

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5143109号  
(P5143109)

(45) 発行日 平成25年2月13日 (2013. 2. 13)

(24) 登録日 平成24年11月30日 (2012. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 36/18 (2006. 01)

A 6 1 K 35/78

C

A 6 1 K 36/28 (2006. 01)

A 6 1 K 35/78

T

A 6 1 K 8/97 (2006. 01)

A 6 1 K 8/97

A 6 1 Q 19/08 (2006. 01)

A 6 1 Q 19/08

A 6 1 P 17/00 (2006. 01)

A 6 1 P 17/00

請求項の数 2 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-258372 (P2009-258372)  
 (22) 出願日 平成21年11月11日 (2009. 11. 11)  
 (65) 公開番号 特開2011-102274 (P2011-102274A)  
 (43) 公開日 平成23年5月26日 (2011. 5. 26)  
 審査請求日 平成24年9月14日 (2012. 9. 14)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000001959  
 株式会社 資生堂  
 東京都中央区銀座7丁目5番5号  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一  
 (74) 代理人 100108903  
 弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Tie 2 活性化剤、血管の成熟化、正常化又は安定化剤、リンパ管安定化剤並びにしわ防止・改善剤及びむくみ改善・予防剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アキノノゲシ (*Lactuca indica*) 及び / 又はスイショウガキ (*Chrysophyllum cainito* Linn.) の抽出物から成る、リンパ管の安定化剤。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のリンパ管安定化剤を含んで成るむくみ改善・予防剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アキノノゲシ及び / 又はスイショウガキの抽出物から成る新規な Tie2 (Tyro  
sine Kinase with Ig and EGF Homology Domain 2) 活性化剤 (Tie2 リン酸化剤)、血管  
の成熟化、正常化若しくは安定化剤、リンパ管安定化剤、並びにしわ防止・改善剤及びむ  
くみ改善・予防剤を提供する。

【背景技術】

【0002】

血管は血管内皮細胞に対して、血管内皮細胞の外腔面から、血管壁細胞と総称される血  
管平滑筋細胞やペリサイトが、細胞外マトリックスを介して、あるいは直接的に接着して  
いる。血管径の大きさによっては内皮細胞と壁細胞の接着する比率が異なり、大血管系で  
は、1 層の内皮細胞に、複数層の壁細胞が裏打ちしており、中、小血管では、内皮細胞 1  
細胞に壁細胞が 1 細胞裏打ちするものが多く、また、さらに径の細い血管では、1 個の壁

10

20

細胞が複数の内皮細胞に接着している。このように、壁細胞が血管内皮細胞に対し裏打ちすることは血管の構造的な「成熟化」過程にとって重要である。また、血管内皮細胞同士の接着により、血管内環境因子（細胞および液性因子）が容易には血管外に漏出しないような内皮細胞間の接着斑を形成することが、機能的な血管の「成熟化」過程にとって重要である。さらに、組織の酸素や栄養分の需要に応じて、とくにそれらが不足する際には、血管は管腔を拡大化させることで血流を増加させ、酸素、養分を組織に十分に行き渡らせるように調節する。つまり、血管内皮細胞同士が接着斑を形成することで透過性を制御し、血管内皮細胞が壁細胞の裏打ちを伴うことにより構造的安定化させ、血管腔を大中小に制御していく過程を、「血管成熟化」と定義する。

#### 【 0 0 0 3 】

また、種々の病態では、構造の乱れた血管が構築され、内皮細胞同士の接着が抑制されたり、壁細胞の内皮細胞への接着が欠損した未熟な血管が形成されている。これらが無秩序な血管透過性の亢進を招くことで、組織内と血管内の液性因子や細胞の交通が異常となる。透過性が亢進すれば組織浮腫が生じ、組織の機能不全の原因となり、また炎症細胞の浸潤が無秩序に生じることで炎症を招く。さらに壁細胞は既存の血管からの血管の発芽を抑制していることから、壁細胞の伴わない血管からは血管の発芽が過剰となり、無秩序な血管の発芽が誘導され病態の悪化をもたらす。このような現象は、糖尿病性網膜症や腫瘍、炎症に代表される病態で観察される。つまり、血管透過性の破たんした血管や血管の無秩序な増生をまねくような異常な血管を、内皮細胞同士の接着をたかめ、壁細胞の内皮細胞への裏打ちを促進することにより、血管を正常な状態にすることを「血管正常化」と定義する。また、上記のような異常な血管は、糖尿病、高脂血症、高血圧などにより、血流内外環境因子の変化が内皮細胞や壁細胞に障害（細胞死など）を与えたり、がんや炎症により血管新生促進因子の過度の産生上昇が引き金になって生じる。このような病態が発生した際に、既存の血管に対する障害を抑制し、内皮細胞同士の解離を抑制したり、内皮細胞と壁細胞の解離を抑制することを「血管安定化」と定義する。また、この安定化には内皮細胞の細胞死を抑制する機構も含まれる。

#### 【 0 0 0 4 】

血管新生とは既存の血管から新たな血管のネットワークが形成される現象であり、腫瘍、慢性関節リウマチ、糖尿病網膜症、高脂血症、高血圧などの血管病変を主体とした疾患と深く関わっている。VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮細胞増殖因子) が分子クローニングされたのを皮切りに血管形成に特異的に作用する因子としてVEGFファミリーとアンジオポエチン (angiopoietin; Ang) ファミリーの分子が次々に同定されてきた。VEGFとその受容体は脈管形成とよばれる血管の初期発生からその後の血管新生に至るまで非常に広い範囲の血管形成に関与する。一方、Angは脈管形成後、血管内皮細胞による発芽、分枝、嵌入、退縮などの細胞現象を伴った管腔形成において機能する。Angは血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼTie-2を介し、血管内皮細胞と、周皮細胞（ペリサイト）や血管平滑筋細胞のような血管壁細胞との接着を制御し、血管の構造的安定化に機能している（非特許文献1：実験医学 Vol.20, No.8 (2002) pp.52-57）。

#### 【 0 0 0 5 】

これまでにAng-1～4までの4つのアイソフォームが知られ、Ang-1, Ang-2はヒト、マウスいずれにも存在するが、Ang-3はマウス、Ang-4はヒトに存在する。壁細胞から分泌されたAng-1, -4はTie-2を刺激し細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を惹起し、インテグリンの活性化、焦点接着キナーゼ (focal adhesion kinase; FAK) の活性化、PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase; PI3K, serine-threonine kinase: Akt) の活性化を伴い、内皮細胞と壁細胞の接着を誘導する。正酸素状態では内皮細胞は壁細胞が恒常的に分泌するAng-1, -4により内皮細胞-壁細胞間の接着が維持されているが、局所的に低酸素状態が生じると、Ang-1, -4のアンタゴニストであるAng-2, -3の産生が高まり、Tie2の活性化を一時的に抑制し、内皮細胞とそれを裏打ちした壁細胞の接着が抑制される。そして壁細胞の解離により内皮細胞は増殖し発芽的血管新生を開始し、新しい血管網の形成

に至る。Tie2の活性化は内皮細胞と壁細胞の接着を誘導することで、血管構造の安定化に寄与し、また、内皮細胞同士の接着を促進して血管透過性を制御する。また、Tie2の活性化は、内皮細胞の細胞死を抑制することから（非特許文献2：Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Yasunaga K, Kim KT, Choi HH, Kim W, Kim SH, Park SK, Lee GM, Koh GY. Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 13;101(15):5553-8）、種々の細胞内外の血管構造を破たんさせる環境因子に対しては、Tie2の活性化を誘導して、血管の不安定化を抑制して、血管を安定化および正常化させることが可能である。また、血管再生医療において、血管内皮細胞によって構築された血管においては、Tie2の活性化を誘導することにより、内皮細胞と壁細胞の接着を誘導して血管の成熟化が可能である。また、腫瘍や糖尿病性網膜症などで観察される、壁細胞が内皮細胞に接着しないことによる無秩序な血管が増生するような疾患では、Tie2の活性化により、壁細胞を内皮細胞に接着させ、血管を正常化させることが可能である。また文献によれば（非特許文献3：Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1999 Dec 24;286(5449):2511-4）、Tie2の活性化は、血管腔を拡大化することが報告されており、血管狭小化あるいは血管拡大化の抑制が原因となって生じる虚血性疾患においてはTie2の活性化により、血管腔を拡大化して病態の改善を図ることが可能である。

#### 【0006】

また最近ではAngの構造上の特徴であるcoiled-coiledドメインとfibrinogen-likeドメインを有する複数の分子が発見されている。これらはいずれもTie-1受容体、Tie-2受容体に結合能を示さないため、既存のAngファミリーとは異なる分子群とみなされ、アンジオポエチン様因子（Angiopoietin-like protein; Angptl）と命名され、Angptl-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7が報告されている。いずれのAngptlも受容体は現時点では同定されていないオーファンリガンドであるが、これらにも多様な作用を示すことが期待される。

#### 【0007】

血管内皮細胞以外ではTie2の活性化は細胞の休眠状態を誘導することが知られている。これまでの報告によると、造血幹細胞上のTie2の活性化が造血幹細胞の休眠を誘導することが報告されている（非特許文献4：Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):149-61）。つまり、Tie2の活性化を誘導することで、造血幹細胞の試験管内での生存を長期維持できることが可能となる。また、これまでの報告によれば、Tie2の活性化がインテグリンなどの接着因子の活性化により、細胞外マトリックスなどへの細胞の接着を誘導することが知られている（非特許文献5：Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis. *Immunity*. 1998 Nov;9(5):677-86）。このような細胞接着の誘導により、Tie2の活性化によって造血幹細胞は足場依存的な生存維持が生体内外で誘導可能となると考えられる。さらに、近年の報告によると、がんの組織中に存在する最も悪性度の高いとされ、がんの再発に關与するとされているがん幹細胞において、Tie2の発現が示唆されてきている（非特許文献6：Lee OH, Xu J, Fueyo J, Fuller GN, Aldape KD, Alonso MM, Piao Y, Liu TJ, Lang FF, Bekele BN, Gomez-Manzano C. Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Mol Cancer Res*. 2006 Dec;4(12):915-26）。Tie2の活性化が、造血幹細胞の細胞周期を休眠状態に陥らせることが可能なように、がん幹細胞に発現するTie2の活性化によっても、がん幹細胞の増殖を抑制することが可能である。

#### 【0008】

血管系とは別個に組織液の排水路を形成するものがリンパ管である。リンパ管は、末梢

組織で血管から漏出した間質液、タンパク質、脂肪、細胞などを血管系へと環流することにより血液量を一定に保ち、閉鎖循環系を維持する。皮膚に存在する毛細血管では、内皮細胞の外側を基底膜が取り囲み、さらに周皮細胞が付着している。一方、毛細リンパ管では、内皮細胞の外には基底膜がほとんどなく、周皮細胞の付着もない。この構造が、効率よく間質から体液や細胞を取り込むために役立っている（非特許文献7：実験医学 Vol. 24, No. 18 (2006), pp. 133-138）。これまでに、チロシナーゼ型受容体VEGFR(vascular endothelial growth factor receptor)-3がリンパ管内皮細胞に特異的に発現することが示され、そのリガンドであるVEGF-CおよびVEGF-Dがリンパ管の新生を誘導することが示された。また、VEGF-Aはリンパ管内皮細胞に発現するVEGFR2を介してリンパ管新生を誘導していることが明らかになった（非特許文献8：Jussila L and Alitalo K, (2006) Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82:673-700）。さらに、リンパ管の機能に関しては、以下の報告がある。VEGF-Aを発現するアデノウイルスを感染させたマウス耳では、顕著なリンパ管新生が見られたが、構造的な異常とともに、コロイダルカーボンに耳に注入した実験から、リンパ管の回収機能も顕著に阻害されていることが明らかになった（非特許文献9：Nagy et al., (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 196: 1497-1506）。つまり、リンパ管の機能にはリンパ管内皮細胞が適切に配置して裏打ちされていることが必要であると考えられる。これをわれわれは「リンパ管の安定化」と定義する。

10

## 【0009】

20

皮膚に対する物理的あるいは化学的刺激は血管新生やVEGF-Aなどによる血管透過性を誘導して、この結果組織液の貯留と浮腫が生じる。一方で、これらの刺激は直接的にリンパ管の新生・拡張を誘導することも知られている。これまでに、紫外線炎症によってリンパ管の拡張が観測され、染料を注入した実験からリンパ管の機能が障害されていることが明らかになった。血管拡張に伴う水分の真皮内への漏出にともない、リンパ管は拡張して間質液を回収しようとしていると考えられる。しかしながら、過剰なリンパ管の拡張はその回収機能を逆に低下させ浮腫を遅延していると考えられた（非特許文献10：Kajiya K., Hirakawa S., and Detmar M., (2006) VEGF-A mediates UVB-induced impairment of lymphatic vessel function. *Am J Pathol* 169: 1496-1503）。つまり、組織間液の速やかな回収には、リンパ管の過剰な拡張を誘導しないような“リンパ管の安定化”が必要であるとされる。

30

## 【0010】

これまでに、リンパ管の機能不全が関与する病態としては、先天性リンパ浮腫とともに、フィラリア、手術、悪性腫瘍、炎症にともなう二次性のリンパ浮腫、が知られている。先天性のリンパ浮腫としてはMilroy病、Meige病、lymphedema-distichiasis症候群がある。Milroy病ではリンパ管の無形成や低形成が報告され、一方でlymphedema-distichiasis症候群ではリンパ管の過形成が報告されている。これらからも、リンパ管の新生だけではなくリンパ管の安定化によって回収機能を保持することが必要であると考えられる（非特許文献11：実験医学 Vol. 24, No. 18 (2006), pp. 139-143）。

## 【先行技術文献】

40

## 【非特許文献】

## 【0011】

【非特許文献1】実験医学 Vol.20, No.8 (2002) pp.52-57

【非特許文献2】Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 13;101(15):5553-8

【非特許文献3】Science. 1999 Dec 24;286(5449):2511-4

【非特許文献4】Cell. 2004 Jul 23;118(2):149-61

【非特許文献5】Immunity. 1998 Nov;9(5):677-86

【非特許文献6】Mol Cancer Res. 2006 Dec;4(12):915-26

【非特許文献7】実験医学 Vol. 24, No. 18 (2006), pp. 133-138

【非特許文献8】Physiol Rev 82:673-700

50

【非特許文献 9】J Exp Med 196: 1497-1506

【非特許文献 10】Am J Pathol 169: 1496-1503

【非特許文献 11】実験医学 Vol. 24, No. 18 (2006), pp. 139-143

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の課題は、新規なTie2活性化剤の提供、延いては、血管の成熟化、正常化、安定化剤、並びに、リンパ管の安定化を図り、リンパ管の回収機能を維持・亢進するのに有効な薬剤の提供にある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

紫外線Bの照射を受けた皮膚組織中での挙動について詳細に検討したところ、紫外線照射により内皮細胞と壁細胞の接着が抑制され、Tie2のリン酸化（活性化）が抑制された状態に誘導されること、そして、Tie2を強制発現した細胞に様々な生薬エキスを作用させて検討した実験から、ニッケイ（Cinnamomum）属植物由来のケイシ抽出物等にはTie2を活性化作用があること、が見出されている（国際公開番号WO2009/123211）。また、同特許公報では、紫外線Bの照射により光老化を惹起させたマウス皮膚にケイシ抽出物を塗布した結果、同抽出物を塗布することにより改善作用が具体的に示されている。このように、同抽出物はTie2リン酸化により内皮細胞 壁細胞間の接着を改善、促進し、安定な血管構造を形成し、延いてはUVB誘導性の皮膚損傷およびしわ形成を回復することが確認されている。従って、Tie2活性化が血管の成熟化、正常化又は安定化に寄与していることが明らかにされている。

【0014】

一方、Tie2とリンパ管との関係についてAng-1とリンパ管内皮細胞で発現しているTie2との関係に着目してAng-1の機能についてリンパドレナージュアッセイにより調べた結果、Ang-1はTie2の活性化を介してリンパ管の回収機能を促進することが明らかとされている（国際出願番号PCT/JP2009/061047）。従って、Tie2活性化は、血管の成熟化、正常化又は安定化のみならず、リンパ管の安定化に寄与しリンパの流れを促進することが明らかにされている。

【0015】

本発明者がTie2活性化能を有する様々な生薬エキスについてスクリーニングを行ったところ、調べたエキスのうちで、アキノノゲシ及びスイショウガキの抽出物がTie2活性を有することを見出し、以下の発明を完成するに至った：

（1）アキノノゲシ（*Lactuca indica*）及びノ又はスイショウガキ（*Chrysophyllum cainito* Linn.）の抽出物から成る、Tie2活性化剤。

（2）前記抽出物がエタノール、メタノール、1, 3 - ブチレングリコール、水から選ばれる1種又は2種以上の溶媒による抽出物である、（1）のTie2活性化剤。

（3）アキノノゲシ又はスイショウガキの抽出物から成る、血管の成熟化、正常化又は安定化剤。

（4）（3）の血管の成熟化、正常化又は安定化剤、を含んで成るしわ防止・改善剤。

（5）（3）の血管の成熟化、正常化又は安定化剤を被験者に適用することからなる、しわを防止・改善するための美容学的方法。

（6）アキノノゲシ又はスイショウガキの抽出物から成る、リンパ管の安定化剤。

（7）（6）のリンパ管安定化剤を含んで成るむくみ改善・予防剤。

（8）（6）のリンパ管の安定化剤を被験者に適用することからなる、むくみを改善又は予防するための美容学的方法。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、アキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物はTie2を活性化し、それにより血管が成熟化、正常化又は安定化され、そしてノあるいはリンパ管が安定化さ

10

20

30

40

50

れ、その結果しわ、むくみの改善などが図られる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】アキノノゲシ又はスイショウガキの抽出物を添加した場合の、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）におけるリン酸化Tie2量の変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

Tie2活性化剤

1つの観点において、本発明はアキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物から成るTie2活性化剤を提供する。

【0019】

アキノノゲシ（*Lactuca indica*）は、キク目（*Asterales*）、キク科（*Asteraceae*）の植物であり、スイショウガキ（*Chrysophyllum cainito* Linn.）は、カキノキ目（*Ebenales*）、アカテツ科（*Sapotaceae*）の植物である。これらの抽出物はいずれも、Tie2活性化、Tie2活性化に伴う血管の成熟化、正常化又は安定化、あるいはリンパ管安定化、延いては、しわ、むくみの改善等の効果を奏することは知られていない。

【0020】

上記抽出物は常法により得ることができ、例えばその起源となる植物の一部又は全部を抽出溶媒とともに常温で又は加熱して浸漬または加熱還流した後、濾過し、濃縮して得ることができる。アキノノゲシの場合全草が、そしてスイショウガキの場合その葉又は枝が抽出部位として使用されうるが、抽出部位はこれらに限定されない。溶媒抽出の前に、抽出部位を乾燥させてもよい。抽出溶媒としては、通常抽出に用いられる溶媒であれば任意に用いることができ、例えば、有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、グリセリン等のアルコール類、含水アルコール類、クロロホルム、ジクロロエタン、四塩化炭素、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン等、あるいは水性溶媒、例えば水、生理食塩水、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等を、それぞれ単独で、あるいは組み合わせて用いることができる。好ましくは、溶媒としてメタノール、エタノール、1,3-ブチレングリコール、水から選ばれる1種または2種以上が好適に使用される。

【0021】

上記溶媒で抽出して得られた抽出物をそのまま、あるいは例えば凍結乾燥などにより濃縮したエキスを使用でき、また必要であれば吸着法、例えばイオン交換樹脂を用いて不純物を除去したものや、ポラスポリマー（例えばアンバーライトXAD-2）のカラムにて吸着させた後、所望の溶媒で溶出し、さらに濃縮したものも使用することができる。

【0022】

Tie2の活性化とは、Tie2をリン酸化することでその活性体（リン酸化Tie2）に変換できる能力をいう。Tie2の活性化剤として、アンジオポエチン1（Ang-1）などがTie2を活性化するものとして知られていた。

【0023】

アキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物は、抽出物そのものをTie2活性化剤として使用することができる。また、濃度依存的にTie2活性化作用を示す。従って、このような観点からは、アキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物の配合量は、配合する組成物の剤形により異なるが、配合組成物全量中、乾燥物として0.0001～20.0質量%、好ましくは0.0001～10.0質量%である。

【0024】

血管の成熟化、正常化又は安定化剤

別の観点において、本発明は、アキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物から成る、血管の成熟化、正常化又は安定化剤を提供する。

【0025】

本発明に係る血管の成熟化、正常化又は安定化剤は、血管の構造変化を原因とする、種

10

20

30

40

50

々の疾患および老化の予防、改善に有効な医薬品または化粧品として利用できる。本発明の血管の成熟化、正常化又は安定化剤は、血管の正常化、安定化を誘導することにより、種々の炎症性疾患や免疫疾患、成人病など、例えば、種々の感染症、がん、関節リウマチ、痛風、高血圧、糖尿病、動脈硬化症、アトピー性皮膚炎などにおいて、血管新生や血管の破たんを伴う全身の病変部位の改善を図る医薬品として利用できる。また、血管透過性の抑制により、皮膚を含め臓器、器官、各種組織内の浮腫、たとえば炎症性疾患や免疫疾患、成人病による血管浮腫や、紫外線暴露や虫さされ、アレルギーなどによる血管透過性亢進による浮腫やかゆみなどの症状を改善する医薬品または化粧品として利用できる。さらに、Tie2リン酸化剤は、種々の要因によって誘導される内皮細胞の細胞死、たとえば炎症性疾患や免疫疾患、成人病など、例えば、種々の感染症、がん、関節リウマチ、痛風、高血圧、糖尿病、動脈硬化症、または放射線障害、種々の薬剤や紫外線による内皮細胞の細胞死を抑制して、血管の不安定化を抑制できる医薬品または化粧品として利用できる。本発明の血管の成熟化、正常化又は安定化剤は、血管成熟化や血管腔を拡大化することにより、外傷や縛そうなど創傷治癒の促進、血管再生医療における血管の成熟化、虚血性疾患、たとえば脳梗塞や心筋梗塞の改善剤として医薬品に利用でき、また、血流改善効果を利用して、腰痛症、凍傷、脱毛症などに対する内服および外用医薬品としても利用できる。脳血流の増大においては、痴呆症への応用も可能である。脱毛症に対しては、化粧品としての利用も可能である。また、がんにおいては、がん細胞の休眠を誘導する治療薬として、幹細胞においてはその生体内での維持薬として利用が可能である。

10

#### 【0026】

20

光老化とは、一般に日光に対する被曝が繰り返された結果として認められる皮膚の外見及び機能の変化を意味する。日光の構成要素である紫外線（UV）、特に中間UV（UVBと呼ばれる、波長290 - 320nm）が主として光老化を引き起こす。光老化を引き起こすのに必要なUVBの被曝量は現在のところ知られていない。しかしながら、紅斑や日焼けを引き起こすレベルでのUVBに対する繰り返しの被曝が、通常光老化に結びつく。臨床的には、光老化は肌荒れ、しわの形成、斑の着色、土色化、たるみの形成、毛細管拡張症の発症、ほくろの発生、紫斑病の発症、傷つき易くなる、萎縮、繊維症的色素除去領域の発生、前悪性腫瘍及び悪性腫瘍の発症等として特定され得る。光老化は普通、顔、耳、頭、首、と手のような、日光に習慣的に曝される皮膚に起こる。皮膚における老化においては、皮膚障害や紫外線に対する暴露による光老化が主因となるが、本Tie2リン酸化剤は、光老化の原因となる血管障害を抑制することにより、光老化の改善に利用できる。

30

#### 【0027】

##### リンパ管安定化剤

別の観点において、本発明は、アキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物を含んで成る、リンパ管の安定化剤を提供する。

#### 【0028】

本発明に係るリンパ管安定化剤はリンパ管の構造の不安定化を原因とするリンパ液の漏出による様々な皮膚疾患、例えば浮腫（むくみ）の治療・予防に有効な医薬品または化粧品として利用できる。浮腫には、例えば紫外線照射、フィラリア、手術、悪性腫瘍、炎症にともなう二次性のリンパ浮腫や、先天性リンパ浮腫、例えばMilroy病、Meige病、lymph edema-distichiasis症候群がある。

40

#### 【0029】

本発明に係るTie2活性化剤、血管の成熟化、正常化又は安定化剤及びリンパ管安定化剤は、その使用目的に合わせて用量、用法、剤型を適宜決定することが可能である。例えば、本発明の血管の成熟化、正常化又は安定化剤及びリンパ管安定化剤の投与形態は特に制限されるものではなく、経口、非経口、外用等であってよいが、好ましくは外用剤、食品である。剤型としては、例えば軟膏、クリーム、乳液、ローション、パック、浴用剤等の外用剤、注射剤、点滴剤、若しくは坐剤等の非経口投与剤、又は錠剤、粉剤、カプセル剤、顆粒剤、エクス剤、シロップ剤等の経口投与剤、タブレット、ドリンク、クッキー等の食品に配合できる。

50

## 【0030】

本発明の血管の成熟化、正常化又は安定化剤及びリンパ管安定化剤中のアキノノゲシ及びノ又はスイショウガキの抽出物の配合量は、用途に応じて適宜決定できるが、一般には配合する組成物全量中、植物抽出物の乾燥残分として0.0001～20.0質量%、好ましくは0.0001～10.0質量%である。

## 【0031】

また、本発明の血管の成熟化、正常化又は安定化剤及びリンパ管安定化剤には、Tie2活性化剤以外に、例えば、通常の食品や医薬品に使用される賦形剤、防湿剤、防腐剤、強化剤、増粘剤、乳化剤、酸化防止剤、甘味料、酸味料、調味料、着色料、香料等、化粧品等に通常用いられる美白剤、保湿剤、油性成分、紫外線吸収剤、界面活性剤、増粘剤、アル

10

## 【0032】

さらに、本発明の血管の成熟化、正常化又は安定化剤あるいはリンパ管安定化剤を、しわ防止・改善剤又はむくみ改善・予防剤のような皮膚外用剤として使用する場合、皮膚外用剤に慣用の助剤、例えばエデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等の金属封鎖剤、カフェイン、タンニン、ペラパミル、トラネキサム酸およびその誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種生薬、酢酸トコフェロール、グリチルリチン酸およびその誘導体またはその塩等の薬剤、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美白剤、グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類、レチノイン酸、レチノール、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール等のビタミンA類なども適宜配合することができる。皮膚外用剤に配合される血管の成熟化、正常化又は安定化剤あるいはリンパ管安定化剤の量は、適宜決定することができるが、一般には配合する組成物の全量中、植物抽出物の乾燥残分として、0.0001～20.0質量%、好ましくは0.0001～10.0質量%である。

20

## 【0033】

## 美容方法

別の観点において、本発明は、血管の成熟化、正常化又は安定化剤を被験者に適用することからなる、しわを防止・改善するための美容学的方法、を提供する。本発明に係る美容方法は、小じわが形成されやすい顔面の皮膚、特に目尻、下瞼または口元等の皮膚に適用することができるが、これらの部位に限定されない。

30

## 【0034】

更に別の観点において、本発明は、リンパ管の安定化剤を被験者に適用することからなる、むくみを改善又は予防するための美容学的方法、を提供する。本発明に係る美容方法は、むくみや目袋の軽減・予防を目的とするものである。この美容学的方法は、例えば本発明に係るリンパ管安定化剤をむくみなどのある部位に適用し、そのまま放置するか又は例えばリンパ管の流れの方向に即してマッサージなどを施し、リンパ管液の流れを促進するなどして行うことができる。この方法の適用箇所には顔面、首、手足、など、全身のあらゆる部位が挙げられる。

40

## 【実施例】

## 【0035】

次に実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

## 【0036】

アキノノゲシのメタノール抽出物の調製

アキノノゲシの全草乾燥物9.52gを室温で1週間、メタノール80mlに浸漬した。ついで、ろ紙ろ過により得た抽出液よりメタノールを留去し、メタノール抽出物1.66gを得た（抽出率17.3%）。

50



## 【 0 0 3 7 】

スイショウガキのメタノール抽出物の調製

スイショウガキの葉、枝の乾燥物11.81gを室温で1週間、メタノール80mlに浸漬した。ついで、ろ紙ろ過により得た抽出液よりメタノールを留去し、メタノール抽出物1.68gを得た（抽出率14.3%）。

## 【 0 0 3 8 】

血管内皮細胞のウエスタンブロッティング

Tie2を発現する正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）は、三光純薬より購入した。増殖因子などの添加因子を加えたEBM-2（Cambrex; Verviers, Belgium）中でHUVECを培養した後、各種濃度（0.01%～0.0001質量%）の各生薬存在下でHUVEC内のタンパク質をPhosphosafe Extraction Reagent（Novagen, Madison, WI）で抽出した。コントロールとしてDMSOを添加したHUVECも調製した。

## 【 0 0 3 9 】

総タンパク量をRC DC Protein Assay Kit（BIO-RAD, Hercules, CA）にて定量し、以下のようにウエスタンブロッティングして検出した。等量の総タンパク量を7.5%アクリルアミドゲル（NPU-7.5L, ATTO, Japan）でSDS-PAGEを行い、Tie2およびリン酸化Tie2のタンパク質の発現は、抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）を用いて、ECL Kitにより発色した。結果を図1に示す。

## 【 0 0 4 0 】

図1の結果より、コントロールのDMSOと比較して、アキノノゲシ又はスイショウガキのメタノール抽出物が、Ang-1と同様、顕著なTie2活性化作用を示すことが分かる。従って、これらの抽出物がいずれもTie2リン酸化効果を示し、血管成熟化、正常化、安定化に寄与し、その結果血管新生を抑制できることが示唆された。更に、Tie2活性化能を有するAng-1がリンパ管の回収機能を促進することから、これらの抽出物もAng-1と同様にリンパ管の安定化作用を奏するものと考えられる。

## 【 0 0 4 1 】

Tie2活性化剤の配合例

本発明によるTie2活性化剤を含む、錠剤、ソフトカプセル、顆粒、ドリンク、キャンデー、クッキーの配合例を以下に示す。これらの配合例は例示を目的として列挙されるものであって本発明の技術的範囲を限定することを意図するものではない。

## 【 0 0 4 2 】

## 配合例1（錠剤）

（組成物）	配合量（mg / 1錠中）
本発明のTie2活性化剤（植物抽出物の乾燥残分として）	360.5
乳糖	102.4
カルボキシメチルセルロースカルシウム	29.9
ヒドロキシプロピルセルロース	6.8
ステアリン酸マグネシウム	5.2
結晶セルロース	10.2

515.0

## 【 0 0 4 3 】

## 配合例2（錠剤）

（組成物）	配合量（mg / 1錠中）
ショ糖エステル	70
結晶セルロース	74
メチルセルロース	36
グリセリン	25
本発明のTie2活性化剤（植物抽出物の乾燥残分として）	475
N - アセチルグルコサミン	200

10

20

30

40

50

ヒアルロン酸	1 5 0
ビタミン E	3 0
ビタミン B 6	2 0
ビタミン B 2	1 0
- リボ酸	2 0
コエンザイム Q 1 0	4 0
セラミド (コンニャク抽出物)	5 0
L - プロリン	3 0 0

1 5 0 0

10

## 【 0 0 4 4 】

## 配合例 3 (ソフトカプセル)

(組成物)

配合量 (mg / 1 カプセル中)

食用大豆油	5 3 0
トチュウエキス	5 0
ニンジンエキス	5 0
本発明の Tie2 活性化剤 (植物抽出物の乾燥残分として)	1 0 0
ローヤルゼリー	5 0
マカ	3 0
G A B A	3 0
ミツロウ	6 0
ゼラチン	3 7 5
グリセリン	1 2 0
グリセリン脂肪酸エステル	1 0 5

1 5 0 0

20

## 【 0 0 4 5 】

## 配合例 4 (ソフトカプセル)

(組成物)

配合量 (mg / 1 カプセル中)

玄米胚芽油	6 5 9
本発明の Tie2 活性化剤 (植物抽出物の乾燥残分として)	5 0 0
レスベラトロール	1
ハス胚芽エキス	1 0 0
エラスチン	1 8 0
D N A	3 0
葉酸	3 0

1 5 0 0

30

## 【 0 0 4 6 】

## 配合例 5 (顆粒)

(組成物)

配合量 (mg / 1 包中)

本発明の Tie2 活性化剤 (植物抽出物の乾燥残分として)	4 0 0
ビタミン C	1 0 0
大豆イソフラボン	2 5 0
還元乳糖	3 0 0
大豆オリゴ糖	3 6
エリスリトール	3 6
デキストリン	3 0
香料	2 4
クエン酸	2 4

2 4

40

50

		1 2 0 0	
【 0 0 4 7 】			
配合例 6 ( ドリンク )			
( 組成物 )	配合量 ( g / 6 0 m L 中 )		
トチュウエキス	1 . 6		
ニンジンエキス	1 . 6		
本発明のTie2活性化剤 ( 植物抽出物の乾燥残分として )	1 . 6		
還元麦芽糖水飴	2 8		
エリスリトール	8		10
クエン酸	2		
香料	1 . 3		
N - アセチルグルコサミン	1		
ヒアルロン酸 N a	0 . 5		
ビタミン E	0 . 3		
ビタミン B 6	0 . 2		
ビタミン B 2	0 . 1		
- リボ酸	0 . 2		
コエンザイム Q 1 0	1 . 2		
セラミド ( コンニャク抽出物 )	0 . 4		20
L - プロリン	2		
精製水	残余		

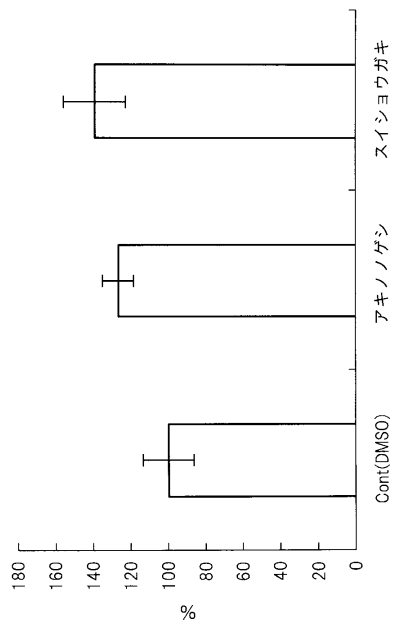
		6 0	
【 0 0 4 8 】			
配合例 7 ( キャンディー )			
( 組成物 )	配合量 ( 重量 % )		
砂糖	5 0		
水飴	4 8		
本発明のTie2活性化剤 ( 植物抽出物の乾燥残分として )	1		30
香料	1		

		1 0 0	
【 0 0 4 9 】			
配合例 8 ( クッキー )			
( 組成物 )	配合量 ( 重量 % )		
薄力粉	4 5 . 0		
バター	1 7 . 5		
グラニュー糖	2 0 . 0		
本発明のTie2活性化剤 ( 植物抽出物の乾燥残分として )	4 . 0		40
卵	1 2 . 5		
香料	1 . 0		

		1 0 0 . 0	
【 0 0 5 0 】			
配合例 8 ( クッキー ) の製造方法			
バターを撈拌しながらグラニュー糖を徐々に添加し、卵、本発明のTie2活性化剤、及び香料を添加して撈拌した。十分に混合した後、均一に振るった薄力粉を加えて低速で撈拌し、塊状で冷蔵庫で寝かせた。その後、成型し 1 7 0 ° C 1 5 分間焼成しクッキーとした。			50

## 【図 1】

図1



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	9/14
A 6 1 Q	19/00 (2006.01)	A 6 1 Q	19/00
A 6 1 P	7/10 (2006.01)	A 6 1 P	7/10
A 2 3 L	1/30 (2006.01)	A 2 3 L	1/30 B

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 加治屋 健太郎

神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内

(72)発明者 山西 治代

神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内

(72)発明者 中野 祐輔

神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(金沢八景)内

審査官 鶴見 秀紀

(56)参考文献 特開2002-308753(JP,A)

特開2004-323406(JP,A)

韓国登録特許第10-0897140(KR,B1)

国際公開第2010/010248(WO,A1)

特開2001-122732(JP,A)

特開2009-114158(JP,A)

WANG,S. et al, Antioxidant Properties and Phytochemical Characteristics of Extracts from *Lactuca indica*, J Agric Food Chem, 2003年, Vol.51, No.5, pp.1506-1512KIM,K.H. et al, Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity in vitro, Bioorg Med Chem Lett, 2007年, Vol.17, No.24, pp.6739-6743HOU,C. et al, Antidiabetic Dimeric Guianolides and a Lignan Glycoside from *Lactuca indica*, J Nat Prod, 2003年, Vol.66, No.5, pp.625-629CHEN,Y. et al, Induction of Apoptosis by the *Lactuca indica* L. in Human Leukemia Cell Line and Its Active Components, J Agric Food Chem, 2007年, Vol.55, No.5, pp.1743-1749KIM,M. et al, Serum cholesterol-lowering effect of triterpene acetate obtained from *Lactuca indica*, Saengyak Hakhoechi, 1997年, Vol.28, No.1, pp.21-25, (abstract) CA [online] AN 127:60467

EINBOND,L.S. et al, Anthocyanin antioxidants from edible fruits, Food Chemistry, 2004年, Vol.84, No.1, pp.23-28

GITHIORI,J.B. et al, Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants, Veterinary Parasitology, 2006年, Vol.139, No.4, pp.308-320

FUJIMAKI,Y. et al, Macrophilicidal and microfilaricidal effects of *Neurolaena lobata*, a Guatemalan medicinal plant, on *Brugia pahangi*, Journal of Helminthology, 2005年, Vol.79, No.1, pp.23-28

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 6 / 1 8

A 6 1 K 8 / 9 7

A 6 1 K 3 6 / 2 8

A 6 1 P 7 / 1 0

A 6 1 P 9 / 1 4

A 6 1 P 1 7 / 0 0

A 6 1 Q 1 9 / 0 0

A 6 1 Q 1 9 / 0 8

A 2 3 L 1 / 3 0

CA / BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamII)