

(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
2023年12月21日(21.12.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/243732 A1

(51) 国際特許分類:
CI2N 15/12 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
CI2Q 1/68 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/022650

(22) 国際出願日: 2023年6月19日(19.06.2023)

(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:
63/353,070 2022年6月17日(17.06.2022) US
63/403,991 2022年9月6日(06.09.2022) US

(71) 出願人: ロート製薬株式会社
(**ROHTO PHARMACEUTICAL CO., LTD.**) [JP/
JP]; 〒5448666 大阪府大阪市生野区巽西
1丁目8番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: フローレンス フローレンス
(**FLORENCE Florence**); 〒5448666 大阪府大阪
市生野区巽西1丁目8番1号 ロート製
薬株式会社内 Osaka (JP). 羽賀 雅俊(**HAGA
Masatoshi**); 〒5448666 大阪府大阪
市生野区巽西1丁目8番1号 ロート製薬株式会社内 Osaka
(JP). 佐藤 康成(**SATO Yasunari**); 〒5448666 大
阪府大阪市生野区巽西1丁目8番1号 ロ
ート製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人 津国 (**TSUKUNI &
ASSOCIATES**); 〒1020083 東京都千代田区麹町
5-3-1 麹町ビジネスセンター Tokyo (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,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, 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).

(54) **Title:** BIOMARKER OF SKIN AGING, METHOD FOR DETERMINING SKIN AGING, AND METHOD FOR
SCREENING SKIN AGING IMPROVEMENT SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 皮膚老化のバイオマーカー、皮膚老化の判定方法、皮膚老化改
善物質のスクリーニング方法

(57) **Abstract:** The objective of the present invention is to provide a biomarker for use in determination of skin aging,
comprising a protein or a fragment thereof. Alternatively, the objective of the present invention is to provide a method
for determining skin aging in a subject, characterized in measuring a protein or a fragment thereof in a blood sample of
the subject. Yet alternatively, the objective of the present invention is to provide a method for screening a skin aging im-
provement substance, characterized in studying an expression level of or a concentration change in a protein or a fragment
thereof in a blood sample of a subject before and after intake of a test substance by the subject. The present invention is a
biomarker for use in determination of skin aging, comprising a protein selected from the group consisting of: osteomod-
ulin (OMD); chondroadherin (CHAD); collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2); leucine-rich repeat-containing protein
15 (LRRC15); glycoprotein hormones alpha chain/choriogonadotropin subunit beta 3/choriogonadotropin subunit beta 7
(CGA/CGB3/CGB7); lutropin subunit beta (LHB); glycoprotein hormones alpha chain/lutropin subunit beta (CGA/LHB);
and glycoprotein hormones alpha chain/follitropin subunit beta (CGA/FSHB), or a fragment thereof.

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：本発明は、皮膚老化の判定における使用のための、タンパク質又はそのフラグメントからなる、バイオマーカーを提供することを目的とする。あるいは、被験体の血液サンプル中のタンパク質又はそのフラグメントを測定することを特徴とする、被験体における皮膚老化の判定方法を提供することを目的とする。あるいは、被験体に被験物質を摂取させる前後の被験体の血液サンプル中のタンパク質又はそのフラグメントの発現レベル又は濃度の変化を調べることを特徴とする、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。本発明は、皮膚老化の判定における使用のための、オステオモジュリン（osteomodulin（OMD））、コンドロアドヘリン（chondroadherin（CHAD））、コラーゲンXⅠ型アルファ2鎖（collagen type XI alpha 2 chain（COL11A2））、ロイシン-リッチリピート含有タンパク質15（leucine-rich repeat-containing protein 15（LRRC15））、グリコプロテインホルモンアルファ鎖／コリオゴナドトロピンサブユニットベータ3／コリオゴナドトロピンサブユニットベータ7（Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7（CGA / CGB3 / CGB7））、ルトロピンサブユニットベータ（lutropin subunit beta（LHB））、グリコプロテインホルモンアルファ鎖／ルトロピンサブユニットベータ（glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta（CGA/LHB））、及びグリコプロテインホルモンアルファ鎖／フォリトロピンサブユニットベータ（glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta（CGA/FSHB））から成る群より選択されるタンパク質又はそのフラグメントからなる、バイオマーカーである。

明 細 書

発明の名称：

皮膚老化のバイオマーカー、皮膚老化の判定方法、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本特許出願は、2022年6月17日に出願された米国仮出願第63/353,070号及び2022年9月6日に出願された米国仮出願第63/403,991号の優先権を主張し、これらの内容はFlorence, et al. (2023). IFSCC Magazine, 26(1), 7-16. でパブリッシュされ、その全体が参照により本書に組み込まれる。

[0002] 本発明は、皮膚老化のバイオマーカー、皮膚老化の判定方法、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0003] 皮膚の老化は、様々な内因性要因（例えば細胞老化）と外因性要因（例えば紫外線、刺激物等）の影響を受ける多面的なプロセスである（非特許文献1）。

[0004] 循環器系を共有するような若齢マウスと老齢マウスとの間のパラバイオシスに関し、若齢血清に存在する因子が老齢マウスの組織や臓器に再生作用を示す一方で、若齢マウスの臓器には老齢血清由来の因子による変性作用が見られることが報告されている（非特許文献2）。これに基づき、加齢に伴う血液中の分子変化が生体の老化に寄与しているのではないかという仮説が提唱されている（非特許文献3）。しかし、血液中のタンパク質の変化が皮膚に及ぼす影響についての研究は、まだ十分とは言えない。特に皮膚の加齢の内在的要因として、血中タンパク質の変化による影響は十分に知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Zhang, S., & Duan, E. (2018). Cell transplantation, 27(5), 729-738.

非特許文献2 : Conboy, I. et al. (2005). Nature, 433(7027), 760-764.

非特許文献3 : Lehallier, B. et al. (2019). Nature medicine, 25(12), 1843-1850

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、皮膚老化の判定における使用のための、タンパク質又はそのフラグメントからなる、バイオマーカーを提供することを目的とする。あるいは、被験体の血液サンプル中のタンパク質又はそのフラグメントを測定することを特徴とする、被験体における皮膚老化の判定方法を提供することを目的とする。あるいは、被験体に被験物質を摂取させる前後の被験体の血液サンプル中のタンパク質又はそのフラグメントの発現レベル又は濃度の変化を調べることを特徴とする、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、加齢に伴い、性別特異的に増加する血液中タンパク質を初めて見出し、本発明を完成するに至った。更に、これらのタンパク質が線維芽細胞におけるコラーゲン線維形成を抑制し、コラーゲン前駆体の分泌を抑制し、細胞外マトリクスのフィブリル構造に異常を起こすことも初めて見出した。また、これらのタンパク質は、表皮におけるバリア機能を抑制し、真皮におけるⅠ型コラーゲン前駆体の発現を抑制することも明らかにした。これらの知見に基づき、本発明者らは皮膚老化判定における使用のためのバイオマーカー、皮膚老化の判定方法、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法を開発した。

[0008] すなわち、本発明の要旨は、以下のとおりである。

[1] 皮膚老化の判定における使用のための、オステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラー

ゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピートー含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択されるタンパク質又はそのフラグメントからなる、バイオマーカー。

〔2〕上記タンパク質又はそのフラグメントが、被験体の血液サンプル中に含まれる、〔1〕に記載のバイオマーカー。

〔3〕被験体の血液サンプル中の上記タンパク質又はそのフラグメントの発現の増加、又は濃度の増加が、被験体の皮膚老化の進行を示す、〔2〕に記載のバイオマーカー。

〔4〕被験体の血液サンプル中の上記タンパク質又はそのフラグメントの発現の低下、又は濃度の減少が、被験体の皮膚老化の改善を示す、〔2〕に記載のバイオマーカー。

〔5〕被験体の血液サンプル中のオステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピートー含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin

subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖/ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖/フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択される少なくとも1種のタンパク質又はそのフラグメントを測定することを特徴とする、被験体における皮膚老化の判定方法。

[6] 被験体に被験物質を摂取させる前後の被験体の血液サンプル中のオステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピート含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖/コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3/コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖/ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖/フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択される少なくとも1種のタンパク質又はそのフラグメントの発現レベル又は濃度の変化を調べることを特徴とする、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法。

発明の効果

[0009] 本発明の皮膚老化のバイオマーカーは、皮膚の老化により増加するため、

老化の進行を示す生理学的指標になるタンパク質である。本発明の皮膚老化の判定方法は、老化が進行している皮膚で増加するタンパク質、すなわち本発明の皮膚老化のバイオマーカーを測定し、皮膚老化を判定する。本発明の皮膚老化改善物質のスクリーニング方法によると、被験物質の摂取前後での本発明の皮膚老化のバイオマーカータンパク質の濃度の変化を調べ、皮膚老化改善物質を見出すことができる。本発明の方法によって見出される皮膚老化改善物質は、皮膚老化に関する症状を制御することができるため、皮膚老化が進行することによって起こる症状に対して効果を奏することが期待できる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] 8種類のタンパク質について女性および男性の経年のzスコアの軌跡を示す。

[図2A] 図2 Aは、試験例2におけるosteomodulinのコラーゲン産生に関する評価結果のうち、NHDF細胞のI型コラーゲン線維の免疫蛍光画像を示す。

[図2B] 図2 Bは、試験例2におけるosteomodulinのコラーゲン産生に関する評価結果のうち、コラーゲン産生量の結果を示す。

[図2C] 図2 Cは、試験例2におけるosteomodulinのコラーゲン産生に関する評価結果のうち、NHDFの細胞外マトリックスの走査型電子顕微鏡画像を示す。

[図2D] 図2 Dは、試験例2におけるosteomodulinのコラーゲン産生に関する評価結果のうち、コラーゲン線維径の定量化と分布の結果を示す。

[図3] 図3は、試験例3における遺伝子発現の結果を示す（A : OCLN、B : OCLDN1、C : FLG、D : LOR、E : KRT1）。

[図4A] 図4 Aは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の結果のうち、HSEのH&E染色を示す。

[図4B] 図4 Bは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の結果のうち、経表皮水分損失（TEWL）の測定結果を示す。

[図4C] 図4 Cは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の

結果のうち、KRT1/KRT14の免疫染色を示す。

[図4D]図4 Dは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の結果のうち、FLG/CLDN1の免疫染色を示す。

[図4E]図4 Eは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の結果のうち、Ki67の免疫染色を示す。

[図4F]図4 Fは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の結果のうち、HSEの表皮におけるKRT1、FLG、LOR、OCLN、およびCLDN1の遺伝子発現量の結果を示す。

[図4G]図4 Gは、試験例4におけるヒト皮膚等価物（HSE）の組織学的解析の結果のうち、HSEの真皮におけるCOL1A1の遺伝子発現量の結果を示す。

[図5A]図5 Aは、試験例5におけるCHAD、LRRC15のコラーゲン産生に関する評価の結果のうち、NHDF細胞のⅠ型コラーゲン線維の免疫染色蛍光画像を示す。

[図5B]図5 Bは、試験例5におけるCHAD、LRRC15のコラーゲン産生に関する評価の結果のうち、コラーゲン産生量の結果を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。なお、本明細書中で使用される用語は、特に言及しない限り、当該技術分野で通常用いられる意味で解釈される。

[0012] [バイオマーカー]

本実施形態に係るバイオマーカーは、老化バイオマーカーであり、加齢とともに変動するファクターを意味し、老化、特に皮膚老化の進行度等の老化状態を判定、予測できるものである。また、本実施形態に係るバイオマーカーによる老化の判定、予測によって、老化の改善および改悪を判定、予測できる。老化の改善とは、老化状態の抑止、老化の進行抑制、老化の逆行促進（若返り）を意味する。ここで、老化とは、成長期を過ぎておこる個体、器官、組織、細胞などに現れる機能の低下を意味する。皮膚老化とは、狭

義には、加齢に伴って現れる皮膚の機能低下を意味し、広義には、様々な内因性要因（例えば細胞老化）と外因性要因（例えば紫外線、刺激物等）の影響を受けて現れる皮膚の機能低下を意味する。本実施形態に係るバイオマーカーは、生理的老化状態や病的老化状態、特に皮膚の生理的老化状態や病的老化状態の指標となりえる。生理的老化は加齢とともに必然的に進行する生理的な機能低下であり、病的老化は病的状態を引き起こすような機能の低下を意味する。

[0013] 本実施形態に係るバイオマーカーは、皮膚老化の判定における使用のためのバイオマーカーであり、オステオモジュリン（osteomodulin（OMD））、コンドロアドヘリン（chondroadherin（CHAD））、コラーゲンⅩⅠ型 アルファ 2 鎖（collagen type XI alpha 2 chain（COL11A2））、ロイシンーリッチ リピーター含有タンパク質 15（leucine-rich repeat-containing protein 15（LRRC15））、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ 3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ 7（Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7（CGA / CGB3 / CGB7））、ルトロピン サブユニット ベータ（lutropin subunit beta（LHB））、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ（glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta（CGA/LHB））、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ（glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta（CGA/FSHB））から成る群より選択されるタンパク質又はそのフラグメントからなる。

[0014] 上記タンパク質又はそのフラグメントは、加齢に伴い、特に女性において、血液中で増加するタンパク質群であり、皮膚細胞に対して老化を促進させる方向に作用するものである。上記バイオマーカーの各タンパク質は従来公知のタンパク質であり、表 1－1 及び 1－2 に示す特徴を有する。

[0015]

[表1-1]

Protein Name	Gene (Entrez Gene ID)	UniProt ID	Size (kDa)	GO Biological Processes	GO Molecular Function	GO Cellular Component
Collagen type XI alpha 2 chain	COL11A2	P13942	172	Cartilage development, collagen fibril organization	Extracellular matrix structural constituent, extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength, metal ion binding, protein- macromolecule adaptor activity	Collagen trimer, collagen type XI trimer/2, collagen-containing, endoplasmic reticulum lumen, extracellular matrix, extracellular region, extracellular space
Chondroadherin	CHAD	O15335	40	Bone development, negative regulation of bone trabecula formation	-	Extracellular matrix, extracellular space
Osteomodulin	OMD	Q99983	49	Regulation of bone mineralization, cell adhesion	-	Collagen-containing extracellular matrix, extracellular region, extracellular space, Golgi lumen, lysosomal lumen, extracellular exosome
Leucine-rich repeat- containing protein 15	LRRCL5	Q8TF66	64	Negative regulation of protein localization to plasma membrane, positive regulation of cell migration, receptor-mediated virion attachment to host cell	Collagen binding, fibronectin binding, laminin binding	Extracellular exosome, extracellular matrix, extracellular space, integral component of membrane
Glycoprotein hormones alpha chain/ choriogonadotropin subunit beta 3/ choriogonadotropin subunit beta 7	CGA, CGB3, CGB7	P01215 (CGA) P0DN87 (CGB7)	~27	Developmental growth, follicle-stimulating hormone secretion, follicle-stimulating hormone signaling pathway, G protein-coupled receptor signaling pathway, hormone-mediated signaling pathway, luteinizing hormone secretion, negative regulation of organ growth, positive regulation of cell migration, positive regulation of cell population proliferation, positive regulation of steroid biosynthetic process, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, regulation of signaling receptor activity, thyroid gland development, thyroid hormone generation	Follicle-stimulating hormone activity, hormone activity	Extracellular region, extracellular space, follicle-stimulating hormone complex, Golgi lumen, pituitary gonadotropin

[0016] [表1-2]

Protein Name	Gene (Entrez Gene ID)	UniProt ID	Size (kDa)	GO Biological Processes	GO Molecular Function	GO Cellular Component
Lutropin subunit beta	LHB	Q8WXL0	14	-	Hormone activity	Extracellular region
Glycoprotein hormones alpha chain/lutropin subunit beta	CGA.LHB	Q8WXL0 (LHB)	~27	Similar with CGA, CGB and LHB	Similar with CGA and LHB	Similar with CGA, CGB and LHB
Glycoprotein hormones alpha chain/ folliclestimulating subunit beta	CGA.FSHB	P01225 (FSHB)	~27	female gamete generation, female pregnancy, follicle-stimulating hormone signaling pathway, G protein-coupled receptor signaling pathway, positive regulation of bone resorption, positive regulation of cell migration, positive regulation of cell population proliferation, positive regulation of gene expression, positive regulation of steroid biosynthetic process, positive regulation of transcription by RNA polymerase II, progesterone biosynthetic process, regulation of osteoclast differentiation, regulation of signaling receptor activity, Sertoli cell proliferation, spermatogenesis, transforming growth factor beta receptor signaling pathway	-	Cytoplasm, extracellular region, extracellular space, follicle-stimulating hormone complex, follicle-stimulating hormone activity

Gene IDs are obtained from the Entrez Gene resource of the NCBI. The biological process, molecular functions, and cellular component information is obtained from the Gene Ontology (GO) database.

- [0017] 本実施形態に係るバイオマーカーのタンパク質としては、皮膚老化の判定の感度の観点から、上記8種のうち、オステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、ロイシンーリッチリピート含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRR15)) が好ましい。バイオマーカーのタンパク質のサイズとしては、皮膚老化の判定の感度の観点から、180kDa以下が好ましく、150kDa以下がより好ましく、120kDa以下が更に好ましく、80kDa以下が更により好ましく、66kDa以下が特に好ましい。
- [0018] 本実施形態に係るバイオマーカーを測定する際には、被験体試料として体液サンプルを用いることが好ましく、例えば、血液、血清、血漿、尿、分泌物、間質液、滑液、髄液、リンパ液が挙げられ、これらのうち、血液、血清、血漿がより好ましく、血清、血漿がさらに好ましい。上記タンパク質又はそのフラグメントは、被験体試料、好ましくは体液サンプル、より好ましくは血液サンプル、さらに好ましくは血清サンプル中に含まれる。
- [0019] 上記被験体としては、哺乳動物、ヒトが好ましく、ヒトがより好ましく、生物学上の女性のヒトがさらに好ましい。
- [0020] 本実施形態に係るバイオマーカーにおいては、被験体試料中（好ましくは体液サンプル、より好ましくは血液サンプル、さらに好ましくは血清サンプル中）の上記タンパク質又はそのフラグメントの発現の増加、又は濃度の増加が、被験体の皮膚老化の進行を示す。逆に、被験体試料中（好ましくは体液サンプル、より好ましくは血液サンプル、さらに好ましくは血清サンプル中）の上記タンパク質又はそのフラグメントの発現の低下、又は濃度の減少が、被験体の皮膚老化の改善を示す。被験体試料は、被検体から採取した後に、測定方法に合わせて適切に調製してもよい。
- [0021] 上記被験体試料を用いて本実施形態に係るバイオマーカーの発現量、濃度等を測定する方法としては、各タンパク質の従来公知の検出方法、測定方法を用いることができる。例えば、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、免疫沈降法、ウェスタンブロット等

が挙げられ、中でもELISAが簡便であり好ましい。

[0022] ELISAの一実施形態では、本実施形態に係るバイオマーカータンパク質を含むサンプルを、固体の支持体（例えば、マイクロタイタープレート等）に曝す。サンプル中のバイオマーカータンパク質が支持体に固定され、バイオマーカータンパク質に特異的な酵素共役抗体等を用いて直接検出される。

[0023] [皮膚老化の判定方法]

本発明の皮膚老化の判定方法は、被験体の血液サンプル中のオステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピート含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRR15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択される少なくとも1種のタンパク質又はそのフラグメントを測定することを特徴とする、被験体における皮膚老化の判定方法である。

[0024] 本実施形態に係る皮膚老化の判定方法は、(i) 被験体の体液サンプル、好ましくは被験体の血液サンプル、より好ましくは被験体の血清サンプル中の上記各タンパク質又はそのフラグメント量又は濃度を測定することと、(ii) (i) で得られた測定値と、皮膚老化判定の基準となる基準値とを比較して被験体の皮膚老化を判定すること、を含むことを特徴とする。上記基準値は、健常な個体の体液レベル、好ましくは血液レベル、より好ましくは血清レベ

ルとしてもよいし、上記被験体の年齢の健常人における平均値としてもよいし、上記被験体の以前の測定値であってもよいし、上記被験体と同様の状況を有する人における平均値であってもよい。上記工程(i)で得られた測定値が、上記基準値よりも高い場合には、皮膚老化が標準より進んでいる、又は以前より皮膚老化が進んだと判定される。逆に上記工程(i)で得られた測定値が、上記基準値よりも低い場合には、皮膚老化が標準より遅れている、皮膚老化の進行が標準より遅い、以前より皮膚老化が改善した、皮膚老化の進行が抑制された、又は皮膚老化の逆行（若返り）が起こったと判定される。本実施形態の判定方法によると、バイオマーカーにより皮膚老化の進行状態を適切に評価することができる。なお、当該方法において使用する上記タンパク質又はそのフラグメントは、上述の本発明のバイオマーカーに該当し、具体的な説明はバイオマーカーの項（0012～0022段落）の記載を適用できる。

[0025] [皮膚老化改善物質のスクリーニング方法]

本発明の皮膚老化改善物質のスクリーニング方法は、被験体に被験物質を摂取させる前後の被験体の血液サンプル中のオステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピートー含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB 3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ foll

itropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択される少なくとも 1 種のタンパク質又はそのフラグメントの発現レベル又は濃度の変化を調べることを特徴とする。

[0026] 本実施形態に係る皮膚老化改善物質のスクリーニング方法は、(i) 被験物質を摂取させる前の被験体の血液サンプル中の上記タンパク質又はそのフラグメントの量又は濃度を測定する工程、(ii) 被験体に被験物質を摂取させる工程、(iii) 上記工程 (ii) から一定期間後に、被験体の血液サンプル中の上記タンパク質又はそのフラグメント (上記工程 (i) で測定したものと同一のもの) の量又は濃度を測定する工程、(iv) 上記 (i) と (iii) の測定値を比較し、(i) より (iii) の値が低い場合、又は (i) と (iii) の値が同じ場合には、被験物質は皮膚老化改善物質であると判断し、(i) より (iii) の値が高い場合には、被験物質は皮膚老化改善物質ではないと判断する工程、を含む。本発明の方法によると、皮膚老化を改善・予防したり、皮膚老化の進行を抑制したり、老化の逆行（若返り）を促進するヘルスケア素材や医薬品素材や化粧品素材などを見出すことができる。なお、当該方法において使用する上記タンパク質又はそのフラグメントは、上述の本発明のバイオマーカーに該当し、具体的な説明はバイオマーカーの項（0012～0022 段落）の記載を適用できる。

実施例

[0027] 以下、試験例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、以下の試験例等における配合量は特記しない限り質量％を示す。なお、各試験例における培養条件などの試験条件は、特記しない限り、添加する物質の違いを除いて、同じ条件で行った。また、全ての試験毎にコントロールやネガティブコントロールを供し、本発明のバイオマーカーの効果を正確に評価した。

[0028] 以下、試験例では特記しない限り、次の細胞培養、材料、方法を使用した。

〈細胞培養と材料〉

- ・真皮線維芽細胞：新生児正常ヒト真皮線維芽細胞（NHDFs（NB））、ロット番号05882（Kurabo, Osaka, Japan）を用い、10%牛胎児血清および1%抗生物質、抗真菌剤を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM；Gibco, USA）において培養した。

- ・培養ヒトケラチノサイト：新生児正常ヒト表皮ケラチノサイト（NHEK（NB））、ロット番号7609（Kurabo, Osaka, Japan）を用い、Humedia-KG2培地（Kurabo, Japan）において培養した。

- ・細胞の培養条件：5%CO₂インキュベーター内で37℃にて培養した。

- ・組換えヒトOMD（ab27632）はAbcam（Cambridge, UK）より入手した。

- ・プロコラーゲン1ELISAキット（Human Pro-Collagen I alpha 1 DuoSet ELISA, DY6220-05）はR&D Systems（米国ミネソタ州ミネアポリス）より購入した。

[0029] 〈方法〉

- ・生存細胞数の計数方法：

Hoechst 33342（Dojindo, Kumamoto, Japan）で染色し、ImageXpress（登録商標）（Molecular Devices, California, USA）で計数した。

[0030] ・走査型電子顕微鏡（SEM）：

NHDFは、そのサンプルと同様のプロトコルを用いてプレーティングした。処理群にリコンビナントOMD（0.01 μM、0.1 μM、または1 μM）を添加した。6日間処理後、NHDFを固定液で固定し、サンプルをSEM観察に供した。

[0031] ・定量的リアルタイムRT-PCR：

RNeasy mini kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて培養細胞からRNAを抽出し、NanoDrop UV-Vis spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US）を用いてRNA濃度を決定した。qPCRのために、RNAはReverTraAce qPCR RT Master Mix（東洋紡、大阪、日本）を用いて第一鎖のcDNAに逆転写された。このcDNAをSYBR™Green PCR Master MixとKRT1、KRT10、OCLN、CLDN1、FLG、LOR、IVL、KRT1、KRT10、COL1A1、p21、OMDのプライマー（サ

ーモフィッシャーサイエンティフィック、マサチューセッツ、US) と混合し、リアルタイムPCR装置 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて製造者のプロトコルに従いqPCRを実施した。転写レベルは、GAPDHに対して正規化した。

[0032] ・経表皮水分損失 (TEWL) の測定 : Vapometer SWL-5001とSWL2040-09プローブ (Delfin, Kuopio, Finland) を用いた。組織培養で維持されたHSEには、少なくとも15分間、温度と湿度の環境条件に順応させた培地を使用する。同じ発明者が各HSEについて3回に分けてTEWL測定を行い、各TEWLの平均を算出してTEWL値とした。

[0033] ・乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) アッセイ : Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit (Dojindo, Kumamoto, Japan)を用い、説明書に従って実施した。HSEモデルについては、100 μ l の培地を96ウェルプレートに移し、LDHアッセイを実施した。培養ヒト線維芽細胞およびケラチノサイトについては、OMD等のタンパク質を添加して48時間静置した後、上清100 μ l を96ウェルプレートに移し、LDHアッセイを行った。

[0034] [試験例1] 血液中タンパク質のコホート解析

本試験例では、血液中のタンパク質をクラスター化し、年齢ごとにヒートマップで可視化することにより、年齢による変化を評価した。INTERVAL cohort (Cambridge, UK) の18~76歳の健常者3301人 (女性1616人、男性1685人) から3283個の血漿タンパク質の3K SOMAscanプロテオミクスzスコア測定値を使用した。zスコアの変化は、Rのpheatmapパッケージ (バージョン1.0.12) を用いて、ヒトの寿命にわたって同様のダイナミクスを持つタンパク質をクラスター化することで可視化した。教師なし階層クラスタリングとクラスター化ヒートマップを用いて、女性および男性の全年齢にわたって類似した軌道を持つ血漿タンパク質をグループ化した。

[0035] その結果、女性では年齢が上がるにつれて負のzスコアから正のzスコアへ変化するユニークなクラスターを認めた。このクラスターは8個のタンパク質で構成され、オステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロ

アドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピート含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3 /Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB))であることを、本発明者らは初めて見出した。

[0036] これら8個のタンパク質の年齢による変化の詳細を解析した結果を図1に示す。女性において、これら8個のタンパク質は20～40歳頃に減少し、45～55歳頃に増加した。男性においては、これらのタンパク質は65歳前後で存在量が増加し、年齢を経るにつれて徐々に減少した。したがって、これら8個のタンパク質は女性において特異的に変動することが分かった。

[0037] 本発明者らは、osteomodulin (OMD)、chondroadherin (CHAD)、leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15)、Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7)、lutropin subunit beta (LHB)、glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB)、及びglycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)のサイズが66kDa以下であることから、皮膚の血管を通過して皮膚組織に到達することができるため、皮膚の組織や細胞に影響を与えると考えた。

[0038] [試験例2] Osteomodulinがコラーゲン産生に与える影響の評価

本試験例では、Osteomodulin (OMD) のコラーゲン産生への影響を評価した

。具体的には、培養正常ヒト線維芽細胞（NHDF）に各濃度のOMDを添加して6日間培養し、Ⅰ型コラーゲンを免疫染色して蛍光画像を得た（図2A）。コラーゲンⅠ α Ⅰの酵素結合免疫吸着法（ELISA）により各条件におけるⅠ型コラーゲン量を測定した（図2B）。OMDの添加濃度は図中に示す。OMDを添加しないものをコントロール（Ctrl）とした。走査型電子顕微鏡を使用してNHDFの細胞外マトリックスを観察した結果を図2Cに示す。さらに、走査型電子顕微鏡画像から少なくとも600個のフィブリルを解析し、NHDFのコラーゲン線維径の定量化および分布を解析した結果を図2Dに示す。

[0039] 図2Aに示す通り、Ⅰ型コラーゲンは細胞外コンパートメントで染色され、OMDを添加した線維芽細胞で染色強度は低かった。図2Bに示す通り、ELISAの結果、線維芽細胞におけるⅠ型コラーゲン産生は、添加したOMDの濃度依存的に抑制された。図2Cに示す通り、OMDを添加した場合は、コントロールと比較して細胞外マトリックスにおけるコラーゲン線維が細くなっていることが観察され、OMDによりコラーゲンの会合が抑制されることが分かった。図2Dに示す通り、OMDを添加したNHDFでは、コントロールでのコラーゲン線維の平均直径である40nmより小さい直径を有するコラーゲン繊維が増加していた（図2Dの40nmのバーはコントロールとの比較を分かりやすくするための補助線である）。

[0040] 本発明者らによって、OMDは線維芽細胞においてⅠ型コラーゲンの産生を抑制し、コラーゲン線維の径を小さくすることが明らかになった。

[0041] [試験例3] Osteomodulinが皮膚バリア機能関連遺伝子発現に与える影響の評価

本試験例では、OMDによる皮膚バリア機能関連遺伝子発現への影響を評価した。具体的には、ヒトケラチノサイト（NHEK）にOMDを0.1 μ M又は1 μ Mとなるように添加し、タイトジャンクション遺伝子OCLNおよびCLDN1、末端分化マーカーFLGおよびLOR、表皮分化マーカーKRT1の遺伝子発現を測定した。参照遺伝子としてGAPDHを使用した。OMDを添加しないこと以外は同じ条件で試験を行ったものをコントロールとした。結果を図3A～図3Eに示す。

[0042] NHEKにOMDを添加すると、タイトジャンクション遺伝子OCLNおよびCLDN1と、末端分化マーカーLOR、表皮分化マーカーKRT1の発現は、コントロールよりも低下した（図3 A、図3 B、図3 D、図3 E）。末端分化マーカーFLGの発現は、コントロールと同程度であった（図3 C）。なお、OMD添加による細胞毒性の有無を確認する目的で、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）放出アッセイを行ったところ、OMD添加群とコントロールとでLDH放出において差を認めなかった。この結果から、OMDによる細胞毒性は各遺伝子発現の評価に影響を及ぼしていないことが確認された。

ことから、

[0043] 以上のことから、OMDはNHEKにおいてOCLN、CLDN1、LOR、KRT1の遺伝子発現を抑制し、バリア機能の低下を促進すると考えられた。

[0044] [試験例4] Osteomodulinがヒト皮膚等価物(HSE)モデルに与える影響の評価

本試験例では、ヒト皮膚等価物(HSE)モデル（T-skinTM、EPISKIN SA）を1 μ MのOMDを添加した培地で5日間培養し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（富士フイルム和光純薬株式会社、大阪、日本）で固定し、パラフィンに包埋してH&E染色と免疫染色を行った（図4 A）。また、上記5日間培養後の細胞について経表皮水分損失（TEWL）を測定した（図4 B）。

[0045] 定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）のために、HSEの表皮と真皮を鉗子で分離した。RNA抽出の前に、組織をBiomasherII（ニッピ、東京、日本）で潰し、10,000 $\times$ gで10分間遠心分離し、上清をRNeasy Mini Kit（Qiagen、Hilden、ドイツ）での抽出に用いた。

[0046] NHDFを24ウェルプレートに1ウェルあたり38,000個の密度でプレATINGし、10%ウシ胎児血清と1%抗生物質－抗マイコチンを添加したDMEM中で一晩培養した。翌日、培地を1%抗生物質－抗マイコプラズマ剤と1 mg/ml α -アスコルビン酸（013-12061、富士フイルム和光純薬株式会社、日本、大阪）を添加したDMEM（ウシ胎児血清なし）に交換した。処理群にOMD（0.01 μ M、0.1 μ M、1 μ M、5 μ M）を添加した。6日

間処理した後、細胞をPBSで洗浄し、I型コラーゲンを標的とする一次抗体（C2456、モノクローナル、Sigma-Aldrich、ミズーリ州、米国およびNB600-408、ポリクローナル、Novus Biologicals、コロラド、米国）と4℃で一晩インキュベートした。次にAlexa488-またはAlexa546コンジュゲート二次抗体を用い、37℃で1時間インキュベートした。HSE組織切片を、Ki67（ab16667, Abcam, Cambridge, UK）、KRT1（ab185628, Abcam）、KRT14（ab7800, Abcam）、FLG（ab17808, Abcam）、およびCLDN1（ab211737, Abcam）を標的とする一次抗体と37℃で2時間インキュベートした。次に、Alexa488またはAlexa594コンジュゲート二次抗体を用い、37℃（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US）で1時間インキュベートした。サンプルを検査し、オールインワン蛍光顕微鏡BZ-X800（キーエンス、大阪、日本）を用いて画像を撮影した。なお、OMDを添加しないことを除いて上記と同じ条件のものをコントロール（Ctrl）とした。

[0047] 図4Aに示す通り、OMDを添加したHSEでは、表皮の肥厚が観察され、細胞核の周囲に観察される空胞様構造物の数が増加した。図4Bに示す通り、OMDを添加したHSEでは、TEWLが増加し、表皮のバリア機能が抑制された。また、図4Cに示す通り、コントロールのHSEではKRT1が勾配を持った分布をしているのに対し、OMDを添加したHSEでは、基底部上部の表皮に集中して確認され、OMD添加によってHSEにおけるKRT1分布に異常が生じた。この作用機序により、OMDによる表皮のバリア機能抑制が生じると考えられた。図4Dに示す通り、FLG/CLDN1の免疫染色による染色領域について、コントロールのHSEではFLGとCLDN1の染色領域が明確に分離して見られたが、OMDを添加したHSEでは染色領域が顆粒層上に重複して見られた。図4Eに示す通り、OMDを添加したHSEでは、コントロールと比較してKi67陽性細胞が減少しており、内在性老化の兆候を示す指標の一種である「基底層の細胞の増殖抑制」を確認した。図4Fに示す通り、OMDを添加したHSEでは、コントロールと比較して炎症性サイトカインネットワークに関与するKRT1の遺伝子発現が抑制され、末端分化遺伝子FLG、LOR、タイトジャンクション遺伝子OCLNの遺伝子発現も抑制された。

ことから、皮膚がOMDに暴露されることで、皮膚のバリア機能が抑制されることが分かった。図4 Gでは、OMDを添加したHSEでは、真皮においてCOL1A1の発現量が抑制されたことを示す。

[0048] 更年期の女性の皮膚は、matrisome産生の低下から乾燥状態へと変化することが知られているが、加齢と共に増加するOMDが表皮のバリア機能を低下させ、コラーゲン産生やコラーゲン線維形成を抑制することがその一因であると考えられる。このことから、OMDは皮膚老化の判定における有用なバイオマーカーとなると考えられた。

[0049] また、OMDが真皮線維芽細胞の形状を伸長型に変化させることは、細胞外コラーゲンの消失や細胞骨格のシグナル伝達が不規則になることによるものであると考えられる。

[0050] OMDがコラーゲン線維の集合体やコラーゲン線維の直径に影響を与えることから、OMDはⅠ型コラーゲンの質を低下させている可能性が考えられる。また、更年期の皮膚は非更年期の皮膚と比較して、伸展性や弛緩性が高いことが知られているが、加齢と共に増加するOMDがコラーゲン線維の直径サイズに影響を与えていることが原因となって起こっている可能性が考えられた。

[0051] 配向性や繊維幅などのコラーゲンの質は、内因性老化がより中心的な役割を担って変化することから、皮膚のコラーゲンの質と量を低下させるOMDは、皮膚老化を判定するためのバイオマーカーとして特に有用であると考えられる。

[0052] Ⅰ型コラーゲンの産生量と質が損なわれると、シワやたるみ等が発生し、皮膚の外観に悪い影響を及ぼす。また、老化した肌や更年期の肌において、肌の乾燥は不快感やバリア機能の低下を引き起こすことから、大きな懸念事項である。加齢と共に増加するOMDは皮膚の表皮と真皮の両方に影響を与えることから有用なバイオマーカーであると言える。

[0053] OMDは皮膚老化を判定するための有用なバイオマーカーであることから、細胞や組織中のOMDをターゲットとして、その発現量や濃度の変化を調べることで、OMD阻害成分、OMD産生抑制成分をスクリーニングし、真皮と表皮の

老化抑制の効果を奏する成分をスクリーニングすることができると考えられる。

[0054] [試験例5] CHAD、LRRC15がコラーゲン産生に与える影響の評価

本試験例では、chondroadherin（以下、CHADともいう）、leucine-rich repeat-containing protein 15（以下、LRRC15ともいう）のコラーゲン産生への影響を評価した。具体的には、培養正常ヒト線維芽細胞（NHDF）に1 mg / ml L-アスコルビン酸（Vitamin C）（013-12061、富士フイルム和光純薬株式会社、日本、大阪）並びに、OMD、CHADまたはLRRC15を1 μ M添加して6日間培養し、I型コラーゲンを免疫染色して蛍光画像を得た（図5 A）。コラーゲンI α Iの酵素結合免疫吸着法（ELISA）により各条件における培養上清中のI型コラーゲン量を測定した。ネガティブコントロールの測定値を100とした場合の各サンプルの測定値を算出した（図5 B）。CHAD、LRRC15を添加せずに、L-アスコルビン酸のみ添加したものをコントロールとした。L-アスコルビン酸およびタンパク質（CHAD、LRRC15）を添加しないものをネガティブコントロールとした。

[0055] 図5 Aに示す通り、L-アスコルビン酸を添加したコントロールは高い染色強度を示したが、L-アスコルビン酸に加えて1 μ MのOMD、CHAD、LRRC15を添加した線維芽細胞では、染色強度は顕著に低下した。図5 Bに示す通り、ELISAの結果、I型コラーゲンの産生は、1 μ MのOMD、CHAD、LRRC15を添加した線維芽細胞で抑制された。特にCHAD、LRRC15を添加した線維芽細胞でのI型コラーゲン産生抑制効果は顕著であった。

[0056] 本発明者らによって、CHAD、LRRC15によりI型コラーゲンの産生は抑制され、コラーゲン線維の形態や分泌状態は乱れることが明らかにされた。OMDと同様に、66 kDa以下のタンパク質であるCHAD、LRRC15は皮膚の血管を通過して皮膚組織に到達することができるため、加齢等によって血中濃度が上昇した場合には、皮膚の組織や細胞へより大きな影響を及ぼすと考えられる。

産業上の利用可能性

[0057] 本発明は、皮膚老化の判定のためのバイオマーカー、及びその使用、皮膚老化の進行状態の検出、皮膚老化の判定、皮膚老化改善物質のスクリーニングを必要とする全ての技術分野、例えば、皮膚老化による症状の発生の検出、症状進行度の予測、症状の進行リスク予測、皮膚老化の原因究明、医薬品等による皮膚老化の抑制効果の確認、皮膚老化の治療効果の確認等に利用することができ、特に医薬、化粧、食品等の分野に利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 皮膚老化の判定における使用のための、オステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピートー含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択されるタンパク質又はそのフラグメントからなる、バイオマーカー。
- [請求項2] 上記タンパク質又はそのフラグメントが、被験体の血液サンプル中に含まれる、請求項1に記載のバイオマーカー。
- [請求項3] 被験体の血液サンプル中の上記タンパク質又はそのフラグメントの発現の増加、又は濃度の増加が、被験体の皮膚老化の進行を示す、請求項2に記載のバイオマーカー。
- [請求項4] 被験体の血液サンプル中の上記タンパク質又はそのフラグメントの発現の低下、又は濃度の減少が、被験体の皮膚老化の改善を示す、請求項2に記載のバイオマーカー。
- [請求項5] 被験体の血液サンプル中のオステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲ

ンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピート含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択される少なくとも1種のタンパク質又はそのフラグメントを測定することを特徴とする、被験体における皮膚老化の判定方法。

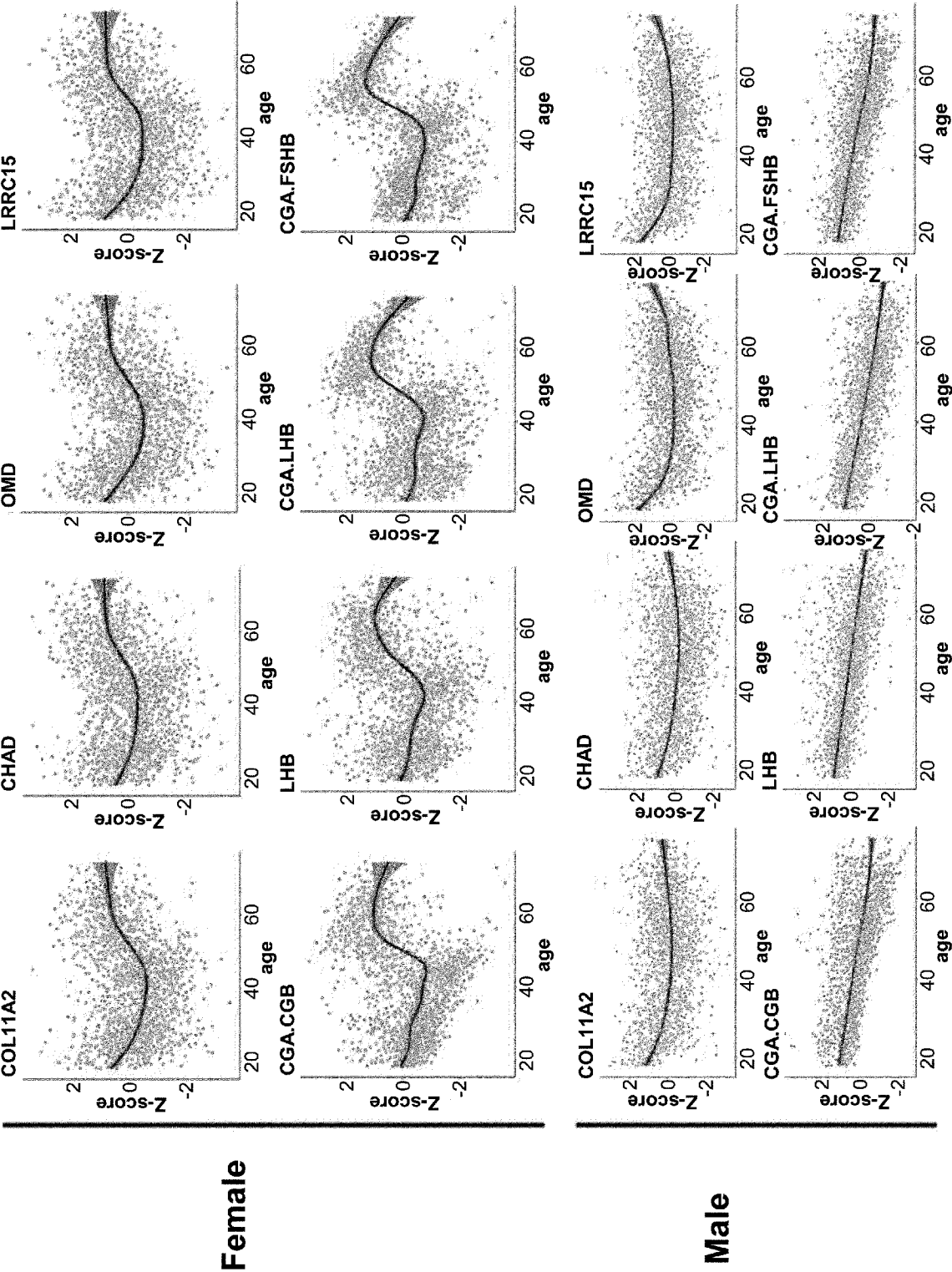
[請求項6]

被験体に被験物質を摂取させる前後の被験体の血液サンプル中のオステオモジュリン (osteomodulin (OMD))、コンドロアドヘリン (chondroadherin (CHAD))、コラーゲンXⅠ型 アルファ2鎖 (collagen type XI alpha 2 chain (COL11A2))、ロイシンーリッチリピート含有タンパク質15 (leucine-rich repeat-containing protein 15 (LRRC15))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ3／コリオゴナドトロピン サブユニット ベータ7 (Glycoprotein hormones alpha chain/Choriogonadotropin subunit beta 3/Choriogonadotropin subunit beta 7 (CGA / CGB3 / CGB7))、ルトロピン サブユニット ベータ (lutropin subunit beta (LHB))、グリコプロテイン ホルモン アルファ鎖／ルトロピン サブユニット ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ lutropin subunit beta (CGA/LHB))、及びグリコブ

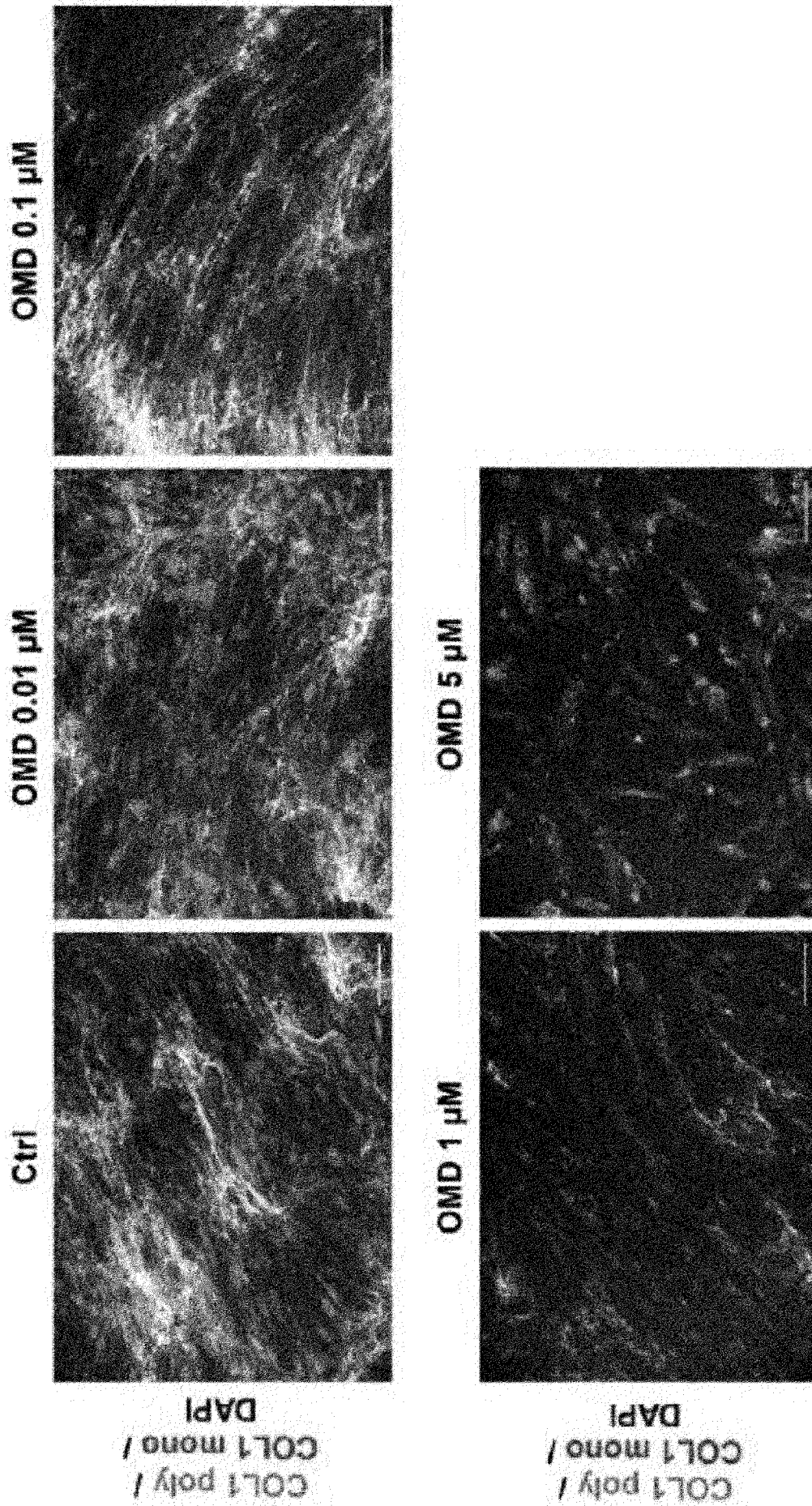
ロテイン ホルモン アルファ鎖／フォリトロピン サブユニット
ベータ (glycoprotein hormones alpha chain/ follitropin subunit
beta (CGA/FSHB)) から成る群より選択される少なくとも1種のタン
パク質又はそのフラグメントの発現レベル又は濃度の変化を調べるこ
とを特徴とする、皮膚老化改善物質のスクリーニング方法。

[1]

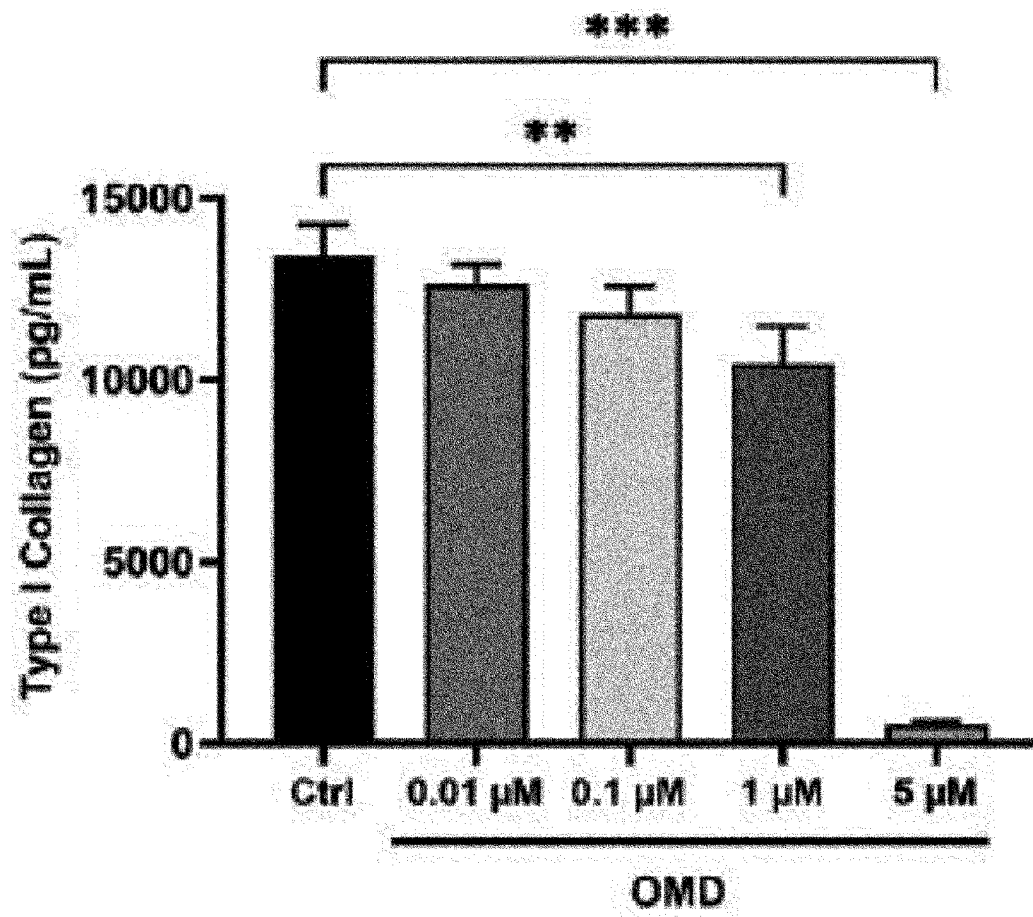
Selected 8 proteins Z-score trajectories with age



[図2A]

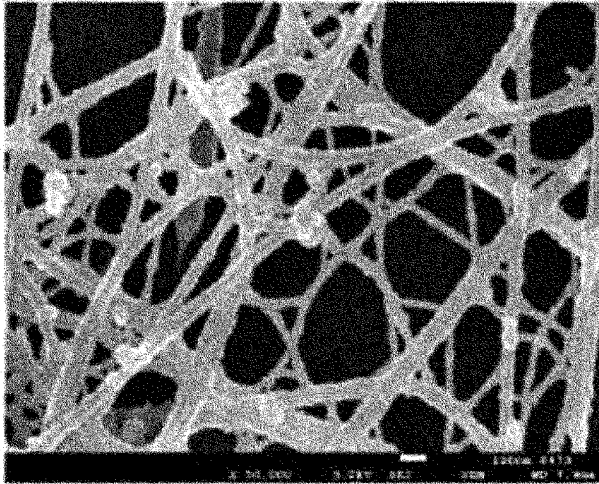
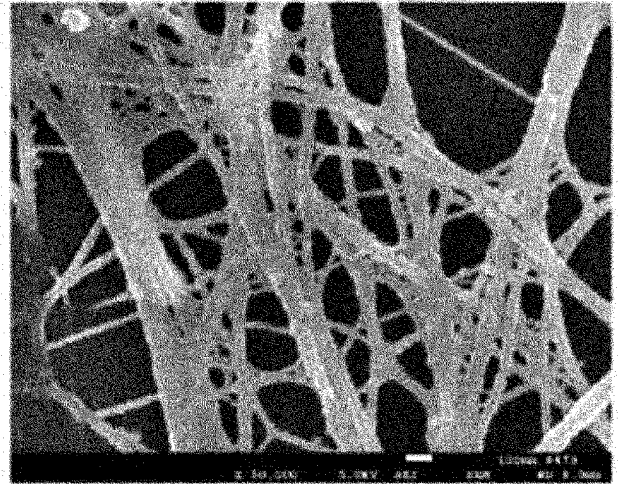
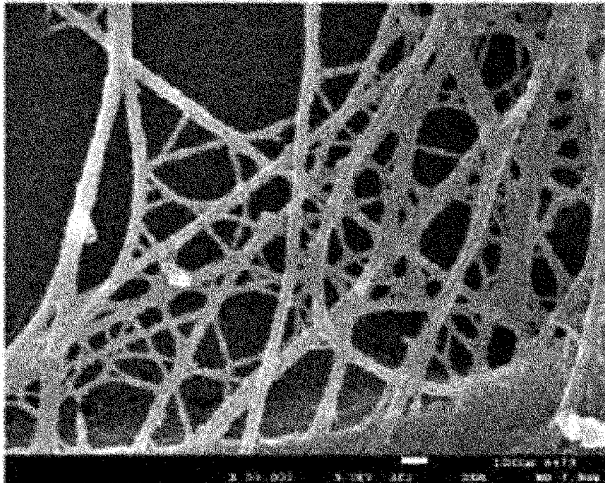
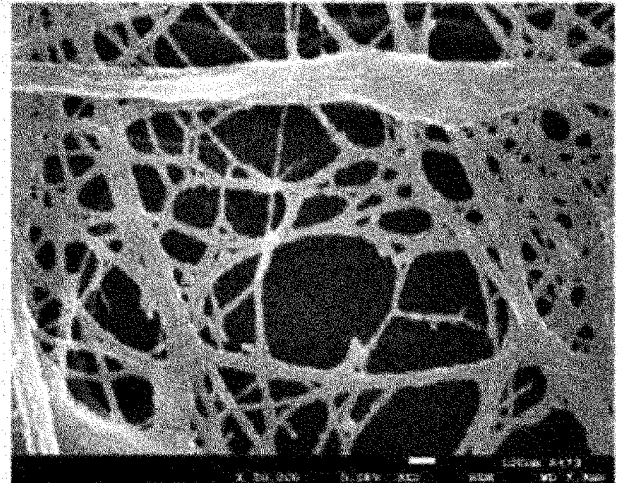


[図2B]

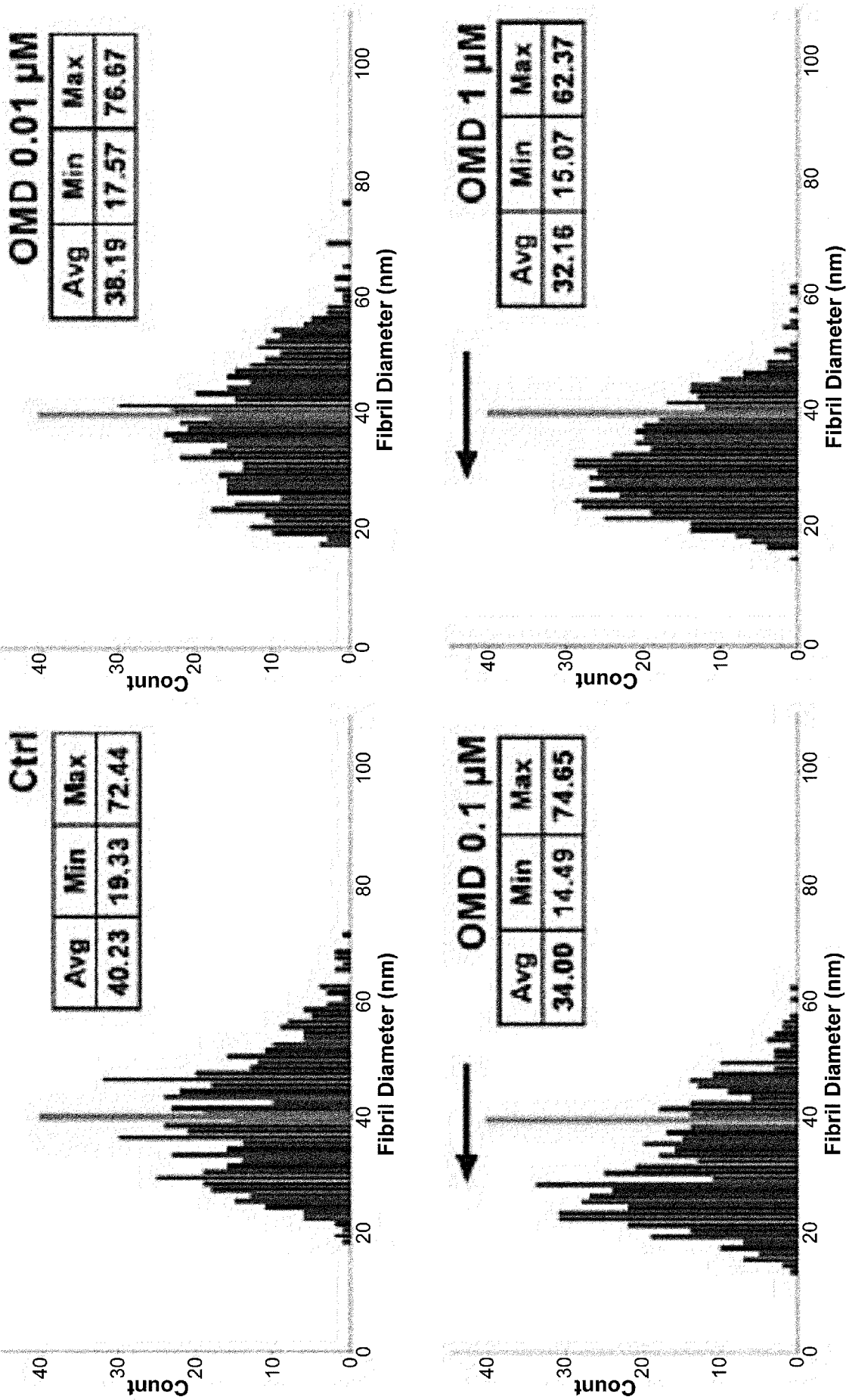


[図2C]

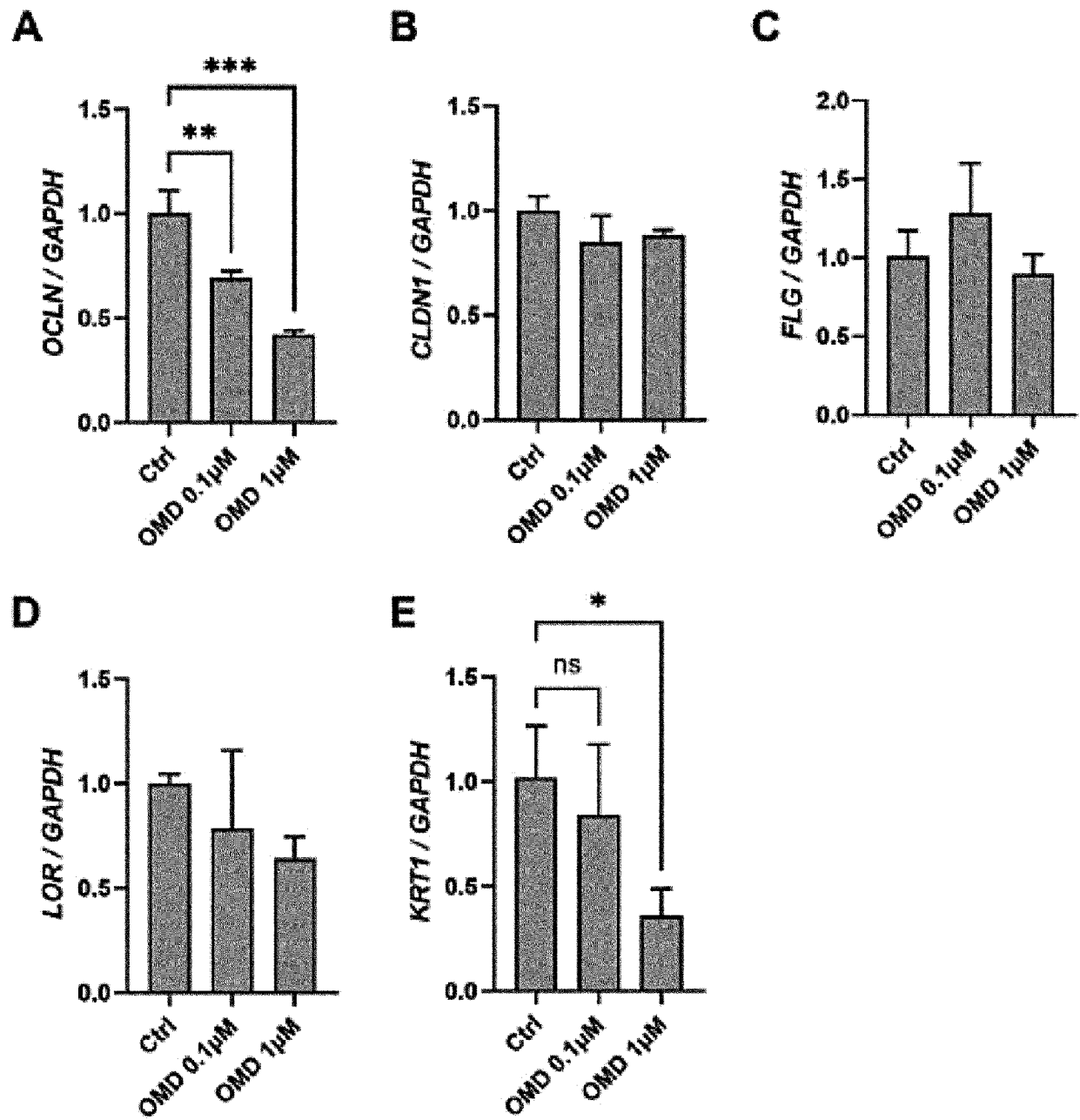
Ctrl

OMD 0.01 μM OMD 0.1 μM OMD 1 μM 

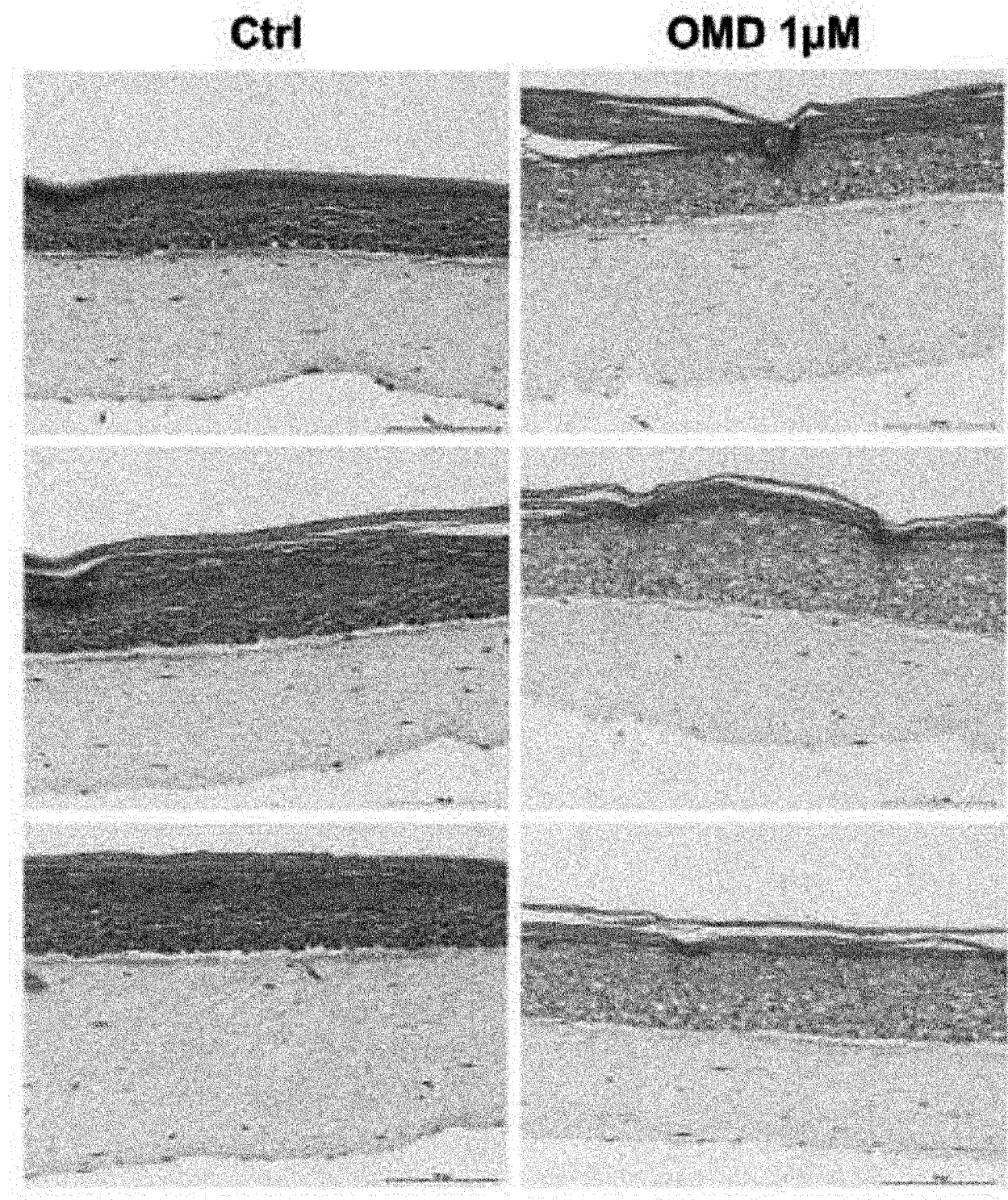
[図2D]



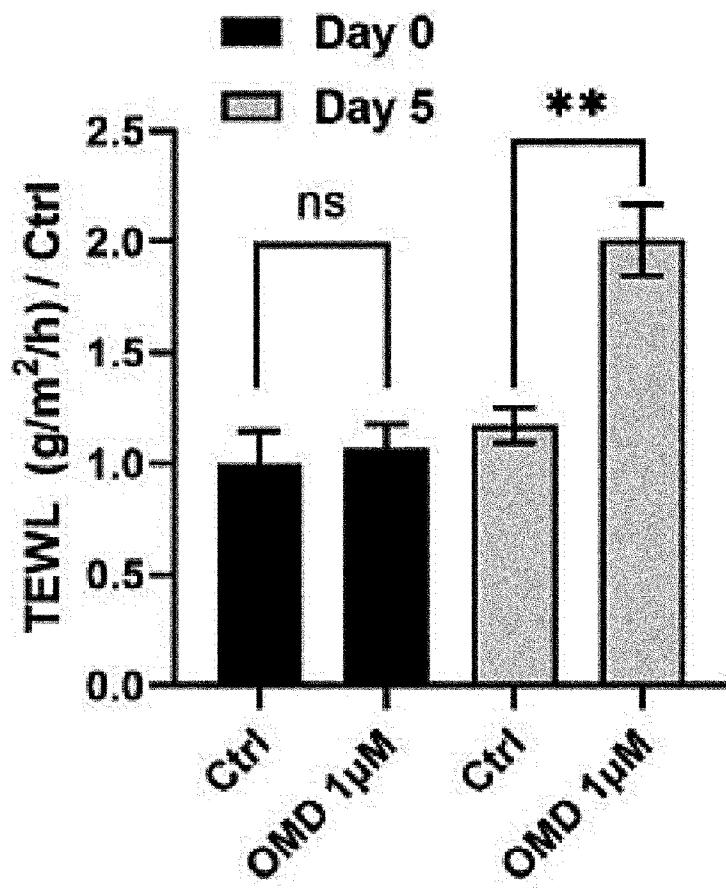
[図3]



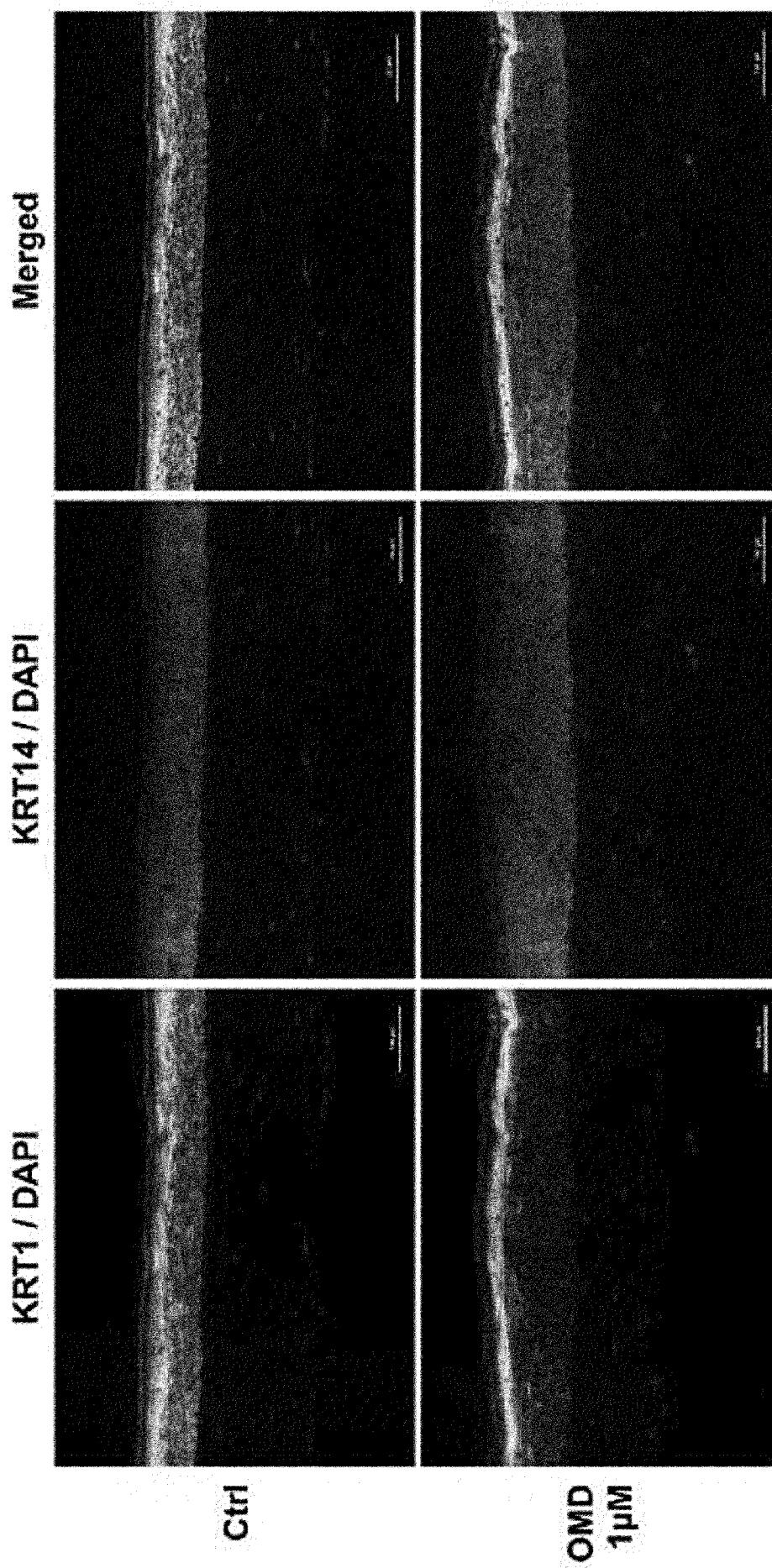
[図4A]



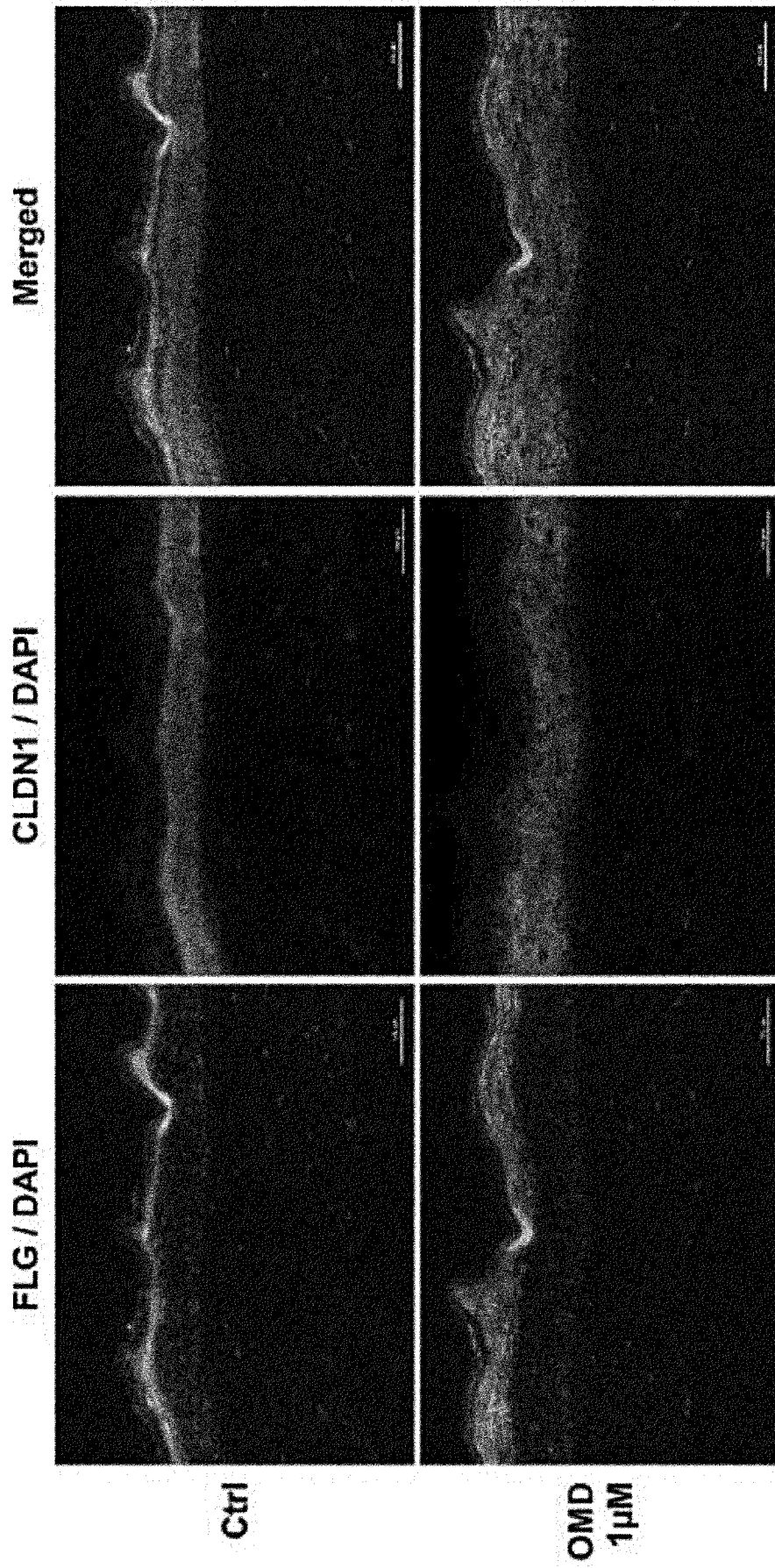
[図4B]



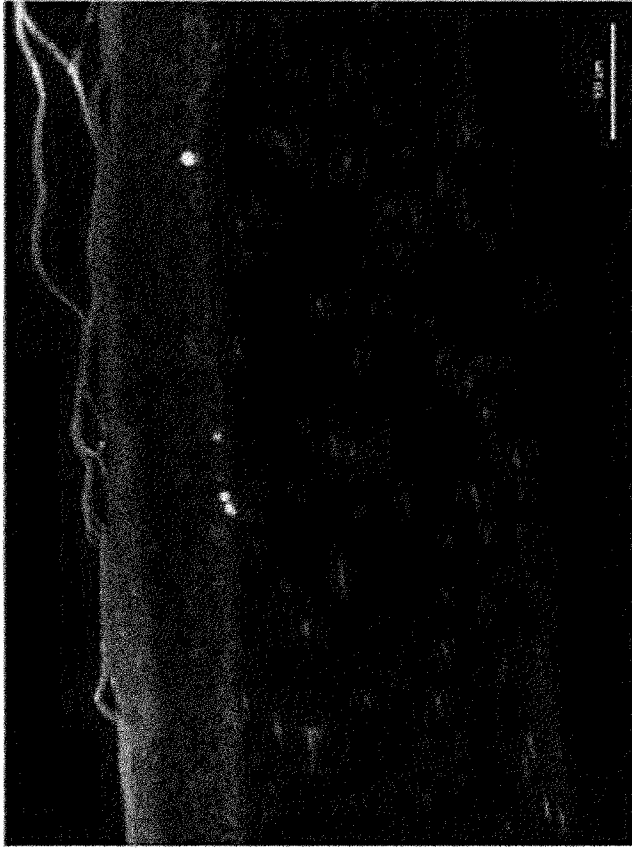
[図4C]



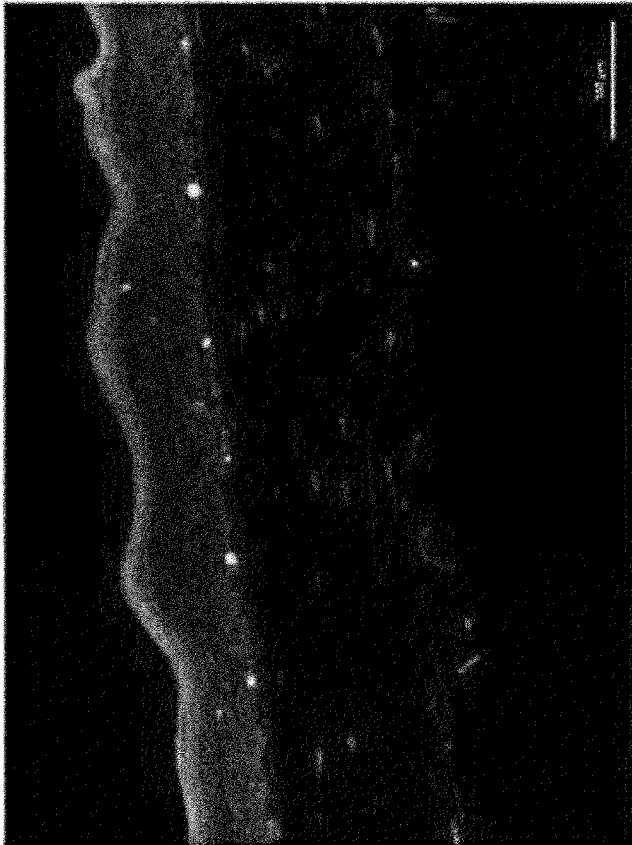
[図4D]



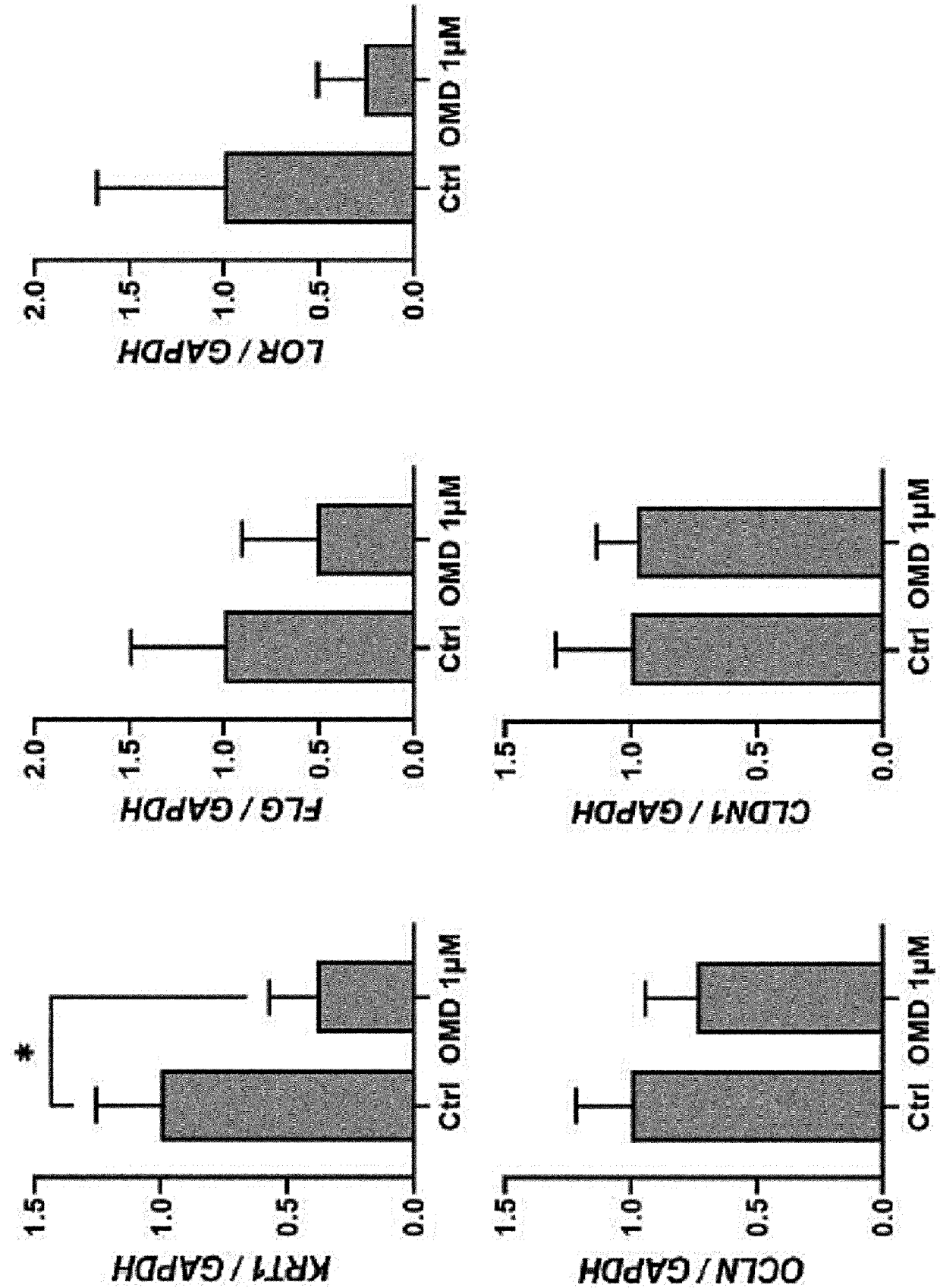
[図4E]

OMD 1 μ M

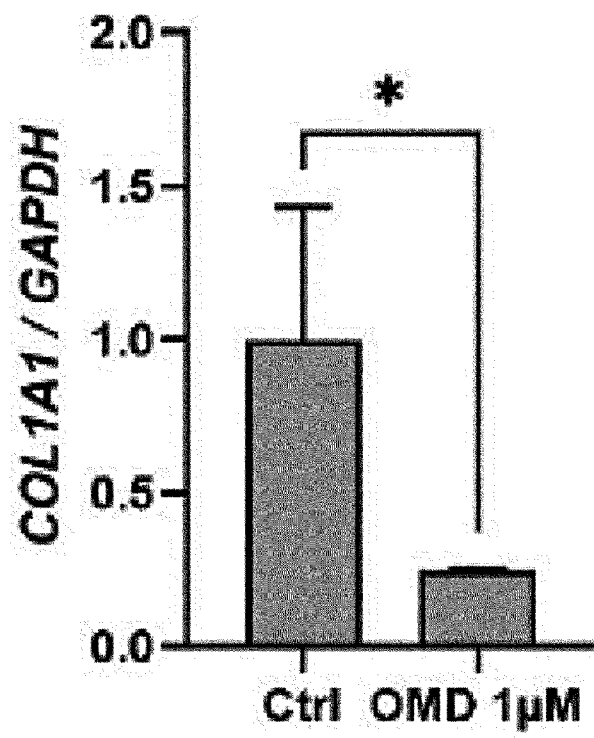
Ctrl

Ki67
DAPI

[図4F]

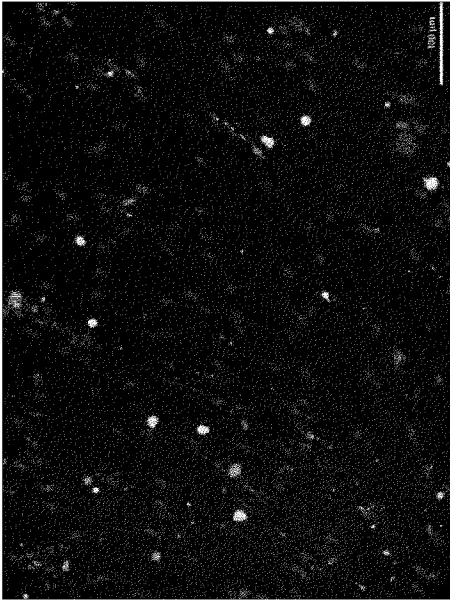


[図4G]

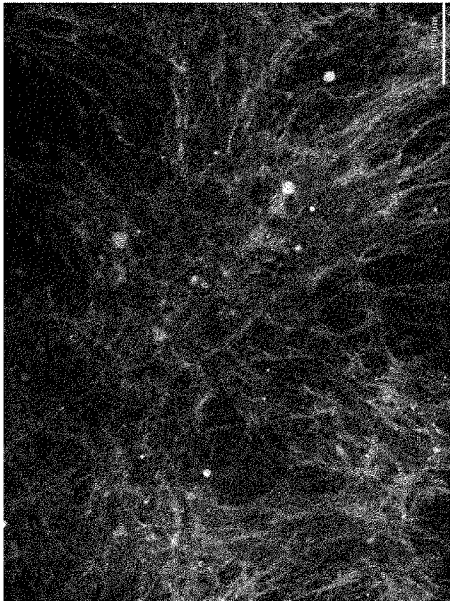


[図5A]

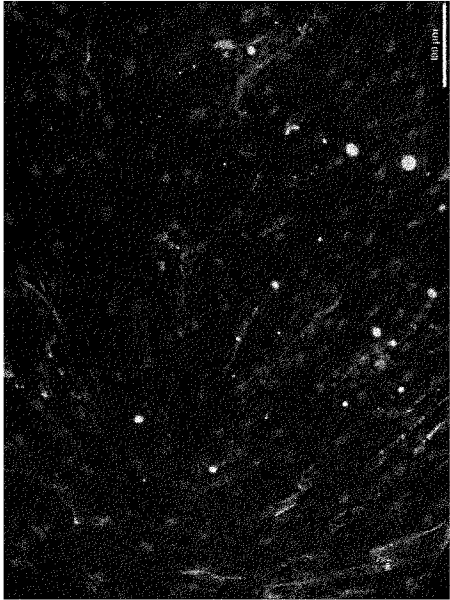
No Vitamin C



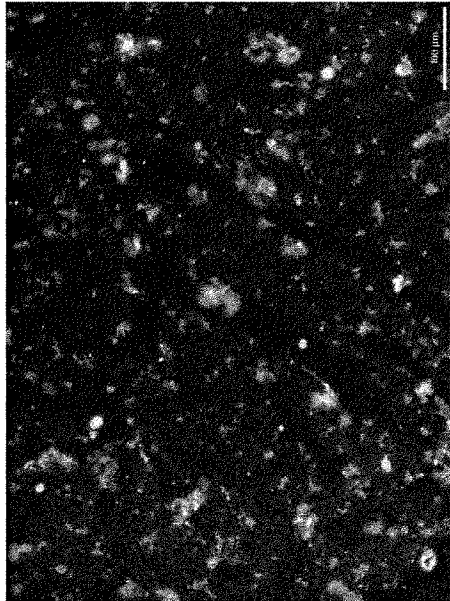
Vitamin C



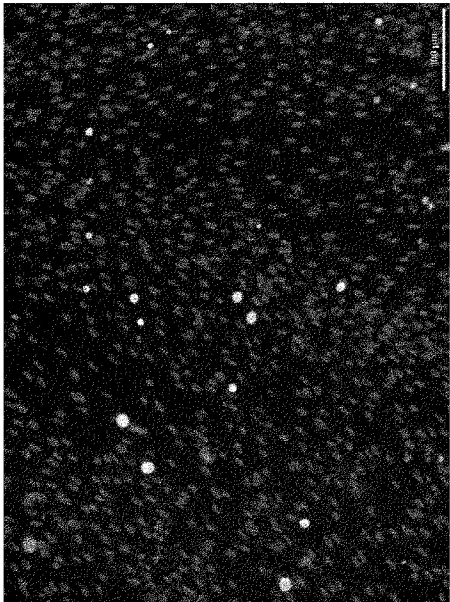
Vitamin C
+ OMD 1μM



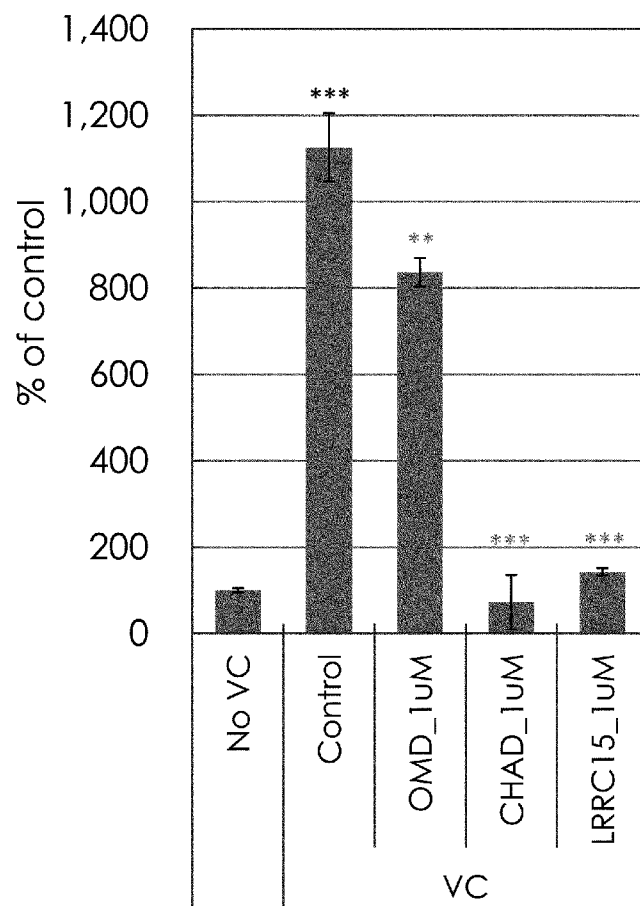
Vitamin C
+ CHAD 1μM



Vitamin C
+ LRRC15 1μM



[図5B]



Vc : Vitamin C

t-test n=3

* P<0.05, ** p<0.01, p<0.001 *** VS No VC

* P<0.05, ** p<0.01, p<0.001 *** VS VC Control

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/022650

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C12N 15/12*(2006.01)i; *C12Q 1/68*(2018.01)i; *G01N 33/50*(2006.01)i

FI: C12N15/12; C12Q1/68; G01N33/50 P; G01N33/50 Q; 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)

C12N15/12; C12Q1/68; 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 1971-2023

Registered utility model specifications of Japan 1996-2023

Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/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	Definition: RecName: Full=Collagen alpha-2(XI) chain, Accession No. P13942, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/P13942?format=txt&versions=238 > entire text	1-4
X	Definition: RecName: Full=Chondroadherin, Accession No. O15335, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/O15335?format=txt&versions=163 > entire text	1-4
X	Definition: RecName: Full=Osteomodulin, Accession No. Q99983, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/Q99983?format=txt&versions=181 > entire text	1-4

☒ 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

“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

31 July 2023

Date of mailing of the international search report

22 August 2023

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/JP2023/022650

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Definition: RecName: Full=Leucine-rich repeat-containing protein 15, Accession No. Q8TF66, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/Q8TF66?format=txt&versions=167 > entire text	1-4
X	Definition: RecName: Full=Glycoprotein hormones alpha chain, Accession No. P01215, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/P01215?format=txt&versions=213 > entire text	1-4
X	Definition: SubName: Full=Luteinizing hormone beta subunit, Accession No. Q8WXL0, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/Q8WXL0?format=txt&versions=95 > entire text	1-4
X	Definition: RecName: Full=Follitropin subunit beta, Accession No. P01225, Database Uniprot[online], 25 May 2022 uploaded, [retrieved on 31 July 2023], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/P01225?format=txt&versions=212 > entire text	1-4
X	JP 2010-019683 A (BIOMARKER SCIENCE CO., LTD.) 28 January 2010 (2010-01-28) claims 1, 7	5, 6
X	WO 2022/035075 A1 (CUTIS BIOMEDICAL RESERCH CENTER) 17 February 2022 (2022-02-17) claim 1, paragraph [0099]	5, 6

International application No.
PCT/JP2023/022650

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2010-019683	A	28 January 2010	(Family: none)	
WO	2022/035075	A1	17 February 2022	JP	2022-554046 A
				claim 1, paragraph [0065]	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/12(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; G01N 33/50(2006.01)i FI: C12N15/12; C12Q1/68; G01N33/50 P; G01N33/50 Q; 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）） C12N15/12; C12Q1/68; 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023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 (JDreamII); 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	Definition: RecName: Full=Collagen alpha-2(XI) chain, Accession No.P13942, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:<https://rest.uniprot.org/unisave/P13942?format=txt&versions=238> 全文	1-4								
X	Definition: RecName: Full=Chondroadherin, Accession No.015335, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:<https://rest.uniprot.org/unisave/015335?format=txt&versions=163> 全文	1-4								
X	Definition: RecName: Full=Osteomodulin, Accession No.Q99983, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:<https://rest.uniprot.org/unisave/Q99983?format=txt&versions=181> 全文	1-4								
☒ 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、一般的技術水準を示すもの “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 31.07.2023		国際調査報告の発送日 22.08.2023								
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） 長谷川 強 4B 1783 電話番号 03-3581-1101 内線 3446								

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	Definition: RecName: Full=Leucine-rich repeat-containing protein 15, Accession No.Q8TF66, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/Q8TF66?format=txt&versions=167 > 全文	1-4
X	Definition: RecName: Full=Glycoprotein hormones alpha chain, Accession No.P01215, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/P01215?format=txt&versions=213 > 全文	1-4
X	Definition: SubName: Full=Luteinizing hormone beta subunit, Accession No.Q8WXL0, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/Q8WXL0?format=txt&versions=95 > 全文	1-4
X	Definition: RecName: Full=Follitropin subunit beta, Accession No.P01225, Database Uniprot[online], 2022.05.25 uploaded, [retrieved on 2023.07.31], Retrieved from the internet:< https://rest.uniprot.org/unisave/P01225?format=txt&versions=212 > 全文	1-4
X	JP 2010-019683 A (株式会社バイオマーカーサイエンス) 28.01.2010 (2010 - 01 - 28) 請求項 1、 7	5, 6
X	WO 2022/035075 A1 (CUTIS BIOMEDICAL RESERCH CENTER) 17.02.2022 (2022 - 02 - 17) 請求項 1、 [9 9]	5, 6

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/JP2023/022650

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2010-019683	A	28.01.2010	(ファミリーなし)	
WO	2022/035075	A1	17.02.2022	JP 2022-554046 A	
				請求項 1、[0065]	