

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 342300

(P2003 - 342300A)

(43)公開日 平成15年12月3日(2003.12.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 4
A 6 1 K 7/00		A 6 1 K 7/00	K 4 C 0 8 3
7/06		7/06	4 C 0 8 4
39/395		39/395	N 4 C 0 8 5
45/00		45/00	4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 4 数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002 - 151941(P2002 - 151941)

(22)出願日 平成14年5月27日(2002.5.27)

(71)出願人 501362814

株式会社 エーティーラボ

秋田県秋田市卸町3丁目4番2号

(71)出願人 391012383

秋田大学長

秋田県秋田市手形学園町1番1号

(72)発明者 杉山 俊博

秋田県秋田市御所野元町6丁目8—1

(72)発明者 亀田 隆

秋田県秋田市広面字広面180 セジュールK
K202

(74)代理人 100110537

弁理士 熊谷 繁 (外 1 名)

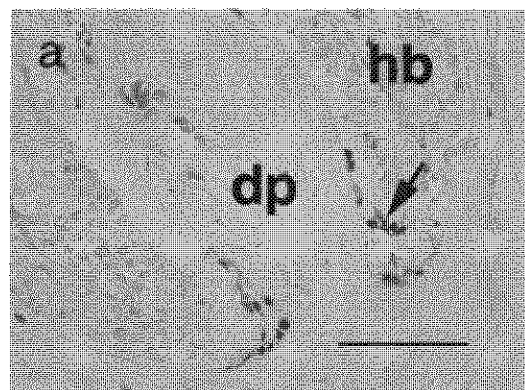
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 未分化毛包細胞に対するモノクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含む医薬並びに診断薬

(57)【要約】

【課題】 本発明は、毛髪再生に関連した細胞移植治療に必要な毛包幹細胞を同定・分離することができる、未分化毛包細胞のモノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体を含む医薬、並びに前記モノクローナル抗体と他の結合分子との結合体を含む医薬または診断薬を提供すること。

【解決手段】 本発明のモノクローナル抗体は、ヒト新生児包皮の初代培養細胞を動物に免疫し、前記動物から抗体産生細胞を単離し、これをミエローマ細胞と融合することによりハイブリドーマを作製し、次いで得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより得られる単クローンハイブリドーマにより産生されるものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】ヒト新生児包皮の初代培養細胞を動物に免疫し、前記動物から抗体産生細胞を単離し、これをミエローム細胞と融合することによりハイブリドームを作製し、次いで得られたハイブリドームをスクリーニングすることにより得られる単一クローンのハイブリドームにより産生されることを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 2】毛髪組織に存在する未分化毛包幹細胞を認識することを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】ヒト頭皮の組織標本に対する反応性を免疫組織化学染色法で測定した場合、毛母細胞が毛乳頭に接している、毛球の最も下部にある細胞を認識することを特徴とする請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】毛包幹細胞と同等な特徴を持つ皮膚に存在する幹様細胞を認識する請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載のモノクローナル抗体を含む医薬。

【請求項 6】(a) 請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載のモノクローナル抗体；および (b) 抗癌化学療法剤、ラジオアイソトープ、蛋白性毒素、致死性蛋白、あるいはこれを発現する遺伝子を挿入した発現ベクター、酵素、ストレプトアビジンから成る群から選択される結合分子：の結合体を含む医薬または診断薬。

【請求項 7】毛髪幹様細胞の細胞移植治療用または毛髪再生診断用であることを特徴とする請求項 6 に記載の医薬または診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、未分化毛包細胞を認識する新規なモノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体を含む医薬、並びに前記モノクローナル抗体と他の結合分子との結合体を含む医薬または診断薬に関する。

【0002】

【従来の技術】一般に、毛髪は皮膚派生物であることがよく知られている。毛髪形成とは、毛根部で活発に増殖している毛母細胞が、次第に毛髪特異的ケラチン（特殊な中間径フィラメント）を細胞内にため込み、互いの接合を強め、乾燥して死細胞と化す過程であり、表皮の角質層の形成過程に良く似ている。毛幹細胞は、以前毛母細胞の集団中に存在すると考えられていたが毛組織内で細胞標識が長く残存する細胞（つまり細胞周期が長い細胞）を検索した実験からむしろ外毛根鞘の立毛筋が付着している部分（バルジ）に局在している可能性が示唆された。バルジに存在する幹細胞は多分化能を有するとも考えられており、毛母細胞以外に表皮角質化細胞や皮脂腺細胞へも分化すると予想されている。毛幹細胞を用いた毛髪再生は男性型禿頭症などの治療法として魅力的で

あるが毛幹細胞のみを用いる方法には限界がある。なぜなら、毛幹細胞は前述の通り多分化能を有しており、通常の方法で培養しても毛母細胞へは分化しせずにケラチノサイトへと分化してしまうからである。毛髪誘導においては間充織系の細胞である毛乳頭細胞が重要な役割を担っている。毛乳頭細胞は、未分化な表皮系幹細胞に働きかけて毛母細胞への分化を誘導するのだと考えられる。上皮と間充織の相互作用が発生時の形態形成において重要な役割を担っていることは古くから実験発生学的研究により示されている。生体中では多分化能を持つ幹細胞の制御には様々な細胞間シグナルが関与して毛髪の発生・成長・再生をコントロールしている因子についてはまだ不明な点が多い。本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究した結果、ヒト新生児包皮の初代培養細胞に特異的なモノクローナル抗体を作製し、得られた抗体のヒト毛髪組織内の分布を観察した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、毛髪再生に関連した細胞移植治療に必要な毛包幹細胞を同定・分離することができる、未分化毛包細胞のモノクローナル抗体、前記モノクローナル抗体を含む医薬、並びに前記モノクローナル抗体と他の結合分子との結合体を含む医薬または診断薬を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明のモノクローナル抗体は、毛髪組織に存在する未分化毛包幹細胞を認識するものである。本発明のモノクローナル抗体は、ヒト頭皮の組織標本に対する反応性を免疫組織化学染色法で測定した場合、毛母細胞が毛乳頭に接している、毛球の最も下部にある細胞を認識するものである。本発明のモノクローナル抗体は、毛包幹細胞と同等な特徴を持つ皮膚に存在する幹様細胞を認識するものである。本発明のモノクローナル抗体は、ヒト新生児包皮の初代培養細胞を動物に免疫し、前記動物から抗体産生細胞を単離し、これをミエローム細胞と融合することによりハイブリドームを作製し、次いで得られたハイブリドームをスクリーニングすることにより得られる単一クローンのハイブリドームにより産生されるものである。本発明のハイブリドームは、モノクローナル抗体を産生するものである。本発明の医薬は、モノクローナル抗体を含むものである。本発明の医薬または診断薬は、(a) モノクローナル抗体；および (b) 抗癌化学療法剤、ラジオアイソトープ、蛋白性毒素、致死性蛋白、あるいはこれを発現する遺伝子を挿入した発現ベクター、酵素、ストレプトアビジンから成る群から選択される結合分子：の結合体を含むものである。本発明の医薬または診断薬は、毛髪幹様細胞の細胞移植治療用または毛髪再生診断用である。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明による未分化毛包細胞を認識するモノクローナル抗体の製造方法について、以下の

実施例により詳細に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。本発明は未熟な毛包の細胞を認識するモノクローナル抗体を作製することを目的としていることから、より未熟な細胞を含む新生児の表皮に含まれる細胞（塊）をその抗原として用いることを考えた。本発明のモノクローナル抗体を得るための免疫源としては、ヒト新生児包皮の初代培養細胞を用いることができる。かかる細胞の単離のための源および単離方法は、特に限定されず、健康新生児包皮から単離される。具体的には、Human Embryonic Keratinocyte (HEK) 10 として米国Cell Application Inc.から市販されているヒト新生児の包皮の初代培養細胞を抗原として用いた。免疫の方法として、抗体価の効率的な上昇が期待できる脾臓に直接抗原を注射する方法を選んだ。凍結保存したHEK細胞を解凍し、培地で1度洗浄した後にPBSに懸濁したものを、Balb/cマウス（6週齢、♀、日本クレア）1匹につき100 μ L、計3匹に注射した。更に3～5週間後に追加免疫として腹腔にHEKを同量注射した。尾静脈血の抗血清のELISAによって、高い抗体価を示した1匹のマウスより脾臓を摘出してハイブリドーマを作製した。20

【0006】この脾細胞とミエロマ細胞（p3-X63-Ag 8.653、理研細胞銀行）を5:1の割合にて、40%ポリエチレングリコール存在下で融合した。これをHAT選択培地で培養し、選択された40個のハイブリドーマプールについて96穴タイタープレートを用いて限界希釈を行い、上清中の抗体のスクリーニングを行った。スクリーニングにはヒト頭皮切片を用いて、ハイブリドーマ培養上清に含まれる抗体を一次抗体としたABC法による免疫組織化学染色を行った。この抗原抗体反応によって認識される部分について、1)毛包の組織中で未熟な細胞を含んでい30
ると考えられる部分（バルジ、毛球の下部など）、2)毛髪の構造の前駆細胞になると考えられる部分、3)その他、毛髪周期、毛包の構造などにおいて部分的に認識するもの、の視点に立って、限界希釈したハイブリドーマ上清のスクリーニングを行った。その結果、ハイブリドーマプール28Aより2つのユニークなモノクローナル抗体を単離した。

【0007】抗体MAb-sDPIは毛母細胞が毛乳頭dpに接している、毛球hbの最も下部にある細胞を認識した(図1aに矢印で示す)。認識される細胞は、非常に小さい細胞 *40

*であり細胞全体に対する核の割合が大きく、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色によって濃く染まらない(図1b)、毛球部分にメラノサイトが多いときにこの抗体が認識する細胞は少ない、のような特徴がある。抗体MAb-sDPが認識する細胞の領域よりやや上側（表皮側）の細胞は活発に増殖を続けている細胞群であり、将来的に毛包のそれぞれの部分（毛随、内毛根鞘、外毛根鞘）に分化する。Germinative cellsと呼ばれているこの細胞群に対して、ある期間をあけてこれらの基となる細胞を供給する幹様細胞があるという概念は古くから提唱されており、最近再び注目されつつある。前記抗体MAb-sDPが認識する細胞は、前記Germinative cellsの幹様細胞を認識している。したがって、前記抗体MAb-sDPを用いると、毛髪再生に関連した細胞移植治療に必要な毛包幹細胞を同定・分離することができる。このように、抗体MAb-sDPを用いることにより、モノクローナル抗体を含む医薬や、(a)モノクローナル抗体；および(b)抗癌化学療法剤、ラジオアイソトープ、蛋白性毒素、致死性蛋白、あるいはこれを発現する遺伝子を挿入した発現ベクター、酵素、ストレプトアビジンから成る群から選択される結合分子：の結合体を含む医薬または診断薬、主に毛髪幹細胞の細胞移植治療用または毛髪再生診断用として使用することができる。

【0008】

【発明の効果】本発明は、未分化毛包細胞のモノクローナル抗体を用いると、毛髪再生に関連した細胞移植治療に必要な毛包幹細胞を同定・分離することができる。発明者の作製した抗体について、抗体MAb-sDPIは興味深い認識をすることより、将来的に毛髪再生に関わる新たな知見を得られる可能性が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】顕微鏡による毛乳頭の周囲の免疫組織化学染色による写真である。

【図2】顕微鏡による毛乳頭の周囲のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による写真である。

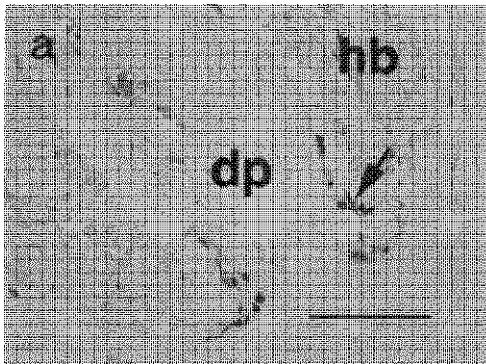
【符号の説明】

dp: 毛乳頭

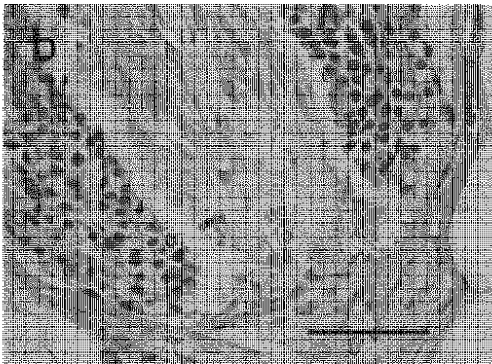
hb: 毛球

bar=50 μ

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
A 6 1 P	17/14	A 6 1 P	17/14
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53 Y
	33/577		33/577 B
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08
(72)発明者	亀田 隆 秋田県秋田市広面字広面180 セジュール K K 202	(72)発明者	菅原 美里 秋田県南秋田郡昭和町大久保字北野大崎道 添140
(72)発明者	畠山 晋 秋田県能代市向能代字上野134	F タ-ム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
(72)発明者	辻村 範行 秋田県河辺郡雄和町女米木字高麗沢25		4C083 AA071 CC37 EE22 4C084 AA19 MA02 NA14 ZA921 4C085 AA14 BB11 CC02 DD23 DD61 EE01 4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	药物包括单克隆抗体和未分化毛囊细胞和诊断剂的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2003342300A	公开(公告)日	2003-12-03
申请号	JP2002151941	申请日	2002-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	普洱茶实验室		
申请(专利权)人(译)	公司洱茶实验室 秋田大学长		
[标]发明人	杉山俊博 亀田隆 畠山晋 辻村範行 菅原美里		
发明人	杉山 俊博 亀田 隆 畠山 晋 辻村 範行 菅原 美里		
IPC分类号	G01N33/53 A61K8/00 A61K8/96 A61K8/98 A61K39/395 A61K45/00 A61P17/14 A61Q5/00 A61Q7/00 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/577 A61K7/00 A61K7/06		
FI分类号	C07K16/18 A61K7/00.K A61K7/06 A61K39/395.N A61K45/00 A61P17/14 G01N33/53.Y G01N33/577.B C12P21/08 A61K8/00 A61K8/98 A61Q5/00 A61Q7/00 C12N5/00.202.D C12N5/074		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C083/AA071 4C083/CC37 4C083/EE22 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA921 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/DD23 4C085/DD61 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4B065/AA90		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种未分化的毛囊细胞的单克隆抗体，一种包含所述单克隆抗体的药物和一种单克隆抗体，所述单克隆抗体能够鉴定和分离与毛发再生有关的细胞移植治疗所需的毛囊干细胞。 本发明提供了包含肽与另一种结合分子的缀合物的药物或诊断剂。 解决方案：本发明的单克隆抗体用人新生儿包皮的原代培养细胞免疫动物，从动物中分离出产生抗体的细胞，并将其与骨髓瘤细胞融合以制备杂交瘤，然后 它是由通过筛选获得的杂交瘤而获得的单克隆杂交瘤产生的。

