

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5688496号
(P5688496)

(45) 発行日 平成27年3月25日(2015.3.25)

(24) 登録日 平成27年2月6日(2015.2.6)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 8/64 (2006.01)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)
A 6 1 K 38/28 (2006.01)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)
A 6 1 P 17/16 (2006.01)

A 6 1 K 8/64
A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 37/26
A 6 1 P 3/10
A 6 1 P 17/16

請求項の数 8 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-528653 (P2008-528653)
(86) (22) 出願日 平成18年8月29日(2006.8.29)
(65) 公表番号 特表2009-506107 (P2009-506107A)
(43) 公表日 平成21年2月12日(2009.2.12)
(86) 国際出願番号 PCT/IL2006/001001
(87) 国際公開番号 W02007/026356
(87) 国際公開日 平成19年3月8日(2007.3.8)
審査請求日 平成21年4月27日(2009.4.27)
審判番号 不服2012-23656 (P2012-23656/J1)
審判請求日 平成24年11月29日(2012.11.29)
(31) 優先権主張番号 60/711,666
(32) 優先日 平成17年8月29日(2005.8.29)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 514244398
アラヴァ・バイオ・テック・リミテッド
ARAVA BIO-TECH LTD.
イスラエル ネタンヤ (無番地) ウィ
ンゲート・インスティテュート
WINGATE INSTITUTE,
NETANYA, ISRAEL
(74) 代理人 110001818
特許業務法人R&C
(72) 発明者 テンネンバウム, タマー
イスラエル 96105 エルサレム ハ
ーズル・ブルヴァード 12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病および皮膚の老化を予防および治療するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態を治療または予防するために使用する場合に、任意に医薬上もしくは化粧品として許容される担体と共に、1 μMの配列番号1のPKCα偽基質ペプチド及び7×10⁻⁷Mの濃度にあるインスリンを含む皮膚への局所用医薬組成物もしくは化粧品組成物。

【請求項 2】

前記配列番号1のPKCα偽基質ペプチドが、N-ミリストイル化されている請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

PKCηインヒビターを含む請求項1に記載の組成物。

【請求項 4】

前記配列番号1のPKCα偽基質ペプチドがN-ミリストイル化され、そして、前記PKCηインヒビターがコポリマー1又は配列番号25のN-ミリストイル化PKCη偽基質ペプチドである請求項3に記載の組成物。

【請求項 5】

糖尿病及び／又は老化に関連する前記皮膚の病変、障害もしくは状態が、皮膚薄化、上皮薄化、皮膚乾燥、上皮における異常な分化パターン、全皮膚層における増殖の減少、皮下組織の皮下脂肪組織の欠如／不規則性、脆弱性、低減した肌の張り、皮膚の水分消失、皮膚のたるみ、皮膚の色素沈着過度および変色、刺激された過敏な皮膚、増加した皮膚炎

症、肌のきめの消失、基質線維（コラーゲンおよびエラスチン）構造の崩壊、皮膚の滑らかさおよび締まりの消失、弾力性の消失、制限された油／皮脂の分泌、糖尿病性脂肪類壊死症、環状肉芽腫、糖尿病性皮膚障害、糖尿病性水疱、制限された関節可動域、糖尿病性浮腫性硬化症、黒色表皮腫、後天性穿孔性皮膚病、インスリンアレルギー、皮膚感染症、または黄色腫である請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

老化に関連する前記皮膚の病変、障害もしくは状態が、乾燥した鱗状の皮膚、皮膚の菲薄化、乳頭間隆起（rete ridges）の平坦化、光線性の弾力線維症、しわ、目尻のしわ、肝斑、老斑、皮膚の色素沈着過度、変色、水疱形成の促進、脆弱性、低減した肌のはり、刺激に対する低下した閾値、張りの消失およびたるみ、弾性の消失、弛緩症、過形成で組織の乱れた弾性線維系、低減した皮膚柔軟性、低減した末端腺（acral gland）および汗腺、低減した皮脂産生、結果として水分消失を生じさせる経皮水分蒸散（TEWL）である請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 7】

糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態の再発を予防するための皮膚への局所用医薬組成物もしくは化粧品組成物であって、任意に医薬上もしくは化粧品として許容される担体と共に、 $1 \mu\text{M}$ の配列番号 1 の PKC α 偽基質ペプチド及び $7 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度にあるインスリンを含む組成物。

【請求項 8】

糖尿病および／または老化に関連する個体の皮下脂肪層を再活性化するための皮膚への局所用医薬組成物もしくは化粧品組成物であって、任意に医薬上もしくは化粧品として許容される担体と共に、 $1 \mu\text{M}$ の配列番号 1 の PKC α 偽基質ペプチド及び $7 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度にあるインスリンを含む組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変および障害を予防および／または治療するための方法および組成物に関する。より具体的には、本発明は、皮膚の病変もしくは障害に関連する皮膚の障害された生理的状态を回復させることができる様々な作用物質の使用に関する。

30

【背景技術】

【0002】

皮膚の生理機能および構造

皮膚は、無数の細胞タイプから構成され、全組織機能を維持するために共に機能する。正常な皮膚の生理機能および構造は、これらの細胞間のクロストークに依存しており、さらにいっそう複雑な細胞内シグナリング機構を包含している。生化学的過程間の繊細な均衡は、すべての生理学的成果の焦点である。この均衡は、それによって皮膚が、病原菌障壁の形成、免疫応答の調節、恒常性障壁（すなわち、流体調節）としての機能、および体温の制御を含むその生理学的機能を発揮する根拠である。皮膚の病変は、この均衡が崩れ、所望の生理学的経路が発現しない場合に発生する。

40

【0003】

皮膚は、各々が相違する細胞特性および生理学的有意性を有する別個の層、つまり表皮、真皮および皮下組織において組織化された複雑な組織である（シェーファー（Schaefer）およびレーデルマイアー（Redelmeier），1996年）。

【0004】

表皮は、増殖および分化をしている細胞が厳密に区分化されている、重層した扁平上皮である（シェーファー（Schaefer）およびレーデルマイアー（Redelmeier），1996年）。正常な生理的状态では、増殖は基底膜に付着する基底細胞に限定されている。分化は、基底細胞が基底膜への付着力を失い、DNA合成を停止して一連の形態学および生化学的变化を受ける空間的過程である。最終的な成熟工程は、皮膚の保護障壁を形成する角

50

化層の生成である（テンネンバウム（Tennenbaum）他、1991年；ワイソッキ（Wysocki），1999年）。

【0005】

真皮は、主としてマトリックス繊維から構成され、様々な細胞タイプを含有している。さらに、すべての皮膚付属器、つまり、微小血管、汗腺および皮脂腺、感覚神経および毛包は、真皮内に局在する。真皮は、表皮およびそれによって身体の他の部分からのシグナルが外層に到達する経路を維持する、皮膚への栄養補給を支援する役割を果たすと考えられてきた（テンネンバウム（Tennenbaum）他、1991年；ワイソッキ（Wysocki），1999年）。

【0006】

皮下組織は、主として脂肪細胞からなり、皮下脂肪層としても知られる、皮膚の最深層である。最近まで、この層は、外部の温度変化から隔離して、皮膚の上層に対する機械的支持を与える役割を有すると考えられてきた（ジャクソン（Jackson）他、1993年）。最近になって初めて、脂肪組織、具体的には内臓脂肪組織の内分泌有意性が認識され（パンタネッティ（Pantanetti）他、2004年；フライアーズ（Fliers）他、2003年）、糖尿病の発生および進行におけるグルコース調節に何らかの役割を果たすことが確認された（ラヴィオラ（Laviola）他、2006年；マイアヌ（Maianu）、2001年）。さらに、近年の刊行物は、皮膚の生理機能および再生に影響を及ぼす可能性がある数種のサイトカインおよび成長因子を分泌する皮下脂肪細胞が及ぼす潜在的影響を確認している（ナカガミ（Nakagami）他、2006年）。

【0007】

皮膚におけるインスリンシグナリング

インスリン受容体は、インスリン調節チロシンキナーゼである。その受容体へ結合するインスリンは、細胞内 β -サブユニットのいくつかの領域上のチロシン残基の自己リン酸化を介して結果として受容体活性化を生じさせる。その後、インスリン受容体基質（IRS）タンパク質は、リン酸化かつ活性化されたチロシンである。チロシン-リン酸化IRSタンパク質は、様々なシグナリングタンパク質のSH2ドメインへの直接結合によって下流シグナルを発生させる。数種の酵素およびアダプタータンパク質は、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3-キナーゼ）、ホスホチロシンホスファターゼSHP2、Grb2、Nck、およびCrkを含むIRS-IおよびIRS-2と関連することが確認されている。shc遺伝子の生成物は、それらがSH2ドメインを含有しており、インスリンに応答してリン酸化されるチロシンであるので、インスリン受容体の基質でもある（ホワイト（White）、1997年）。

【0008】

インスリンシグナリング経路における最初期の工程の1つは、PI3-キナーゼの活性化である。一旦活性化されると、触媒サブユニットはイノシトール環の3'位置にあるホスホイノシチドまたはセリン残基にあるタンパク質をリン酸化する。PI3Kは、セリンキナーゼAktを活性化するPtdIns(3,4)P2/PtdIns(3,4,5)P3-依存性キナーゼ1（PK1）などの下流分子を活性化する。Aktは、順にグリコーゲンシンターゼキナーゼ3（GSK-3）を非活性化し、グリコーゲンシンターゼの活性化、したがってグリコーゲン合成を導く。Aktの活性化は、また細胞内プールから細胞膜へのGLUT4小胞のトランスロケーションをもたらす（チャン（Chang）他、2004年；イシキ（Ishiki）およびクリップ（Klip）、2005年）。Aktのその他の標的には、PHAS/e1f4およびp70^{s6k}によるタンパク質合成のmTOR-媒介性活性化ならびにBAD（Bcl-2/Bcl-X_Lアンタゴニスト）およびIKK（I- κ Bキナーゼ）によって提示される細胞生存機序が含まれる。

【0009】

IRS分子と相互作用する他のシグナル伝達タンパク質には、Grb2およびSHP2が含まれる。そのSH2ドメインに隣接して、Grb2は、Ras上のGDP/GTP交換を刺激するグアニンヌクレオチド交換因子であるmSOS内のプロリンリッチ領域と

10

20

30

40

50

構成的に関連する2つのSH3ドメインを含有している。活性化されたRasは、セリン／トレオニンキナーゼであるRafを細胞膜へ補充する。Rafの活性化は、2つのセリン残基のリン酸化によって結果としてMEKの活性化が生じる。MEKは、チロシンおよびトレオニン両方のリン酸化によってMAPK（マイトジェン活性化プロテインキナーゼ）を活性化する二重特異性キナーゼである。MAPKは、一部の転写因子（Myc、NF- κ B、AP-1）、キナーゼ（Rsk）、細胞生存タンパク質（Bcl-2、cPL-2）および構造タンパク質（パキシリン）のアクチベーターとして作用する（タハ（Taha）およびクリップ（Klip）、1999年）。さらに、インスリンは、数種の組織および細胞タイプにおいてPKCアイソフォームの活性化を刺激する。PKCアイソフォームは、IRと複合体を形成することができ、IR惹起シグナリングに参与する数種の分子をリン酸化し、それらの機能を阻害することも報告されている。セリン／トレオニンキナーゼ中で、インスリンシグナルの調節における重要な役割は、PKCファミリーメンバーによって果たされる（ファリース（Farese）他、2005年）。例えば、PKC α は、細胞および動物両方のモデルにおけるインスリン作用を阻害することが報告されている。PKC α の過剰発現は、培養細胞系においてインスリンシグナリングを阻害することが証明されている。PKC α 遺伝子アブレーションのマウスモデルもまた、インスリンに対する上昇した感受性を示すが、これもまた分解に向けてインスリンをターゲティングすることによってインスリンシグナリングにおけるPKC α の負の役割に関する概念を支持している。インスリンの下流シグナリングは、さらにPKC ζ およびPKC β の特異的活性化にも関与している（フォーミサノ（Formisano）他、2000年）。さらに、皮膚内では、インスリンはPKC δ 活性化およびSTAT3の転写調節を介した皮膚増殖を調節することが証明された（ガーツバイン（Gartsbein）他、2006年）。インスリンは、IRS-1およびPKC δ を含む多分子複合体の形成を刺激する。PKC α はIR／IRS-1シグナリングを阻害し、インスリン分解を調節する。インスリンは、タンパク質合成の全体調節において重要な役割を果たす。インスリンの作用の一部はmRNA存在比における変化に関与しているが、インスリンは翻訳プロセス自体にも重要な作用を及ぼす（パテル（Patel）他、2006年）。実際に、数種の開始および鎖延長因子は、しばしばそれらのリン酸化状態における変化の結果として、このホルモンによって調節される。

【0010】

糖尿病における皮膚の病変

皮膚の病変は、糖尿病の一般的な合併症であり、それらの大多数は代謝欠陥の進行に関連しており、一部は糖尿病患者において高い発生率を伴うと思われる（ヴェルトハイマー（Wertheimer）、2004年；ヴェルトハイマー（Wertheimer）およびエンク（Enk）、2001年）。皮膚構造における特異的な変化ならびに糖尿病の状態に関連する特徴的な皮膚の病変を指摘している報告がある。糖尿病患者は、鱗状の外層を伴う乾燥して薄化した皮膚を示し、細菌および真菌の両方の起源によって惹起された皮膚感染症により多く曝される（ワン（Wang）およびマルゴリス（Margolis）、2006年；ミュラー（Muller）他、2005年）。さらに、糖尿病患者における皮膚弾力性は、高齢患者の皮膚と類似して危険にさらされているので、亀裂や損傷が生じる傾向がある（ユーン（Yoon）他、2002年；モンターニャ（Montagna）およびカーリスル（Carlisle）、1979年；ウェスト（West）、1994年）。具体的には、薄化した皮膚は、皮膚が温度および流体の恒常性を制御する能力を徐々に害する、隆起（rete ridge）の減少を示す。さらに、隆起がヒトの皮膚の富裕な幹細胞集団として機能することが証明されている。このために、糖尿病性皮膚の構造における隆起の弱化的結果として皮膚幹細胞集団の枯渇が生じ、皮膚の機能およびリモデリングにおける重度の機能障害をもたらすことも明白である（ヴェルトハイマー（Wertheimer）、2004年）。

【0011】

糖尿病性皮膚の病変および障害に特異的に関連している多数の病変および障害は、医学文献において報告されている。これらには、（i）糖尿病性脂肪類壊死症（NLD）—糖尿病進行の様々な病期で現れる—が含まれる。病変は、下肢に特徴的な沈下した蠟様の血

管拡張性中心を備える限局性紅斑性プラークの様相を呈する、(i i) 環状肉芽腫—下肢下部における紅斑性プラークを特徴とする病因不明の慢性炎症性障害。病変には増悪期のⅠ型糖尿病が関連している、(i i i) 糖尿病性皮膚障害—糖尿病状態の期間およびその他の糖尿病性合併症の出現と関連している、成人糖尿病患者における最も一般的な病変。病変は、複数の円形もしくは楕円形のピンク色から褐色の無痛プラークとして出現する、(i v) 糖尿病性水疱—水疱形成に対する低下した閾値と関連する、長期糖尿病に独特の水疱性病変、(v) 限定された関節可動域—関節拘縮および皮膚内のコラーゲン沈着を特徴とする。病変は、コラーゲンの充填、架橋結合および代謝回転における変化の結果として生じられる、(v i) 糖尿病性浮腫性硬化症—後部頸部および上背の皮膚厚の劇的な増加を特徴とする、(v i i) 黒色表皮腫 (AN)—高インスリン血症と共にインスリン耐性と関連している身体の折り曲げ部である頸部および腋窩に現れる暗色に色素沈着した皮膚の病変、(v i i i) 後天性穿孔性皮膚症—穿孔性皮膚における皮膚成分の経皮的除去を特徴とする病変、(i x) インスリンアレルギー—インスリンおよび／または血糖降下薬を用いた継続的治療の皮膚副作用であり、しばしば注射部位での斑状丘疹状皮膚もしくは疼痛性掻痒性紅斑、および(x) 皮膚感染症 (cutaneous skin infection)—罹病率および死亡率の主因を示している糖尿病患者における一般的発生率 (ヴェルトハイマー (Wertheimer)、2004年) が含まれる。

10

【0012】

これらの皮膚の病変における別の共通因子は、皮膚が外部病原体を撃退する能力の危機をもたらす、皮膚の免疫系に及ぼす作用である (ワン (Wang) およびマルゴリス (Margolis)、2006年; ミュラー (Muller) 他、2005年)。さらに、糖尿病性皮膚は、代謝性合併症によってもたらされる皮膚構造における変化への十分に機能しない免疫応答を示す。そのような病変は、遅延型過敏症、皮膚層内の活性化組織球 (histocytes) (泡沫細胞) の蓄積または真皮内の変化に寄与する免疫媒介性免疫応答の結果として生じる (ヴェルトハイマー (Wertheimer)、2004年)。さらに、糖尿病性皮膚は、それが外因性感染に効果的に反応する能力の低下に起因して、微生物もしくは真菌いずれかの起源に常に感染することが見いだされている。これらの日和見感染の要因は、十分に機能しない免疫応答の利点を利用し、患者へ持続的な悪化をもたらす (ワン (Wang) およびマルゴリス (Margolis)、2006年; ミュラー (Muller)、2005年)。

20

【0013】

老化における皮膚障害

皮膚の変化は、特に最も目立つ老化の徴候である。老化の兆候には、しわが寄ってたるんだ皮膚が含まれる。皮膚における老化変化は、ヒトが年を重ねるにつれて発生する1群の一般的な状態および発生である。老化に伴って、皮膚外層 (表皮) は薄くなるが、細胞層数は変化しないままである。色素含有細胞 (メラニン形成細胞) 数が減少する。従って老化した皮膚は、より薄く、より蒼白に、そして半透明になる。大きな色素斑、いわゆる、老斑、肝斑もしくは黒子は、日光露光部に現れることがある。遮蔽および詰め物 (padding) を提供する皮下脂肪層 (皮下組織) は、薄くなる。これは、皮膚損傷のリスクを増加させ、体温を維持する能力を減少させる。全高齢者の90%超が何らかの種類の皮膚障害を有する。

30

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、糖尿病および／または老化した皮膚に関連する皮膚の病変、障害および状態を治療および／または予防するための方法、医薬および化粧品組成物の確立を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

1つの態様では、本発明は、糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態を治療または予防する方法であって、前記病変、障害もしくは状態と関連する

50

皮膚の損傷した生理的状态を回復させることができる、治療もしくは美容有効量の少なくとも1つの作用物質の糖尿病および／または老化した個人の皮膚への局所的な投与を含む方法を提供する。

【0016】

別の態様によると、本発明は、糖尿病および／または老化した個人における前記皮膚の病変、障害もしくは状態を治療または予防するための局所用医薬組成物もしくは化粧品組成物を調製するための、糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態に関連する皮膚の損傷した生理的状态を回復させることができる少なくとも1つの作用物質の使用を提供する。

【0017】

更に別の態様によると、本発明は、糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態を治療または予防するために使用する場合に、任意に医薬用もしくは化粧品用として許容される担体と共に、前記皮膚の病変、障害もしくは状態と関連する皮膚の損傷された生理的状态を回復させることができる、治療もしくは美容有効量の少なくとも1つの作用物質を含む局所用医薬組成物もしくは化粧品組成物を提供する。

【0018】

本発明の方法および組成物は、糖尿病患者における前記皮膚の病変、障害もしくは状態の再発を予防するために使用できる。

【0019】

本発明によって使用される作用物質には、PKCアイソフォーム調節因子、アディポカイン、PPAR γ 、PPARアゴニストもしくはアンタゴニスト、および皮膚内のインスリンシグナリング経路に関与する因子の発現および／または活性を調節できる作用物質が含まれる。

【0020】

これらの作用物質は、糖尿病および／または老化した個人における皮下組織／皮下脂肪組織／層の再活性化／再生／若返り／回復に有用であり、したがって、抗老化用剤として使用することができる。

【0021】

従って、本発明は、任意に化粧品用として許容される担体と共に、老化した皮膚の病変、障害もしくは状態と関連する皮膚の損傷した生理的状态を回復させることができる、美容有効量の少なくとも1つの作用物質を含む抗老化用化粧品組成物をさらに提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

図面の簡単な説明

図1A～1Dは、黄色の矢印で概説されている、皮膚層間に分布した促進性の膿瘍形成によって示される、糖尿病性動物の皮膚が重篤な炎症反応を示す傾向があることを証明している、糖尿病性（STZ注射）（1A～1B）対非糖尿病性（1C～1D）C57BL／6Jマウスの皮膚の炎症反応を示した図である。皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。

【0023】

図2A～2Dは、矢印で示した、皮下脂肪層が真皮下の正常血糖性マウス皮膚の構造（図2A）、皮下脂肪組織の絶対的不在を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2B）、黄色の点線で下線が引かれた上皮の正常な組織を示している正常マウス皮膚の構造（図2C）、および黄色の点線で下線が引かれた上皮の異常な組織化を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2D）を示した図である。皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL／6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（Nikon Eclipse 50i 顕微鏡、図2A～2B — 倍率10倍、図2C～2D — 倍率40倍）。

図3A～3Bは、正常129褐色マウス（図3A）対PKC δ 欠損症が誘発されたインスリンシグナリングが損傷した129褐色マウス（図3B）の皮膚構造を示した図である

10

20

30

40

50

。皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した（倍率10倍、Nikon Eclipse 50i顕微鏡）。

図4は、高齢（8月齢）対幼若（8週齢）C57BL/6Jマウスにおける皮下脂肪組織分布の消失を示した図である。皮下脂肪組織の消失は、無傷の皮下組織を備えるマウスの比率（%）として表示した（各群n=10）。

図5は、マウスを以下の実施例3に記載したとおりに処置した場合の、糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから切除した皮膚生検標本の破裂圧（kg/cm²）を評価することによる平均皮膚強度および弾性を示した図である（各群n=10）。

図6A～Cは、糖尿病性マウス皮膚のエラスチン分布（黄色の矢印により細い黒色のファイバーとして図示した）（図6A）、弾性線維の回復を示している、MAPK経路の誘発による操作後の糖尿病性マウス皮膚（図6B）、および弾性線維分布がまばらである、PKCδ活性化の阻害によってインスリンシグナリングが損傷した糖尿病性マウス皮膚（図6C）を示した図である。皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、弾性線維のためのVerhoeff-ワン・ギーソン（Van Gieson）手法を用いるエラスチン染色によって分析した（倍率40倍、Nikon Eclipse 50i顕微鏡）。

図7A～7Cは、（i）黄色の矢印で示されている、濃褐色に染色された核として図示された正常血糖性マウス（図7A）、（ii）真皮および表皮の両方における皮膚増殖能力における顕著な減少（褐色染色が少ない）を示している糖尿病性マウス皮膚（図7B）、および（iii）黄色の矢印で示されている、正常増殖能力の回復を示している、MAPKおよびPKCα経路が阻害された糖尿病性マウス皮膚（図7C）の皮膚増殖能力を示した図である。皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから分離し、パラフィン中に包埋し、増殖細胞核内抗原（PCNA）免疫組織化学的染色によって分析した（倍率40倍、Nikon Eclipse 50i顕微鏡）。

図8は、7日間にわたりPBS（対照）もしくはアディポネクチン（0.1μg/mL）のいずれかを用いて処置した糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスが重篤な炎症を示している比率（%）を示した図であり、アディポネクチン処置は皮膚および近位血管における膿瘍形成および過剰な白血球増加症の両方によって判定される炎症反応を減少させることができた。皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した（合計n=18）。

図9は、9日間にわたる（i）PBS（コントロール）、（ii）インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質ペプチド（1μM）の混合液（インスリン+PKCα阻害剤）、または（iii）Cop-1（55μg/mL）を用いて処置した糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスが重篤な炎症を示している比率（%）を示した図である。インスリンおよびPKCα阻害剤ならびにCop-1を用いた両方の処置は、皮膚および近位血管中の膿瘍形成および過剰な白血球増加症の両方によって判定される炎症反応を減少させることができた。皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した（各群n=6）。

図10は、（i）野生型129マウス（コントロール）、（ii）PKCα欠損129マウス、または（iii）PKCζ欠損129マウスから切除し、下記の実施例3に記載したとおりに処置した皮膚生検の平均破裂圧（kg/cm²）を示した図である。

図11A～11Bは、（i）PBS（コントロール）もしくはインスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質（1μM）の組み合わせ（インスリン+PKCα阻害剤）（図11A）、または（ii）PBS（コントロール）もしくはアディプシン（1μM）（図11B）のいずれか、を用いた7～9日間の処置後に糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスから切除した皮膚生検における皮下組織の再構築率（%）を示した図である。これらの結果は、インスリン、PKC調節因子および脂肪細胞分泌因子が糖尿病性皮膚における皮下脂肪細胞沈着および皮下組織皮層分布を誘発する能力を証明している。次に皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学

10

20

30

40

50

的染色によって分析した。

図12は、0.12mMの Ca^{+2} 中で培養し、そして様々な濃度（0、50、150および300nM）のロシグリタゾンを用いて処置し、さらにSDS-PAGEおよび抗フィラグリン抗体を利用したウエスタンブロット分析にかけた後の、一次ケラチン生成細胞から入手した細胞骨格分画の分析を示した図である。

図13は、下記の「材料および方法」の項に記載したチミジン取り込みによって分析した、様々な濃度（0、50、100および200nM）のロシグリタゾンを用いて処置した一次ケラチン生成細胞の増殖分析を示した図である。チミジン取り込みは、cpm/μgタンパク質/分で測定した。

図14は、抗K1抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた、(i)非糖尿病性コントロール、(ii)糖尿病性コントロール、(iii)PKCα枯渴糖尿病性、および(iv)PKCδ枯渴非糖尿病性の129褐色マウス由来の全皮膚全可溶化液の細胞骨格分画の分析を示した図である。

図15は、PBS（上方パネル）もしくはインスリンおよび配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質ペプチドの組み合わせのいずれかを用いて処置したLarge-whitex & Landraceの4月齢体重60kgの雌性ブタ（n=8）の背部上で実施した外科切開部の閉鎖の結果として生じた癒痕部位を示した図である。

図16A～16Bは、インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質ペプチド（1μM）の組み合わせを用いた局所処置の前（図16A）および局所処置の14日後（図16B）の癒痕形成されたウマ皮膚を示した図である。

図17は、抗PI3K抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた、様々な実験用129褐色マウス（非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKCα枯渴糖尿病性、およびPKCδ枯渴非糖尿病性）由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分の分析を示した図である。

図18A～18Bは、抗Akt抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた様々な実験用129褐色マウス（非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKCα枯渴非糖尿病性、およびPKCα枯渴糖尿病性）由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分（図18A）、および抗pThrAkt抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた様々な実験用129褐色マウス（非糖尿病性コントロール、PKCα枯渴非糖尿病性、およびPKCδ枯渴非糖尿病性）由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分（図18B）の分析を示した図である。

図19は、抗pMAPKおよび抗MAPK抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた、様々な実験用129褐色マウス（非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKCα枯渴非糖尿病性、PKCα枯渴糖尿病性、PKCδ枯渴非糖尿病性、およびPKCδ枯渴糖尿病性）由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分の分析を示した図である。

図20A～20Bは、インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質ペプチド（1μM）の組み合わせを用いた局所処置の前（図20A）および局所処置の14日後（図20B）の糖尿病関連皮膚障害を有する患者の鱗状の皮膚を備える手掌を示した図である。

図21A～21Bは、インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質ペプチド（1μM）の組み合わせを用いた局所処置の前（図21A）および局所処置の14日後（図21B）の糖尿病関連糖尿病性皮膚障害を有する80歳の患者の手の甲を示した図である。

図22A～22Bは、インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKCα偽基質ペプチド（1μM）の組み合わせを用いた局所処置の前（図22A）および局所処置の14日後（図22B）の83歳の患者の糖尿病性病変を示した図である。

【0024】

本発明は、糖尿病および／または老化した皮膚に関連する皮膚の病変、障害および状態を治療および／または予防するための方法、医薬および化粧品組成物に関する。

【0025】

本発明による方法および組成物の原理および作用は、図面および添付の説明を参照するとより明確に理解することができる。

【0026】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用が以下の説明に記載した、または「実施例」の項に例示した構成要素の構築および配列の詳細に限定されないことを理解されたい。本発明は、他の実施形態が可能である、または様々な方法で実践もしくは実施されることが可能である。さらに、本明細書で使用する述語および専門用語は説明を目的としており、限定的と見なすべきではないことを理解されたい。

【0027】

本明細書で使用する用語「皮膚の病変」および「皮膚障害」は創傷を含んでおらず、特に以前の特許出願US 09/629, 970号、US 10/169, 801号、US 11/332, 774号、US 11/348, 527号、WO 02/09639号、WO 2005/007072号およびWO/2005/013885号に規定された種類の創傷を含まない。具体的には、用語「皮膚の病変」および「皮膚障害」は、潰瘍、糖尿病関連創傷、熱傷、日焼け、老化皮膚の創傷、角膜潰瘍創傷、炎症性消化管疾患創傷、腸炎症疾患創傷、クローン病創傷、潰瘍性大腸炎、痔、表皮水疱性創傷、皮膚疱疹創傷、乾癬創傷、動物皮膚創傷、肉芽創傷、動物糖尿病性創傷、網膜症性創傷、口腔創傷（粘膜炎）、膣粘膜炎創傷、歯周病創傷、裂傷、外科的切開創傷および術後癒着創傷を含まない。

【0028】

本明細書で使用する用語「糖尿病性皮膚」および「糖尿病に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態」は、糖尿病によって惹起される、または糖尿病の影響を受ける皮膚障害を規定するために互換的に使用される。これらの障害の一部は、アテローム硬化性皮膚変化、皮膚の細菌および真菌感染症、および掻痒などのだれでもが有している可能性があるが、糖尿病患者は特にその傾向が強い状態である。その他の糖尿病性皮膚疾患は、主として、もしくは排他的に糖尿病患者において見られ、表1は要約した病変を含む。この表では、罹患した細胞／組織への様々な病変の区分化が、糖尿病性皮膚に関連する一般的な不全症の障害および治療をより明確に理解することを可能する。

【0029】

【表 1】

糖尿病に関連する皮膚病変およびそれらと関連する細胞／組織

病変	関連する細胞／組織	臨床的および組織学的発 現
N L D	基質／真皮	コラーゲンの肥厚化
環状肉芽腫	基質／真皮	コラーゲンの限局性変性
糖尿病性皮膚症	基質／真皮	線維芽細胞増殖、線維性 コラーゲンを伴う萎縮性 真皮
糖尿病性硬皮症	基質／真皮／脂肪	コラーゲン線維による皮 下脂肪の置換を通して腫 脹した真皮
A P D	基質／真皮	コラーゲン／エラスチン から上皮への横断
糖尿病性水疱	表皮	疱疹形成に対する低減し た閾値
黒色表皮腫	表皮	肥厚した上皮および変化 した真皮乳頭
A P D	表皮	一次上皮欠損、肥厚上皮
皮膚感染症	表皮	病原菌障壁の破損、上皮 における免疫細胞の減少

【0030】

細胞および様々な皮膚細胞における生化学的変化に焦点を合わせることによって、本発明者らは糖尿病性関連皮膚合併症をさらに区分化することができる。具体的には、上皮関連欠陥には、損傷された増殖／分化率または細胞－細胞もしくは細胞－マトリックス（基底膜）接触の侵害のいずれかが結び付いている可能性がある（ヴェルトハイマー（Wertheimer）他、2001年；アルト（Alt）他、2001年）。皮膚／マトリックス関連欠陥は、真皮層に存在する線維芽細胞の分化能力によって影響を受けることがある。真皮内の最も一般的な細胞型である線維芽細胞は、コラーゲンおよびエラスチン線維の網状組織合成および維持の責任を負っていることが知られている。真皮内では、線維芽細胞は幹細胞から中間段階を経由して完全に分化した拘束された線維芽細胞に至る全分化段階において見いだされる。マトリックス形成について責任を負うのは成熟細胞であり（フラインケル（Freinkel）およびウッドレー（Woodley）、2001年）、従って、線維芽細胞分化における何らかの障害はマトリックス不完全性の原因になることがある。さらに、増殖の減少による線維芽細胞枯渇は損傷した基質形成および／または維持の原因となることもある。

【0031】

付随的に、皮下組織内の脂肪細胞は、皮膚の生理機能においてそれらが果たす内分泌性

の役割を発揮するためにそれらの脱分化状態にも左右される（グレゴアール（Gregoire）、2001年）。

【0032】

本発明の発明者らは、皮膚の生理機能における臨界的パラメーターを定量的に同定するために信頼できる技術を開発した。これらのパラメーターは、増殖、遊走、分化、基質形成および維持を含む生理学のプロセスを引き起こすシグナリング経路と特異的に連結している。パラメーター間の連結を確立することは、糖尿病患者の皮膚合併症の一次予防および治療において極めて重要である。従って、これらのプロセスの生化学的調節に基づいて、所望の生理学のエンドポイントを導く特異的シグナリング経路を制御することができる。これらの経路の多くが相互作用して相互に影響を及ぼすことを考慮に入れることが重要であり、これは組み合わせられた調節のみで所望の結果を効果的に指向できることを意味している。

10

【0033】

本発明者らの観察から、糖尿病性皮膚の上皮は、細胞が大きな核を伴って出現しており、正常な皮膚におけるようには垂直にそろっていない破壊された基底層を示すことが明らかである。さらにまた、真皮内のエラスチンが上皮の下から消失しており、真皮の深部では線維の崩壊が特徴的であることも観察できる。同時に、糖尿病性皮膚は線維芽細胞数の減少を示すという報告があり、これはプロコラーゲンの低減にしたがってコラーゲン含量の減少についての論理的根拠となっている（ヴァラニ（Varani）他、2006年）。恒常性の高血糖症によって惹起される最終糖化産物形成は、微小血管構造、皮膚コラーゲン線維および基底膜などの様々な皮膚構造へ直接的に影響を及ぼすと考えられてきた（ヤン（Yang）他、2003年）。高血糖症は、上皮ケラチン生成細胞に直接的作用を及ぼし、それらの増殖および分化する能力を改変させることもまた証明されている（スプラヴチコフ（Spravchikov）他、2000年）。

20

【0034】

本発明による本発明者らの結果は更に、皮膚の糖尿病合併症における皮下脂肪細胞に対する極めて重要な役割も意味している。糖尿病の進行ならびに皮膚の弾性および強度の悪化は、皮下組織／皮下脂肪層の消失をもたらす脂肪細胞の分化および分布の調節異常と直接的に連結している。さらに、糖尿病の状態は、皮膚の免疫応答に影響を及ぼすので、従って病原体およびストレス関連性障害から皮膚を保護する適正な機能を妨害する（ティンゴ（Tingo）他、2006年）。これらをまとめると、糖尿病性代謝症候群が様々な経路を通して皮膚に影響を及ぼし、ほぼすべての皮膚関連細胞に関与することは明白である。

30

【0035】

糖尿病性皮膚はその特徴においては独特であるが、一部の糖尿病関連病理は老化状態の特徴的な欠陥に似ている。このため、皮膚若返りを誘発するために老化する皮膚を再活性化することに類似のアプローチを差し向けることができる。

【0036】

従って一般的に、高齢の糖尿病患者を含む糖尿病患者、および非糖尿病性の老化が始まった個人において見いだされる欠陥は、本発明によると、具体的には皮膚の、特に皮下組織層の様々な細胞層の再生によって矯正することができる。これは、糖尿病患者および非糖尿病患者において審美的欠陥を矯正し、弾性を回復させて皮膚を若返らせるため、および糖尿病性皮膚に関連する病変の発生もしくは再発予防のための新規アプローチである。

40

【0037】

1つの態様では、本発明は、糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態を治療または予防する方法であって、前記皮膚の病変、障害もしくは状態と関連する皮膚の損傷した生理的状态を回復させることができる、治療もしくは美容有効量の少なくとも1つの作用物質の糖尿病および／または老化する個人の皮膚への局所的な投与を含む方法を提供する。

【0038】

本明細書で使用する用語「前記皮膚の病変もしくは障害と関連する皮膚の損傷した生理

50

的状态」は、糖尿病性皮膚と関連する場合は、皮下組織脂肪層の消失、糖尿病性皮膚において頻回に見られる分化プロセスおよび増殖能力の破壊された制御を通した皮下組織脂肪層の損傷された整合性、糖尿病性皮膚に特徴的である、全皮膚層を通したコラーゲン分布、弾性線維破壊および強化された炎症反応に影響を及ぼす散在した基質沈着の真皮露出などの、皮膚の生化学的平衡および構造を損なわせるすべての病変を意味する。これらの生理的状态の変化の結果として、本明細書において明記したように、糖尿病状態に特異的な明確な皮膚の病変が誘発される。さらに、これらの機能障害は、薄化、乾燥、多数のスキントグおよび一般的審美性の消失などの一般的な変化も誘発する。老化した皮膚が関係している限り、知られている基質沈着および真皮構造における変化に加え、この用語はさらに、本発明者らが本発明において特性付けた、損傷された弾性、薄化、しわなどを含む老化する皮膚の機能障害を導く皮下脂肪層における独特の機能障害も意味する。この用語は、具体的には、上皮、真皮および独特にも皮下組織における変化を含む構造的かつ病理学的兆候を惹起する、糖尿病性及び老化した皮膚におけるインスリンシグナリング経路、PKC経路およびアディポカイン分泌における生化学的機能障害も意味する。本発明者らはこれらの皮膚の問題における主要な分子およびそれらが果たす役割を認識したので、本明細書では、糖尿病性および老化する皮膚に関連する機能障害を克服するいくつかの考えられる経路関連治療法を示す。

10

【0039】

下記の「材料および方法」の項で、開発され、そして記載されたインビトロおよびインビボモデルは、正常および糖尿病性皮膚における段階特異的な変化の定量を可能にする。本発明者らのモデルは、効率的な治療の処方促進する標的かつ特異的な調節因子を同定するための形態学的、組織学的および免疫組織化学的分析の利用を提供する。

20

【0040】

本発明の1つの実施形態では、少なくとも1つの作用物質は、少なくとも1つのPKCアイソフォームの発現および／または活性を調節できるPKCアイソフォーム調節因子である。

【0041】

本明細書で使用する用語「PKCアイソフォーム」は、PKC α 、PKC β （PKC β 1およびPKC β 2の両方を含む）、PKC δ 、PKC ϵ 、PKC η 、PKC ζ 、PKC γ 、PKC θ 、PKC λ およびPKC τ を含む全PKCアイソフォームを包含している。好適な実施形態では、PKCアイソフォームは、PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ もしくはPKC ζ である。

30

【0042】

語句「PKCアイソフォームの発現および／または活性の調節」は、PKCアイソフォームの増加もしくは低減した発現および／または活性に関する。発現の増加は、PKCアイソフォームの増加した産生を導く。本明細書で使用する用語「PKCアクチベーター」は、PKCアイソフォームの発現および／または活性を増強する分子を記載するために用語「PKCアイソフォームアクチベーター」と互換的に使用される。

【0043】

本明細書で使用する用語「PKCインヒビター」は、PKCアイソフォームの発現および／または活性を阻害する分子を記載するために用語「PKCアイソフォームインヒビター」と互換的に使用される。

40

【0044】

特に、ホスホリル転移領域、偽基質ドメイン、ホルボールエステル結合配列、およびリン酸化部位は、アイソザイム特異的PKC活性を調節するための標的となることがある（ホフマン（Hofmann）、1997年）。多数の調節因子は特異的ではなく、時には調節因子はインヒビターおよびアクチベーターの両方の場合があることを理解されたい。

【0045】

1つの実施形態では、少なくとも1つの作用物質は、PKCアイソフォーム偽基質インヒビター、PKCアイソフォーム基質領域に結合するペプチド、PKCアイソフォームの

50

A T P結合部位に結合するペプチド、またはコポリマー1であってよいP K Cアイソフォームインヒビターである。

【0046】

P K Cアイソフォームの「偽基質領域」もしくは自己阻害性ドメインは、リン酸化可能な残基を備えていないキナーゼのための基質のコンセンサス配列として規定されている。偽基質ドメインは、調節領域内に置かれており、認識部位を遮断してリン酸化を予防する基質認識モチーフに非常に似ている。従って、阻害ペプチドは、セリン(S)もしくはチロシン(T)のリン酸化可能な残基をアラニン(A)で置換することによって入手される。P K C δは、P K C δの保存ドメイン2であるC 2ドメイン上でのアイソフォームの活性化を可能にする追加の結合部位を有することが知られている唯一のP K Cアイソフォームである(ビーンズ(Benes)他、2005年)。

10

【0047】

全P K CアイソフォームのA T P結合部位は、文献から知られている。A T P結合部位に結合する任意のペプチドは、P K Cアイソフォームの活性を阻害するであろう。

【0048】

P K Cアイソフォームインヒビターは、好ましくはP K C α、P K C β、P K C ηもしくはP K C ζインヒビター、より好ましくはP K C αもしくはP K C ηインヒビターである。

【0049】

本発明によって使用できるP K C αインヒビターの例には、非限定的に、配列番号1～7のペプチド、および配列番号8～24のペプチドなどの基質領域に結合するペプチドなどのP K C α偽基質インヒビターが含まれる。配列番号1～24のペプチドは、好ましくはC 1 2-C 2 0脂肪酸、より好ましくはC 1 4-アシル(ミリストイル)に由来するアシル基によってN-アシル化されていてよい。最も好適な一実施形態では、P K C αインヒビターは、配列番号1のN-ミリストイル化P K C-α偽基質ペプチドである。これは、0.01 μM～10 μM、好ましくは0.1～5 μM、0.5～2 μM、もしくは1～2 μMの範囲内の治療または美容有効濃度で、治療目的にはより好ましくは1 μMで、および美容目的ではより低濃度、より好ましくは0.1 μMの濃度で投与できる。

20

【0050】

本発明によって使用できるP K C ηインヒビターの例には、非限定的に、配列番号25のN-ミリストイル化ペプチド、配列番号26および配列番号27のペプチドなどの基質領域に結合するP K C ηインヒビター、ならびに多発性硬化症を治療するために臨床的に使用されるコポリマー1(Teva Pharmaceutical Industries社(イスラエル国ティクヴァ)製の薬剤である酢酸グラチラマー/Copaxone(登録商標)の有効成分)が含まれる。コポリマー1は、ミエリン鞘の天然成分であるミエリン塩基性タンパク質(M B P)の合成ポリペプチドアナログである。化学的には、コポリマー1は、4種のアミノ酸であるL-グルタミン酸、L-アラニン、L-リシンおよびL-チロシンのランダムコポリマーである。その酢酸塩形では、酢酸グラチラマーとして知られており、4,700～11,000ダルトンの平均分子量を有している。より高分子量のコポリマー1分子も知られており(MW15,000～18,000)、本発明によって使用できる。あたかも完全に本明細書に記載されているかのように全体として参照によって本明細書に組み込まれる米国特許出願第11/332,774号に開示されているように、コポリマー1は、特異的かつ極めて有効なP K C ηインヒビターであることが発見された。

30

40

【0051】

本発明によって使用できるP K C βインヒビターの例には、非限定的に、配列番号28～38のペプチドなどの基質領域に結合するP K C βインヒビターが含まれる。

【0052】

本発明によって使用できるP K C ζインヒビターの例には、非限定的に、配列番号39～43のペプチドなどの基質領域に結合するP K C ζインヒビターが含まれる。

【0053】

50

別の実施形態によると、本発明の方法および組成物において使用される前記 P K C アイソフォーム調節因子は、P K C アイソフォームアクチベーター、好ましくは P K C δ 、P K C ε もしくは P K C ζ アクチベーター、より好ましくは P K C δ アクチベーターである。

【0054】

P K C アイソフォームアクチベーターは、非限定的に、P K C アイソフォーム基質領域に結合するペプチド、P K C アイソフォームリン酸化部位に作用するペプチド、インスリン、ブリオスタチン、P K C アイソフォーム R A C K ペプチドまたは M A R C K S（ミリストイル化アラニンリッチ C キナーゼ基質）由来ペプチドであってよい。

【0055】

本発明によって使用できる P K C δ アクチベーターの例には、非限定的に、インスリン、配列番号 44～51 のペプチドなどの P K C δ 基質領域に結合するペプチド、配列番号 52～54 のペプチドなどの P K C δ リン酸化部位に作用するペプチド、P K C δ R A C K ペプチドおよび C 2 ドメインに対応するペプチドが含まれる（ビーンズ（Benes）他、2005年に開示されている）。より好適な実施形態では、P K C δ アクチベーターは、医薬もしくは化粧品組成物中では 0.01 μ M～10 μ M、好ましくは 0.01～2 μ M の範囲内の、より好ましくは治療目的には 7×10^{-7} M（0.1 単位）および美容目的には 7×10^{-8} M（0.01 単位）の濃度で投与されるインスリンである。

【0056】

本発明によって使用できる P K C ε アクチベーターの例には、非限定的に、P K C ε R A C K ペプチドが含まれる。本発明によって使用できる P K C ζ アクチベーターの例には、非限定的に、配列番号 55 の P K C ζ M A R C K S 由来ペプチドが含まれる。

【0057】

1つの実施形態では、2つ以上の作用物質、好ましくは2もしくは3種の P K C アイソフォーム調節因子を、本発明の方法／組成物において使用できる。

【0058】

好適な一実施形態では、2つの作用物質が使用されるが、それらの作用物質は、(i) P K C α インヒビター、好ましくは配列番号 1 の N－ミリストイル化ペプチド、および P K C δ アクチベーター、好ましくはインスリン、(i i) P K C η インヒビター、好ましくはコポリマー 1 もしくは配列番号 25 の N－ミリストイル化ペプチド、および P K C δ アクチベーター、好ましくはインスリン、および (i i i) P K C α インヒビター、好ましくは配列番号 1 の N－ミリストイル化ペプチド、および P K C η インヒビター、好ましくはコポリマー 1 もしくは配列番号 25 の N－ミリストイル化ペプチドであってよい。配列番号 1 のペプチドおよびインスリンの濃度は、治療および美容目的について上記に規定したとおりである。コポリマー 1 の濃度は、0.5～60 μ g/mL、好ましくは 10～55 μ g/mL もしくは 50～55 μ g/mL の範囲内にあり、より好ましくは約 55 μ g/mL である。

【0059】

さらに別の好適な実施形態では、3種の作用物質、例えば P K C α インヒビター、好ましくは配列番号 1 の N－ミリストイル化ペプチド、P K C η インヒビター、好ましくはコポリマー、および P K C δ アクチベーター、好ましくはインスリンが使用される。

【0060】

本発明の方法および組成物において使用するためのインスリンは、組換え、またはヒトインスリンもしくはブタインスリンなどのヒトに使用するために適切な非ヒト哺乳動物インスリンなどの天然起源由来であってよい。

【0061】

本発明のまた別の実施形態では、少なくとも1つの作用物質は、脂肪細胞分泌酵素、成長因子、サイトカインおよびホルモンから選択された脂肪細胞によって分泌された生物活性分子であるアディポカインである。アディポカインの例には、補体因子 D（アディプシン）、C 3 および B、アディポネクチン（A c r p 3 0）、アペリン、ビスファチン、レ

10

20

30

40

50

ジスチン、レプチン、リポプロテインリパーゼ (L P L)、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター 1 (P A I - 1)、腫瘍壊死因子- α (T N F - α)、インターロイキン-1 β (I L - 1 β)、I L - 4、I L - 6、I L - 8、アンジオテンシン I - I V (アンジオテンシン I V は、活性アンジオテンシン I I フラグメント) およびそれらの環状アナログ、アンジオテンシノーゲン、1-ブチリルグリセロール (モノブチリン)、マトリックスメタロプロテイナーゼ 2、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9、アシル化刺激タンパク質 (A S P)、バスピン、オメンチン、および神経ペプチド Y が含まれるがそれらに限定されない。

【0062】

好適な一実施形態では、アディポカインは、0.01~1 μ g/mL、好ましくは 0.1 μ g/mL の濃度で利用できるアディポネクチンである。

10

【0063】

また別の実施形態では、少なくとも 1 つの作用物質は、脂肪細胞、ケラチン生成細胞および皮脂腺中で発現する転写因子である P P A R γ (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ) である、またはそれは P P A R アゴニストもしくはアンタゴニストである。1 つの実施形態では、作用物質は、GW 9662 (2-クロロ-5-ニトロベンズアニリド) などの P P A R γ アンタゴニストもしくはチアゾリジンジオン誘導体、例えば、トログリタゾン [5-(4-(6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-イル-メトキシ) ベンジル)-2, 4-チアゾリジンジオン]、ロシグリタゾン [5-(4-(2-(メチル-2-ピリジニルアミノ) エトキシ) フェニル) メチル)-2, 4-チアゾリジンジオン] などの P P A R γ アゴニスト、または脂肪細胞分化の強力なアンタゴニストである部分 P P A R γ アゴニスト GW 0072 である。他の実施形態では、作用物質は、GW 7647 および BM-17.0744 などの P P A R α アゴニスト、GW 0742 などの P P A R δ アゴニスト、または GW 2433、GW 4148、GW 2331 および L 165041 などの P P A R 非サブタイプ選択的アゴニストである。

20

【0064】

好適な一実施形態では、P P A R γ アゴニストは、2~300 nM、好ましくは 10~200 nM、20~150 nM、20~100 nM、もしくは 20~50 nM、好ましくは美容目的のためには 50 nM もしくは 20 nM の濃度で利用できるトログリタゾンもしくはロシグリタゾンである。また別の実施形態では、作用物質は、1~100 nM の濃度

30

【0065】

さらに別の実施形態では、少なくとも 1 つの作用物質は、皮膚内のインスリンシグナリング経路に関係する因子の発現および/または活性を調節することができる。

【0066】

1 つの実施形態では、作用物質は、インスリン受容体 (I R) の発現および/または活性を直接的に活性化する。本発明によって使用できる I R アクチベーターの例には、非限定的に、T L K 16998、T L K 19781、2, 5-ジヒドロキシ-3-(4-メトキシフェニル)-6-フェニル-2, 5-シクロヘキサジエン-1, 4-ジオン、2, 5-ジヒドロキシ-3-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-6-フェニル-2, 5-シクロヘキサジエン-1, 4-ジオン、および 1, 2, 3, 4, 6-ペンター-O-ガロイル-D-グルコピラノースが含まれる。

40

【0067】

別の実施形態では、作用物質は、I R に向かって下流の I R 調節特異的標的経路の下流に作用する。そのような作用物質の例には、非限定的に、ホスホファチジルイノシトール 3-キナーゼ (P I 3 K) 調節因子、プロテインキナーゼ B/A k t 調節因子、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (G S K 3) 調節因子、R a f 調節因子、レニン-アンジオテンシン系 (R a s) 調節因子、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (M A P K) 調節因子、E R K 調節因子、J N K 調節因子、もしくは M E K 調節因子が含まれる。

【0068】

50

そのような調節因子の例には、P T E N、ワートマニンおよびL Y 2 9 4 0 0 2などのP I 3 Kインヒビター、N L - 7 1 - 1 0 1などのA k tインヒビターもしくはラパマイシンの哺乳動物標的(m T O R)などのA k tアクチベーター、化合物C T 2 0 0 2 6、C H I R 9 8 0 1 4およびC H I R 9 9 0 2 1などのG S K 3インヒビター、B A Y 4 3 - 9 0 0 6(ソラフェニブ)などのR a fインヒビター、S B 2 0 3 5 8 0などのp 3 8 - M A P Kインヒビター、P D 0 9 8 5 9などのE R Kインヒビター、S P 6 0 0 1 2 5などのJ N Kインヒビター、ならびにP D 9 8 0 5 9もしくはU O 1 2 6などのM E Kインヒビターが含まれるがそれらに限定されない。

【0069】

皮膚薄化、上皮薄化、皮膚乾燥、上皮における異常な分化パターン、全皮膚層における増殖の減少、皮下組織の皮下脂肪組織の欠如／不規則性、脆弱性、低減した肌の張り、皮膚の水分消失、皮膚のたるみ、皮膚の色素沈着過剰および変色、刺激された過敏な皮膚、増加した皮膚炎症、肌のきめの消失、基質繊維(コラーゲンおよびエラスチン)構造の崩壊、皮膚の滑らかさおよび張りの消失、弾力性の消失、限定された油／皮脂の分泌、糖尿病性脂肪類壊死症(N L D)、環状肉芽腫、糖尿病性皮膚障害、糖尿病性水疱、限定された関節可動域、糖尿病性浮腫性硬化症、黒色表皮腫、後天性穿孔性皮膚病、インスリンアレルギー、皮膚感染症、または黄色腫(脂質を持つ泡沫細胞の良性病変—黄色病変)を含むがそれらに限定されない糖尿病に関連する任意の皮膚の病変もしくは障害は、本発明の方法によって治療および／または予防することができる。さらに、痒み、膿皮症、カンジダ症、湿疹、晩発性皮膚ポルフィリン症(P C T)、および皮下脂肪組織炎などの炭水化物代謝の障害に起因する皮膚障害も含まれる。

【0070】

さらに、以下に記載するように老化に関連するすべての皮膚の障害もしくは状態の治療は、糖尿病の老化する個人に適用可能である。

【0071】

一実施形態では、本発明の方法は、皮膚の病変もしくは障害が糖尿病と関連している場合に適用され、前記少なくとも1つの作用物質は治療有効量の前記少なくとも1つの作用物質を含む医薬組成物で投与される。好適な一実施形態では、本医薬組成物は、任意で0.01 μg/mL~10 μg/mL、好ましくは0.1~2 μg/mLの範囲内の、より好ましくは0.1 μg/mLの濃度のインスリンと組み合わせて、医薬上許容される担体および0.01 μg/mL~10 μg/mL、好ましくは0.1~5 μg/mL、0.5~2 μg/mL、もしくは1~2 μg/mLの範囲内の、より好ましくは1 μg/mLの濃度の配列番号1のN-ミリスチル化P K C α偽基質ペプチドを含んでいる。

【0072】

別の実施形態では、本発明の方法は、皮膚の病変、障害もしくは状態が糖尿病と関連している場合に適用され、前記少なくとも1つの作用物質は美容有効量の前記少なくとも1つの作用物質を含む化粧品組成物で投与される。好適な一実施形態では、本医薬組成物は、任意で0.01 μg/mL~10 μg/mL、好ましくは0.1~2 μg/mLの範囲内の、より好ましくは0.1 μg/mLの濃度のインスリンと組み合わせて、化粧品として許容される担体および0.01 μg/mL~10 μg/mL、好ましくは0.1~5 μg/mL、0.5~2 μg/mL、もしくは1~2 μg/mLの範囲内の、より好ましくは1 μg/mLの濃度の配列番号1のN-ミリスチル化P K C α偽基質ペプチドを含んでいる。

【0073】

また別の実施形態では、本発明の方法は、皮膚の病変もしくは障害が老化と関連している場合に適用され、前記少なくとも1つの作用物質は美容有効量の前記少なくとも1つの作用物質を含む化粧品組成物で投与される。好適な一実施形態では、本医薬組成物は、任意で0.01 μg/mL~10 μg/mL、好ましくは0.1~2 μg/mLの範囲内の、より好ましくは0.1 μg/mLの濃度のインスリンと組み合わせて、化粧品として許容される担体および0.01 μg/mL~10 μg/mL、好ましくは0.1~5 μg/mL

mL、0.5～2 μg/mL、もしくは1～2 μg/mLの範囲内の、より好ましくは0.1 μg/mLの濃度の配列番号1のN-ミリストイル化PKCα偽基質ペプチドを含んでいる。

【0074】

本発明の方法によって治療できる老化に関連する障害もしくは状態には、乾燥した鱗状の皮膚、皮膚の薄化、乳頭間隆起の平坦化、光線性の弾力線維症、しわ、目尻のしわ（crows feet）、肝斑、老斑、皮膚の色素沈着過剰、変色、水疱形成の促進、脆弱性、肌のはりの減少、刺激に対する低下した閾値、張りの消失およびたるみ、弾性の消失、弛緩症、過形成で組織の乱れた弾性線維系、低減した皮膚柔軟性、低減した末端腺（acral gland）および汗腺、低減した皮脂産生、結果として水分消失を生じさせる経皮水分蒸散（TEWL）が含まれるがそれらに限定されない。

10

【0075】

本発明はさらに、糖尿病患者における皮膚の病変もしくは障害の再発予防のための方法であって、前記皮膚の病変もしくは障害と関連する皮膚の損傷した生理的状态を回復させることができる、上記に規定した治療もしくは美容有効量の少なくとも1つの作用物質の前記糖尿病患者の皮膚への局所的な投与を含む方法を提供する。

【0076】

本発明は、糖尿病もしくは老化する個人の皮下組織の脂肪層を再活性化／若返り／再生する方法であって、皮下脂肪層の再生を誘発できる上記に規定した美容有効量の少なくとも1つの作用物質を前記個人の皮膚への局所的な投与を含む方法にもさらに関する。

20

【0077】

本発明は、糖尿病および／または老化する個人における前記皮膚の病変もしくは障害の治療または予防の局所用医薬組成物または化粧品組成物を調製するための、糖尿病および／または老化に関連する皮膚の病変、障害もしくは状態に関連する皮膚の損傷された生理的状态を回復させることができる少なくとも1つの作用物質の使用にさらに関する。

【0078】

さらに本発明によって、糖尿病および／または老化する個人における皮膚の病変、障害もしくは状態の治療もしくは予防のために局所投与するための医薬および化粧品組成物であって、医薬上もしくは化粧品として許容される担体と、糖尿病および／または老化に伴う前記皮膚の病変、障害もしくは状態に関連した皮膚の損傷した生理的状态を回復させることができる上記に規定した少なくとも1つの作用物質とを含む医薬および化粧品組成物も提供される。

30

【0079】

本発明において使用される治療上／医薬上／美容上の有効成分は、糖尿病性もしくは老化する皮膚へそれ自体を、または適切な担体および／または賦形剤と混合した医薬もしくは化粧品組成物で投与することができる。本発明の状況において使用するために適合する医薬組成物には、有効成分が所定の治療作用を達成するために有効な量で含有されている医薬組成物が含まれる。本発明という背景における使用に適合する医薬組成物には、有効成分が所定の美容作用を達成するために有効な量で含有されている医薬組成物が含まれる。

40

【0080】

本発明の医薬および化粧品組成物は局所適用することを企図しており、水溶液、ゲル、クリーム、ペースト、ローション、スプレー、懸濁液、粉末、分散液、膏薬、軟膏、乳清、無水スティック（anhydrous stick）、油性スプレー、水中油型エマルジョンもしくは油中水型エマルジョンの形状にあってよい。

【0081】

本明細書で使用する用語「局所適用」は、皮膚、粘膜、歯、毛髪、頭皮への外部適用を意味する。

【0082】

本明細書で使用する用語「医薬組成物」および「化粧品組成物」は、治療もしくは化粧

50

品使用に適合する伝統的な薬物、生理学的に許容される担体および賦形剤などの他の化学成分を備える、本明細書に記載した1つまたは複数の有効成分、またはそれらの生理学的に許容できる塩もしくはプロドラッグの製剤を意味する。本発明の組成物は、当技術分野においてよく知られているプロセスによって、例えば、一般的に使用される混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、研和、乳化、被包化、封入もしくは凍結乾燥プロセスによって製造することができる。

【0083】

以下では、語句「医薬上適切な担体」および「美容上もしくは皮膚学的に許容される担体」は、生体に重大な刺激を惹起しない、そして投与された成分の生物学的活性および特性を無効にしない担体もしくは希釈剤を意味する。医薬組成物中では、有効成分のプロセスおよび投与をさらに促進するために不活性物質が加えられるが、これらの賦形剤には、非限定的に、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖および様々な種類のデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが含まれる。有効成分の製剤化および投与するための技術は、参照して本明細書に組み込まれる“Remington's Pharmaceutical Sciences,” Mack Publishing Co., Easton, P A, latest editionの中で見いだすことができる。

【0084】

有効成分を投与するためには様々な経路が可能であるが、本発明のためには、局所経路が好ましく、局所用担体によって支援される。局所用担体は、有効成分の局所投与に一般的に適している担体であり、当技術分野において知られている任意の材料が含まれる。局所用担体は、例えば液体もしくは非液体担体、ローション、クリーム、ペースト、ゲル、粉末、軟膏、溶媒、液体希釈剤、液滴などの所望の形状にある組成物を提供できるように選択され、天然型もしくは合成起源いずれかの材料から構成されてよい。選択された担体が、局所製剤の活性物質もしくはその他の成分に有害な作用を及ぼさない、そして局所製剤の全成分に関して安定であることは必須であり、明らかである。ここで使用するための適切な局所用担体の例には、水、アルコールおよびその他の非毒性有機溶媒、グリセリン、ミネラルオイル、シリコーン、石油ゼリー、ラノリン、脂肪酸、植物油、パラベン、ワックスなどが含まれる。本明細書における好ましい製剤は、無色無臭の軟膏、液剤、ローション剤、クリーム剤およびゲル剤である。

【0085】

軟膏は、典型的にはワセリンもしくは他の石油誘導体を基剤とする半固体製剤である。当業者には理解されるように、使用すべき特定の軟膏基剤は、最適の有効成分送達を提供する、そして好ましくは、例えば皮膚軟化性などの他の所望の特性を提供する軟膏基剤である。他の担体もしくは賦形剤 (vehicle) と同様に、軟膏基剤は、不活性、安定性、非刺激性および非感作性でなければならない。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995年) の第1399~1404頁で説明されているように、軟膏基剤は4つのクラス、油脂性基剤、乳化性基剤、エマルジョン基剤、および水溶性基剤に分類できる。油脂性軟膏基剤には、例えば、植物油、動物起源の脂肪、および石油起源の半固体炭化水素が含まれる。吸収性軟膏基剤としても知られる乳化性軟膏基剤は、水をほとんどもしくは全く含有しておらず、例えば、硫酸ヒドロキシステアリン、無水ラノリンおよび親水性ワセリンが含まれる。エマルジョン軟膏基剤は、油中水型 (W/O) エマルジョンもしくは水中油型 (O/W) エマルジョンのいずれかであり、例えば、セチルアルコール、グリセリルモノステアレート、ラノリンおよびステアリン酸が含まれる。好ましい水溶性軟膏基剤は、様々な分子量のポリエチレングリコールから調製され、同様に、詳細な情報についてはRemington: The Science and Practice of Pharmacyを参照されたい。

【0086】

ローション剤は摩擦なしで皮膚表面へ適用する製剤であり、典型的には、活性物質を含む固体粒子が、水もしくはアルコール基剤中に存在する液体もしくは半固体製剤である。ローション剤は、通常は固体の懸濁液であり、水中油型の液体油性エマルジョンを含んで

いてよい。ローション剤は、本明細書ではより流体組成物を適用するのが容易であるために、大きな体面積を処置するために好ましい製剤である。一般には、ローション中の不溶性物質が微細に分配されていることが必要である。ローションは、典型的にはより良好な分散液を生成するために懸濁化剤ならびに、皮膚と接触させて活性物質を局在化させて保持するために有用な、例えば、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどの化合物を含有しているであろう。

【0087】

選択された有効成分を含有するクリーム剤は、当技術分野において知られているように、水中油型もしくは油中水型いずれかの粘性液体もしくは半固体エマルジョンである。クリーム基剤は水で洗い落とすことができ、油相、乳化および水相を含有している。時には「内」相とも呼ばれる油相は、一般にはワセリンおよびセチルもしくはステアシルアルコールなどの脂肪アルコールから構成され、水相は、必ずではないが、通常は容積において油相を上回っており、一般には湿潤剤を含有している。クリーム製剤中の乳化剤は、上記のRemingtonにおいて説明されているように、一般には非イオン性、アニオン性、カチオン性もしくは両親媒性界面活性剤である。

10

【0088】

ゲル製剤は、頭皮への適用に好ましい。局所用有効成分製剤の分野の当業者には理解されるように、ゲルは半固体の懸濁液型の系である。単相ゲルは、典型的には水相であるがさらに好ましくはアルコールおよび任意で油を含有している担体液体全体に実質的に均一に分布した有機高分子を含有している。

20

【0089】

本発明の局所製剤には、当業者には知られている様々な添加物を含めることができる。例えば、所定の有効成分物質を可溶化させるためには溶媒を使用できる。その他の任意の添加物には、皮膚浸透強化剤、乳白剤、酸化防止剤、ゲル化剤、増粘剤、安定剤などが含まれる。

【0090】

化粧品組成物は、1つまたは複数の乳化剤、保存料、増粘剤、日焼け止め剤、酸化防止剤、皮膚軟化剤、皮膚保護剤、毛髪保護剤を含有してもよい。化粧品分野において通常使用される賦形剤の例には、メチルパラベン、グリセリン、EDTA二ナトリウム、セテアシルアルコール、セテアレス20 (cetareth)、プロピルパラベン、パルミチン酸セチル、ステアレス20 (steareth-20) ステアリン酸オクチル、ポリオールプレポリマー2、レシチンなどが含まれるがそれらに限定されない。

30

【0091】

糖尿病性皮膚の病変および障害を治療するための局所用医薬組成物は、そのような病変および障害を治療するために使用される他の医薬上有効な作用物質もしくは成分を含有してもよい。抗菌剤、抗真菌剤、抗生物質および抗炎症薬などの他の作用物質も加えることができる。

【0092】

糖尿病性および老化する皮膚の病変、障害および状態を予防および／または治療するための局所用化粧品組成物は、非限定的に、ビタミンA、B、C、Eおよびパンテノールを含む抗老化および抗しわ組成物に使用される追加の栄養素を含有している。

40

【0093】

本明細書に記載する医薬組成物は、適切な固体もしくはゲル相担体もしくは賦形剤もさらに含んでもよい。そのような担体もしくは賦形剤の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールなどのポリマーが含まれるがそれらに限定されない。

【0094】

投与は、病変もしくは障害の種類、重症度および発現に、そして被験者の有効成分に対する応答性、ならびに使用される剤形および特定作用物質の効力に依存する。化粧品使用のため、特に予防目的での用量は、通常は医薬／治療目的の用量より少ないであろう。

50

【0095】

糖尿病およびインスリン耐性は、皮膚の構造に極めて大きな作用を及ぼす。主として、糖尿病性皮膚は皮下脂肪の皮下油肪層を提示できず、皮下脂肪組織の消失および不規則性は皮膚真皮および上皮の区画化を改変し、より薄い皮膚を出現させる。この兆候は、糖尿病性強皮症（Scleroderma Diabeticorum）などの知られている糖尿病性皮膚の病変にも特徴的であり、皮膚の薄化、鱗状および乾燥した皮膚を含む変化した皮膚構造を導き、これはさらに障壁機能および皮膚弾力性にも影響を及ぼす。皮下脂肪組織を回復させる有意性は、実際に多数の糖尿病性皮膚の病変を克服することができる。これは本発明によると、糖尿病性皮膚を、皮膚および脂肪組織の分化並びに生理機能に影響を及ぼすことが知られているPKC調節因子、様々なアディポカインおよびインスリンシグナリング関連分子を用いた処置によって達成できる。

10

【0096】

皮下組織の皮下脂肪組織の除去に加えて、糖尿病患者の皮膚では、上皮および真皮層の異常な構造が観察される。糖尿病性の上皮は薄く、より少数の層を示し、増加した角化膜形成によって証明される分化パターンの崩壊を描出する。損傷された分化自体が、糖尿病関連皮膚症にとって一般的基本である。糖尿病性皮膚のいくつかの皮膚の病変は、糖尿病性水疱症（Bullosis Diabeticorum）、APDおよびその他などの正常な上皮構造の妨害と関連している。従って、インスリン、PKCおよびMAPKなどの関係する特異的シグナリング経路の調節に影響を及ぼすことによって、本発明者らは、以下の実施例10および13に例示したように正常な分化パターンを回復させて上皮関連の糖尿病性皮膚の病変を克服することができる。

20

【0097】

糖尿病発生の早期段階で観察される皮下脂肪層の消失は、本発明者らも実施例4において例示するように、基質構造における変化へも導く。糖尿病性皮膚では、真皮は組織化が乱れて、サイズが顕著に減少しているように見える。弾性線維が減少し、基質沈着が変化している。これらの兆候は、糖尿病性皮膚症およびNLDなどのヒト糖尿病性病変に似ている。さらに、糖尿病性皮膚における増殖能力は弱められてこれらの病変の基礎となっている。真皮層の回復、改善した基質沈着および皮膚強度は、以下の実施例8に例示するように、PKC調節因子、インスリンシグナリング関連因子およびアディポカインの誘発によって達成できる。これは、皮下組織の脂肪組織形成の誘発によっても達成できる。これらの結果は、糖尿病性皮膚に特徴的な機能障害の矯正への脂肪組織統合性および分泌因子の重要性を証明している。さらに、糖尿病性皮膚は、さらに糖尿病患者の皮膚において重度合併症も導く炎症反応が増加する傾向も示す。PKC調節因子の利用は、異常炎症反応を特異的かつ効率的に減少させることができる。

30

【0098】

糖尿病患者集団の増加を踏まえると、糖尿病性皮膚の治療およびスキンケアのための改良された化粧品組成物および美容上の方法の開発に対する強い要求がある。現行製品に対する代替として、本発明は、糖尿病の状態に特徴的であり、皮膚の外観および状態の改善できる、機能障害および病変の治療、遅延、もしくは予防からなる群から選択される少なくとも1つのスキンケアの有益性を提供する方法を提供する。これには、皮膚の弾力および柔軟性を誘発するために敏感な乾燥した、もしくは鱗状の皮膚の治療を含む。たるんだ皮膚の治療、遅延、予防；皮膚を明るくもしくは暗くさせることによる皮膚への若々しい外観の付与、皮膚の色の正常化；炎症を起こした、もしくは敏感な皮膚を滑らかにすること；皮膚のきめの改善；皮膚の滑らかさを強化することによる皮膚の堅固さおよび強度の誘発、ならびに油／皮脂分泌および水分の調節が含まれる。さらに、これらの組成物は、糖尿病性脂肪壊死症、環状肉芽腫、糖尿病性皮膚症、糖尿病性水疱症、限定された関節可動域、糖尿病性強皮症、黒色表皮腫、先天性穿孔性皮膚症、インスリンアレルギーもしくは糖尿病関連皮膚感染症を含む糖尿病性皮膚に現れる可能性がある明確な病変の遅延、治療、もしくは予防にも適応する。

40

【0099】

50

スキンケアおよび処置のために、多数の化粧品組成物および美容方法が開発されてきた。しかし、糖尿病性皮膚に関しては、糖尿病性皮膚に特徴的な構造および機能の明確な消失に関連する機能障害に特異的に影響を及ぼす作用機序は記載されておらず、特定の組成物は見いだされていない。このため、現在までに美容上の外観および皮膚の糖尿病性の状態に関連する病変を治療するために独特の製品または治療方法は全く記載されていない。

【0100】

全体的に見ると、本発明では、本発明者らは糖尿病性皮膚が独特の特徴を有することを証明する。本発明者らは、病変の基礎にある機序を同定し、糖尿病患者における皮膚構造の悪化を改善もしくは予防するためにスキンケア用の一連の治療上活性もしくは美容上有効な組成物を提案する。これらの組成物の一部は、老化プロセスに関連する固有の欠陥を矯正するためにも同様に有効であることが証明された。このため、それらは老化する皮膚の美容上の外観を治療する新規の一連の美容ケア製品として利用することができる。これらをまとめて、本発明者らは、インスリンシグナリング経路、MAPKシグナリング経路、脂肪細胞分泌分子およびPKC調節因子に関連する特異的分子が、ここに提示した実施例で例示するように糖尿病性および老化する皮膚の機能障害および病変を治療する、予防する、もしくは遅延させることができることを証明する。

【0101】

ヒトの皮膚の状態は、湿潤性、紫外線、化粧品組成物、老化、疾患、ストレスおよび栄養などの様々な因子によって影響される。いくつかの機能は、皮膚の老化に関連している。これには、細胞および皮膚に血液供給する血管数の減少に関連する弾力性の消失および皮膚の薄化が含まれる。さらに、老化した皮膚には、しわや目尻のしわ、シミおよび老斑、たるみ、はりやつやの消失、柔軟性および弾力性の消失などの皮膚審美性および外観における変化が結び付いている。

【0102】

線維芽細胞およびその他の皮膚細胞増殖の減少には、コラーゲン生合成の消失および皮膚内の細胞外基質の様々な成分の不規則性が結び付いており、したがって皮膚老化プロセスに特徴的である弾力性の消失およびしわやたるみを誘発する。このために、老化する皮膚に化粧品として使用するための多種多様な皮膚関連製品には、皮膚構造、皮膚細胞増殖ならびにコラーゲンおよび基質産生の誘発に影響を及ぼすことが知られている成分が含まれる。本発明では、本発明者らは、皮下脂肪組織の消失によって特徴付けられ、様々なアディポカインの分泌における機能障害を含む、皮膚内の脂肪細胞組織成分における不規則性を媒介する皮膚老化の誘発に関する新規機序について記載した。この現象を矯正するために、本発明にしたがって、脂肪組織の分化および分布に関係することが知られている作用物質を試験した。本発明者らの試験結果は、これらの作用物質を用いた処置が損傷した皮膚内での脂肪細胞分布および皮下組織層の再形成／再生を強化することを証明した。これらの作用物質には、PKCアクチベーターおよびインヒビター、インスリンシグナリング経路を活性化する因子が含まれる。さらに、皮下脂肪組織は内分泌器官として機能するので、病変は、脂肪細胞の増殖および分化プロセスに寄与する様々な脂肪細胞分泌因子を用いた皮膚の処置によって克服することができよう。

【0103】

本明細書に記載した化粧品組成物および方法は、しわの形成の予防、減少もしくは遅延、肌のはりの消失の予防、減少もしくは遅延、ならびに吹き出物および毛穴の黒ずみの形成の予防、減少もしくは遅延を生じさせる。それらは、褐斑、しみもしくは肝斑などの皮膚変色を緩和し、乾燥した、傷んだ、もしくは炎症を起こした皮膚を若返らせ、孔を閉鎖もしくは締め、肌のきめ、滑らかさもしくは堅さを改善し、弾力性が改善された滑らかでしなやかな皮膚を創り出す。外観、きめおよび状態における、特に皮膚の輝き、透明度、および全般的外観に関する全体的改善が達成される。このため本発明は、抗老化の利点としてまとめて記載される極めて広範囲の結果を提供する。

【0104】

以下では、本発明を非限定的実施例によって例示する。

【実施例】

【0105】

材料および方法

(i) 材料

組織培養培地および血清は、Biological Industries社（イスラエル国ベイトハーメック）から購入した。強化化学発光法（ECL）は、BioRad社（イスラエル国）から購入したキットを用いて実施した。抗ホスホチロシンモノクローナル抗体は、Upstate Biotechnology社（米国ニューヨーク州レイクプラシッド）から購入した。PKCアイソフォームに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、Santa Cruz社（米国カリフォルニア州）およびTransduction Laboratories社（ケンタッキー州レキシントン）から購入した。ホスホチロシンに対するラットmAbは、Sigma社（ミズーリ州セントルイス）から、およびウサギ抗ホスホセリンはZymed社（カリフォルニア州サンフランシスコ）から購入した。西洋わさびペルオキシダーゼ抗ウサギおよび抗マウスIgGは、Bio-Rad社（イスラエル国）から購入した。ロイペプチン、アプロチニン、フッ化フェニルメタンスルホニル（PMSE）、ジチオスレイトール（DTT）、オルトバナジウム酸ナトリウムおよびペプスタチンは、Sigma Chemicals社（ミズーリ州セントルイス）から購入した。インスリン（HumulinR、組換えヒトインスリン）は、Eli Lilly France SA社（フランス国フェルジェルハイム）から購入した。IGF1は、Cytolab社（イスラエル国）から寄贈された。セラチン1および14、ならびにフィラグリン抗体は、Babco-Convance社（カリフォルニア州リッチモンド）から購入した。

【0106】

(ii) 正常および糖尿病性条件下で皮膚の生理機能を改変する化合物をスクリーニングするための皮膚損傷インビボアッセイ

糖尿病性皮膚合併症を特徴付ける特異的变化を同定するために、本発明者らはI型糖尿病およびII型糖尿病のマウスおよびデブスナネズミ（*Psammomys obesus*）動物モデルから入手した皮膚生検について試験した。特異的シグナリング経路に重点を置くために様々なマウス系統を使用した。野生型系統（129褐色マウス）—正常および糖尿病性サブグループ。マウスは正常血糖性で維持した、またはSTZ（クエン酸バッファー中の185 mg/kg）の単回注射によって糖尿病を誘発した。さらに、本発明者らは、インスリンシグナリングが損なわれた系統ならびに欠陥のあるMAPKシグナリング経路—正常および糖尿病性サブグループを利用した。デブスナネズミは糖尿病性傾向および糖尿病耐性の両方の系統から入手し、この動物モデルでは糖尿病の誘発因子である高エネルギー飼料を摂取させた。皮膚生検は、ウエスタンブロット法によるタンパク質分析のためにパラフィン中に包埋するか、または凍結保存した。特定パラメーターの評価は、H&E、Elastin and Masson染色および上皮分化状態を詳細に示す免疫組織化学検査を用いる組織学的分析によって実施した。免疫組織化学的マーカーは、特異的タンパク質発現、基底増殖細胞に特徴的なセラチン14および増殖性細胞核抗原（PCNA）、セラチン1（有棘分化細胞に特異的）およびフィラグリン分布（角化層—末端分化状態に特徴的）を含んでいた。

【0107】

本発明者らの皮膚損傷のモデルは、後期糖尿病合併症に基づいている。本発明者らは糖尿病を発生させるためのストレプトゾトシン（STZ）注射と共に、ある程度のインスリン耐性を自発的に発生することが知られているC57BL/6Jを含む多数のマウスモデルを利用した。長期間にわたる極めて高レベルの高血糖（7日間以上にわたる>450 mg/dL）によって評価した、顕性糖尿病を持続したマウスだけを考察の対象とし、注射をされていないそれらの同腹のマウスと比較した。追加の動物モデルは、PKCδ枯渇に起因する欠陥のあるインスリンシグナリング経路を備えるマウスおよび皮膚内のPKCα枯渇に起因する皮膚内の欠陥のあるMAPKシグナリング経路を備える129起源由来のマウスを含んでいた。PKCのダウンレギュレーションは、皮膚を長期間にわたり酢酸ミリスチン酸ホルボール（phorbol 12-myristate 13-acetate：PMA）で処置する、またはPKCアイソフォームインヒビターを利用する皮膚細胞の特異的調節のいずれかによっ

て達成できる。これらのマウスにも S T Z を注射し、顕性糖尿病状態で維持した。これらのモデルからの皮膚には、パラフィン包埋および組織学的分析ならびに免疫沈降法およびウエスタンブロットによるタンパク質発現分析の両方を受けさせた。

【0108】

(i i i) 皮膚のインビトロモデル系

インビトロモデル系は、ケラチン生成細胞もしくは線維芽細胞いずれかの一次皮膚細胞培養に基づいていた。細胞を処理し、形態学的変化ならびに遊走および増殖能力について試験した。遊走は、搔爬試験技術を利用して試験し、増殖は増殖性細胞核抗原 (P C N A) 発現によって、またはシェン (Shen) 他、(2001年) によって記載されたようなチミジン取り込みによって試験した。

10

【0109】

(i v) Large White & Landraceブタにおける瘢痕形成の評価

切開は、ブタの背部上で実施し、創傷後20～30日間にわたり瘢痕形成について評価した。生検を採取し、パラフィン中に包埋した。評価は、形態学および審美的分析によって実施した。

【0110】

(v) ケラチン生成細胞および皮膚線維芽細胞の増殖、分化、遊走 (剥離、付着、細胞死) を調節する化合物を検出するためのインビトロ方法

マウスケラチン生成細胞の単離および培養

一次ケラチン生成細胞は、以前に記載されたように (アルト (Alt), 2001年)、新生仔皮膚から単離した。ケラチン生成細胞は、ウシ胎児血清で処置した8% キレックス (Chelex-100、BioRad社) を含有するイーグル最小必須培地 (E M E M) 中で培養した。増殖性基底細胞表現型を維持するために、最終 Ca^{2+} 濃度を0.05 mMに調整した。実験は、プレーティング後5～7日間にわたり実施した。

20

【0111】

マウス皮膚線維芽細胞の単離および培養

一次皮膚線維芽細胞は新生仔皮膚から単離した。各新生仔皮膚について、真皮はトリプシン上に一晚浮遊させた後に上皮から分離した。真皮は、その後37℃で攪拌しながら30分間にわたりコラゲナーゼ (真皮10片につき25 mL) と共にインキュベートした。次に、3容積のH i C a、つまり血清およびfungisomeを備えるダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M) を濾液に加え、懸濁液を無菌ナイロンメッシュに通して濾過し、室温で7分間にわたり1,200 rpmで遠心した (ペレットは、線維芽細胞およびろ胞を、含有する)。ペレットをH i C a、1 mL培地に各マウス相当、中に再懸濁させ、そして、3分間にわたり500 rpmで遠心した (ペレットはろ胞を含有しており、上清は線維芽細胞を含有している)。適切な容量のH i C aを上清に加え、10 cm培養皿につき1匹のマウス相当をプレーティングした。実験は早期細胞継代 (2～6 継代) で実施した。

30

【0112】

皮膚の生理学的プロセスに影響を及ぼす活性化合物についてのスクリーニング

細胞がサブコンフルエンシーに達すると、それらの形態を写真記録し (0 時点)、様々な潜在的薬用化粧品物質を用いた処置を実施した。結果の評価は、適切な時点、処置5秒～15分後の即時型分子応答 (分子経路の活性化について) および処置24～72時間後に後期形態学的/生理学的応答を評価した。皮膚構造の維持に関連する形態学的変化 (付着/剥離、増殖、分化、細胞死) を追跡調査して、写真記録した。さらに、細胞溶解液は、段階特異的マーカー抗体を用いた免疫ブロット法を含む適切な方法を使用して生化学的/分子分析にかけた。

40

【0113】

細胞抽出物の調製およびウエスタンブロット分析

クルードな膜分画については、10 $\mu\text{g/mL}$ のアプロチニン、10 $\mu\text{g/mL}$ のロイペプチン、2 $\mu\text{g/mL}$ のペプスタチン、1 mM のP M S F、10 mM のエチレンジアミン四酢酸 (E D T A)、200 μM のN a V O 4および10 mM のN a Fを含有するP B

50

S中に細胞をすくい取って入れることによって全細胞溶解液を調製した。ホモジナイズ及び4サイクルの凍結／解凍後に、溶解液は最高速度に設定した微量高速遠心機内で20分間にわたり4℃で沈降させた。可溶性細胞質タンパク質分画を含有する上清を別の試験管へ移した。ペレットは、プロテアーゼおよびホスファターゼインヒビターとともに1%のTriton X-100を含有する250 μLのPBS中に再懸濁させ、4℃で30分間にわたりインキュベートし、4℃で最高速度に設定した微量高速遠心機内で沈降させた。上清は膜分画を含有している。タンパク質濃度は、改変Loweryアッセイ（Bio-Rad社、DCタンパク質アッセイキット）を用いて測定した。細胞タンパク質分画のウェスタンブロット分析は、記載されたように実施した（アルト（Alt）他、2001年）。

【0114】

免疫沈降のための細胞溶解液の調製

ケラチン生成細胞を含有する培養皿は、 Ca^{2+} ／ Mg^{2+} 無含有PBSを用いて洗浄した。細胞は、プロテアーゼおよびホスファターゼインヒビター（20 μg/mLのロイペプチン、10 μg/mLのアプロチニン、0.1 mMのPMSEF、1 mMのDTT、200 μMのオルトバナジウム酸ナトリウム、2 μg/mLのペプスタチン）を含有する放射免疫沈降（RIPA）バッファー（50 mMのTris・HCl（pH 7.4）、150 mMのNaCl、1 mMのEDTA、10 mMのNaF、1%のTriton X-100、0.1%のSDS、1%のデオキシコール酸ナトリウム）中で機械的に分離させた。この調製物は4℃で20分間にわたり最高速度に設定した微量高速遠心機内で遠心した。免疫沈降法のためには上清を使用した。

【0115】

免疫沈降法

溶解液は、300 μgの細胞溶解液を25 μLのプロテインA／Gセファロース（米国カリフォルニア州サンタクルーズ）と混合することによって事前に浄化し、懸濁液は4℃で30分間にわたり持続的に回転させた。次に、調製物を10分間にわたり4℃で最高速度に設定して遠心し、30 μLのA／Gセファロースを個々の抗原へ特異的ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体と共に上清に加えた（希釈率、1：100）。試料は、4℃で一晩にわたり回転させた。懸濁液は、次に4℃で10分間にわたり最高速度で遠心し、ペレットはRIPAバッファーを用いて洗浄した。懸濁液は再び15,000×g（4℃で10分間）で遠心し、Tris緩衝食塩液Tween-20（TBST）中で4回洗浄した。試料バッファー（0.5 MのTris・HCl（pH 6.8）、10%のSDS、10%グリセロール、4%の2-β-メルカプトエタノール、0.05%のブロモフェノールブルー）を加え、試料を5分間沸騰させ、次にSDS-PAGEを供した。

【0116】

実施例1．糖尿病の皮膚は過剰な炎症反応を示す

糖尿病の結果として生じる皮膚内の重篤な問題の1つは、異常なアップレギュレートされる炎症反応の傾向である。これらの過剰な炎症を起こした領域は、糖尿病性病変およびその他の損傷についての皮膚感受性に対する将来の局所的「ホットスポット」である。

【0117】

糖尿病性（STZ注射された）ならびに非糖尿病性C57BL／6Jマウスの皮膚生検を切開し、パラフィン中に包埋し、組織学的切片を作製し、H&E組織学的染色によって分析した。炎症は、皮膚および近位血管内の膿瘍形成および過剰な白血球増加症によって判定した。図1A～1Dは、膿瘍形成が黄色の矢印で示されている糖尿病性動物（図1A～1B）対非糖尿病性動物（図1C～1D）の皮膚における炎症反応を示している。図示したように、糖尿病性動物の皮膚は、皮膚の様々な部分における促進された膿瘍形成によって指示される、実際に重篤な炎症反応を示す傾向がある。このため、糖尿病性の炎症を起こした皮膚問題を克服するためにこの発現を予防することが重要である。

【0118】

増強された異常な炎症反応に加えて、糖尿病性皮膚構造の完全性は別々に損なわれる。この重度の機能障害には、皮下組織の皮下脂肪組織の破棄、上皮の過剰な分化および異常

10

20

30

40

50

構造、および真皮構造の崩壊が含まれる。

【0119】

実施例2. 皮膚構造は、糖尿病および高齢動物では変化する

正常血糖性ならびに糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウス由来の皮膚生検をパラフィン包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。

【0120】

図2A～2Dに示したように、糖尿病は皮膚構造に顕著な作用を有する。図2Aは、矢印で示した皮下脂肪層が真皮の下にある正常血糖性マウスの構造を示している。それとは反対に、糖尿病性マウスの皮膚は、皮下脂肪組織の絶対的不在を示し、その代わりに下にある筋肉は真皮の下へ「押され」て、より薄い皮膚を出現させる（図2B）。同一現象は、非肥満性糖尿病性（NOD）マウス、デブスナネズミ2型糖尿病モデル、糖尿病ラットおよび大型動物モデルを含む本発明者らが試験した他の全ての糖尿病性モデルにおいて観察された。皮下脂肪組織の回復は、糖尿病性皮膚の病変を克服できる可能性がある。上皮もまた糖尿病の状態によって損なわれる。図2Cは、黄色の点線で下線が引かれた上皮の正常構造を示している正常マウス皮膚の構造を示している。図2Dは、黄色の点線で下線が引かれた上皮の異常構造を示している糖尿病性マウス皮膚を示している。図から明らかなように、糖尿病性上皮は薄く、少数の層を示し、増加した角化エンベロープ形成によって証明される分化パターンの崩壊を描出する。

【0121】

正常129褐色マウスならびにPKC δ 欠損症が誘発されたインスリンシグナリングが十分に機能しない129褐色マウス由来の皮膚生検をパラフィン包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。図3A～3Bは、正常皮膚（図3A）と比較して欠陥のある真皮構造を示している、インスリン耐性皮膚モデル（図3B）において証明されたように、皮膚構造へのインスリン経路が及ぼす直接的作用を例示している。図3Bに示したように、インスリン耐性皮膚モデル内の真皮は、顕著に減少しており、組織が破壊された構造を有するように見える。真皮の組織が破壊された構造は、同様に全動物観察所見において見ることができ、マウスは極めて薄い皮膚を備えて脆弱に見える。これらの病変は、糖尿病性皮膚症などのヒト糖尿病性病変に似ている。

【0122】

上記に提示したデータから、糖尿病が明確な方法で全皮膚層に影響を及ぼすことは明白である。さらに、特異的シグナリングモデルを利用することによって、インスリンシグナリング経路が崩壊すると、真皮層が直接的に損なわれることがさらに理解される。従って、PI3K、PKD1、MAPK、Ras、PKC、Aktなどの皮膚内のインスリンシグナリング経路の下流エレメントおよびそれらのアダプター分子および転写因子を調節することによって、本発明者らは皮膚の構造特性を調節することができるであろう。さらに、このデータは、皮膚生理学のためには脂肪層の存在が極めて重要であることを証明している。脂肪組織の重要性は、他の皮膚層に影響を及ぼす、脂肪細胞が様々な選択された因子の起源および内分泌器官（すなわち、アディポカイン分泌）として機能する能力によってさらに確証される。糖尿病誘発性の構造機能障害の別の態様は、上皮分化スキームによって証明され、インスリンおよびMAPKなどの関係する特異的シグナリング経路の調節に影響を及ぼすことによって、本発明者らは糖尿病関連皮膚症の一般的根拠である正常分化パターンを回復させることができる。

【0123】

8週齢および8月齢のC57BL/6Jマウス（各群n=10）を屠殺し、皮膚生検標本をパラフィン中に包埋し、無傷皮下組織層についてのH&E組織学的染色によって分析した。図4は、各群における正常皮下組織を備えるマウスの比率（%）を示している。図から明らかなように、高齢マウスは皮下の皮下組織層の枯渇もさらに示しており、これは糖尿病におけると同様に、この層の回復がその枯渇の結果として生じる病変を克服するであろうことを指示している。

【0124】

実施例 3．糖尿病性動物における皮膚強度

糖尿病性皮膚は、虚弱で薄いと記載されてきた。糖尿病状態に関連する病変の多くは、マトリックスの構造および生理機能における変化の組織学的証拠を示してきた。本発明者らは、この根拠に従う一連の実験を実施し、皮膚生検を破裂圧による強度試験にかけた。この分析のために、切開した皮膚を破裂チャンバー内に配置し、皮膚上に CO_2 の流量を増加させながら負荷した。皮膚が破裂した破壊点後に、データを分析し、グラフ形式で要約した。

【0125】

糖尿病性（STZ 注射）ならびに非糖尿病性 C57BL/6J マウス（各群 $n = 10$ ）由来の皮膚生検を切開し、上記に記載したように破裂圧分析を受けさせた。各切開片の破裂圧（ kg / cm^2 ）は下記の表 2 に表示されており、各群の平均破裂圧は図 5 に表示されている。

【0126】

【表 2】

糖尿病性（STZ 注射）対非糖尿病性マウスの皮膚強度

処置	皮膚強度（ kg / cm^2 ）
非糖尿病マウス	0.85, 1.10, 1.25, 1.28, 1.30, 1.40, 1.50, 1.52, 1.7
糖尿病マウス	0.10, 0.20, 0.25, 0.48, 0.55, 0.62, 0.64, 0.75, 0.82, 0.92, 1.2

【0127】

図 5 および表 2 に明白に表示されているように、皮膚強度は糖尿病性動物では半分に減少しており、これはさらに皮膚構造への糖尿病の影響を実証している。皮膚強度は、そのコラーゲンおよび他のマトリックス線維の含量および組織化に基づいていると理解されている。さらに、上記の実施例 2 に示したように、糖尿病性皮膚の皮下組織層は減少しており、皮膚の薄化および皮膚強度の消失を促進する。皮膚強度の回復は、真皮内でのコラーゲンおよびマトリックス線維形成、皮下脂肪組織形成および分布の誘発、ならびに適正な上皮組織化（増殖および分化パターン）の維持に影響を及ぼすことによって達成できる。

【0128】

実施例 4．皮膚弾力性および糖尿病

糖尿病性（STZ 注射）C57BL/6J マウスからの皮膚生検をパラフィン中に包埋し、Fan 及び Nagle（2002 年）によって記載されたように弾性線維のための Verhoeff-Wan・ギーンソン（Van Gieson）手法を用いてエラスチン染色によって分析した。

【0129】

図 6 A～6 C は、黄色の矢印で示した薄い黒色線として例示された様々な皮膚生検内のエラスチン分布を示している。図 6 A は糖尿病性マウス皮膚内のエラスチン分布を示しており、図 6 B は、弾性線維の回復を示している、MAPK 経路の誘発による操作後の糖尿病性マウス皮膚を示しており、そして図 6 C は、糖尿病性コントロール（図 6 A）と類似の増殖パターンを示している、インスリンシグナリングが PKC δ 活性化の阻害によって損傷した糖尿病性マウス皮膚を示している。

【0130】

破壊された皮膚構造および低減した皮膚強度に加えて、糖尿病性皮膚は弾性フィラメントの損失に起因してより脆弱性であることが証明されている。上記に提示したデータは、糖尿病性皮膚が真皮内での弾性線維分布を減少させることを明白に証明しており、シグナリング特異的モデルを通して、本発明者らはこの現象をより明確に理解する。図 6 C に示したインスリンシグナリング欠損皮膚モデルでは、弾性線維は野生型正常血糖性コントロール（図示せず）に比較して糖尿病条件下では減少すると思われ、これはインスリンシグナリングがエラスチン含量に直接的影響を及ぼすことを指示している。他方、図 6 B に示した MAPK 調節経路モデルは、エラスチン含量を正常血糖性レベル（図示せず）へ回復

させるが、これは様々な方法の下流エレメントの活性化によりインスリン非応答性経路を無効にすることによって、本発明者らが糖尿病関連皮膚機能障害を治療できることを示唆している。

【0131】

実施例5. 糖尿病は皮膚の増殖能力に影響を及ぼす

正常血糖性ならびに糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウス由来の皮膚生検をパラフィン包埋し、増殖性細胞核抗原（PCNA）免疫組織化学的染色によって分析した。

【0132】

図7A～7Cは、濃褐色染色核として例示した様々な皮膚生検の増殖能力を示している。図7Aは、黄色の矢印で示した濃褐色染色核として例示した正常血糖性マウス皮膚の増殖能力を示しており、図7Bは、真皮および表皮の両方における皮膚増殖能力（褐色染色が少ない）における顕著な減少を示している糖尿病性マウス皮膚を示しており、図7Cは、黄色の矢印で示されている正常増殖能力の回復を示している、MAPKおよびPKC α 経路が阻害された糖尿病性マウス皮膚を示している。

10

【0133】

糖尿病性皮膚における増殖能力は損なわれており、黒色表皮腫、先天性穿孔性皮膚症（APD）およびその他の皮膚症などの多数の関連性病変の基礎になっていることは明確に実証されている。上記に提示したデータは、糖尿病が上皮ならびに真皮内の増殖をダウンレギュレートすることを例示している。MAPKおよびPKC α 媒介性経路などのインスリン下流シグナリングを含む特異的シグナリング経路の操作を通して、本発明者らは正常および糖尿病性動物の両方において増殖パターンを回復させることができる（図7C）。これらの結果は、MAPK経路の特異的エレメントおよびインスリン下流シグナリングの特異的調節を阻害することによって、本発明者らは上皮および／または真皮および／または皮下組織の増殖および分化に関係するシグナリング関連皮膚病変と関連する欠陥を克服することができる。

20

【0134】

糖尿病性皮膚の損傷および病変を予防および治療するためには、インスリンシグナリング経路もしくはMAPKシグナリング経路に関連する特異的分子、脂肪細胞分泌分子、PKC調節因子およびその他の関連分子を以下の実施例で例示するように使用できる。

30

【0135】

実施例6. 糖尿病性皮膚炎症反応の減弱

糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスの損傷した皮膚をPBS（コントロール）またはアディポネクチン（0.1 μ g/mL）で7日間にわたり処置した（合計n=18）。その後、皮膚生検を採取し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。炎症は、皮膚および近位血管における膿瘍形成および過剰な白血球増加症によって判定し、膿瘍および白血球増加症の両方が明白であった場合に重篤な炎症であると見なされた。図8は、1群当たりの重篤な炎症を備える全動物の比率（%）を示している。

【0136】

次の工程では、糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスからの損傷した皮膚をPBS（コントロール）、インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド（1 μ M）の混合液、またはコポリマー1（Teva Pharmaceutical Industries社、イスラエル国）（55 μ g/mL）のいずれかで9日間にわたり処置した（各群n=6）。本発明者らの研究所において以前に発見されたように、Copolymer 1は、特異的かつ極めて有効なPKC η インヒビターであることが見いだされた。その後、皮膚生検を採取し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって炎症の分析を行った。炎症は、上述したように判定した。図9は、1群当たりの重篤な炎症を備える全動物の比率（%）を示している。

40

【0137】

50

図8は、糖尿病性皮膚における過剰炎症現象がアディポネクチンなどのアディポカインの導入によって予防できることを示している。特に、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ でのアディポネクチンは皮膚における炎症反応を劇的に減少させたが、このとき非処置対照群における90%と比較して重篤な皮膚の炎症を示したのは動物の20%だけであった。種々のアディポネクチン濃度($0.01 \sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$)を試験したときに類似の結果が得られた(図示せず)。

【0138】

図9は、PKC η インヒビターなどの特異的ペプチドまたはPKC α インヒビターとPKC δ アクチベーターであるインスリンの組み合わせなどのペプチドの組み合わせのいずれかで治療すると過剰炎症を減少できることを示している。詳細には、Cop-1またはインスリンと配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチドの組み合わせのいずれかを用いて治療した場合に炎症の顕著な減少を達成した。

10

【0139】

実施例7. 糖尿病性マウスにおいて皮膚強度を増加させる作用物質

野生型129マウスおよびPKC α もしくはPKC ζ 活性化が枯渇している129マウスからの皮膚生検を切開し、上記の実施例3に記載したとおりに破裂圧分析にかけた。1群当たりの平均破裂圧(kg/cm^2)は、図10に示した。

【0140】

図から明らかなように、マトリックスおよびコラーゲン形成、脂肪組織分化および皮膚内の上皮統合性に影響を及ぼすことが知られているシグナリング経路の特異的調節は、皮膚強度を改善できる。糖尿病性動物における皮膚強度は、関連する生理学的プロセスに影響を及ぼす様々な皮膚層の損傷された皮膚再生の結果として損なわれる。これらの結果は、糖尿病関連機能障害を克服する潜在的治療を指摘している。

20

【0141】

実施例8. 損傷した皮膚内での皮下組織層の再建

糖尿病性(STZ注射)C57BL/6Jマウスからの損傷した皮膚をPBS(コントロール)、インスリン(0.1 単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド($1 \mu\text{M}$)の混合液、またはアディプシン($1 \mu\text{M}$)のいずれかで7~9日間にわたり処置した。次に皮膚生検を採取し、パラフィン中に包埋し、組織学的切片を作製し、H&Eを用いて染色した。これらの切片を脂肪細胞の連続層として提示された皮下組織層の存在について分析し、各群当たりの完全に再構築された皮下組織を備える全動物の比率(%)を、図11A~11Bに示した。

30

【0142】

上記に提示した結果は、明白に、配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチドなどのPKC α インヒビターとインスリンなどのPKC δ アクチベーター、ならびにアディプシンなどのアディポカインなどの組み合わせは、糖尿病性動物における皮下組織の皮下層を再構築し、重度の糖尿病性皮膚機能障害の一部を予防できることを証明している。

【0143】

実施例9. インスリン耐性皮膚内の上皮の再生においてチアゾリジンジオン(TZD)およびPKC調節因子を含む様々な作用物質が及ぼす作用

40

一次マウスケラチン生成細胞は、 0.05mM の Ca^{2+} MEM中で培養し、 Ca^{2+} 濃度を 0.12mM へ上昇させることによって分化を誘発した。ケラチン生成細胞は、PBS(コントロール)または様々な濃度(50 、 150 および 300nM)のPPAR γ アクチベーターであるトログリタゾンのいずれかを用いて処置した。細胞を溶解し、細胞骨格画分をSDS-PAGEに供し、抗フィラグリン抗体を用いてブロッティングした。

【0144】

PPAR γ は、主として脂肪細胞によって分泌されるインスリン調節転写因子で、糖尿病進行の重要な調節因子である。PPAR γ は、皮下脂肪組織によって明確に示されるケ

50

ラチン生成細胞に影響を及ぼすことができる。ウエスタンブロット分析において明白に示されるように、PPAR γ の活性化は、末端分化および角化層形成の誘発を示すフィラグリン発現のアップレギュレーションによって正常な皮膚のパターンおよび構造を誘発できる(図12)。

【0145】

次の工程では、5日齢の一次マウスケラチン生成細胞を未処置、または抗糖尿病薬として知られる別のPPAR γ アゴニストである様々な濃度(50、100および200nM)のロシグリタゾンを用いて20分間にわたり処置した。次に細胞をPBSで洗浄し($\times 2$)、培養培地を加えた。処置の18時間後に、上記の材料および方法に記載したように、細胞には、チミジン取り込みによる増殖分析を受けさせた。図13は、ロシグリタゾンがケラチン生成細胞増殖能力に及ぼす作用を示している。これらの結果は、ロシグリタゾンによるケラチン生成細胞増殖における重度の増加を示しており、これはさらに皮膚生理学的に脂肪細胞分泌因子が及ぼす役割を確認している。

【0146】

ケラチン1(K1)は、有棘上皮層に分化する細胞の拘束に依存して皮膚ケラチン生成細胞中での発現が変化する大きな1つのファミリーの細胞骨格タンパク質に属する。低減したK1発現は、皮膚過形成、カルス形成および皮膚障壁機能の崩壊を導く。

【0147】

様々な実験用マウス由来の全皮膚全溶解液の細胞骨格画分を、抗K1抗体を利用したウエスタンブロット分析に供した。図14に示したように、糖尿病性マウスからの皮膚は低減したK1発現を示しており、これは糖尿病関連皮膚合併症の以前の観察所見を支持している。枯渇したPKC α レベルを備える糖尿病性動物は、コントロールの非糖尿病性動物において観察されるレベルに類似して、高レベルの上皮K1を示す。これとは対照的に、PKC δ 枯渇は、非糖尿病性動物の皮膚におけるK1発現の減少を誘発する。上記に提示したデータは、K1発現の薬理的維持と共に、PKC α 阻害もしくはPKC δ 活性のアップレギュレーションによる皮膚内でのK1減少の予防により皮膚における糖尿病関連損傷を最小限に抑えることができることを指示している。

【0148】

実施例10. インスリンおよびPKC α インヒビターの組み合わせは瘢痕形成を予防し、インビボでの損傷した皮膚の審美性を向上させる

外科的長手方向切開は、4月齢体重60kgのLarge White & Landraceの雌性ブタで実施した(n=8)。創傷を閉鎖した後、瘢痕部位をPBS(コントロール)またはインスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリストイル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いて21日間にわたり処置した。この後、審美性および瘢痕形成を評価するために瘢痕部位を写真撮影した。図15は、PBSで処置した4つの瘢痕部位(上方パネル)および上記に記載した組み合わせを用いて処置した4つの瘢痕部位(下方パネル)を示している。

【0149】

相違する実験において、瘢痕形成したウマの皮膚を、皮膚の審美性を向上させるために、上記に記載した組み合わせで14日間にわたり局所的に処置した。図16は、第0日(図16A)および第14日(図16B)の処置領域を示している。

【0150】

図15および図16に明白に図示されているように、インスリン-MAPKシグナリング経路に影響を及ぼすインスリンおよび配列番号1のN-ミリストイル化PKC α 偽基質ペプチドの組み合わせを用いた処置は、瘢痕形成を予防し、損傷した皮膚の全体的審美性を向上させることができる。さらに、ウマおよびイヌを含む大型動物では、処置はさらに瘢痕組織と引き替えに新規毛髪の成長および発生も誘発したが、これはさらに処置が毛髪成長を誘発する能力を暗示している。これはさらに皮膚の審美性を向上させ、この同一作用がさらにインスリン-MAPKシグナリング経路に影響を及ぼす他の小分子によっても達成される可能性があることを指摘している。

【0151】

実施例11. インスリンシグナリング経路のメディエーターは、糖尿病皮膚病変の予防および／または克服のために調節できる

ホスホチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) は、インスリンシグナリングの根本要素の1つとして知られている。これはAktの上流で機能し、ホスホチジルイノシトール-3-リン酸塩を介してインスリン受容体からのシグナルを送達する。図17は、抗K1抗体を利用したウエスタンブロット分析を供した、(i) 非糖尿病性コントロール、(ii) 糖尿病性コントロール、(iii) PKC α 枯渴糖尿病性、および(iv) PKC δ 枯渴非糖尿病性の129褐色マウス由来の全皮膚全溶解液のTriton可溶性画分の分析を示している。図示したように、おそらくは皮膚の代償機序に起因して、糖尿病性マウスの皮膚内でのPI3K発現レベルの劇的な上昇が観察された。糖尿病性動物におけるPKC α 枯渴はPI3K発現を標準化し、そのレベルをコントロール非糖尿病性マウスのレベルにした。これは、組織学スライドによって観察されたように、皮膚における正常な組織学的特徴の回復と関連していた。さらに、PKC δ が欠如しているマウスは、非糖尿病性状態でさえ、実験動物が糖尿病合併症に罹りやすくなる素因を与えるコントロール糖尿病性マウスにおいて観察されるレベルよりはるかに高い、極めて高レベルのPI3Kを示した。これらの皮膚では、脂肪組織も枯渴しており、皮膚の薄化を示していた(図示せず)。従って、PKC α 活性のダウンレギュレーションと共に薬理学的物質によるPI3K発現の障害は、皮膚における糖尿病関連合併症に有益な可能性がある。

【0152】

インスリン誘発性シグナリングの結果として、重要な酵素であるAktは活性化され、分化、誘導および生存を含む様々な細胞応答を開始させる。Aktは、PI3K媒介性インスリンシグナリングの特徴の1つを表している。その細胞発現を変化させることによるその調節は、細胞のインスリン感受性に寄与することができる。図18Aは、抗Akt抗体を利用したウエスタンブロット分析に供した、(i) 非糖尿病性コントロール、(ii) 糖尿病性コントロール、(iii) PKC α 枯渴非糖尿病性、および(iv) PKC α 枯渴非糖尿病性の129褐色マウス由来の全皮膚全溶解液のTriton可溶性画分の分析を示している。図から明らかなように、Aktの発現レベルは、非糖尿病性動物と比較して糖尿病性マウスの皮膚において有意に増加する。これは、細胞による代償機序として糖尿病性動物におけるインスリンの欠如および未使用Akt電位の蓄積に起因することによる、この酵素の活性化の消失に原因を求めることができる。PKC α 欠損性非糖尿病性マウスは、コントロールに類似するAktレベルを示すが、これらの動物における糖尿病の誘発は、有意に低い強度ではあるが、最終的にはAkt発現レベルを上昇させる。図18Bに示したように、これはPKC α 欠損マウスにおけるAkt活性の基礎上昇によって説明することができ、これは順にAkt阻害タンパク質を誘発することによってAkt発現をダウンレギュレートする。

【0153】

上記に提示したデータは、PKC α の障害は皮膚内のAkt発現レベルへの糖尿病関連作用を最小限に抑えることを示めている。Akt蓄積の薬理学的予防と共に、PKC α 障害は糖尿病患者の皮膚細胞におけるAktレベルの標準化に寄与するであろう。

【0154】

インスリン誘発性経路の別のシグナリング成分であるAktと類似して、MAPKはインスリンに応答して活性化される。図19は、抗pMAPKおよび抗MAPK抗体を利用したウエスタンブロット分析に供した、(i) 非糖尿病性コントロール、(ii) 糖尿病性コントロール、(iii) PKC α 枯渴非糖尿病性、(iv) PKC α 枯渴糖尿病性、(v) PKC δ 枯渴非糖尿病性、および(vi) PKC δ 枯渴糖尿病性129褐色マウス由来の全皮膚全溶解液のTriton溶解性画分の分析を示している。

【0155】

図19に示したように、糖尿病の誘発はMAPK活性化および細胞発現レベルの両方を上昇させる。PKC α 欠損動物では、MAPKの活性化および発現は、ほんのわずかな上

昇しか示さない。従って、PKC α の阻害はMAPKの蓄積および活性化を予防し、このために糖尿病患者におけるMAPK分布を平衡化させる。他方、PKC δ 欠損マウスは、非糖尿病性条件下でさえ相当高レベルのMAPK活性化および発現を示すので、動物に糖尿病発生の素因を与える。上記に提示したデータは、MAPK活性化および／または発現の薬理的阻害と共に、PKC α を阻害してPKC δ を活性化することによって、皮膚における糖尿病の症状を克服できることを示めている。

【0156】

実施例12. インスリンおよびPKC α インヒビターの組み合わせは、糖尿病関連皮膚障害の完全回復を促進する

糖尿病関連皮膚障害を有する患者は、インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド（1 μ M）の組み合わせで局所的に処置した。図20A～20Bは、第0日（図20A）および第14日（図20B）のこの患者の手掌を示している。

10

【0157】

糖尿病性皮膚症を有する別の高齢患者（80歳）を上記に記載したように処置した。図21A～21Bは、第0日（図21A）および第14日（図20B）のこの患者の手甲を示している。

【0158】

第3のケースでは、患者の糖尿病性病変を上述したように14日間にわたり処置した。図22A～22Bは、第0日（図22A）および第14日（図22B）の処置領域を示している。

20

【0159】

上記に提示したデータは、これらのすべてのケースにおいて、上記の組み合わせを用いた2週間にわたる処置が皮膚の完全な回復を促進することを示めている。

【0160】

参考文献

アルト, エイ (Alt, A.) オーバ, エム (Ohba, M.) リ, エル (Li, L.) ガーツ
バイン, エム (Gartsbein, M.) ベランガー, エイ (Belanger, A.) デニング, エム
・エフ (Denning, M.F.) クロキ, ティ (Kuroki, T.) ユスバ, エス・エイチ (Yuspa,
S.H.) テンネンbaum, ティ (Tennenbaum, T.), Protein kinase Cdelta-mediated
phosphorylation of alpha6beta4 is associated with reduced integrin localization
to the hemidesmosome and decreased keratinocyte attachment, Cancer Res., 2001,
61, 4591-4598

30

ビーンズ, シー・エイチ (Benes, C.H.) ウー, エヌ (Wu, N.) エリア, エイ・イー
ー・エイチ (Elia, A.E.H.) ダリア, ティ (Dharia, T.) キャントレー, エルシー (Cantley, L.C.) ソルトフ, エス・ピー (Soltoff, S.P.), The C2 domain of PKC δ is
a phosphotyrosine binding domain, Cell, 2005, 121, 271-280

チャン, エル (Chang, L.) チアン, エス・エイチ (Chiang, S.H.) サルティエル,
エイ・アール (Saltiel, A.R.), Insulin signaling and the regulation of glucose t
ransport, Mol Med., 2004, 10 65-71

40

コネリー, エル・イー (Connery, L.E.) コーシン, ディ・ビー (Coursin, D.B.),
Assessment and therapy of selected endocrine disorders, Anesthesiol. Clin. plac
eNorth America, 2004, 22, 93-123

エリアス, ピー・エム (Elias, P.M.) ガディアリー, アール (Ghadially, R.), Th
e aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities, Clin
Geriatr Med., 2002, 18, 103-120

ファリース, アール・ヴィ (Farese, R.V.) サジャン, エム・ピー (Sajan, M.P.)
スタンダート, エム・エル (Standaert, M.L.), Insulin-sensitive protein kinases
(atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in ob
esity and type II diabetes, Exp Biol Med., 2005, 230, 593-605

50

フライアーズ, イー (Fliers, E.) クライアー, エフ (Kreier, F.) ヴォショル, ピー・ジェイ (Voshol, P.J.) ハヴェケス, エル・エム (Havekes, L.M.) ザウアーヴァイン, エイチ・ピー (Sauerwein, H.P.) カルスビーク, エイ (Kalsbeek, A.) ブエイス, アール・エム (Buijs, R.M.) ロメイ, ジェイ・エイ (Romijn, J.A.), White adipose tissue: getting nervous, *J Neuroendocrinol.*, 2003, 15, 1005-1010

フォーミサノ, ピー (Formisano, P.) オリエンティ, エフ (Orienty, F.) フィオリ, エフ (Fiory, F.) カルソ, エム (Caruso, M.) ミーレ, シー (Miele, C.) マイタン, エム・エイ (Maitan, M.A.) アンドレオッツィ, エフ (Andreozzi, F.) ヴィグリオッタ, ジー (Vigliotta, G.) コンドレリ, ジー (Con dorelli, G.) ベギノット, エフ (Beguino, F.), Insulin-activated protein kinase C β bypasses Ras and stimulates mitogen-activated protein kinase activity and cell proliferation in muscle cells, *Mol Cell Biol.*, 2000, 20, 6323-6333

フラインケル, アール・ケイ (Freinkel, R.K.) ウッドレー, ディ・ティ (Woodley, D.T.), The biology of the skin. Publisher: the Parthenon publishing group, 2001, placeCityPearl River, StateNY country-regionUSA, ISDN 1850700060

ガーツバイン, エム (Gartsbein, M.) アルト, エイ (Alt, A.) ハシモト, ケイ (Hashimoto, K.) ナカジマ, ケイ (Nakajima, K.) クロキ, ティ (Kuroki, T.) テンネンバウム, ティ (Tennenbaum, T.), The role of protein kinase C δ activation and STAT3 Ser727 phosphorylation in insulin-induced keratinocyte proliferation, *J Cell Sci.*, 2006, 119, 470-481

グレゴアール, エフ・エム (Gregoire, F.M.), Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell, *Exp Biol Med*, 2001, 226, 997-1002

ホフマン, ジェイ (Hofmann, J.), The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C, *The FASEB J*, 1997, 11, 649-669

イシキ, エム (Ishiki, M.) クリップ, エイ (Klip, A.), Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners, *Endocrinology*, 2005, 146, 5071-5078

ジャクソン, エス・エム (Jackson, S.M.) ウィリアムズ, エム・エル (Williams, M.L.) ファインゴールド, ケイ・アール (Feingold K.R.) エリアス, ピー・エム (Elias, P.M.), Pathobiology of the stratum corneum, *West J Med.*, 1993, 158, 279-285

ラヴィオラ, エル (Laviola, L.) ペッリーニ, エス (Perrini, S.) シグナレリ, エイ (Cignarelli, A.) ジョルジーノ, エフ (Giorgino, F.), Insulin signalling in human adipose tissue, *Arch Physiol Biochem.*, 2006, 112, 82-88

マイアス, エル (Maianu, L.) ケラー, エス・アール (Keller, S.R.) ガーヴェイ, ダブリュー・ティ (Garvey, W.T.), Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2001, 86, 5450-5456

モンターニャ, ダブリュー (Montagna, W.) カーリスル, ケイ (Carlisle, K.), Structural changes in aging human skin, *J Invest Dermatol.*, 1979, 73, 47-53

ミュラー, エル・エム (Muller, L.M.) ゴーター, ケイ・ジェイ (Gorter, K.J.) ハク, イー (HAK, E.) ゴウズワード, ダブリュー・エル (Goudzwaard, W.L.) シェルヴィス, エフ・ジー (Schellevis, F.G.) ホーペルマン, エイ・アイ (Hoepelman, A.I.) ラッタン, ジー・イー (Rutten, G.E.), Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Clin Infect Dis.*, 2005, 41, 281-288

ナカガミ, エイチ (Nakagami, H.) 他、*J. Atheroscler. Thromb.*, 2006
 エング, ティ (Ng, T.) パーソンズ, エム (Parsons, M.) ヒューズ, ダブリュー・イー (Hughes, W.E.) マニーペニー, ジェイ (Monypenny, J.) ズィカ, ディ (Zicha, D.)

10

20

30

40

50

） ゴートロー, エイ (Gautreau, A.) アーピン, エム (Arpin, M.) グシュマイスナー, エス (Gschmeissner, S.) ヴェルヴェール, ピー・ジェイ (Verveer, P.J.) バスティエンズ, ピー・アイ (Bastiaens, P.I.) パーカー, ピー・ジェイ (Parker, P.J.), Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility, *EMBO J.*, 2001, 20, 2723-2741

パンタネッティ, ピー (Pantanetti, P.) ガーラパ, ジー・ジー (Garrapa, G.G.) マンテロ, エフ (Mantero, F.) ボスカロ, エム (Boscaro, M.) ファロイア, イー (Faloia, E.) ヴェナルッキ, ディ (Venarucci, D.), Adipose tissue as an endocrine organ? A review of recent data related to cardiovascular complications of endocrine dysfunctions, *Clin Exp Hypertens.*, 2004, 26, 387-398

パテル, エヌ (Patel, N.) フアン, シー (Huang, C.) クリップ, エイ (Klip, A.), Cellular location of insulin-triggered signals and implications for glucose uptake, *Pflugers Arch.*, 2006, 451, 499-510

シェーファー, エイチ (Schaefer, H.) レーデルマイアー, ティ・イー (Redelmeier, T.E.), Structure and dynamics of the skin barrier. In: Skin barrier: principles of percutaneous absorption. placeCityBasel, country-regionSwitzerland, Karger, 1996, 1-42

シェン, エス (Shen, S.) アルト, エイ (Alt, A.) ヴェルトハイマー, イー (Wertheimer, E.) ガーツバイン, エム (Gartsbein, M.) クロキ, ティ (Kuroki, T.) オオバ, エム (Ohba, M.) ブライマン, エル (Braiman, L.) サンプソン, エス・アール (Sampson, S.R.) テンネンバウム, ティ (Tennenbaum, T.), PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes, *Diabetes*, 2001, 50, 255-264

スプラヴチコフ, エヌ (Spravchikov, N.) シズヤコフ, ジー (Sizyakov, G.) ガーツバイン, エム (Gartsbein, M.) アッチリ, ディ (Accili, D.) テンネンバウム, ティ (Tennenbaum, T.) ヴェルトハイマー, イー (Wertheimer, E.), Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications, *Diabetes*, 2000, 50, 1627-1635

タハ, シー (Taha, C.) クリップ, エイ (Klip, A.), The insulin signaling pathway, *J. Membrane Biol.*, 1999, 169, 1-12

テンネンバウム, ティ (Tennenbaum, T.) ユスパ, エス・エイチ (Yuspa, S.H.) ノックス, ピー (Knox, B.) ソベル, エム・イー (Sobel, M.E.) カストロノヴォ, ヴィ (Castronovo, V.) ヤマダ, ワイ (Yamada, Y.) デ・ルカ, エル・エム (De Luca, L.M.), Alterations in attachment to laminin and localization of laminin binding proteins during differentiation of primary mouse keratinocytes in vitro (Abstract), *J. Invest. Dermatol.*, 1991, 96

ティンゴ, エックス・ティ (Tingo, X.T.) デイム, エス・ワイ (Dimg, S.Y.) ハンセン, ビー・シー (Hansen, B.C.), Paradoxical increase in dermal microvascular flow in pre-diabetes associated with elevated levels of CRP, *Clin Hemorheol Microcirc.*, 2006, 34, 273-282

ヴァラニ, ジェイ (Varani, J.) デイム, エム・ケイ (Dame, M.K.) リッティ, エル (Rittie, L.) フリギール, エス・イー (Fligiel, S.E.) カン, エス (Kang, S.)

フィッシャー, ジー・ジェイ (Fisher, G.J.) ヴォールヒーゼ, ジェイ・ジェイ (Voornhees, J.J.), Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation, *Am J Pathol.*, 2006, 168, 1861-1868

ワン, ワイ・アール (Wang, Y.R.) マルゴリス, ディ (Margolis, D.), The prevalence of diagnosed cutaneous manifestations during ambulatory diabetes visits in the United States, 1998-2002, *Dermatology*, 2006, 212, 229-234

ヴェルトハイマー, イー (Wertheimer, E.) エンク, シー・ディ (Enk, C.D.), Ski

10

20

30

40

50

n and diabetes mellitus, Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text, Chapter 96, 2001

ヴェルトハイマー, イー (Wertheimer, E.) スプラヴチコフ, エヌ (Spravchikov, N.) トレビクス, エム (Trebicz, M.) ガーツバイン, エム (Gartsbein, M.) アッチリ, ディ (Accili, D.) アヴィノア, アイ (Avinoah, I.) ノフェー - モーゼス, エス (Nofeh-Moses, S.) シズヤコフ, ジー (Sizyakov, G.) テンネンバウム, ティ (Tennenbaum, T.), The regulation of skin proliferation and differentiation in the IR null mouse: implications for skin complications of diabetes, Endocrinology, 2001, 142, 1234-1241

ヴェルトハイマー, イー (Wertheimer, E.), Diabetic skin complications: a need for reorganizing the categories of diabetes-associated complications, Isr. Med. Assoc. J., 2004, 6, 287-289

ウェスト, エム・ディ (West, M.D.), The cellular and molecular biology of skin aging, Arch Dermatol., 1994, 130, 87-95

ホワイト, エム・エフ (White, M.F.), The insulin signalling system and the IRS proteins, Diabetologia., 1997, 40 Suppl 2, 2-17

ワイソッキ, エイ・ビー (Wysocki, A.B.), Skin, anatomy, physiology, and pathophysiology, Nurs. Clin. North Am., 1999, 34, 777-797

ヤン, エス (Yang, S.) リッチフィールド, ジェイ・イー (Litchfield, J.E.) ベインズ, ジェイ・ダブリュ (Baynes, J.W.), AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats, Arch Biochem Biophys., 2003, 412, 42-46

ユーン, エイチ・エス (Yoon, H.S.) バイク, エス・エイチ (Baik, S.H.) オー, シー・エイチ (Oh, C.H.), Quantitative measurement of desquamation and skin elasticity in diabetic patients, Skin Res Technol., 2002, 8, 250-254

ユスパ, エス・エイチ (Yuspa, S.H.) キルケニー, エイ・イー (Kilkenny, A.E.) スタイナート, ピー・エム (Steinert, P.M.) ループ, ディ・アール (Roop, D.R.), Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro, J. Cell Biol., 1989, 109, 1207-1217

【図面の簡単な説明】

【0161】

【図1A】黄色の矢印で概説されている、皮膚層間に分布した促進性の膿瘍形成によって示される、糖尿病性動物の皮膚が重篤な炎症反応を示す傾向があることを証明している、糖尿病性 (STZ注射) (図1A~1B) 対非糖尿病性 (図1C~1D) C57BL/6Jマウスの皮膚の炎症反応を示した図であり、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。

【図1B】黄色の矢印で概説されている、皮膚層間に分布した促進性の膿瘍形成によって示される、糖尿病性動物の皮膚が重篤な炎症反応を示す傾向があることを証明している、糖尿病性 (STZ注射) (図1A~1B) 対非糖尿病性 (図1C~1D) C57BL/6Jマウスの皮膚の炎症反応を示した図であり、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。

【図1C】黄色の矢印で概説されている、皮膚層間に分布した促進性の膿瘍形成によって示される、糖尿病性動物の皮膚が重篤な炎症反応を示す傾向があることを証明している、糖尿病性 (STZ注射) (図1A~1B) 対非糖尿病性 (図1C~1D) C57BL/6Jマウスの皮膚の炎症反応を示した図であり、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。

【図1D】黄色の矢印で概説されている、皮膚層間に分布した促進性の膿瘍形成によって示される、糖尿病性動物の皮膚が重篤な炎症反応を示す傾向があることを証明している、糖尿病性 (STZ注射) (図1A~1B) 対非糖尿病性 (図1C~1D) C57BL/6

10

20

30

40

50

Jマウスの皮膚の炎症反応を示した図であり、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した。

【図2A】矢印で示した、皮下脂肪層が真皮下の正常血糖性マウス皮膚の構造（図2A）、皮下脂肪組織の絶対的不在を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2B）、黄色の点線で下線が引かれた上皮の正常な組織を示している正常マウス皮膚の構造（図2C）、および黄色の点線で下線が引かれた上皮の異常な組織化を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2D）を示した図であり、皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（Nikon Eclipse 50i 顕微鏡、図2A～2B — 倍率10倍、図2C～2D — 倍率40倍）。

10

【図2B】矢印で示した、皮下脂肪層が真皮下の正常血糖性マウス皮膚の構造（図2A）、皮下脂肪組織の絶対的不在を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2B）、黄色の点線で下線が引かれた上皮の正常な組織を示している正常マウス皮膚の構造（図2C）、および黄色の点線で下線が引かれた上皮の異常な組織化を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2D）を示した図であり、皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（Nikon Eclipse 50i 顕微鏡、図2A～2B — 倍率10倍、図2C～2D — 倍率40倍）。

【図2C】矢印で示した、皮下脂肪層が真皮下の正常血糖性マウス皮膚の構造（図2A）、皮下脂肪組織の絶対的不在を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2B）、黄色の点線で下線が引かれた上皮の正常な組織を示している正常マウス皮膚の構造（図2C）、および黄色の点線で下線が引かれた上皮の異常な組織化を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2D）を示した図であり、皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（Nikon Eclipse 50i 顕微鏡、図2A～2B — 倍率10倍、図2C～2D — 倍率40倍）。

20

【図2D】矢印で示した、皮下脂肪層が真皮下の正常血糖性マウス皮膚の構造（図2A）、皮下脂肪組織の絶対的不在を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2B）、黄色の点線で下線が引かれた上皮の正常な組織を示している正常マウス皮膚の構造（図2C）、および黄色の点線で下線が引かれた上皮の異常な組織化を示している糖尿病性マウス皮膚の構造（図2D）を示した図であり、皮膚生検を糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（Nikon Eclipse 50i 顕微鏡、図2A～2B — 倍率10倍、図2C～2D — 倍率40倍）。

30

【図3A】正常129褐色マウス（図3A）対PKCδ欠損症が誘発されたインスリンシグナリングが損傷した129褐色マウス（図3B）の皮膚構造を示した図であり、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（倍率10倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡）。

【図3B】正常129褐色マウス（図3A）対PKCδ欠損症が誘発されたインスリンシグナリングが損傷した129褐色マウス（図3B）の皮膚構造を示した図であり、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H&E組織学的染色によって分析した（倍率10倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡）。

40

【図4】高齢（8月齢）対幼若（8週齢）C57BL/6Jマウスにおける皮下脂肪組織分布の消失を示した図であり、皮下脂肪組織の消失は、無傷の皮下組織を備えるマウスの比率（%）として表示した（各群n=10）。

【図5】マウスを以下の実施例3に記載したとおりに処置した場合の、糖尿病性（STZ注射）もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから切除した皮膚生検標本の破裂圧（kg/cm²）を評価することによる平均皮膚強度および弾性を示した図（各群n=10）。

【図6A】糖尿病性マウス皮膚のエラスチン分布（黄色の矢印により細い黒色のファイバ

50

ーとして図示した) (図6A)、弾性線維の回復を示している、MAPK経路の誘発による操作後の糖尿病性マウス皮膚(図6B)、および弾性線維分布がまばらである、PKC δ 活性化の阻害によってインスリンシグナリングが損傷した糖尿病性マウス皮膚(図6C)を示した図であり、皮膚生検を糖尿病性(STZ注射)C57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、弾性線維のためのVerhoeff-ワン・ギーソン(Van Gieson)手法を用いるエラスチン染色によって分析した(倍率40倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡)。

【図6B】糖尿病性マウス皮膚のエラスチン分布(黄色の矢印により細い黒色のファイバーとして図示した) (図6A)、弾性線維の回復を示している、MAPK経路の誘発による操作後の糖尿病性マウス皮膚(図6B)、および弾性線維分布がまばらである、PKC δ 活性化の阻害によってインスリンシグナリングが損傷した糖尿病性マウス皮膚(図6C)を示した図である。皮膚生検を糖尿病性(STZ注射)C57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、弾性線維のためのVerhoeff-ワン・ギーソン(Van Gieson)手法を用いるエラスチン染色によって分析した(倍率40倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡)。

【図6C】糖尿病性マウス皮膚のエラスチン分布(黄色の矢印により細い黒色のファイバーとして図示した) (図6A)、弾性線維の回復を示している、MAPK経路の誘発による操作後の糖尿病性マウス皮膚(図6B)、および弾性線維分布がまばらである、PKC δ 活性化の阻害によってインスリンシグナリングが損傷した糖尿病性マウス皮膚(図6C)を示した図である。皮膚生検を糖尿病性(STZ注射)C57BL/6Jマウスから切除し、パラフィン中に包埋し、弾性線維のためのVerhoeff-ワン・ギーソン(Van Gieson)手法を用いるエラスチン染色によって分析した(倍率40倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡)。

【図7A】(i) 黄色の矢印で示されている、濃褐色に染色された核として図示された正常血糖性マウス(図7A)、(ii) 真皮および表皮の両方における皮膚増殖能力における顕著な減少(褐色染色が少ない)を示している糖尿病性マウス皮膚(図7B)、および(iii) 黄色の矢印で示されている、正常増殖能力の回復を示している、MAPKおよびPKC α 経路が阻害された糖尿病性マウス皮膚(図7C)の皮膚増殖能力を示した図である。皮膚生検を糖尿病性(STZ注射)もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから分離し、パラフィン中に包埋し、増殖細胞核内抗原(PCNA)免疫組織化学的染色によって分析した(倍率40倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡)。

【図7B】(i) 黄色の矢印で示されている、濃褐色に染色された核として図示された正常血糖性マウス(図7A)、(ii) 真皮および表皮の両方における皮膚増殖能力における顕著な減少(褐色染色が少ない)を示している糖尿病性マウス皮膚(図7B)、および(iii) 黄色の矢印で示されている、正常増殖能力の回復を示している、MAPKおよびPKC α 経路が阻害された糖尿病性マウス皮膚(図7C)の皮膚増殖能力を示した図である。皮膚生検を糖尿病性(STZ注射)もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから分離し、パラフィン中に包埋し、増殖細胞核内抗原(PCNA)免疫組織化学的染色によって分析した(倍率40倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡)。

【図7C】(i) 黄色の矢印で示されている、濃褐色に染色された核として図示された正常血糖性マウス(図7A)、(ii) 真皮および表皮の両方における皮膚増殖能力における顕著な減少(褐色染色が少ない)を示している糖尿病性マウス皮膚(図7B)、および(iii) 黄色の矢印で示されている、正常増殖能力の回復を示している、MAPKおよびPKC α 経路が阻害された糖尿病性マウス皮膚(図7C)の皮膚増殖能力を示した図である。皮膚生検を糖尿病性(STZ注射)もしくは非糖尿病性いずれかのC57BL/6Jマウスから分離し、パラフィン中に包埋し、増殖細胞核内抗原(PCNA)免疫組織化学的染色によって分析した(倍率40倍、Nikon Eclipse 50i 顕微鏡)。

【図8】7日間にわたりPBS(対照)もしくはアディポネクチン(0.1 μ g/mL)のいずれかを用いて処置した糖尿病性(STZ注射)C57BL/6Jマウスが重篤な炎症を示している比率(%)を示した図であり、アディポネクチン処置は皮膚および近位血

10

20

30

40

50

管における膿瘍形成および過剰な白血球増加症の両方によって判定される炎症反応を減少させることができ、皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した（合計 $n = 18$ ）。

【図9】9日間にわたる（i）PBS（コントロール）、（ii）インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド（1 μ M）の混合液（インスリン+PKC α 阻害剤）、または（iii）Cop-1（55 μ g/mL）を用いて処置した糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスが重篤な炎症を示している比率（%）を示した図であり、インスリンおよびPKC α 阻害剤ならびにCop-1を用いた両方の処置は、皮膚および近位血管中の膿瘍形成および過剰な白血球増加症の両方によって判定される炎症反応を減少させることができた。皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した（各群 $n = 6$ ）。

10

【図10】（i）野生型129マウス（コントロール）、（ii）PKC α 欠損129マウス、または（iii）PKC ζ 欠損129マウスから切除し、下記の実施例3に記載したとおりに処置した皮膚生検の平均破裂圧（kg/cm²）を示した図。

【図11A】（i）PBS（コントロール）もしくはインスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質（1 μ M）の組み合わせ（インスリン+PKC α 阻害剤）（図11A）、または（ii）PBS（コントロール）もしくはアディプシン（1 μ M）（図11B）のいずれか、を用いた7～9日間の処置後に糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスから切除した皮膚生検における皮下組織の再構築率（%）を示した図であり、これらの結果は、インスリン、PKC調節因子および脂肪細胞分泌因子が糖尿病性皮膚における皮下脂肪細胞沈着および皮下組織皮層分布を誘発する能力を証明し、次に皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した。

20

【図11B】（i）PBS（コントロール）もしくはインスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質（1 μ M）の組み合わせ（インスリン+PKC α 阻害剤）（図11A）、または（ii）PBS（コントロール）もしくはアディプシン（1 μ M）（図11B）のいずれか、を用いた7～9日間の処置後に糖尿病性（STZ注射）C57BL/6Jマウスから切除した皮膚生検における皮下組織の再構築率（%）を示した図であり、これらの結果は、インスリン、PKC調節因子および脂肪細胞分泌因子が糖尿病性皮膚における皮下脂肪細胞沈着および皮下組織皮層分布を誘発する能力を証明し、次に皮膚生検を切除し、パラフィン中に包埋し、H & E組織学的染色によって分析した。

30

【図12】0.12 mMのCa²⁺中で培養し、そして様々な濃度（0、50、150および300 nM）のロシグリタゾンを用いて処置し、さらにSDS-PAGEおよび抗フィラグリン抗体を利用したウェスタンブロット分析にかけた後の、一次ケラチン生成細胞から入手した細胞骨格分画の分析を示した図。

【図13】「材料および方法」の項に記載したチミジン取り込みによって分析した、様々な濃度（0、50、100および200 nM）のロシグリタゾンを用いて処置した一次ケラチン生成細胞の増殖分析を示した図であり、チミジン取り込みは、cpm/ μ gタンパク質/分で測定した。

40

【図14】抗K1抗体を利用したウェスタンブロット分析を受けさせた、（i）非糖尿病性コントロール、（ii）糖尿病性コントロール、（iii）PKC α 枯渇糖尿病性、および（iv）PKC δ 枯渇非糖尿病性の129褐色マウス由来の全皮膚全可溶化液の細胞骨格分画の分析を示した図。

【図15】PBS（上方パネル）もしくはインスリンおよび配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチドの組み合わせのいずれかを用いて処置したLarge-white & Landraceの4月齢体重60 kgの雌性ブタ（ $n = 8$ ）の背部上で実施した外科切開部の閉鎖の結果として生じた瘢痕部位を示した図。

【図16A】インスリン（0.1単位）および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド（1 μ M）の組み合わせを用いた局所処置の前（図16A）および局所処

50

置の14日後(図16B)の癬痕形成されたウマ皮膚を示した図。

【図16B】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図16A)および局所処置の14日後(図16B)の癬痕形成されたウマ皮膚を示した図。

【図17】抗PI3K抗体を利用したウエスタンブロット分析に供した、様々な実験用129褐色マウス(非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKC α 枯渴糖尿病性、およびPKC δ 枯渴非糖尿病性)由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分の分析を示した図。

【図18A】抗Akt抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた様々な実験用129褐色マウス(非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKC α 枯渴非糖尿病性、およびPKC α 枯渴糖尿病性)由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分(図18A)、および抗pThrAkt抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた様々な実験用129褐色マウス(非糖尿病性コントロール、PKC α 枯渴非糖尿病性、およびPKC δ 枯渴非糖尿病性)由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分(図18B)の分析を示した図。

【図18B】抗Akt抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた様々な実験用129褐色マウス(非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKC α 枯渴非糖尿病性、およびPKC α 枯渴糖尿病性)由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分(図18A)、および抗pThrAkt抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた様々な実験用129褐色マウス(非糖尿病性コントロール、PKC α 枯渴非糖尿病性、およびPKC δ 枯渴非糖尿病性)由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分(図18B)の分析を示した図。

【図19】抗pMAPKおよび抗MAPK抗体を利用したウエスタンブロット分析を受けさせた、様々な実験用129褐色マウス(非糖尿病性コントロール、糖尿病性コントロール、PKC α 枯渴非糖尿病性、PKC α 枯渴糖尿病性、PKC δ 枯渴非糖尿病性、およびPKC δ 枯渴糖尿病性)由来の全皮膚全可溶化液のTriton溶解画分の分析を示した図。

【図20A】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図20A)および局所処置の14日後(図20B)の糖尿病関連皮膚障害を有する患者の鱗状の皮膚を備える手掌を示した図。

【図20B】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図20A)および局所処置の14日後(図20B)の糖尿病関連皮膚障害を有する患者の鱗状の皮膚を備える手掌を示した図。

【図21A】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図21A)および局所処置の14日後(図21B)の糖尿病関連糖尿病性皮膚障害を有する80歳の患者の手の甲を示した図。

【図21B】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図21A)および局所処置の14日後(図21B)の糖尿病関連糖尿病性皮膚障害を有する80歳の患者の手の甲を示した図。

【図22A】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図22A)および局所処置の14日後(図22B)の83歳の患者の糖尿病性病変を示した図。

【図22B】インスリン(0.1単位)および配列番号1のN-ミリスチル化PKC α 偽基質ペプチド(1 μ M)の組み合わせを用いた局所処置の前(図22A)および局所処置の14日後(図22B)の83歳の患者の糖尿病性病変を示した図。

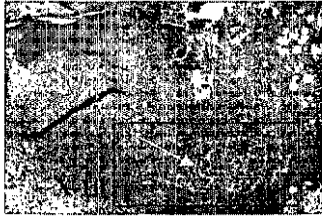
10

20

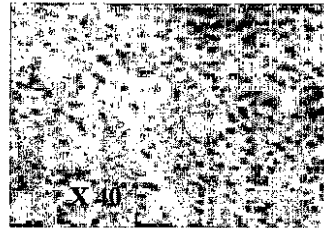
30

40

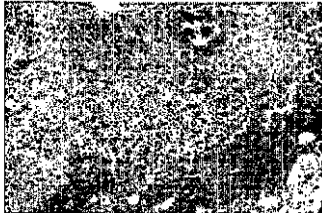
【図 1 A】

Fig. 1A

【図 1 D】

Fig. 1D

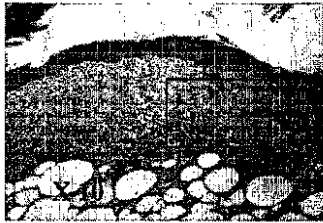
【図 1 B】

Fig. 1B

【図 2 A】

Fig. 2A

【図 1 C】

Fig. 1C

【図 2 D】

Fig. 2D

【図 2 B】

Fig. 2B

【図 2 C】

Fig. 2C

【図 3 A】

Fig. 3A

【図 3 B】

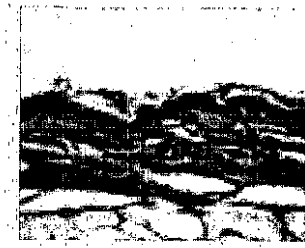
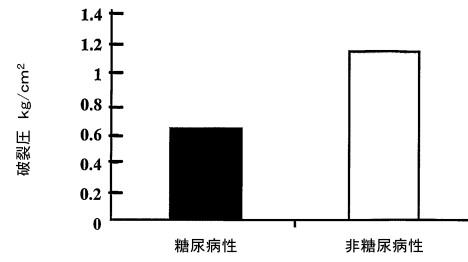


Fig. 3B

【図 5】



【図 6 A】

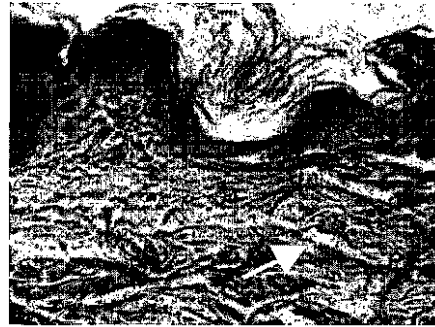
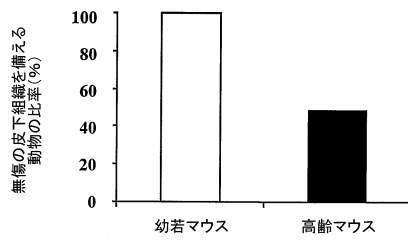


Fig. 6A

【図 4】



【図 6 B】



Fig. 6B

【図 6 C】

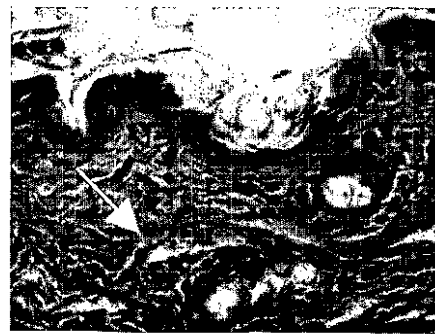


Fig. 6C

【図 7 A】



Fig. 7A

【図 7 C】



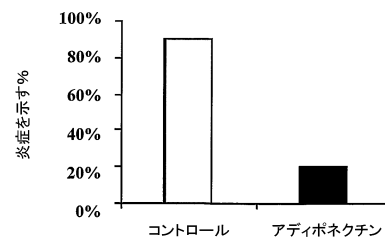
Fig. 7C

【図 7 B】

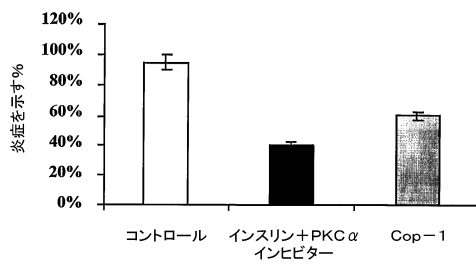


Fig. 7B

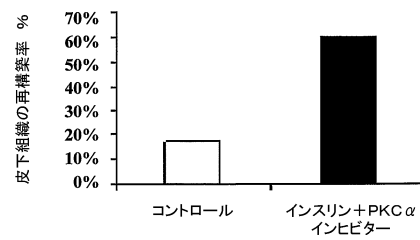
【図 8】



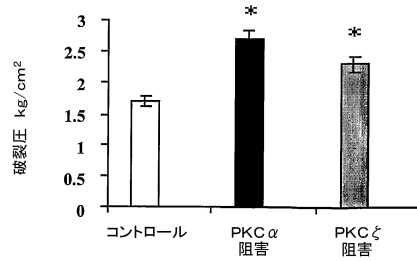
【図 9】



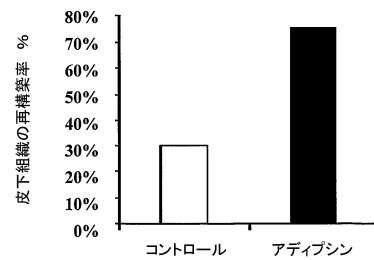
【図 11 A】



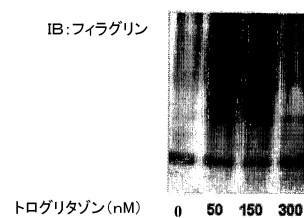
【図 10】



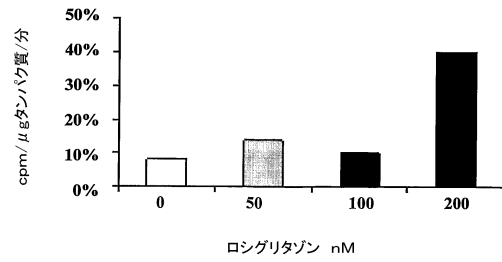
【図 11 B】



【図 12】



【図 13】



【図 14】



【図 15】

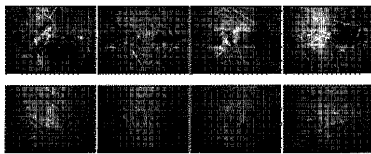


Fig. 15

【図 16 A】

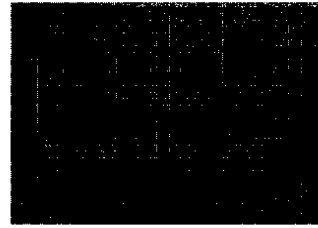


Fig. 16A

【図 16 B】

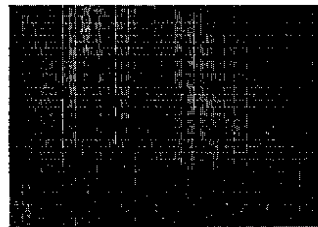
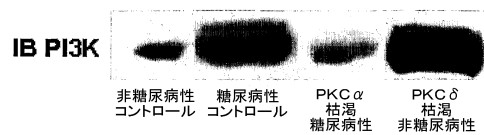
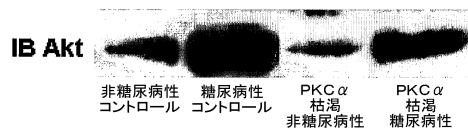


Fig. 16B

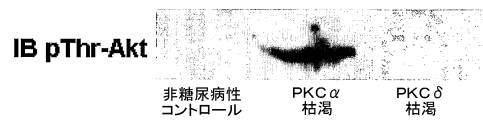
【図 17】



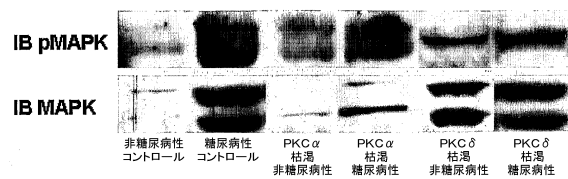
【図 18 A】



【図 18 B】



【図 19】



【図 20 A】

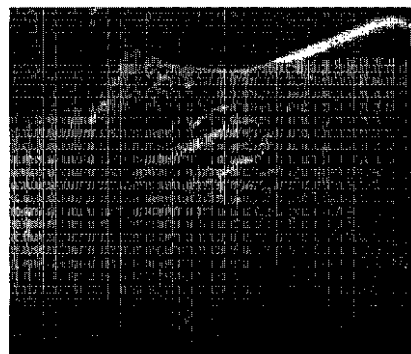


Fig. 20A

【図 20 B】



Fig. 20B

【図 2 1 A】



Fig. 21A

【図 2 1 B】

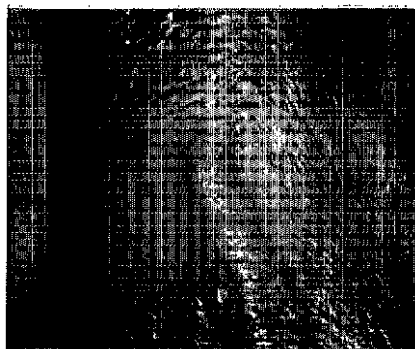


Fig. 21B

【図 2 2 A】

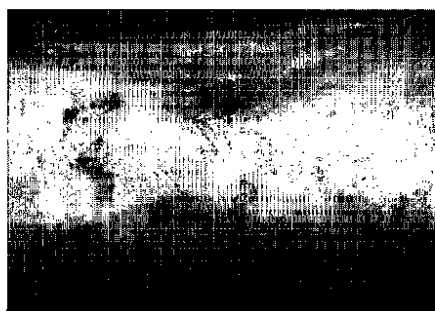


Fig. 22A

【図 2 2 B】

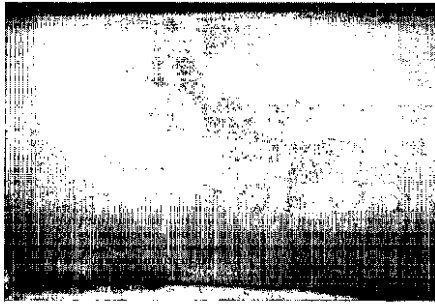


Fig. 22B

【配列表】

0005688496000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	17/18	(2006.01)	A 6 1 P	17/18	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 Q	19/08	(2006.01)	A 6 1 Q	19/08	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	Z N A
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	7/08	
C 0 7 K	14/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/00	
C 0 7 K	14/62	(2006.01)	C 0 7 K	14/62	

- (72)発明者 ブライマン - ウィクスマン, リオラ
 イスラエル 7 5 4 0 0 リション・レズィオン スティーヴン・ワイス・ストリート 2 4
- (72)発明者 ソロモニック, イネッサ
 イスラエル 5 5 9 0 0 ガネイ・ティクヴァ ハミズペ・ストリート 3
- (72)発明者 マイアー, ミカル
 イスラエル 6 9 0 2 5 テル・アヴィヴ イェフダ・カルニ・ストリート 1 9

合議体

審判長 田村 明照

審判官 齋藤 恵

審判官 内藤 伸一

- (56)参考文献 国際公開第2005/007072 (WO, A2)
 国際公開第02/09639 (WO, A2)
 国際公開第2005/013885 (WO, A2)
 The Journal of Investigative Dermatology, 20
 04年, Vol. 122, No. 3, A49, 290

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K8

A61K37