

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6614566号
(P6614566)

(45) 発行日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(24) 登録日 令和1年11月15日(2019.11.15)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/6851 (2018.01)	C 12 Q 1/6851
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02
G 01 N 33/15 (2006.01)	G 01 N 33/15
A 61 Q 19/08 (2006.01)	A 61 Q 19/08
A 61 K 8/96 (2006.01)	A 61 K 8/96

請求項の数 3 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2014-250611 (P2014-250611)	(73) 特許権者	000113470 ポーラ化成工業株式会社 静岡県袋井市愛野1234番地
(22) 出願日	平成26年12月11日(2014.12.11)	(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
(65) 公開番号	特開2015-130857 (P2015-130857A)	(74) 代理人	100126505 弁理士 佐貫 伸一
(43) 公開日	平成27年7月23日(2015.7.23)	(74) 代理人	100131392 弁理士 丹羽 武司
審査請求日	平成29年9月28日(2017.9.28)	(74) 代理人	100151596 弁理士 下田 俊明
(31) 優先権主張番号	特願2013-256962 (P2013-256962)	(72) 発明者	楊 一幸 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内
(32) 優先日	平成25年12月12日(2013.12.12)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】皮膚老化抑制素材のスクリーニング方法、及び皮膚老化抑制方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験物質を添加したヒト皮膚線維芽細胞での、加齢に伴い発現量が変動するLncRNAの発現量が、被験物質を添加しなかったヒト皮膚線維芽細胞における前記LncRNAの発現量と比較して変化した被験物質を選択するステップを含む皮膚老化抑制素材のスクリーニング方法であって、

前記変動が減少であり、かつ前記変化がLncRNAの発現亢進であり、

前記LncRNAがLOC100292680である、皮膚老化抑制素材のスクリーニング方法。

【請求項2】

前記皮膚老化抑制が、しわ防止、たるみ防止、シミ形成防止、及びくすみ防止からなる群から選択される1種以上を含む、請求項1に記載の皮膚老化抑制素材のスクリーニング方法。

10

【請求項3】

請求項1又は2に記載のスクリーニング方法により皮膚老化抑制素材を選択するステップ、及び前記皮膚老化抑制素材を含有させるステップを含む、皮膚老化抑制用組成物の設計方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚老化抑制素材をスクリーニングする方法、及び該スクリーニングにより

20

得られた素材を含む皮膚老化抑制組成物を摂取するステップを含む皮膚老化抑制方法、に関する。

【背景技術】

【0002】

肌のしわ形成予防、肌のたるみの形成予防等、いわゆる皮膚老化抑制に関する研究が進められている。例えば、皮膚真皮の構成成分であるエラスチンやコラーゲンは、肌の張りや弾力を保つ働きをするところ、エラスターーゼやMMP-1といったこれらの成分を分解する酵素が加齢や紫外線などにより過剰に誘導されることで、真皮においてエラスチンやコラーゲンの分解が進み、皮膚老化の原因となることが知られている（非特許文献1～3参照）。

10

【0003】

他方、タンパク質をコードしていない塩基数200nt以上のRNAであるLncRNAが知られており、LncRNAは8200種ほど存在すると予想されているが（非特許文献4参照）、その機能は現在のところあまり解明されていない。

LncRNAに関しては、近年、若齢および老齢ドナー5名ずつの前腕内側から皮膚を採取し、発現量を比較したところ、いくつかのLncRNAの量が加齢により変化していたことが報告されている（非特許文献5参照）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

20

【非特許文献1】Takeuchi H. et al., J. Dermatol. Sci. (2010), 60, 151-158

【非特許文献2】Tsuji N. et al., Photochem. Photobiol. (2001) 74(2), 283-290

【非特許文献3】Matsuda M. et al., J. Invest Dermatol. (2012) online (doi: 10.1038/jid.2012.383)

【非特許文献4】Moran N. Cabili et al. (2011) Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclass. GENES & DEVELOPMENT, Online.

【非特許文献5】Chang ALS. et al. (2012) Rejuvenation of Gene Expression Pattern of Aged Human Skin by Broadband Light Treatment: A Pilot Study. J. Invest. Dermatol. 287, online

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明では、LncRNAを用いて、皮膚老化抑制素材をスクリーニングする新たな方法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】

【0006】

本発明者らはLncRNAについて研究を進め、加齢に伴い発現量が変動する特定のLncRNAが、皮膚老化に関する因子の発現量に影響を及ぼすことを見出した。そして当該知見をもとに、特定のLncRNAを指標とすることで、皮膚の老化を抑制する効果を有する素材をスクリーニングできることに想到した。

40

すなわち本発明は、加齢に伴い発現量が変動するLncRNAを選定するステップ、及び

被験物質を添加した細胞での前記LncRNAの発現量が、被験物質を添加しなかった細胞における前記LncRNAの発現量と比較して変化した被験物質を選択するステップ

、
を含む、皮膚老化抑制素材のスクリーニング方法である。

【0007】

また、本発明の別の態様は、上記スクリーニング方法により得られた皮膚老化抑制素材を含む皮膚老化抑制組成物を調製するステップ、及び

50

調製された皮膚老化抑制組成物を摂取するステップ、を含む皮膚老化抑制方法である（但し、医療行為を除く）。

【発明の効果】

【0008】

本発明により、LncRNAを指標とした、新たな皮膚老化抑制素材のスクリーニング法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】実験2で用いた、X-galを加えることで呈色反応を起こすことによる、老化の抑制または促進に関するLncRNAの存在を示す図である（図面代用写真）。 10

【図2】実験2において、呈色反応を示す細胞数をカウントした結果を示すグラフである。

【図3】加齢に伴い量が変動するLncRNAの老化関連因子への影響を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、本発明について、具体的に行った実験を示して説明するが、本発明が具体的な実施態様にのみ限定されることはいうまでもない。

【0011】

<実験1：加齢に伴い量が変動するLncRNA>

若齢由来（20代）および老齢由来（60～70代）の正常ヒト皮膚線維芽細胞を、24穴プレート（BD Falcon社製）に45000cells/wellになる様に播種し、10%FBS/DMEM（FBS：ハナ・ネスコバイオ社製、DMEM：シグマアルドリッヂ社製）で24時間培養した。RNeasy Mini Kit（QIAGEN社製）を用いRNAを抽出し、NanoDrop（LMS社製）およびBioanalyzer（Agilent社製）にてRNA純度を測定した。得られたRNAをLow Input Quick Amp Labeling Kit（1色用）（アジレント社製）を用いてラベル化cRNAに変換し、Gene Expression Hybridization Kit（アジレント社製）によりSurePrint G3 Human GE 8 x 60K Microarray（アジレント社）にハイブリダイズさせ、発現量を測定した。結果を表1に示す。表1の結果より、加齢に伴って量が変化するLncRNAが存在することがわかる。 30

【0012】

【表1】

表1

遺伝子名	老齢/若齢細胞の発現量比
NESPAS	3.45
FLJ46906	2.57
HOTAIR	2.31
SNHG5	0.47
LOC100292680	0.42
IPW	0.38

【0013】

本実施態様に係るスクリーニング法では、加齢に伴い発現量が変動するLncRNAを選定するステップを有し、上記表1中から1種以上のLncRNAを選定することができる。 50

また、上記表 1 以外の LncRNA であっても、実験 1 と同様の方法、または実験 1 に準ずる方法により加齢に伴い発現量が変動する LncRNA であると判別されたものを、本ステップで選定してもよい。

【0014】

加齢に伴う発現量の変動は、その程度は特段限定されず、発現量の正の変化では、通常 10 歳以上の加齢幅において、好ましくは 20 歳以上の加齢幅において、より好ましくは 30 歳以上の加齢幅において、通常 10 % 以上の発現量の増加があり、好ましくは 20 % 以上の発現量の増加があり、より好ましくは 30 % 以上の発現量の増加がある。また、50 % 以上の発現量の増加があってもよく、100 % 以上の発現量の増加があってもよく、200 % 以上の発現量の増加があってもよい。

また、発現量の負の変化では、通常 10 歳以上の加齢幅において、好ましくは 20 歳以上の加齢幅において、より好ましくは 30 歳以上の加齢幅において、通常 10 % 以上の発現量の減少であり、好ましくは 20 % 以上の発現量の減少があり、より好ましくは 30 % 以上の発現量の減少がある。また、50 % 以上の発現量の減少があってもよく、60 % 以上の発現量の減少があってもよく、70 % 以上の発現量の減少があってもよい。好ましい LncRNA としては、NESPAS、HOTAIR、FLJ46906、SNHG5、LOC100292680、及びIPW からなる群から選択される 1 種以上を含む。

【0015】

<実験 2：加齢に伴い発現量が変動する LncRNA の老化への影響評価>

正常ヒト皮膚線維芽細胞を、24穴プレート (BD Falcon 社製) に 30000 cells / well になる様に播種し、10% FBS / DMEM (FBS: ハナ・ネスコバイオ社製、DMEM: シグマアルドリッヂ社製) で 24 時間培養した。次いで該 LncRNA に対する siRNA (キアゲン社製、配列非公開) を Lipofectamine 2000 (ライフテクノロジーズ製) を用いてトランスフェクションした。なお、コントロールとして Allstar Negative Control (キアゲン社製) を同手法にてトランスフェクションした細胞も用意し、それぞれ所定時間 (24 ~ 120 時間) 培養した。

ここで、細胞老化に伴い、細胞内の Senescence associated - Galactosidase 活性が上昇することが知られており、老化状態の評価として Senescence associated - Galactosidase の基質である X-gal を加えることで呈色反応を起こす方法が広く知られている。本実験でもこの手法を用い、X-gal を加えた後に位相差顕微鏡で細胞を観察し、撮像した結果を図 1 に示す。また、撮影像内の全細胞数に対する呈色細胞のパーセンテージをカウントし、それを 3 回繰り返した時の平均を図 2 に示す。

図 1 では、X-gal を培養後に得られた細胞に添加することで、細胞が呈色反応を示しており、図 2 では、有意差を持って呈色細胞数が増加していることを示している。このことは細胞内 Senescence associated - Galactosidase 活性の上昇を示唆している。よって、老化の抑制または促進に関与する LncRNA が存在することが理解できる。

【0016】

また、同様に培養した細胞から RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を用いて Total RNA を抽出し、SuperScript VILO cDNA synthesis Kit (ライフテクノロジーズ製、配列非公開) を用いて cDNA を合成し、Step One Plus (ライフテクノロジーズ製) にて MMP-1、MMP-3、MMP-9、Elastin、IL-1、IL-6、IL-8 プライマー (キアゲン社製、配列非公開) を用いて mRNA の発現量を解析した。図 3 にその結果を示す。図 3 から、老化の抑制または促進に関与する LncRNA が存在することが理解できる。

【0017】

本実施態様に係るスクリーニング法は、被験物質を添加した細胞での LncRNA の発現量が、被験物質を添加しなかった細胞における LncRNA の発現量と比較して変化し

10

20

30

40

50

た被験物質を選択するステップを有する。

発現量の変化は、選択する L n c R N A の種類により L n c R N A の発現抑制であってもよく、発現亢進であってもよい。当業者は、上記実験 2 の結果、及び実験 2 に準じた実験の結果に基づき、発現量の変化が L n c R N A の発現抑制であるか L n c R N A の発現亢進であるか判断できる。

具体的に例示すると、L n c R N A の発現量が被検物質を添加しなかった細胞に対して 80 % 未満の場合には、上記ステップにおける発現量の変化が発現抑制である。

L n c R N A の発現量が被検物質を添加しなかった細胞に対して 120 % 以上の場合には、上記ステップにおける発現量の変化が発現亢進である。

【0018】

本発明のスクリーニング方法が対象とする被験物質は、純物質、動植物由来の抽出物、又はそれらの混合物等のいずれであってもよい。

動植物由来の抽出物は、動物又は植物由来の抽出物自体のみならず、抽出物の画分、精製した画分、抽出物乃至は画分、精製物の溶媒除去物の総称を意味するものとし、植物由来の抽出物は、自生若しくは生育された植物、漢方生薬原料等として販売されるものを用いた抽出物、市販されている抽出物等が挙げられる。

抽出操作は、植物部位の全草を用いるほか、植物体、地上部、根莖部、木幹部、葉部、茎部、花穂、花蕾等の部位を使用することできるが、予めこれらを粉碎あるいは細切して抽出効率を向上させることができが好ましい。抽出溶媒としては、水、エタノール、イソプロピルアルコール、ブタノールなどのアルコール類、1,3-ブタンジオール、ポリプロピレングリコールなどの多価アルコール類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、テトラヒドロフランなどのエーテル類等の極性溶媒から選択される 1 種乃至は 2 種以上が好適なものとして例示することができる。具体的な抽出方法としては、例えば、植物体等の抽出に用いる部位乃至はその乾燥物 1 質量に対して、溶媒を 1 ~ 30 質量部加え、室温であれば数日間、沸点付近の温度であれば数時間浸漬し、室温まで冷却し後、所望により不溶物及び / 又は溶媒除去し、カラムクロマトグラフィー等で分画精製する方法が挙げられる。

【0019】

本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングした皮膚老化抑制素材は、シワ防止効果、たるみ防止効果、シミ形成防止効果、くすみ防止効果から選択される 1 種以上の効果を奏し、後述するように化粧料、医薬部外品、食品などに配合されることで、アンチエージング効果を奏する。

【0020】

本発明の別の実施態様は、上記スクリーニング方法により得られた皮膚老化抑制素材を含む皮膚老化抑制組成物を調製するステップ、及び調製された皮膚老化抑制組成物を摂取するステップ、を含む皮膚老化抑制方法である。ただし、本実施態様は、医療行為を除くものである。

【0021】

皮膚老化抑制組成物は、化粧料、医薬部外品、食品等として適用され、化粧料の場合には肌に化粧料を塗布することで皮膚老化抑制組成物の摂取を行い、食品の場合には、経口により摂取する。

本実施態様における、皮膚老化抑制組成物中の皮膚老化抑制素材の含有量（配合量）は、通常、0.00001 質量 % 以上、好ましくは 0.0001 質量 % 以上、より好ましくは 0.001 質量 % 以上であり、通常 80 質量 % 以下、好ましくは 30 質量 % 以下、より好ましくは 10 質量 % である。上記範囲とすることで、好適にアンチエージング効果を奏する皮膚老化防止組成物とすることができます。

また、皮膚老化防止組成物に含有させる皮膚老化抑制素材の種類は、1 種類のみでなく 2 種類以上であってもよい。

【0022】

皮膚老化抑制組成物は、化粧品、医薬部外品、食品に適用することが可能であり、それ

10

20

30

40

50

その用途に応じて、適宜必要な成分を含有させることができる。

このうち、特に化粧料に適用させることができが好ましい。

化粧料に適用される場合、通常化粧料に使用される成分を広く配合することが可能であり、また、その剤形や用途についても、何ら限定されない。以下、化粧料に適用される場合、化粧料中に含有させることができる成分について説明する。

【0023】

有効成分としては、美白成分、シワ改善成分、抗炎症成分、動植物由来の抽出物等が挙げられる。なお、上記説明した本発明の実施態様に係る皮膚老化抑制素材と重複して配合してもよい。

美白成分としては、一般的に化粧料に用いられているものであれば特に限定はない。例えば、4-n-ブチルレゾルシノール、アスコルビン酸グルコシド、3- - -エチルアスコルビン酸、トラネキサム酸、アルブチン、1-トリフェニルメチルピペリジン、1-トリフェニルメチルピロリジン、2- (トリフェニルメチルオキシ)エタノール、2- (トリフェニルメチルアミノ)エタノール、2- (トリフェニルメチルオキシ)エチルアミン、トリフェニルメチルアミン、トリフェニルメタノール、トリフェニルメタン及びアミノジフェニルメタン、N- (p-トルイル)システイン酸、N- (p-メトキシベンゾイル)システイン酸等が挙げられる。更にその他の美白成分として、N-ベンゾイル-セリン、N- (p-メチルベンゾイル)セリン、N- (p-エチルベンゾイル)セリン、N- (p-メトキシベンゾイル)セリン、N- (p-フルオロベンゾイル)セリン、N- (p-トリフルオロメチルベンゾイル)セリン、N- (2-ナフトイル)セリン、N- (4-フェニルベンゾイル)セリン、N- (p-メチルベンゾイル)セリン メチルエステル、N- (p-メチルベンゾイル)セリン エチルエステル、N- (2-ナフトイル)セリン メチルエステル、N-ベンゾイル- O-メチルセリン、N- (p-メチルベンゾイル)- O-メチルセリン、N- (p-メチルベンゾイル)- O-アセチルセリン、N- (2-ナフトイル)- O-メチルセリン等があげられる。

これらの美白成分は、既に市販されているものもあれば、合成により入手することができる。例えば、3- - -エチルアスコルビン酸は、特開平8-134055号公報に記載の公知の方法で合成することが出来る。市販品(日本精化製「VCエチル」)もあるので、これらを入手して使用することが可能である。1-トリフェニルメチルピペリジン、1-トリフェニルメチルピロリジン、2- (トリフェニルメチルオキシ)エタノール、2- (トリフェニルメチルアミノ)エタノール、2- (トリフェニルメチルオキシ)エチルアミン、トリフェニルメチルアミン、トリフェニルメタノール、トリフェニルメタン、アミノジフェニルメタンは特許文献WO2010/074052号パンフレットに、N- (o-トルオイル)システイン酸、N- (m-トルオイル)システイン酸、N- (p-トルオイル)システイン酸、N- (p-メトキシベンゾイル)システイン酸、N- (4-フェニルベンゾイル)システイン酸、N- (p-トルオイル)ホモシステイン酸、はWO2011/058730号パンフレットに、N-ベンゾイル-セリン、N- (p-メチルベンゾイル)セリン、N- (p-エチルベンゾイル)セリン、N- (p-メトキシベンゾイル)セリン、N- (p-フルオロベンゾイル)セリン、N- (p-トリフルオロメチルベンゾイル)セリン、N- (2-ナフトイル)セリン、N- (4-フェニルベンゾイル)セリン、N- (p-メチルベンゾイル)セリン メチルエステル、N- (p-メチルベンゾイル)セリン エチルエステル、N- (2-ナフトイル)セリン メチルエステル、N-ベンゾイル- O-メチルセリン、N- (p-メチルベンゾイル)- O-メチルセリン、N- (p-メチルベンゾイル)- O-アセチルセリン、N- (2-ナフトイル)- O-メチルセリン等はWO2011/074643号パンフレットに、それぞれその合成方法が公開されているので、該開示に従い合成することができる。

化粧料における美白成分の含有量は、通常0.01~30質量%であり、0.1~10質量%が好ましく、1~5質量%がより好ましい。

【0024】

シワ改善成分としては、一般的に化粧料に用いられているものであれば特に限定はない

10

20

30

40

50

。例えば、ビタミンA又はその誘導体が、レチノール、レチナール、レチノイン酸、トレチノイン、イソトレチノイン、レチノイン酸トコフェロール、パルミチン酸レチノール、酢酸レチノールやウルソール酸ベンジルエステル、ウルソール酸リン酸エステル、ベツリシン酸ベンジルエステル、ベンジル酸リン酸エステルが挙げられる。化粧料におけるシワ改善成分の含有量は、通常0.01～30質量%であり、0.1～10質量%が好ましく、1～5質量%がより好ましい。

【0025】

動植物由来の抽出物としては、一般的に医薬品、化粧料、食品等に用いられているものであれば特に限定はない。例えば、アケビエキス、アスナロエキス、アスパラガスエキス、アボガドエキス、アマチャエキス、アーモンドエキス、アルニカエキス、アロエエキス、アロニアエキス、アンズエキス、イチョウエキス、インドキノエキス、ワイキョウエキス、ウドエキス、エイジツエキス、エゾウコギエキス、エンメイソウエキス、オウゴンエキス、オウバクエキス、オウレンエキス、オタネニンジンエキス、オトギリソウエキス、オドリコソウエキス、オレンジエキス、カキョクエキス、カッコンエキス、カモミラエキス、カラットエキス、カワラヨモギエキス、カンゾウエキス、キウイエキス、キューカンバーエキス、グアバエキス、クジンエキス、クチナシエキス、クマザサエキス、クララエキス、クルミエキス、グレープフルーツエキス、黒米エキス、クロレラエキス、クワエキス、ケイケットウエキス、ゲットウヨウエキス、ゲンチアナエキス、ゲンノショウコエキス、紅茶エキス、ゴボウエキス、コメエキス、コメ発酵エキス、コメヌカ発酵エキス、コメ胚芽油、コケモモエキス、サルビアエキス、サボンソウエキス、ササエキス、サンザシエキス、サンシャエキス、サンショウエキス、シイタケエキス、ジオウエキス、シコンエキス、シソエキス、シナノキエキス、シモツケソウエキス、シャクヤクエキス、ショウキヨウエキス、ショウブ根エキス、シラカバエキス、スギナエキス、ステビアエキス、ステビア発酵物、セイヨウキズタエキス、セイヨウサンザシエキス、セイヨウニワトコエキス、セイヨウノコギリソウエキス、セイヨウハッカエキス、セージエキス、ゼニアオイエキス、センキュウエキス、センブリエキス、ソウハクヒエキス、ダイオウエキス、ダイズエキス、タイソウエキス、タイムエキス、タンポポエキス、茶エキス、チョウジエキス、チンピエキス、甜茶エキス、トウガラシエキス、トウキエキス、トウキンセンカエキス、トウニンエキス、トウヒエキス、ドクダミエキス、トマトエキス、納豆エキス、ニンジンエキス、ニンニクエキス、ノバラエキス、ハイビスカスエキス、バクモンドウエキス、ハスエキス、パセリエキス、バーチエキス、ハマメリスエキス、ヒキオコシエキス、ヒノキエキス、ビワエキス、フキタンポポエキス、フキノトウエキス、ブクリョウエキス、ブッチャーブルームエキス、ブドウエキス、ブドウ種子エキス、ヘチマエキス、ベニバナエキス、ペペーミントエキス、ボダイジュエキス、ボタンエキス、ホップエキス、マツエキス、マロニエエキス、ミズバショウエキス、ムクロジエキス、メリッサエキス、モズクエキス、モモエキス、ヤグルマギクエキス、ユーカリエキス、ユキノシタエキス、ユズエキス、ユリエキス、ヨクイニンエキス、ヨモギエキス、ラベンダーエキス、緑茶エキス、リンゴエキス、ルイボス茶エキス、レイシエキス、レタスエキス、レモンエキス、レンギョウエキス、レンゲソウエキス、ローズエキス、ローズマリーエキス、ローマカミツレエキス、ローヤルゼリーエキス、ワレモコウエキス等のエキスが好ましいものとして挙げられる。

化粧料中における動植物由来抽出物の含有量は、通常0.01～30質量%であり、0.1～10質量%が好ましく、1～5質量%がより好ましい。

食品中における動植物抽出物の含有量は、通常0.01～80質量%であり、0.1～50質量%が好ましく、1～30質量%がより好ましい。

【0026】

抗炎症成分としては、クラリノン、グラブリジン、グリチルリチン酸、グリチルレチン酸、パントテニルアルコール等が挙げられ、好ましくは、グリチルリチン酸及びその塩、グリチルレチン酸アルキル及びその塩、並びに、グリチルレチン酸及びその塩である。

化粧料中における抗炎症成分の含有量は、通常0.01～30質量%であり、0.1～10質量%が好ましく、1～5質量%がより好ましい。

10

20

30

40

50

【0027】

油性成分としては、極性油、揮発性炭化水素油等が挙げられる。

極性油としては、合成エステル油として、ミリスチン酸イソプロピル、オクタン酸セチル、ミリスチン酸オクチルドデシル、パルミチン酸イソプロピル、ステアリン酸ブチル、ラウリン酸ヘキシル、ミリスチン酸ミリスチル、オレイン酸デシル、ジメチルオクタン酸ヘキシルデシル、乳酸セチル、乳酸ミリスチル、酢酸ラノリン、ステアリン酸イソセチル、イソステアリン酸イソセチル、12-ヒドロキシステアリル酸コレステリル、ジ-2-エチルヘキシル酸エチレングリコール、ジペンタエリスリトール脂肪酸エステル、モノイソステアリン酸N-アルキルグリコール、ジカプリン酸ネオベンチルグリコール、リンゴ酸ジイソステアリル、ジ-2-ヘプチルウンデカン酸グリセリン、トリ-2-エチルヘキシル酸トリメチロールプロパン、トリイソステアリン酸トリメチロールプロパン、テトラ-2-エチルヘキシル酸ペンタンエリスリトール、トリ-2-エチルヘキシル酸グリセリン、トリイソステアリン酸トリメチロールプロパンを挙げることができる。
10

【0028】

さらに、セチル2-エチルヘキサノエート、2-エチルヘキシルパルミテート、トリミリスチン酸グリセリン、トリ-2-ヘプチルウンデカン酸グリセライド、ヒマシ油脂肪酸メチルエステル、オレイン酸オイル、セトステアリルアルコール、アセトグリセライド、パルミチン酸2-ヘプチルウンデシル、アジピン酸ジイソブチル、N-ラウロイル-L-グルタミン酸-2-オクチルドデシルエステル、アジピン酸ジ-2-ヘプチルウンデシル、エチルラウレート、セバチン酸ジ-2-エチルヘキシル、ミリスチン酸2-ヘキシルデシル、パルミチン酸2-ヘキシルデシル、アジピン酸2-ヘキシルデシル、セバチン酸ジイソブチル、コハク酸2-エチルヘキシル、酢酸エチル、酢酸ブチル、酢酸アミル、クエン酸トリエチル、オクチルメトキシシンナメート等も挙げられる。
20

【0029】

また、天然油として、アボガド油、ツバキ油、タートル油、マカデミアナッツ油、トウモロコシ油、ミンク油、オリーブ油、ナタネ油、卵黄油、ゴマ油、パーシック油、小麦胚芽油、ザザンカ油、ヒマシ油、アマニ油、サフラワー油、綿実油、エノ油、大豆油、落花生油、茶実油、カヤ油、コメヌカ油、シナギリ油、日本キリ油、ホホバ油、胚芽油、トリグリセリン、トリオクタン酸グリセリン、トリイソパルミチン酸グリセリン等が挙げられる。
30

【0030】

揮発性炭化水素油としては、イソドデカン、イソヘキサデカン等が挙げられる。

【0031】

界面活性剤としては、脂肪酸セッケン（ラウリン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム等）、ラウリル硫酸カリウム、アルキル硫酸トリエタノールアミンエーテル等のアニオニン界面活性剤類、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、ラウリルアミンオキサイド等のカチオン界面活性剤類、ベタイン系界面活性剤（アルキルベタイン、アミドベタイン、スルホベタイン等）、イミダゾリン系両性界面活性剤（2-ココイル-2-イミダゾリニウムヒドロキサイド-1-カルボキシエチロキシ2ナトリウム塩等）、アシルメチルタウリン等の両性界面活性剤類、ソルビタン脂肪酸エステル類（ソルビタンモノステアレート、セスキオレイン酸ソルビタン等）、グリセリン脂肪酸類（モノステアリン酸グリセリン等）、プロピレングリコール脂肪酸エステル類（モノステアリン酸プロピレングリコール等）、硬化ヒマシ油誘導体、グリセリンアルキルエーテル、POEソルビタン脂肪酸エステル類（POEソルビタンモノオレエート、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン等）、POEソルビット脂肪酸エステル類（POE-ソルビットモノラウレート等）、POEグリセリン脂肪酸エステル類（POE-グリセリンモノイソステアレート等）、POE脂肪酸エステル類（ポリエチレングリコールモノオレート、POEジステアレート等）、POEアルキルエーテル類（POE2-オクチルドデシルエーテル等）、POEアルキルフェニルエーテル類（POEノニルフェニルエーテル等）、プルロニック型類、POE・POPアルキルエーテル類（POE・POP2-デシ
40
50

ルテトラデシルエーテル等)、テトロニック類、POEヒマシ油・硬化ヒマシ油誘導体(POEヒマシ油、POE硬化ヒマシ油等)、ショ糖脂肪酸エステル、アルキルグルコシド等の非イオン界面活性剤類、等が挙げられる。

【0032】

多価アルコールとしては、ポリエチレングリコール、グリセリン、1,3-ブチレングリコール、エリスリトール、ソルビトール、キシリトール、マルチトール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ジグリセリン、イソブレングリコール、1,2-ペンタンジオール、2,4-ヘキシレングリコール、1,2-ヘキサンジオール、1,2-オクタンジオール等が挙げられる。

【0033】

増粘剤としては、グアガム、クインスシード、カラギーナン、ガラクタン、アラビアガム、ペクチン、マンナン、デンプン、キサンタンガム、カードラン、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、グリコーゲン、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、トラガントガム、ケラタン硫酸、コンドロイチン、ムコイチン硫酸、ヒドロキシエチルグアガム、カルボキシメチルグアガム、デキストラン、ケラト硫酸、ローカストビーンガム、サクシノグルカン、カロニン酸、キチン、キトサン、カルボキシメチルキチン、寒天、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルキル変性カルボキシビニルポリマー、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ベントナイト等が挙げられる。

【0034】

粉体類としては、表面を処理されていても良い、マイカ、タルク、カオリン、合成雲母、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、無水ケイ酸(シリカ)、酸化アルミニウム、硫酸バリウム等の粉体類、表面を処理されていても良い、ベンガラ、黄酸化鉄、黒酸化鉄、酸化コバルト、群青、紺青、酸化チタン、酸化亜鉛の無機顔料類、表面を処理されていても良い、雲母チタン、魚鱗箔、オキシ塩化ビスマス等のパール剤類、レーキ化されていても良い赤色202号、赤色228号、赤色226号、黄色4号、青色404号、黄色5号、赤色505号、赤色230号、赤色223号、橙色201号、赤色213号、黄色204号、黄色203号、青色1号、緑色201号、紫色201号、赤色204号等の有機色素類、ポリエチレン末、ポリメタクリル酸メチル、ナイロン粉末、オルガノポリシロキサンエラストマー等の有機粉体類、が挙げられる。

【0035】

紫外線吸収剤としては、パラアミノ安息香酸系紫外線吸収剤、アントラニル酸系紫外線吸収剤、サリチル酸系紫外線吸収剤、桂皮酸系紫外線吸収剤、ベンゾフェノン系紫外線吸収剤、糖系紫外線吸収剤、2-(2'-ヒドロキシ-5'-t-オクチルフェニル)ベンゾトリアゾール、4-メトキシ-4'-t-ブチルジベンゾイルメタン等の紫外線吸収剤類、等が挙げられる。

【0036】

また、化粧料として適用される場合の剤型は、通常知られているローション剤形、乳液剤形、エッセンス剤形、クリーム剤形、粉体含有剤形の何れをも取ることが出来る。

【実施例】

【0037】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0038】

<被験物質>

本技術分野において、抗老化効果が既に知られている、YACエキス(例えば特開2010-138152参照)、アマチャエキス(例えば特開2014-214139参照)、ヤグルマソウエキス(例えば、特開2006-028099参照)、NAOエキス(「ファレロール」とも称する。例えばWO2007/094384参照)を被験物質として

10

20

30

40

50

準備した。これらを表2に示す。なお、各エキスの濃度は、それぞれ、次の通りである。YACエキス：特開2010-138152のアモルファス「分画7」として、1.0質量%（溶媒：35%エタノール）。

アマチャエキス：特開2014-214139の製造例により得られた固形分の植物抽出物として、1.0質量%（溶媒：55%エタノール）。

ヤグルマソウエキス：特開2006-028099の製造例2により得られたアモルファスとして、1.0質量%（溶媒：55%1、3ブチレングリコール）。

NAOエキス：ファレロールとして、0.01質量%（溶媒：85%1、3ブチレングリコール）。

【0039】

10

【表2】

表2

番号	被験物質
①	YACエキス
②	アマチャエキス
③	ヤグルマソウエキス
④	NAOエキス

【0040】

20

<実施例1>

正常ヒト皮膚線維芽細胞を、24穴プレート（BD Falcon社製）に50000cells/wellになる様に播種し、10%FBS/DMEM（FBS：ハナ・ネスコバイオ社製、DMEM：シグマアルドリッヂ社製）で24時間培養する。その後表2に示すそれぞれの被験物質を所定濃度にてそれぞれ0.5mL加え、さらに24時間培養し、RNeasy Mini Kit（キアゲン社製）を用いてotal RNAを抽出し、SuperScript VILO cDNA synthesis Kit（ライフテクノロジーズ製、配列非公開）を用いてcDNAを合成し、Step One Plus（ライフテクノロジーズ製）にてIPWのプライマー（キアゲン社製、配列非公開）を用いてIPWの発現量を解析した。得られたIPWの発現量と、被験物質を添加しなかったコントロールの発現量を比較し、その変化を確認した。

30

その結果、IPWの発現量が変化した被験物質を、皮膚老化抑制素材として選択した。結果を下記表3に示す。

【0041】

<実施例2～5>

実施例1のスクリーニング方法において、IPWの代わりに、それぞれLoc100292680（実施例2）、SNHG5（実施例3）、HOTAIR（実施例4）、NESPA（実施例5）を用いて、同様のスクリーニングを行った。

【0042】

なお、本発明のスクリーニング方法において、コントロールと比較して変化ありとの評価（表3中「」）は、加齢により発現が抑制されるLncRNAを用いた場合はコントロールに比べて発現量が1.2倍以上である場合をいう。又、加齢により発現が亢進されるLncRNAを用いた場合はコントロールに比べて発現量が0.8倍以下である場合をいう。即ち、加齢により発現が抑制されるLncRNAの発現量がコントロールの1.2倍未満である場合、又は加齢により発現が亢進されるLncRNAの発現量がコントロールの0.8倍を超える場合には、コントロールと比較して変化なしとの評価（表3中「×」）がなされる。

40

実施例1～3は加齢により発現が抑制されるLncRNAを用いており（表1参照）、実施例4及び5は、加齢により発現が亢進されるLncRNAを用いている（表1参照）。

【0043】

50

【表3】

表3

被験物質		用いたLncRNAの種類				
		加齢により発現抑制			加齢により発現亢進	
		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
①	対コントロール	1.34	1.35	1.20	1.02	0.78
	評価	○	○	○	×	○
②	対コントロール	1.05	0.83	1.15	0.68	1.28
	評価	×	×	×	○	×
③	対コントロール	1.28	1.22	1.34	1.32	2.02
	評価	○	○	○	×	×
④	対コントロール	1.18	1.30	1.32	1.28	1.72
	評価	×	○	○	×	×

10

【0044】

<被験物質の抗老化効果>

前記特開2010-138152の実施例を参照すれば、YAC化合物を配合した化粧料は、皮膚の紅斑抑制効果、即ち光損傷抑制効果を奏することが示されている。前記特開2014-214139の実施例を参照すれば、アマチャエキスを配合した皮膚外用剤はシワ改善効果を発揮することが示されている。特開2006-28099の実施例を参照すれば、ヤグルマソウエキスを配合した皮膚外用剤は、抗炎症効果を奏することが示されている。又、前記WO2007/094384の実施例を参照すれば、NAOエキス(ファレロール)を含有する皮膚外用剤は、シワ改善効果を奏することが示されている。

従って、本発明のスクリーニング方法で皮膚老化抑制素材として選択されたものは、皮膚老化抑制効果を示すことが確認できる。

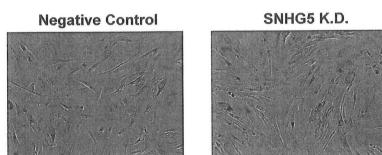
20

【産業上の利用可能性】

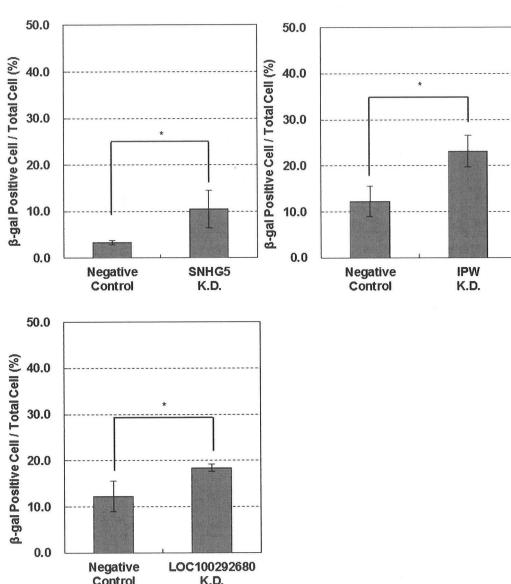
【0045】

本発明により、LncRNAを指標として、新たな皮膚老化抑制素材のスクリーニング方法を提供できる。

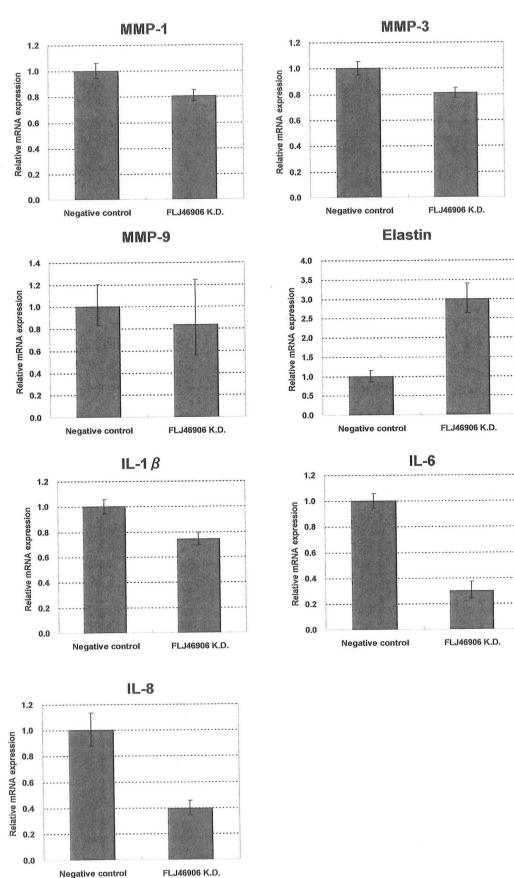
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 竹内 啓貴

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町 560 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内

(72)発明者 宮戸 まゆみ

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町 560 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内

(72)発明者 五味 貴優

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町 560 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2013 / 0252845 (U S , A 1)

Aging Cell, 2013, 12(5), pp.890-900, Epub 2013 Jul 14

J. Invest. Dermatol., 2013, 133(2), pp.394-402, Published online 2012 Aug 30

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 Q 1 / 68 - 1 / 6897

C 12 N 15 / 00 - 15 / 90

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

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