



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201216973 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：100133493

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K35/36 (2006.01)

A61K35/12 (2006.01)

A61P17/18 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/17 日本

2010-209705

(71)申請人：資生堂股份有限公司 (日本) SHISEIDO COMPANY, LTD. (JP)

日本

(72)發明人：相馬勤 SOMA, TSUTOMU (JP)；山西治代 YAMANISHI, HARUYO (JP)；石松弓子 ISHIMATSU, YUMIKO (JP)

(74)代理人：陳長文

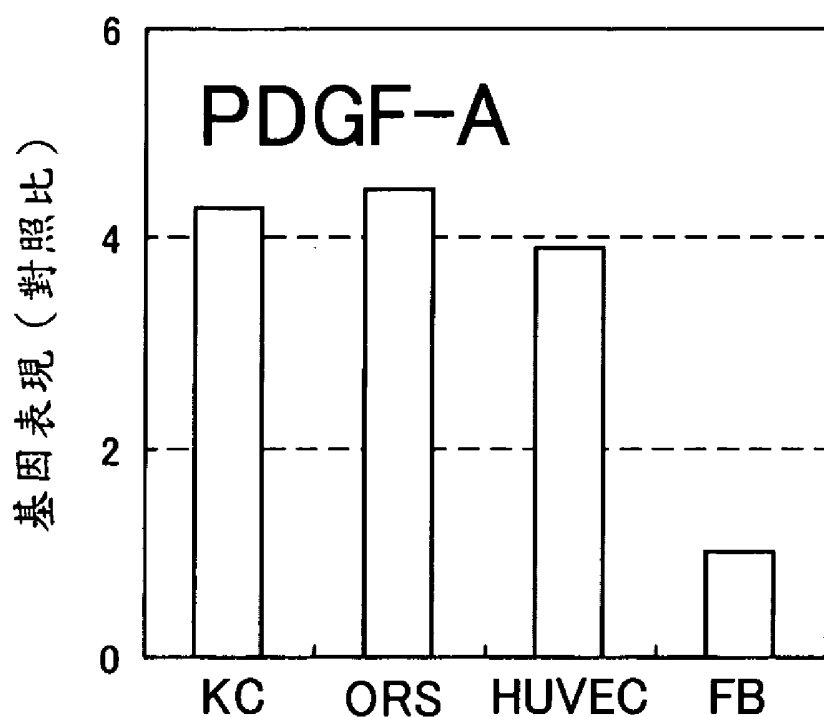
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：3 項 圖式數：8 共 33 頁

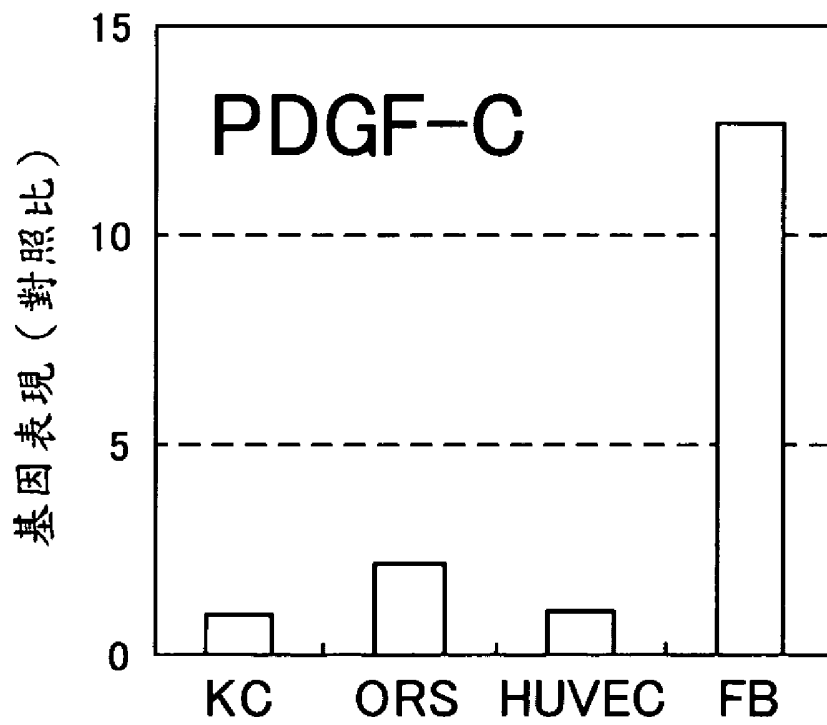
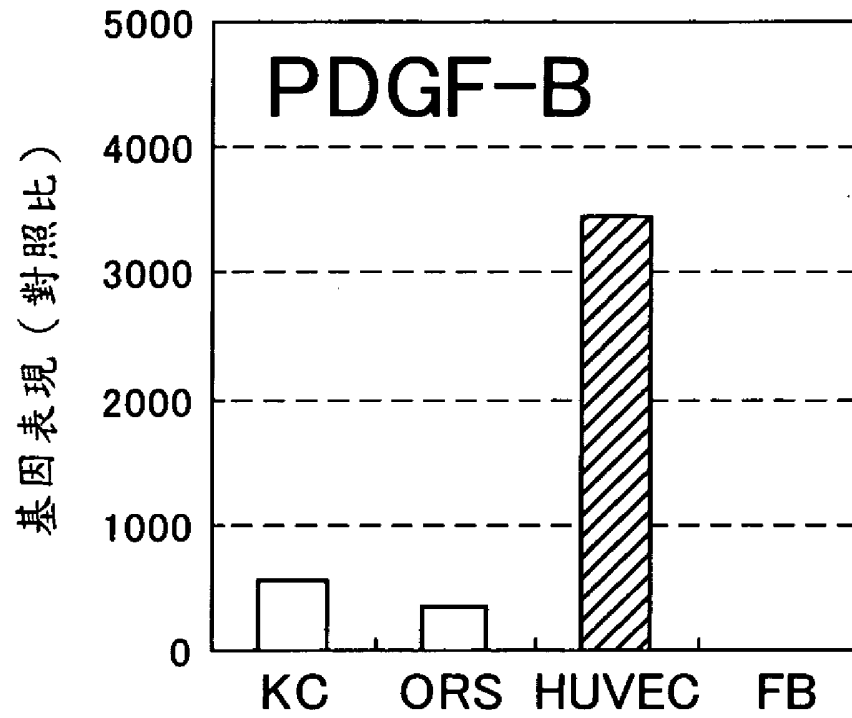
(54)名稱

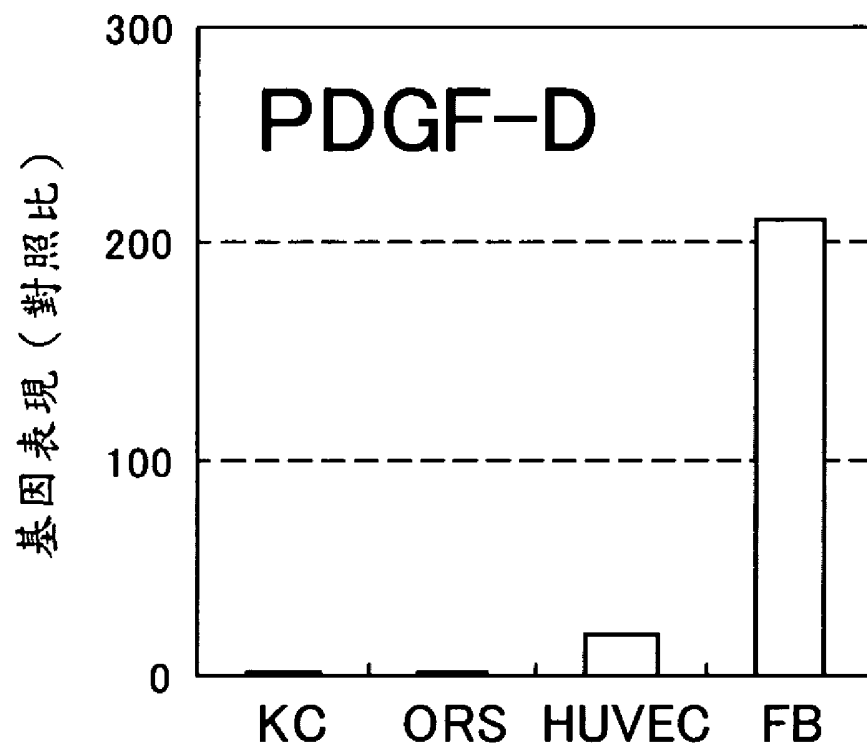
藉由 PDGF-BB 活性促進之皮膚活化

(57)摘要

本發明係一種方法，其特徵在於：其係篩選使皮膚活化之藥劑之方法，且選擇使候補藥劑作用於血管內皮細胞，從而促進上述細胞之 PDGF-BB 之表現之藥劑作為皮膚活化劑。









(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201216973 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：100133493

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 09 月 16 日

(51)Int. Cl. : A61K35/36 (2006.01)

A61K35/12 (2006.01)

A61P17/18 (2006.01)

(30)優先權：2010/09/17 日本

2010-209705

(71)申請人：資生堂股份有限公司 (日本) SHISEIDO COMPANY, LTD. (JP)

日本

(72)發明人：相馬勤 SOMA, TSUTOMU (JP)；山西治代 YAMANISHI, HARUYO (JP)；石松弓子 ISHIMATSU, YUMIKO (JP)

(74)代理人：陳長文

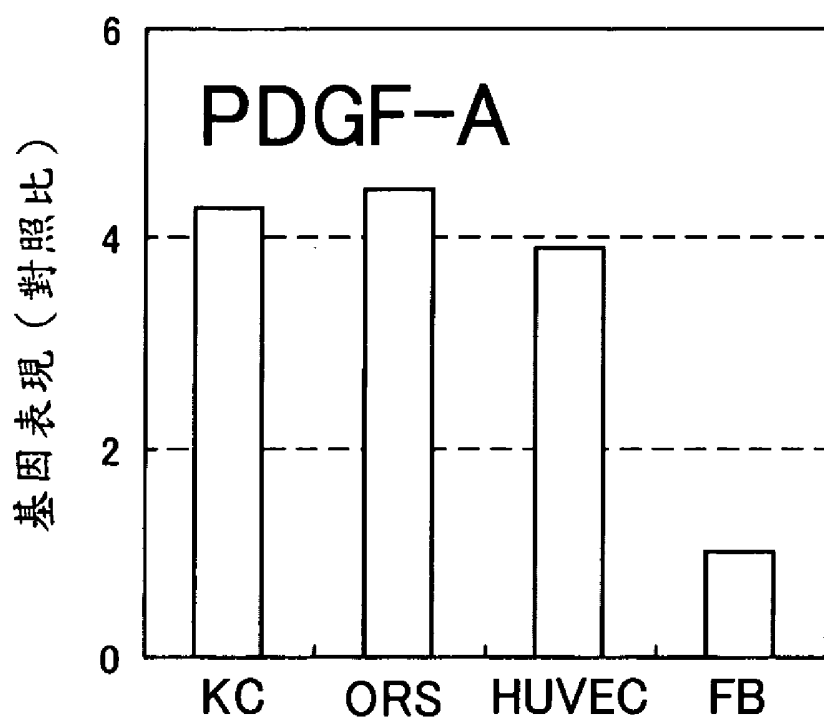
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：3 項 圖式數：8 共 33 頁

(54)名稱

藉由 PDGF-BB 活性促進之皮膚活化

(57)摘要

本發明係一種方法，其特徵在於：其係篩選使皮膚活化之藥劑之方法，且選擇使候補藥劑作用於血管內皮細胞，從而促進上述細胞之 PDGF-BB 之表現之藥劑作為皮膚活化劑。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種藉由血小板衍生成長因子-BB(PDGF-BB)活性促進之皮膚活化法。

【先前技術】

幹細胞係兼具產生分化成複數個細胞之細胞之多分化能力、與藉由細胞分裂產生與該細胞相同之細胞之自我複製能力的2種性質之細胞。來自受精卵之初始之產生階段即胚的幹細胞稱為胚胎幹細胞(ES細胞, Embryonic Stem cell)。雖然期待將人類ES細胞用於再生醫學, 但就利用受精卵之倫理上之問題而言, 未允許製作新的人類ES細胞。

近年來, 作為具有與ES細胞類似之性質之細胞, 人工多能幹細胞(iPS細胞, induced Pluripotent Stem cell, 誘導性多功能幹細胞)亦備受注目。然而, 於iPS細胞之製作時, 就細胞之癌化、製作效率等之觀點而言有較多之問題。另一方面, 具有分化成特定組織之能力之體性幹細胞由於自患者自身之身體組織例如骨髓中獲得, 故並無如胚胎幹細胞之倫理上之問題。

眾所周知於皮膚之表皮基底層中存在表皮幹細胞(非專利文獻1), 又, 報告有於毛囊之稱為凸出區域之區域中存在毛囊上皮幹細胞(非專利文獻2)或皮膚色素幹細胞(非專利文獻3)。另一方面, 關於真皮, 於以膠原蛋白作為主體之纖維成分中存在成細長之紡錘形之纖維母細胞, 但並不明確於真皮之纖維母細胞中是否存在幹細胞。又, 雖然已

知於真皮中存在分化成脂肪、神經膠質、軟骨、肌肉等複數個細胞系列之皮膚衍生前驅細胞 (skin-derived precursors: SKP)(非專利文獻4)，但並不明確真皮纖維母細胞與SKP之關聯。

作為纖維母細胞之前驅細胞而自骨髓中分離之間葉系幹細胞(非專利文獻5)由於分化成屬於間葉系之各種細胞(骨細胞、肌肉細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞等)，故期待應用於骨或血管、肌肉之再成型等再生醫學中。最近，日益明確有間葉系幹細胞於很多具有間葉系組織之組織中存在之可能性，且亦可自脂肪或臍帶血、胎盤等中離析間葉系幹細胞(非專利文獻6-8)。然而，依然未明確於真皮中之間葉系幹細胞之存在。

[先前技術文獻]

[非專利文獻]

[非專利文獻1] Watt FM, J Dermatol Sci. 28: 173-180, 2002

[非專利文獻2] Cotsarelis G et al., Cell. 57: 201-209, 1989

[非專利文獻3] Nishimura EK et al., Nature. 416: 854-860, 2002

[非專利文獻4] Wong CE al., J Cell Biol. 175: 1005-1015, 2006

[非專利文獻5] Pittenger MF et al., Science. 284: 143-147, 1999

[非專利文獻6] Park KW et al., Cell Metab. 8: 454-457, 2008

[非專利文獻7] Flynn A, et al., Cytotherapy. 9: 717-726, 2007

[非專利文獻8] Igura K et al., Cytotherapy. 6: 543-553, 2004

[非專利文獻9] Kim WS et al., J Dermatol Sci. 53: 96-102, 2009

[非專利文獻10] Dalla-Favera R et al., Nature 292: 31-35, 1981

【發明內容】

已明確間葉系幹細胞除存在於骨髓、臍帶血、胎盤中之外亦存在於脂肪中。已明確於真皮中亦與其下之皮下脂肪中同樣地存在間葉系幹細胞，進而局部存在於血管部位。然而，依然不清楚該等真皮或脂肪之間葉系幹細胞局部存在於血管部位之機制、或該等幹細胞之因老化所引起之增減。因此，本發明之課題在於提供一種藉由明確因老化所引起之真皮及皮下脂肪中之間葉系幹細胞之增減，並且調節與該等部位中之間葉系幹細胞之維持相關之因子而改善皮膚狀態之方法。

由於骨髓之間葉系幹細胞非常少，且臍帶血或胎盤限定對象，故作為來自自身之間葉系幹細胞源有極限。只要可自真皮中離析間葉系幹細胞，則皮膚可成為再生醫學或美容醫學所使用之間葉系幹細胞之珍貴之供給源。因此，我

等明確於真皮中亦與皮下脂肪中同樣地存在間葉系幹細胞，並且確立效率良好地自真皮中離析間葉系幹細胞之方法(日本專利特願2009-213291)。由於依然不清楚該等真皮或皮下脂肪之間葉系幹細胞局部存在於血管部位之機制、或該等幹細胞之因老化所引起之增減，故本發明者為了更詳細明確於真皮或者皮下脂肪中存在間葉系幹細胞之部位，並且明確使間葉系幹細胞定域之因子，進行了研究，結果明確係PDGF-BB參與其中。顯示出CD34陽性之真皮或皮下脂肪之間葉系幹細胞隨著老化而減少，同樣地PDGF-B之基因表現亦隨著老化而減少。報告有藉由將來自脂肪之間葉系幹細胞注入老化皮膚中，而改善皺紋等皮膚老化之效果(非專利文獻9)。或者，已知來自脂肪之間葉系幹細胞於皮膚中發揮抗氧化功能。由該等情況可知，藉由於真皮或皮下脂肪之間葉系幹細胞定域之血管部位更具體而言高表現出PDGF-BB之血管內皮細胞中提高內因性PDGF-BB之表現，且保持較多之真皮或皮下脂肪中之間葉系幹細胞，從而可抑制皮膚老化。

因此，本申請案包含下述之發明。

[1]一種方法，其特徵在於：其係篩選使皮膚活化之藥劑之方法，且選擇使候補藥劑作用於血管內皮細胞，從而促進上述細胞之PDGF-BB之表現之藥劑作為皮膚活化劑。

[2]如[1]之方法，其中上述測定係藉由利用即時聚合酶鏈方法測定細胞中之來自PDGF-B之mRNA而實施。

[3]一種方法，其係藉由於皮膚之血管部位增加PDGF-

BB活性或量，而活化間葉系幹細胞，故而活化皮膚，從而抑制皮膚之老化。

[4]如[3]之方法，其係藉由將視黃酸應用於需要抑制老化之皮膚而成。

根據本發明，可鑑定新穎之皮膚活化劑。

【實施方式】

本發明係關於一種方法，其特徵在於：其係篩選使皮膚活化之藥劑之方法，且選擇使候補藥劑作用於血管內皮細胞，從而促進上述細胞之PDGF-BB之表現之藥劑作為皮膚活化劑。

血小板衍生成長因子係參與纖維母細胞、平滑肌細胞、神經膠質細胞等間葉系細胞之趨化及增殖等之調節之增殖因子，且由上皮細胞或內皮細胞等各種細胞產生。於PDGF中存在PDGF-A、B、C及D之至少4種，但A鏈及B鏈係藉由形成雙硫鍵而獲得同型或者異型二聚物結構，且具有3種同功異構物(PDGF-AA、AB、BB)。已知PDGF係經由作為酪胺酸激酶關聯型之PDGF受體(PDGFR)而表現其生理作用。PDGF-B之基因為公知，且可進行基因選殖(非專利文獻10)。

於本發明中所使用之間葉系細胞可來自所有之哺乳動物例如人類、黑猩猩、其他靈長類，家畜動物例如狗、貓、兔子、馬、綿羊、山羊、牛、豬，其他實驗用動物例如大鼠、小鼠、豚鼠等之真皮。

所謂本發明中敘述之皮膚之活化並未特別限定，通常係

指皮膚組織之新陳代謝變得活躍，且代謝回轉週期相對較短，從而成為組織疲勞或萎縮、氧化之進行等較慢之狀態。藉由皮膚之活化，可保持肌膚之緊致，防止小皺紋之形成、褐斑之形成等，或改善該等。

血管內皮細胞中之PDGF-BB基因之表現，例如可藉由測定PDGF-BB之量而決定。較佳為該測定可利用對PDGF-BB特異之抗體，並藉由業界眾所周知之方法例如利用螢光物質、色素、酶等之免疫染色法，西方墨點法，免疫測定方法例如ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay，酶聯結免疫吸附劑分析)法，RIA(radio immuno assay，放射免疫分析)法等各種方法而實施。又，例如亦可藉由提取血管內皮細胞中之總RNA(Ribonucleic Acid，核糖核酸)，並測定編碼PDGF-B之mRNA之量而決定。mRNA之提取、其量之測定亦為業界眾所周知，例如RNA之定量可藉由定量聚合酶鏈反應(PCR，polymerase chain reaction)法例如即時聚合酶鏈反應(RT-PCR，real time-polymerase chain reaction)而進行。適於RT-PCR之引子之選擇可藉由業者眾所周知之方法而實施。

又，本發明者發現視黃酸會促進PDGF-BB之發明。因此，皮膚活化劑之選擇例如可經由統計學之方法，調查於使用例如視黃酸之具有PDGF-BB之表現促進效果之藥劑等之陽性對照組與使用具有PDGF-BB表現抑制效果之藥劑例如PDGF-B基因之siRNA等之陰性對照組之對比時，候補藥劑是否促進PDGF-BB之表現而進行。

本發明進而對候補藥劑對於血管內皮細胞中之編碼PDGF-B(序列編號1)之多核苷酸，促進可於高嚴格條件下雜交之多核苷酸之表現之能力進行評價，提供一種特徵在於：選擇具有該促進能力之候補藥劑作為皮膚活化劑之方法。雜交可依據眾所周知之方法或根據其之方法例如J. Sambrook 等人之 Molecular Cloning 2nd, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989中記載之方法而進行，並且所謂高嚴格之雜交條件係指包括例如鈉濃度約為10~40 mM、較佳約為20 mM，溫度約為50~70°C、較佳約為60~65°C之條件。

本發明進而係關於一種美容學之方法，其係藉由於皮膚之血管部位增加PDGF-BB活性或量，而使促進活性或增加表現量之PDGF-BB作用於間葉系幹細胞，其結果活化該間葉系幹細胞並活化皮膚，故而抑制皮膚老化。如上述所述，本發明者發現視黃酸尤其維甲酸促進PDGF-BB之發明。因此，該方法例如藉由將視黃酸應用於需要抑制老化之皮膚而實施。

又，試驗體中之編碼PDGF-B之基因處於惰性狀態或沉默狀態，其結果於細胞處於PDGF-B缺損或缺陷狀態時，為了將PDGF-B基因自身導入細胞內，可使用組入有PDGF-BB基因之載體，從而增加PDGF-BB之活性或量。較佳為於該載體中，將促進PDGF-B基因之表現之調節序列例如啟動子或促進子配置於對PDGF-B基因而言可動作之位置。

作為將PDGF-B基因導入細胞內之方法，亦可應用利用病毒載體之基因導入方法、或者非病毒性之基因導入方法(Nikkei Science, 1994年4月號, 第20-45頁, 實驗醫學增刊, 12(15)(1994), 實驗醫學附冊「基因治療之基礎技術」, 羊土公司(1996))中之任一方法。作為藉由病毒載體之基因導入方法, 例如可列舉將編碼PDGF-B之DNA組入反轉錄病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、痘病毒、脊髓灰白質炎病毒、新培斯病毒等DNA病毒或RNA病毒中而導入之方法。其中, 尤其較佳為使用反轉錄病毒、腺病毒、腺病毒相關病毒、牛痘病毒之方法。作為非病毒性之基因導入方法, 可列舉將表現質體直接投予肌肉內之方法(DNA疫苗法)、脂質體法、微脂體法、顯微注射法、磷酸鈣法、電穿孔法等, 尤其較佳為DNA疫苗法、脂質體法。又, 為了將上述基因實際用作醫藥, 有將DNA直接導入體內之in vivo(體內)法、及自人體中提取某種細胞並於體外將DNA導入該細胞中, 且將該細胞返回體內之ex vivo(體外)法(Nikkei Science, 1994年4月號, 第20-45頁, 月刊藥事, 36(1), 23-48 (1994), 實驗醫學增刊, 12(15)(1994))。更佳為in vivo法。於藉由in vivo法進行投予之情形時, 例如可投予至靜脈、動脈、皮下、皮內、肌肉內等。於藉由in vivo法進行投予之情形時, 通常製成注射劑等, 亦可視需要加入慣用之載體。又, 於製成脂質體或膜融合脂質體(仙台病毒(HVJ, Hemagglutinating virus of Japan)-脂質體等)之形態之情形時, 可製成懸浮

劑、冷凍劑、離心分離濃縮冷凍劑等脂質體製劑。

[實施例]

繼而，根據實施例對本發明進行進一步詳細說明。再者，本發明並非限定於此。

實驗方法

人體皮膚構成細胞中之PDGF-B基因表現量之測定

藉由定量PCR法調查人體皮膚之構成細胞中之PDGF-B基因表現量。表皮角化細胞KC及作為毛囊上皮細胞之外毛根鞘細胞ORSC係使用Epilife-KG2培養基(Kurabo)進行增殖培養，皮膚纖維母細胞FB係使用添加有10% FBS之DMEM培養基(Invitrogen)進行增殖培養，人體血管內皮細胞HUVEC係使用EGM-2培養基(三光純藥)進行增殖培養。將各細胞回收至Isogen(等基因)(Nippongene)，依據所提供之操作說明提取總RNA。純化之總RNA之濃度係藉由核酸定量裝置Nanodrop(Thermo scientific)進行測定。關於各樣品，使用等量之總RNA，並藉由無規引子(Invitrogen)與反轉錄酶Superscript III(Invitrogen)，依據Invitrogen公司之指南合成cDNA。將所合成之cDNA放入鑄模內並使用反應試劑LightCycler FastStart DNA Master PLUS SYBR Green (Roche)、反應裝置LightCycler(Roche)進行定量PCR。組成條件依據Roche之操作說明。又，PCR之條件設為初始改質95℃下10分鐘、改質95℃下10秒鐘、退火60℃下10秒鐘、延伸72℃下10秒鐘。所使用之引子之序列如以下所述，使用LightCycler之附屬之軟體，測定PDGF基因之表

現量。

PDGF-A：

正向引子：5'-ATACCTCGCCCATGTTCTG-3'(序列編號1)

反向引子：5'-GATGCTTCTCTTCCTCCGAA-3'(序列編號2)

PDGF-B：

正向引子：5'-CTTTAAGAAGGCCACGGTGA-3'(序列編號3)

反向引子：5'-CTTCAGTGCCGTCTTGTCAT-3'(序列編號4)

PDGF-C：

正向引子：5'-TATATTAGGGCGCTGGTGTG-3'(序列編號5)

反向引子：5'-ATTAAGCAGGTCCAGTGGCA-3'(序列編號6)

PDGF-D：

正向引子：5'-TGGGAATCTGTCACAAGCTC-3'(序列編號7)

反向引子：5'-CTTTTGACTTCCGGTCATGG-3'(序列編號8)

G3PDH：

正向引子：5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'(序列編號9)

反向引子：5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'(序列編號10)

再者，G3PDH用作內部標準，於各基因各自之定量時，使用其修正對照群之cDNA量。

趨化能力之評價

購入市售之來自脂肪之間葉系幹細胞MSC並於間葉系幹細胞用培養基MesenPro(Invitrogen)中進行繼代培養。繼而，於24孔培養盤中向無血清之MSC用培養基StemPro培養基(Invitrogen)中加入濃度5~30 ng/ml之PDGF-AA、PDGF-AB或者PDGF-BB(R & D Systems)，於其上放置纖維結合蛋白塗覆細胞插管(BD bioscience)，並於StemPro培養基中播種50,000個懸浮之MSC。於CO₂培養箱中培養一晚後，將培養液抽吸去除。繼而，將細胞插管浸漬於Hoechst 33258-PBS溶液中10分鐘，並將於細胞插管上接著之細胞之核染色。於用PBS清洗後，於螢光顯微鏡下觀察細胞插管之背面側並拍攝影像。關於各細胞插管，無規則地拍攝5段影像，計數移動之細胞之數量。

人體皮膚組織中之PDGF-BB之定域部位

將人體皮膚組織包埋於冷凍組織包埋劑OTC化合物(Sakura Finetek Japan)中，藉由冷凍切片製作裝置低溫恆溫器(Leica)製作50 μm之冷凍切片。使用於-20℃下冷卻15分鐘之冷丙酮，於室溫下將室溫下風乾之冷凍切片固定15分鐘。繼而，藉由TBS清洗後，利用無血清阻斷試劑(DAKO)進行30分鐘阻斷處理，使利用含3% BSA之TBST稀釋成100倍之兔子Anti(抗)-人類PDGF-BB抗體(Abcam)與綿羊Anti-人類CD31抗體(R & D systems)於4℃下反應一晚。於藉由TBST進行40分鐘2次、藉由TBS進行40分鐘1次之總計3次之清洗後，使利用含3% BSA之TBST稀釋200倍之Alexa 488標記-anti-sheep(綿羊) IgG與Alexa 594標記-anti-

rabbit(兔子) IgG標記之二次抗體(Invitrogen)反應1小時。將反應後之切片藉由TBST進行40分鐘2次、藉由TBS進行40分鐘1次之總計3次清洗後，藉由Hoechst 33258進行核染色後，使用共軛焦螢光顯微鏡LSM5 PASCAL(Zeiss)進行觀察及影像輸入。

血管內皮細胞管形成分析

於使用In Vitro Angiogenesis Assay Kit(體內血管生成分析套組)塗覆而成之8孔Chamber Slide中播種用紅色螢光色素(PKH26 RED FLUORESCENT, Sigma)標記之HUVEC、用綠色螢光色素(PKH67 GREEN FLUORESCENT, Sigma)標記之MSC後，於5%CO₂存在下、於37°C下培養12小時。使用共軛焦螢光顯微鏡LSM5 PASCAL(Zeiss)，對所形成之管之狀態進行觀察並拍攝影像。又，小鼠抗PDGF受體中和抗體(R & D Systems)或同型之一致之小鼠IgG以5 µg/ml之濃度而使用。

藉由定量PCR法之人體皮膚中之PDGF基因表現量之測定

將人體皮膚組織於液態氮下冷凍，使用Cryo Press(Microtek-Nition)於液態氮之冷卻下進行組織之破碎處理。將樣品回收至Isogen(Nippongene)中，使用所提供之操作說明提取皮膚之總RNA。PDGF-B基因之表現量係使用以下之引子，並利用與上述相同之方法進行。

PDGF-B：

正向引子：5'-CCTGGCATGCAAGTGTGA-3'(序列編號11)

反向引子：5'-CCAATGGTCACCCGATTT-3'(序列編號12)

皮膚中之人類間葉系幹細胞之染色

藉由福馬林-磷酸緩衝液將人類皮膚組織固定1週後，使用自動包埋機(Sakura Finetek Japan)包埋於石蠟中。藉由切片機(Leica)自所獲得之人體皮膚石蠟塊中製作6 μm 之組織切片，貼附於APS塗覆載玻片並於伸展機(Sakura Finetek Japan)上進行伸展、乾燥。關於所製作之皮膚組織載玻片，進行藉由二甲苯之脫石蠟與藉由乙醇/水系列之親水處理，進而利用TBS緩衝液進行沖洗後，使其與20 $\mu\text{g/ml}$ 之Proteinase K(Roche)於37°C下進行15分鐘之酶反應處理而使CD34抗原活化。繼而，藉由TBST充分清洗後，利用無血清阻斷試劑(DAKO)進行15分鐘阻斷處理，使其與利用含3% BSA之TBST稀釋成500倍之小鼠抗-人類CD34抗體(克隆QBEND-10, Abcam)於室溫下反應1小時。藉由TBST進行15分鐘2次、藉由TBS進行15分鐘1次之總計3次之清洗後，使其與抗小鼠抗體用染色試劑(Histofine小鼠染色套組, Nichirei)反應15分鐘。繼而，將反應後之切片藉由TBST進行15分鐘2次、藉由TBS進行15分鐘1次之總計3次清洗後，使其與過氧化酶標記抗生蛋白鏈菌素(Nichirei)反應15分鐘。將反應後之切片藉由TBST進行15分鐘2次、藉由TBS進行15分鐘1次之總計3次清洗後，使用簡易染色DAB溶液(Nichirei)進行顯色反應。不進行對比染色而用蒸餾水沖洗後，進行藉由乙醇/水系列之脫水與藉由二甲苯之通透處理，進而使用Mount-Quick(大道產業)與蓋玻片而裝入。藉由微分干涉顯微鏡(Olympus BX51)以物鏡20倍之

鏡頭進行影像輸入，對各自之切片，計數10片之影像之CD34陽性細胞之數量。

血管內皮細胞中之PDGF-B之產生促進作用之評價

於EGM-2培養基(三光純藥)中對人體血管內皮細胞HUVEC進行繼代培養，使繼代第四代之細胞懸浮於不含有VEGF-A之Humedia-EG2培養基(Kurabo)中，並於膠原塗覆之24孔之多孔盤(Multiplate)(旭硝子)中以20,000個之比例進行播種，於5% CO₂存在下、於37℃下進行3~5天之培養直至細胞達到密集為止。交換成添加有視黃酸1 μM、10 μM或者溶劑對照組DMSO之Humedia-EG2培養基(Kurabo)後，進而培養2天。培養結束時回收培養上清液，使用人類PDGF-BB Quantikine ELISA套組(R & D Systems)，並依據所提供之操作說明進行PDGF-BB之定量。又，使用RNA提取試劑MagNA Pure LC mRNA HS套組(Roche)與自動核酸提取裝置MagNA Pure LC 1.0裝置(Roche)，依據所提供之操作說明進行自培養後之細胞中提取、純化mRNA。關於各樣品，將等容量之mRNA放入鑄模中，使用序列編號9與10之引子對、反應試劑QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit(Qiagen)與反應裝置LightCycler(Roche)，進行PDGF-B基因之單步定量RT-PCR。組成條件依據Qiagen之操作說明。又，RT-PCR之條件設為RT反應50℃下20分鐘、初始改質95℃下15分鐘、改質94℃下15秒鐘、退火60℃下20秒鐘、延伸72℃下30秒鐘。再者，G3PDH用作內部標準，使用其修正對照群之mRNA量。

結果

明確於人體皮膚中，間葉系幹細胞定域於血管部位(日本專利特願2009-213291)。關於作為纖維母細胞之趨化因子而已知之PDGF家族，為了調查於血管部位表現較高之分子種，將4個基因PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D之皮膚構成細胞中之表現進行比較，結果明確PDGF-B於HUVEC中表現非常高，另一方面，於FB中幾乎不表現(圖1)。此外，結果為PDGF-A於KC、ORSC、HUVEC中相同且為FB之4倍左右，PDGFC與PDGFD於FB中之表現明顯較高(圖1)。由於確認到HUVEC中PDGFA與PDGFB之表現，故調查由該等基因所產生之PDGF蛋白質之PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB對間葉系幹細胞之趨化能力之影響。結果明確PDGF-BB與PDGF-AA或PDGF-AB相比，顯著促進幹細胞之趨化能力(圖2)。

繼而，調查真皮或皮下脂肪中之PDGF-BB之定域，結果於較粗之血管部位中與血管標記物CD31一致地分佈(圖3)。藉由共軛焦雷射顯微鏡觀察較粗之血管部位中之分佈狀態，結果可知PDGF-BB存在於血管內皮細胞之外側且周皮細胞(=真皮幹細胞)之間(圖4)。進而若於血管內皮細胞管形成分析時加入間葉系幹細胞，則其大部分集成於支部，與此相對，若於PDGF-BB之受體之中和抗體存在下，則抑制於支部之集成(圖5)，認為PDGF-BB於間葉系幹細胞向血管部位之集成時發揮作用。調查人體皮膚中之間葉系幹細胞及PDGF-BB之老化變化，結果可知間葉系幹細胞

之數量隨著老化而減少(圖6)、PDGF-B基因之表現亦同樣地由於老化而減少(圖7)。由於該等情況，故考慮藉由維持、促進PDGF-BB而增加間葉系幹細胞，藉此可活化皮膚之可能性。

因此，對於促進PDGF-BB之表現之藥劑，藉由ELISA法及定量PCR法進行調查，結果於維甲酸(all trans retinoic acid，全反式維甲酸)中發現濃度依賴性之活性(圖8)。

【圖式簡單說明】

圖1表示血管內皮細胞中之PDGF基因之表現。

圖2表示藉由PDGF之真皮、脂肪幹細胞之趨化。

圖3表示真皮中之PDGF-BB之定域。

圖4表示真皮中之PDGF-BB之定域。

圖5表示PDGF-BB抑制對幹細胞壁龕向真皮、脂肪幹細胞集成的影響。

圖6表示人體中之真皮、脂肪幹細胞因老化所引起之變化。

圖7表示人體中之真皮、脂肪幹細胞因老化所引起之變化。

圖8表示藉由視黃酸之PDGF-BB產生之促進。

序列表

<110> 日商資生堂股份有限公司

<120> 藉由 PDGF-BB 活性促進之皮膚活化

<130> Z652-PCT

<140> I00133493

<141> 2011-09-16

<150> JP 2010-209705

<151> 2010-09-17

<160> 12

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF-A 正向引子

<400> 1

atacctcgcc catgttctg

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF-A 反向引子

<400> 2

gatgcttctc ttctctcgaa

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF-B 正向引子

<400> 3

ctttaagaag gccacggtga

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF-B 反向引子

<400> 4

cttcagtgcc gtcttgcac

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PDGF-C 正向引子

<400> 5

tatattaggc gcctggtgtg

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> PDGF-C 反向引子

<400> 6
attaagcagg tccagtggca 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PDGF-D 正向引子

<400> 7
tgggaatctg tcacaagctc 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PDGF-D 反向引子

<400> 8
cttttgactt ccggtcatgg 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> G3PDH 正向引子

<400> 9
gcaccgtcaa ggctgagaac 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> G3PDH 反向引子

<400> 10
atggtggtga agacgccagt 20

<210> 11
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PDGF-B 正向引子

<400> 11
cctggcatgc aagtgtga 18

<210> 12
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PDGF-B 反向引子

<400> 12
ccaatggtca cccgattt 18

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100133493

※申請日：100.9.16

※IPC 分類：~~C12N~~ A61K35/36 (2006.01)

A61K35/12 (2006.01)

A61P17/18 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

藉由PDGF-BB活性促進之皮膚活化

二、中文發明摘要：

本發明係一種方法，其特徵在於：其係篩選使皮膚活化之藥劑之方法，且選擇使候補藥劑作用於血管內皮細胞，從而促進上述細胞之PDGF-BB之表現之藥劑作為皮膚活化劑。

三、英文發明摘要：

七、申請專利範圍：

1. 一種方法，其特徵在於：其係篩選使皮膚活化之藥劑之方法，且選擇使候補藥劑作用於血管內皮細胞，從而促進上述細胞之PDGF-BB之表現之藥劑作為皮膚活化劑。
2. 如請求項1之方法，其中上述測定係藉由利用即時聚合酶鏈方法測定細胞中之來自PDGF-B之mRNA而實施。
3. 一種活化皮膚、抑制皮膚老化之方法，其係藉由於皮膚之血管部位增加PDGF-BB活性或量，而活化間葉系幹細胞，故而活化皮膚，抑制皮膚之老化。

八、圖式：

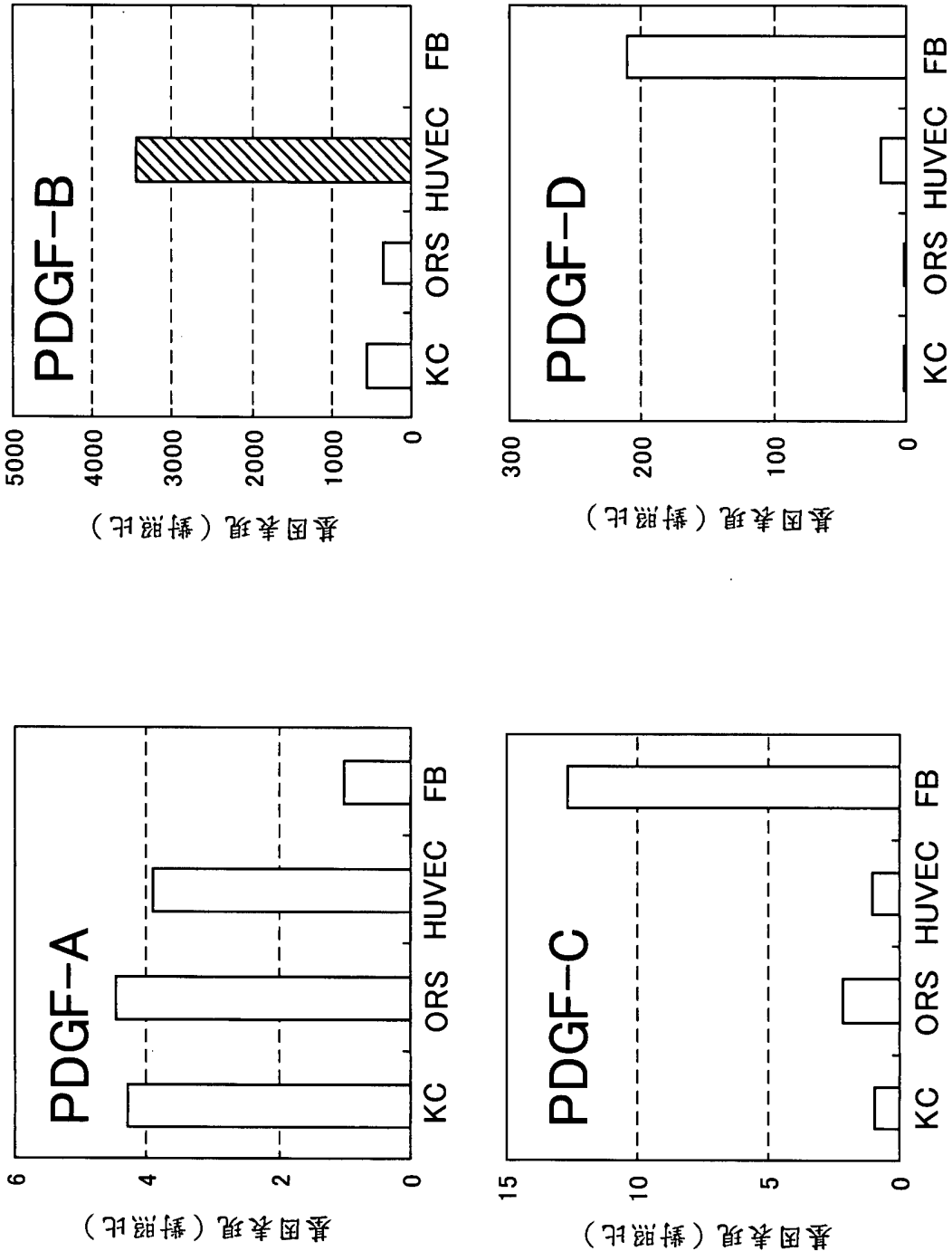


圖 1

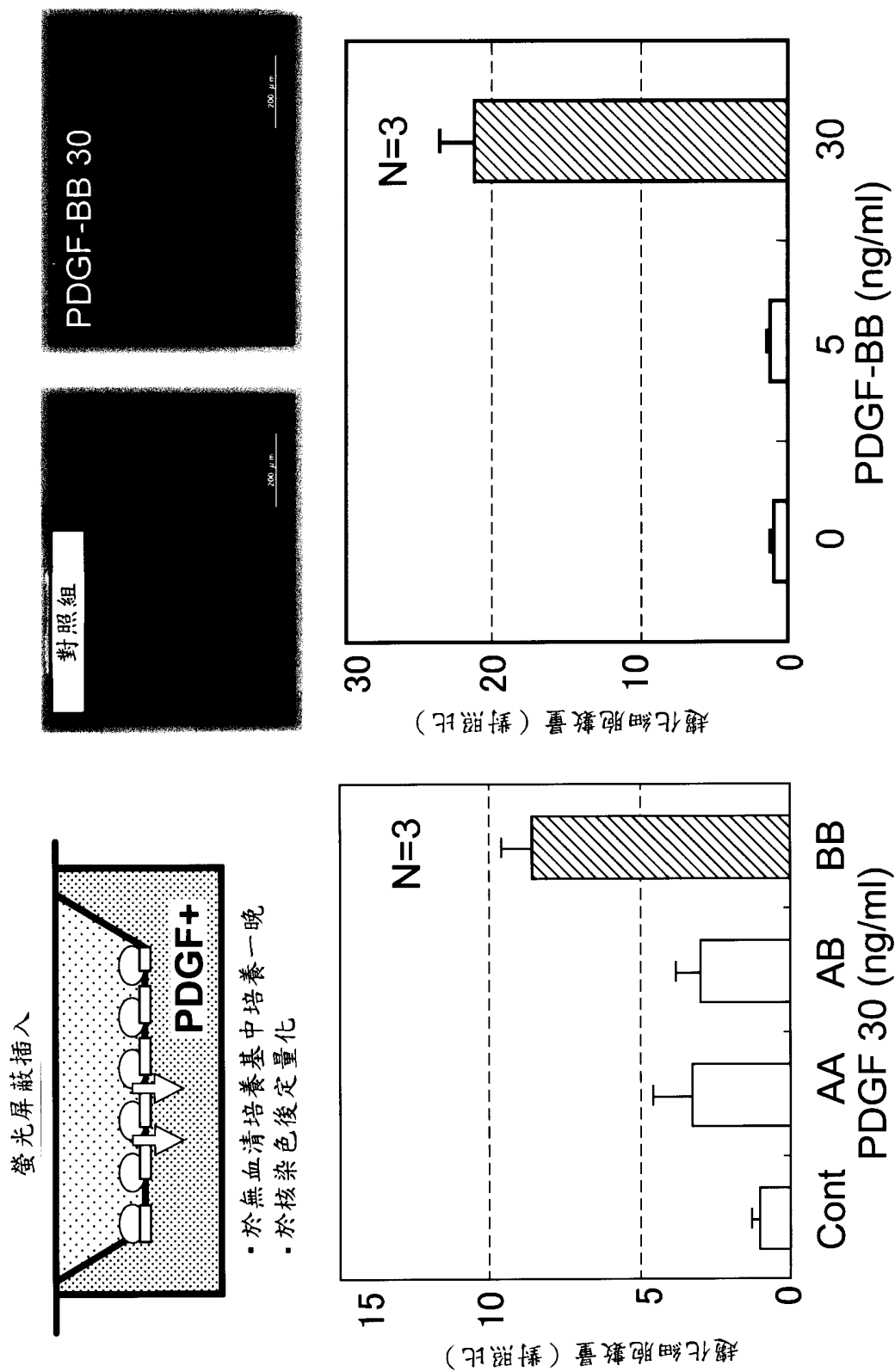


圖 2



圖 3

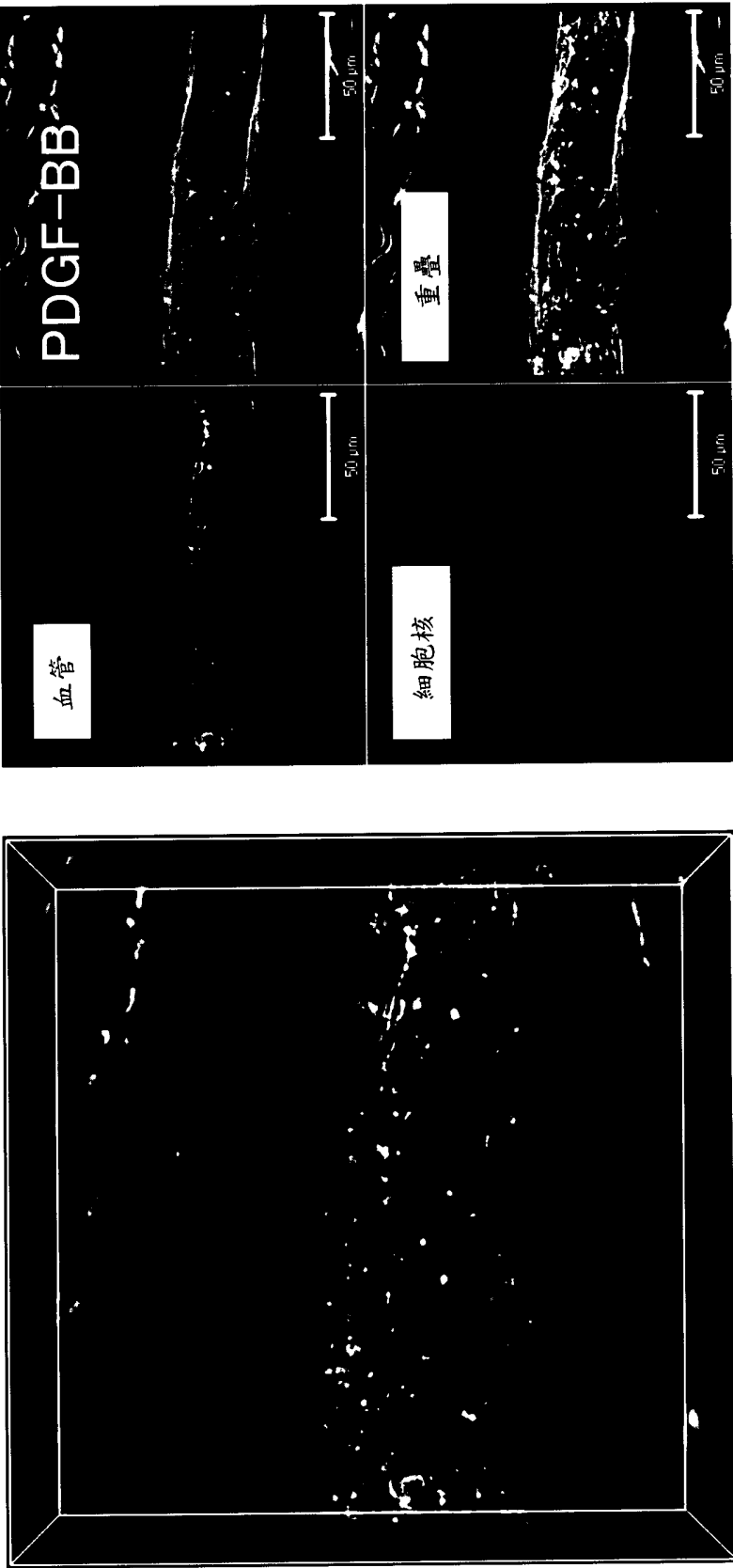


圖 4

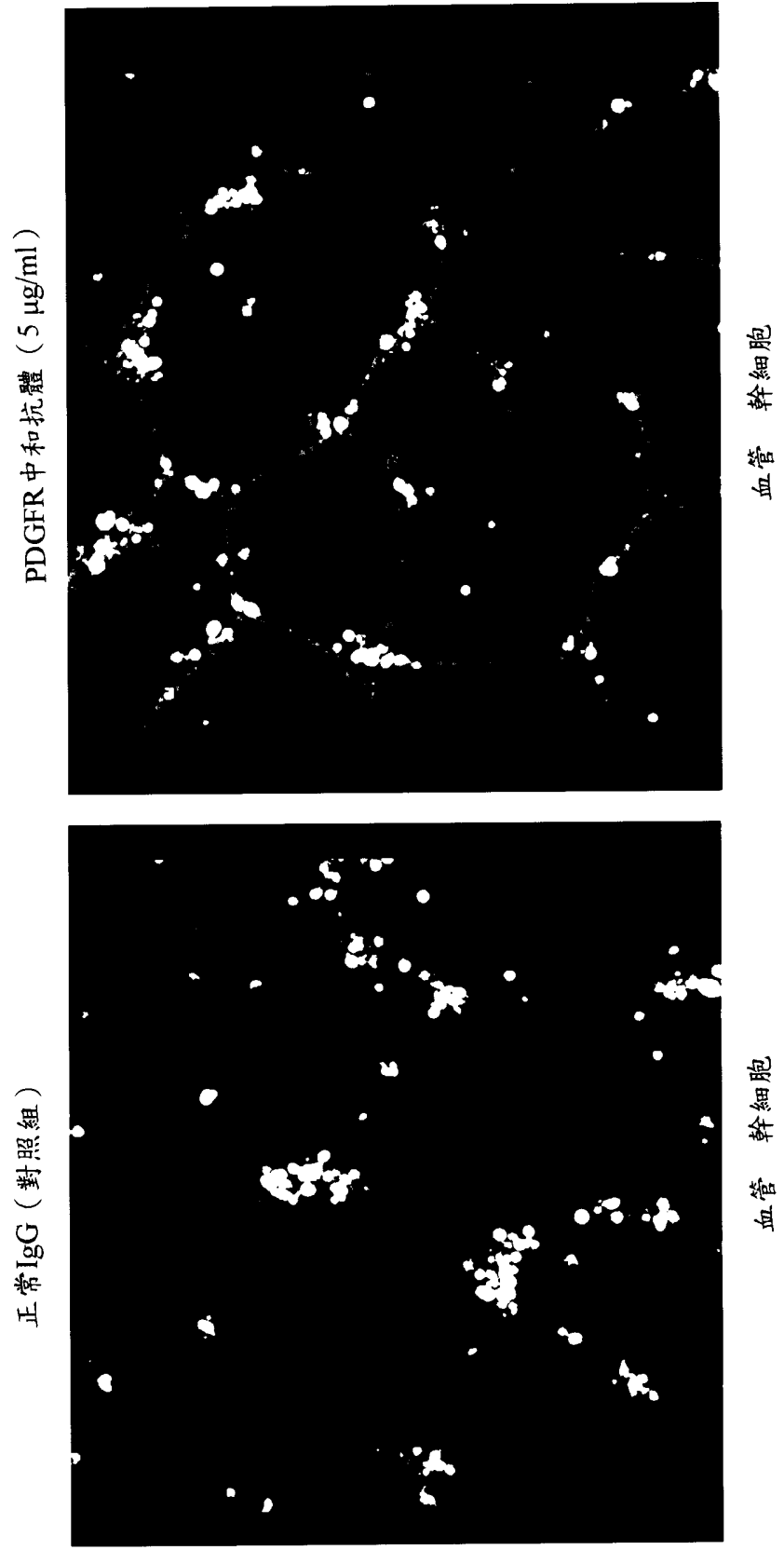


圖 5

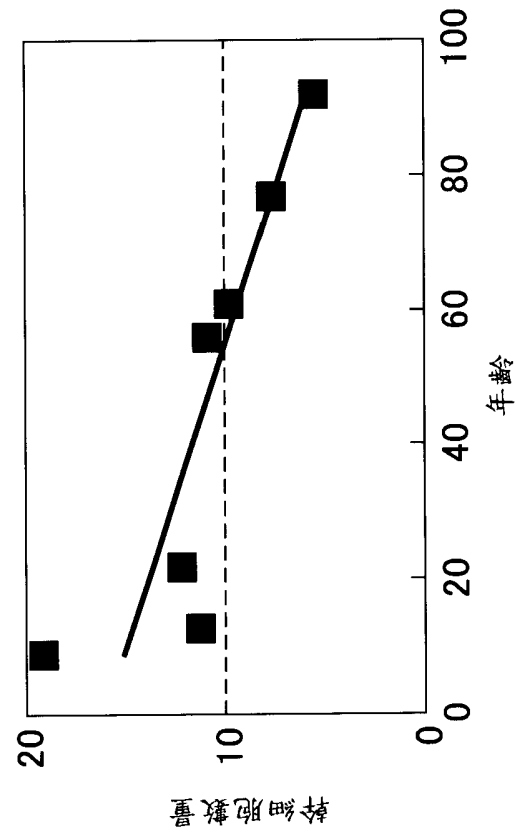
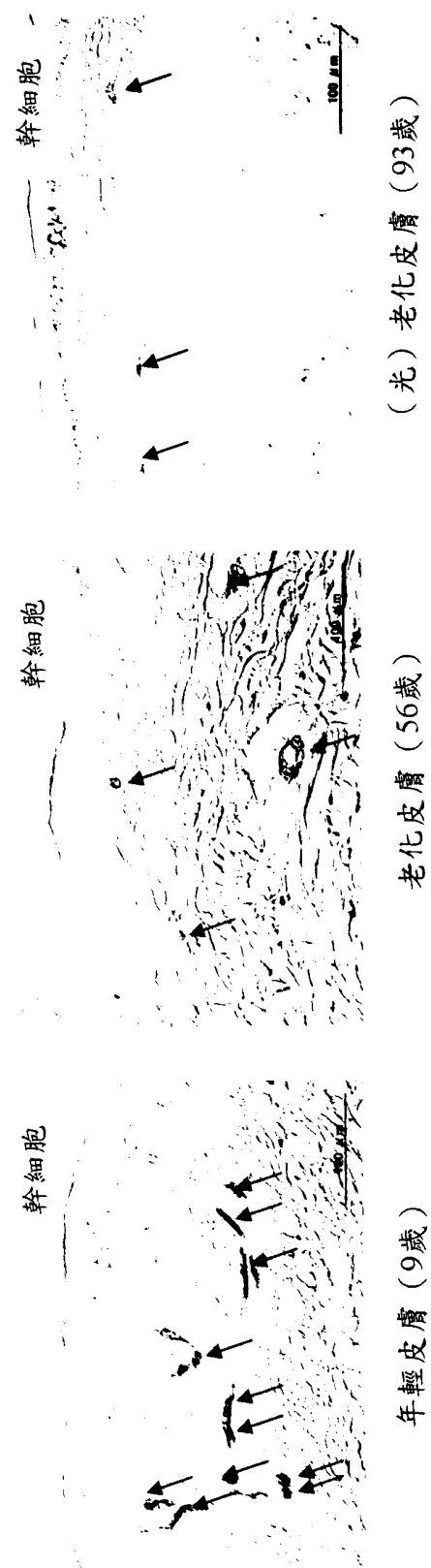


圖 6

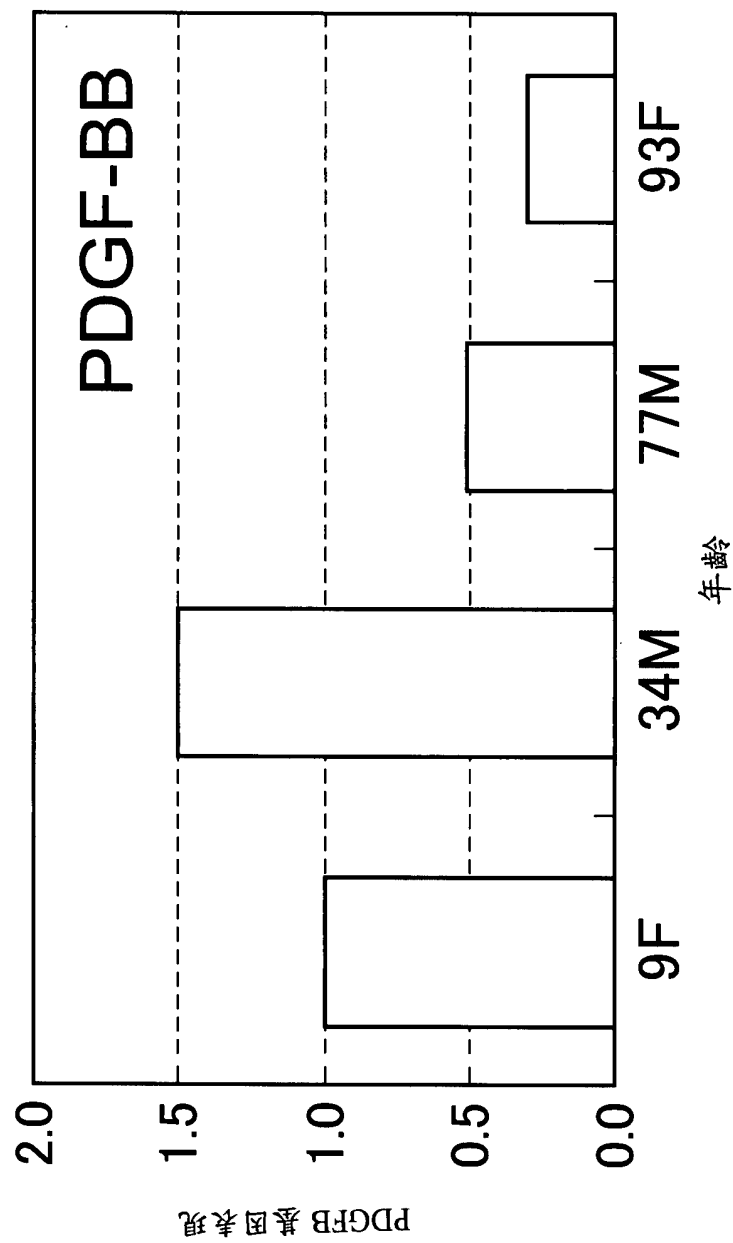


圖 7

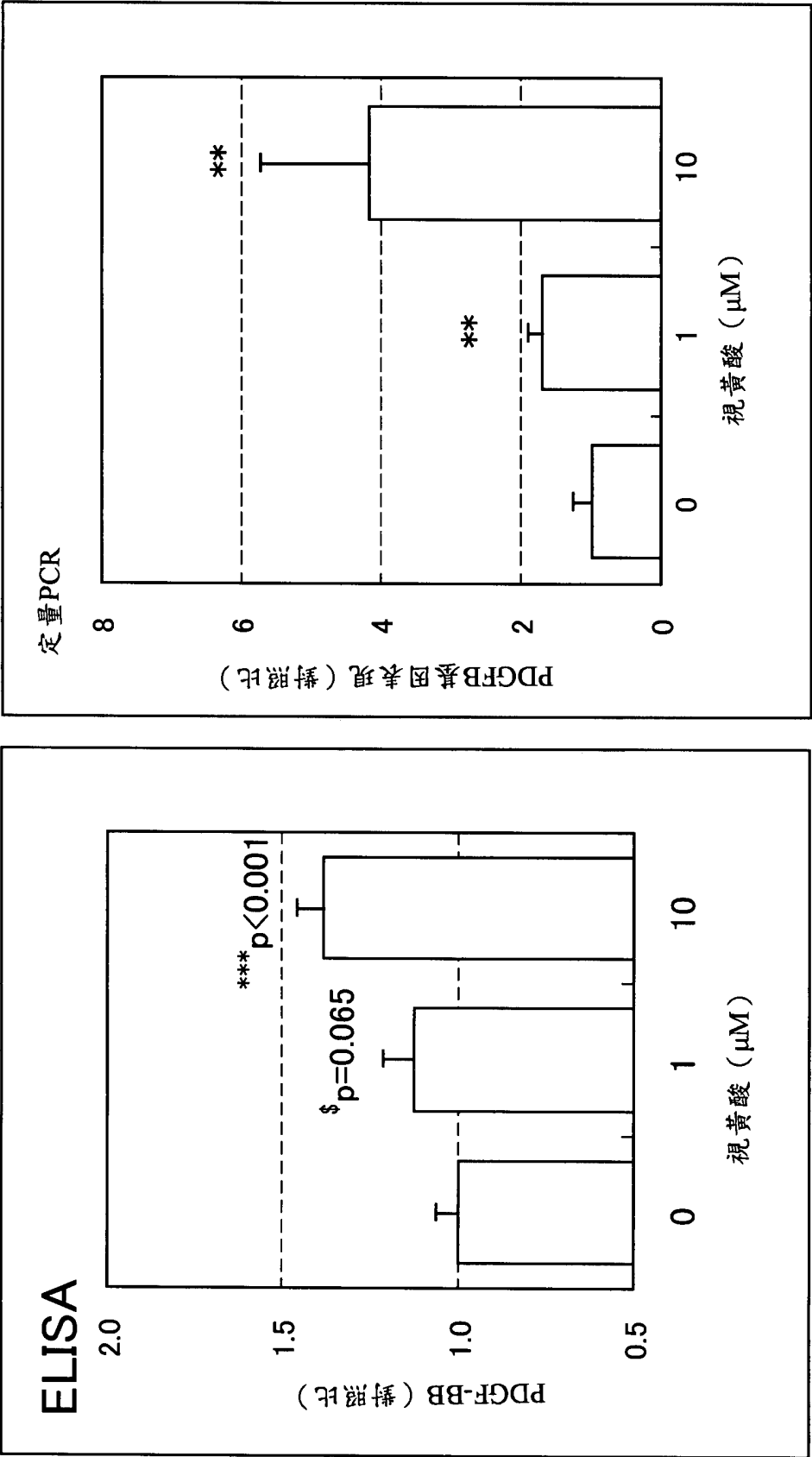


圖 8

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)