

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月9日(09.01.2025)



(10) 国際公開番号
WO 2025/009296 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61P 17/16* (2006.01)
A61K 31/121 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01) *C12N 9/99* (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
A61K 31/423 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61K 31/60 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/020054

(22) 国際出願日: 2024年5月31日(31.05.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-109275 2023年7月3日(03.07.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1番1号 Hyogo (JP).

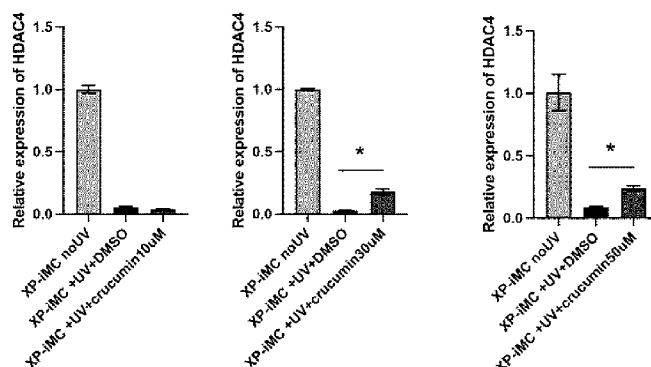
(72) 発明者: 福本 毅 (FUKUMOTO, Takeshi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 錦織 千佳子(NISHIGORI, Chikako); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 青井 貴之(AOI, Takashi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 青井 三千代(AOI, Michiyo); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 竹森 千尋(TAKEMORI, Chihiro); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目6番13号 御幸ビル307号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,

(54) Title: PROPHYLACTIC AND/OR THERAPEUTIC AGENT FOR SKIN DISORDER ASSOCIATED WITH HISTONE DEACETYLASE 4 ABNORMALITY

(54) 発明の名称: ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤



(57) Abstract: The present invention provides a prophylactic and/or therapeutic agent for a skin disorder associated with a histone deacetylase 4 abnormality. This prophylactic and/or therapeutic agent for a skin disorder associated with a histone deacetylase 4 abnormality contains a histone acetyltransferase inhibitor as an active ingredient. This prophylactic and/or therapeutic agent makes it possible to prevent and/or treat a skin disorder associated with a histone deacetylase 4 abnormality.

(57) 要約: ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤を提供する。ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤を有効成分として含む、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤による。前記予防及び／又は治療剤によれば、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療を行うことができる。

HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤
技術分野

[0001] 本発明は、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願2023-109275号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 色素細胞（メラノサイト）は、発生過程において神経堤に由来し、メラニンを産生する細胞である。メラノサイトは、皮膚においては主に表皮の基底層に存在し、周囲ケラチノサイトにメラニンを供給する。メラノサイトは、メラニン産生により紫外線からの防御を担うが、メラノサイトも紫外線によってDNA損傷を生じる。

[0004] 色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum：以下、単に「（XP）」ともいう。）では、症状が最も強く発現する標的臓器は皮膚であり、特に色素異常が必発であることから、患者のメラノサイトの紫外線応答を解析することが、XP病態解明において最重要である。XPは、常染色体潜性形式で遺伝する遺伝性光線過敏性疾患であり、重度の光線過敏と神経症状を来す遺伝性DNA修復異常症である。XP患者皮膚は紫外線によって引き起こされるDNA損傷を修復する能力を先天性に欠損するため、日光や紫外線に対する重度の光線過敏（異常な日焼け、色素異常、露光部の皮膚がん等）が病型によって様々な程度に起こる。このため、全生活空間に遮光環境を作る必要があり、XP患者及びその家族のQOLは著しく低下する。適切な遮光を怠れば重篤な光線過敏症状、雀卵斑様の色素異常が進行し、若年齢にもかかわらず高頻度に皮膚がんが発症する。さらに、半数以上のXP患者では原因不明の進行性の脳・神経変性症状を伴い、この重症度が患者予後に影響する。これより、XPの病態の解明と治療薬

の確立が強く望まれており、治療薬の確立は、世界中のXP患者の為に急務である。

[0005] XPは、遺伝的に異なるA～G群（遺伝的相補性群）とバリエーション（V）型の8つの病型に分類される。日本のXPでは皮膚症状、神経症状ともに最重症型であるA群（xeroderma pigmentosum group A : XP-A）が約55%を占め、皮膚症状のみのV型が約25%といわれている。日本人に多いXP-A患者では光線過敏症状が重く、生直後から激しい日焼け症状が現れ、低紫外線量でも著明に促進された光老化が見られ、すなわち重度の日焼け反応、大きさも色調も様々なそばかす様色素斑、若年での露光部の皮膚がん等の皮膚症状がみられるが、XP-Aの病態は未だ解明されていない。またXP-A患者では聴力低下、言葉が不明瞭になる、体のバランスが取れなくなる、といった神経症状も6歳ころから顕在化し、10歳を過ぎたころから次第に転びやすい等の神経症状が出始め、聴力低下や知的障害の進行とともに言語機能も低下する。

[0006] XPでは、症状が最も強く発現する標的臓器は皮膚であり、特に色素異常が必発であることから、メラノサイトでの研究が病態解明を進めていくうえで重要である。しかしながら、XP患者皮膚組織からメラノサイトの単離培養が困難であるため、線維芽細胞（ファibroblast）を用いて解析が行われてきた（非特許文献1、2）。一方、メラノサイトとファibroblastでは、紫外線に対する耐性やDNA損傷に対する反応が異なるため、XPにおいてメラノサイトを用いて研究することが重要である（非特許文献3～5）。しかしながら、メラノサイトが関与する露光部で色素斑と脱色素斑が入り混じるXPの早発する光老化の病態を、XP患者由来のメラノサイトを用いて解析した報告はこれまでにない。そこで、本発明者らは、多能性幹細胞から色素幹細胞を作製し、及び当該色素幹細胞からメラノサイトを樹立する方法を見出した（特許文献1、非特許文献6）。

[0007] エピジェネティクスを担う代表的な分子機構としてヒストン修飾が挙げられる。ヒストン修飾には、ヒストンアセチル基転移酵素（histone acetyltransferase : HAT）と、ヒストン脱アセチル化酵素（Histone Deacetylase : HDA

C) が関与している。HATはヒストンのリジン残基をアセチル化することにより、遺伝子発現を増加させる役割を担っている。一方、HDACはヒストンの脱アセチル化することにより、遺伝子発現を抑制させる役割を担っている。このようにHATとHDACは、遺伝子の転写制御において重要な役割を果たしており、ヒストンのアセチル化修飾は、HATとHDACの拮抗した作用により調節されている。

[0008] ヒトのHDACには18種類あり、classIからclassIVまでの4つのクラスに分類され、それぞれに特徴がある。classIとclassIIのHDACは亜鉛を酵素活性部位に持つ加水分解酵素であり、細胞内局在としては、classIは核に、classIIは核と細胞質に局在するという特徴がある。HDAC4は、classIIに属する。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特許第6624916号公報

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Bowden et al. Int. J. Mol. Sci. 2015, 15985–15996

非特許文献2：Herman et al. Environ Mol Mutagen. 2014 June; 55(5): 375–384

非特許文献3：Fukumoto et al. Genes Cells. 2016, Feb; 21(2): 185–99

非特許文献4：Cho-TH et al. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2008 Jun; 24(3): 110–4.

非特許文献5：Emri G et al. J Invest Dermatol. 2000 Sep; 115(3): 435–40

非特許文献6：Hosaka et al. Pigment Cell & Melanoma Research, 2019, 32(5): 623–633

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、ヒストン脱アセチル化酵素4 (Histone Deacetylase 4: HDAC4) 異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤が、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療に有効であることを見出し、本発明を完成した。

[0013] すなわち本発明は、以下よりなる。

1. ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤を有効成分として含む、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
2. 皮膚障害が、光曝露によって生じるメラノサイトにおけるヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害である、前項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
3. 皮膚障害が、光老化による皮膚障害である、前項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
4. 皮膚障害が、色素性乾皮症による皮膚障害である、前項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
5. ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤が、ヒストン脱アセチル化酵素4の発現異常を改善する作用を有する、前項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
6. ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤が、クルクミン、C-646、A-485、アナカルジン酸、ブチロラクトン、CTPB及びガルシノールからなる群から選択される1種又は複数種である、前項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
7. メラノサイトの培養系に候補物質を添加し、前記メラノサイトの細胞傷害を改善する物質を選別することを特徴とする皮膚障害の予防及び／又は治療剤のスクリーニング方法。
8. メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子を検出することにより得られる、前項7に記載のスクリーニング方法。
9. メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、メラノサイトの生存率を評価することにより得られる、前項7に記載のスクリーニング方法。

10. メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、メラノサイトの細胞遊走能を評価することにより得られる、前項7に記載のスクリーニング方法。

11. メラノサイトが多能性幹細胞由来のメラノサイトである、前項7に記載のスクリーニング方法。

12. 多能性幹細胞由来のメラノサイトが、色素性乾皮症の患者由来の多能性幹細胞から作製された多能性幹細胞由来のメラノサイトである、前項11に記載のスクリーニング方法。

13. メラノサイトの細胞傷害が、光曝露による細胞傷害である前項7に記載のスクリーニング方法。

14. 光曝露による細胞傷害が、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害である、前項13に記載のスクリーニング方法。

15. 被検者から採取した皮膚について、ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子の異常を検出する工程を含む、皮膚障害の検査方法。

16. 細胞老化随伴分泌現象因子が、MMP-1、MMP-3、TNF α 及びIL-6から選択される、1種又は複数種である、前項15に記載の皮膚障害の検査方法。

17. ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子異常の検出が、以下の1)又は2)を用いて行われる、前項15に記載の皮膚障害の検査方法；

1) ヒストン脱アセチル化酵素4遺伝子及び／若しくは細胞老化随伴分泌現象因子遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブ又は核酸プライマー；

2) ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子を特異的に認識する抗体。

18. ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子の異常を検出し得る物質を含む、皮膚障害検査用キット。

発明の効果

[0014] 本発明のヒストンアセチル基転移酵素阻害剤を有効成分として含む、ヒス

トン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療を行うことができる。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]ヒト皮膚由来の正常線維芽細胞由来iPS細胞から分化させたメラノサイト（HC-iMC）及びXP-A患者由来の線維芽細胞由来iPS細胞から分化させたメラノサイト（XP-A-iMC）を示す。（参考例1）
- [図2]各々のメラノサイトにおいて、MCマーカであるSOX10、MITF、TYRの発現を示す。（参考例1）
- [図3]図3Aは、XP-A-iMC及びHC-iMCにおいて、ゲノミックシーケンスによる変異を示す。図3Bは、XP-A-iMCがXPAタンパク質を発現していないことを示す。（実施例1）
- [図4]XP-A-iMCがXP-Aの性質を有していることを示す。図4Aは、Flow cytometry-basedNER 法における結果を示す。図4BはMTT法における結果を示す。（実施例2）
- [図5]図5AはXP-A-iMCとHC-iMCへの紫外線照射のプロトコールを示す。図5Bは紫外線によって影響を受けるXP-A-iMCとHC-iMCの遺伝子における違いを示す。図5CはXP-A-iMC及びHC-iMCに高線量UV-Bを照射した後に上昇又は低下するプローブを示す。（実施例3）
- [図6]XP-A-iMCの紫外線に対する細胞応答に関連する分子機構を解明するためのG0解析の結果を示す。（実施例3）
- [図7]紫外線照射後のXP-A-iMCのHDAC4発現の変化を示す。（実施例4）
- [図8]紫外線照射後のXP-A-iMCのHDAC4発現結果を示す。（実施例4）
- [図9]紫外線照射後のXP-A-iMCにおいて、scrachアッセイによる位相差顕微鏡の結果を示す。（実施例5）
- [図10]紫外線照射後のXP-A-iMCにおいて、scrachアッセイによる細胞遊走能の結果を示す。（実施例5）
- [図11]紫外線照射後のXP-A-iMCにおいて、Digitalholographicmicroscopyに

よる細胞遊走の観察方法を示す。（実施例5）

[図12]紫外線照射後のXP-A-iMCにおいて、Digitalholographicmicroscopyにより測定した細胞が遊走した距離を示す。（実施例5）

[図13]紫外線照射後のXP-A-iMCにおいて、Digitalholographicmicroscopyにより測定した細胞遊走のスピードを示す。（実施例5）

[図14]紫外線照射後のXP-A-iMCの細胞老化の検討結果を示す。（実施例6）

[図15]紫外線照射後のXP-A-iMCにおいてPCR法によるSASP因子群の発現結果を示す。（実施例6）

[図16]紫外線を照射後のXP-A-iMCにおいてウエスタンブロッティング法によるSASP因子群の発現結果を示す。（実施例6）

[図17]紫外線照射後のNHEMのHDAC4発現結果を示す。（実施例7）

[図18]紫外線を照射後のXP-A-iMCにおいてクルクミンの効果を示す。（実施例8）

[図19]紫外線を照射後のXP-A-iMCにおいてC-646の効果を示す。（実施例9）

発明を実施するための形態

[0016] 本発明は、ヒストンアセチル基転移酵素（HAT）阻害剤を有効成分として含む、ヒストン脱アセチル化酵素4（HDAC4）異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤に関する。

[0017] 本発明者らは、メラノサイトにおける光曝露に対する反応を探索し、皮膚障害に関する治療標的シーズとなり得る分子を網羅的に解析し、メラノサイトをエピジェネティックに制御する遺伝子としてHDAC4を特定した。さらに、光曝露後のメラノサイトにおいて、免疫蛍光抗体法を用いて細胞老化が起きていることを明らかにした。さらに、細胞老化を起こしたメラノサイトは、細胞老化随伴分泌現象（Senescence-Associated Secretory Phenotype : SASP）因子群に影響を及ぼすと考えられ、実際に多数のSASP因子群の発現上昇を確認した。即ち、光曝露によって皮膚におけるHDAC4の発現が低下し、相対的にヒストンのアセチル化が起きることから、これに伴いSASP関連遺伝子の発現が上昇することにより、様々な皮膚障害が生じると考えられる。

[0018] そこで、本発明者らは、HDAC4発現異常を改善することにより、皮膚障害を予防及び／又は治療に適用し得る可能性を初めて見出した。本明細書において、細胞老化随伴分泌現象（SASP）因子とは、例えばMMP-1、MMP-3、TNF α 、IL-6等が挙げられる。

[0019] 本明細書において、「HDAC4異常」とは、ヒストン脱アセチル化酵素4（HDAC4）の量的異常のこといい、特に光曝露前に比べ、光曝露後にHDAC4発現が低下することをいう。「発現」とは遺伝子レベルであってもよいし、タンパク質レベルであってもよい。本発明の予防及び／又は治療剤は、HDAC4の発現異常を改善する作用を有することを特徴とする。

[0020] 本明細書において「皮膚障害」とは、HDAC4異常に伴う皮膚障害が特に適用され、例えば、光曝露によって生じるメラノサイトにおけるHDAC4異常に伴う皮膚障害、光老化による皮膚障害、色素性乾皮症による皮膚障害等が挙げられる。ここで、「光老化」とは光曝露が繰り返された結果として認められる皮膚の外見及び機能の変化を意味し、広く光曝露によって起こり得る皮膚障害等が含まれる。具体的な皮膚障害としては、XP患者皮膚に起こり得る皮膚障害に限定されず、XP患者でない者が光曝露によって起こり得る皮膚障害も含まれる。例えば皮膚障害は、色素斑と脱色素斑が混在する色素病変、皮膚の乾燥や萎縮、皮膚の弾力性の低下、しわ・たるみの形成、若年齢から発生する皮膚がん、そばかすの形成、色素沈着、皮膚の黒化、黄ばみの増加、皮膚バリア機能の低下、角層機能の低下等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0021] 本明細書において「色素性乾皮症（XP）」とは、背景技術の欄でも説明したごとく、常染色体潜性形式で遺伝する遺伝性光線過敏性疾患である。本明細書において、XPは遺伝的に異なるA～G群（遺伝的相補性群）とバリエーション（V）型の8病型すべてを含む概念で使用される。特に好適には皮膚症状、神経症状ともに最重症型であるA群（XP-A）に適用される。XPは、特に色素異常が必発であることからメラノサイトでの研究が病態解明を進めていくうえで重要である。

[0022] 本明細書において、「光曝露」とは、日常生活における通常の光曝露又はこれを超える光曝露（例えば、日焼け）に限定されず、XP患者にとって皮膚障害が起こり得るわずかな光曝露も含まれる。本明細書において「光」とは、紫外線が含まれる「光」であれば特に限定されないが、例えば日光、紫外線（例えばUV-B、UV-C、UV-A）、照明光等が挙げられ、特に日光、紫外線という。光の波長としては、特に限定されないが、例えば0～3000 nm、好ましくは10～400 nm、より好ましくは200～380nm、特に好ましくは280～315 nmである。線量としては、特に限定されないが、例えば10 J/m²～500 J/m²、好ましくは30～200 J/m²、より好ましくは150 J/m²である。

[0023] 本明細書において、「HAT阻害剤」とは文言通りヒストンアセチル基転移酵素（HAT）の酵素活性を阻害又は抑制する物質をいう。HATの酵素活性を阻害又は抑制することで相対的にHDAC4とHATの均衡が得られ、HDAC4の異常が改善されるものである。HAT阻害剤は、例えばクルクミン、C-646、A-485、アナカルジン酸、ブチロラクトン、CTPB及びガルシノールからなる群から選択される1種又は複数種等が挙げられる。本発明の予防及び／又は治療剤は、HAT阻害剤を有効成分として含有する。本明細書において、有効成分として含有するHAT阻害剤としては、クルクミン、C-646、A-485、アナカルジン酸、ブチロラクトン、CTPB及びガルシノール等の化合物の他、当該化合物の誘導体や、当該化合物若しくは当該化合物の誘導体の薬学的に許容される塩であってもよいし、水和物でもよい。特にクルクミン、C-646、A-485が好適である。クルクミン（UPAC名：(1E, 6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione）は、主にウコンに高含有され、カルダモン、クローブ、クミン、胡椒、コリアンダー、パプリカ、メース等にも含まれる脂溶性のポリフェノールである。クルクミンの医学的利用の可能性として、抗腫瘍作用、抗酸化作用、抗アミロイド作用、抗炎症作用等が知られており、近年盛んに研究されている。

[0024] 本発明の予防及び／又は治療剤は、医薬組成物として使用される。医薬組成物とは、医学的用途における投与に適した組成物を意味し、有効成分とし

てのHAT阻害剤の他1種又は複数種の製薬学的に許容される担体及び／又は製薬学的に許容される賦形剤を含んでいてもよい。本発明の予防及び／又は治療剤としての医薬組成物は、当分野において通常用いられている薬剤用担体、賦形剤等を用いて通常使用されている方法によって調製することができる。投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、又は、関節内、静脈内、筋肉内等の注射剤、坐剤、点眼剤、眼軟膏、経皮用液剤、軟膏剤、経皮用貼付剤、経粘膜液剤、経粘膜貼付剤、吸入剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤、徐放剤等が用いられる。このような固体組成物においては、1種又は2種以上の有効成分を、少なくとも1種の製薬学的に許容される担体及び／又は製薬学的に許容される賦形剤と混合される。

[0025] 本明細書の製薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機又は無機担体物質が挙げられ、例えば固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤及び崩壊剤、又は液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤及び緩衝剤等が挙げられる。更に必要に応じ、通常防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

[0026] 本明細書の製薬学的に許容される賦形剤としては、例えば等張化剤、増量剤、防腐・殺菌剤、結合剤、酸化防止剤、溶解剤、溶解補助剤、懸濁化剤、充填剤、pH調節剤、安定化剤、吸収促進剤、放出速度制御剤、着色剤、可塑剤、粘着剤等が挙げられる。具体的には、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

[0027] 滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。結合剤としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン

、デンプン、ショ糖、ゼラチン、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等が挙げられる。

[0028] 崩壊剤としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、レーヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

[0029] 溶剤としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。

[0030] 溶解補助剤としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

[0031] 懸濁化剤としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。

[0032] 等張化剤としては、例えばブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。

[0033] 緩衝剤としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。

[0034] 防腐剤としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。

[0035] 抗酸化剤としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸、 α -トコフェロール等が挙げられる。

[0036] 有効成分としてのHAT阻害剤の投与量は、投与対象、投与ルート、症状、体

重、年齢等によっても異なり、適宜選択することができる。有効成分としてのHAT阻害剤は、適宜他の薬剤とともに併用して投与してもよい。

[0037] 本発明は皮膚障害の予防及び／又は治療剤のスクリーニング方法にも及ぶ。スクリーニング方法としては、メラノサイトの培養系に候補物質を添加し、前記メラノサイトの細胞傷害を改善する物質を選別することを特徴とすることができる。

[0038] 「メラノサイト」（色素細胞やメラニン細胞とも呼ばれる。）とは、チロシナーゼ活性があり、メラニンを産生する細胞であって、メラニン合成のための細胞内小器官（メラノソーム）を有する、形態学的には樹枝状の細胞でその樹状突起の形状は環境によって変化する細胞を意味する。

[0039] メラノサイトは、例えば多能性幹細胞から作製することができる。多能性幹細胞細胞として、例えば人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性腫瘍細胞（EC細胞）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）等が挙げられるが、iPS細胞が好ましい。多能性幹細胞からメラノサイトへの分化誘導方法は、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。具体的には実施例に記載の方法や特許6624916号に記載の方法を適用することができる。多能性幹細胞は、既に樹立されたiPS細胞を用いてもよいし、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法により作製することもでき、具体的には例えば実施例に記載の方法、Cell, 131(5): 861-872 (2007)、Cell, 126(4):663-676(2006)、非特許文献6に記載の方法等が挙げられる。多能性幹細胞は、例えばXP患者由来の細胞から作製することができる。XP患者由来の多能性幹細胞の作製方法は、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法を適用することができる。具体的には、実施例に記載の方法や特開2021-17405号に記載の方法を適用することができる。培養する環境は、自体公知の環境であればよく、特に制限されるものではないが、一般的には細胞を37±1℃、5±1%CO₂条件下で培養することができる。

[0040] 本明細書において、「メラノサイトの細胞傷害」は、例えば光曝露による細胞傷害であることが好適である。メラノサイトはメラニン産生により、光

からの防御を担うが、メラノサイト自身も紫外線によってDNA損傷が生じ、DNAのアセチル化を制御する遺伝子HDAC4の発現異常が起こる。「光曝露による細胞傷害」は、HDAC4異常に伴う皮膚障害が好適である。本発明のスクリーニング方法において、メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法により選別することができる。例えば、HDAC4及び／又はSASP因子の検出、メラノサイトの生存率の評価、又はメラノサイトの細胞遊走能の評価等の方法により、メラノサイトの細胞傷害を改善する物質を選別することができる。これらの選別方法は、光曝露の有無によって比較することによりメラノサイトの細胞傷害を改善する物質を選別することができる。本発明のスクリーニング方法に供される候補物質としては、高分子化合物であってもよいし低分子化合物であってもよい。高分子化合物の例としては、特に限定されないが、例えばタンパク質、核酸物質が挙げられ、具体的には抗体、抗体断片、ペプチド、例えばsiRNA又はshRNA等が挙げられる。低分子化合物の例としては、特に限定されない。また、低分子化合物と高分子化合物を含む物質であってもよい。

[0041] 本発明は、被検者から採取した皮膚について、HDAC4及び／又はSASP因子の異常を検出する工程を含む、皮膚障害の検査方法にも及ぶ。

[0042] HDAC4及び／又はSASP因子の異常を検出する工程は、HDAC4及び／又はSASP因子の異常を検出可能な方法で検出する工程であれば特に限定されない。例えば、被検者の皮膚からRNA（例：全RNA、mRNA）画分を調製し、該画分中に含まれるHDAC4遺伝子及び／又はSASP因子遺伝子の転写産物を検出する工程、HDAC4及び／又はSASP因子を特異的に認識する抗体を用いた免疫学的手法により検出する工程、質量分析法により検出する工程等が挙げられる。具体的には、本発明の検査方法においてHDAC4及び／又はSASP因子の異常の検出は、以下の1)又は2)を用いて行うことができる。

1) HDAC4遺伝子及び／若しくはSASP因子遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブ又は核酸プライマー、

2) HDAC4及び／又はSASP因子を特異的に認識し得る抗体。

[0043] RNA画分の調製は、グアニジン—CsCl超遠心法、AGPC法等公知の手法を用いて行うことができるが、市販のRNA抽出用キット（例：RNeasy Mini Kit；QIAGEN製等）を用いて、微量検体から迅速且つ簡便に高純度の全RNAを調製することができる。RNA画分中のHDAC4遺伝子及び／又はSASP因子遺伝子の転写産物を検出する方法としては、例えば、PCR（RT—PCR、競合PCR、リアルタイムPCR等）、ハイブリダイゼーション（ノーザンブロット、ドットブロット、DNAチップ解析等）を用いる方法等が挙げられる。免疫学的手法として、例えばウエスタンブロッティング法、ELISA、FIA、RIA等が挙げられる。本明細書において、抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）等の天然型抗体、遺伝子組換え技術を用いて製造され得るキメラ抗体、ヒト化抗体や一本鎖抗体、及びこれらの結合性断片が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はこれらの結合性断片である。結合性断片とは、特異的結合活性を有する前述の抗体の一部分の領域を意味し、具体的には例えばF（ab'）₂、Fab'、Fab、Fv、sFv、dsFv、sdAb等が挙げられる（Exp.Opin.Ther. Patents, Vol.6, No.5, p.441-456, 1996）。抗体のクラスは、特に限定されず、IgG、IgM、IgA、IgDあるいはIgE等のいずれのアイソタイプを有する抗体をも包含する。好ましくは、IgG又はIgMであり、精製の容易性等を考慮するとより好ましくはIgGである。また、本発明においては、HDAC4及び／又はSASP因子を特異的に認識する抗体として、市販の抗HDAC4抗体、抗SASP因子抗体、又は抗HDAC4抗体、抗SASP因子抗体を含むキットを使用することも好ましい。

[0044] 本発明の検査方法において、被検者においてHDAC4が、対照に比べて低値で検出された場合又はSASP因子が対照に比べて高値で検出された場合には、上記のような皮膚障害の可能性が高いと判断することができる。従って、本発明の検査方法は、上記1）、2）の工程に加えて、3）被検者においてHDAC4が対照に比べて低値で検出又はSASP因子が対照に比べて高値で検出された場合には、皮膚障害である又はその可能性が高いと判断する工程を含んでもよい。

[0045] 本発明の検査方法において、「被検者」とは皮膚障害か不明の者、皮膚障害と疑われる者等のほか、XPに罹患しているか不明の者、XPと疑われる者等が含まれる。

[0046] 本発明は、さらにHDAC4及び／又はSASP因子の異常を検出し得る物質を含む、皮膚障害検査用キットにも及ぶ。HDAC4及び／又はSASP因子の異常を検出し得る物質として、例えばHDAC4遺伝子及び／若しくはSASP因子遺伝子の転写因子を特異的に検出し得る核酸プローブ又は核酸プライマー、HDAC4及び／又はSASP因子を特異的に認識し得る抗体等が挙げられる。本明細書において、「プライマー又はプローブ等」は、その機能が著しく損なわない限りにおいて、修飾することもできる。修飾としては、例えば標識物、蛍光色素、酵素、タンパク質、放射性同位体、化学発光物質、ビオチン等が挙げられる。プライマー又はプローブ等は、任意の固相に固定化して使用することもできる。本明細書において、「固相」は、ポリヌクレオチドを固定化できるものであれば特に限定されず、例えばガラス板、ナイロンメンブレン、マイクロビーズ、シリコンチップ、キャピラリー又はその他の基板等が挙げられる。本発明のキットは、さらに反応緩衝液、dNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ、competitor核酸、蛍光試薬、competitor抗体、標識された二次抗体、ブロッキング液等を含んでもよい。

実施例

[0047] 本発明の理解を助けるために、以下に参考例及び実施例を示して具体的に本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものでないことはいうまでもない。なお、「参考例」では本発明の完成に至る実験内容を示す。

[0048] (参考例1) iPS由来のメラノサイトの作製

本参考例では、XP疾患特異的色素幹細胞を作製した後、メラノサイト(MC)へ分化させ、iPS由来のメラノサイトを作製した。

[0049] (XP疾患特異的色素幹細胞の作製)

ヒトiPS細胞株の樹立には、ヒト皮膚由来の正常線維芽細胞(TIG-120細胞; JCRB0542)及びXP-A患者由来の線維芽細胞(XP30S)を使用した。XP30S細

胞 (JCRB0303) は、XPAの日本人創始者変異 (c.390-1G>C : g.15148G>C) を持つことが知られている細胞である。これらの細胞株は、JCRB生物資源バンク (日本) から入手し、ダルベッコ改変イーグル培地Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ナカライ) に、10%ウシ胎児血清及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン (LifeTechnologies) を加えた培地で培養した。ヒトiPS細胞株は、これらの2つの線維芽細胞株から、CytoTune-iPS 2.0SendaiReprogramming Kit (ID Pharma Co., Ltd.) を用いて確立した (非特許文献6)。その後、ヒトiPS細胞を非接着培養皿上に播種し (50~200細胞/ml)、霊長類ES/iPS細胞用培地中で2週間培養することで、胚様体を形成させた。その後胚様体をフィブロネクチンでコートした接着培養皿上に播種し、3 μ M CHIR99021 (Stemgent)、50 ng/ml SCF (R&D)、100 nM ET-3 (American Peptide Company)、500 μ M dbcAMP (Sigma)、50nMTPA(12-テトラデカノイルホルボー ル 13-アセタート (Sigma)、4ng/ml bFGF (Wako)、100 μ M L-アスコルビン酸 (Sigma)、0.05 μ M デキサメタゾン (Sigma)、1 mg/ml リノール酸-ウシ血清 (Sigma)、及び1Xインスリン-トランスフェリン-亜セレン酸ナトリウム (Sigma) を加えたメラノサイト維持培地 (Medium 254培地 (Invitrogen) にHumanMelanocyte GrowthSupplement (HMGS) (Invitrogen) を添加した培地) で培養し、メラノサイトへの分化を誘導した。この間、2~3日に一度培地を交換した。分化誘導をしてから14日後に、紡錘形で黒褐色の顆粒を含有する細胞が顕微鏡観察により認められたため分化誘導を中止し、分化誘導因子を含んでいないメラノサイト維持培地に切り替えて細胞を培養した。分化誘導を中止してから7日後に、培地中に色素幹細胞が認められた。

[0050] (XP疾患特異的メラノサイトへの分化誘導)

上述した色素幹細胞は、2日ごとに3 μ M CHIR99021を添加した後、約1週間後にMCに分化した。以下、XP-A患者由来の線維芽細胞由来iPS細胞からメラノサイトへ分化させた細胞をXP-A-iMC、ヒト皮膚由来の正常繊維芽細胞由来iPS細胞からメラノサイトへ分化させた細胞をHC-iMCとする。

[0051] XP-A-iMC及びHC-iMCを位相差顕微鏡にて観察した。この結果、正常ヒト表

皮メラノサイト（NHEM）と同様に、XP-A-iMC及びHC-iMCにおいて、樹状突起をもつ細長い紡錘形状の形態を有していた（図1）。目視による細胞形態の観察に加えて、より正確を期すために、遠心分離によるペレットの観察と免疫組織化学染色を行った。遠心分離によるペレットは、目視で黒色調であったためMCへ分化していることが示された。免疫組織化学染色において、MCマーカーであるSOX10、MITF、TYRの発現によってMCの性質を持つ事を確認した（図2）。

[0052] （実施例1）ゲノミックシーケンスによる変異の確認

本実施例では、XP-A-iMCが正しく日本人創始者変異（c.390-1G>C : g.15148G>C）を有しているかの確認を行った。

[0053] ゲノムDNAは、Gentra PuregeneCellKit(Qiagen, Hilden)を用いてXP-A-iMCから分離した。XPA遺伝子の日本人XP-A創始者変異g.15148G>Cの有無を確認するため（c.390-1 G>C）、この変異を含む領域を以下のPCRプライマーで増幅した。

5' -GCTGTGTGCCTAAGTT-3' （フォワード）（配列番号1）

5' -TGCAAACTAGGAAAAGTTT-3' （リバーズ）（配列番号2）

Ex-Taq（タカラバイオ）

[0054] PCR産物をアガロースゲルを用いて分解し、QIAquickGelExtraction Kit (Qiagen)を用いて精製し、AppliedBiosystems 3500Genetic Analyzer (AppliedBiosystems)を用いて同じフォワードプライマーで配列決定した（図3A）。さらにウエスタンブロッティング法によって、XP-A-iMCは、XPAタンパク質を発現していないことも確認した（図3B）。

[0055] （実施例2）XP-A-iMCがXPAの性質を有していることの確認

本実施例では、XPの性質としてDNA修復が障害されているため紫外線に脆弱である性質を有することを、Flow cytometry-based NER 法（Nakano et al, 2018, J Invest Dermatol, 138:467-47）及びMTT（増殖/生存）法で検討した。Flow cytometry-based NER 法は臨床診断でも用いられているDNA修復試験であり、UV-C照射後の(6-4)PPに対するモノクローナル抗体を用いてフローサイト

メトリーで解析することによる方法である。

[0056] (Flow cytometry-based NER 法)

Flow cytometry-based NER 法によりXP-A-iMC及びHC-iMCのDNA病変修復を評価した。具体的にはXP-A-iMC及びHC-iMCを10cmディッシュに播種し、翌日に30 J/m²のUV-Cを照射し、照射直後又は照射6時間後にXP-A-iMC及びHC-iMCを採取した。その後、(6-4) PPに対するマウス一次モノクローナル抗体 (1 : 1,000、Cosmo BioCo.,Ltd.) で22℃で1.5時間染色し、AlexaFluor 488抗体 (1 : 200、Thermo FisherScientific) を含むPBS-TBに22℃で1時間再懸濁し、さらに5 µg/mlヨード化プロピジウム (Thermo Fisher) を含むPBSに再懸濁し、XP-A-iMC及びHC-iMCを染色した。染色後、FACSVerseフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて分析した。すべてのデータは、FlowJoソフトウェア (BDLife Sciences) を用いて解析した。DNA病変の除去率は、平均蛍光強度に基づいて算出した。UVを照射していないXP-A-iMC及びHC-iMCの蛍光強度をバックグラウンドとし、UV照射直後の細胞の蛍光強度を100%とした。蛍光強度の減少は、6時間後に測定した。

[0057] (MTT法)

MTT法により細胞生存率を確認した。具体的には、CellProliferationKit I (MTT assay)(Roche)を用いて、製造元のプロトコールに従ってUV-B照射後24時間後のXP-A-iMC、HC-iMC及びNHEMを評価した。培地は、MTT試薬との反応直前にフェノールレッドフリー培地 (Lifeline CellTechnology) に交換した。そして、最終産物を96ウェルプレートに移し、Emax precision microplate reader (MolecularDevices) を用いて595nmと650nmの吸光度で測定した。細胞生存率は、UVを照射していないものとの相対値で表した。

[0058] Flow cytometry-based NER 法における結果を図4 Aに示す。図4 Aは、未照射、UV-C照射直後及びUV-C照射6時間後の(6-4) PP相対シグナル強度を示す代表的ヒストグラムを示す。HC-iMCとXP-A-iMCでは、UV-C照射後6時間以内に(6-4) PPがそれぞれ96.5%と6.1%修復されることが示された。同様の結果が、3回の独立した実験から得られた。

[0059] MTT法における結果を図4 Bに示す。照射後24時間の細胞生存率を、低線量 (10 J/m^2 , 20 J/m^2) 又は高線量 (100 J/m^2 , 200 J/m^2) でそれぞれ評価した (図4 B)。参考データとして、市販のNHEMの生存率も評価した (Gaddameedhi S et al 2010)。HC-iMCの生存率は、NHEMの生存率とほぼ同様であり、 200 J/m^2 ではベースライン時より有意に低下したが、 100 J/m^2 では低下しなかった。一方、XP-A-iMCでは $\geq 20 \text{ J/m}^2$ UV-B照射で有意に低下した。

[0060] (実施例3) XP-A-iMCを用いたXPの病態解明研究

本実施例では、XP-A-iMCの紫外線応答を解析し、メラノサイトにおける紫外線刺激に対する反応を網羅的に探索し、XPの病態形成に直接的に関与し治療標的シーズとなりうる分子 (創薬標的分子) の特定を検討した。

[0061] XP-A-iMCとHC-iMCを10cmディッシュに播種し、それぞれ低線量 (30 J/m^2) 又は高線量 (150 J/m^2) のUV-Bを照射した後、 37°C で4時間又は12時間インキュベート (図5 A) してから網羅的に転写プロファイル解析を行った。遺伝子転写プロファイリングは、GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)を用いて、製造元のプロトコールに従って実施した。データは、Robust Multichip Average (RMA) 法を使用してGeneSpring13.1.1software (Agilent Technologies, Inc.)を用いて解析した。UV-Bによって影響を受けるXP-A-iMCとHC-iMCの遺伝子における違いを明らかにした。

[0062] XP-A-iMCとHC-iMCの遺伝子発現量が大幅に変化した (10倍以上) プローブの数を図5 Bに示す。発現量が大幅に変化した (10倍以上) プローブの数を検討してみると、HC-iMCに低用量UV-Bを照射した場合、27のプローブ (アップレギュレート15、ダウンレギュレート12) の発現量が変化することが解った。しかし、照射前と比較して照射4時間後に10倍以上変化するが、照射12時間後には、ほぼすべての遺伝子が照射前のレベルに戻ることが判明した。一方、XP-A-iMCに低線量UV-Bを照射すると、72のプローブ (34のアップレギュレートと38のダウンレギュレート) の発現レベルが照射4時間後に大きく変化し、これはHC-iMCで観察されたよりもかなり多い数であった。

[0063] 次に、HC-iMCに高線量UV-B (150 J/m^2) を照射して4時間後に10倍以上発現

が上昇又は低下する26又は55のプローブをピックアップした。これらのプローブのHC-iMC及びXP-A-iMCにおける照射4又は12時間後の遺伝子発現量を図5Cに示す。HC-iMCでは、すべての発現量が12時間後には元のレベルに戻っていた。一方、XP-A-iMCでは、ほぼ全てのプローブの発現レベルが12時間後でも基底レベルに戻らず、アップレギュレーション又はダウンレギュレーションしたままであることが分かった（図5C）。遺伝子の発現レベルが、照射後12時間経過しても照射前のレベルに戻らないことが、XP-A-iMCの特徴であることが判明した。（図5C）

[0064] より詳細にXP-A-iMCのUV-Bに対する細胞応答に関連する分子機構を解明するためにG0解析（ $p < 0.05$ ）を実施した。高線量UV-B照射12時間後に、XP-A-iMCで特異的に発現が上昇した遺伝子（ $n=49$ ）の結果から、細胞増殖と細胞死の制御がXP-A-iMCの主要なG0用語カテゴリであり、プログラム細胞死の制御（ $p=0.004$ ）、アポトーシス過程の制御（ $p=0.004$ ）、細胞増殖の制御（ $p=0.004$ ）、刺激への応答（ $p=0.004$ ）と細胞死の制御（ $p=0.007$ ）であった。一方、132個の特異的に発現低下した遺伝子から示唆されたXP-A-iMCの主要G0用語カテゴリには、細胞分裂（ $p=3.15 \times 10^{-10}$ ）、分裂期細胞周期（ $p=3.88 \times 10^{-9}$ ）、染色体分離（ $p=8.64 \times 10^{-8}$ ）、分裂期細胞周期過程（ $p=3.12 \times 10^{-7}$ ）及び細胞周期過程（ $p=2.04 \times 10^{-6}$ ）が含まれていた（図6）。

[0065] （実施例4）Histone Deacetylase 4(HDAC4)の特定

本実施例では、XP-A-iMCで特異的に発現が低下した132の遺伝子プローブのうち、特徴的な挙動を強く示す遺伝子としてヒストン脱アセチル化酵素4（HDAC4）を特定した（図7）。HDAC4はヒストン修飾に重要な役割を果たし、細胞増殖、細胞周期進行、分化、発生に重要で、オートファジーやミトファジーにも関与していることが過去の報告で知られていて、XPで観察される病態を確かに説明することもでき、メラノサイトをエピジェネティックに制御する遺伝子である可能性が考えられる。HDAC4の挙動としては、UV-B照射4時間後にいずれのMCでも低下し、12時間後にNHEMとHC-iMCで回復したが、XP-A-iMCではHDAC4の発現が回復しない傾向があり、UV照射12時間後に減少し続け

た（図 7）。RT-PCR法とウエスタンブロッティング法を用いてXP-A-iMCのHDAC4の発現を、多角的に確認した（図 8 A、B）。

[0066] （実施例 5）XP-A-iMCの細胞遊走能における検討

本実施例では、紫外線照射後のXP-A-iMCの細胞遊走能を、scratchアッセイとDigital holographic microscopyを用いて検討した。

[0067] 移動能力が低下することを、scratchアッセイとDigitalholographicmicroscopyを用いた解析で明らかにした。具体的には、60 mmディッシュにXP-A-iMCとHC-iMCを播種し、コンフルエントになったところで、高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射した後、小さなスクレーパーで掻破して裂隙を作成した。その後裂隙が細胞遊走によって埋まる様子を、位相差顕微鏡で連日観察した（図 9）。scratchアッセイによる細胞遊走能の結果を図 10 に示す。HDAC4の減少したXP-A-iMCではHC-iMCに比べて、有意に細胞遊走が障害されていることが判明した。

[0068] デジタルホログラフィック顕微鏡でも細胞遊走を検証した（図 11）。高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射後のXP-A-iMCとHC-iMCの動きのイメージングとトラッキングには、HoloMonitor^(R) M4 microscope(Phase Holographic ImagingAB)を使用した。XP-A-iMCとHC-iMC（1×10⁴個）を6ウェルプレートに播種し、高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射後72時間の遊走をトラッキングした。図 12 は細胞が遊走した距離を示し、図 13 は細胞遊走のスピードを示す。UV-Bを照射後のHDAC4の低下したXP-A-iMCでは遊走能が低下していることが確認できた。これより、XP-A-iMCの表現型が、XP-A患者に特徴的な皮膚症状である色素沈着や色素脱失を引き起こす可能性が示唆された。また実施例 2 では、XP-A-iMCでは光照射により生存率が低下することが示されたことから、メラノサイトの培養系に候補物資を添加し、メラノサイトの生存率やメラノサイトの細胞遊走能を評価することにより、メラノサイトの細胞傷害を改善する物質が得られることが期待できる可能性もある。

[0069] （実施例 6）XP-A-iMCの細胞老化における検討

本実施例では、紫外線照射後のXP-A-iMCの細胞老化が起きているかを免疫

蛍光抗体法を用いて検討した。

[0070] 60 mmディッシュにXP-A-iMCとHC-iMCを播種し、約70%コンフルエントになったところで、高線量 (150 J/m²) のUV-Bを照射した後、24時間後にDNA損傷の指標であり、かつ細胞老化を評価する指標である γ H2AXの発現を検証した。XP-A-iMCではHC-iMCに比べ著明な γ H2AXの発現上昇を蛍光抗体法で確認し、細胞老化が促進していることが判明した (図14)。

[0071] さらに、細胞老化を起こしたメラノサイトは、炎症を惹起する細胞老化随伴分泌現象 (Senescence-Associated Secretory Phenotype; SASP) 因子群に変化があると考え、RT-PCR法を用いて、多数のSASP因子群の発現上昇を検証した。紫外線 (150 J/m²) を照射後に、HDAC4の発現が低下したXP-A-iMCでは、多数のSASP因子群の発現上昇を確認した (図15)。さらにウェスタンブロッティング法によりSASP因子群の発現を確認した (図16)。発現上昇したSASP因子群が慢性の炎症を引き起こすことは他のがん種では報告されているが、XP-A患者においては、発現上昇したSASP因子群が慢性の炎症を引き起こすことで、特徴的な光発がんの発生増加を含めた光老化の著明な促進である皮膚症状の原因であると考えられる。そこでHDAC4の低下を抑制することで、XPの皮膚症状を総合的に抑制できることが示唆された。一方、NHEMでも、著しい高線量 (500 J/m²) のUV-Bを照射した場合には、XP-A-iMCに紫外線 (150 J/m²) を照射した際と同様に、SASP因子群の発現上昇を認めた (図15)。

[0072] (実施例7) NHEMでのHDAC4の発現低下

本実施例ではNHEMにおけるHDAC4発現を確認した。NHEMを60mmディッシュに播種し、著しい高線量 (500 J/cm²) のUV-Bを照射した後、24時間後にRT-PCR法を用いてHDAC4の発現を確認した (図17)。紫外線照射によって著明にHDAC4の発現が低下するという病態は、紫外線量を著しく増加させた場合には健常者からのメラノサイトでも同様であることも確認でき、HDAC4の低下は、光老化で一般的に重要な可能性が示唆された。

[0073] (実施例8) クルクミンによるHDAC4発現改善作用

60 mmディッシュにXP-A-iMCを播種し、約70%コンフルエントになったとこ

ろで、高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射した後、クルクミンを細胞培地に加えて24時間培養した後に、RT-PCR法を用いてHDAC4の発現を確認した。対照にはクルクミンの溶媒であるジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射によって低下したHDAC4の発現が有意に回復していることを認めた（図18）。またその効果は、クルクミン濃度依存性であることも確認出来た。

[0074] （実施例9）C-646によるHDAC4発現改善作用

60 mmディッシュにXP-iMCを播種し、約70%コンフルエントになったところで、高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射した後、C-646を細胞培地に加えて24時間培養した後に、RT-PCR法を用いてHDAC4の発現を確認した（図19）。対照にはC-646の溶媒であるジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。高線量（150 J/m²）のUV-Bを照射によって低下したHDAC4の発現が有意に回復していることを認めた。

産業上の利用可能性

[0075] 本発明のヒストンアセチル基転移酵素阻害剤を有効成分として含む、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤によれば、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療を行うことができ、XP患者のみならず、例えば光老化による多く皮膚疾患に適用可能であり大変有用である。特にXP患者にとっては、効果的な治療方法が未確立であるため有用である。また、HDAC4とメラノサイトに着目した新規皮膚障害の予防及び／又は治療剤のスクリーニングをすることができる。

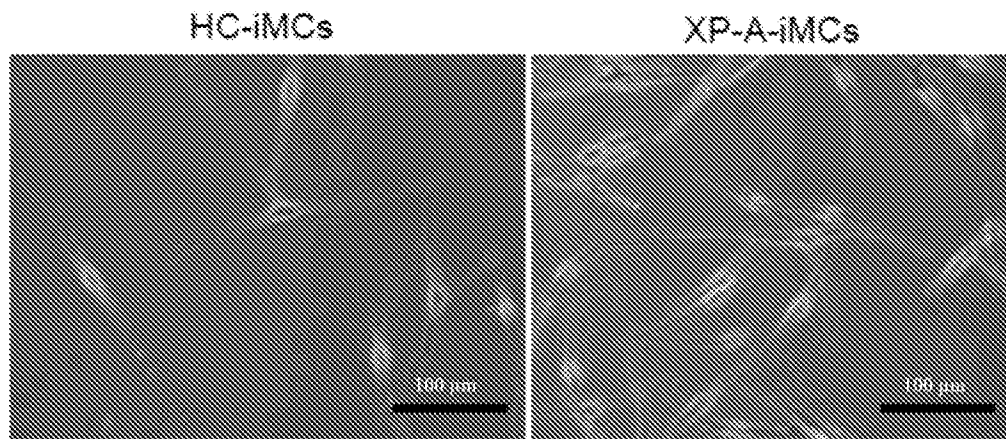
請求の範囲

- [請求項1] ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤を有効成分として含む、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
- [請求項2] 皮膚障害が、光曝露によって生じるメラノサイトにおけるヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害である、請求項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
- [請求項3] 皮膚障害が、光老化による皮膚障害である、請求項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
- [請求項4] 皮膚障害が、色素性乾皮症による皮膚障害である、請求項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
- [請求項5] ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害の予防及び／又は治療剤が、ヒストン脱アセチル化酵素4の発現異常を改善する作用を有する、請求項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
- [請求項6] ヒストンアセチル基転移酵素阻害剤が、クルクミン、C-646、A-485、アナカルジン酸、ブチロラクトン、CTPB及びガルシノールからなる群から選択される1種又は複数種である、請求項1に記載の皮膚障害の予防及び／又は治療剤。
- [請求項7] メラノサイトの培養系に候補物質を添加し、前記メラノサイトの細胞傷害を改善する物質を選別することを特徴とする皮膚障害の予防及び／又は治療剤のスクリーニング方法。
- [請求項8] メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子を検出することにより得られる、請求項7に記載のスクリーニング方法。
- [請求項9] メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、メラノサイトの生存率を評価することにより得られる、請求項7に記載のスクリーニング方法。
- [請求項10] メラノサイトの細胞傷害を改善する物質は、メラノサイトの細胞遊走能を評価することにより得られる、請求項7に記載のスクリーニング方法。

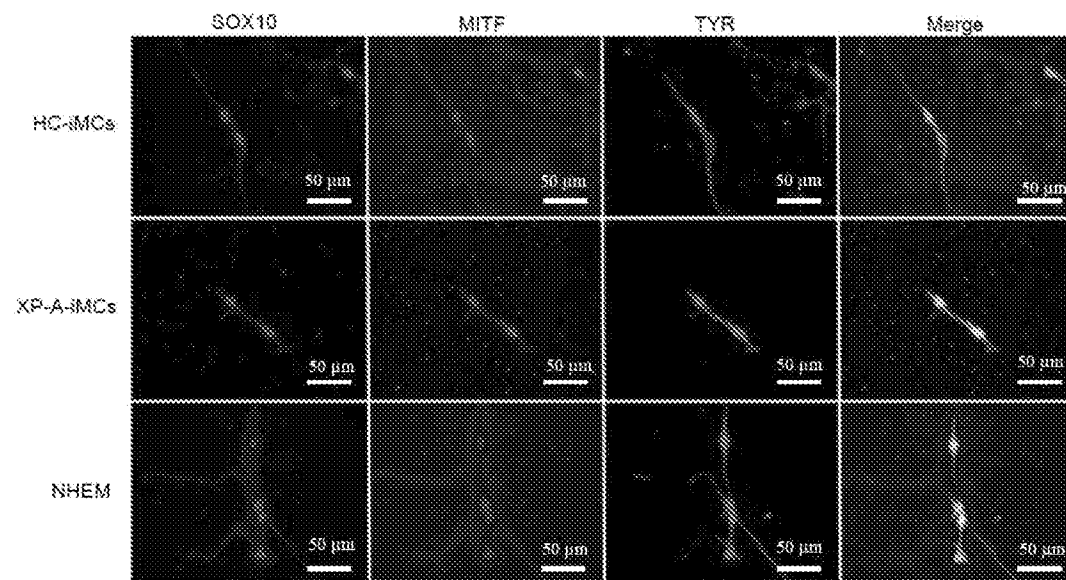
方法。

- [請求項11] メラノサイトが多能性幹細胞由来のメラノサイトである、請求項7に記載のスクリーニング方法。
- [請求項12] 多能性幹細胞由来のメラノサイトが、色素性乾皮症の患者由来の多能性幹細胞から作製された多能性幹細胞由来のメラノサイトである、請求項11に記載のスクリーニング方法。
- [請求項13] メラノサイトの細胞傷害が、光曝露による細胞傷害である請求項7に記載のスクリーニング方法。
- [請求項14] 光曝露による細胞傷害が、ヒストン脱アセチル化酵素4異常に伴う皮膚障害である、請求項13に記載のスクリーニング方法。
- [請求項15] 被検者から採取した皮膚について、ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子の異常を検出する工程を含む、皮膚障害の検査方法。
- [請求項16] 細胞老化随伴分泌現象因子が、MMP-1、MMP-3、TNF α 及びIL-6から選択される、1種又は複数種である、請求項15に記載の皮膚障害の検査方法。
- [請求項17] ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子異常の検出が、以下の1)又は2)を用いて行われる、請求項15に記載の皮膚障害の検査方法；
- 1) ヒストン脱アセチル化酵素4遺伝子及び／若しくは細胞老化随伴分泌現象因子遺伝子の転写産物を特異的に検出し得る核酸プローブ又は核酸プライマー；
 - 2) ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子を特異的に認識する抗体。
- [請求項18] ヒストン脱アセチル化酵素4及び／又は細胞老化随伴分泌現象因子の異常を検出し得る物質を含む、皮膚障害検査用キット。

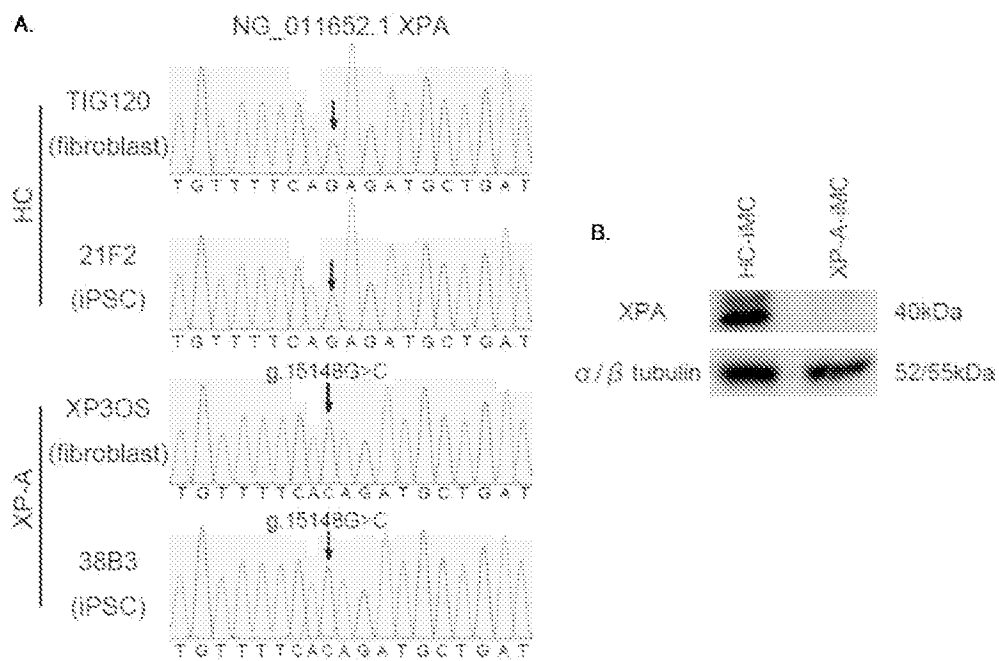
[図1]



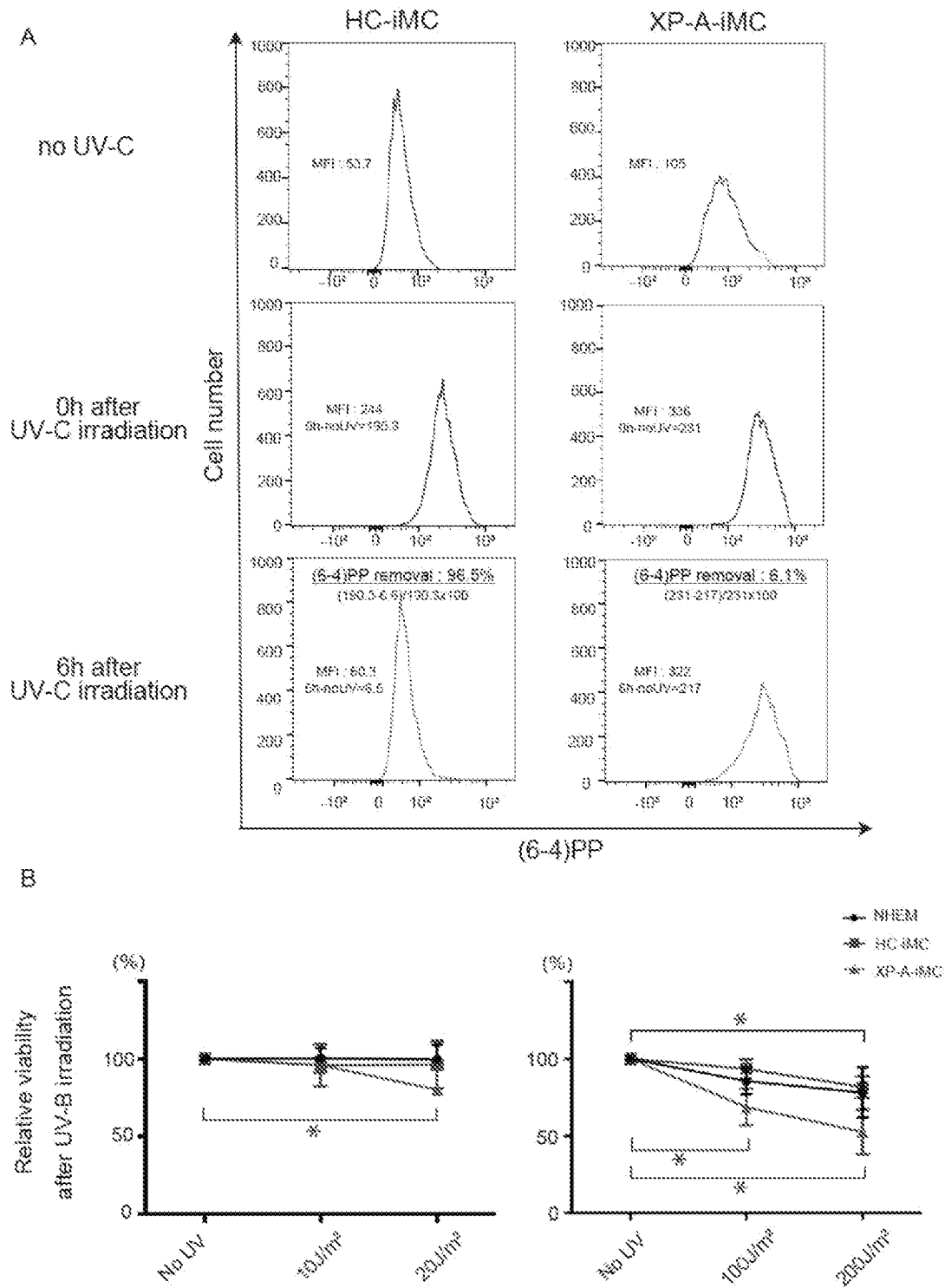
[図2]



[図3]

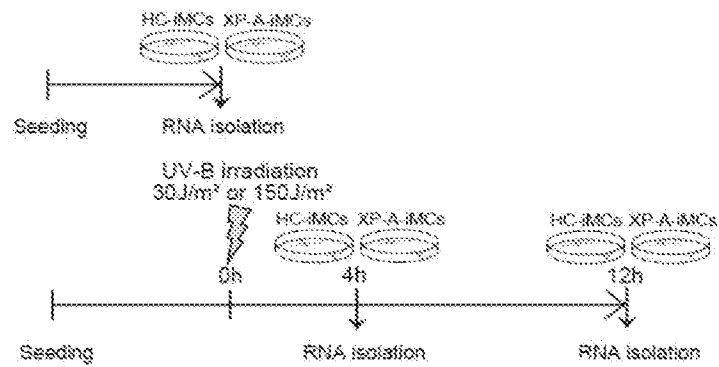


[図4]

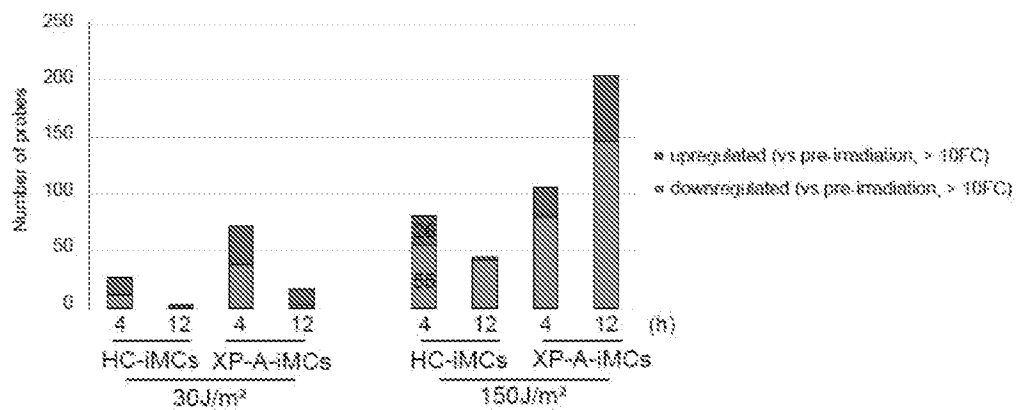


[図5]

A

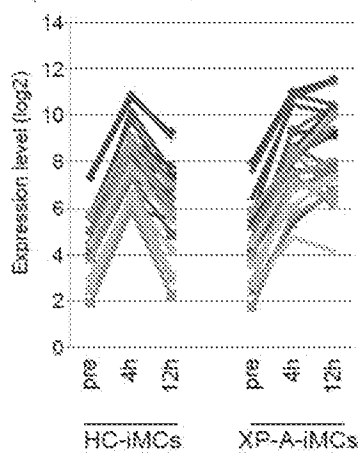


B

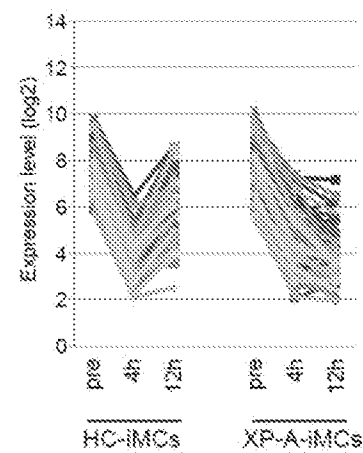


C

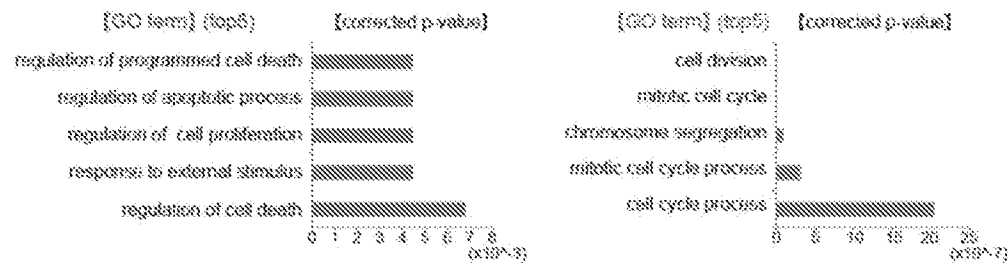
Expression kinetics in each iMCs on the 26 probes upregulated in HC-iMCs ($>10\text{FC}$, 4h after 150 J/m^2 UV-B irradiation)



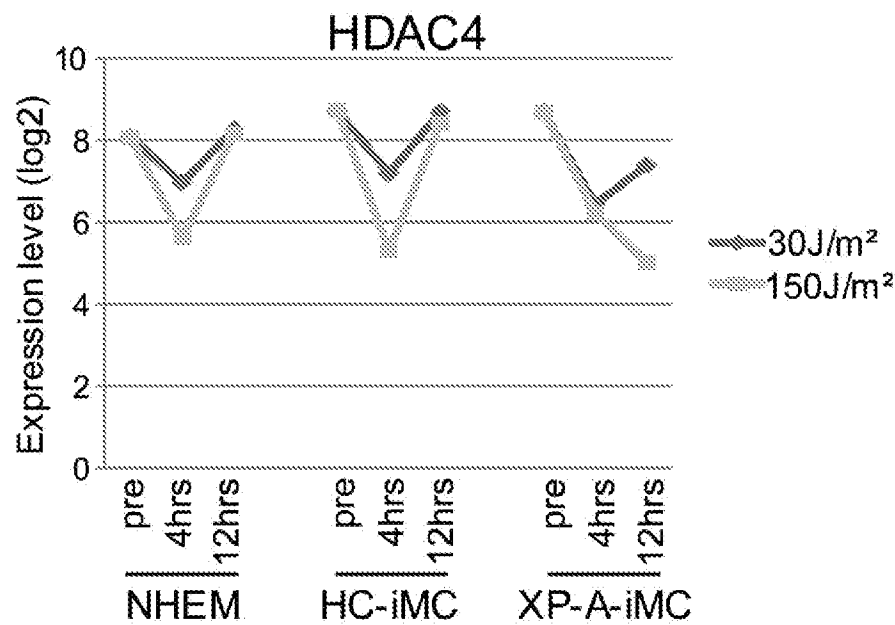
Expression kinetics in each iMCs on the 55 probes downregulated in HC-iMCs ($>10\text{FC}$, 4h after 150 J/m^2 UV-B irradiation)



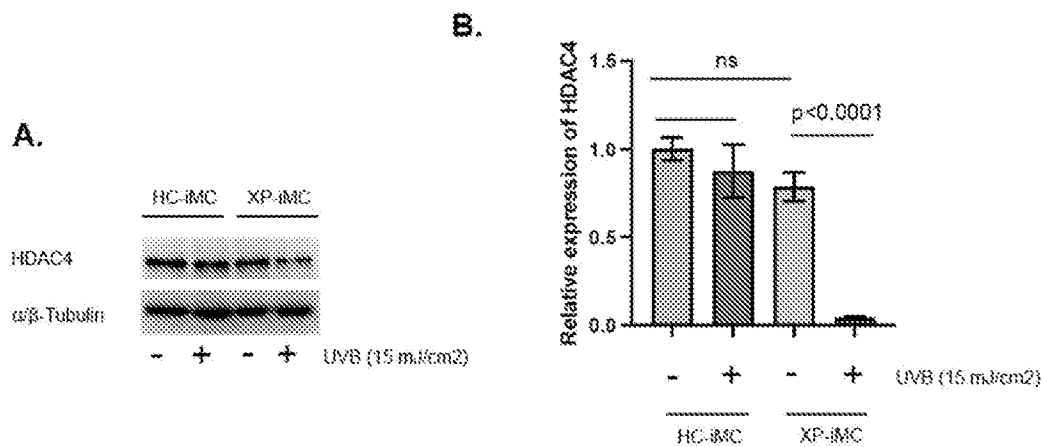
[図6]



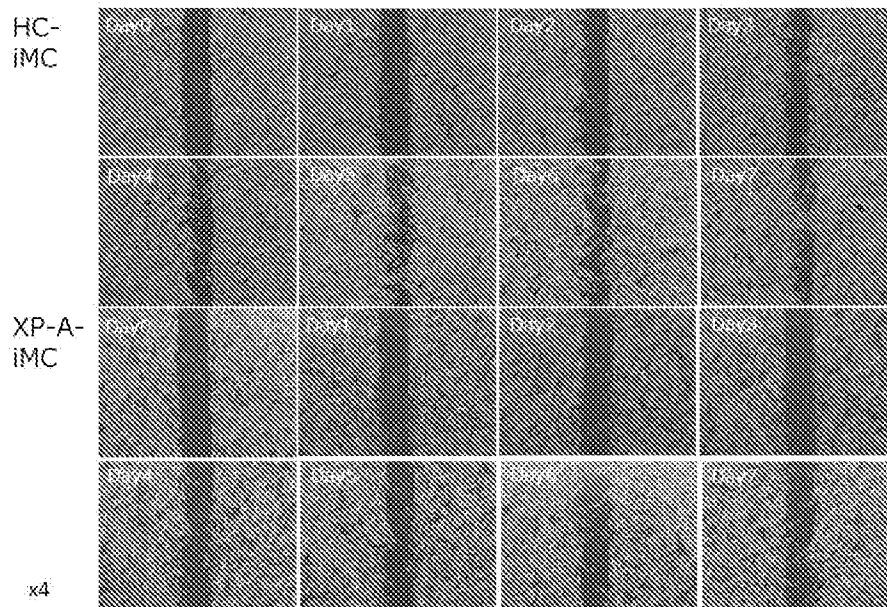
[図7]



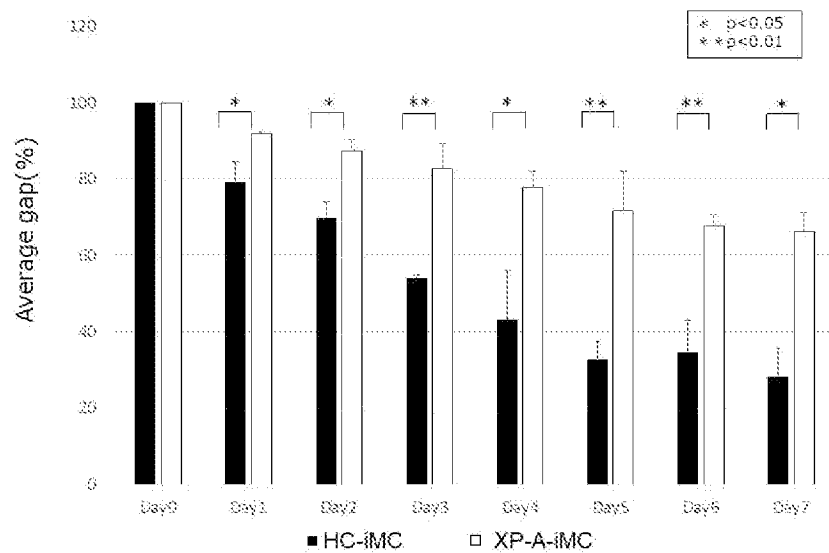
[図8]



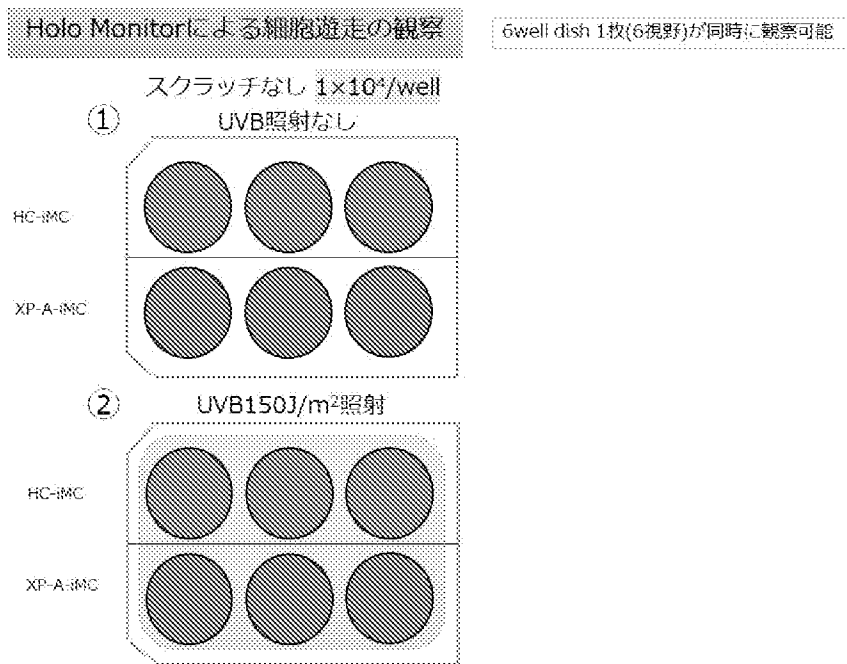
[図9]

スクラッチアッセイ(UVB150J/m²)

[図10]

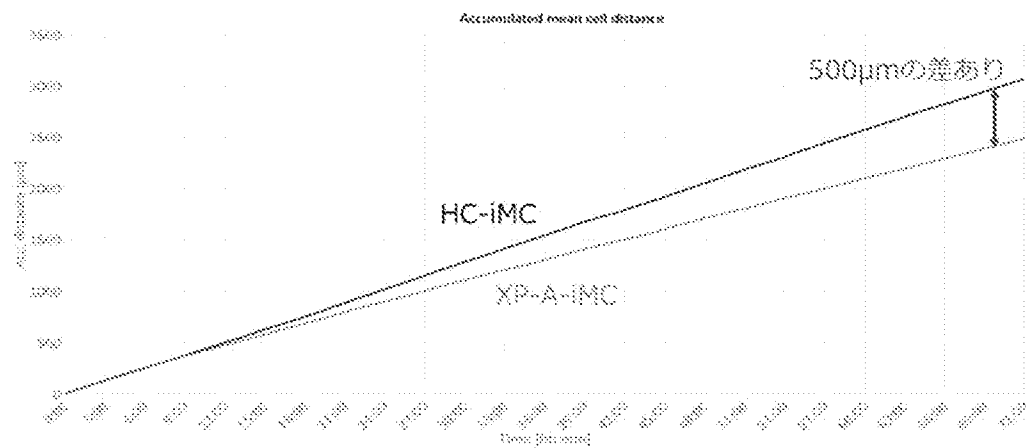
スクラッチアッセイ(UVB150J/m²)

[図11]

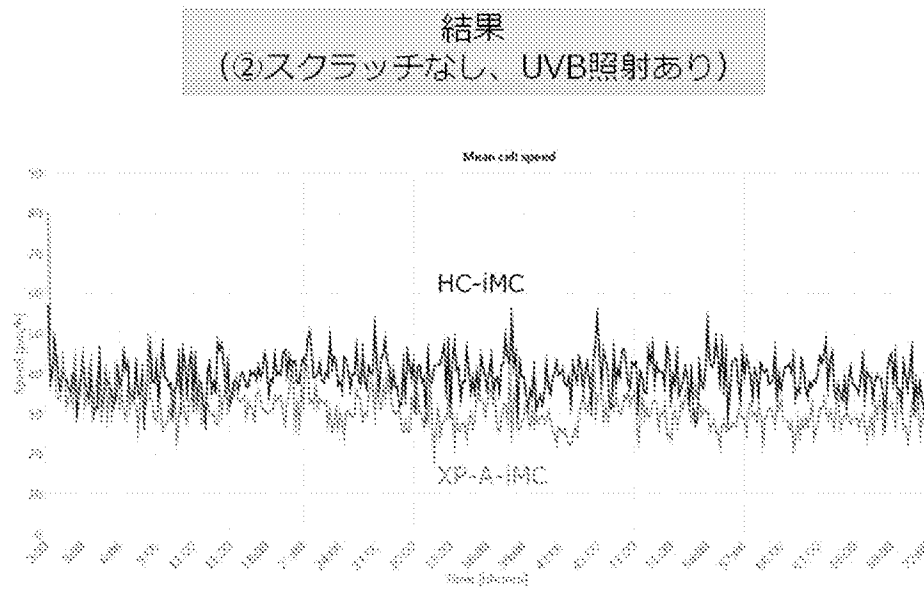


[図12]

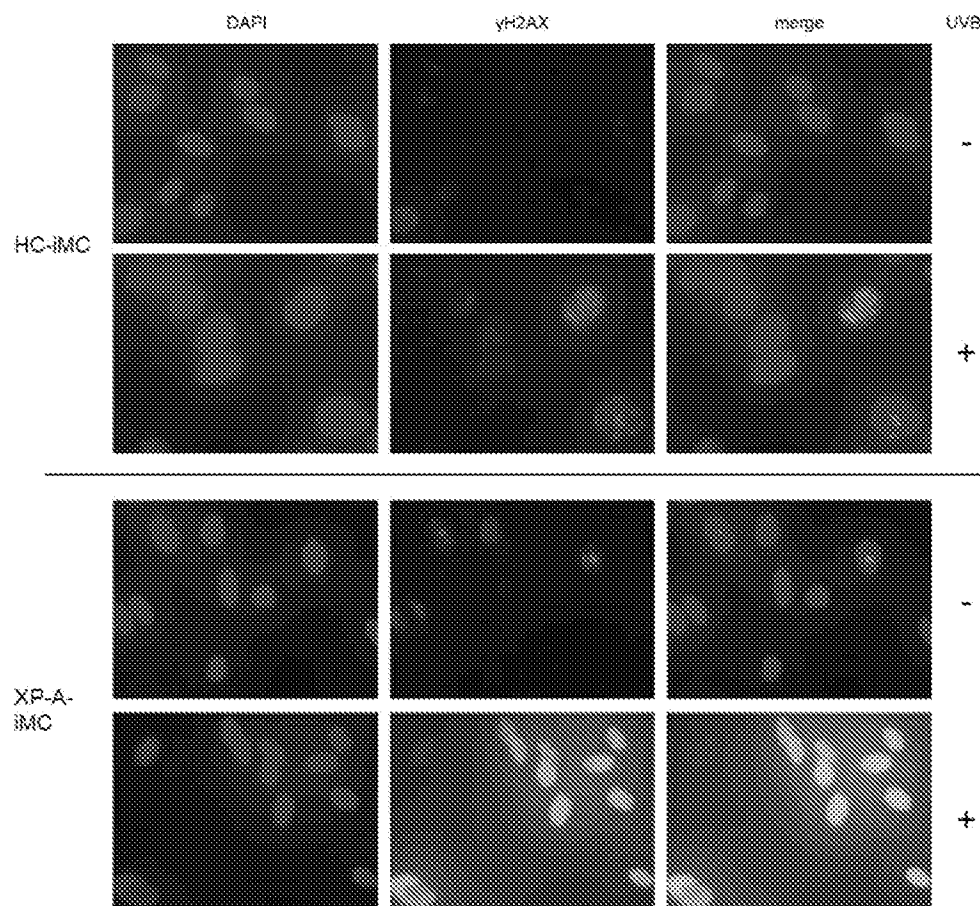
結果
(②スクラッチなし、UVB照射あり)



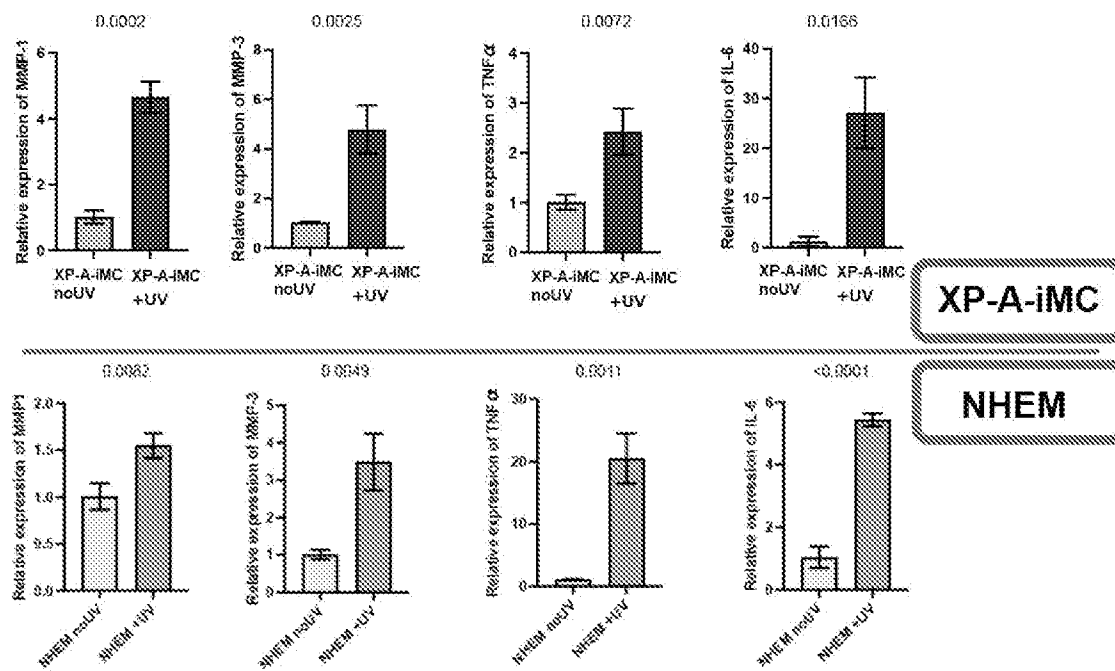
[図13]



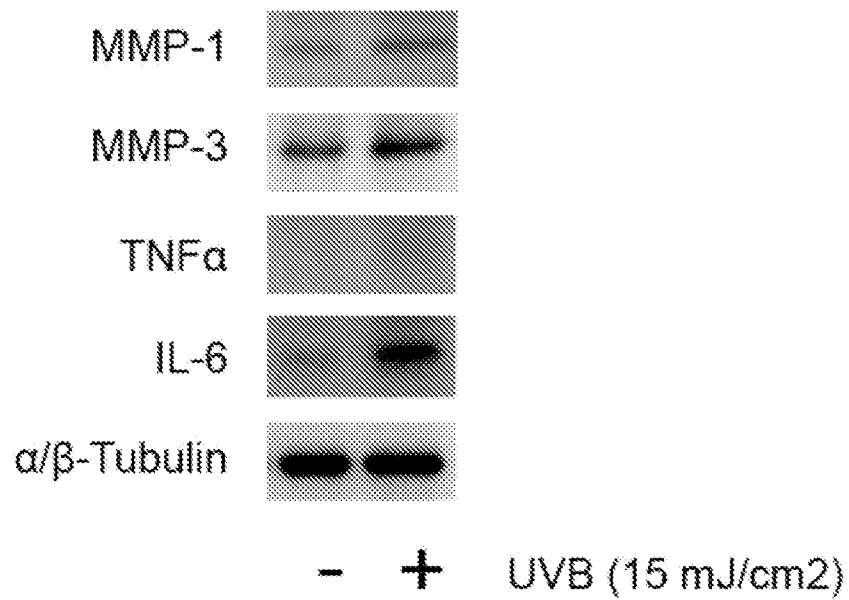
[図14]



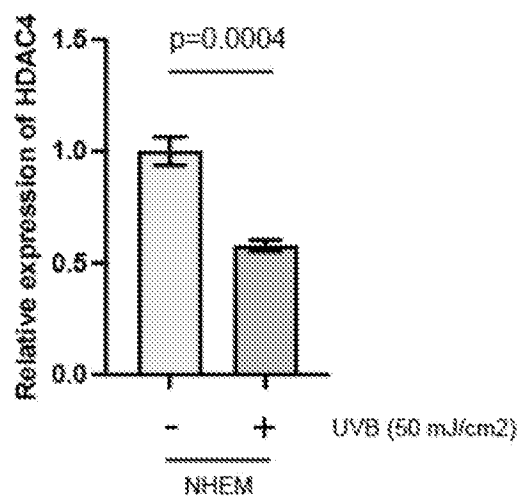
[図15]



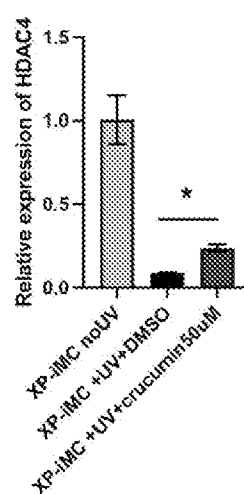
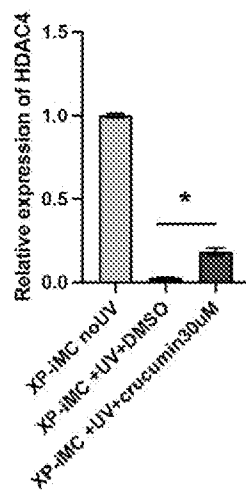
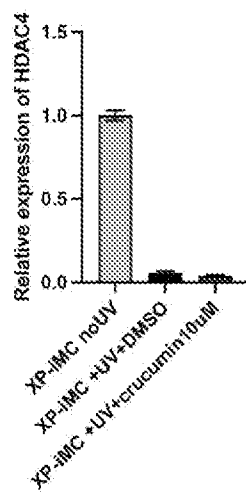
[図16]



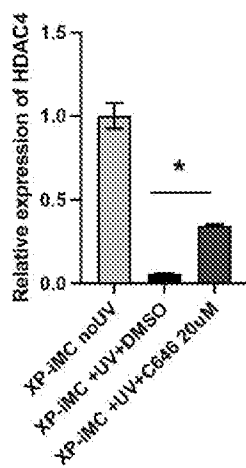
[Fig 17]



[Fig 18]



[Fig 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; **A61K 31/121**(2006.01)i; **A61K 31/122**(2006.01)i; **A61K 31/365**(2006.01)i; **A61K 31/4155**(2006.01)i;
A61K 31/423(2006.01)i; **A61K 31/60**(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61P 17/16**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i;
C12N 9/99(2006.01)i; **C12Q 1/02**(2006.01)i; **C12Q 1/6883**(2018.01)i; **G01N 33/15**(2006.01)i; **G01N 33/50**(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61K31/121; A61K31/122; A61K31/365; A61K31/4155; A61K31/423; A61K31/60; A61P17/00;
A61P17/16; A61P43/00 111; C12N9/99; C12Q1/02; C12Q1/6883 Z; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00; A61K31/121; A61K31/122; A61K31/365; A61K31/4155; A61K31/423; A61K31/60; A61P17/00; A61P17/16;
A61P43/00; C12N9/99; C12Q1/02; C12Q1/6883; G01N33/15; G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2019-055932 A (FANCL CORP.) 11 April 2019 (2019-04-11) claims, paragraph [0008]	1-3, 5-6
Y		4
X	JP 2015-527361 A (WOLDEMARIAM T. Z.) 17 September 2015 (2015-09-17) claims, paragraph [0002], example 8	1-3, 5-6
Y		4
X	JP 3-170416 A (UNILEVER NV) 24 July 1991 (1991-07-24) claims	1-3, 5-6
Y		4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 2024

Date of mailing of the international search report

13 August 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020054

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2021-017405 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 15 February 2021 (2021-02-15) paragraphs [0002], [0017], examples (particularly reference example 1, reference example 2, example 1)	7-14
Y		4, 7-14
X	JP 2013-520163 A (INST NAT SANTE RECH MED) 06 June 2013 (2013-06-06) claims, paragraphs [0102], [0107]	7-14
Y		7-14
X	JP 2017-104085 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) 15 June 2017 (2017-06-15) claims, paragraphs [0008]-[0012], [0020], [0064]	7, 11
Y		7-14
X	LI, Shanshan et al., Protective role of histone deacetylase 4 from ultraviolet radiation-induced DNA lesions, Molecular Carcinogenesis, 2020, Volume 59, Issue 11, pp. 1292-1301, <DOI: 10.1002/mc.23257> abstract, p. 1293, left column, third paragraph to right column, first paragraph	15-18
Y		8
X	米井 嘉一 等, 皮膚老化概論: 酸化ストレスと糖化ストレス, 日本化粧品技術者会誌, 2019, vol. 53, no. 2, pp. 83-90, <DOI: 10.5107/sccj.53.83> (YONEI, Yoshikazu et al., Skin Aging: Oxidative Stress and Glycative Stress, J. Soc. Cosmet Chem. Jpn) p. 84, left column, second paragraph, p. 85, left column, second paragraph	15-18
X	JP 2021-523735 A (DERMTECH INC.) 09 September 2021 (2021-09-09) claim 7, example 1	15-18
X	WO 2010/015618 A1 (ROUSSY INST GUSTAVE) 11 February 2010 (2010-02-11) claims	15-18
A	LI, Wentao et al., Epigenetic Regulation of Nucleotide Excision Repair, Front. Cell Dev. Biol., 08 April 2022, Volume 10, Article 847051, <DOI: 10.3389/fcell.2022.847051> p. 3, left column, second paragraph to p. 4, left column, second paragraph	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/020054

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/020054

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2019-055932	A	11 April 2019	(Family: none)	
JP	2015-527361	A	17 September 2015	US 2014/0056828	A1
				claims, paragraph [0005], example 8	
				WO 2014/031504	A1
				EP 2887950	A1
				CN 104717969	A
JP	3-170416	A	24 July 1991	US 5152983	A
				claims	
				EP 431755	A1
				KR 10-1991-0009238	A
JP	2021-017405	A	15 February 2021	(Family: none)	
JP	2013-520163	A	06 June 2013	WO 2011/104200	A1
				claims, p. 20, pp. 22-23	
				EP 2539438	A1
				CN 102858955	A
				KR 10-2012-0120971	A
JP	2017-104085	A	15 June 2017	(Family: none)	
JP	2021-523735	A	09 September 2021	WO 2019/217478	A1
				claim 7, example 1	
				EP 3813678	A1
				CN 112512440	A
				KR 10-2021-0031640	A
				US 2020/0308649	A1
WO	2010/015618	A1	11 February 2010	US 2011/0136685	A1
				EP 2151505	A1

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/121(2006.01)i; A61K 31/122(2006.01)i; A61K 31/365(2006.01)i; A61K 31/4155(2006.01)i; A61K 31/423(2006.01)i; A61K 31/60(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P 17/16(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i
FI: A61K45/00; A61K31/121; A61K31/122; A61K31/365; A61K31/4155; A61K31/423; A61K31/60; A61P17/00; A61P17/16; A61P43/00 111; C12N9/99; C12Q1/02; C12Q1/6883 Z; G01N33/15 Z; G01N33/50 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

A61K45/00; A61K31/121; A61K31/122; A61K31/365; A61K31/4155; A61K31/423; A61K31/60; A61P17/00; A61P17/16; A61P43/00; C12N9/99; C12Q1/02; C12Q1/6883; G01N33/15; G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2019-055932 A (株式会社ファンケル) 11.04.2019 (2019-04-11) 特許請求の範囲、段落0008	1-3, 5-6
Y		4
X	JP 2015-527361 A (ウォルデマリアム, チベベ, ゼット) 17.09.2015 (2015-09-17) 特許請求の範囲、段落0002、例8	1-3, 5-6
Y		4
X	JP 3-170416 A (ユニリーバー・ナムローゼ・ベンノートシヤープ) 24.07.1991 (1991-07-24) 特許請求の範囲	1-3, 5-6
Y		4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
29.07.2024

国際調査報告の発送日
13.08.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

堂畑 厚志 4U 7880

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2021-017405 A (国立大学法人神戸大学) 15.02.2021 (2021 - 02 - 15) 段落 0 0 0 2、0 0 1 7、実施例 (特に、参考例 1、参考例 2、実施例 1)	7-14
Y		4, 7-14
X	JP 2013-520163 A (アンスティチュ ナショナル ドウ ラ サンテ エ ドウ ラ ルシェ ルシュ メディカル) 06.06.2013 (2013 - 06 - 06) 特許請求の範囲、段落 0 1 0 2、0 1 0 7	7-14
Y		7-14
X	JP 2017-104085 A (国立大学法人神戸大学) 15.06.2017 (2017 - 06 - 15) 特許請求の範囲、段落 0 0 0 8 - 0 0 1 2、0 0 2 0、0 0 6 4	7, 11
Y		7-14
X	LI, Shanshan et al., Protective role of histone deacetylase 4 from ultraviolet radiation-induced DNA lesions, Molecular Carcinogenesis, 2020, Volume 59, Issue 11, Pages 1292-1301, <DOI: 10.1002/mc.23257> Abstract、p.1293左欄第 3 段落 - 右欄第 1 段落	15-18
Y		8
X	米井 嘉一 等, 皮膚老化概論: 酸化ストレスと糖化ストレス, 日本化粧品技術者会 誌, 2019, 53巻, 2号, pp. 83-90, <DOI: 10.5107/sccj.53.83> p.84左欄第 2 段落、p.85左欄第 2 段落	15-18
X	JP 2021-523735 A (ダームテック, インク) 09.09.2021 (2021 - 09 - 09) 請求項 7、実施例 1	15-18
X	WO 2010/015618 A1 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 11.02.2010 (2010 - 02 - 11) Claims	15-18
A	LI, Wentao et al., Epigenetic Regulation of Nucleotide Excision Repair, Front. Cell Dev. Biol., 2022.04.08, Volume 10, Article 847051, <DOI: 10.3389/fcell.2022.847051> p.3左欄第 2 段落 - p.4左欄第 2 段落	1-18

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/020054

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2019-055932	A	11.04.2019	(ファミリーなし)	
JP	2015-527361	A	17.09.2015	US 2014/0056828	A1
				Claims, [0005], Example 8	
				WO 2014/031504	A1
				EP 2887950	A1
				CN 104717969	A
JP	3-170416	A	24.07.1991	US 5152983	A
				Claims	
				EP 431755	A1
				KR 10-1991-0009238	A
JP	2021-017405	A	15.02.2021	(ファミリーなし)	
JP	2013-520163	A	06.06.2013	WO 2011/104200	A1
				Claims, p.20 , p.22-23	
				EP 2539438	A1
				CN 102858955	A
				KR 10-2012-0120971	A
JP	2017-104085	A	15.06.2017	(ファミリーなし)	
JP	2021-523735	A	09.09.2021	WO 2019/217478	A1
				Claim 7, Example 1	
				EP 3813678	A1
				CN 112512440	A
				KR 10-2021-0031640	A
				US 2020/0308649	A1
WO	2010/015618	A1	11.02.2010	US 2011/0136685	A1
				EP 2151505	A1