

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5017535号
(P5017535)

(45) 発行日 平成24年9月5日(2012.9.5)

(24) 登録日 平成24年6月22日(2012.6.22)

(51) Int. Cl. F 1
A 6 1 K 38/00 (2006.01) A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 48/00 (2006.01) A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 17/14 (2006.01) A 6 1 P 17/14

請求項の数 4 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2006-14408 (P2006-14408)	(73) 特許権者	506307809 株式会社アップウェル 福岡県久留米市荘島町8-5-101
(22) 出願日	平成18年1月23日(2006.1.23)	(74) 代理人	100163647 弁理士 進藤 卓也
(65) 公開番号	特開2007-197330 (P2007-197330A)	(72) 発明者	吉田 隆文 佐賀県鳥栖市秋葉町2-1041
(43) 公開日	平成19年8月9日(2007.8.9)	(72) 発明者	中村 和生 福岡県北九州市若松区赤島町6-11
審査請求日	平成21年1月22日(2009.1.22)	(72) 発明者	山岸 昌一 福岡県久留米市国分1319TFグラウンド シャルマン101
		(72) 発明者	井上 浩義 福岡県久留米市日吉町1番地1アーバンパ レス久留米センターステージ302号 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脱毛抑制または発毛促進用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

皮脂の過剰分泌とともに生じる脱毛の抑制用組成物であって、

(a) 色素上皮由来因子、

(b) ヒト色素上皮由来因子と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列、またはヒト色素上皮由来因子のアミノ酸配列に対して50以下のアミノ酸残基の置換、欠失、および/または付加を有するアミノ酸配列を有し、かつ該色素上皮由来因子(a)と同等の脱毛抑制活性を有する、該色素上皮由来因子(a)の変異体、および

(c) 該因子(a)または該変異体(b)をコードする核酸分子を含むベクターからなる群から選択される活性成分を含有する、組成物。

【請求項2】

前記脱毛の抑制が、毛母細胞のアポトーシス防止による脱毛の抑制である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

脱毛部位への皮下投与用である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記活性成分が、前記(c)のベクターであって、該ベクターがアデノウイルスベクターである、請求項1から3のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脱毛を効果的に予防または治療するための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

毛髪は、皮膚の一部が変化したものであり、皮脂腺や汗腺と一緒に胎児の発育とともに発生する。従って、毛髪は皮膚の発生に伴って発生し、角化が進行して一本の太い髪となる。毛髪は、毛根部にある毛乳頭に存在する毛母細胞がケラチンタンパク質を合成しながら分裂増殖し、毛幹を上方に押し出していくことにより成長する。毛乳頭の底部には、毛細血管が張り巡らされており、この血管からの酸素や栄養の補給が毛母細胞の増殖を支持している。毛髪には一定の寿命があり、成長したあと自然に抜け、再び新しい毛が生えてくる。これを毛周期といい、この毛周期は成長期、退行期、および休止期の3つに分かれている。

10

【0003】

しかし、毛乳頭や毛包への血行不良、毛包や皮脂腺における男性ホルモンの活性化、皮脂の過剰分泌、栄養障害、ストレスなどの様々な原因により毛周期のバランスが崩れると、本来なら成長期の過程にあって抜けるべきではない毛髪が寿命よりも早く抜けてしまう異常脱毛が発生する。

【0004】

脱毛のメカニズムは未だ十分に解明されていないが、皮脂の過剰な分泌による脱毛については、以下のように考えられている。皮膚常在菌の働き、毛穴から分泌された皮脂の酸化などによって、毛穴の入口に角栓が形成され、毛穴が塞がれる。毛穴の中の皮脂は、皮膚の外に排泄されずに毛穴の中で脂栓となり、毛根固着力を低下させる。そのため、現存の毛髪だけでなく新生の毛髪までもが、洗髪またはブラッシングのような刺激に対してさえも抜けやすい状態になる。このように、新生毛髪の寿命はヒトの場合には本来は3～6年であるにもかかわらず、発毛周期（毛周期）が短縮化し、毛が十分に成長しないうちに抜けていく異常脱毛が発生する。さらに、過剰に分泌された皮脂は、毛穴の中で毛母細胞の細胞分裂をも鈍化させ、毛髪の形成を阻害する。現代では、不規則な生活やアンバランスな食生活により、このような皮脂の過剰な分泌が生じやすくなっている。

20

【0005】

色素上皮由来因子（PEDF）は、セリンプロテアーゼ阻害物質のスーパーファミリーに属する糖タンパク質であり、強力なヒト網膜芽細胞腫神経分化活性を有する因子としてヒト網膜色素上皮細胞の馴化培地から初めて精製された（非特許文献1）。

30

【0006】

PEDFは、細胞培養および動物モデルの両方において、血管新生の強力な阻害物質であることが示唆されている。PEDFは、網膜内皮細胞の増殖および移動を阻害し、虚血誘発性網膜新血管形成を抑制することが報告されている（非特許文献2および3）。さらに、PEDFの喪失は、増殖性糖尿病性網膜症における血管形成活性に関連する（非特許文献4）。PEDFは、虚血および加齢による黄斑変性に起因する網膜および脈絡膜新血管形成を効果的に抑制することも知られている（非特許文献3および5）。PEDFは、NADPHオキシダーゼ活性を抑制することにより、糖尿病やアテローム性動脈硬化症のような血管障害の治療および予防に用いられ得ることが見出されている（特許文献1）。

40

【0007】

最近、PEDF欠損マウスが膵臓癌に罹りやすいことも報告されている（非特許文献6）。PEDFは、内皮細胞においてFasリガンドを上方調節し、それによって腫瘍血管特異的にアポトーシス感受性にすることが開示されている（非特許文献7）。このように、PEDFは、腫瘍血管形成を抑制し、癌細胞においてアポトーシスを誘発し、そして悪性黒色腫などの癌細胞の増殖を抑制することから、癌の予防または治療に有効であることが見出されている（特許文献2）。

【特許文献1】特開2005-336159号公報

【特許文献2】特開2005-298473号公報

50

【特許文献3】米国特許第6319687号明細書

【特許文献4】国際公開第03/059248号パンフレット

【特許文献5】国際公開第93/24529号パンフレット

【非特許文献1】Tombran-Tink, J.ら、Exp. Eye Res., 53巻, 411-414頁 (1991年)

【非特許文献2】Dawson, D.W.ら、Science, 285巻, 245-248頁 (1999年)

【非特許文献3】Duh, E.J.ら、Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 43巻, 821-829頁 (2002年)

【非特許文献4】Spranger, J.ら、Diabetes, 50巻, 2641-2645頁 (2001年)

【非特許文献5】Holekamp, N.M.ら、Am. J. Ophthalmol., 134巻, 220-227頁 (2002年)

【非特許文献6】Doll, J.A.ら、Nat. Med., 9巻, 774-780頁 (2003年)

10

【非特許文献7】Volpert, O.V.ら、Nat. Med., 8巻, 349-357頁 (2002年)

【非特許文献8】Steel, F.R.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90巻(4)号, 1526-1530頁 (1993年)

【非特許文献9】Yamagishi, S.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 296巻(4)号, 877-882頁 (2002年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、脱毛を効果的に予防または治療するための組成物を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、脱毛抑制用組成物を提供する。この脱毛抑制用組成物は、

(a) 色素上皮由来因子、

(b) 該色素上皮由来因子(a)と機能的に同等な特性を有する、該因子の変異体、および、

(c) 該因子(a)または該変異体(b)をコードする核酸分子を含むベクターからなる群から選択される活性成分を含有する。

【0010】

本発明はまた、発毛促進用組成物を提供する。この発毛促進用組成物は、

30

(a) 色素上皮由来因子、

(b) 該色素上皮由来因子(a)と機能的に同等な特性を有する、該因子の変異体、および、

(c) 該因子(a)または該変異体(b)をコードする核酸分子を含むベクターからなる群から選択される活性成分を含有する。

【0011】

本発明はさらに、脱毛を抑制するためのベクターを提供する。このベクターは、

(a) 色素上皮由来因子、または

(b) 該色素上皮由来因子(a)と機能的に同等な特性を有する、該因子の変異体をコードする核酸分子を含む。

40

【0012】

本発明はさらに、発毛を促進するためのベクターを提供する。このベクターは、

(a) 色素上皮由来因子、または

(b) 該色素上皮由来因子(a)と機能的に同等な特性を有する、該因子の変異体をコードする核酸分子を含む。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、脱毛を効果的に予防または治療するための組成物が提供される。本発明の組成物は、皮脂が過剰に分泌されていても、脱毛の予防および治療に有用である。さらに、発毛促進にも有用である。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、脱毛抑制用組成物および発毛促進用組成物を提供する。「脱毛抑制用組成物」とは、脱毛を抑制する作用を有する組成物をいい、この組成物は、例えば、皮脂の過剰分泌が生じた際に、脱毛が起こるのを抑制する。「発毛促進用組成物」とは、毛を生やす作用を有する組成物をいい、この組成物は、毛の形成および成長を促進し得る。

【0015】

(1) 本発明の組成物に含有される活性成分

本発明の組成物では、活性成分は、以下からなる群から選択される：

- (a) 色素上皮由来因子、
- (b) 該色素上皮由来因子(a)と機能的に同等な特性を有する、該因子の変異体、および、
- (c) 該因子(a)または該変異体(b)をコードする核酸分子を含むベクター。

10

【0016】

(1-1) タンパク質

本発明において、単に「色素上皮由来因子」または「PEDF」と称する場合は、色素上皮由来因子タンパク質を意味する。PEDFは、脱毛抑制活性および/または発毛促進活性を有する。さらに、PEDFは、毛母細胞を含む毛根部の細胞のアポトーシスを防止し得る。

【0017】

本発明において、PEDFとしては、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、およびウマのような哺乳類由来の全種類のPEDFを含み、ヒト由来のPEDFが好ましい。ヒトPEDFのアミノ酸配列およびこれをコードする核酸配列は、非特許文献8に記載されており、GenBank/EMBLデータベースにaccession no. M76979で登録されている。

20

【0018】

PEDFは、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989年)のような多くの出版物および参考文献に記載の手順に従って、該タンパク質をコードするDNAを発現させることにより産生することができる。より具体的には、該タンパク質をコードするDNAを適切な発現ベクター(例えば、pBK-CMV)に挿入することによって、発現プラスミドを構築する。そして、その発現プラスミドを適切な宿主細胞に導入し、形質転換細胞を得る。宿主細胞の例としては、大腸菌のような原核生物、酵母のような単細胞性真核生物、ならびに昆虫および動物のような多細胞性真核生物の細胞が挙げられる。発現プラスミドは、リン酸カルシウム法、電気穿孔法、リポフェクション法などのような当業者が通常用いる方法により宿主細胞へ導入することができる。所望のタンパク質は、当業者が通常用いる方法に従い、適切な培地中で該形質転換体を培養することにより産生される。このようにして得られたタンパク質は、標準的生化学的手法に従って、単離精製することができる。

30

【0019】

本明細書で用いる場合、「PEDFと機能的に同等な特性を有するPEDFの変異体」には、ヒトPEDFと機能的に同等な特性を有するすべての種類のPEDF変異体が含まれる。PEDFの変異体は、例えば、特許文献3~5などに記載されている。

40

【0020】

PEDF変異体の好ましい例には、ヒトPEDFのアミノ酸配列(例えば、上記非特許文献8に記載のアミノ酸配列)に対して、1つまたは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、および/または付加を有するアミノ酸配列を含み、かつヒトPEDFと機能的に同等な特性を有するPEDFの変異体が含まれる。当業者であれば、例えば、部位特異的変異導入法などの当業者が通常用いる手法を用いて、適宜置換、欠失、および/または付加変異を導入することにより、タンパク質の構造を改変することができる。本発明において、置換、欠失、および/または付加することができるアミノ酸残基数は、通常120以下、例えば100以下、80以下、50以下、あるいは20以下、好ましくは16以下、より好ま

50

しくは5以下、さらに好ましくは0～3アミノ酸残基である。また、アミノ酸の変異は自然界において生じることもあるので、人工的にアミノ酸を変異したタンパク質のみならず、自然界においてアミノ酸が変異したタンパク質も、ヒトPEDFと機能的に同等な特性を有する限り、本発明の組成物に使用することができる。

【0021】

上記ヒトPEDFのアミノ酸配列(例えば、上記非特許文献8に記載のアミノ酸配列)と相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質も、ヒトPEDFと機能的に同等な特性を有する限り、本発明の組成物に使用することができる。PEDF変異体は、好ましくは、上記ヒトPEDFのアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、なおより好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の相同性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であり得る。タンパク質の相同性(ホモロジー)検索は、例えば、SWISS-PROT、PIR、DADなどのタンパク質のアミノ酸配列に関するデータベース、DDBJ、EMBL、GenBankなどのDNA配列に関するデータベース、DNA配列を元にした推定アミノ酸配列に関するデータベースなどを対象に、BLAST、FASTAなどのデータ解析プログラムを利用して、例えば、インターネットを通じて行うことができる。このようなPEDF変異体もまた、上述の組換え技術によって調製することができる。

10

【0022】

ヒトPEDFと機能的に同等な特性とは、ヒトPEDFと同等の脱毛抑制活性または発毛促進活性を有すること、またはヒトPEDFと同等に毛母細胞を含む毛根部の細胞のアポトーシスを防止し得ることを意味する。

20

【0023】

前述のように調製した変異体がPEDFと機能的に同等な特性を有するか否かは、本明細書で後述する実施例に従って証明することができる。

【0024】

(1-2)核酸分子およびベクター

本明細書中で使用する「核酸分子」という用語は、一本鎖または二本鎖であり得るDNAおよびRNAを含む。核酸分子は、典型的なDNA合成または遺伝子工学的な方法、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989)のような標準テキストに記載の方法によって容易に調製される。

30

【0025】

ヒトPEDFをコードする核酸分子は、上述したように、その配列が非特許文献8に記載されており、GenBank/EMBL accession no. M76979で登録されている。好ましくは、この非特許文献8に記載の核酸配列を有する核酸分子が、本発明の組成物に用いられる。

【0026】

本発明の組成物に用いられる核酸分子としては、上記(1-1)のヒトPEDFと機能的に同等な特性を有するタンパク質をコードする核酸分子も挙げられる。当業者であれば、非特許文献8に記載の核酸配列に部位特異的変異導入法などの当業者が通常用いる手法を用いて、適宜置換、欠失、および/または付加変異を導入することによりポリヌクレオチドのホモログを得ることが可能である。

40

【0027】

このような核酸分子は、被験体においてPEDFまたはその変異体が発現されて脱毛抑制活性または発毛促進活性を示すように、被験体に投与され得る。この目的のために、核酸分子はベクターに組み込まれてインビボ投与され得る。

【0028】

核酸分子を組み込むためのベクターとしては、従来から使用されている遺伝子治療に有用なベクターを使用できる。このようなベクターとしては、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルスあるいはシンドビスウイルスのようなDNAまたはRNAウイ

50

ルスに核酸分子を組み込んで細胞に導入するウイルスベクターが挙げられる。これらの中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルスあるいはヘルペスウイルスを使用するものは、特に好適である。ベクターの具体的な例としては、pAd/CMV/V5-DEST Gatewayベクター (Invitrogen) などが挙げられる。

【0029】

本発明はまた、このような核酸分子が組み込まれたベクター自身を包含する。

【0030】

例えば、本発明のベクターは、以下の手順により生成され得る。PEDFのcDNAを、例えば、非特許文献9に記載のように、ヒト胎盤cDNAライブラリー(例えば、Clontech, Palo Alto, CAより入手可能)より単離し得る。これを市販のアデノウイルスベクター(例えば、pAd/CMV/V5-DEST Gatewayベクター (Invitrogen))に、当業者が通常用いる方法を用いて組み込み得る。PEDF遺伝子が組み込まれた市販のベクターもまた、PEDFまたはその変異体の投与のために用いられ得る。

10

【0031】

(2)本発明の組成物

本発明の組成物は、上記(1)の活性成分を含み、脱毛を抑制する作用を示す。本発明の組成物はまた、発毛を促進する作用も示す。さらに、毛母細胞を含む毛根部の細胞のアポトーシスまたは細胞死を防ぎ得る。

【0032】

本発明の組成物は、ヒトの頭皮の脱毛予防および発毛促進に加え、動物の脱毛予防および発毛促進(例えば、ミンクなどの毛皮用動物の発毛、ペット動物の脱毛予防など)にも使用可能である。本発明の組成物は、特に、脱毛を生じた皮脂の過剰分泌がさらに続く条件下にあっても、発毛作用を示し得る。したがって、皮脂の過剰分泌とともに生じる脱毛の予防および治療のために特に有用である。

20

【0033】

本発明の組成物は、その効果を発揮できる限り、投与剤形および投与経路は特に限定されない。通常は、生理学的に許容可能な担体、賦形剤などと混合して、経口または非経口的な投与または適用に適切な形態にされる。

【0034】

本発明の組成物中の活性成分がタンパク質である場合、経口または非経口のいずれでもよい。例えば、脱毛の抑制または発毛を希望する部位への直接塗布、散布、噴霧、または皮下注射などのような手段を用いて投与してもよい。

30

【0035】

本発明の組成物中の活性成分がベクターである場合、注射(静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射など)により被験体に投与され得る。ヒトの場合、ベクターに組み込まれた核酸分子が、頭皮における脱毛を抑制するか、または頭皮の脱毛部での発毛を促進するタンパク質として発現されることが望ましい。

【0036】

経口投与のための剤形としては、具体的には錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。このような剤形は、当業者が通常用いる方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体もしくは賦形剤を含有し得る。

40

【0037】

非経口投与または適用のための剤形としては、例えば、軟膏剤、注射剤、湿布剤、塗布剤、経皮吸収剤、局所徐放剤などが挙げられる。上記剤形は、当業者が通常用いる方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体もしくは賦形剤を含有し得る。本発明の組成物はまた、例えば、ローション剤、乳剤、ゲル剤、クリーム剤、軟膏剤などの種々の形態に加工され得る。

【0038】

注射剤などの溶液製剤は、当業者が通常用いる方法、例えば、活性成分を、通常注射剤に用いられ得る無菌の水溶液に溶解または懸濁して、あるいはさらには乳化してリポソ-

50

ムに封入した状態で調製され得る。固体製剤は、当業者が通常用いる方法、例えば、活性成分にマンニトール、トレハロース、ソルビトール、ラクトース、グルコース、デンプンなどを賦形剤として加え、凍結乾燥物として調製され得る。さらにこれを粉体化して用いることもできる。また、これら粉体をポリ乳酸やグリコール酸などと混合し、固形化してもよい。ゲル化剤は、当業者が通常用いる方法、例えば、活性成分をグリセリン、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などの増粘剤や多糖に溶解した状態で調製され得る。

【0039】

上記のいずれの製剤においても、分散剤または吸収促進剤として活性成分の生理活性を損なわない範囲でアルコール、糖アルコール、イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤などを添加することができる。また、微量金属や有機酸塩も必要に応じて加えることができる。

10

【0040】

本発明の組成物における活性成分の効果を減じない範囲で、必要に応じて、その他の当業者が通常用いる成分、例えば、抗酸化剤、防腐剤、着色剤、安定化剤、溶解補助剤、粘度調整剤、清涼化剤、香料などを加えてもよい。

【0041】

投与量は、投与対象の年齢、体重、性別、投与対象疾患、症状、投与形態、投与経路などに応じて適宜決定され得る。活性成分がタンパク質の場合、代表的には、0.0001mg~100mg、好適には0.001mg~100mg、より好適には0.01mg~10mg、活性成分がベクターの場合、代表的には、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ pfu、好適には $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ pfu、より好適には $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ pfuの活性成分を、毎日（日に1回から数回に分けて投与することができる）、あるいは数日毎から数ヶ月毎に投与または適用する。したがって、本発明の組成物中の活性成分は、このような投与または適用が可能な量になるように、製剤中に含有される。

20

【0042】

本発明の組成物は、他の公知の発毛促進剤、育毛剤、養毛剤などと併用することも可能である。

【実施例】

【0043】

以下に示す実施例によって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例はいかなる意味においても本発明を制限するものではない。

30

【0044】

実施例では、PEDFをマウスに投与するために、市販のベクターAdenoVecTM-hPEDF (InvivoGenより購入)を用いた。これは、アデノウイルスゲノムを骨格とし、ヒトPEDF遺伝子を含むベクターである。以下、このベクターをPEDF発現アデノベクターという。コントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)もしくはアデノウイルスベクターpAd-LacZ (Invitrogenより購入)を投与した。投与は、尾静脈からの静脈内注射または大腿筋肉への筋肉内注射により行った。

【0045】

(実施例1: PEDFの脱毛抑制活性)

6~8週齢の体重18~20gのC57BL6/Jマウス(クレアより購入)を特定病原体未感染条件下において10週間飼育した。飼育方法は、久留米大学動物実験倫理委員会もしくは米国農務省(USDA)の「the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」のガイドラインに沿って許可されたプロトコルに従って行った。

40

【0046】

マウスをランダムに約20~30匹ずつ12群に分けた。これらの群は、以下の通りであった:

1. PEDF発現アデノベクターを静脈内注射し、コリン欠乏食を給餌した;
2. PEDF発現アデノベクターを筋肉内注射し、コリン欠乏食を給餌した;

50

- 3 . pAd-LacZを静脈内注射し、コリン欠乏食を給餌した；
- 4 . pAd-LacZを筋肉内注射し、コリン欠乏食を給餌した；
- 5 . P B S を静脈内注射し、コリン欠乏食を給餌した；
- 6 . P B S を筋肉内注射し、コリン欠乏食を給餌した；
- 7 . P E D F 発現アデノベクターを静脈内注射し、コリン欠乏食を給餌しなかった；
- 8 . P E D F 発現アデノベクターを筋肉内注射し、コリン欠乏食を給餌しなかった；
- 9 . pAd-LacZを静脈内注射し、コリン欠乏食を給餌しなかった；
- 10 . pAd-LacZを筋肉内注射し、コリン欠乏食を給餌しなかった；
- 11 . P B S を静脈内注射し、コリン欠乏食を給餌しなかった；および
- 12 . P B S を筋肉内注射し、コリン欠乏食を給餌しなかった。

10

【0047】

コリン欠乏食給餌群では、試験開始日から、マウスに低蛋白高脂肪のコリン欠乏食を自由に摂食させた。このコリン欠乏食の組成（単位は質量％）は、ビタミンフリーカゼイン 8.000；ラード 37.950；グラニュー糖 48.375；L-シスチン 0.625；ビタミン Mix 1.000；ミネラル Mix 4.000；および油性ビタミン混合物 0.050である。ここで、ビタミン Mix は、以下の組成（単位は mg / 飼料 g）：ビタミン K 3 0.3125、ビタミン B 1 0.3125、ビタミン B 2 0.5000、ビタミン B 6 0.3125、DL-パントテン酸 Ca 1.2500、ナイアシン 1.2500、残りはグラニュー糖を有し、ミネラル Mix は、以下の組成（単位は mg / 飼料 100 g 中）：Ca (H₂PO₄)H₂O 585.000、乳酸 Ca 1,328.000、クエン酸 Fe 118.800、MgSO₄・7H₂O 548.000、K₂HPO₄ 959.200、NaH₂PO₄・2H₂O 453.600、および NaCl 174.000を有し、油性ビタミン混合物は、以下の組成（単位は mg / 飼料 100 g 中）：ビタミン A (50万 IU / g) 2.5000、ビタミン D 3 (50万 IU / g) 0.6250、ビタミン E 25.0000、およびピーナッツ油 21.8750を有する。コリン欠乏食を給餌しない群では、通常の食餌を与えた。

20

【0048】

試験開始日（0日目）に、PEDF発現アデノベクター、アデノウイルスベクター-pAd-LacZ、またはPBSを投与した。投与経路に関わらず、PBSは100μl、アデノウイルスベクター-pAd-LacZ 1×10⁸ pfu（PBSで容量を100μlとする）、PEDF発現アデノベクター 1×10⁸ pfu（PBSで容量を100μlとする）の量で投与した。投与の翌日からマウスの体毛の状態を1日1回観察した。試験開始日から5週後（この頃にベクターによる遺伝子発現が低下する）、コリン欠乏食を継続摂取中のマウスに、PEDF発現アデノベクター、またはコントロールとしてPBSもしくはアデノウイルスベクター-pAd-LacZを再度、同様に投与した。試験開始日から10週後まで観察を続けた。以下、PEDF発現アデノベクターを投与したマウスをPEDF投与マウス、PBSまたはpAd-LacZを投与したマウスをコントロールマウスという場合がある。

30

【0049】

図1は、コリン欠乏食投餌開始6週後のPEDF投与マウス（PEDF群；左側の4匹のマウス）およびコントロールマウス（Control群；右側の4匹のマウス）の体毛の状態を示す写真である。マウスは、通常の状態では、ふさふさとした黒い体毛を有する。コリン欠乏食を給餌しなかった群においては、いずれもふさふさとした黒い体毛を有した。しかし、脱毛が生じるにつれ、体毛の色は薄くなり肌色の皮膚を露出するようになる。PEDF群は、ふさふさとした黒い体毛を有するが、PBSまたはpAd-LacZを投与したControl群は、背中での体毛の色が薄くなり、皮膚が露出していた。Control群では、コリン欠乏食投餌開始2週後より脱毛が見られた。このように、PEDF群では、明らかに脱毛の抑制が認められた。結果は、静脈内注射による投与でも筋肉内注射による投与でも同様であった。

40

【0050】

さらに、コントロールマウスの脱毛部分およびPEDF投与マウスの対応部分（脱毛は

50

生じていない)の皮膚を剥ぎ取り、そのパラフィン包埋切片を作製し、組織学的観察を行った。皮膚切片標本をヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。この染色では、細胞核は青紫に染まり、その他の細胞質などは赤系色に染まる。染色は、以下の手順で行った：(1)脱パラフィンおよび蒸留水による洗浄、(2)カラッチのヘマトキシリン液に20分間浸漬、(3)軽く水洗、(4)1%塩酸含有70%アルコール溶液で分別、(5)色出し後に10分間水洗、(6)軽く80%エタノールに通した後、10分間エオジン液に浸漬、(7)軽く水洗、(8)脱水、透徹、封入する。

【0051】

ヘマトキシリンおよびエオジン(H.E.)で染色したコントロールマウスの脱毛部分およびPEDF投与マウスの皮膚切片の顕微鏡写真を図2に示す。PEDF投与マウス(PEDF群)の皮膚切片では、毛根が淡黒色にきれいに染まり、毛母細胞が生きることが分かった。一方、コントロールマウス(Control群)の皮膚切片では、毛根の残骸しか見られず、毛母細胞が何らかの理由により死んでいることが示唆された。

10

【0052】

これとは別に、皮膚切片標本をApop-Tagおよびメチルグリーンでも染色した。Apop-Tagでは、アポトーシスを起こした細胞の核が茶色に染まる。メチルグリーンでは、核中のDNAが緑青色に染まり、核小体中のRNAが赤色に染まるので、細胞の核が茶色に染まる。Apop-Tag染色は、ApopTag(登録商標)In Situ Apoptosis検出キット(ケミコン社から発売)を用いて行った。このキットでは、アポトーシス細胞のDNA断片末端をTdT(末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ)を使用してインサイチュで標識し、特異的染色によってアポトーシス細胞を検出する。メチルグリーン染色は、以下の手順で行った：(1)脱パラフィンおよび蒸留水による洗浄、(2)10~15分メチルグリーン・ピロニン液に浸漬、(3)急いで蒸留水で水洗(スライドの染色液が落ちる程度)、(4)n-ブタノールI・II・IIIで分別し、脱水、(5)透徹、封入する。

20

【0053】

コントロールマウス(Control群)では、表皮層にかけて茶色が多く、細胞がアポトーシスを起こしていることが分かった。核染色の結果からも、毛母細胞を含む細胞が壊れていることが分かった。一方、PEDF投与マウス(PEDF群)では、アポトーシスはほとんど見られなかった。核染色の結果から、細胞が秩序だって並んでいることが分かった(データは示さず)。

30

【0054】

(実施例2：PEDFの発毛促進活性)

上記実施例1においてPEDFが脱毛を抑制することが判明したので、本実施例では、一旦脱毛した状態からの新たな発毛をPEDFが促進し得るかどうかについて検討した。

【0055】

上記実施例1と同様にして、マウスにコリン欠乏食を14日間給餌し、脱毛を生じさせた。コリン欠乏食投餌開始から4週後に、脱毛部の皮下に、PEDF発現アデノベクター 1×10^8 pfu(PBSで容量を $100 \mu\text{l}$ とする)、またはコントロールとしてPBS $100 \mu\text{l}$ もしくはアデノウイルスベクター-pAd-LacZ 1×10^8 pfu(PBSで容量を $100 \mu\text{l}$ とする)を1回投与した。

40

【0056】

図3は、コリン欠乏食を継続摂取中のマウスにおけるPEDF発現アデノベクター投与前(左)およびPEDF発現アデノベクター投与2週後(右)の体毛の状態を示す写真である。PEDF発現アデノベクター投与前のマウスでは、脱毛が生じているため、体毛の色が薄くなり、皮膚が露出した部分が見られた。これに対して、PEDF発現アデノベクター投与後のマウスでは、毛が生えてきており、黒い体毛が生えるまで回復した部分も見られた。このように、コリン欠乏食を継続摂取しているにも関わらず、PEDF発現アデノベクターの投与によって、投与した部分を中心として徐々に発毛していることが確認された。一方、コントロールマウス(Control群：PBSもしくはアデノウイルスベクターAd-LacZを投与)では、このような発毛は認められなかった(データは示さず)。

50

【産業上の利用可能性】

【0057】

本発明によれば、脱毛を効果的に予防または治療するための組成物が提供される。本発明の組成物は、ヒトの頭皮の脱毛予防および発毛促進、ならびに動物の脱毛予防および発毛促進（例えば、ミンクなどの毛皮用動物の発毛、ペット動物の脱毛予防など）に使用可能である。特に、皮脂の過剰分泌とともに生じる脱毛の予防および治療のために有用である。

【図面の簡単な説明】

【0058】

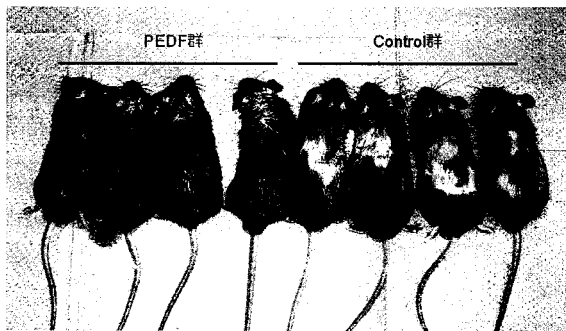
【図1】コリン欠乏食投餌開始6週後のPEDF投与マウス（PEDF群）およびコントロールマウス（Control群）の体毛の状態を示す写真である。

10

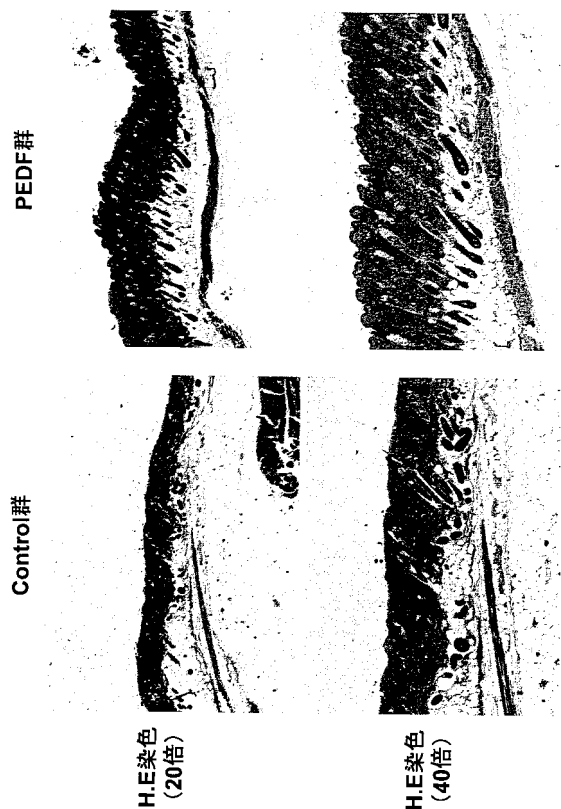
【図2】PEDF投与マウス（PEDF群）およびコントロールマウス（Control群）においてヘマトキシリンおよびエオジン（H.E.）で染色した皮膚切片の顕微鏡写真である。

【図3】コリン欠乏食を継続摂取中のマウスにおけるPEDF発現アデノベクター投与前およびPEDF発現アデノベクター投与2週後の体毛の状態を示す写真である。

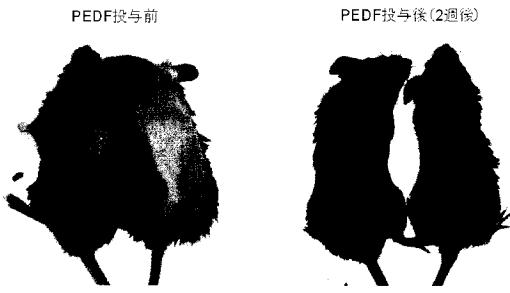
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

審査官 池上 京子

(56)参考文献 特表2004-516001(JP,A)

特表2001-510804(JP,A)

HASE,R. et al, Pigment epithelium-derived factor gene therapy inhibits human pancreatic cancer in mice, Clin Cancer Res, 2005年, Vol.11, No.24 Pt 1, p.8737-44

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00 - 38/58

A61K 48/00

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)