

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4565112号
(P4565112)

(45) 発行日 平成22年10月20日(2010.10.20)

(24) 登録日 平成22年8月13日(2010.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15	Z
請求項の数 15 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-268242 (P2004-268242)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成16年9月15日(2004.9.15)		独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号	特開2006-83082 (P2006-83082A)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日	平成18年3月30日(2006.3.30)	(72) 発明者	今村 亨
審査請求日	平成18年10月13日(2006.10.13)		茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
		(72) 発明者	川野 光子
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
		(72) 発明者	倉持 明子
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
		(72) 発明者	鈴木 理
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

F G F - 1 8 の全長又は配列番号2に示されるアミノ酸配列における55~177番目の領域を含むF G F - 1 8の部分ペプチドを有効成分として含有する毛髪成長促進剤。

【請求項2】

他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むことを特徴とする請求項1記載の毛髪成長促進剤。

【請求項3】

F G F - 1 8 の全長又は配列番号2に示されるアミノ酸配列における55~177番目の領域を含むF G F - 1 8の部分ペプチドを有効成分として含有する発毛促進剤。

【請求項4】

他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むことを特徴とする請求項3記載の発毛促進剤。

【請求項5】

F G F - 1 8 の全長又は配列番号2に示されるアミノ酸配列における55~177番目の領域を含むF G F - 1 8の部分ペプチドを有効成分として含有する脱毛症治療剤。

【請求項6】

他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むことを特徴とする請求項5記載の脱毛症治療剤。

【請求項7】

FGF-18の全長又は配列番号2に示されるアミノ酸配列における55～177番目の領域を含むFGF-18の部分ペプチドをコードするcDNAを組み込んだ発現ベクターを有効成分として含有する毛髪成長促進剤。

【請求項8】

他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むことを特徴とする請求項7記載の毛髪成長促進剤。

【請求項9】

FGF-18の全長又は配列番号2に示されるアミノ酸配列における55～177番目の領域を含むFGF-18の部分ペプチドをコードするcDNAを組み込んだ発現ベクターを有効成分として含有する発毛促進剤。

10

【請求項10】

他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むことを特徴とする請求項9記載の発毛促進剤。

【請求項11】

FGF-18の全長又は配列番号2に示されるアミノ酸配列における55～177番目の領域を含むFGF-18の部分ペプチドをコードするcDNAを組み込んだ発現ベクターを有効成分として含有する脱毛症治療剤。

【請求項12】

他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むことを特徴とする請求項11記載の脱毛症治療剤。

20

【請求項13】

被検物質を動物培養細胞又はヒト以外の実験動物に接触させる工程と、動物培養細胞又はヒト以外の実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする工程とを含み、FGF-18遺伝子の発現を促進する機能を有する被検物質を毛髪成長剤の候補とする、スクリーニング方法。

【請求項14】

被検物質を動物培養細胞又はヒト以外の実験動物に接触させる工程と、動物培養細胞又はヒト以外の実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする工程とを含み、FGF-18遺伝子の発現を促進する機能を有する被検物質を発毛促進剤の候補とする、スクリーニング方法。

30

【請求項15】

被検物質を動物培養細胞又はヒト以外の実験動物に接触させる工程と、動物培養細胞又はヒト以外の実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする工程とを含み、FGF-18遺伝子の発現を促進する機能を有する被検物質を脱毛症治療剤の候補とする、スクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、毛包（毛根と同義）の成長を促進する成分を含有する毛髪成長促進剤、発毛促進剤、脱毛症治療剤及びそれらのスクリーニング方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

繊維芽細胞増殖因子（以下FGFと称する）といった様々なポリペプチド増殖因子が皮膚組織において発現していることが知られている。マウス及びヒトにおいては、FGFは22種類の異なる遺伝子によってコードされる（非特許文献1）。特に、FGF-1、FGF-2、FGF-5、FGF-7、FGF-10、FGF-13及びFGF-22は、皮膚細胞及び毛包細胞において発現し、毛髪成長及び皮膚再生を制御していることが報告されている（非特許文献2～17参照）。

【0003】

また、特許文献1には、FGF-5による毛髪成長促進方法及び禿頭症治療方法が開示されている。しかしながら、非特許文献13に開示されているように、FGF-5遺伝子産物は、

50

毛包細胞を退行期に誘導する機能を有することが知られている。よって、特許文献1に開示されているFGF-5を用いて、毛髪の成長を促進したり、禿頭症を治療するといったことは現実的ではない。なお、特許文献1の明細書を詳細に検討しても、FGF-5が毛髪の成長を促進するといった作用があることを何ら実証していない。

【0004】

上掲した非特許文献2～17を含む他の文献から、FGFが皮膚細胞の増殖及び分化に重要な役割を担っていることが示唆される。しかしながら、毛包の成長を促進する作用、それに伴う毛髪成長促進作用及び発毛促進作用に対して、FGF群がどのように関与するのかといった知見は依然として不明のままである。

【0005】

【非特許文献1】Ornitz DM, Itoh N: Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3005, 2001

【非特許文献2】du Cros DL: Fibroblast growth factor and epidermal growth factor in hair development. *J Invest Dermatol* 101:106S-113S, 1993

【非特許文献3】du Cros DL, Isaacs K, Moore GP: Distribution of acidic and basic fibroblast growth factors in ovine skin during follicle morphogenesis. *J Cell Sci* 105:667-674, 1993

【非特許文献4】Hebert JM, Rosenquist T, Gotz J, Martin GR: FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: Evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78:1017-1025, 1994

【非特許文献5】Danilenko DM, Ring BD, Yanagihara D, Benson W, Wiemann B, Starneck CO, Pierce GF: Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. *American J Pathol* 147:145-154, 1995

【非特許文献6】Marchese C, Chedid M, Dirsch OR, et al: Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in reepithelializing human skin. *J Exp Med* 182:1369-1376, 1995

【非特許文献7】Guo L, Degenstein L, Fuchs E: Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. *Genes Dev* 10:165-175, 1996

【非特許文献8】Rosenquist TA, Martin GR: Fibroblast growth factor signalling in the hair growth cycle: Expression of the fibroblast growth factor receptor and ligand genes in the murine hair follicle. *Developmental Dynamics* 205:379-386, 1996

【非特許文献9】Petho-Schramm A, Muller HJ, Paus R: FGF5 and the murine hair cycle. *Arch Dermatol Res* 288:264-266, 1996

【非特許文献10】Mitsui S, Ohuchi A, Hotta M, Tsuboi R, Ogawa H: Genes for a range of growth factors and cyclin-dependent kinase inhibitors are expressed by isolated human hair follicles. *Br J Dermatol* 137:693-698, 1997

【非特許文献11】Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C: Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5672-5677, 1998

【非特許文献12】Suzuki S, Kato T, Takimoto H, et al: Localization of rat FGF-5 protein in skin macrophage-like cells and FGF-5 protein in hair follicle: Possible involvement of two Fgf-5 gene products in hair growth cycle regulation. *J Invest Dermatol* 111:963-972, 1998

【非特許文献13】Suzuki S, Ota Y, Ozawa K, Imamura T: Dual-mode regulation of hair growth cycle by two Fgf-5 gene products. *J Invest Dermatol* 114:456-463, 2000

【非特許文献14】Nakatake Y, Hoshikawa M, Asaki T, Kassai Y, Itoh N: Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochem Biophys Acta* 1517:460-463, 2000

10

20

30

40

50

1

【非特許文献15】Stenn KS, Paus R: Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 81:449-494, 2001

【非特許文献16】Beyer TA, Werner S, Dickson C, Grose R: Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Exp Cell Res* 287:228-236, 2003

【非特許文献17】Kawano M, Suzuki S, Suzuki M, Oki J, Imamura T: Bulge- and basal layer-specific expression of fibroblast growth factor 13 (FHF-2) in mouse skin. *J Invest Dermatol* 122:1084-1090, 2004

【特許文献1】特開平4-224522号公報

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、毛包の成長を促進する作用を解明し、新規な毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した目的を達成するため本発明者らは、毛包と毛の成長に重要な働きをするFGF遺伝子を特定するために、FGFファミリーに属する22遺伝子全ての発現を、毛成長周期の各ステージ（休止期、成長期及び退行期）で網羅的に検索したところ、これまで皮膚でその機能の知られていなかったFGF-18遺伝子の発現レベルが高いことを発見した。また、本発明者等は、FGF-18に関する詳細な機能解析を行ったところ、FGF-18には毛包成長の司令塔と考えられる毛乳頭細胞の増殖を促進する機能があることを見出した。そして、本発明者らは、このような新規な知見に基づいて、FGF-18が毛成長を促進することを推定し、それを実験的に確認することによって、本発明を完成するに至った。

20

【0008】

すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) FGF-18の全長又は部分ペプチド若しくはFGF-18の全長又は部分ペプチドをコードするcDNAを組み込んだ発現ベクターを有効成分として含有する毛髪成長促進剤。

(2) FGF-18の全長又は部分ペプチド若しくはFGF-18の全長又は部分ペプチドをコードするcDNAを組み込んだ発現ベクターを有効成分として含有する発毛促進剤。

30

(3) FGF-18の全長又は部分ペプチド若しくはFGF-18の全長又は部分ペプチドをコードするcDNAを組み込んだ発現ベクターを有効成分として含有する脱毛症治療剤。

上記(1)～(3)の剤は、他のタンパク質増殖因子及び/又は毛髪成長促進剤を更に含むものであっても良い。

【0009】

他のタンパク質増殖因子としては、表皮増殖因子、血小板由来増殖因子、FGFファミリーに属するFGF-18以外の因子、トランスフォーミング増殖因子- α 、トランスフォーミング増殖因子- β 、トランスフォーミング増殖因子- γ スーパーファミリーに属する因子、インシュリン様増殖因子-I及びインシュリン様増殖因子-IIを挙げることができる。上記(1)～(3)の剤は、これら他のタンパク質増殖因子のうち一種を含むものであっても良いが、複数種を含むものであっても良い。またこれらに限定されるものではない。

40

【0010】

毛髪成長促進剤としては、ミノキシジル、ミノキシジル類縁体、ミノキシジル誘導体、抗アンドロゲン及び5 α -還元酵素阻害剤、Finasteride（プロペシア）、を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。上記(1)～(3)の剤は、これら毛髪成長促進剤のうち一種を含むものであっても良いが、複数種を含むものであっても良い。

【0011】

また、本発明は以下を包含する。

(4) 被検物質を動物培養細胞又は実験動物に接触させる工程と、動物培養細胞又は実

50

験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする工程とを含み、FGF-18遺伝子の発現を促進する機能を有する被検物質を毛髪成長剤の候補とする、スクリーニング方法。

(5) 被検物質を動物培養細胞又は実験動物に接触させる工程と、動物培養細胞又は実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする工程とを含み、FGF-18遺伝子の発現を促進する機能を有する被検物質を発毛促進剤の候補とする、スクリーニング方法。

(6) 被検物質を動物培養細胞又は実験動物に接触させる工程と、動物培養細胞又は実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする工程とを含み、FGF-18遺伝子の発現を促進する機能を有する被検物質を脱毛症治療剤の候補とする、スクリーニング方法。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、毛包の成長を促進することによる毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤を提供することができる。本発明に係る毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤によれば、禿頭及び薄毛頭における毛髪の成長、発毛の促進及び脱毛症の治療をより効果的に達成することができる。

【0013】

また、本発明に係るスクリーニング方法によれば、毛髪成長剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤として有効な物質をスクリーニングすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0015】

本発明を適用することによって、新規な毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤を提供することができる。これら毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、FGF-18の全長又は部分ペプチドを含有する点、及び毛包（毛根と呼ばれる場合もある）の成長を促進する作用を有する点で共通する。

【0016】

毛包とは、毛を作る器官である。毛包の成長周期は、成長期（anagen）、退行期（catagen）、退行期に続く休止期（telogen）からなり、休止期の後に成長期に入るというサイクルである。一般に、マウスの実験系では、成長期は脱毛後1～19日目の期間であり、退行期は20～21日目の期間である。また、脱毛後、21～22日目に休止期に入ることが知られている。成長期においては、新しい毛の成長（伸長）が活発化するとともに、皮膚内では毛包の成長が活発化して、その底部が皮膚の下部近傍に到達する。一方、休止期においては、毛包は皮膚の浅いところに小さい状態で存在する。また、成長期と休止期とでは皮膚の厚さも全く異なる。さらに成長期の初期にはメラニン色素が合成され、皮膚が青くなっているのを視認することができる。したがって、皮膚の外側から青い色を見て毛包の成長周期の進行を評価することもできる。また、成長期に皮膚を切開して裏側から見ると、メラニン色素を多量に含んだ毛包が高い密度で並ぶこととなるため、皮膚の裏側が黒まっているのを視認することができる。これに対して休止期においては、皮膚の裏側は白いままであることを視認することができる。例えば、マウスの実験系では、生後7～8週齢のマウスの背中の毛は全て休止期にあり、また、生えている毛を抜くことにより、同調して成長期が開始する。

【0017】

1. FGF-18

本発明に係る新規な毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤に含まれるFGF-18は、例えば配列番号2に示すアミノ酸配列からなるヒト由来のFGF-18を使用することができる。また、使用可能なFGF-18としては、ヒト由来に限定されず、例えば、他の哺乳動物由来のFGF-18を使用することができる。他の哺乳動物としては、マウス、ラット、ニワトリ、七面鳥、ウシ、ブタ、ヒツジ及びウサギ等を挙げることができるが、これらに限定されない。例えば、配列番号1に示すヒト由来FGF-18の塩基配列に基づいて作製したプローブを定法に従って用いれば、ヒトを除く他の哺乳動物からFGF-18をコードする遺伝子を単離

10

20

30

40

50

することができる。

【0018】

ヒト由来FGF-18の塩基配列及びアミノ酸配列をそれぞれ配列番号1及び2に示す。マウス由来FGF-18のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号3に示す。ラット由来FGF-18のアミノ酸配列を配列番号4に示す。ニワトリ由来FGF-18のアミノ酸配列を配列番号5に示す。これら配列番号2、3、4及び5に示すアミノ酸配列を比較すると判るように、哺乳動物においてFGF-18は非常に高い相同性を有しており、哺乳動物におけるFGF-18の機能はほぼ同様であると理解することができる。

【0019】

なお、配列番号2、3、4及び5に示すアミノ酸配列のうち、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び付加されたアミノ酸配列からなり、毛包の成長促進作用があるタンパク質であれば、本願におけるFGF-18に含まれる。ここで、数個のアミノ酸とは、例えば2～54個、より好ましくは2～27個を意味する。

【0020】

例えば、配列番号2に示すアミノ酸配列における55～177番目の領域は、様々なFGFに共通するコア部分であると考えられる。したがって、配列番号2に示すアミノ酸配列における55～177番目の領域を除く領域であれば、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換及び付加されたとしても、毛包の成長促進作用を欠損することなく本願におけるFGF-18として使用することができる。

【0021】

また、本発明に係る新規な毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、上述したFGF-18の部分断片であっても良い。FGF-18の部分断片としては、例えば配列番号2における55～177番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドを挙げることができる。すなわち、55～177番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドであっても、受容体とヘパリンに結合し、毛包の成長を促進する作用を有している蓋然性が高い。また、FGF-18の部分断片としては、最も好ましくは28～207番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドを使用することができる。なお、配列番号3、4及び5に示すアミノ酸配列においても、上記の範囲に相当するアミノ酸配列からなるポリペプチドであっても、本発明に係る新規な毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤の有効成分として使用することができる。さらに、FGF-18の部分断片としては、FGF-18の本発明における活性を発揮するために必要なものなら、1～207番目のアミノ酸配列のうちいずれの部分からなる長さ3-50アミノ酸程度のペプチドであっても良い。ただし、この数値範囲を超えるアミノ酸からなるペプチドであっても、本発明におけるFGF-18の部分断片に含まれる。

【0022】

上述したように定義されたFGF-18の全長及び部分ペプチドは、毛包の成長を促進する作用を有する。この作用は、詳細を実施例にて後述するが、FGF-18の全長及び部分ペプチドを含む培地にて毛包を培養し、FGF-18の全長及び部分ペプチドによる毛乳頭細胞、皮膚線維芽細胞及び表皮角化細胞におけるDNA合成誘導能を、それぞれの純粋培養系又は外毛根鞘細胞との複合培養系を用いて調べることで確認することができる。また、休止期にある実験動物に対してFGF-18の全長及び部分ペプチドを皮下投与し、毛包の成長を観察することによって、FGF-18の全長及び部分ペプチドによる毛包成長促進作用を確認することができる。

【0023】

2. 毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤

上記「1. FGF-18」で説明したFGF-18全長ポリペプチド及び/又は部分ポリペプチドは、例えば、皮膚適用向けに適合化された溶液、クリーム、軟膏、ゲル、ローション、シャンプー又はエアゾールといった形態で製剤化され、毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤として提供される。

【0024】

特に、毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、局所投与用に適合化された薬

10

20

30

40

50

理学上許容されるキャリアと共にFGF-18を含んだ医薬組成物の形で投与される。毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、さらにヘパリンを含有することが好ましい。FGF-18を含有する毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、薬学上許容されるキャリア中に通常約0.01～約100 µg/日/cm²、好ましくは約0.1～約10 µg/日/cm²の活性化化合物を含有している。言い換えると、FGF-18の濃度は薬学上許容されるキャリア中で通常約0.01～約100 µg/日/cm²、好ましくは約0.1～約10 µg/日/cm²の活性化化合物である。

【0025】

また、毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、当業界で周知の他の精製又は組換え由来タンパク質増殖因子（PGF）を含有していても良い、FGF-18による毛包成長促進効果を増加又は増強させる増殖因子としては特に限定されず、表皮増殖因子（EGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、トランスフォーミング増殖因子-（TGF-）、トランスフォーミング増殖因子-（TGF-）、インシュリン様増殖因子（IGF）及び血管内皮細胞増殖因子の群を挙げることができる（ファン・プラント及びクラウスナー、バイオテクノロジー、第6巻、第25-30頁、1988年）。

【0026】

EGF、hEGF及びこれらの製造方法については、米国特許第3,914,824号、米国特許第3,948,875号、米国特許第4,528,186号、公開PCT特許出願第WO/85/00369号、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスUSAの第80巻、第7461-7465頁（1983年）に記載されており、参照することができる。

【0027】

PDGF、hPDGF及びこれらの製造方法については、米国特許第4,350,687号、ネーチャーの第320巻、第695-699頁（1986年）、EMBOジャーナルの第3巻、第921-928頁（1984年）、EMBOジャーナルの第3巻、第2963-2967頁（1984年）に記載されており、参照することができる。

【0028】

TGF-、hTGF-及びこれらの製造方法については、欧州特許出願公開第154,434号、セルの第38巻、第287-297頁（1984年）に記載されており、参照することができる。TGF-、hTGF-及びこれらの製造方法については、米国特許第4,774,228号、米国特許第4,774,322号、DNAの第7巻、第1-8頁（1988年）、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリーの第262巻、第12127-12131頁（1987年）に記載されており、参照することができる。

【0029】

IGF-I、hIGF-I及びこれらの製造方法については、公開PCT特許出願第WO/88/03409号、欧州特許出願公開第264,074号、欧州特許出願公開第219,814号に記載されており、参照することができる。IGF-II、hIGF-II及び及びこれらの製造方法については、欧州特許出願公開第280,460号に記載されており、参照することができる。

【0030】

さらに、毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、当業界で周知の他の毛髪成長促進活性を示す化合物又は薬剤を含んでも良い。他の毛髪成長促進剤としては、特に限定されず、抗アンドロゲン、5-還元酵素阻害剤、ミノキシジル、ミノキシジル誘導体又は類縁体及び関連化合物又は類縁体を挙げることができる。

【0031】

さらにまた、局所投与用に適合化された薬理学上許容されるキャリアとしては、特に限定されないが、親水ワセリン又はポリエチレングリコール軟膏のような軟膏、キサンゴムのようなゴム等のペースト、アルコール、水性又は緩衝液のような溶液、水酸化アルミニウム又はアルギン酸ナトリウムゲルのようなゲル、ヒト又は動物アルブミンのようなアルブミン、ヒト又は動物コラーゲンのようなコラーゲン、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース及びアルキルヒドロキシアルキルセルロースのようなセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びヒドロキシプロピルセルロース、ブルロニックF - 12

10

20

30

40

50

7で例示されるプルロニック(Pluronic(商標))ポリオールのようなポリマー;テトロニック1508のようなテトロニック(tetronic)、アルギン酸ナトリウムのようなアルギン酸塩を挙げることができる。

【0032】

また、本発明に係る毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、上記「1.FGF-18」で説明したFGF-18全長ポリペプチド及び/又は部分ポリペプチドをコードするcDNAを有する発現ベクターを有効成分として含有するものであってもよい。すなわち、本発明に係る毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤は、上記発現ベクターを用いた遺伝子治療に使用することができる。発現ベクターとしては、動物細胞において発現を実現するためのプロモーターなどの配列を備えるが、特に限定されるものではない。発現ベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクターなどが利用可能であるが、これらに限定されない。

10

【0033】

より具体的には、遺伝子治療においては、上記「1.FGF-18」で説明したFGF-18全長ポリペプチド及び/又は部分ポリペプチドをコードするcDNAを、例えばウイルスベクターに組み込んで、該組換えウイルスベクターを有するウイルス(無毒化されたもの)を患者に感染させる。患者体内ではFGF-18の全長ポリペプチド及び/又は部分ポリペプチドが産生され、毛包の成長を促進することができる。

【0034】

遺伝子治療用の毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤を細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、非ウイルス性の遺伝子導入方法(日経サイエンス,1994年4月号,20-45頁、実験医学増刊,12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」,羊土社(1996))のいずれの方法も適用することができる。

20

【0035】

ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、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、シンピスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに、TR4あるいは変異TR4をコードするDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

30

【0036】

また遺伝子治療用の毛髪成長促進剤、発毛促進剤及び脱毛症治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するインビボ法及びヒトからある種の細胞を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すエクスピボがある(日経サイエンス,1994年4月号,20-45頁、月刊薬事,36(1),23-48(1994)、実験医学増刊,12(15)(1994))。

【0037】

例えば、該遺伝子治療剤がインビボ法により投与される場合は、疾患、症状等に応じ、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等、適当な投与経路により投与される。またインビボ法により投与する場合は、該遺伝子治療剤は一般的には注射剤等とされるが、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソーム又は膜融合リポソーム(センダイウイルス-リポソーム等)の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができる。

40

【0038】

3.インビトロ毛髪再生系への応用~1

FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドを用いて、再生された皮膚組織における毛髪のインビトロ再生系を構築することができる。ここで、皮膚組織とは、分離した皮膚幹細胞を

50

培養することによって得られる、皮膚の各種の細胞からなる組織を意味する。皮膚の各種の細胞とは、特に限定されないが、皮膚表皮の上皮細胞、皮膚上皮基底層の細胞、毛胞を構成する各種細胞、真皮の細胞及び脂肪細胞等を意味する。皮膚組織を再生する際に使用される細胞は、異種細胞、同種他家細胞及び同種自家細胞のいずれであっても良い。

【0039】

先ず、皮膚幹細胞からの皮膚の各種細胞への分化を制御する方法としては、特に確立された技術がないため、本発明においては特に限定されない。例えば、自然分化(spontaneous differentiation)が起きた段階において異なる発現を示す増殖因子受容体を利用し、それぞれに対応するリガンド増殖因子を培地中に加えることにより、異なった分化方向を有する細胞を選択的に増幅することができる。異なった分化方向を有する細胞を選択的に増幅した後、皮膚組織を作製することができる。

10

【0040】

人工皮膚組織の作製方法としては、特に定まった技術はないため、本発明においては限定されないが、例えば、上皮細胞だけを培養し層状に仕上げる方法、繊維芽細胞など真皮の構成細胞により真皮層を形成した後、上皮細胞を重層させて一体化する方法、その後上皮細胞の表面を空気に暴露することにより表皮化を促進させる方法、真皮層の変わりに、生物分解が可能な成分により形成された層状フィルムを用いる方法、など、様々な方法をとることができる。また、本発明は、ヒトから採取した皮膚組織から皮膚幹細胞を分離し、分離した皮膚幹細胞を用いて皮膚組織を作製するといった、いわゆる再生医療における皮膚組織の作製方法も適用される。このとき、新たに作製した皮膚組織は、採取したヒトと同一人に対して治療のために戻すことを前提としても良いし、採取したヒトと異なる他人に対して治療のために移植することを前提するものであってもよい。

20

【0041】

このような皮膚組織の作製方法において、培地中にFGF-18の全長及び/又は部分ペプチドを適当な時期に添加することによって、再生した皮膚組織において毛包の成長を促進することができる。当該皮膚組織における毛髪の成長或いは発毛を促進することができる。さらに、皮膚組織の作製方法において、培地中にFGF-18の全長及び/又は部分ペプチドを適当な時期に添加することによって、皮膚細胞の増殖を促進することができる。皮膚組織全体の体積の増大を図ることができる。

【0042】

4. インビトロ毛髪再生系への応用 ~ 2

FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドを用いて、毛包を成長させる培養法を構築することができる。毛包は、例えば、引き抜いた毛髪から調製された成長期ヒト毛包を使用することができる。毛包は、許容される洗浄用溶液、緩衝液又は培地で洗浄される。許容される洗浄用溶液としては、特に限定されず、蒸留水、生理塩水等を使用することができる。許容される緩衝液としては、特に限定されず、リン酸緩衝液、リン酸緩衝塩水(PBS)、リン酸緩衝塩水グルコース、トリスHCl等を使用することができる。培地としては、特に限定されず、イーグル最小必須培地、イーグル基本培地及びダルベッコ修正イーグル培地等を使用することができるが、ダルベッコ修正イーグル培地が好ましい。洗浄された毛包は約1~約10毛包/ウェルで細胞培養プレートにおかれる。

30

40

【0043】

毛包は、通常、熱不活化血清、好ましくは約10%牛胎児血清、抗生物質、好ましくは10,000 μ l、ペニシリンG、約10,000 μ g、硫酸ストレプトマイシン及び約1%フンギゾンで補充された培地で培養される。選択される培地はダルベッコ修正イーグル培地が好ましい。毛包は、約5%のCO₂及び約95%空気雰囲気下において37℃で約1~約5日間培養される。このとき、FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドを、例えば約0.01~約1.0 μ g FGF/ml/日で添加される。また、ヘパリンは各ウェルに約3:1=ヘパリン:FGFで加えられる。ヒト血清アルブミン(HSA)は、すべてのウェルに約10:1=HSA:FGFで加えられる。細胞刺激は最終24時間のインキュベーションにおいて、³H-チミジン約5 μ Ci、約0.14 μ g/ウェルの添加後、冷チミジン約14.2 μ g/ウェルの添加により、FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドの作

50

用を調べることができる。

【0044】

毛包DNAは、約5%トリクロロ酢酸で沈降され、約1NのNaOHに約45 で一夜かけて溶解される。シンチレーションカウントは50 μ l容量の最終切断物について3回行われる。FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドは、毛包においてDNA合成を促進する。よって、以上のように毛包DNA量を検定することによって、毛包の成長促進能を明らかにすることができる。

【0045】

5. スクリーニング方法

本発明に係るスクリーニング方法は、FGF-18による毛包の成長促進作用を介して、毛髪成長促進、発毛促進或いは脱毛症治療といった機能を有する物質をスクリーニンする方法

10

である。

【0046】

本スクリーニング方法では、先ず、被検物質を動物培養細胞又は実験動物に接触させる。なお、実験動物とは、ヒトを除く、例えば、マウス、ラット、ニワトリ、七面鳥、ウシ、ブタ、ヒツジ及びウサギ等を意味する。被検物質としては、何ら限定されないが、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、低分子化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、動物組織抽出液等が挙げられる。これらの物質は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。

【0047】

次に、本スクリーニング方法では、動物培養細胞又は実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現をモニターする。動物培養細胞又は実験動物におけるFGF-18遺伝子の発現は、例えば、FGF-18抗体を用いたELISA等の常法を用いて解析するか、あるいは該細胞内又は実験動物内におけるFGF-18遺伝子のmRNA量を定量的逆転写PCR法やノーザンプロット法等により解析するといった方法によりモニターすることができる。

20

【0048】

これらいずれかの解析により、被検物質の非存在下で培養された動物培養細胞内におけるFGF-18遺伝子の発現量と比べて、被検物質の存在下で培養された動物培養細胞内又は実験動物内におけるFGF-18遺伝子の発現量が増加すれば、当該被検物質は毛髪成長促進、発毛促進或いは脱毛症治療といった機能を有する可能性があるかと判断できる。

【0049】

このようにスクリーニングされた物質は、臨床へ応用するに際し、上記有効成分を単独で用いることも可能であるが、薬学的に許容され得る担体と配合して医薬品組成物として用いることもできる。この時の有効成分の担体に対する割合は、1～90重量%の間で変動され得る。また、かかる薬剤は種々の形態で投与することができ、それらの投与形態としては、溶液、クリーム、軟膏、ゲル、ローション、シャンプー又はエアゾールといった非経口投与を挙げることができる。また、その投与量は、症状、年齢、体重等によって適宜選択することができる。

30

【実施例】

【0050】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

40

【0051】

〔実施例1〕

本実施例では、マウスの皮膚におけるFGFファミリーに属する遺伝子の発現プロファイルを検討した。

<材料と方法>

マウスおよび皮膚サンプルの調製

毛周期の実験用として7週齢のC3H/HeN雄マウス(Tlr4^{+/+})25匹を日本エスエルシー株式会社から入手し、標準的な実験動物用飼料および水を任意に摂取させて飼育した。1週間馴化させた後、マウス5匹を安楽死させ、背部毛を短く刈り、皮膚サンプルを分離し、

50

「0日（休止期）」サンプルとした。残りのマウス20匹については、ワックス、テープ又は脱毛剤を用いずに、手袋を装着して指によって背部毛幹を優しく抜いて、毛周期の成長期を誘発した。そして毛包周期の時期、すなわち脱毛後8日（成長期V）、18日（成長期VI）、20日（退行期IV）及び22日（休止期）を選択し、マウスを安楽死させ、毛を短く刈り、全層皮膚サンプル（表皮、毛幹、毛包、皮脂腺、皮下脂肪、皮膚筋及び血管を含む）を脱毛した部位から採取した。全層皮膚サンプルは、後述するmRNA分離、in situハイブリダイゼーション及び免疫組織染色に使用した。なお、これらの実験は基本的に同一試験計画によって3回実施して結果の再現性を確認した。

【0052】

in situハイブリダイゼーション用の皮膚サンプルは、直ちにOCT-compoundで包埋して液体窒素で凍結した。また、免疫組織染色用の皮膚サンプルは、最初に10%ホルムアルデヒドで室温24時間固定し、標準的な方法によってパラフィンで包埋した。

10

【0053】

mRNA調製および逆転写

トータルRNAは、上述したように準備した皮膚サンプルからIsogen（株式会社ニッポンジーン）を製造業者の取扱説明書に従って使用して調製した。次に、Oligotex-dT30 Super mRNA精製キット（タカラバイオ株式会社）を用いて、トータルRNAからmRNAを精製した。精製したmRNAサンプル（100ng）を鋳型とし、プライマとしてOligo(dT)12-18を用いたSuperScript II（Gibco BRL）によって全量20mlで逆転写反応を行った。

【0054】

20

PCRプライマの設計およびFGF cDNAのクローニング

各FGFのmRNA量をリアルタイムPCRによって分析できるように、特異的なプライマセットを設計した（表1）。各FGFのmRNAを定量する際、コピー数対照としてcDNAフラグメントが必要となる。このcDNAフラグメントをクローニングする際、同じプライマセットを使用した。

【0055】

【表 1】

	配列 (5'-3')	配列番号
FGF-1	CTGACCGAGAGGTTCAACCTGCCTCTAGGA CTTTATATACACTTCGCCCGCACTTTCCGC	配列番号6 配列番号7
FGF-2	GCGACCCACACGTCAAACCTACAACCTCCAAG CCCGTTTTGGATCCGAGTTTATACTGCCCA	配列番号8 配列番号9
FGF-3	ACGGCTGTATGCTTCGGATCACTACAACGC GCCATTACCGACACGTACCAAGGTCTCTG	配列番号10 配列番号11
FGF-4	GACACGAGGGACAGTCTTCTGGAGCTCTCT CCGTTCTTACTGAGGGCCATGAACATACCG	配列番号12 配列番号13
FGF-5	ACCTATGCGTCCGCGATCCACAGAAGTCAA AAGTTCGGGTGCTCGGACTGCTTGAACCT	配列番号14 配列番号15
FGF-6	GCACTGAGCAAATATGGACGGGTAAAGCGG AGTCACGGGATAGGAGCAGAAGCGTTCTCT	配列番号16 配列番号17
FGF-7	TGGAATCAGGACCGTGGCAGTTGGAATTG GATTTAAGGCAACGAACATTTCCCCTCCGC	配列番号18 配列番号19
FGF-8	ATACTTTTGAAGCAGAGTCCGAGTTCGCG GGTAAAGCCATGTACCAGCCCTCGTACTT	配列番号20 配列番号21
FGF-9	TAGGTGAAGTTGGGAGCTATTTCCGGTGTGC CCCTTTAAATGATCCAAGTCCGTGACTGCG	配列番号22 配列番号23
FGF-10	AAGCTCTTGGTCAGGACATGGTGTACAGG GTACGGACAGTCTTCATTCTTGGTCCCGCT	配列番号24 配列番号25
FGF-11	AGCTCAAAGGCATCGTCACCAAAGTGTCT GCTGTGAAATGTGGCGAGCTGTACAATAGC	配列番号26 配列番号27
FGF-12	TGTGACAAGGTTATTCAGCCAGCAGGGATA ATAAAGGCTGGCTTTAACCCTTGGATGGC	配列番号28 配列番号29
FGF-13	GGCAATGAACAGCGAGGGATACTTGTACAC CGGATTGCTGCTGACGGTAGATCATTGATG	配列番号30 配列番号31
FGF-14	CGGGCTTTTCAATGGCAACCTGGTGGATAT TACAACCCTGTCTTCACTCCCTGGATGGCA	配列番号32 配列番号33
FGF-15	TGGATCCGTTTCCAGGATGGTGGAGGATGTAG AGCCACTAACACAACAGGGTCCATGTGAGA	配列番号34 配列番号35
FGF-16	CCCGGGAGGGATAACAGGACTAAACGACACC AGCGGAAGAGATCTCTGGACATGGAGGGCA	配列番号36 配列番号37
FGF-17	CAGTACGTGAGGGACCAGGGCGCTATGACC CTCCACGATGAGCTTGGCGAACTTGTTGCC	配列番号38 配列番号39
FGF-18	AGACGCGGGCTCGAGATGATGTGAGTCGGA GCCCTTGATCCGGAAGTACTCCCGAAGGT	配列番号40 配列番号41
FGF-20	AGTGTGGCAGTGGGACTGGTCCAGTATCAGA TAAGTGCTACAAAATACCTGCGACCCCGTGT	配列番号42 配列番号43
FGF-21	GAGATCAGGGAGGATGGAACAGTGGTAGGC GGGCTTCCAGACTGGTACACATTGTAACCGT	配列番号44 配列番号45
FGF-22	CGTAGGGGTGTTCTGGGTCTTCTCCATGAA TTCATGGAGAAGACCCAGAACACCCCTACG	配列番号46 配列番号47
FGF-23	AGCCAGGACCAGCTATCACCTACAGATCCA GCAATTCTCTGGGCTGAAGTGAAGCGATCC	配列番号48 配列番号49

10

20

30

40

上述した逆転写反応の反応産物（RT混合物）を蒸留水で10倍希釈したものをPCR増幅の鋳型とした。PCR増幅には、Pfuポリメラーゼ（Stratagene社製）を製造業者の取扱説明書に従って使用した。そして、PCR増幅反応混合液の一部を2.0%アガロースゲルを用いた電気泳動に使用し、増殖産物の大きさを確認した。また、各FGFに相当するそれぞれのcDNAをクローニングするため、PCR産物をpCR-BluntII-TOPOベクター（Invitrogen社製）に連結してE.coliの形質転換に使用した。リコンビナントプラスミドのヌクレオチド配列はBigDyeターミネータサイクルシーケンシングキット及びABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems社製）を用いて確認した。

【0057】

リアルタイムPCRによるmRNAコピー数の定量

10

リアルタイムPCR増幅は、1:10に希釈したRT混合物2mlを鋳型として使い、Light Cycler（Roche Diagnostics社製）によって実施した。各FGFの絶対コピー数を得るため、各FGFに対応するプラスミッドDNAをコピー数対照としてそれぞれ使用した。Light Cyclerによって増幅したDNAの定量には、Cyber Greenを使用した。特異性の高いプライマとともに、最適なアニーリング温度、伸長時間、および取得温度でLight Cycler反応を実施した。プライマの特異性はバックグラウンド用の配列としてマウスの全cDNAを用いて最初に確認した。プライマの特異性および反応条件はプラスミッドDNAに増幅フラグメントをクローニングすることによって、さらに実験的に実証してこれらの配列を検証した。

【0058】

さらに個別実験の最後に増幅産物の融点温度を測定してこれらが融点温度で均一であることが実証された。定量実験後、産物を2.0%アガロースゲル電気泳動で分析し、反応によって既知サイズのDNAフラグメントが正確に増幅されていることが確認された。この実験系によって個別遺伝子の特異的な定量が保証される。mRNAの評価では、Light Cyclerによる同一実験に標的cDNA配列を有するDNAの連続希釈サンプルを含め、これらの測定から個別サンプルと関連するmRNAの絶対コピー数を算出した。またハウスキーピング遺伝子のコピー数を同じ方法で評価してこれらの量が予測範囲内であることを確認した（例えば、b-アクチンmRNAコピー数は8日目のサンプルが 2×10^6 コピー/ng mRNAであることが測定された）。

20

【0059】

<結果>

30

FGF及びFGFRファミリーメンバの発現プロファイル

毛周期の指示時期における各FGFおよびFGFRのmRNA発現量をそれぞれ図1A、図1B及び図2に示した。さらにすべてのmRNAの中で最も高い発現量およびその毛周期での時期を表2にまとめて示す。

【0060】

【表 2】

遺伝子	mRNA の発現量の最大	
	コピー数 (コピー/ng mRNA)	MRNA の発現量が最大となる 毛周期 (脱毛後日数)
<i>Fgf-1</i>	2,900 +/- 136	休止期 (0)
<i>Fgf-2</i>	751 +/- 46	休止期 (0)
<i>Fgf-3</i>	667 +/- 77	成長期 VI (18)
<i>Fgf-4</i>	(-)	(-)
<i>Fgf-5</i>	1,882 +/- 273	成長期 VI (18)
<i>Fgf-6</i>	542 +/- 84	休止期 (0)
<i>Fgf-7</i>	7,467 +/- 424	成長期 V (8)
<i>Fgf-8</i>	(-)	(-)
<i>Fgf-9</i>	306 +/- 30	休止期 (22)
<i>Fgf-10</i>	4,389 +/- 305	成長期 V (8)
<i>Fgf-11</i>	1,422 +/- 75	休止期 (0)
<i>Fgf-12</i>	188 +/- 21	成長期 V (8)
<i>Fgf-13</i>	4,945 +/- 77	休止期 (0)
<i>Fgf-14</i>	(-)	(-)
<i>Fgf-15</i>	(-)	(-)
<i>Fgf-16</i>	171 +/- 30	成長期 VI (18)
<i>Fgf-17</i>	179 +/- 6	成長期 VI (18)
<i>Fgf-18</i>	9,822 +/- 1,677	休止期 (0)
<i>Fgf-20</i>	465 +/- 45	休止期 (0)
<i>Fgf-21</i>	898 +/- 98	成長期 VI (18)
<i>Fgf-22</i>	2,685 +/- 275	成長期 VI (18)
<i>Fgf-23</i>	(-)	(-)
<i>Fgfr-1</i>	47,108 +/- 2,758	退行期 (20)
<i>Fgfr-2</i>	10,414 +/- 1,055	成長期 VI (18)
<i>Fgfr-3</i>	28,540 +/- 2,015	成長期 VI (18)
<i>Fgfr-4</i>	1,028 +/- 191	退行期 (20)
<i>Beta-actin</i>	562,240 +/- 36,592	成長期 V (8)

【 0 0 6 1 】

図1A及び表 2 から、発現量の最も高い遺伝子はFgf-1、-5、-7、-10、-13、-18及び-22であることが判明した。この群では、FGF-5及びFGF-22のmRNA量が毛周期全体を通して同様な変化を示し、成長期VIにおける発現量が最も高かった（18日目；図1A）。FGF-7及び-10（又は、それぞれ角化細胞増殖因子（KGF）-1及びKGF-2）のmRNA量は、成長期Vで最も高かった（8日目；図1A）。FGF-1のmRNA（又は酸性FGF）量は比較的一定しており、休止期で最大量を示した（0日目；図1A）。これらFGFの最大発現量はFGF-7及び-18などで 1×10^4 コピー/ng mRNAである。このmRNA発現量は豊富な構造タンパク質の1つである β -アクチン（成長期Vで 5.6×10^5 コピー/ng mRNA；表 2）の約60分の1だった。

【 0 0 6 2 】

本実施例では、皮膚で発現することが既に知られているこれら遺伝子、すなわちFGF-1、-2、-5、-7、-10、-13及び-22に加えて、FGF-18 mRNAも高い量で発現しており、FGF-18 mRNA量が休止期にピークを示す（0日目及び22日目；図1A）ことが明らかになった。また、図1Aからは、FGF-18発現量が、十分研究されているFGF-2（又は塩基性FGF）及び他のFG

Fよりもほとんどの時期で高いことが明らかとなった。FGF-3、-6、-9、-11、-20及び-21のmRNAも中程度発現された（図1B）が、FGF-4、-8、-14、-15及び-23のmRNA発現は毛周期のどの時期でもほとんどあるいは全く検出されなかった（<100コピー/ng mRNA；表2）。

【0063】

FGFRに関しては、FGFR-1及びFGFR-3のmRNAともに多量に発現されたが（FGFR-1では最大47,000コピー/ng mRNA、FGFR-3では最大28,000コピー/ng mRNA；図2）、前者では最も強い発現が成長期VI～退行期（18日目及び20日目）に現れ、後者では成長期VI（18日目；図2）で最高だった。FGFR-2のmRNA発現量は、上皮細胞に特異的であるIIIbサブクラスも含めてFGFR-1又は3のmRNAよりも少なく（図2）、FGFR-4のmRNA発現量は4種類の受容体の中で最も低かった（図2）。

【0064】

〔実施例2〕

実施例1において、皮膚におけるFGF-18の発現が新規に明らかになったため、本実施例では、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いてそのmRNAの分布を測定した。

<材料と方法>

*in situ*ハイブリダイゼーション

*in situ*ハイブリダイゼーション実験は、OCTで包埋した凍結組織切片およびジゴキシゲニン標識リボプローブを用いて基本的に既に報告されている方法（Komminoth P: Digoxigenin as an alternative probe labeling for *in situ* hybridization. *Diag Mol Pathol* 1:142-150, 1992参照）に従って実施した。

【0065】

FGF-18のセンスリボプローブ及びアンチセンスリボプローブは、ジゴキシゲニン-dUTP（Roche Applied Science社製）の存在下で、それぞれSP6及びT7のRNAポリメラーゼを使用して合成した。ハイブリダイゼーション処理中はあらゆる手段を講じてRNA変性を避けた。凍結組織は、クライオスタット（Microm社製、モデルHM5000M）を用いて10mmに切り、直ちにMASでコートしたスライドガラス（松浪硝子株式会社製）にのせ、50℃で1時間乾燥させてから、乾燥剤とともに-80℃で保存した。ハイブリダイゼーション前に切片は4%パラホルムアルデヒドを含むPBSで室温10分間固定してからPBSで5分間洗浄した。そして切片にプロテイナーゼK（2×TE中に0.01mg/ml）を37℃で5分間浸透させ、PBSですすいしてから再度4%パラホルムアルデヒドを含むPBSで5分間固定し、PBSで5分間洗浄した。固定した切片は0.1%DEPCを含むPBSで15分間2回浸漬し、PBSですすいだ。

【0066】

次に切片は100%ホルムアミドに45℃で10分間浸漬し、100%及び50%のホルムアミドを用いて45℃ですすいしてから5×SSCに15分間浸漬した。最終的にハイブリダイゼーションは、50%（v/v）ホルムアミド、5×SSC、500mg/mlのサケ精巢DNA、250mg/mlのtRNA、5×Denhardt's溶液、および1mMのDTTを含むハイブリダイゼーション緩衝液100ml中に500ng/mlで加えた熱変性（70℃で10分間）プローブを用いて、45℃で16～18時間実施した。ハイブリダイゼーション後、スライドを2×SSCを用いて45℃ですすぎ、そして2×SSCによって45℃で30分間2回洗浄し、さらに0.2×SSCによって45℃で20分間2回洗浄した。結合したリボプローブをアルカリホスファターゼと結合させた抗ジゴキシゲニン抗体（1:500、Roche Applied Science社製）を用いて検出した。可視化するため、ニトロブルーテトラゾリウムおよび5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-1-リン酸（NBT/BCIP）を用いた比色反応を、BMパール（Roche Applied Science社製）を使用してシグナルが認められるまで暗所において室温で行った。具体的には、脱毛後8日（成長期V）の切片サンプルについては24時間の比色反応、18日（成長期VI）の切片サンプルについては48時間の比色反応、20日（退行期IV）の切片サンプルについては24時間の比色反応、及び0日（休止期）の切片サンプルについては96時間の比色反応を行った。

【0067】

<結果>

*in situ*ハイブリダイゼーションの結果を図3に示す。図3中、A及びBはアンチセンス

10

20

30

40

50

リボプローブを用いた結果を示し、C及びDはセンスプローブを用いた結果を示す。図3中のバーは100 μ mを意味する。図3に示すように、成長期における毛包では、FGF-18 mRNAは実質的に毛包の内毛根鞘細胞のみで発現されることを認めた(図3A、B; 紫色のシグナル)。一方、センスプローブはシグナルを生じなかった(図3C、D)。

【0068】

また、休止期においてFGF-18 mRNAは、毛包底部のバルジ領域で発現されることを認めた。なお、休止期においては、 α -アクチンmRNAでさえ非常に微弱にしか検出できないことから、成長期と比較して休止期のin situハイブリダイゼーションは非常に困難であった。そこで、本実施例では、0日(休止期)の切片サンプルに対するin situハイブリダイゼーションの比色反応を96時間といった長時間で行うことで、休止期のin situハイブリダイゼーションを可能ならしめた。

10

【0069】

〔実施例3〕

本実施例では、FGF-18の皮膚における機能を評価するため、ヒト毛包外根鞘(ORS)細胞、毛乳頭(HFDP)細胞、皮膚線維芽細胞(HDF細胞)及び表皮角化細胞(HEK細胞)について、FGF-18による細胞分裂促進効果を調べた。

【0070】

<材料と方法>

DNA合成アッセイ

培養した最初のヒト皮膚線維芽細胞(新生児包皮由来; 東洋紡績株式会社製)は、HDF生育培地(生育補助成分を加えたFBM(線維芽細胞基礎培地); 東洋紡績株式会社製)で継代培養して2継代以内に $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイに使用した。

20

【0071】

培養した最初のヒト毛乳頭細胞(成人頭皮由来; 東洋紡績株式会社製)はHFDP生育培地(20%ウシ胎児血清を含む乳頭細胞基礎培地; 東洋紡績株式会社製)で継代培養して2継代以内に $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイに使用した。細胞はトリプシン処理してコラーゲンコートプレート(Sumilon社製)に、密度が 1×10^4 細胞/ウェルで48ウェル(HDF細胞)又は 1×10^4 細胞/ウェルで24ウェル(HFDP細胞)に分注してHDF培地で37°Cに維持した。次の日にHDF生育培地を、0.5%チャコール吸着子ウシ血清を含むFBMで置き換え、細胞を48時間(HDF細胞)又は96時間(HFDP細胞)培養してから所定の濃度のFGFで刺激した。FGFを加えてから18時間後(HDF細胞)又は8時間後(HFDP細胞)に $[^3\text{H}]$ -チミジン(1mCi/ウェル; Moravek Biochemicals社製)を培地に加え、細胞をさらに8時間(HDF細胞)又は18時間(HFDP細胞)培養した。そして細胞を採取して、取り込まれた放射エネルギーを計測した。

30

【0072】

培養した最初のヒト表皮角化細胞(新生児包皮由来; 東洋紡績株式会社製)及び最初のヒト外根鞘細胞(成人男性頭皮由来)は角化細胞生育培地(ウシ下垂体抽出物、インスリン、上皮増殖因子、ヒドロコルチゾン、トランスフェリン、エピネフリン、および抗生物質を添加した角化基礎培地(KBM)-2; 東洋紡績株式会社製)で継代培養して2継代以内で使用した。細胞はトリプシン処理してコラーゲンコートプレートに密度が 1×10^4 細胞/ウェルで48ウェル(HEK細胞)又は 1.2×10^4 細胞/ウェルで24ウェル(ORS細胞)に分注してHEK生育培地で37°Cに維持した。次の日(HEK細胞)又は4日後(ORS細胞)に生育培地を 10^{-8} Mインスリンおよび5mg/mlのヘパリンを含むKBM-2培地で置き換え、細胞を所定の濃度のFGFで刺激した。FGFを加えてから18時間後(HEK細胞)又は8時間後(ORS細胞)に $[^3\text{H}]$ -チミジン(1mCi/0.5ml; Moravek Biochemicals社製)を培地に加え、細胞をさらに8時間(HEK細胞)又は18時間(ORS細胞)培養した。そして細胞を採取して、取り込まれた放射エネルギーを計測した。

40

【0073】

<結果>

DNA合成アッセイの結果を図4に示す。図4中、AはHFDP細胞(図中ではDPCと表記)を用いたアッセイの結果を示し、BはORS細胞(図中ではORSCと表記)を用いたアッセイの結

50

果を示し、CはHDF細胞（図中ではDFと表記）を用いたアッセイの結果を示し、DはHEK細胞（図中ではEKと表記）を用いたアッセイの結果を示している。図4から判るように、比較的高い濃度（100及び1000ng/ml）のFGF-18によって、HFDP細胞、HDF細胞及びHEK細胞においてDNA合成が誘導されていた（それぞれ図4A、4C及び4D）。このことは、HEK細胞でDNA合成を刺激する（図4D）がHFDP細胞（図4A）及びHDF細胞（図4C）では非常に刺激が弱いことが十分特徴付けられている角化細胞マイトゲンであるFGF-7（KGF）と相違している。

【0074】

この結果から、FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドは、毛包の成長を促進する作用があることが実証された。さらに、この結果から、FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドは、皮膚細胞の増殖、すなわち皮膚全体の体積の増大に促進的に作用することが実証された。

10

【0075】

〔実施例4〕

本実施例では、毛包に対するFGF-18の*in vivo*での影響の特徴を調べるため、FGF-18の投与による影響を毛周期の休止期にあるC3H/HeNマウスで試験した。

<材料と方法>

FGF-18活性の*in vivo*分析

FGF-18の毛包に対する*in vivo*での影響の特徴を調べるため、毛成長が休止期のマウスに組換えFGF-18を投与した。基本的な手順はMcElweeらによって開発された方法に従って、*in vivo*におけるマクロファージ刺激性タンパク質の活性を実証した（McElwee KJ, Huth A, Kissling S, Hoffman R; Macrophage-stimulating protein promotes hair growth *ex vivo* and induces anagen from telogen stage hair follicles *in vivo*. *J Invest Dermatol* 123:34-40, 2004参照）。

20

【0076】

すなわち、まず、10mgの組換えFGF-18タンパク質を添加した0.75mlのPBSを、0.75ml（包装容量）のセファロース4Bビーズ及び7.5mlのC3H/HeN血清と37℃で2時間混合してビーズに組換えFGF-18を吸着させた。また、組換えFGF-18を加えずに同一処理して得られたビーズを対照ビーズとした。50日齢のC3H/HeN雌マウス5匹に麻酔をかけ、背部毛をトリマによって優しく短く刈った。そしてFGF-18吸着ビーズ懸濁液を背部皮膚に皮下注射した（150ml/マウス、すなわち、マウス1匹あたり1µgのFGF-18）。マウスは飼料および水を任意に摂取できるようにして飼育した。21日後にマウスに麻酔をかけて安楽死させた。背部皮膚を全層で切除し、内部表面を写真撮影してから皮膚をパラフィンで包埋した。包埋した皮膚サンプルはマイクロームで4µm厚の切片にしてヘマトキシリンで染色して顕微鏡で観察した。

30

【0077】

<結果>

結果を図5に示す。図5中、AはFGF-18吸着ビーズ懸濁液を投与したマウスにおける皮膚内部表面を撮影した写真であり、Bは写真A内の囲み枠を拡大した写真であり、CはFGF-18吸着ビーズ懸濁液を投与したマウスにおける皮膚切片を撮影した写真であり、Dは対照ビーズ懸濁液を投与したマウスにおける皮膚内部表面を撮影した写真であり、Eは対照ビーズ懸濁液を投与したマウスにおける皮膚切片を撮影した写真である。なお、図5に示した写真C及びE内のバーはそれぞれ100µmを示している。

40

【0078】

FGF-18吸着ビーズ懸濁液を皮下投与した21日後に5匹中4匹で毛包成長が認められた。外観から1匹には活発な毛成長が背部皮膚の試験部位の全域で認められ、3匹では試験部位のいくつかの領域で明らかな色素沈着が認められた（図示せず）。皮膚の内部表面検査によって、明らかな色素沈着及び/又は毛成長を伴ってマウスの成長期毛包における広範囲にわたる成長が示された（図5の写真A及びB）。図5の写真A及びBは代表的な結果を示しているが、図5の写真A及びBにおいて黒色のスポットは成長期毛包を示している。さらに、図

50

5の写真Cに示すように、皮膚切片の組織学的検査によってもマウスの成長期毛包における広範囲にわたる成長を確認することができた。なお、5匹のマウスのうち1匹はFGF-18吸着ビーズ懸濁液の投与によっても、試験期間中に明白な変化を示さなかった。

【0079】

これに対して、対照ビーズ懸濁液を投与したマウス5匹では、毛成長あるいは強い色素沈着は認められなかった。図5の写真Dに示すように、内部表面の検査からは、白色によって示されるように成長期毛包はほとんど又は全く示されなかった。図5の写真Eに示すように、このことは組織学的検査により確認することができた。

【0080】

この結果から、FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドを投与することによって、毛包の成長を促進できることがin vivoにおいて実証された。

10

【0081】

また、図5の写真C及びEを比較すると判るように、皮膚が生理学的な成長期毛包を伴う正常な皮膚と全く同じように非常に厚くなっていた。この結果から、FGF-18の全長及び/又は部分ペプチドは、皮膚細胞の増殖、すなわち皮膚全体の体積の増大に対しても、促進的に作用することが実証された。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1A】各毛周期におけるFGF-1、-5、-7、-10、-11、-13、-18及び-22遺伝子の発現プロファイルを示す特性図である。

20

【図1B】各毛周期におけるFGF-2、-3、-4、-6、-8、-9、-12、-14、-15、-16、-17、-20、-21及び-23遺伝子の発現プロファイルを示す特性図である。

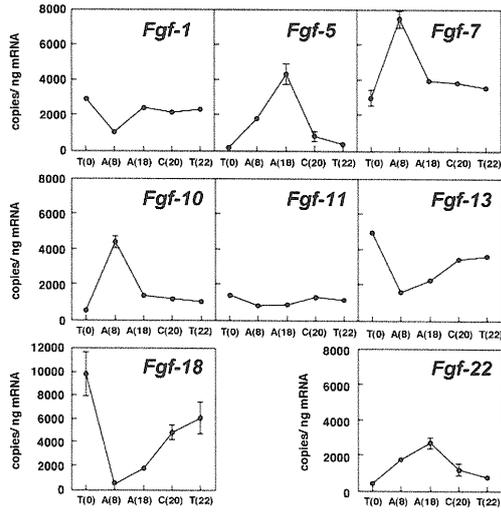
【図2】各毛周期におけるFGFRファミリーに属する遺伝子の発現プロファイルを示す特性図である。

【図3】in situハイブリダイゼーション実験の結果を示す写真である。

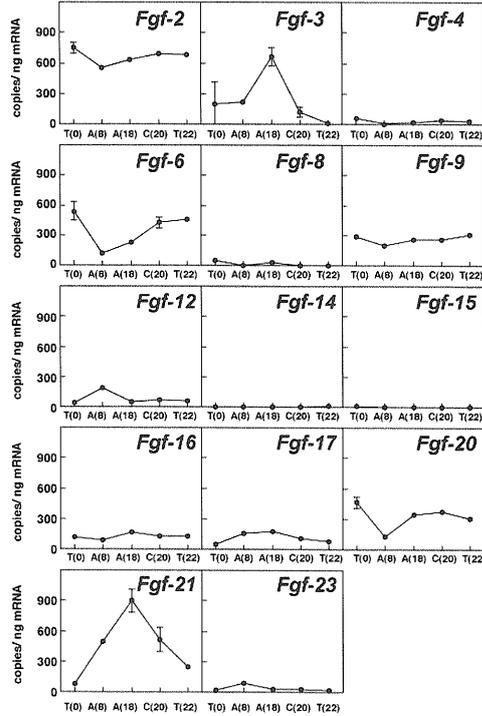
【図4】DNA合成アッセイの結果を示す特性図である。

【図5】FGF-18活性のin vivo分析試験の結果を示す写真である。

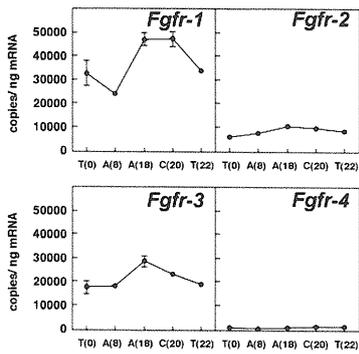
【 1 A 】



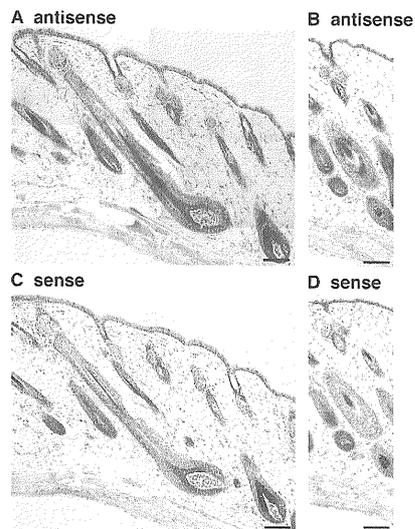
【 1 B 】



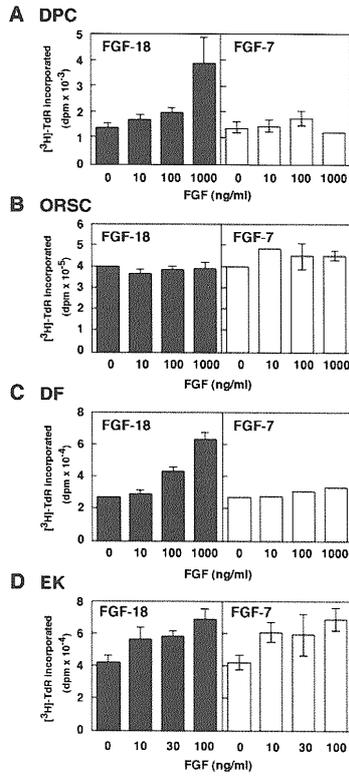
【 2 】



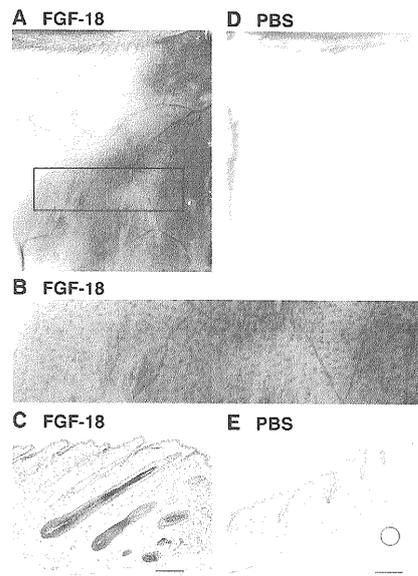
【 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0004565112000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

(72)発明者 浅田 真弘
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内

審査官 安川 聡

(56)参考文献 特開平04-224522(JP,A)
特開平05-043424(JP,A)
特開平09-316096(JP,A)
GREEN,E.S. et al, Two animal models of retinal degeneration are rescued by recombinant adeno-associated virus-mediated production of FGF-5 and FGF-18, Mol Ther, 2001年, Vol.3, No.4, p.507-15

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

A 6 1 K 4 8 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m 2)