

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7179875号

(P7179875)

(45)発行日 令和4年11月29日(2022.11.29)

(24)登録日 令和4年11月18日(2022.11.18)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/0797(2010.01)

C 1 2 N 5/0797

C 1 2 P 21/00 (2006.01)

C 1 2 P 21/00 Z

A 6 1 K 8/64 (2006.01)

A 6 1 K 8/64

A 6 1 Q 19/00 (2006.01)

A 6 1 Q 19/00

A 6 1 Q 19/10 (2006.01)

A 6 1 Q 19/10

請求項の数 19 (全24頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-568256(P2020-568256)

(86)(22)出願日 令和1年5月31日(2019.5.31)

(65)公表番号 特表2021-526027(P2021-526027
A)

(43)公表日 令和3年9月30日(2021.9.30)

(86)国際出願番号 PCT/KR2019/006578

(87)国際公開番号 WO2019/235784

(87)国際公開日 令和1年12月12日(2019.12.12)

審査請求日 令和3年1月6日(2021.1.6)

(31)優先権主張番号 10-2018-0064704

(32)優先日 平成30年6月5日(2018.6.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関
韓国(KR)

(73)特許権者 510273880

コリア ユニバーシティ リサーチ アンド
ビジネス ファウンデーションKOREA UNIVERSITY RE
SEARCH AND BUSINESS
FOUNDATION大韓民国、02841 ソウル、ソンプ
クーグ、アナムーロ 145

(74)代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(74)代理人 100090251

森田 憲一

(72)発明者 ホン ソンホイ

大韓民国、04973, ソウル、クァン
ジング、アチャサンーロ 70-ギル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経幹細胞培養液を有効成分として含む抗老化又はしわ抑制用化粧料組成物及びその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の段階を含む、TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 及びTIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) を有効成分として含む紫外線による皮膚組織の活性酸素種 (reactive oxygen species) 生成抑制用又はDNA損傷の復旧用組成物の製造方法:

(a) 脳の脳室帯 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を不死化 (immortalized) させる段階と、

(b) 前記不死化神経幹細胞を非誘導性培地で培養して神経幹細胞培養液を収得する段階。

【請求項2】

前記神経幹細胞培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、及びMMP-9 (matrix metalloproteinase-9) の発現を抑制することを特徴とする、請求項1に記載の組成物の製造方法。

【請求項3】

前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織のコラーゲン又はエラスチンを回復させることを特徴とする、請求項1に記載の組成物の製造方法。

【請求項 4】

前記紫外線はUVB (ultraviolet-B)であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物の製造方法。

【請求項 5】

前記DNA損傷の復旧は、Rad50の発現増加によってなされることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物の製造方法。

【請求項 6】

前記非誘導性培地は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10%FBS (fetal bovine serum) 及び1%ペニシリン／ストレプトマイシンを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物の製造方法。

10

【請求項 7】

TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 及びTIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) を含む脳の脳室帯 (ventricular zone) 由来の神経幹細胞培養液を有効成分として含む、紫外線による皮膚組織の活性酸素種 (reactive oxygen species) 生成抑制用化粧料組成物。

【請求項 8】

前記神経幹細胞培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、MMP-3 (matrix metalloproteinase-3)、MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)、MMP-7 (Matrilysin)、MMP-10 (Stromelysin) 及びMMP-13 (Collagenase) を低濃度で含むことを特徴とする、請求項 7 に記載の化粧料組成物。

20

【請求項 9】

前記神経幹細胞培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、及びMMP-9 (matrix metalloproteinase-9) の発現を抑制することを特徴とする、請求項 7 に記載の化粧料組成物。

【請求項 10】

前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織のコラーゲン又はエラスチンを回復させることを特徴とする、請求項 7 に記載の化粧料組成物。

30

【請求項 11】

前記紫外線はUVB (ultraviolet-B)であることを特徴とする、請求項 7 に記載の化粧料組成物。

【請求項 12】

前記化粧料は、スキンローション、スキンソフナー、スキントナー、アストリンゼント、ローション、ミルクローション、モイスチャーローション、栄養ローション、マッサージクリーム、栄養クリーム、モイスチャークリーム、ハンドクリーム、ファウンデーション、エッセンス、栄養エッセンス、パック、せっけん、クレンジングフォーム、クレンジングローション、クレンジングクリーム、ボディーローション、ボディークレンザー、洗顔剤、トリートメント、美容液、美容パック、軟膏剤、ゲル剤、リニメント剤、液剤、パッチ及び噴霧剤からなる群から選択されるいずれか1種の剤形であることを特徴とする、請求項 7 に記載の化粧料組成物。

40

【請求項 13】

TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 及びTIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) を含む、脳の脳室帯 (ventricular zone) 由来の神経幹細胞培養液を有効成分として含む、紫外線によるDNA損傷の復旧用化粧料組成物。

50

【請求項 14】

前記神経幹細胞培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、MMP-3 (matrix metalloproteinase-3)、MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)、MMP-7 (Matrilysin)、MMP-10 (Stromelysin) 及びMMP-13 (Collagenase) を低濃度で含むことを特徴とする、請求項 13 に記載の化粧料組成物。

【請求項 15】

前記神経幹細胞培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、及びMMP-9 (matrix metalloproteinase-9) の発現を抑制することを特徴とする、請求項 13 に記載の化粧料組成物。

10

【請求項 16】

前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織のコラーゲン又はエラスチンを回復させることを特徴とする、請求項 13 に記載の化粧料組成物。

【請求項 17】

前記紫外線はUVB (ultraviolet-B) であることを特徴とする、請求項 13 に記載の化粧料組成物。

【請求項 18】

前記DNA損傷の復旧は、Rad50の発現増加によってなされることを特徴とする、請求項 13 に記載の化粧料組成物。

20

【請求項 19】

前記化粧料は、スキンローション、スキンソフナー、スキントナー、アストリンゼント、ローション、ミルクローション、モイスチャーローション、栄養ローション、マッサージクリーム、栄養クリーム、モイスチャークリーム、ハンドクリーム、ファウンデーション、エッセンス、栄養エッセンス、パック、せっけん、クレンジングフォーム、クレンジングローション、クレンジングクリーム、ボディーローション、ボディークレンザー、洗顔剤、トリートメント、美容液、美容パック、軟膏剤、ゲル剤、リニメント剤、液剤、パッチ及び噴霧剤からなる群から選択されるいずれか1種の剤形であることを特徴とする、請求項 13 に記載の化粧料組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は高濃度のTIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1)、TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) 及び低濃度の多様なマトリクスメタロプロテイナーゼを有効成分として含む皮膚しわ改善能又は皮膚弾力増進能に優れた神経幹細胞培養液の製造方法に関するもので、より詳しくは真皮内コラーゲンの分解に参与する多様な種類のマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase) の発現を減少させるとともに活性を抑制することができるTIMP-1 及びTIMP-2 を高濃度を含む神経幹細胞培養液の製造方法に関するものである。

40

【背景技術】

【0002】

皮膚は外部環境から人体を保護し、多様な生理的機能を担当する。皮膚は、大別して総3個の層である表皮、真皮及び皮下脂肪層から構成されている。表皮は主に角質を形成する細胞とメラニン色素を生成するメラニン細胞とから構成され、真皮は主にコラーゲン及びエラスチン弾力線維から構成されている結合組織と基質からなっており、筋肉、毛嚢、血管、神経などがその中に含まれる。

【0003】

皮膚老化の原因はお年の増加につれて発生する内部的要因と外部環境などによって誘発

50

される外部的原因とがある。皮膚しわの形成と密接な連関があるコラーゲン (collagen) は皮膚の線維芽細胞で生成されて真皮の90%を構成し、年齢及び紫外線のような外部刺激によって減少すると知られている (S.D. Shapiro., Curr. Opin. Cell Biol., 10, 1996; Naylor EC et al., Maturitas, 2011)。老化が進行するか外部紫外線に持続的に露出されるとき、コラーゲンを含む結合組織を分解するマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase) の発現及び活性の増加によって皮膚の真皮組織内のコラーゲン分解を促進させることがコラーゲンの含量が低下する原因と知られている (A. Mauviel., J Cell. Biochem., 1993; T Quan et al., J Investig Dermatol Symp Proc. 2009)。ここで、マトリクスメタロプロテイナーゼの発現調節は転写因子 (transcription factors) AP-1とNFkBがマトリクスメタロプロテイナーゼ遺伝子のプロモーター (promoter) に作用すると知られている (G.J. Fisher & J.J. Voorhees., J Investig Dermatol Symp Proc., 1998; K. Abeyama et al., J Clin. Invest. 2000)。また、組織内コラーゲンの恒常性維持の際、マトリクスメタロプロテイナーゼの活性を抑制するTIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) の均衡が重要に作用する。

【0004】

TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) は1型、2型、3型、4型が存在し、生体内に存在するマトリクスメタロプロテイナーゼの抑制剤の役割をする。この中で、TIMP-1は、コラーゲナーゼタイプIVのうち、92kDaのMMP-9の潜伏型 (pro form) 及びMMP-1と結合してMMPを非可逆的に抑制すると知られており、TIMP-2は、コラーゲナーゼタイプIVのうち、72kDaのMMP-2の潜伏型 (pro form) と活性型 (active form) と全部結合し、特に全てのマトリクスメタロプロテイナーゼの活性型を抑制すると報告されている (Y.A. Declerck et al., Biochem. J. 1993; W. Bode et al., Ann. NY Acad Sci. 1999)。

【0005】

また、エラスチン (elastin) はしわ生成に関与する重要な線維組織であり、コラーゲンとともに皮膚弾力に関与すると知られており、エラスチンの分解はエラスターゼという酵素の影響によって調節されると知られている (J.H. Chung et al., J. Invest. Dermatol., 117, 2001)。

【0006】

したがって、本発明者らは皮膚しわの改善及び防止と皮膚弾力の増進が可能な組成物を開発しようと鋭意努力した結果、成体幹細胞である神経幹細胞を培養して、皮膚内のコラーゲン合成の阻害及び分解を促進する多様なマトリクスメタロプロテイナーゼの機能を非可逆的に抑制するTIMP-1、TIMP-2が高濃度で存在し、多様なマトリクスメタロプロテイナーゼが低濃度で存在する神経幹細胞の培養液組成物を製造することができることを確認し、本発明を完成することになった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、コラーゲンの生成を抑制するマトリクスメタロプロテイナーゼを低濃度で含み、マトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を抑制して、コラーゲンとエラスチンの合成を回復させることができるTIMP-1及びTIMP-2を高濃度で含む皮膚しわ改善能又は皮膚弾力増進能が向上した神経幹細胞培養液の製造方法及び前記培養液を含む化粧品組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前記目的を達成するために、本発明は、(a) 脳の脳室帯 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs

10

20

30

40

50

）を不死化（immortalized）させる段階と、（b）前記不死化神経幹細胞を非誘導性培地で培養して培養液を収得する段階とを含む、TIMP-1（tissue inhibitor of metalloproteinase 1）及びTIMP-2（tissue inhibitor of metalloproteinase 2）を有効成分として含む皮膚しわ改善能又は皮膚弾力増進能が向上した神経幹細胞培養液の製造方法を提供する。

【0009】

また、本発明は、TIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液を有効成分として含む皮膚しわ改善用又は皮膚弾力増進化粧料組成物を提供する。

【0010】

また、本発明は、TIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液を用いた皮膚しわ改善又は皮膚弾力増進方法を提供する。

【0011】

また、本発明は、皮膚しわ改善又は皮膚弾力増進に使うためのTIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液の用途を提供する。

【0012】

また、本発明は、皮膚しわ改善用又は皮膚弾力増進化粧料組成物の製造に使うためのTIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液の用途を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】神経幹細胞培養液でヒト体細胞を処理するとき、細胞毒性（cytotoxicity）がないことをWST-1で確認した図である。

【図2】神経幹細胞培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理するとき、UVBによって増加した活性酸素種（ROS；reactive oxygen species）が減少することを蛍光マイクロプレートリーダー（fluorescence microplate reader）で測定した図である。

【図3】神経幹細胞培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理するとき、UVBによって増加した活性酸素種（ROS；reactive oxygen species）が減少することを蛍光顕微鏡（fluorescent microscope）で分析した図である。

【図4】神経幹細胞培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理するとき、UVBによってコラーゲン（pro-collagen）の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現が抑制されることをqPCRで確認した図である。

【図5】神経幹細胞培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理するとき、UVBによってコラーゲン（pro-collagen）の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現が抑制されることをウェスタンブロット法で確認した図である。

【図6】神経幹細胞培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理するとき、UVBによってコラーゲン（pro-collagen）の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの活性が抑制されることをザイモグラフィー（zymography）で確認した図である。

【図7】神経幹細胞培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理するとき、UVBによって減少したコラーゲン（pro-collagen）が再び増加することを確認した図である。

【図8】神経幹細胞培養液内でマトリクスメタロプロテイナーゼの活性を抑制するTIMP-1、TIMP-2を確認した図である。

【図9】組み換えタンパク質TIMP-1、TIMP-2及び神経幹細胞培養液をTIMP-1、TIMP-2抗体でブロックした（neutralizing）後、マトリクスメタロプロテイナーゼの活性抑制を確認した図である。

【図10】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって増加したしわが再び減少することを肉眼で確認した図である。

10

20

30

40

50

【図11】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって増加したしわが再び減少することをしわ部位面積の測定で確認した図である。

【図12】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって増加したROS (reactive oxygen species) が減少することを確認した図である。

【図13】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって減少した真皮内コラーゲン (collagen) 及びエラスチン (elastin) が再び増加することを確認した図である。

【図14】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって真皮内コラーゲン (collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現が減少することを免疫蛍光染色で確認した図である。

10

【図15】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって真皮内コラーゲン (collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現が抑制されることを確認した図である。

【図16】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって真皮内コラーゲン (collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの活性が抑制されることを確認した図である。

【図17】神経幹細胞培養液がマトリクスメタロプロテイナーゼの発現を調節する転写因子 (transcription factors) のうちNFkBによって調節されることを確認した図である。

20

【図18】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、転写因子の減少によって真皮内コラーゲン (collagen) の生成が回復されることを確認した図である。

【図19】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって誘発されるDNA損傷 (damage) をDNA回復酵素 (repair enzymes) の一つであるRad50によって回復することをウェスタンブロット法で確認した図である。

【図20】神経幹細胞培養液でUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって誘発されるDNA損傷 (damage) 程度をγH2AXで確認した図である。

30

【図21】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれの老化抑制及びしわ生成抑制の効果を比較したもので、(a)は細胞毒性を確認した図、(b)はそれぞれの培養液処理時のマトリクスメタロプロテイナーゼ遺伝子のRNA発現水準を確認した図である。

【図22】(a)は神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれ内で放出されるMMP-1の量を比較した図、(b)はそれぞれの培養液でUVBに露出されたヒト体細胞を処理した後、マトリクスメタロプロテイナーゼタンパク質の量を確認した図である。

【図23】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液内に存在する(a)全体タンパク質の量及び(b)TIMP-1、TIMP-2の量を比較した図である。

【図24】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれでUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、(a)はUVBによって生成されたしわの抑制程度を肉眼で確認した図、(b)はしわ部位の面積を測定して比較した図である。

40

【図25】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれでUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、(a)はUVBによって真皮内コラーゲン (collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現抑制の比較を示した図、(b)は真皮内コラーゲン (collagen) の生成又は復元を比較した図である。

【図26】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれでUVBが露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、UVBによって減少した真皮内コラーゲン (collagen) 及びエラスチン (elastin) の増加程度を比較した図である。

【図27】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれでUVBが露出された雌性S

50

KH-1マウスを処理するとき、UVBによって真皮内コラーゲン (collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現の減少を免疫蛍光染色で確認した図である。

【図28】神経幹細胞培養液と脂肪幹細胞培養液のそれぞれでUVBに露出された雌性SKH-1マウスを処理するとき、(a)はUVBによって誘発されるDNA損傷 (damage) をDNA回復酵素 (repair enzymes) の一つであるRad50によって回復することをウェスタンブロット法で比較した図、(b)及び(c)はUVBによって誘発されるDNA損傷 (damage) 程度を γ H2AXで比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

他に定義しない限り、本明細書で使用する全ての技術的及び科学的用語は本発明が属する技術分野で熟練した専門家によって通常的に理解されるものと同じ意味を有する。一般に、本明細書で使用する命名法は当該技術分野でよく知られて通常的に使われるものである。

【0015】

本発明では、ヒト脳の脳室帯 (ventricular zone) から抽出した神経幹細胞 (neural stem cells、NCSs) を培養して収得した外胚葉由来の神経幹細胞培養液で紫外線 (UVB) に露出されたヒト線維芽細胞 (human dermal fibroblast) とマウスを処理した。その後、紫外線 (UVB) に露出されたヒト線維芽細胞及びマウス皮膚組織において真皮内コラーゲンの分解に関与する MMP-2 (matrix metalloproteinase 2)、MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) 及び MMP-1 (matrix metalloproteinase 1) の発現及び活性が神経幹細胞培養液によって抑制されることを確認し、このようなマトリクスメタロプロテイナーゼの抑制によってコラーゲンの合成が復旧又は促進されることを確認した。また、前記コラーゲン合成の復旧及び促進によって皮膚しわの改善又は皮膚弾力の増進のための有効成分として TIMP-1 及び TIMP-2 が高濃度で神経幹細胞培養液に含まれていることを確認した。

【0016】

したがって、本発明は、一観点で、(a) 脳の脳室帯 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を不死化 (immortalized) させる段階と、(b) 前記不死化神経幹細胞を非誘導性培地で培養して培養液を収得する段階とを含む、TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 及び TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) を有効成分として含む皮膚しわ改善能又は皮膚弾力増進能が向上した神経幹細胞培養液の製造方法に関するものである。

【0017】

本発明において、前記培養液を製造するための神経幹細胞はその種類に制限されない。好ましくは胎児由来の成体幹細胞であり、本発明の具体的な実施例では、胎児脳の脳室帯 (ventricular zone) から抽出した神経幹細胞を使って神経幹細胞培養液を製造した。

【0018】

本発明において、神経幹細胞培養液とは、外胚葉幹細胞の一種である神経幹細胞を継代培養して収得した細胞から放出される成分を含む物質である。

【0019】

本発明において、前記神経幹細胞培養液は、TIMP-3 又は TIMP-4 をさらに含むことを特徴とすることができる。

【0020】

本発明において、前記神経幹細胞培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloprote

10

20

30

40

50

inase-2)、MMP-3 (matrix metalloproteinase-3) 及びMMP-9 (matrix metalloproteinase-9) の発現又は活性を抑制することを特徴とすることができる。

【0021】

本発明の具体的な実施例では、神経幹細胞培養液内のTIMP-1、TIMP-2成分がマトリクスメタロプロテイナーゼ (matrix metalloproteinase) の発現及び活性を阻害して、しわの改善及び防止と皮膚弾力の増進に及ぶ影響を確認するために、神経幹細胞培養液から得た上澄み液をサイトカインアレイ及びウェスタンブロット法で確認した。

【0022】

また、本発明の具体的な実施例では、神経幹細胞培養液内のTIMP-1、TIMP-2成分が活性型マトリクスメタロプロテイナーゼを抑制して、しわ生成の改善及び皮膚弾力の増進に参与することをゼラチンザイモグラフィー (gelatin zymography) で確認した。

【0023】

本発明の具体的な実施例では、神経幹細胞培養液、組み換えタンパク質TIMP-1又はTIMP-2をそれぞれ又は一緒に処理するか、抗体によってそれぞれ又は一緒にブロッキングした後、コラゲナーゼタイプIVのうち、92kDaのMMP-9及び72kDaのMMP-2潜伏型 (pro form) と活性型 (active form) に結合してマトリクスメタロプロテイナーゼの活性を抑制することを確認した。

【0024】

本発明では、神経幹細胞培養液内のTIMP-1、TIMP-2成分のしわ生成改善及び皮膚弾力増進の効果を確認するために、雌性SKH-1マウスの背中に、1週から4週まではUVB (30mJ/cm) を3回/1週で処理した後、PBS (phosphate buffered saline) 及び神経幹細胞培養液を背中にそれぞれ200µl (v/v) ずつ塗布した。その後、5週から12週まではUVB (30mJ/cm) を1回/1週で処理した後、PBS及び神経幹細胞培養液を200µl (v/v) ずつ塗布した。

【0025】

本発明において、前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織のコラーゲン又はエラスチンを回復させることを特徴とすることができる。

【0026】

本発明において、前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織の活性酸素種 (reactive oxygen species) の生成を抑制するか又はDNA損傷を復旧することの特徴とすることができる。

【0027】

本発明で使う用語、‘しわ改善’は皮膚のしわ及び弾力に係る能力を維持又は強化させることを意味する。皮膚の構造のうち真皮層に存在する膠原線維 (collagen: コラーゲン) と弾力線維 (elastin: エラスチン) がその役割をする主要タンパク質であり、皮膚弾力を担う。コラーゲンの生合成は皮膚の内外的影響を受けることになる。具体的に、皮膚内的要因としては、自然老化によって細胞活性が減少し、コラーゲン線維が減少し、外的要因としては、紫外線の過量照射及びストレスなどによって生成された活性酸素種がタンパク質のチオール基 (thiol: -SH) と反応して酵素の活性を阻害するか、コラーゲン、エラスチンなどを分解させる酵素 (Matrix metalloproteinase-1: MMP-1) であるコラゲナーゼの発現を増加させて皮膚のしわを増加させるとともに弾力を減少させる結果を引き起こす。

【0028】

本発明の神経幹細胞培養のための培地は当該分野に知られた基本培地を制限なしに使うことができる。基本培地は人為的に合成して製造することができ、商業的に製造された培地を使うこともできる。商業的に製造される培地の例を挙げれば、DMEM (Dulbe

10

20

30

40

50

cco's Modified Eagle's Medium)、MEM (Minimal Essential Medium)、BME (Basal Medium Eagle)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -MEM (α -Minimal essential Medium)、G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium) 及び Isocove's Modified Dulbecco's Medium などがあるが、これに限定されるものではなく、最も好ましくは DME M 培地であることができる。

【0029】

また、前記基本培地は 5～10% (v/v) の FBS を含むことが好ましく、本発明の具体的な実施例では DME M 培地で培養した。

【0030】

本発明において、前記非誘導性培地は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS (fetal bovine serum) 及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (ペニシリン/ストレプトマイシン) を含むことを特徴とすることができる。

【0031】

本発明の組成物は通常的に使われるどの方法でも製造することができ、神経幹細胞を単離、培養及び分離する過程は本発明の方法に限定されず、当該分野で通常に行われる方法で実施することができる。

【0032】

上述したように、本発明による外胚葉由来の神経幹細胞培養液は TIMP-1、TIMP-2 を有効成分として含むので、マトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性型マトリクスメタロプロテイナーゼを抑制して、しわの改善及び防止と皮膚弾力の増進のための組成物として使うことができる。

【0033】

したがって、本発明は、他の観点で、TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) 及び TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) を含む神経幹細胞の培養液を有効成分として含む皮膚しわ改善用又は皮膚弾力増進用の化粧品組成物に関するものである。

【0034】

本発明において、前記神経幹細胞の培養液は、TIMP-3 又は TIMP-4 をさらに含むことを特徴とすることができる。

【0035】

また、前記神経幹細胞の培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、MMP-3 (matrix metalloproteinase-3)、MMP-9 (matrix metalloproteinase-9)、MMP-7 (Matrilysin)、MMP-10 (Stromelysin) 及び MMP-13 (Collagenase) を低濃度で含むことを特徴とすることができる。

【0036】

本発明において、前記神経幹細胞は脳の脳室帯 (ventricular zone) から抽出された神経幹細胞を不死化させて得る細胞である。本発明の具体的な実施例では、胎児の脳の脳室帯 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を用い、これを不死化 (immortal) させて細胞を得た。これを DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS (fetal bovine serum)、及び 1% ペニシリン/ストレプトマイシンが含まれた非誘導性培地で培養して非接着性細胞を除去した。前記過程で培養された神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を継代培養する過程で培養液を収得し、これを遠心分離し、上澄み液を濾過して

10

20

30

40

50

取得した。

【0037】

本発明において、前記神経幹細胞の培養液は、MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)、MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)、MMP-3 (matrix metalloproteinase-3) 及びMMP-9 (matrix metalloproteinase-9) の発現又は活性を抑制することを特徴とすることができる。

【0038】

本発明において、前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織のコラーゲン又はエラスチンを回復させることを特徴とすることができる。

【0039】

また、本発明において、前記神経幹細胞培養液は、皮膚組織の活性酸素種 (reactive oxygen species) の生成を抑制するか又はDNA損傷を復旧すること

【0040】

を特徴とすることができる。前記DNA損傷の復旧は、神経幹細胞培養液によってDNA回復酵素であるRad50、Rad51又はXRCC4の活性が向上することによってDNA損傷を復旧することができる。また、神経幹細胞培養液は、gammaH2AXをDNA損傷程度を把握するマーカーとして使うことを特徴とする。

【0041】

本発明において、‘化粧料組成物’は前記神経幹細胞培養液又は神経幹細胞抽出物を含む組成物であり、その剤形はどの形態でも可能である。このような剤形の例として、前記化粧料組成物を用いて製造した化粧料は、スキンローション、スキンソフナー、スキントナー、アストリンゼント、ローション、ミルクローション、モイスチャーローション、栄養ローション、マッサージクリーム、栄養クリーム、モイスチャークリーム、ハンドクリーム、ファウンデーション、エッセンス、栄養エッセンス、パック、せっけん、クレンジングフォーム、クレンジングローション、クレンジングクリーム、ボディーローション、ボディークレンザー、洗顔剤、トリートメント、美容液、美容パック、軟膏剤、ゲル剤、リニメント剤、液剤、パッチ及び噴霧剤からなる群から選択されるいずれか1種の剤形であることを特徴とすることができる。

【0042】

本発明の目的を達成するために、このような剤形の中でどの剤形にも製造されて商用化することができ、前記例に限定されない。

【0043】

化粧料組成物に製剤化される場合、前記神経幹細胞培養液の含量は、化粧料組成物の総重量に対して、0.0001~50重量%であり、好ましくは0.01~10重量%である。最小限の紫外線による皮膚損傷の改善効果を達成できるように、神経幹細胞培養液の含量は前記最小値以上であることが好ましく、過量添加による使用感低下及び各種の剤形への適用可能性を考慮して、神経細胞培養液の含量は前記最大値以下であることが好ましい。ここで、神経細胞培養液の含量は剤形又は化粧料組成物に含有される成分の含量によって前記範囲内で適宜調節することが好ましい。

【0044】

本発明の化粧品組成物に含まれる成分は、有効成分以外に、化粧品組成物に通常的に用いられる成分を含み、例えば抗酸化剤、安定化剤、溶解剤、ビタミン、顔料及び香料のような通常的な補助剤、そして担体を含む。

【0045】

本発明の剤形がペースト、クリーム又はゲルの場合には、担体成分として動物性油、植物性油、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、シリカ、タルク又は酸化亜鉛などを用いることができる。

【0046】

本発明の剤形がパウダー又はスプレーの場合には、担体成分として、ラクトース、タルク、シリカ、水酸化アルミニウム、珪酸カルシウム又はポリアミドパウダーを用いることができ、特にスプレーの場合には、追加的にクロロフルオロヒドロカーボン、プロパン／ブタン又はジメチルエーテルのような推進体を含むことができる。

【0047】

本発明の剤形が溶液又は乳濁液の場合には、担体成分として、溶媒、溶解剤又は乳濁剤を用いる。担体成分は、例えば水、エタノール、イソプロパノール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチルグリコールオイル、グリセロール脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール又はソルビタンの脂肪酸エステルがある。

10

【0048】

本発明の剤形が懸濁液の場合には、担体成分として、水、エタノール又はプロピレングリコールのような液状の希釈剤、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールエステル及びポリオキシエチレンソルビタンエステルのような懸濁剤、微小結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天又はトラガカントなどを用いることができる。

【0049】

本発明の剤形が界面活性剤含有クレンジングの場合には、担体成分として、脂肪酸アルコールサルフェート、脂肪酸アルコールエーテルサルフェート、スルホサクシネートモノエステル、イセチオネート、イミダゾリニウム誘導体、メチルタウレート、サルコシネート、脂肪酸アミドエーテルサルフェート、アルキルアミドベタイン、脂肪酸アルコール、脂肪酸グリセリド、脂肪酸ジエタノールアミド、植物性油、ラノリン誘導体又はエトキシ化グリセロール脂肪酸エステルなどを用いることができる。

20

【0050】

本発明は、さらに他の観点で、TIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液を用いた皮膚しわ改善又は皮膚弾力増進方法に関するものである。

【0051】

本発明は、さらに他の観点で、皮膚しわ改善又は皮膚弾力増進に使うためのTIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液の用途に関するものである。

30

【0052】

本発明は、さらに他の観点で、皮膚しわ改善用又は皮膚弾力増進用化粧料組成物の製造に使うためのTIMP-1及びTIMP-2を含む神経幹細胞の培養液の用途に関するものである。

【0053】

実施例

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の要旨によって本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないというのは当該分野で通常の知識を有する者に明らかであろう。

40

【0054】

実施例1：神経幹細胞培養液及び神経幹細胞抽出物生産

【0055】

胎児脳の脳室帯 (ventricular zone) から分離した成体神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を不死化 (immortalized) させて細胞を得た。

【0056】

具体的には、14週になった胎児神経細胞組織を0.1%コラゲナーゼと0.1%ヒアルロニダーゼ溶液で37℃で1時間処理し、0.05%Trypsin-EDTAで2～3分処理して単一細胞に分離した後、CD45-／CD133+／CD34-マーカーを

50

用いてFACSによって分離した。これをN-2 supplements、0.2mg/mlヘパリン、20ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factors)、20ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) 及び10ng/ml LIFが添加されたヒトニューロスフェア (human neurosphere) 培養培地で培養した。10~14日経過の後、形成されたニューロスフェア (neurospheres) をコラゲナーゼで処理して単一細胞に分離し、レトロウイルスベクター (retroviral vector) を用いてv-myc遺伝子を形質導入 (transduction) し、選別 (selection) して得た細胞をDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10%FBS (fetal bovine serum) 及び1%ペニシリン／ストレプトマイシンが含まれた非誘導性培地で培養した (Flax JD et al., Nature Biotechnology, 16, 1998; Lim H-C et al., Neuroscience Letters 435:175-180, 2008)。150mmの培養皿 (culture dishes) に前記細胞 5×10^5 個を分株し、培養培地15mlを添加した後、37℃、5%CO₂培養器で培養し、80%の細胞密集度 (cell confluence) に到達したとき、培養液を収得した。ここで、培養培地はDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10%FBS (fetal bovine serum)、1%ペニシリン／ストレプトマイシンが含まれた非誘導性培地であり、培養の後、非接着性細胞は除去した。このような過程で培養された神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) を継代培養する過程で培養液を収得し、これを遠心分離し、上澄み液を濾過した。

10

20

【0057】

実施例2：神経幹細胞培養液のヒト体細胞に対する細胞毒性確認

【0058】

ヒト体細胞 5×10^3 個を96-ウェルプレート (96-well plate) に接種し、細胞密集度 (cell confluence) が80~90%に到達するとき、神経幹細胞培養液を24時間処理した。WST-1を入れ、マイクロプレートリーダー (microplate reader) を用いて450nmで測定して神経幹細胞培養液の細胞毒性 (cytotoxicity) を確認した。

【0059】

その結果、神経幹細胞培養液はヒト体細胞増殖に影響がないことを確認した (図1)。

30

【0060】

実施例3：神経幹細胞培養液によるUVBによって増加する細胞内活性酸素種抑制確認

【0061】

ヒト体細胞 5×10^3 個を黒い96-ウェルプレート (96-well plate) に接種し、細胞密集度 (cell confluence) が80~90%に到達するとき、血清のない (serum free) DMEMで24時間培養した。その後、神経幹細胞培養液で24時間処理し、ヒト体細胞をUVB (30mJ/cm²) に露出させた後、10%血清が添加されたDMEM培地で24時間培養した。UVBによって増加する細胞内活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) を神経幹細胞培養液が抑制するかを確認するために、10μMジヒドロエチジウム (dihydroethidium、DHE) 溶液を入れ、37℃で30分間処理し、蛍光マイクロプレートリーダー (fluorescence microplate reader) を用いて測定した。

40

【0062】

その結果、神経幹細胞培養液はヒト体細胞でUVBによって増加する細胞内活性酸素種の減少に効果があることを確認した (図2)。

【0063】

また、24-ウェルプレート (24-well plate) にカバースリップ (cover slip) を用いてヒト体細胞を接種し、細胞密集度 (cell confluence) が80~90%に到達するとき、血清のない (serum free) DMEM

50

で24時間培養した。その後、神経幹細胞培養液を24時間処理し、ヒト体細胞をUVB (30 mJ/cm^2) に露出させた後、10%血清が添加されたDMEMで24時間培養した。UVBによって増加する細胞内活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) に神経幹細胞培養液が及ぶ影響を確認するために、 $10\text{ }\mu\text{M}$ ジヒドロエチジウム (DHE) 溶液を入れ、蛍光顕微鏡 (fluorescent microscope) を用いて分析した。

【0064】

その結果、神経幹細胞培養液はヒト体細胞でUVBによって増加する細胞内活性酸素種の減少に効果があることを確認した (図3)。

【0065】

実施例4：神経幹細胞培養液によるヒト体細胞でマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性抑制確認

【0066】

ヒト体細胞がUVBに露出されればコラーゲン (pro-collagen) の分解が促進される。したがって、本実施例では、このようなコラーゲン (pro-collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を確認した。

【0067】

ヒト体細胞を100mm培養皿に接種し、細胞密集度 (cell confluence) が80~90%に到達するとき、血清のない (serum free) DMEMで24時間培養した。その後、神経幹細胞培養液を24時間処理し、ヒト体細胞をUVB (30 mJ/cm^2) に露出させた後、10%血清が添加されたDMEM培地で24時間培養した。UVBに露出されるとき、コラーゲン (pro-collagen) の分解を促進させるマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性に対する神経幹細胞培養液の効果をqPCR (図4)、ウェスタンブロット法 (図5) 及びザイモグラフィ (zymography) (図6) を用いて測定した。

【0068】

その結果、神経幹細胞培養液はUVBによってコラーゲン (pro-collagen) の分解を促進させる役割をするマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を抑制することを確認した (図4~6)。

【0069】

実施例5：神経幹細胞培養液のUVBによるコラーゲン分解抑制確認

【0070】

ヒト体細胞がUVBに露出されればコラーゲン (pro-collagen) の分解が促進され、このようなコラーゲン (pro-collagen) の分解促進にはマトリクスメタロプロテイナーゼが関与することを実施例4で確認した。したがって、本実施例では、神経幹細胞培養液によってマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を抑制して、コラーゲン (pro-collagen) の合成が促進されることを確認した。

【0071】

実施例4と同様な方法で細胞を準備し、神経幹細胞培養液で24時間処理して、UVBによってコラーゲン分解を促進させるのに関与するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を抑制した。その後、神経幹細胞培養液によってマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性が抑制されるコラーゲン (pro-collagen) をウェスタンブロット法で測定した。

【0072】

その結果、神経幹細胞培養液がUVBによって促進されるコラーゲン分解に関与するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を抑制すれば、コラーゲン (pro-collagen) の合成が促進されることを確認した (図7)。

【0073】

実施例6：マトリクスメタロプロテイナーゼの活性抑制に関与する神経幹細胞培養液内の有効成分 (cytokines) TIMP-1/2 確認

10

20

30

40

50

【0074】

ヒト体細胞を150mm培養皿に接種し、細胞密集度 (cell confluence) が80~90%に到達するとき、血清のない (serum free) DMEMで培養した。48時間培養して培養液を収得し、タンパク質量が200 μ gになるように試料を準備した後、神経幹細胞培養液内の成分をサイトカインアレイ、特にRayBio社のHuman Cytokine Antibody Arrayによって分析した。

【0075】

その結果、神経幹細胞培養液内にTIMP-1、TIMP-2が存在することをHuman Cytokine Antibody Arrayによって確認し、もう一度ウェスタンブロット法 (Western-blot) で確認した (図8)。

10

【0076】

その後、ヒト体細胞を100mm培養皿に接種し、細胞密集度 (cell confluence) が80~90%に到達するとき、血清のない (serum free) DMEMで24時間培養した。その後、神経幹細胞培養液及び組み換えタンパク質TIMP-1、TIMP-2をそれぞれ又は一緒に24時間処理し、ヒト体細胞をUVB (30mJ/cm²) に露出させた後、10%血清が添加されたDMEM培地で24時間培養した。UVBによって促進されるマトリクスメタロプロテイナーゼの活性を神経幹細胞培養液が抑制するかを分析した。

【0077】

その結果、TIMP-1、TIMP-2が含有された神経幹細胞培養液はUVBによって増加するマトリクスメタロプロテイナーゼの活性を抑制することを確認した (図9)。

20

【0078】

実施例7: SKH-1マウスにおいて神経幹細胞培養液によるしわ生成抑制確認

【0079】

7-1: しわ生成抑制効果

【0080】

雌性SKH-1マウスを12週間UVB (30mJ/cm²/1回) に露出させ、神経幹細胞培養液で処理した後、12週にマウスを犠牲 (sacrifice) させた。神経幹細胞培養液で処理した群 (group) でのしわ生成抑制及びしわ改善効果をシリコンレプリカ (silicone replica) で分析した。

30

【0081】

その結果、神経幹細胞培養液で処理したマウスでしわ生成の抑制及び防止及びしわ改善の効果を現すことを確認した (図10及び図11)。

【0082】

7-2: ROS (reactive oxygen species) 減少効果

【0083】

実施例7-1のように組織を準備し、UVBによって生成されるROS (reactive oxygen species) に神経幹細胞培養液が及ぶ影響をDHE染色で分析した。

【0084】

その結果、神経幹細胞培養液で処理したマウスで、UVBによって促進されるROS (reactive oxygen species) が減少する効果を現すことを確認した (図12)。

40

【0085】

7-3: コラーゲン及びエラスチン回復効果

【0086】

実施例7-1のように組織を準備し、マウス皮膚組織を4%ホルムアルデヒドに固定し、組織をパラフィンに埋め込んで製作した後、3 μ mの厚さに切断した組織をスライドに付けた。その後、UVBによって減少するコラーゲン及びエラスチンをMasson's Trichrome染色及びVerhoeff's elastin染色でそれぞれ分析し

50

た。

【0087】

その結果、神経幹細胞培養液で処理したマウスでUVBによって減少するコラーゲン及びエラスチンが回復することを確認した（図13）。

【0088】

実施例8：SKH-1マウスにおいて神経幹細胞培養液によるMMP-2及びMMP-9減少確認

【0089】

8-1：UVBによって増加するMMP-2及びMMP-9の減少

【0090】

実施例7-1のように組織を準備し、マウス皮膚組織を4%ホルムアルデヒドに固定し、組織をパラフィンで製作した後、3µmの厚さに切断した組織をスライドに付け、パラフィン除去及び再水和過程（deparaffinize and rehydrate）を実施した。その後、抗原回復（antigen retrieval；citrate buffer、pH6.0）及び0.1%トリトン（Triton）X-100処理を実施し、正常口バ血清（normal donkey serum）でブロッキング（blocking）した後、1次抗体を1：100で24時間処理した。その後、2次抗体を用いて1時間処理し、DAPI染色を5分間実施した。ベクタシールド封入剤（vectashield mounting medium）を用いてスライドに固定させた後、共焦点顕微鏡（Confocal Microscope）で確認した。

【0091】

その結果、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいてUVBによって増加するMMP-2及びMMP-9が減少することを確認した（図14）。

【0092】

8-2：UVBによって増加するマトリクスメタロプロテイナーゼを調節する転写因子NFκB

【0093】

実施例7-1のように組織を準備し、マウス皮膚組織においてUVBによって促進される真皮内コラーゲン（collagen）の分解に関与するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性、そして前記マトリクスメタロプロテイナーゼを調節する転写因子（transcription factors）の発現をウェスタンブロット法で確認した（図15～図17）。また、神経幹細胞培養液がマトリクスメタロプロテイナーゼ及びマトリクスメタロプロテイナーゼを調節する転写因子によってコラーゲン生成に及ぶ影響を調査した（図18）。

【0094】

その結果、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいてUVBによって増加するMMP-1、MMP-2及びMMP-9の発現（図15）と活性（図16）が減少することを確認した。また、このようなマトリクスメタロプロテイナーゼを調節する転写因子であるNFκBも減少することを確認し（図17）、これによって真皮内のコラーゲンが再び回復することを確認した（図18）。

【0095】

実施例9：神経幹細胞培養液によるDNA損傷抑制及び回復確認

【0096】

実施例7-1のように組織を準備し、実施例8-1と同様な方法で組織を染色し、UVBによって誘発されるDNA損傷（damage）程度をγH2AXで確認した。また、神経幹細胞培養液がDNA損傷に及ぶ影響を確認するために、DNA回復酵素（repair enzymes）の一つであるRad50をウェスタンブロット法で確認した。

【0097】

その結果、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいてUVBによって誘発されるDNA損傷（damage）が復旧された。このとき、DNA回復酵素（repair en

10

20

30

40

50

zymes) の一つである Rad 50 によって損傷された DNA が復旧されることを確認した (図 19 及び図 20)。

【0098】

実施例 10: 神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液生産

【0099】

神経幹細胞培養液 (neural stem cell conditioned medium; NSC-CM) と脂肪幹細胞培養液 (adipose-derived stem cell conditioned medium; ASC-CM) の製造のために、150mm 培養皿 (culture dishes) に前記それぞれの細胞 5×10^5 個を分株し、培養培地 15ml を添加した後、37℃、5% CO₂ 培養器で培養し、80% 細胞密集度 (cell confluence) に到達するとき、培養液を収得した。このとき、神経幹細胞培養培地は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、10% FBS (fetal bovine serum)、1% ペニシリンストレプトマイシンを使い、脂肪幹細胞培養培地は DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12)、10% FBS (fetal bovine serum)、1% ペニシリンストレプトマイシンが含まれた非誘導性培地を使った。培養の後、非接着性細胞は除去した。このような過程で培養された神経幹細胞 (neural stem cells、NSCs) 及び脂肪幹細胞 (adipose-derived stem cells、ASC) を継代培養する過程で培養液を収得し、これを遠心分離し、上澄み液を濾過した。また、それぞれの培養液が細胞毒性 (cytotoxicity) がないことを WST-1 で確認した (図 21a)。

【0100】

実施例 11: in vitro で神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液によるマトリクスメタロプロテイナーゼの発現抑制比較

【0101】

11-1: マトリクスメタロプロテイナーゼの発現確認

【0102】

ヒト体細胞が UVB に露出されればコラーゲン (pro-collagen) の分解が促進される。したがって、本実施例では、このようなコラーゲン (pro-collagen) の分解を促進するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現を確認し、それぞれの幹細胞培養液内に存在する MMP-1 を確認した。

【0103】

ヒト体細胞を 100mm 培養皿に接種し、細胞密集度 (cell confluence) が 80~90% に到達するとき、血清のない (serum free) DMEM で 24 時間培養した。その後、神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液を 24 時間処理し、ヒト体細胞を UVB ($30 \text{ mJ} / \text{cm}^2$) に露出させた後、10% 血清が添加された DMEM 培地で 24 時間培養した。UVB に露出されるとき、コラーゲン (pro-collagen) の分解を促進させるマトリクスメタロプロテイナーゼの発現に対する神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液の効果を qPCR (図 21b) 及びウェスタンブロット法 (図 22b) で測定した。

【0104】

その結果、神経幹細胞培養液内で UVB によってコラーゲン (pro-collagen) の分解を促進させる役割をするマトリクスメタロプロテイナーゼの発現をもっと大きく抑制することを確認した。

【0105】

11-2: しわ生成抑制関連因子比較

【0106】

本実施例では、コラーゲン (pro-collagen) の分解を促進させる役割をするマトリクスメタロプロテイナーゼ及びこれらの活性を阻害する因子 (TIMP-1 及び

10

20

30

40

50

TIMP-2) が神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液内に存在するかを確認した。それぞれの培養液内のタンパク質総量を Bradford (図 23a) によって確認し、その後、RayBio(R) Human cytokine antibody array で MMP-1、-2、-3、-7、-9、-10 及び -13 の濃度を分析した (図 22a)。また、それぞれの培養液で処理し、ついでマトリクスメタロプロテイナーゼの発現をウェスタンブロット法 (図 23b) で分析した。

【0107】

その結果、神経幹細胞培養液内にはコラーゲンの分解を促進させる MMP-1、MMP-2、MMP-3 及び MMP-9 の含量がずっと少なく、さらにマトリクスメタロプロテイナーゼの活性を抑制させる TIMP-1 及び TIMP-2 の含量が脂肪幹細胞培養液より高かった。そして、他の MMP-7、MMP-10 及び MMP-13 の含量はそれぞれの培養液内にほぼ同一に存在することを確認した。したがって、神経幹細胞培養液内の主要マトリクスメタロプロテイナーゼの含量が低いので、コラーゲン保護能力がより良いと予測することができる。

【0108】

実施例 12: *in vivo* で神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液の効果比較

12-1: SKH-1 マウスにおいて神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液によるしわ生成抑制確認

【0109】

雌性 SKH-1 マウスを 12 週間 UVB に (1 週～4 週は $30 \text{ mJ} / \text{cm}^2 / 3 \text{ 回}$ 、5 週～12 週は $30 \text{ mJ} / \text{cm}^2 / 1 \text{ 回}$) 露出させ、神経幹細胞培養液で処理した後、12 週にマウスを犠牲 (*sacrifice*) させた。神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液で処理した群 (*group*) でしわ生成抑制及びしわ改善効果を *silicone replica* で分析した。

【0110】

その結果、脂肪幹細胞培養液に比べ、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいてしわ生成の抑制及び防止及びしわ改善効果がもっと大きく高いことを確認した (図 25a 及び図 25b)。

【0111】

12-2: SKH-1 マウスにおいて神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液によるコラーゲン及びエラスチン回復効果

【0112】

実施例 7 のように組織を準備し、マウス皮膚組織を 4% ホルムアルデヒドに固定し、組織をパラフィンに埋め込んで製作した後、 $3 \mu\text{m}$ の厚さに切断した組織をスライドに付けた。その後、UVB によって減少するコラーゲン及びエラスチンを Masson's Trichrome 染色及び Verhoeff's elastin 染色によってそれぞれ分析した。

【0113】

その結果、脂肪幹細胞培養液に比べ、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいて UVB によって減少するコラーゲン及びエラスチンがより大きく回復することを確認した (図 26)。

【0114】

実施例 13: *in vivo* で神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液によるマトリクスメタロプロテイナーゼの発現抑制比較

【0115】

実施例 7-1 のように組織を準備し、マウス皮膚組織を 4% ホルムアルデヒドに固定し、組織をパラフィンに埋め込んで製作した後、 $3 \mu\text{m}$ の厚さに切断した組織をスライドに付け、パラフィン除去及び再水和過程 (*deparaffinize and rehydrate*) を実施した。その後、抗原回復 (*antigen retrieval; citrate buffer, pH 6.0*) 及び 0.1% トリトン (*Triton*) X-1

10

20

30

40

50

00 処理を実施し、正常口バ血清 (normal donkey serum) でブロッキング (blocking) した後、1 次抗体を 1 : 100 で 24 時間処理した。その後、2 次抗体を用いて 1 時間処理し、DAPI 染色を 5 分間実施した。ベクタシールド封入剤 (vectashield mounting medium) を用いてスライドに固定させた後、共焦点顕微鏡 (Confocal Microscope) で確認した。

【0116】

その結果、脂肪幹細胞培養液に比べ、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいて UV B によって増加する MMP-2 及び MMP-9 がより大きく減少することを確認した (図 27)。

【0117】

実施例 14 : 神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液による DNA 損傷抑制及び回復確認

【0118】

実施例 7-1 のように組織を準備し、実施例 8-1 と同様な方法で組織を染色し、UV B によって誘発される DNA 損傷 (damage) 程度を γ H2AX で確認した。また、神経幹細胞培養液及び脂肪幹細胞培養液が DNA 損傷に及ぶ影響を確認するために、DNA 回復酵素 (repair enzymes) の一つである Rad50 をウェスタンブロット法で確認した。

【0119】

その結果、脂肪幹細胞培養液に比べ、神経幹細胞培養液で処理したマウスにおいて UV B によって誘発される DNA 損傷 (damage) が復旧された。このとき、DNA 回復酵素 (repair enzymes) の一つである Rad50 によって、損傷された DNA がより大きく復旧されることを確認した (図 28)。

【産業上の利用可能性】

【0120】

本発明による低濃度の多様なマトリクスメタロプロテイナーゼ及び高濃度の TIMP-1 及び TIMP-2 を有効成分として含む神経幹細胞培養液はコラーゲンの生成を抑制するマトリクスメタロプロテイナーゼの発現及び活性を抑制してコラーゲンとエラスチンの合成を回復させるので、皮膚しわ改善又は皮膚弾力増進用組成物として有用である。

【0121】

以上で本発明の内容のうち特定の部分を詳細に記述したが、当該分野の通常の知識を有する者にとってこのような具体的技術は単に好適な実施形態であるだけで、これによって本発明の範囲が制限されるものではない点は明らかであろう。したがって、本発明の実質的な範囲は添付の請求範囲及びその等価物によって定義されると言える。

10

20

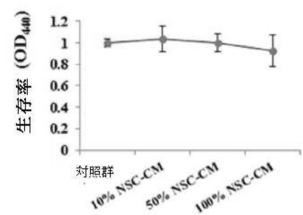
30

40

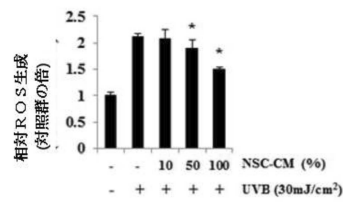
50

【図面】

【図 1】

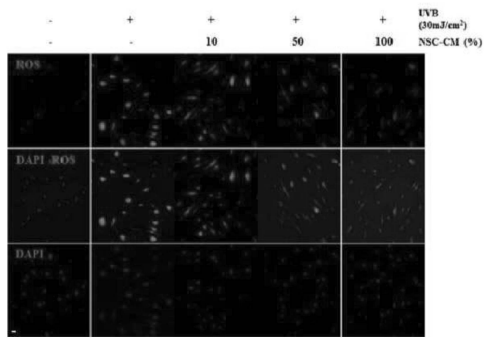


【図 2】

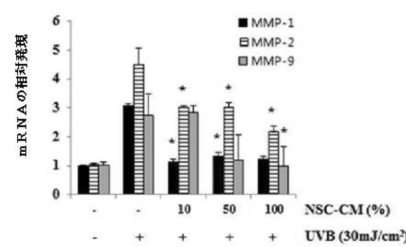


10

【図 3】

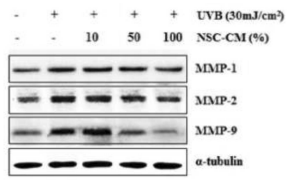


【図 4】

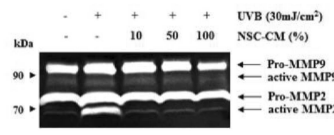


20

【図 5】



【図 6】

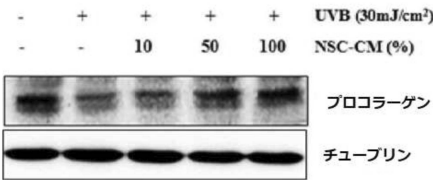


30

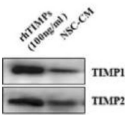
40

50

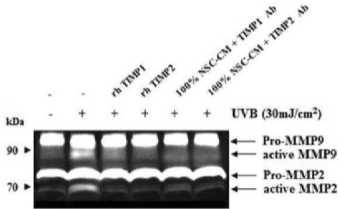
【図 7】



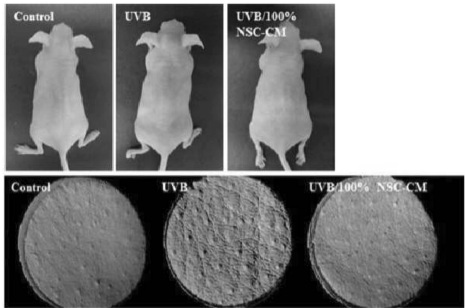
【図 8】



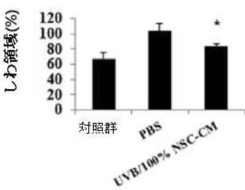
【図 9】



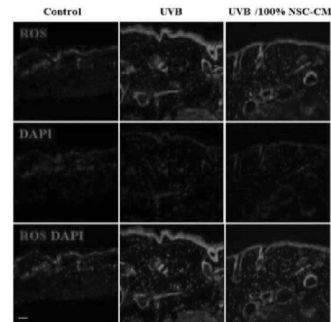
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

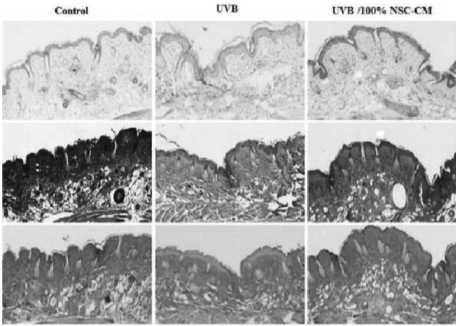
20

30

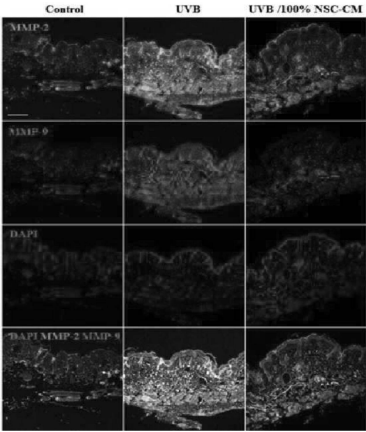
40

50

【図 1 3】

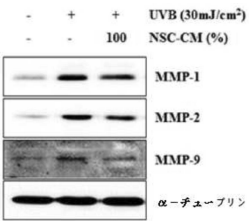


【図 1 4】

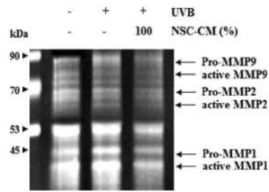


10

【図 1 5】

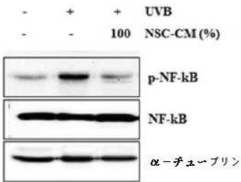


【図 1 6】

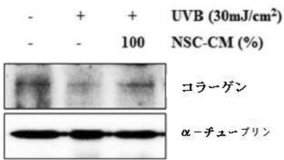


20

【図 1 7】



【図 1 8】

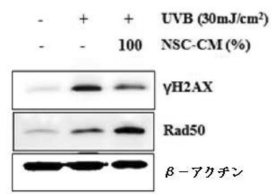


30

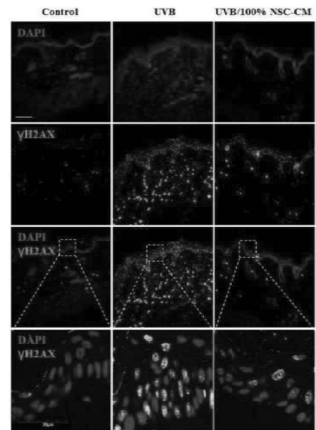
40

50

【図 19】

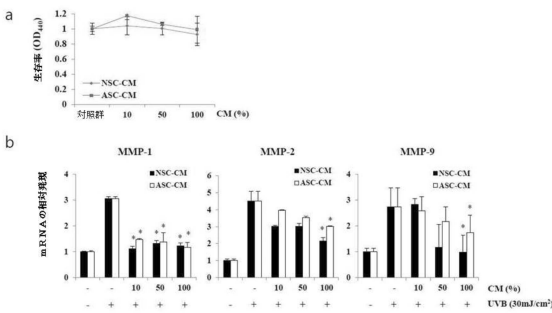


【図 20】

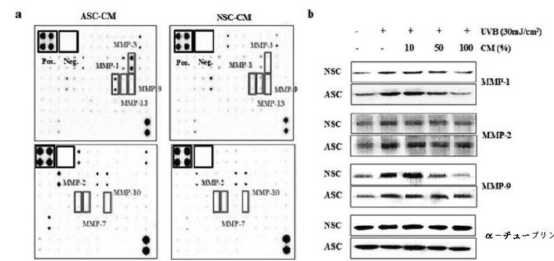


10

【図 21】

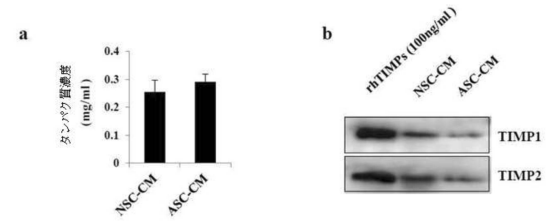


【図 22】

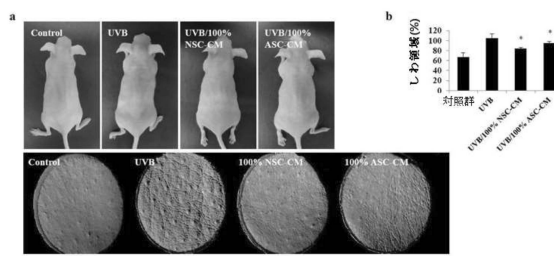


20

【図 23】



【図 24】

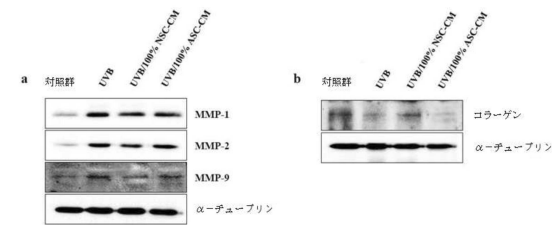


30

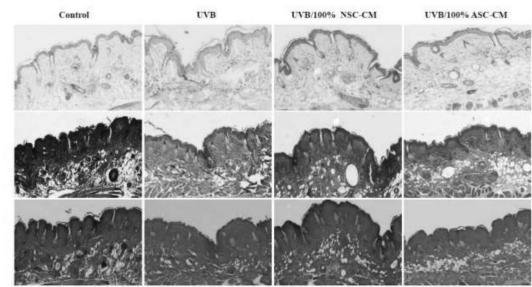
40

50

【図 2 5】

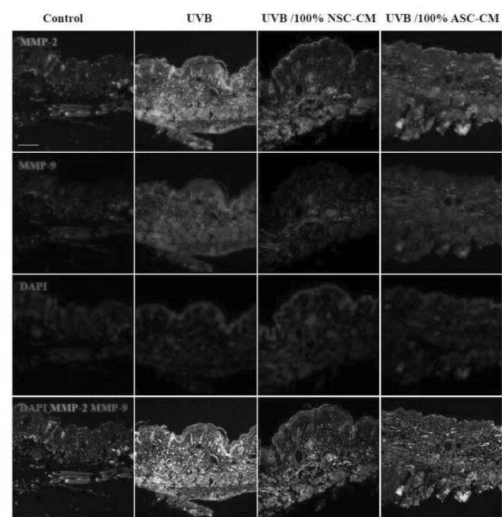


【図 2 6】

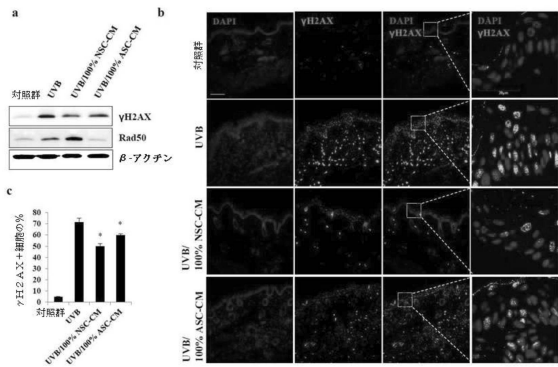


10

【図 2 7】



【図 2 8】



20

30

40

50

フロントページの続き

- (51)国際特許分類 F I
A 6 1 Q 5/12 (2006.01) A 6 1 Q 5/12
A 6 1 Q 1/14 (2006.01) A 6 1 Q 1/14

， 6 1 ， 5 0 3 - 1 2 0 1
(72)発明者 ファン インシク
大韓民国， 0 4 7 1 0 ， ソウル， ソンドン－グ， ワンシムニ－ロ 3 3 -ギル， 1 2 -1
審査官 田中 晴絵
(56)参考文献 韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 6 - 0 0 6 1 9 4 5 (KR, A)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 5 9 3 8 0 (WO, A 1)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)
P u b M e d