

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6580342号
(P6580342)

(45) 発行日 令和1年9月25日 (2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日 (2019.9.6)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 8/60 (2006.01)

A 6 1 K 8/60

A 6 1 K 31/7024 (2006.01)

A 6 1 K 31/7024

A 6 1 Q 19/08 (2006.01)

A 6 1 Q 19/08

A 6 1 P 17/16 (2006.01)

A 6 1 P 17/16

C 0 7 K 14/78 (2006.01)

C 0 7 K 14/78

請求項の数 12 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-38676 (P2015-38676)
 (22) 出願日 平成27年2月27日 (2015.2.27)
 (65) 公開番号 特開2015-178493 (P2015-178493A)
 (43) 公開日 平成27年10月8日 (2015.10.8)
 審査請求日 平成30年2月5日 (2018.2.5)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-38475 (P2014-38475)
 (32) 優先日 平成26年2月28日 (2014.2.28)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000113908
 マルホ株式会社
 大阪府大阪市北区中津一丁目5番22号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100117743
 弁理士 村田 美由紀
 (74) 代理人 100163658
 弁理士 小池 順造

最終頁に続く

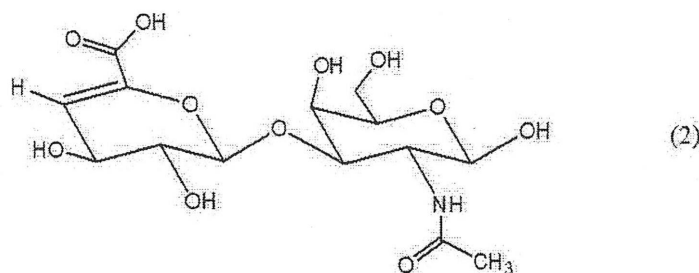
(54) 【発明の名称】 トロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を含有する、トロポエラスチン発現促進剤であって、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、下記化学式(2)で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、トロポエラスチン発現促進剤。

【化 1】



【請求項 2】

皮膚線維芽細胞のトロポエラスチンの発現を促進する、請求項 1 に記載のトロポエラスチン発現促進剤。

【請求項 3】

皮膚の老化の防止または改善用である、請求項 1 または 2 に記載のトロポエラスチン発現促進剤。

【請求項 4】

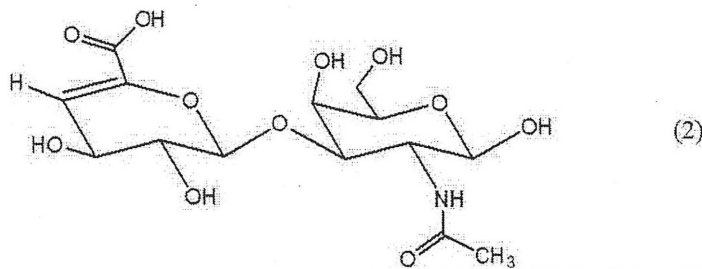
皮膚外用医薬品、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のトロポエラスチン発現促進剤。

【請求項 5】

コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を含有する、エラスチン産生促進剤であって、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、下記化学式 (2) で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、エラスチン産生促進剤。

10

【化 2】



20

【請求項 6】

皮膚真皮の細胞外マトリックスにおけるエラスチンの産生を促進する、請求項 5 に記載のエラスチン産生促進剤。

【請求項 7】

皮膚の老化の防止または改善用である、請求項 5 または 6 に記載のエラスチン産生促進剤。

【請求項 8】

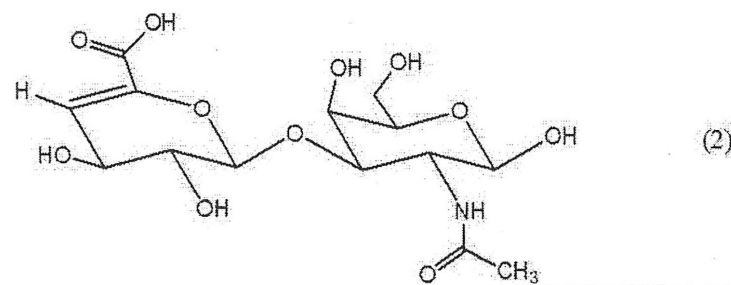
皮膚外用医薬品、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品である、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のエラスチン産生促進剤。

【請求項 9】

培養細胞にコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を作用させることによる、トロポエラスチンの発現の促進方法であって、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、下記化学式 (2) で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、トロポエラスチンの発現の促進方法。

30

【化 3】



40

【請求項 10】

培養細胞が皮膚線維芽細胞の培養細胞である、請求項 9 に記載の促進方法。

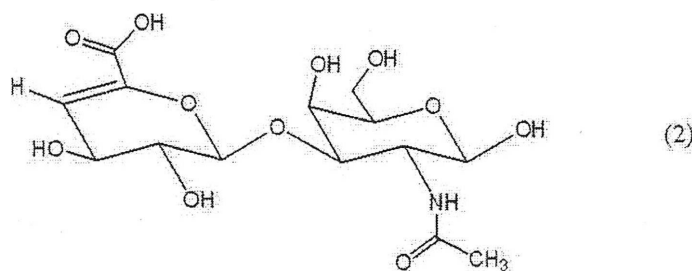
【請求項 11】

培養細胞にコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を作用させ、トロポエラスチンの発現を促進することによる、エラスチン産生の促進方法であって、コンドロイ

50

チン二糖のトリ硫酸エステルが、下記化学式(2)で示されるN-アセチルコンドロシンの化学修飾体のグルクロン酸残基の2位の水酸基、ならびにN-アセチルガラクトサミン残基の4位および6位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、エラスチン産生の促進方法。

【化4】



10

【請求項12】

培養細胞が皮膚線維芽細胞の培養細胞である、請求項11に記載の促進方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞、特に皮膚線維芽細胞におけるトロポエラスチンの発現を促進し、ひいてはエラスチンの産生を促進する、トロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤に関する。

20

【背景技術】

【0002】

加齢や紫外線等による皮膚の老化には、皮膚真皮の細胞外マトリックス成分の減少や変性が関与することが知られている。

主な細胞外マトリックス成分としては、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン等の線維状タンパク質、およびヒアルロン酸等のムコ多糖類が知られている。

【0003】

上記細胞外マトリックス成分のうち、コラーゲンまたはヒアルロン酸に対し、軟骨や関節の滑液に含まれるムコ多糖類であるコンドロイチン硫酸が産生促進作用を有することが知られ、コンドロイチン硫酸を有効成分として含有するコラーゲン産生促進剤、およびヒアルロン酸産生促進剤が開示されている(特許文献1、2)。

30

一方、同じ皮膚真皮の細胞外マトリックス成分であるエラスチンに対しては、ラット新生児の肺線維芽細胞において、不溶性エラスチンの沈着が減少すること、ケロイド線維芽細胞において、コンドロイチン硫酸により、細胞外マトリックスへのエラスチンの蓄積が減少することが報告されている(非特許文献1、2)。

【0004】

エラスチンは、細胞外マトリックスを構成する弾性線維の主成分であり、組織に弾力性および柔軟性を付加する。特に、皮膚真皮においては、皮膚に弾力性を与え、皮膚のはりを保持する機能を有する。加齢によるエラスチン線維の減少は、皮膚のたるみやしわといった老化症状の大きな要因となるといわれている。また、紫外線による光老化では、真皮網状層のエラスチン線維が変性沈着して、弾力性がなく硬化したしわの多い光老化皮膚の原因となるといわれている。

40

【0005】

皮膚の老化の進行に伴う上記のようなエラスチンの減少や変性を防止すべく、エラスチンを分解する酵素であるエラスターゼの活性を阻害し、また、エラスターゼの産生を抑制する物質のスクリーニングが行われてきた。また、細胞外マトリックスにおけるエラスチンの生成を促進する物質の探求も行われている。

【0006】

50

しかしながら、エラスターゼ活性阻害作用またはエラスターゼ産生抑制作用、あるいはエラスチンの産生促進作用を有する成分は、多くが植物抽出物等の天然由来成分に求められており、その有効性、安定性、経皮吸収性等の観点から、十分満足できるものが得られているとは言い難い。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2012-031122号公報

【特許文献2】特開2012-031123号公報

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Archives Biochemistry and Biophysics, Vol. 302, No. 2, pp. 322-331, 1993

【非特許文献2】Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 390, p. 1221-1228, 2009

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、細胞外マトリックスにおけるエラスチンの産生を促進するため、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンの発現を促進し、ひいてはエラスチンの産生を促進し得るトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤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】

【0010】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、コンドロイチン二糖、すなわちコンドロイチンの構成単位であるグルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンよりなる二糖、のトリ硫酸エステルまたはその塩が、トロポエラスチンの発現を促進することで細胞外マトリックスにおけるエラスチンの産生を促進することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

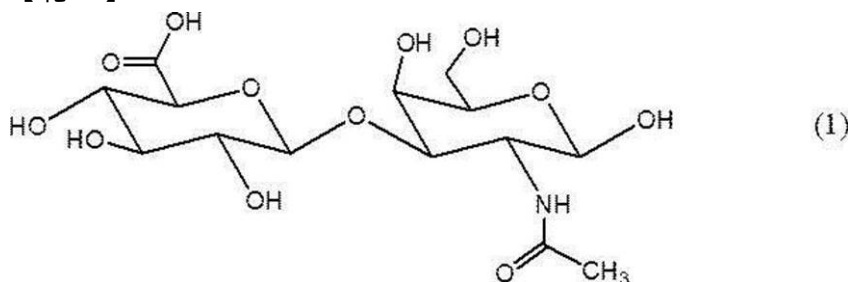
すなわち、本発明は、次の[1]～[21]に関する。

[1]コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を含有する、トロポエラスチン発現促進剤。

[2]コンドロイチン二糖が、下記式(1)で示されるN-アセチルコンドロシンまたは下記式(2)で示されるN-アセチルコンドロシンの化学修飾体である、上記[1]に記載のトロポエラスチン発現促進剤。

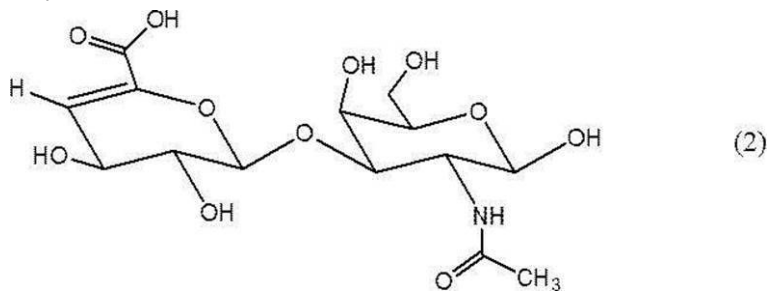
【0012】

【化1】



【0013】

【化 2】



【 0 0 1 4 】

10

〔 3 〕コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、コンドロイチン二糖のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、上記〔 1 〕または〔 2 〕に記載のトロポエラスチン発現促進剤。

〔 4 〕皮膚線維芽細胞のトロポエラスチンの発現を促進する、上記〔 1 〕～〔 3 〕のいずれかに記載のトロポエラスチン発現促進剤。

〔 5 〕皮膚の老化の防止または改善用である、上記〔 1 〕～〔 4 〕のいずれかに記載のトロポエラスチン発現促進剤。

〔 6 〕皮膚外用医薬品、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品である、上記〔 1 〕～〔 5 〕のいずれかに記載のトロポエラスチン発現促進剤。

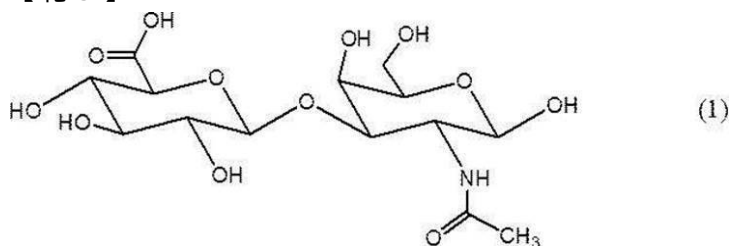
20

〔 7 〕コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を含有する、エラスチン産生促進剤。

〔 8 〕コンドロイチン二糖が、下記式（ 1 ）で示される N - アセチルコンドロシンまたは下記式（ 2 ）で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体である、上記〔 7 〕に記載のエラスチン産生促進剤。

【 0 0 1 5 】

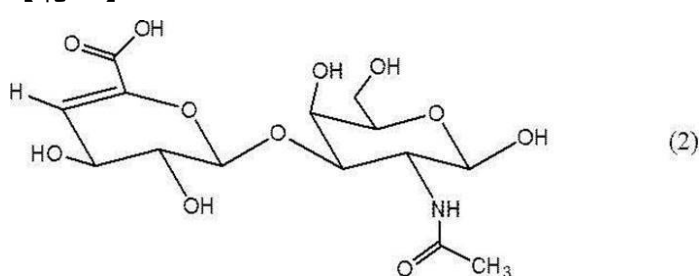
【化 3】



30

【 0 0 1 6 】

【化 4】



40

【 0 0 1 7 】

〔 9 〕コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、コンドロイチン二糖のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、上記〔 7 〕または〔 8 〕に記載のエラスチン産生促進剤。

〔 1 0 〕皮膚真皮の細胞外マトリックスにおけるエラスチンの産生を促進する、上記〔 7 〕～〔 9 〕のいずれかに記載のエラスチン産生促進剤。

50

[1 1] 皮膚の老化の防止または改善用である、上記 [7] ~ [1 0] のいずれかに記載のエラスチン産生促進剤。

[1 2] 皮膚外用医薬品、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品である、上記 [7] ~ [1 1] のいずれかに記載のエラスチン産生促進剤。

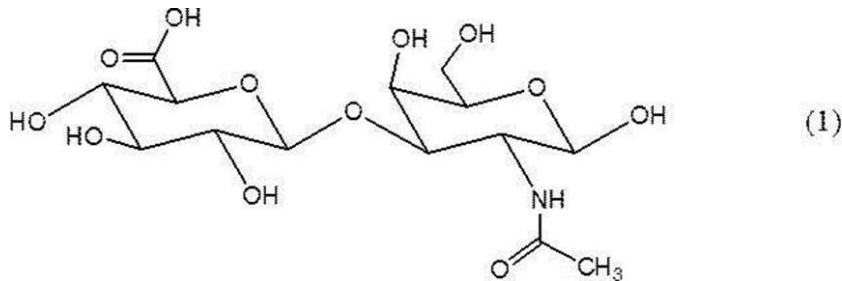
[1 3] 細胞にコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を作用させることによる、トロポエラスチンの発現の促進方法。

[1 4] コンドロイチン二糖が、下記式 (1) で示される N - アセチルコンドロシンまたは下記式 (2) で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体である、上記 [1 3] に記載の促進方法。

【 0 0 1 8 】

10

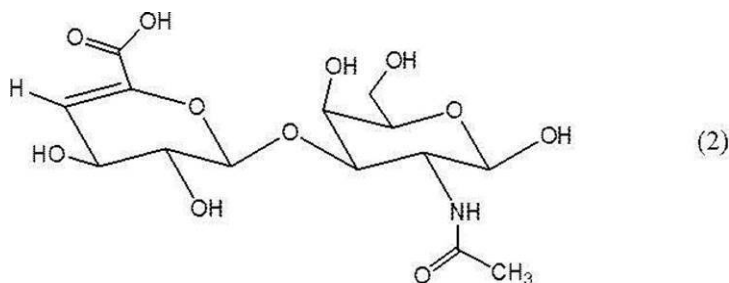
【 化 5 】



【 0 0 1 9 】

20

【 化 6 】



【 0 0 2 0 】

30

[1 5] コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、コンドロイチン二糖のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、上記 [1 3] または [1 4] に記載の促進方法。

[1 6] 細胞が皮膚線維芽細胞である、上記 [1 3] ~ [1 5] のいずれかに記載の促進方法。

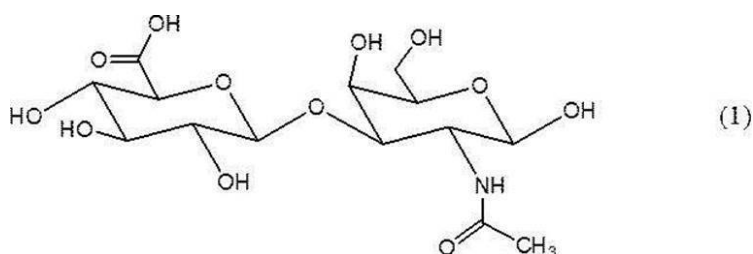
[1 7] 細胞にコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を作用させ、トロポエラスチンの発現を促進することによる、エラスチン産生の促進方法。

[1 8] コンドロイチン二糖が、下記式 (1) で示される N - アセチルコンドロシンまたは下記式 (2) で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体である、上記 [1 7] に記載の促進方法。

40

【 0 0 2 1 】

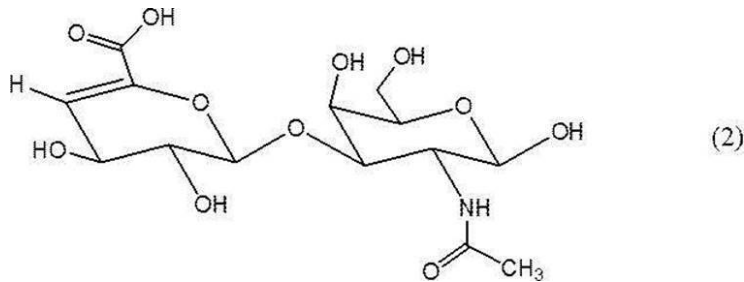
【 化 7 】



50

【 0 0 2 2 】

【 化 8 】



10

【 0 0 2 3 】

[1 9] コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルが、コンドロイチン二糖のグルクロン酸残基の 2 位の水酸基、ならびに N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものである、上記 [1 7] または [1 8] に記載の促進方法。

[2 0] 細胞が皮膚線維芽細胞である、上記 [1 7] ~ [1 9] のいずれかに記載の促進方法。

[2 1] 上記 [1 7] ~ [2 0] のいずれかに記載の促進方法によって得られたエラスチン。

【 発明の効果 】

20

【 0 0 2 4 】

本発明に係るトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、トロポエラスチン遺伝子の発現を増加させて、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンタンパク質の発現を増加させることができ、皮膚真皮の細胞外マトリックス等において、エラスチン線維の産生を促進することができる。

また、本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、経皮吸収性に優れ、エラスチンの減少、変性による皮膚の老化を有効に防止し、または改善することができる。

さらに、本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、皮膚線維芽細胞等の細胞に作用させて、該細胞のトロポエラスチンの発現を促進してエラスチンの産生を促進することができ、皮膚シートの生成等、再生医療分野においても有用である。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルのナトリウム塩を 2 4 時間作用させた後のトロポエラスチン遺伝子発現について、他のコンドロイチン硫酸類と比較して示す図である。

【 図 2 】 コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルのナトリウム塩を 8 時間または 2 4 時間作用させた後のトロポエラスチン遺伝子発現について、他のコンドロイチン硫酸類と比較して示す図である。

40

【 図 3 】 コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルのナトリウム塩を 2 4 時間作用させた後のトロポエラスチン発現について、他のコンドロイチン硫酸類と比較して示す図である。

【 図 4 】 コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルのナトリウム塩を 4 8 時間作用させた後のトロポエラスチン発現を示す図である。

【 図 5 】 コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルのナトリウム塩を 2 4 時間作用させた後のエラスチン産生量を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を有効成分として含有する。

50

【 0 0 2 7 】

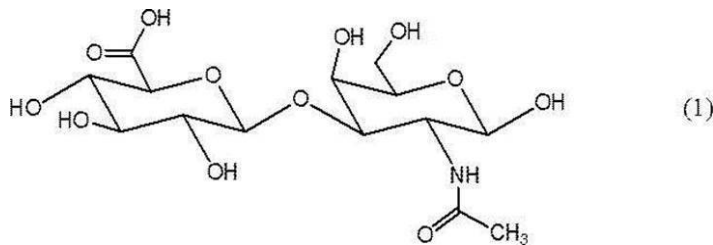
コンドロイチン二糖は、グルクロン酸とN - アセチルガラクトサミンが β - 1 , 3 - 結合してなる二糖であり、コンドロイチンの構成単位である。

本発明において、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルを構成するコンドロイチン二糖としては、下記式(1)で示されるN - アセチルコンドロシン[3 - O - β - D - グルコピラヌロノシル - 2 - (アセチルアミノ) - 2 - デオキシ - β - D - ガラクトピラノース]、および下記式(2)で示されるN - アセチルコンドロシンの化学修飾体が挙げられる。下記式(2)で示されるN - アセチルコンドロシンの化学修飾体は、N - アセチルコンドロシンのグルクロン酸残基の4位水酸基が水素に置換され、4位と5位の間の結合が二重結合となった化合物である。

10

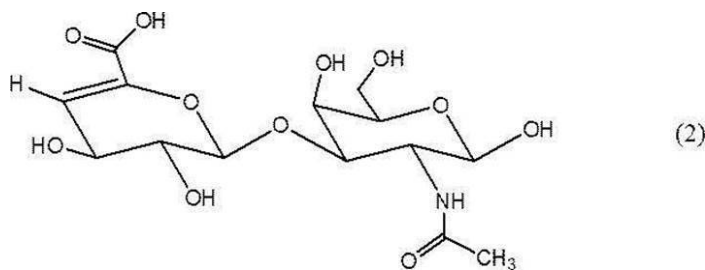
【 0 0 2 8 】

【化9】



【 0 0 2 9 】

【化10】



20

【 0 0 3 0 】

本発明においては、上記N - アセチルコンドロシンまたはその化学修飾体のトリ硫酸エステルを好適に用いることができる。

30

【 0 0 3 1 】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤に含有されるコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルとしては、コンドロイチン二糖のグルクロン酸残基の2位の水酸基、ならびにN - アセチルガラクトサミン残基の4位および6位の水酸基に硫酸基がエステル結合したものが好ましく用いられる。

また、本発明においては、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルの塩としては、薬学的に許容される塩であれば、特に限定されることなく用いることができるが、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が、好ましい塩として例示される。

40

【 0 0 3 2 】

コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルは、コンドロイチナーゼABC等、コンドロイチン硫酸分解酵素を用いて、種々のタイプのコンドロイチン硫酸を分解する方法等、自体公知の方法によって製造することができるが、デキストラ ラボラトリーズ (DEXTRA LABORATORIES) 社等より提供されている市販の製品を用いることが便利である。

【 0 0 3 3 】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤には、上記したコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステル、およびその塩からなる群より1種を選択し、単独で含有させてもよく、2種以上を選択し、組み合わせてもよい。

50

本発明のトロポエラスチン発現促進剤またはエラスチン産生促進剤におけるコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩の含有量は、その剤形の種類等にもよるが、トロポエラスチン発現促進効果またはエラスチン産生促進効果および製剤安定性等を考慮すると、トロポエラスチン発現促進剤またはエラスチン産生促進剤の全量に対し、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルの量として0.001重量%～10重量%とすることが好ましく、0.01重量%～5重量%とすることがより好ましく、0.1重量%～3重量%とすることがさらに好ましい。

【0034】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、一般的な製剤化方法、たとえば第16改正日本薬局方製剤総則に記載された方法に従い、製剤化に際して一般的に用いられる溶剤または基剤に、有効成分であるコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を加え、必要に応じて賦形剤、乳化剤、溶解補助剤、懸濁化剤等の添加剤等を加えて混合し、均質に溶解、分散または懸濁して調製することができ、液剤、ゲル剤、クリーム剤等の半固形剤、固形剤、スプレー剤等、種々の剤形で提供することができる。

10

【0035】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンの遺伝子の発現を促進し、トロポエラスチンタンパク質の生成を促進することにより、エラスチンの産生を促進する。それゆえ、エラスチン線維の再構築効果が期待される。

20

特に、皮膚線維芽細胞のトロポエラスチン発現の促進に有効であり、皮膚真皮の細胞外マトリックスにおけるエラスチン産生の促進、エラスチン線維の再構築に有用である。

従って、本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、しわ、たるみ等、エラスチンの減少または変性に起因する皮膚の老化症状の発現、進行を防止し、または前記老化症状を改善するために好ましく用いられる。

【0036】

よって、本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、皮膚外用医薬品、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品として、好ましく提供することができる。

【0037】

皮膚外用医薬品としては、外用散剤等の外用固形剤；ローション剤、リニメント剤等の外用液剤；外用エアゾール剤、ポンプスプレー剤等のスプレー剤；油脂性軟膏剤、水溶性軟膏剤等の軟膏剤；水中油型または油中水型のクリーム剤；水性または油性ゲル剤；テープ剤またはパップ剤等の貼付剤等が挙げられる。これらは、一般的な溶剤または基剤を用い、必要に応じて一般的な添加剤を加え、また、必要に応じて支持体、剥離ライナー等を用いて、一般的な皮膚外用医薬品の製造方法、たとえば第16改正日本薬局方製剤総則「皮膚などに適用する製剤」に記載された方法に準じて調製される。

30

【0038】

上記溶剤としては、精製水、エタノール、イソプロパノール、ジプロピレングリコール等が挙げられ、これらより1種または2種以上を選択して用いることができる。

40

上記基剤としては、オリーブ油、ダイズ油、ツバキ油、ゴマ油、落花生油、カカオ脂、牛脂、豚脂等の動植物性油脂；カルナウバロウ、ミツロウ等のロウ；オクチルドデカノール、セタノール、ステアリルアルコール等の脂肪族アルコール；オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸等の脂肪酸；スクワラン、白色ワセリン、流動パラフィン、セレシン、マイクロクリスタリンワックス等の炭化水素といった油脂性基剤、ゼラチン、マクロゴール等の親水性基剤が挙げられ、これらより1種または2種以上を選択して用いることができる。

【0039】

また、上記添加剤としては、軽質無水ケイ酸、結晶セルロース、デキストリン等の賦形剤；アジピン酸ジイソプロピル、カプリン酸、クロタミトン、炭酸プロピレン等の溶解補

50

助剤；アルギン酸プロピレングリコールエステル、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、大豆レシチン、ポピドン等の懸濁化剤；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、グリセリンモノステアレート、ショ糖脂肪酸エステル等の界面活性剤または乳化剤；カルボキシビニルポリマー、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール（部分ケン化物）等の粘稠剤；トリアセチン、ミリスチン酸イソプロピル等の可塑剤；グリセリン、1,3-ブチレングリコール、DL-ピロリドンカルボン酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム等の保湿剤；エデト酸ナトリウム、ソルビトール、チモール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール等の安定化剤；アスコルビン酸、エリソルビン酸ナトリウム、酢酸トコフェロール、ジブチルヒドロキシトルエン等の抗酸化剤；ソルビン酸、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル等の保存剤；塩酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸、酢酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム等のpH調整剤などが挙げられ、必要に応じて、1種または2種以上を選択して用いる。

10

【0040】

なお、本発明のトロポエラスチン発現促進剤またはエラスチン産生促進剤が皮膚外用医薬品として提供される場合には、本発明の特徴を損なわない範囲で、コエンザイムQ₁₀、デオキシリボ核酸ナトリウム、アシタバ抽出物、クロレラ抽出物、酵母抽出物、オタネニンジン抽出物、ヒバマタ抽出物、ロイヤルゼリー抽出物等の細胞賦活剤；加水分解シルク、カッコン抽出物、シャクヤク抽出物、卵殻膜タンパク質、レチノール等の抗シワ・抗老化剤；アズレン、アラントイン、カミツレ抽出物、カンゾウ抽出物、キダチアロエ抽出物、グリチルリチン酸等の抗炎症・肌荒れ防止剤等を含有させることができる。

20

【0041】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤またはエラスチン産生促進剤が皮膚外用医薬品として提供される場合において、その適用量は、トロポエラスチン発現促進剤またはエラスチン産生促進剤の剤形、対象となる患者の性別、年齢、皮膚の老化症状やその程度等により異なるが、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルの量として、好ましくは1日当たり0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。前記の量は、1回で適用してもよく、数回に分けて適用してもよい。

30

【0042】

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品としても提供することができる。かかる医薬部外品または化粧品は、皮膚外用医薬品に準じて製造することができ、化粧水、美容液、乳液、クリーム、パック等の形態で提供され得る。

【0043】

また、本発明は、上記コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を細胞に作用させて、トロポエラスチンの発現を促進する方法を提供する。

さらに、本発明は、上記コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を細胞に作用させ、トロポエラスチンの発現を促進することにより、エラスチン産生を促進する方法を提供する。

40

コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を作用させる細胞としては、皮膚線維芽細胞が好ましく、皮膚線維芽細胞にコンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩を作用させることにより、皮膚線維芽細胞において、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンの発現を促進することができるため、皮膚真皮の細胞外マトリックスにおけるエラスチン産生を促進し、前記細胞外マトリックスを構成する弾性線維の主成分であるエラスチン線維の構築を図ることができる。

【0044】

皮膚線維芽細胞におけるトロポエラスチンの発現を促進させるためには、コンドロイチ

50

ン二糖のトリ硫酸エステルまたはその塩は、コンドロイチン二糖のトリ硫酸エステルの量として、皮膚線維芽細胞 5×10^4 個に対し、 $0.02 \mu\text{g} \sim 3 \mu\text{g}$ 作用させることが好ましく、 $0.03 \mu\text{g} \sim 1 \mu\text{g}$ 作用させることがより好ましい。

【0045】

本発明の上記トロポエラスチンの発現促進方法およびエラスチン産生の促進方法は、医療用皮膚シートの調製等、再生医療分野において有用である。

【実施例】

【0046】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0047】

まず、以下の試験例にて用いた皮膚線維芽細胞の培養方法、および各評価に用いた試料について示す。

なお、以下の試験例にて、特に製品名および提供元を記載しない試薬等は、和光純薬工業株式会社より入手した。

【0048】

(1) 皮膚線維芽細胞の培養方法

$10 (\text{w/v})\%$ 牛胎仔血清添加ダルベッコ修正基礎培地 (DMEM - $10\% \text{ FBS}$) 3 mL に正常ヒト皮膚線維芽細胞 (胎児由来) を 5×10^4 個播種し、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ にて 24 時間インキュベートした。

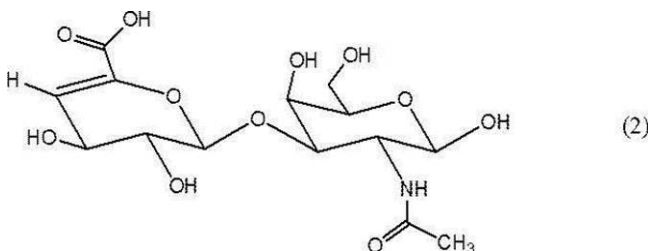
(2) 試料

(i) コンドロイチン二糖トリ硫酸エステル四ナトリウム ($\text{CDi} - \text{Tris} \cdot \text{Na}_4$) : コンドロイチン二糖 (下記式 (2) で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体) のグルクロン酸残基の 2 位、N - アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位に硫酸基が結合したトリ硫酸エステルの四ナトリウム塩 ($\text{Chondroitin disaccharide} \Delta \text{Di} - \text{tris}, \text{sodium salt}$) (カタログ No. C3207)、デキストラ ラボラトリーズ (DEXTRA LABORATORIES) 社) を用いた。

(ii) コンドロイチン二糖硫酸エステル二ナトリウム ($\text{CDi} - \text{S} \cdot \text{Na}_2$) : コンドロイチン二糖 (下記式 (2) で示される N - アセチルコンドロシンの化学修飾体) の N - アセチルガラクトサミン残基の 6 位に硫酸基が結合した硫酸エステルの二ナトリウム塩 ($\text{Chondroitin disaccharide} \Delta \text{Di} - 6 \text{S}, \text{sodium salt}$) (カタログ No. C3203)、デキストラ ラボラトリーズ (DEXTRA LABORATORIES) 社) を用いた。

【0049】

【化 11】



【0050】

(iii) 低分子量の高硫酸化コンドロイチン硫酸 (L - CS) : グルクロン酸および N - アセチルガラクトサミンよりなる二糖単位がトリ硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸 (重量平均分子量 = $3,700 \text{ Da}$) は、特開 2012 - 157271 号公報および特開 2010 - 077256 号公報に記載された方法に従って調製した。重量平均分子量は、マルトペンタオースおよびプルランを標準試料として用い、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) - 示差屈折計 (RI) 法により求めた。

(i v) 高分子量の高硫酸化コンドロイチン硫酸 (H - C S) : グルクロン酸および N - アセチルガラクトサミンよりなる二糖単位がトリ硫酸エステル化されたコンドロイチン硫酸 (重量平均分子量 = 4 , 7 0 0 D a) は、特開 2 0 1 2 - 1 5 7 2 7 1 号公報に記載された方法に従って調製した。重量平均分子量は、マルトペンタオースおよびプルランを標準試料として用い、ゲル浸透クロマトグラフィー (G P C) - 示差屈折計 (R I) 法により求めた。

【 0 0 5 1 】

[試験例 1] コンドロイチン二糖トリ硫酸エステルがトロポエラスチン遺伝子発現に及ぼす効果の評価

(1) トロポエラスチン遺伝子発現に対する C D i - T r i S ・ N a ₄、C D i - S ・ N a ₂ および H - C S の影響 10

(i) 6 0 m m ディッシュにて、培養した正常ヒト皮膚線維芽細胞 (培地 3 m L ; 細胞数 = 5 × 1 0 ⁴ 個 / m L) に各試料の水溶液 (1 0 μ g / m L) を 3 0 μ L 添加 (各試料の最終濃度 = 0 . 1 μ g / m L) し、3 7 ° C、5 % C O ₂ にて 2 4 時間インキュベートした後培地を除去し、3 m L のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で洗浄した。なお、試料を添加せずに同様に処理したものを対照とした。

(i i) P B S を除去し、RNA 抽出試薬 (R N A I s o P l u s、タカラバイオ株式会社) を 1 m L 添加し、細胞 RNA 抽出液を得た。

(i i i) 細胞 RNA 抽出液 1 m L とクロロホルム 2 0 0 μ L を混和し、1 2 , 0 0 0 × g、4 分の条件で 1 5 分間遠心分離した後、上清を回収し、クロロホルム 2 0 0 μ L を加えて混和し、1 2 , 0 0 0 × g、4 分の条件で 1 5 分間遠心分離した。 20

(i v) 上清を回収し、イソプロパノール 5 0 0 μ L と混和し、- 3 0 ° C で一夜静置し、1 2 , 0 0 0 × g、4 分の条件で 1 5 分間遠心分離した。

(v) 上清を除去し、RNA 沈殿物に冷 7 0 (v / v) % エタノール 5 0 0 μ L を添加し、1 2 , 0 0 0 × g、4 分の条件で 1 5 分間遠心分離した。

(v i) 再度上清を除去し、RNA 沈殿物に冷 7 0 (v / v) % エタノール 5 0 0 μ L を添加し、1 2 , 0 0 0 × g、4 分の条件で 1 5 分間遠心分離し、RNA 沈殿物をジエチルピロカーボネート (D E P C) 処理水 (D E P C t r e a t e d w a t e r、株式会社ニッポンジーン) で溶解して、マイクロプレートリーダー (日本モレキュラーデバイス株式会社) により吸光度を測定し、RNA の濃度および純度を算出した (2 6 0 n m / 2 8 0 n m) 。 30

(v i i) 逆転写キット (P r i m e S c r i p t R T r e a g e n t K I T (P e r f e c t R e a l T i m e、タカラバイオ株式会社)) および逆転写装置 (V e r i t i 9 6 w e l l T h e r m a l c y c l a r (アプライド バイオシステムズ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 社)) を用いて、RNA を逆転写し、R e a l T i m e P C R キット (S Y B R P r e m i x E X t a q (T l i R N a s e P l u s、タカラバイオ株式会社)) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を行い (P C R 装置 : S t e p O n e P l u s リアルタイム P C R システム、(アプライド バイオシステムズ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 社) 、トロポエラスチン遺伝子の発現量を求めた。 40

結果は、対照におけるトロポエラスチン遺伝子発現量を 1 とした場合の相対値にて、表 1 および図 1 に示した。

【 0 0 5 2 】

【 表 1 】

試 料	トロポエラスチン遺伝子発現量 (相対値 ± S.D.)
対 照	1
C D i - T r i S ・ N a ₄	2.88 ± 0.547
H - C S	1.15 ± 0.469
C D i - S ・ N a ₂	0.96 ± 0.024

【 0 0 5 3 】

表 1 および図 1 に示されるように、 $CDi - TriS \cdot Na_4$ を正常ヒト線維芽細胞に 24 時間作用させた場合には、対照の 3 倍近いトロポエラスチン遺伝子の発現が見られたが、 $H - CS$ 、 $CDi - S \cdot Na_2$ によっては、トロポエラスチン遺伝子発現の有意な増加は見られなかった。

【 0 0 5 4 】

(2) トロポエラスチン遺伝子発現に対する $CDi - TriS \cdot Na_4$ 、 $L - CS$ および $H - CS$ の影響

試料として、 $CDi - S \cdot Na_2$ の代わりに $L - CS$ を用い、試料添加後のインキュベーション時間を 8 時間および 24 時間とした他は、上記 (1) と同様に処理または操作し、各試料を 8 時間または 24 時間作用させた後のトロポエラスチンの発現量を求めた。

結果は、対照におけるトロポエラスチン遺伝子発現量を 1 とした場合の相対値にて、表 2 および図 2 に示した。

【 0 0 5 5 】

【表 2】

試 料	トロポエラスチン遺伝子発現量 (相対値 $\pm$ S.D.)	
	8 時間作用後	24 時間作用後
対 照	1	1
$CDi - TriS \cdot Na_4$	4.184 ± 2.307	2.75 ± 1.218
$L - CS$	3.476 ± 1.542	1.42 ± 0.388
$H - CS$	5.33 ± 3.907	1.05 ± 1.053

【 0 0 5 6 】

表 2 および図 2 に示されるように、各試料を 8 時間作用させた後には、いずれの試料によっても、トロポエラスチン遺伝子発現の増加が見られた。しかし、24 時間作用させた後では、 $L - CS$ 、 $H - CS$ によるトロポエラスチン遺伝子発現量は、それぞれ対照の 1.42 倍および対照の 1.05 倍にまで減少したのに対し、 $CDi - TriS \cdot Na_4$ を作用させた場合の遺伝子発現量は対照の 2.75 倍であり、 $CDi - TriS \cdot Na_4$ によるトロポエラスチン遺伝子発現の増加は、長時間 (24 時間作用後) まで持続することが認められた。

【 0 0 5 7 】

[試験例 2] トロポエラスチンタンパク質発現に対する $CDi - TriS \cdot Na_4$ 、 $L - CS$ および $H - CS$ の影響の評価

(1) 培養した正常ヒト皮膚線維芽細胞 (培地 3 mL ; 細胞数 = 5×10^4 個 / mL) に各試料の水溶液 ($30 \mu g / mL$) $30 \mu L$ を添加 (各試料の最終濃度 = $0.3 \mu g / mL$) し、37、5% CO_2 にて 24 時間インキュベートした後、培地を除去し、3 mL の PBS で洗浄した。なお、試料を添加せずに同様に処理したものを対照とした。

(2) PBS を除去し、タンパク質抽出用溶液 (2 (w / v) % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、10 (v / v) % グリセロール、10 mM オルトバナジン酸ナトリウム、62.5 mM トリス - 塩酸緩衝液、pH = 6.8) $400 \mu L$ を添加し、タンパク質を抽出した。

(3) ローリー法によりタンパク質量を定量し、対照および各試料添加群のタンパク質抽出液について、タンパク質含有量が同量になるように調整して、以下の通り、ウェスタンブロット法により、トロポエラスチンタンパク質を検出、定量した。

(4) (3) でタンパク質含有量を調整した各群のタンパク質抽出液と、SDS - PAGE サンプルバッファー (62.5 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH = 6.8)、2 (w / v) % SDS、10 (v / v) % グリセロール、1 (w / v) % ブロモフェノールブルー) を 1 : 1 で混和し、95 で 3 分間加温した後、7 (w / v) % ポリアクリルアミドゲル (トロポエラスチン検出用) または 10 (w / v) % ポリアクリルアミドゲル (β - アクチン検出用) を用いて、ミニプロティアン Tetra セル (バイオ - ラッド (BIO - RAD) 社) にて SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) を行った (泳動用バッファー : 2.5 mM トリス、190 mM グリシン、0.1 (w / v) % S

D S 水溶液)。

(5) SDS-PAGE により分離したタンパク質をゲルからポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Amersham Hybond-P、ポアサイズ = 0.45 μm、ジーイーヘルスケア (GE Healthcare) 社) へ転写 (転写装置: criterion トランスブロットセル (バイオ-ラッド (BIO-RAD) 社)、転写用バッファ: 2.5 mM トリス、190 mM グリシン、15 (v/v) % メタノール水溶液、転写条件: 45 分間、3 A) し、ブロッキングバッファ (5 (w/v) % スkimミルク、1 (w/v) % Tween 20、0.13 M 塩化ナトリウム、0.02 M トリス-塩酸緩衝液、pH = 7.2) 中にて 90 分間振とうした。

(6) Tween 20 添加トリス緩衝生理食塩水 (TBS-T; 1 (w/v) % Tween 20、0.13 M 塩化ナトリウム、0.02 M トリス-塩酸緩衝液、pH = 7.2) で 5 分間振とうする操作を 3 回繰り返した後、1 次抗体 (トロポエラスチン検出用: Rabbit Anti-Elastin polyclonal Antibody、Unconjugated (バイオス (Bioss) 社)、β-アクチン検出用: β-actin (13E5) Rabbit mAb (セルシグナリングテクノロジー (Cell signaling technology) 社) 反応溶液に一夜浸漬した。

(7) TBS-T で 20 分間振とうする操作を 3 回繰り返した後、2 次抗体 (Amersham ECL Rabbit IgG、Horseradish Peroxidase linked whole antibody (ジーイーヘルスケア (GE Healthcare) 社) 反応溶液中で 1 時間振とうした。

(8) TBS-T で 10 分間振とうする操作を 3 回繰り返した後、化学発光試薬 (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (ジーイーヘルスケア (GE Healthcare) 社) を添加し、高感度化学発光標識画像入力装置 (LAS-1000 Plus、富士フイルム株式会社) にて画像を解析した。

【0058】

ウェスタンブロット法による解析の結果、60 kDa 付近にトロポエラスチンのバンドが検出された。トロポエラスチンタンパク質の発現量は、β-アクチンタンパク質の発現量に対する量として求め、対照における前記発現量を 1 とした場合の相対値により、表 3 および図 3 に示した。

【0059】

【表 3】

試料	トロポエラスチン発現量 (Tropoelastin/β-actin) (相対値±S.D.)
対照	1
CDi-TriS·Na ₄	1.53±0.703
L-CS	0.429±0.641
H-CS	0.76±0.76

【0060】

表 3 および図 3 に示されるように、CDi-TriS·Na₄ を 24 時間作用させた後において、トロポエラスチンタンパク質の発現が対照の約 1.5 倍に増加したことが認められた。一方、L-CS、H-CS を 24 時間作用させた後には、トロポエラスチンタンパク質の発現の増加は認められなかった。

【0061】

[試験例 3] トロポエラスチンタンパク質発現に対する CDi-TriS·Na₄ の影響の評価

培養した正常ヒト皮膚線維芽細胞におけるトロポエラスチンタンパク質発現に対する CDi-TriS·Na₄ の影響について、CDi-TriS·Na₄ のインキュベーション時間を 48 時間とした他は、上記試験例 2 と同様にタンパク質を回収してウェスタンブロット法により解析し、CDi-TriS·Na₄ を 48 時間作用させた後におけるトロ

10

20

30

40

50

ポエラスチンタンパク質発現に対する影響を評価した。

結果は、 β -アクチンタンパク質の発現量に対するトロポエラスチンタンパク質の発現量について、対照における前記発現量を1とした場合の相対値により、表4および図4に示した。

【0062】

【表4】

試料	トロポエラスチン発現量 (Tropoelastin/ β -actin) (相対値 $\pm$ S.D.)
対照	1
CDi-TriS $\cdot$ Na ₄	3.96 $\pm$ 1.13

10

【0063】

表4および図4より、CDi-TriS $\cdot$ Na₄を48時間作用させた後において、トロポエラスチンタンパク質の発現は対照の約4倍にまで増加することが認められた。

【0064】

[試験例4] エラスチン産生に対するCDi-TriS $\cdot$ Na₄の影響の評価

(1) 培養した正常ヒト皮膚線維芽細胞(培地3mL;細胞数=5 $\times$ 10⁴個/mL)にCDi-TriS $\cdot$ Na₄水溶液(30 μ g/mL)30 μ Lを添加(CDi-TriS $\cdot$ Na₄の最終濃度=0.3 μ g/mL)し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂にて24時間インキュベートした後、培地を除去し、3mLのPBSで洗浄した。なお、CDi-TriS $\cdot$ Na₄を添加せずに同様に処理したものを対照とした。

20

(2) PBSを除去し、タンパク質抽出用溶液(2(w/v)%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、10(v/v)%グリセロール、10mMオルトバナジン酸ナトリウム、6.27mMトリス-塩酸緩衝液、pH=6.8)400 μ Lを添加し、タンパク質を抽出した。

(3) ローリー法によりタンパク質量を定量し、対照およびCDi-TriS $\cdot$ Na₄添加群のタンパク質抽出液について、タンパク質含有量が同量になるように調整して、以下の通り、ウェスタンブロット法により、エラスチンタンパク質を検出、定量した。

(4) (3)でタンパク質含有量を調整した両群のタンパク質抽出液と、SDS-PAGEサンプルバッファー(2.5mMトリス-塩酸緩衝液(pH=6.8)、2(w/v)%SDS、10(v/v)%グリセロール、1(w/v)%ブロモフェノールブルー)を1:1で混和し、95 $^{\circ}$ Cで3分間加温した後、7(w/v)%ポリアクリルアミドゲル(エラスチン検出用)または10(w/v)%ポリアクリルアミドゲル(β -アクチン検出用)を用いて、ミニプロテインTetraセル(バイオ-ラッド(BIO-RAD)社)にてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った(泳動用バッファー:2.5mMトリス、190mMグリシン、0.1(w/v)%SDS水溶液)。

30

(5) SDS-PAGEにより分離したタンパク質をゲルからポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜(Amersham Hybond-P、ポアサイズ=0.45 μ m、ジ-イーヘルスケア(GE Healthcare)社)へ転写(転写装置:criterionトランスブロットセル(バイオ-ラッド(BIO-RAD)社)、転写用バッファー:2.5mMトリス、190mMグリシン、15(v/v)%メタノール水溶液、転写条件:40分間、100V、3A)し、ブロッキングバッファー(5(w/v)%スキムミルク、1(w/v)%Tween20、0.13M塩化ナトリウム、0.02Mトリス-塩酸緩衝液、pH=7.2)中にて60分間振とうした。

40

(6) Tween20添加トリス緩衝生理食塩水(TBS-T;1(w/v)%Tween20、0.13M塩化ナトリウム、0.02Mトリス-塩酸緩衝液、pH=7.2)で15分間振とうする操作を3回繰り返した後、1次抗体(エラスチン検出用:Rabbit Anti-Elastin polyclonal Antibody、Unconjugated(バイオス(Bioss)社)、 β -アクチン検出用: β -actin(13E5)Rabbit mAb(セルシグナリングテクノロジー(Cell sig

50

nal ing technology) 社) 反応溶液に一夜浸漬した。

(7) TBS - T で 15 分間振とうする操作を 3 回繰り返した後、2 次抗体 (Amersham ECL Rabbit IgG、Horseradish Peroxidase linked whole antibody (ジーイーヘルスケア (GE Healthcare) 社) 反応溶液中で 1 時間振とうした。

(8) TBS - T で 10 分間振とうする操作を 3 回繰り返した後、化学発光試薬 (ECL Prime Western Blotting Detection (BIO-RAD 社) を添加し、高感度化学発光標識画像入力装置 (LAS - 1000 Plus、富士フイルム株式会社) にて画像を解析した。

【0065】

10

ウェスタンブロット法による解析の結果、75 kDa 付近にエラスチンのバンドを検出した。エラスチンの産生量は、 β -アクチンタンパク質の発現量に対する量として求め、対照における前記産生量を 1 とした場合の相対値により、表 5 および図 5 に示した。

【0066】

【表 5】

試料	エラスチン産生量 (Elastin/ β -actin) (相対値 $\pm$ S.D.)
対 照	1
CDi-TriS $\cdot$ Na ₄	1.4 $\pm$ 0.13

【0067】

20

表 5 および図 5 に示されるように、CDi-TriS $\cdot$ Na₄ を 24 時間作用させた後において、エラスチンの産生が対照の約 1.4 倍に増加したことが認められた。

【0068】

【実施例 1】水中油型乳剤性ローション剤

表 6 に示す処方に従い、水中油型乳剤性ローション剤を調製する。すなわち、表 6 中のスクワラン以下、モノステアリン酸グリセリンまでの成分を容器に秤量し、約 75℃ に加温し、攪拌溶解させて油相とする。別容器に、表 6 中のカルボキシビニルポリマー以下、精製水までの成分を秤量し、約 75℃ に加温し、攪拌溶解させて水相とする。前記油相に前記水相を加え、ホモミキサーで均一に乳化した後、室温まで冷却して水中油型乳剤性ローション剤を得る。

30

【0069】

【表 6】

成 分	添加量 (重量%)
スクワラン	4.00
セタノール	0.80
還元ラノリン	1.00
ステアリン酸ポリオキシル 40	2.50
モノステアリン酸グリセリン	1.50
カルボキシビニルポリマー	0.15
ジイソプロパノールアミン	0.15
グリセリン	5.00
コンドロイチン二糖トリ硫酸エステル四ナトリウム*	0.30
精製水	84.60

40

*；コンドロイチン二糖のグルクロン酸残基の 2 位、N-アセチルガラクトサミン残基の 4 位および 6 位に硫酸基が結合したトリ硫酸エステルの四ナトリウム塩 (「Chondroitin disaccharide Δ Di-triS, sodium salt」(カタログ No. C3207)、デキストラ ラボラトリーズ (DEXTRA LABORATORIES) 社)

【産業上の利用可能性】

【0070】

以上詳述したように、本発明により、トロポエラスチン遺伝子の発現を増加させて、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンタンパク質の発現を増加させることができ、特

50

に皮膚真皮の細胞外マトリックスにおいて、エラスチン線維の生成を促進させ得るトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤を提供することができる。

本発明のトロポエラスチン発現促進剤およびエラスチン産生促進剤は、エラスチンの減少、変性による皮膚の老化の防止または改善に有用で、皮膚外用医薬品、皮膚外用医薬部外品または皮膚用化粧品として提供することができる。

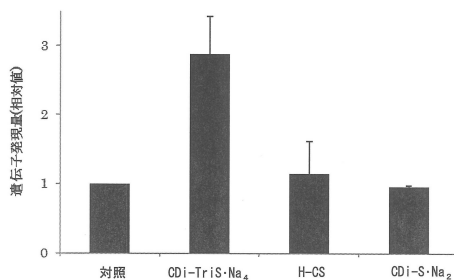
さらに、本発明により、皮膚シートの生成等、再生医療分野において有用な皮膚線維芽細胞等のトロポエラスチンの発現促進方法、およびエラスチン産生の促進方法を提供することができる。

【 0 0 7 1 】

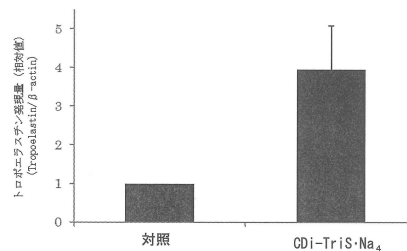
本出願は、わが国で出願された特願 2 0 1 4 - 0 3 8 4 7 5 を基礎とするものであり、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

10

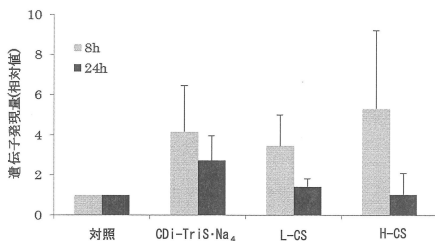
【 図 1 】



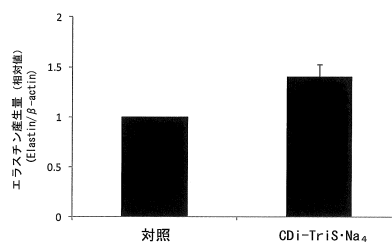
【 図 4 】



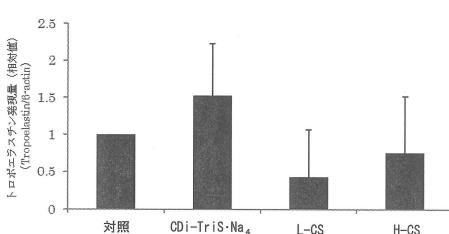
【 図 2 】



【 図 5 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01) C 1 2 Q 1/6851

(74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(74)代理人 100158724
弁理士 竹井 増美

(72)発明者 徳留 嘉寛
埼玉県坂戸市けやき台 1 - 1 学校法人城西大学内

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 特表 2 0 0 3 - 5 0 3 4 3 6 (J P , A)
特開 2 0 0 6 - 1 4 3 6 0 5 (J P , A)
日本香粧品学会誌(2015.03.31),Vol.39,No.1,p.1-6
Biol.Pharm.Bull.(2004),Vol.27,No.1,p.47-51

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9
A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0
R e g i s t r y / C A p l u s / M E D L I N E / K O S M E T / B I O S I S (S T N)