

明 細 書

発明の名称：毛髪改善のための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、毛髪改善のための組成物に関する。

背景技術

[0002] 男性ホルモンを抑制することによる増毛剤が開発されている。しかし、この治療は、治療している期間は増毛効果があるが、治療を終了すると増毛効果が消失する。これは、男性ホルモンを抑制することによる増毛効果は、対処療法的であり、組織再生を介した根本治療ではないことを示唆する。

[0003] 皮膚に対してPPAR γ を欠如させても表現型がないこと、PPAR γ アンタゴニスト処理された皮膚では、成長期に移行した毛髪が観察されなかったことが示されている（非特許文献1）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Festa E. et al., Cell, 146: 761-771, 2011

発明の概要

[0005] 本発明は、毛髪改善のための組成物を提供する。

[0006] 本発明者らは、ピオグリタゾンが、毛髪の量または質の向上に用い得ることを見出した。本発明は、これらの知見に基づくものである。

[0007] 本発明によれば、以下の発明が提供される。

（1）ピオグリタゾンを含む、毛髪の量または質の向上に用いるための組成物。

（2）経口投与用の組成物である、上記（1）に記載の組成物。

（3）皮膚への局所投与用の組成物である、上記（1）に記載の組成物。

[0008] （11）ピオグリタゾンを含む、M2マクロファージの増加およびPPAR γ の発現増加を伴う皮膚の組織修復を促進させ、これにより毛髪の量または

質を向上させることに用いるための組成物。

(12) ピオグリタゾンを含む、毛髪の太さを増加させることに用いるための組成物。

(13) ピオグリタゾンを含む、毛髪のキューティクルの配向を整える、または改善することに用いるための組成物。

(14) 経口投与用の組成物である、上記(11)～(13)のいずれかに記載の組成物。

(15) 皮膚への局所投与用の組成物である、上記(11)～(13)のいずれかに記載の組成物。

(16) 医薬である、上記組成物。

[0009] (20) ピオグリタゾンを含む、M2マクロファージの増加およびPPAR γ の発現増加を伴う皮膚の組織修復を促進させ、これにより毛髪の量または質を向上させることに用いるための組成物。

(21) ピオグリタゾンを含む、成長期毛を増加させることに用いるための組成物。

(22) ピオグリタゾンを含む、毛髪の太さを増加させることに用いるための組成物。

(23) ピオグリタゾンを含む、毛髪のキューティクルの質を改善する(例えば、毛髪のキューティクルの配向を整える、または改善する)ことに用いるための組成物。

(24) 対象において毛髪の量または質(好ましくは、毛髪の太さ、または毛髪のキューティクルの質)を向上させる方法であって、

当該対象にピオグリタゾンを投与することを含む、方法。

(25) 前記投与が、当該対象の皮膚への局所投与である、上記(24)に記載の方法。

(26) 前記投与が、当該対象への経口投与である、上記(24)に記載の方法。

(27) ピオグリタゾン投与後に、対象の毛髪の量または質を検査すること

をさらに含む、上記（２４）～（２６）のいずれかに記載の方法。

（２８）ピオグリタゾン投与後に、皮膚または頭皮におけるM2マクロファージの増加およびPPAR γ の発現増加を伴う皮膚の組織修復の促進の有無を検査することをさらに含む、上記（２４）～（２７）のいずれかに記載の方法。

（２９）上記（２４）～（２８）のいずれかに記載の方法において用いるための、ピオグリタゾンを含む、組成物。

（３０）上記（２４）～（２８）のいずれかに記載の方法において用いるための組成物の製造における、ピオグリタゾンの使用。

[0010]（３１）医薬である、または医薬的使用のための上記組成物。

（３２）化粧品である、または化粧的使用のための上記組成物。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、ピオグリタゾンで処置した頭皮から生える毛髪の太さの変化を示す図である。上のパネルは、頭皮のハーフサイドのみを処置した場合の、処置側と非処置側の毛髪の太さの相違を示す。グラフ中、「＃１」は処置１ヶ月後を表し、「＃６」は処置６ヶ月後を示す。下のパネルは未治療側の太さに対しての変化率と治療側の太さに対しての変化率の割合の比較を示す。

[図2]図２は、ピオグリタゾンで処置した部分の頭皮と処置していない部分の頭皮の毛髪のキューティクルの電子顕微鏡写真を示す。

[図3]図３は、ピオグリタゾンで処置した部分の頭皮と処置していない部分の頭皮の毛髪のキューティクルに基づく髪質評価の結果を示す。

[図4]図４は、特定の遺伝子の発現に対するピオグリタゾン処置の効果を示す。

[図5]図５は、ヒト頭皮における特定の遺伝子の発現に対するピオグリタゾン処置の効果を示す。

[図6]図６は、実施例における白髪の減少に関するデータを示す。

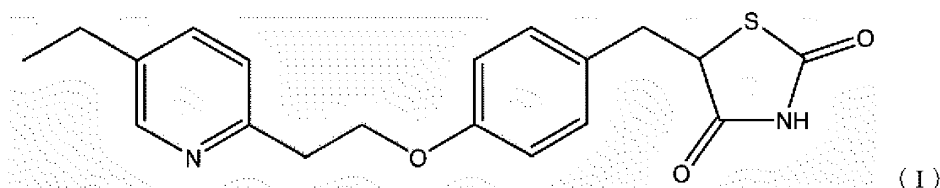
[図7A]図７Ａは、実施例における頭部の評価領域の９分割の方法の模式図である。

[図7B]図7Bは、ピオグリタゾン処置までの薄毛の進行の程度と、ピオグリタゾン処置後の薄毛の進行の程度を示す。

発明の具体的な説明

- [0012] 本明細書では、「対象」とは、哺乳動物であり得、例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、モルモット、ラットおよびリス等のペット；ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、およびヤギ等の家畜；サル、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、ボノボ、およびヒト等の霊長類を含む。対象は、糖尿病または非糖尿病であり得、好ましくは、非糖尿病患者であり得る。
- [0013] 本明細書では、「処置」とは、治療的処置および予防的処置が含まれる意味で用いられる。本明細書では、治療とは、疾患もしくは状態の悪化の抑制、疾患もしくは状態の悪化の遅延、疾患もしくは状態の改善、または疾患もしくは状態の治癒を含む意味で用いられ得る。本明細書では、予防とは、疾患もしくは状態の発症の抑制、または疾患もしくは状態の発症の遅延を含む意味で用いられ得る。
- [0014] 本明細書で用いられる「医薬」とは、治療的効果および予防的効果などの臨床的効果を期待して用いられる製品を意味する。医薬としては、例えば、医薬組成物、および移植材料が挙げられる。本明細書で用いられる「皮膚科学的組成物」とは、皮膚に局所適用することに適した組成物を意味する。皮膚科学的組成物としては、皮膚に局所適用することに適した医薬、および、化粧品組成物が挙げられる。化粧品組成物としては、例えば、保湿剤、コンディショナー、老化防止剤、美白剤、日焼け止め剤、制汗剤、ひげそり用組成物、ひげそり後用組成物、ファンデーション、リップスティック、口紅、整髪料、石けん、シャンプー、洗浄剤、および潤滑剤などの肌に局所適用されるパーソナルケア組成物があげられる。パーソナルケア製品としては、パーソナルケア組成物に加えて、組成物形態を取らない構造物（例えば、下着、おむつ、ティッシュ、拭き取り布、マスク、パッチ等）が挙げられる。
- [0015] ピオグリタゾンは、チアゾリジン系の経口血糖降下薬である。ピオグリタゾンは、以下の化学式（I）を有する。

[化1]



[0016] 本発明によれば、ピオグリタゾンは、毛髪（例えば、頭髮）の量または質を向上させることができる。より具体的には、ピオグリタゾンは、毛髪の量（例えば、成長期毛の量）を増やし、毛髪のキューティクルを整え、白髪の本数もしくは割合を減少させ、および／または、毛髪の太さ（並びに、毛髪をつやおよびこし、毛髪の弾性や光沢）を改善した（向上させた）。したがって、本発明によれば、ピオグリタゾンを含む、毛髪の質（例えば、毛髪の太さ、毛髪をつやおよびこし、毛髪の弾性や光沢）を向上させることに用いるための組成物が提供される。毛髪の太さは、例えば、直径40 μm 以上、直径50 μm 以上、直径60 μm 以上、好ましくは直径70 μm 以上、より好ましくは直径80 μm 以上、さらに好ましくは直径90 μm 以上を有する毛髪の本数または割合が増加し得、この用途で本発明の組成物は用いられ得る。これは、直径40 μm の毛髪を増やす抗アンドロゲン薬（例えば、フィナステリドなど）とは異なる。毛髪の太さは、治療前と比較して5%以上、6%以上、7%以上、8%以上、9%以上、または10%以上増加し得、この用途で本発明の組成物は用いられ得る。ある態様では、本発明によれば、ピオグリタゾンを含む、毛髪のキューティクルを整えること（キューティクルの配向を整える、または改善する）に用いるための組成物が提供される。ある態様では、本発明によれば、ピオグリタゾンを含む、白髪の本数または割合を減少させることに用いるための組成物が提供される。ある態様では、本発明によれば、ピオグリタゾンを含む、毛髪の太さ（並びに、毛髪をつやおよびこし）を増加させることに用いるための組成物が提供される。

[0017] 本発明によれば、対象は、白髪を有する対象であり得る。本発明によればまた、対象は、薄毛症を有する対象であり得る。薄毛症の対象は、例えば、

脱毛症（例えば、男性型脱毛症（AGA）を有する対象であり得る。本発明によればまた、対象は、乱れた（剥がれた、荒れている）キューティクルを有する毛髪を有する対象であり得る。本発明によればまた、対象は、 $70\mu\text{m}$ 以下、 $60\mu\text{m}$ 以下、 $50\mu\text{m}$ 以下、または $40\mu\text{m}$ 以下の太さ（直径）を有する毛髪を有する対象であり得る。本発明によれば、対象は、抗アンドロゲン薬治療を経験した対象（例えば、AGAを有する対象）であり得る。本発明によれば、対象は、抗アンドロゲン薬治療によっても薄毛の進行が停止または改善した経験を有しない対象（例えば、AGAを有する対象）であり得る。

[0018] 本発明によれば、ピオグリタゾンは、対象に経口投与し得る。したがって、本発明によれば、ピオグリタゾンを含む組成物は、経口投与用組成物であり得る。経口投与用組成物は、例えば、散剤、顆粒剤、内服錠、カプセル剤、または丸剤であり得る。ピオグリタゾンは、薬学的に許容可能なその塩、例えば、ピオグリタゾン塩酸塩であり得る。

[0019] 本発明によれば、ピオグリタゾンは、対象において皮膚に対して局所投与し得る。従って、本発明によれば、ピオグリタゾンを含む組成物は、皮膚科学的組成物、または皮膚に対する局所投与用の医薬組成物であり得る。皮膚に対する局所投与用の医薬組成物は、例えば、経皮投与、皮内投与、または皮下投与などの投与形態に適した剤形であり得る。皮膚科学的組成物は、経皮投与に適した剤形であり得る。皮膚科学的組成物、または皮膚に対する局所投与用の医薬組成物は、例えば、エレクトロポレーション等の浸透化技術によって経皮的に皮膚への浸透を高めてもよい。例えば、浸透性を高めるため、片手で濡れたガーゼを巻いたアースを握らせながら、META-TDS electroporation machine (CTP-802, Grand Aespio Inc., KOREA) を用いて $3\text{V}/6\text{mA}$ の出力〔実測値〕で皮膚に有効成分を浸透させることができる。この態様において、医薬組成物は、懸濁されたピオグリタゾンを含み得る。ある態様では、医薬組成物は、溶解したピオグリタゾンを含み得る。ある態様では、

医薬組成物は、ピオグリタゾンを含む懸濁液であり得る。ある態様では、医薬組成物は、ピオグリタゾンを含む、乳液、クリーム、またはオイルであり得る。

[0020] 本発明の組成物は、パーソナルケア組成物および医薬組成物などの組成物であり得る。

[0021] 医薬組成物としては、例えば、局所投与用の医薬組成物が挙げられ、本発明に用いることができる。局所投与用の医薬組成物は、粘膜適用または体表適用のための医薬組成物であり得、例えば、点眼剤、眼軟膏剤、舌下錠、バツカル錠、トローチ剤、含そう剤、スプレー剤、エアロゾル剤、および吸入剤；液剤、灌注剤、グリセリン剤、酒精剤、水剤、および塗布剤などの溶液製剤；乳剤、懸濁剤、リニメント剤、ローション、スプレー剤、およびリポソーム剤などの分散製剤；軟膏剤、硬膏剤、貼付剤、粘着テープ剤、パスタ剤、パップ剤、クリーム剤、油剤、およびスティック剤などの半固形製剤；並びに、エキス剤（軟エキス剤、乾燥エキス剤）、およびチンキ剤などの浸出製剤が挙げられる。

[0022] 本発明によれば、医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤を含んでいてもよい。薬学的に許容可能な賦形剤としては、溶剤、基剤、希釈剤、増量剤、充填剤、および補形剤；溶解補助剤、可溶化剤、緩衝剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、徐放化剤、および噴射剤；抗酸化剤、保存剤、保湿剤、遮光剤、帯電防止剤、芳香剤、着香剤、着色剤、および緩和剤が挙げられる。

[0023] パーソナルケア組成物としては、例えば、スキンケア、制汗剤、脱臭剤、美容品、化粧品、およびヘアケア製品が挙げられる。パーソナルケア組成物としては、保湿剤、コンディショナー、老化防止剤、美白剤、日焼け止め剤、制汗剤、ひげそり用組成物、ひげそり後用組成物、ファンデーション、リップスティック、口紅、整髪料、シャンプー、洗浄剤、および潤滑剤が挙げられる。パーソナルケア組成物は、パーソナルケア製品に用いられ得る。パーソナルケア製品としては、下着、おむつ、ティッシュ、拭き取り布、マス

ク、パッチ等が挙げられる。組成物は、有効成分に加えて賦形剤を含んでいてもよい。組成物は、例えば、静脈投与、経皮投与、経口投与、経腸投与、および腹腔内投与などの投与形態に適した剤形にすることができる。皮膚炎の予防および／または治療に関しては、経皮投与により本発明の組成物を投与してもよく、例えば、ゲル、エマルション、クリーム、液体、ペースト、ローション、リポソームクリーム等の形態（例えば、皮膚科学的組成物）であり得る。ある態様では、組成物は、軟膏であり得る。経皮投与の場合には、賦形剤としては、皮膚科学的に許容可能な賦形剤を用いることができ、これに適した剤形を用いることができる。経粘膜投与の場合には、賦形剤としては、粘膜適用上許容可能な賦形剤を用いることができ、これに適した剤形を用いることができる。

[0024] 本発明によれば、その必要のある対象において髪質を改善するための方法であって、当該対象にピオグリタゾンを投与することを含む、方法が提供される。本発明によれば、投与は局所投与であり得る。本発明によれば、投与は、髪質を改善する必要がある頭皮に対してなされる。

[0025] 本発明によれば、髪質を改善するためのピオグリタゾンが提供される。本発明によれば、髪質を改善することに用いるための医薬、化粧品、またはパーソナルケア製品の製造におけるピオグリタゾンの使用が提供される。

[0026] 本発明のある態様では、頭皮または皮膚の改質のための他の医薬、化粧品、または組成物と併用してもよい。他の医薬、化粧品、または組成物としては、例えば、

(i) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、頭皮組織または皮膚組織に組織再生を誘発させることに用いるための注射用医薬組成物であって、前記分泌物は、脂肪幹細胞を無血清培地中で低酸素条件下で培養して得られるものである、医薬組成物 {ここで、頭皮または皮膚1箇所当りにタンパク質量換算で0.3~0.5 μ g、または0.35~0.45 μ gの前記分泌物が皮下投与または皮内投与されることが好ましい} ;

(ii) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、体表の創傷を治療

することに用いるための注射用医薬組成物であって、前記分泌物は、脂肪幹細胞を無血清培地中で低酸素条件下で培養して得られるものである、医薬組成物 {ここで、頭皮または創傷部位の周辺体表組織1箇所当りにタンパク質量換算で0.3～0.5 μg 、または0.35～0.45 μg の前記分泌物が皮下投与または皮内投与されることが好ましい} ;

(iii) 脂肪幹細胞からの分泌物を有効成分として含む、毛髪を改質することに用いるための注射用医薬組成物であって、前記分泌物は、脂肪幹細胞を無血清培地中で低酸素条件下で培養して得られるものである、医薬組成物 {ここで、頭皮または皮膚1箇所当りにタンパク質量換算で0.3～0.5 μg 、または0.35～0.45 μg の前記分泌物が皮下投与または皮内投与されることが好ましい} ; または

(iv) (a)頭皮または皮膚を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物、(b)創傷を治療することに用いるための局所投与用医薬組成物、または、(c)増毛を促進させることに用いるための局所投与用医薬組成物または毛髪を改質することに用いるための局所投与用医薬組成物であって、治療上有効量の飽和脂肪酸またはその医薬上許容可能な塩を含む、医薬組成物 {ここで、医薬組成物は、飽和脂肪酸とその他の添加剤とからなるものであってもよく、飽和脂肪酸は、パルミチン酸、ステアリン酸、およびミリスチン酸からなる群から選択される1以上の脂肪酸であり得る}

であり得る。これらの詳細は、例えば、参照することによりその全体が本明細書に組込まれるUS2020/0101114A、およびUS2020/0246409Aに開示される通りである。本発明では、例えば、上記(i)～(iv)のいずれかの1以上により処置された対象に対してピオグリタゾン投与することができる。

実施例

[0027] 実施例1：毛髪の太さの変化

ピオグリタゾンとしては、ピオグリタゾン錠15mg「NP」を用いた。1錠のピオグリタゾンをすり鉢で粉碎し、3mLの注射用水PL「フソー」

に懸濁して用いた。女性患者3人（69歳、48歳、65歳の患者）を対象とした。患者の両側の外眼角を頭側に延長し、両耳と頭頂を結ぶ線と交差する2点に墨汁で刺青をし、マーキングを中心に同一条件下で撮影した。頭皮のハーフサイド全体に対して、ピオグリタゾンの懸濁液を塗った。浸透性を高めるため、META-TDS, electroporation machine (CTP-802, Grand Aespio Inc., KOREA) を用いて3V/6mAの出力（実測値）で皮膚にピオグリタゾンを浸透させた。この処置を2週間おきに1度の頻度で12回（すなわち、6ヶ月間）行った。検査部位は、頭部の正中線から左右ともに51mm平均であった。治療開始から6カ月目（12回治療後）に、dermo prime, dpharris (CHOWIS, KOREA) を用いて各検査部位2枚をデジタル画像としてコンピュータに取り込み、毛髪の太いものから各画像3本（1検査画像2枚毛6本）を選別し、太さを自動計測した。その検査値（毛の太さ：mm）の平均値をもってグラフ化した。具体的には治療前を100として治療後の太さを割合で示した。ハーフサイド治療の患者群では治療前後と左右差を比較した。図1に示されるように、左右で比較すると、毛髪は、治療後1ヶ月（経過#1）、治療後6ヶ月（経過#6）と治療回数が増えて行くにつれてピオグリタゾン処置側（PG処置側）において、陰性対照と比較して毛髪が太くなることが確かめられた。また、図1下段には、未治療側の変化率に対する治療側の変化率を示す。図1下段に示されるように、PG処置側の変化率は陰性対照の変化率に比べて変化の割合が高いことが確かめられた。

[0028] ところで、図1の上段に示される結果によれば、陰性対照（注射用水PLの投与）によっても毛髪の太さが治療経過と共に増大する様子が確認された。これは、患者において、治療開始前数ヶ月にわたって毛髪の太さに変化が観察されなかったことを考慮すると、PG投与側（治療側）からの未治療側への治療効果の伝播によるものであると考えられた。

[0029] そこで、陰性対照として頭部の片側半分は生理食塩水を注入した（残りの

半分は未処置とした)。6ヶ月間毎月頭部の片側に生理食塩水注入による毛髪の変化(1.4mm以上の毛髪本数)を観察したが、治療前と治療6ヶ月目の変化率は-0.84%~+1.24%、平均1.03%であった。また生理食塩水注入した治療側と未治療側(何も注入しない)では治療6ヶ月目の変化は-0.99%~+1.25%、平均1.06%であった(n=4)。6ヶ月間毎月頭部の片側に生理食塩水注入による毛髪の変化(1.4mm以上の毛髪の長さの総和)を観察したが、治療前と治療6ヶ月目の変化は-0.79%~+1.33%、平均1.05%であった。また生理食塩水注入した治療側と未治療側では治療6ヶ月目の変化は-0.95%~+1.28%、平均1.07%であった(n=4)。このように、陰性対照として生理食塩水を投与した群では剃毛後3日目に1.4mm以上の毛髪の有意な増加は認められなかった。剃毛後3日目に伸びが1.4mm未満の毛髪の太さは、平均で75.39 μ mであった。1.4mm以上の毛髪では太さが平均で97.42 μ m以上となる傾向が示されている。直径80 μ mの毛髪は、視覚的に十分に太いと認定できる。

[0030] このように、PGの代わりに生理食塩水を投与した群では、毛髪の太さに改善効果は認められなかった。

[0031] これらの結果から、ピオグリタゾンによる頭皮の改質は、毛髪(特に成長期毛)の伸長速度の改善と、太くコシとハリのある毛髪の増加に繋がっていることが明らかとなった。また、頭皮のハーフサイド処置において、非処置側に毛髪の太さの改善効果が認められたが、これは、処置側から頭皮の改質効果が伝播したことによるものであることが示唆された。

[0032] 実施例2：髪質の変化

本実施例では、髪のキューティクルについて処置前後で改善がみられたかを調べた。

[0033] 実施例3のPG投与群(月2回投与)の毛髪を採取し、患者の毛髪の伸長速度(15mm/月)を考慮して、治療前2ヶ月から3カ月の間(2.5カ月付近)に相当する部位と、治療開始から4カ月から5カ月(4.5ヶ月付

近)の部位を採取し、それぞれジップロック(登録商標)に密閉保存した。その後検査部位の毛髪を固定板にレジンで接着固定させた。それらを密閉保存し、検査日に炭素固定し、同日に常法により走査電子顕微鏡により髪のキューティクルの状態を観察した。陰性対象として、同一患者の処置されなかった(ハーフサイド治療の未治療)部分の毛髪を用いた。そして、毛髪の新しく伸びた部分(根元側)と、既存の部分(先端側)とで比較した。代表的な例を図2に示す。

[0034] その結果、治療した毛髪については、先端側ではキューティクルが荒れているのに対して、新しく伸びた部分である根元側ではキューティクルが整っている様子が観察され、髪質の差が明らかに改善していた。これに対して、陰性対象の処置されなかった部分の毛髪では、根元の方が評点は高いが先端側もキューティクルの荒れが観察され、処置されなかった部分ではその質の改善効果は認められなかった。

[0035] より多くの患者(3名:女性:48, 65, 69歳)に対して同様の評価を実施した(PG15mg、月2回投与、計12回、6月投与)。評価は、最後の投与から20日後に、電子顕微鏡画像に基づいて下記の評点に基づいて行った。評価は、医師6名により行った。評点の平均値を求めた。

[0036] 髪質評価の評点表

5点:キューティクルが整っており、荒れが見当たらない。

4点:平均よりもキューティクルが整っているが、多少の荒れが認められる。

3点:キューティクルの整い方が平均的である。

2点:平均よりもキューティクルが荒れており、多少の剥がれが認められる。

1点:キューティクルが全体的に荒れており、全体的に剥がれが認められる。

[0037] 結果は、表1および図3に示される通りであった。

[0038]

[表1]

表1：治療部位と未治療部位との髪質の変化

	根元	先端
治療側	3.7	2.6
未治療側	3.3	2.6
改善度合	1.12	1.0

[0039] 上述の通り、P G治療群では、投与後に髪質の変化が認められた。このことから、ピオグリタゾンは、毛髪の質に対して改善効果をもたらすことが明らかとなった。

[0040] 実施例3：皮下投与後の組織における遺伝子発現の変化

次に、組織における遺伝子発現の変化を確認した。対象としては12週齢ウイスターラット（雄）を用いた。2.5 μg /箇所投与群に関しては、背部に頭部から尾部に対して3つの領域を設定し、さらに各領域を背骨の左右で2つの領域に分けることで、背部に計6つの領域を設定した。これらの投与群では、この6つの各領域の中央付近の2箇所ずつにP Gを投与した。具体的には、2.5 μg /箇所投与群（ $n=3$ ）に関しては、1箇所あたり2.5 μg （20 μL ）のP Gを投与した。また、0.1 μg /箇所投与群および0.02 μg /箇所投与群に関しては、頭部から尾部に対して2つの領域を設定し、さらに各領域を背骨の左右で2つの領域に分けることで、背部に計4つの領域を設定した。これらの投与群では、この4つの各領域の中央付近の2箇所ずつにP Gを投与した。具体的には、0.1 μg /箇所投与群（ $n=3$ ）に関しては、1箇所あたり0.1 μg （20 μL ）のP Gを投与し、0.02 μg /箇所投与群（ $n=2$ ）に関しては、0.02 μg （20 μL ）のP Gを投与した。なお、前記2箇所間の距離は1 cmとした。8週後に注入部中央上方を剃毛後3 mmパンチで組織採取した。

[0041] 採取した組織片を液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。保存された組織片からのtotal RNAの精製と抽出は、25 mgの組織片を5個のステンレスビーズ（直径3 mm）と共にサンプルチューブに封入し、R

Neasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) および TissueLyser II (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて組織片をホモゲナイズした後に、キットに付属のプロトコル通りにスピンカラムを利用して行った。定量PCRによる遺伝子発現解析は、Integrated DNA Technologies, Inc (Skokie, IL, USA) に遺伝子特異的プライマーおよびプローブの設計と合成を委託し、PrimeTime Gene Expression Master Mix 試薬 (Integrated DNA Technologies, Inc, Skokie, IL, USA) と Rotor-Gene Q PCR 装置 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を利用して、対象遺伝子の発現量を解析した。それぞれの検体に対して1遺伝子あたり2回または3回のPCR解析を実施した。

[0042] 定量PCR (qPCR) による遺伝子発現解析に用いられた7種類のラット遺伝子の情報と、核遺伝子に対する合成されたプローブおよびプライマーセットの塩基配列は以下のとおりである。

1.) Ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (RplP0), *Rattus norvegicus*: mRNA, 1,093 bp, NM_022402.2, GI: 310616731

Probe: 6-FAM/CCT GTC TTC /ZEN/CCT GGG CAT CAC G/3IABkFQ (配列番号1)

Primer-1: CAA TCC CTG ACG CAC CG (配列番号2)

Primer-2: TGT CTG CTC CCA CAA TGA AG (配列番号3)

2.) CD34, *Rattus norvegicus*: CD34 molecule (Cd34), mRNA 1,161 bp NM_001107202.2 GI: 169790781

Probe: 6-FAM/TCC CTG GAA /ZEN/GTA CCA GCC ACT ACT /3IABkFQ (配列番号4)

Primer-1: GGA GTA TTT CCA CCA GTT CCT AC (配列番号5)

Primer-2: GAT GGC TGG TGT GGT CTT ATT (配列番号6)

3.) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcript vari

ant 1, (PPARG), *Rattus norvegicus*: mRNA 1,805 bp NM_013124.3 GI: 223941861

Probe: 6-FAM/CCT GGG CGG /ZEN/TCT CCA CTG AGA ATA /3IABkFQ (配列番号 7)

Primer-1: GAA TTA GAT GAC AGT GAC TTG GC (配列番号 8)

Primer-2: AGC AGG TTG TCT TGG ATG TC (配列番号 9)

4.) CD163 molecule (Cd163), *Rattus norvegicus*: mRNA 4,223 bp NM_001107887.1 GI:157823808

Probe: 6-FAM/ACC CAA CGG /ZEN/CTT ACA GTT TCC TCA A/3IABkFQ/ (配列番号 10)

Primer-1: TCA TCC GTC TTC GAA TCC ATC (配列番号 11)

Primer-2: TCT CAT TGC CTT CCT CTT GTG (配列番号 12)

5.) CD68 molecule (Cd68), *Rattus norvegicus*: mRNA 1,224 bp NM_001031638.1 GI: 72255506

Probe: 6-FAM/CTC TGA TGT /ZEN/CGG TCC TGT TTG AAT CCA /3IABkFQ/ (配列番号 13)

Primer-1: TGA GAA TGT CCA CTG TGC TG (配列番号 14)

Primer-2: CAT TCC CTT ACG GAC AGC TTA C (配列番号 15)

[0043] Housekeeping GenesであるRibosomal protein lateral stalk subunit PO (RplPO) と目的遺伝子のmRNAの発現量(それぞれの遺伝子のqPCR反応から得られたCtの平均値、各検体2回検査の3体平均)の差(ΔCt)を算出し、さらに、解析の実験検体と対照(PGの投与無し)における ΔCt の差($\Delta\Delta Ct$)を算出した。この $\Delta\Delta Ct$ の値から目的遺伝子の相対的な遺伝子発現比(倍率)に変換し、その倍率をグラフ上に示した。

[0044] 結果は、図4に示される通りであった。図4に示されるように、ピオグリタゾン投与群では、CD34、およびPPAR γ の発現の増加が認められた。また、図4に示されるように、ピオグリタゾン投与群の組織では、同時に

CD68、およびCD163の増加も認められた。このことは、ピオグリタゾン投与群の組織では、M2マクロファージの活性がM1マクロファージよりも高いことを示すものであると考えられ、すなわち、ピオグリタゾン投与群では、組織修復が促進されていることを示唆するものである（Festa et al., Cell, 146:761-771, 2011参照；本文献は、引用することによりその全体が本明細書に組込まれる）。また、CD34とPPAR γ の発現向上は、皮膚において脂肪幹細胞および幼若脂肪細胞（脂肪前駆細胞）が誘導されたことを示唆する。Festa et al., 2011では、脂肪前駆細胞においてPPAR γ の発現が誘導されることが開示され、成長期の開始時に脂肪前駆細胞を増加させることが記載されている。Festa et al., 2011ではまた、成熟脂肪細胞を欠いたAzipマウスが脂肪前駆細胞を有しており、野生型マウスと同様に毛包を再生することも開示されている。このように、CD34とPPAR γ の発現は、毛周期において成長期が開始されたことを示唆するものである。

[0045] ヒト対象においても確認をした。実施例2の通りピオグリタゾンの懸濁液を作製して懸濁液全量をヒト対象（42歳男性）の頭部に塗った。PG処置は、頭皮全体に2カ月おきに1度の頻度で3回行った。治療前と3回の治療を行い、その2ヶ月後（初回治療から6ヶ月後）に3mmパンチにて検査部付近の組織採取を行った。組織採取は半割にし、半分を10%ホルマリンで固定し、冷蔵保存した。残りの半分をRNA Stabilization Solution (RNAlater, Thermo Fisher Scientific, Lithuania) に浸し、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。その後ラット遺伝子発現解析と同様の手順で遺伝子発現解析を行った。

[0046] ハウスキープング遺伝子であるRibosomal protein lateral stalk subunit P0 (RplP0) と目的遺伝子のmR

NAの発現量（それぞれの遺伝子について3回のqPCR反応から得られたCtの平均値）の差（ ΔCt ）を算出し、さらに、被検者の治療前後の解析の対象となる検体と対照（未治療2人）における ΔCt の差（ $\Delta\Delta Ct$ ）を算出した。この $\Delta\Delta Ct$ の値から目的遺伝子の相対的な発現比（治療前後での遺伝子発現変動）を求めてグラフ上に示した。

[0047] 定量的PCRに用いたプローブとプライマーは以下の通りであった。

1)Homo sapiens ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (RPLP0), transcript variant 1, mRNA, 1,105 bp

Accession: NM_001002.4 GI: 1519314286

Probe: 56-FAM/CCC TGT CTT /ZEN/CCC TGG GCA TCA C/3IABkFQ/（配列番号16）

Primer-1: TGT CTG CTC CCA CAA TGA AAC（配列番号17）

Primer-2: TCG TCT TTA AAC CCT GCG TG（配列番号18）

2)Homo sapiens CD68 molecule (CD68), transcript variant 2, mRNA 1,790 bp Accession: NM_001040059.1 GI: 91199549

Probe: 56-FAM/AGG TCC TGC /ZEN/ATG AAT CCA AAG CTG A/3IABkFQ/（配列番号19）

Primer-1: CCA TGT AGC TCA GGT AGA CAA C（配列番号20）

Primer-2: CCA CCT GCT TCT CTC ATT CC（配列番号21）

3)Homo sapiens CD163 molecule (CD163), transcript variant 1, mRNA 4,190 bp Accession: NM_004244.5 GI: 344179109

Probe: 56-FAM/ATC CAT CTG /ZEN/AGC AGG TCA CTC CAG/3IABkFQ/（配列番号22）

Primer-1: CCA GAA CAC ATA TTC CCT CCA C（配列番号23）

Primer-2: GCA TAG TAA CTG TAC TCA CCA ACA（配列番号24）

4)Homo sapiens CD34 molecule (CD34), transcript variant 1, mRNA 2,621 bp Accession: NM_001025109.1 GI: 68342037

Probe: 56-FAM/CCT TGC AAC /ZEN/ATC TCC CAC TAA ACC CT/3IABkFQ（配列番号25）

号 2 5)

Primer-1: TGC CTG AAC ATT TGA TTT CTG C (配列番号 2 6)

Primer-2: GAC CTT TCA ACC ACT AGC ACT (配列番号 2 7)

[0048] 結果は図 5 に示される通りであった。ピオグリタゾン投与後の患者組織では、ラット同様に C D 6 8、および C D 1 6 3 の増加も認められた。このことは、ピオグリタゾン治療後の組織では、M 2 マクロファージの活性が M 1 マクロファージよりも高いことを示すものであると考えられ、すなわち、ピオグリタゾン投与群では、組織修復が促進されていることを示唆するものである。

[0049] 実施例 4 : 白髪の変化

ピオグリタゾンとしては、ピオグリタゾン錠 1 5 m g 「NP」を用いた。患者は 1 5 m g のピオグリタゾンを含む錠剤 1 錠を午前 1 0 時前後に毎日 1 回服用した。患者 4 人 (男性 2 人 : 5 4 歳、5 6 歳、女性 2 名 : 5 2 歳、5 3 歳の患者) を対象とした。患者の両側の外眼角を頭側に延長し、両耳と頭頂を結ぶ線と交差する 2 点に入れ墨をし、マーキングを中心に同一条件下で撮影した。

[0050] 5 3 歳男性患者は開始時に特定部位に白髪が無く、両耳を結ぶ線上の側頭部に入れ墨をし、マーキングを中心に同一条件下で撮影した。

[0051] ピオグリタゾンの内服は 6 ヶ月続け、2 ヶ月毎に同様の検査を行った。

トリコグラムは、マーキングを中心に撮影 (Canon Power Shot A520, Tokyo, Japan) し、撮影範囲に含まれる入れ墨を中心とした直径 1 1 m m の円 (面積 9 5 m m²) 内の毛髪を、2 方向で写真撮影し、目視で計量し、その 2 枚の平均を得た。

[0052] その結果、上記剃毛部において、治療前に白髪のある 3 人の患者のうちピオグリタゾン服用 6 ヶ月で 3 人全ての白髪が減少した。具体的には、上記剃毛部において平均 1 2 . 7 本 / 9 5 m m² の白髪が減少するようすが観察された (n = 3)。服用開始前を 1 0 0 とした時と比べて 2 3 . 2 % (n = 3) の白髪の本数が減少した。

[0053] 本実施例では、ピオグリタゾンによる毛髪の質の改善効果を認めた。ピオグリタゾンは、組織修復を誘導していることが遺伝子発現データから示唆され、毛髪の質の改善の効果は、ピオグリタゾンによる組織修復の結果であることが示唆された。

[0054] 実施例 5：部位別の頭皮改質効果

本実施例では、頭皮を 9 つの領域に分けて治療による効果を観察した。このようにすることによって、それぞれの患者毎に良い部分（毛の多い部分）と悪い部分（毛の少ない部分）とが混在する場合であっても、良い部分に対する影響と悪い部分に対する影響を分けて評価することが可能であり、精度の高い評価を実現することができると期待できる。

[0055] 1 年前の状態より悪化している男性型脱毛症（AGA）の男性患者（42 歳から 63 歳）4 人を対象とした。このうち 2 人の患者は抗アンドロゲン薬であるフィナステリドをそれぞれ 4 年前および 7 年前から継続して内服中であり、下記治療開始後も内服を継続した。本実施例では、これらの患者に対して、PPAR γ アゴニストであるピオグリタゾンを経口投与した。具体的には、15 mg のピオグリタゾンを含むピオグリタゾン錠（日本ジェネリック株式会社；JG、120 mg／錠）を撚鉢で粉碎後、得られた粉末 40 mg（内ピオグリタゾン含量は 5 mg）に乳糖（260 mg）を混ぜ合わせ 1 包とした。この 1 包を午前中に 1 日 1 回飲料水と共に患者に内服投与した。本実施例における治療開始の 10～12 カ月前の患者の真上からの写真と治療開始日の写真、および、治療開始から 2 カ月目の写真を評価した。薄毛外来を担当する 5 人の専門医により評価を行った。

[0056] 9 つの領域は、以下の基準に従って設定した。具体的には、頭頂部側から撮影した頭部画像を、楕円に見立て、長軸を 3 等分し、短軸を 3 等分して 9 つの領域に区分けた。図 7 A には、頭部の 9 つの区画をどのように分けたかが分かるように模式図を示す。以下評点にしたがって増毛効果を 5 名の専門医により評価した。すけ度合いは、頭頂から頭部を観察したときに頭皮が正常な頭皮と比較してどの程度すけて見えるかに基づいて求めた。

[0057] 増毛効果の評点

5点：ほぼ正常

4点：透け度合いが20%以下

3点：透け度合いが40%以下

2点：透け度合いが60%以下

1点：透け度合いが80%以下

[0058] 結果は、図7Bに示される通りであった。図7Bには、9つの領域に分けたそれぞれの区画の評点の平均点を示す。治療開始まで、いずれの患者においても薄毛の症状が悪化する様子が認められた。これに対して、ピオグリタゾンの内服を開始すると、2ヶ月という短い期間の中でも薄毛の進行を少なくとも停止できたことが理解できた（図7B参照）。特に悪化の度合いが高かった部位に改善傾向が見られた。このように、本実施例では、治療開始時期に悪化傾向であった患者の状態が改善傾向にあることがしめされている。このことから、PPAR γ アゴニストは、薄毛の治療において有効であることが示された。特にPPAR γ アゴニストは、幼若脂肪細胞（脂肪前駆細胞）を増加させ、頭皮を成長期に移行させるところ、AGAにおいてもこの仕組みで薄毛に効果が奏されたと考えられた。