(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
2016 年 12 月 8 日(08.12.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/194760 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 8/34 (2006.01)	*A61K 31/702* (2006.01)
A61K 8/39 (2006.01)	*A61K 31/715* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)	*A61K 31/726* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)	*A61K 38/00* (2006.01)
A61K 8/65 (2006.01)	*A61K 38/17* (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)	*A61K 45/00* (2006.01)
A61K 31/047 (2006.01)	*A61P 17/00* (2006.01)
A61K 31/7004 (2006.01)	*A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)	*A61Q 19/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/065560

(22) 国際出願日: 2016 年 5 月 26 日(26.05.2016)

(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:
特願 2015-109656 2015 年 5 月 29 日(29.05.2015) JP
特願 2015-234603 2015 年 12 月 1 日(01.12.2015) JP

(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: 津田 智博(TSUDA Tomohiro); 〒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). 湯本 真代(YUMOTO Masayo); 〒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: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル） ９階 創英国際特許法律事務所 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

(54) **Title**: COSMETIC METHOD AND DERMATOLOGICAL TOPICAL AGENT FOR USE THEREIN, MIGRATION IMPARTING AGENT, AND METHOD FOR SCREENING COMPONENTS FOR USE IN COSMETIC METHOD FOR IMPROVING SKIN STATE

(54) 発明の名称 : 美容方法およびそれに用いる皮膚外用剤、並びに遊走付与剤、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法

(57) **Abstract**: The present invention pertains to a cosmetic method for applying a migration imparting agent for adipose-derived stem cells to the skin and thereby causing adipose-derived stem cells to migrate to the dermis to improve the skin state. The present invention also pertains to a dermatological topical agent for use in the abovementioned cosmetic method, and is characterized by containing a migration imparting agent which is applied to the skin to cause adipose-derived stem cells to migrate to the dermis. The present invention further pertains to a migration imparting agent for adipose-derived stem cells which contains a polyol compound and at least one hydrophilic biological substance. The present invention also pertains to a method for screening components for use in a cosmetic method for improving the skin state, the screening method comprising a step for evaluating the migration activity of adipose-derived stem cells using a formulated medium containing a sample.

(57) 要約: 本発明は、脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を皮膚に適用することにより、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させ、皮膚状態を向上させる美容方法に関する。本発明はまた、上記美容方法に用いられる皮膚外用剤であって、皮膚への適用によって脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させる遊走付与剤を含有することを特徴とする皮膚外用剤にも関する。本発明はさらに、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種を含有する脂肪由来幹細胞の遊走付与剤にも関する。本発明はさらにまた、試料を含有する調製培地を用いて、脂肪由来幹細胞の遊走活性を評価する工程を包含する、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法にも関する。

WO 2016/194760 A1

明　細　書

発明の名称 ：

美容方法およびそれに用いる皮膚外用剤、並びに遊走付与剤、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、皮膚状態を向上させる美容方法と、それに用いる皮膚外用剤、並びに遊走付与剤、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、幹細胞や幹細胞から派生した細胞を用いて、人体の損傷した組織や臓器を修復したり再生したりする再生医療に対する期待が高まっており、幹細胞に関する研究が急速に進められている。上記幹細胞とは、必要に応じて多様な種類に分化する能力（多分化能）と、細胞分裂後も多分化能を維持する能力（自己複製能）とを併せ持つ細胞で、ＥＳ細胞（胚性幹細胞）、ｉＰＳ細胞（人工多能性幹細胞）、体性幹細胞（成体幹細胞）が知られている。

[0003] これらの幹細胞のうち、ＥＳ細胞は受精卵を用いることから、倫理的な問題等の克服すべき課題が多い。また、ｉＰＳ細胞は、人の体細胞を幹細胞に初期化して用いるものであるが、まだまだ多くの臨床的研究を重ねる必要がある。

[0004] これに対し、体性幹細胞は、生体に備わる体性幹細胞本来の機能を利用して再生医療に役立てることができる可能性が高く、他の幹細胞に比べて実用的な研究が最も進んでいる。そのような研究の成果として、例えば、特許文献１には、ボダイジュ抽出物やボタンピ抽出物等の特定物質を間葉系幹細胞に対して誘引剤として用いることが提案されている。この提案によれば、血流によって体内を循環する血液内の間葉系幹細胞を、特定組織に誘引して集積させることができる可能性を示している。

[0005] また、特許文献２には、落葉中低木亜高木であるアムラ抽出物等の特定物

質が、間葉系幹細胞の安定化に寄与するＰＤＧＦ－ＢＢ（血小板由来成長因子）の産生亢進に有効であり、これを用いて幹細胞の安定化を図ることが提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１１－２５１９２５号公報

特許文献2：特開２０１３－１６６９号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] これらの提案は、再生医療につながるものであるが、肌におけるアンチエイジング効果といった美容上の効果を期待させるものでもある。しかし、上記特許文献１において、対象とする間葉系幹細胞は、主として血液中に含まれる骨髄由来の間葉系幹細胞であって真皮層から遠く離れた存在であり、また、上記特許文献２においては、特定物質が、幹細胞の安定化に寄与するＰＤＧＦ－ＢＢの産生亢進に有効であることは記載されているものの、それが幹細胞に直接影響を与えるものではないことから、美容上の効果が得られるか否か不明である。

[0008] 本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、体性幹細胞のなかでも、特に、真皮層のすぐ下の脂肪層に存在する脂肪由来幹細胞を利用した美容方法およびそれに用いる皮膚用外用剤、並びに遊走付与剤、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法の提供を、その目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上記の目的を達成するため、本発明は、脂肪由来幹細胞の遊走付与剤（以下、単に「遊走付与剤」ともいう）を皮膚に適用することにより、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させ、皮膚状態を向上させる美容方法を第１の要旨とする。

[0010] また、本発明は、そのなかでも、特に、上記遊走付与剤が、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種である美容方法を第２の要旨とする。

[0011] そして、本発明は、そのなかでも、特に、上記ポリオール化合物が、炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールの少なくとも一種である美容方法を第３の要旨とし、上記炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールが、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、１，２－ペンタンジオール、１，２－ヘキサンジオール、エチレングリコールおよびジエチレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である美容方法を第４の要旨とする。

[0012] また、本発明は、特に、上記親水性生体物質が、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類およびポリペプチド類からなる群から選ばれた少なくとも一種である美容方法を第５の要旨とし、上記オリゴペプチド類が、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種である美容方法を第６の要旨とする。

また、本発明は、特に、上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅、カプロオイルテトラペプチド－３、及びジプロピレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である美容方法を第７の要旨とし、上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせである美容方法を第８の要旨とする。

[0013] さらに、本発明は、上記第１～第８のいずれかの要旨である美容方法に用いられる皮膚外用剤であって、皮膚への適用によって脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させる遊走付与剤を含有する皮膚外用剤を第９の要旨とする。

[0014] そして、本発明は、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種を含有する脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を第１０の要旨とする。

[0015] また、本発明は、試料を含有する調製培地を用いて、脂肪由来幹細胞の遊

走活性を評価する工程を包含する、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法を第１１の要旨とする。

[0016] さらに、本発明は、そのなかでも、皮膚状態が非創傷皮膚の状態である、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法を第１２の要旨とする。

[0017] そして、本発明は、真皮層において、線維芽細胞と脂肪由来幹細胞とを共存させることにより、皮膚状態を向上させる美容方法を第１３の要旨とする。

[0018] また、本発明は、そのなかでも、脂肪由来幹細胞を遊走、注入、または浸透させることにより、線維芽細胞と脂肪由来幹細胞とを共存させる美容方法を第１４の要旨とする。

[0019] すなわち、本発明の美容方法は、体性幹細胞のなかでも、特に、脂肪由来幹細胞が、真皮層のすぐ下の脂肪層中に多く存在することから、これに働きかけて真皮層における肌状態の向上に寄与させることができないか、という着想から生まれたもので、特定の遊走付与剤を皮膚に適用することによって、脂肪層中の幹細胞を真皮層に遊走させ、真皮層中における脂肪由来幹細胞を増殖または活性化して、皮膚状態を向上させるようにしたものである。

[0020] より詳しく説明すると、一般に、幹細胞は、生体内で組織に損傷等が生じた場合、その損傷した部位に移動してダメージを受けた細胞に分化し、もしくはダメージを抑制して、これを修復する作用を果たすことが知られている。このように、細胞が特定の部位に向かって移動する動作のことを「遊走（もしくはホーミング）」という。本発明者らは、このような幹細胞の遊走という特性に注目し、皮膚に、幹細胞を遊走させるか遊走を促進する作用を有する物質である遊走付与剤を適用すれば、真皮層の下の脂肪層から幹細胞を遊走させることができ、この脂肪由来幹細胞を利用して、皮膚に対する美容効果を高めることができるのではないか、との着想を得て、一連の研究を重ねた結果、本発明に到達したのである。

[0021] 上述した本発明は、以下の各発明と捉えることもできる。

［１－１］脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を含有する、皮膚状態の向上用皮膚外用剤。

［１－２］皮膚状態の向上が、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させることに基づくものである、［１－１］記載の皮膚外用剤。

［１－３］上記遊走付与剤が、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種である、［１－１］又は［１－２］に記載の皮膚外用剤。

［１－４］上記ポリオール化合物が、炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールの少なくとも一種である、［１－３］に記載の皮膚外用剤。

［１－５］上記炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールが、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、１，２－ペンタンジオール、１，２－ヘキサンジオール、エチレングリコールおよびジエチレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である、［１－４］に記載の皮膚外用剤。

［１－６］上記親水性生体物質が、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類およびポリペプチド類からなる群から選ばれた少なくとも一種である、［１－３］～［１－５］のいずれかに記載の皮膚外用剤。

［１－７］上記オリゴペプチド類が、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種である、［１－６］に記載の皮膚外用剤。

［１－８］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅、カプロオイルテトラペプチド－３、及びジプロピレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である、［１－１］～［１－７］のいずれかに記載の皮膚外用剤。

［１－９］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせである、［１－１］～［１－８］

のいずれかに記載の皮膚外用剤。

［１－１０］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３を重量基準で１：０．０１～１０：０．０１～１０の割合で含有する、［１－９］に記載の皮膚外用剤。

[0022] 本発明はまた、以下の各発明と捉えることもできる。

［２－１］脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を含有し、皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－２］皮膚状態の向上が、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させることに基づくものである、［２－１］記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－３］上記遊走付与剤が、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種である、［２－１］又は［２－２］に記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－４］上記ポリオール化合物が、炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールの少なくとも一種である、［２－３］に記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－５］上記炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールが、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、１，２－ペンタンジオール、１，２－ヘキサンジオール、エチレングリコールおよびジエチレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である、［２－４］に記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－６］上記親水性生体物質が、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類およびポリペプチド類からなる群から選ばれた少なくとも一種である、［２－３］～［２－５］のいずれかに記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－７］上記オリゴペプチド類が、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種

である、［２－６］に記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－８］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅、カプロオイルテトラペプチド－３、及びジプロピレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である、［２－１］～［２－７］のいずれかに記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－９］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせである、［２－１］～［２－８］のいずれかに記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

［２－１０］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３を重量基準で１：０．０１～１０：０．０１～１０の割合で含有する、［２－９］に記載の皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤。

[0023] 本発明はまた、以下の各発明と捉えることもできる。

［３－１］皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤の製造における、脂肪由来幹細胞の遊走付与剤の使用。

［３－２］皮膚状態の向上が、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させることに基づくものである、［３－１］記載の使用。

［３－３］上記遊走付与剤が、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種である、［３－１］又は［３－２］に記載の使用。

［３－４］上記ポリオール化合物が、炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールの少なくとも一種である、［３－３］に記載の使用。

［３－５］上記炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールが、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、１，２－ペンタンジオール、１，２－ヘキサンジオール、エチレングリコールおよびジエチレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である、［３－４］に記載の使用。

［３－６］上記親水性生体物質が、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類およびポリペプチド類からなる群から選ばれた少なくとも一種である、［３－３］～［３－５］のいずれかに記載の使用。

［３－７］上記オリゴペプチド類が、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種である、［３－６］に記載の使用。

［３－８］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅、カプロオイルテトラペプチド－３、及びジプロピレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である、［３－１］～［３－７］のいずれかに記載の使用。

［３－９］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせである、［３－１］～［３－８］のいずれかに記載の使用。

［３－１０］上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３を重量基準で１：０．０１～１０：０．０１～１０の割合で含有する、［３－９］に記載の使用。

[0024] 本発明はまた、以下の各発明と捉えることもできる。

［４－１］ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種を含有する、脂肪由来幹細胞の遊走に、又は脂肪由来幹細胞の遊走の促進に使用するための剤。

［４－２］脂肪由来幹細胞の遊走に、又は脂肪由来幹細胞の遊走の促進に使用するための剤の製造におけるポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種の使用。

[0025] 本発明はまた、以下の各発明と捉えることもできる。

［５－１］非創傷皮膚の状態を向上させる成分のスクリーニング方法であって、

試料を含有する調製培地および試料を含有しない標準培地をそれぞれ用意

する工程と、

上記調製培地または上記標準培地を用いて、トランスウェルにおいて脂肪由来幹細胞を所定期間培養する工程と、

調製培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の遊走活性が、標準培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の遊走活性よりも高いことを指標として、非創傷皮膚の状態を向上させる成分を選抜する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

［５－２］非創傷皮膚の状態を向上させる成分のスクリーニング方法であって、

標識した脂肪由来幹細胞層、真皮モデル層及び表皮角化細胞層をこの順に積層した三次元の皮膚モデルを用意する工程と、

上記皮膚モデルに試料を適用し、所定期間培養する工程と、

培養後の皮膚モデルにおいて、標識を利用して真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数を測定する工程と、

真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数を指標として、非創傷皮膚の状態を向上させる成分を選抜する工程と、

を含む、スクリーニング方法。

発明の効果

[0026] 本発明の美容方法によれば、皮膚に、脂肪由来幹細胞を遊走させるか遊走を促進する作用を有する物質である遊走付与剤を適用することにより、脂肪層または真皮層にある脂肪由来幹細胞を増殖または活性化させることができる。そして、脂肪層において活性化した脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させて、真皮層内において幹細胞を、常態よりも多く存在させることができる。遊走した脂肪由来幹細胞は、それ自身が真皮層における細胞外基質（以下、「ＥＣＭ」と略記する場合がある）の構築に関連する因子を分泌するとともに、真皮層の線維芽細胞を活性化させる。例えば真皮層における線維芽細胞等のダメージが迅速に修復され、あるいは線維芽細胞が賦活化される。したがって、皮膚状態を損なう細胞の老化や損傷が改善され、皮膚のハリや弾力

が良好に保たれることとなり、優れた美容効果が得られる。

[0027] なお、本発明の美容方法のなかでも、特に、上記遊走付与剤が、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種である場合には、とりわけ、脂肪由来幹細胞に対する遊走付与効果（細胞を遊走させる効果および遊走を促進する効果の少なくとも一方の効果）が高く、優れた美容効果を得ることができる。

[0028] また、上記ポリオール化合物が、特に、炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールの少なくとも一種である場合、そして、そのポリオールが、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、１，２－ペンタンジオール、１，２－ヘキサンジオール、エチレングリコールおよびジエチレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である場合、とりわけ優れた遊走付与効果が得られる。

[0029] さらに、上記親水性生体物質が、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類およびポリペプチド類からなる群から選ばれた少なくとも一種である場合、あるいは上記オリゴペプチド類が、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種である場合、より一層優れた遊走付与効果が得られ、好適である。

[0030] そして、本発明の皮膚外用剤によれば、これを皮膚に適用することで、皮膚内部の脂肪層の脂肪由来幹細胞に遊走付与作用を及ぼし、これによって幹細胞の皮膚表面側、すなわち真皮層への移動が可能になり、真皮層中で幹細胞が増殖または活性化することが可能となる。そして、これらの幹細胞の作用によって、皮膚にハリや弾力を与える線維芽細胞を賦活化する等して、皮膚状態を向上させることができる。

[0031] また、本発明の遊走付与剤は、上記皮膚外用剤等に好適に用いることができる。

[0032] さらに、本発明の、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のス

クリーニング方法によれば、皮膚状態の向上に寄与し得る成分を効率よくスクリーニングすることができる。そして、上記皮膚状態が非創傷皮膚の状態である場合等に好適に用いることができる。

[0033] なお、本発明の、真皮層において、線維芽細胞と脂肪由来幹細胞とを共存させる美容方法は、必ずしも上記のような遊走付与剤を適用する必要はなく、例えば脂肪由来幹細胞を直接真皮層に注入する、浸透させる等の作業によって真皮層内に脂肪由来幹細胞を共存させることで、上記遊走付与剤を適用した場合と同様、優れた皮膚状態の向上効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]スキャフォールド遊走試験に用いられる装置の説明図である。

[図2]実施例６のスキャフォールド切片の蛍光顕微鏡写真である。

[図3]比較例２のスキャフォールド切片の蛍光顕微鏡写真である。

[図4]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞のＩ型コラーゲン産生量を比較したグラフ図である。

[図5]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞のＭＭＰ１産生量を比較したグラフ図である。

[図6]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞のＭＭＰ１活性を比較したグラフ図である。

[図7]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞のヒアルロン酸産生量を比較したグラフ図である。

[図8]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞のＴＩＭＰ１産生量を比較したグラフ図である。

[図9]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞との共存がヒト真皮線維芽細胞のＴＩＭＰ１産生量に与える影響を示したグラフ図である。

[図10]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞との共存がヒト真皮線維芽細胞のヒアルロン酸産生量に与える影響を示したグラフ図である。

[図11]ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞との共存がヒト真皮線維芽細胞のＩ型コラーゲン産生量に与える影響を示したグラフ図である。

発明を実施するための形態

[0035] つぎに、本発明の実施の形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施の形態に限定するものではない。

[0036] 一つの実施の形態において、本発明の美容方法は、遊走付与剤を皮膚に適用することにより、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させ、皮膚状態を向上させるものである。本発明の美容方法は、純粋な美容目的の態様（ヒトに対する医療行為を含まない態様）で実施することもできる。

[0037] 上記脂肪由来幹細胞とは、すでに述べたとおり、皮膚の真皮層の下の、いわゆる皮下組織にある脂肪層に豊富に存在する幹細胞であり、他の幹細胞と同様、自己複製能と多分化能とを備えている。特に、脂肪由来幹細胞は、同じ体性幹細胞である骨髄由来幹細胞に比べて高い多分化能を備えるという特長を有している。なお、本明細書において、脂肪由来幹細胞は、通常、哺乳動物の脂肪由来幹細胞であり、好ましくはヒト、ブタ、ウシ、イヌ、またはネコの脂肪由来幹細胞であり、特に好ましくはヒトの脂肪由来幹細胞を意味する。

[0038] そして、本発明に用いられる遊走付与剤とは、この遊走付与剤が存在するところに脂肪由来幹細胞を遊走させる作用と、脂肪由来幹細胞そのものの遊走を促進する作用の少なくとも一方の作用を有する物質をいい、上記作用を有するものであれば、特に制限はない。例えば、植物由来物質、動物由来物質（非植物由来物質）、合成品等があげられ、そのなかでも、特に、ポリオール化合物や親水性生体物質が好適に用いられる。そして、どちらかといえば、非植物由来のものが好適に用いられる。なお、これらの遊走付与剤は、単独で用いても、種類の異なるものを二種以上併用してもよい。

[0039] 上記ポリオール化合物としては、例えば、炭素数３～６（Ｃ３～Ｃ６）のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールがあげられる。より具体的には、例えば、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、１，４－ブタンジオール、１，３－ブタンジオール、プロピレングリコール、イソプロピレングリコール、１，３－プロパ

ンジオール、イソプレングリコール、１，２－ペンタンジオール、ヘキシレングリコール、１，２－ヘキサンジオール、１，６－ヘキサンジオール、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、キシリトール、ガラクチトール、ソルビトール、マンニトール、エチレングリコールおよびジエチレングリコール等があげられ、そのなかでも、ジプロピレングリコールが好適に用いられる。これらのポリオール化合物は、単独で用いても二種以上を併用してもよい。

[0040] 本発明において、遊走付与剤として上記ポリオール化合物を用い、これを皮膚外用剤として調製する場合、上記ポリオール化合物の含有量は、本発明の効果を奏する観点から皮膚外用剤の全重量に対して、例えば、０．０００００１重量％以上が好ましく、０．００００１重量％以上がより好ましく、０．０００１重量％以上がより好ましく、０．００１重量％以上がさらに好ましい。また、使用時のべたつき等の不快感を低減する観点から皮膚外用剤の全重量に対して、例えば、２５重量％以下が好ましく、１５重量％以下がより好ましく、１０重量％以下がさらに好ましく、５重量％以下が最も好ましい。

[0041] また、本発明において、遊走付与剤として用いることのできる親水性生体物質としては、例えば、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類、ポリペプチド類等があげられ、なかでも、コラーゲン類およびオリゴペプチド類が、とりわけ好適である。これらの親水性生体物質も、単独で用いても二種以上を併用してもよい。

[0042] 上記コラーゲン類は、原料（コラーゲン）の由来は特に限定されないが、安定的に供給可能であることから、刺胞動物（例えば、クラゲ）、棘皮動物（例えば、ナマコ）、魚類、牛、豚、鶏等に由来するものが好適である。また、本発明におけるコラーゲン類には、コラーゲン（魚類等に由来する天然コラーゲン）を酵素（例えば、コラゲナーゼ、ペプシン、トリプシン等のタンパク質加水分解酵素）および／または酸もしくはアルカリで分解し低分子化した低分子コラーゲンも含まれる。

[0043] このような低分子コラーゲンの具体例としては、例えば、天然コラーゲンに水を加えて加熱または加圧加熱することによってコラーゲンを抽出し、このコラーゲンをタンパク質加水分解酵素で処理して低分子コラーゲンにしたものがあげられる。酵素の種類は、特に限定されるものではなく、例えば、中性プロテアーゼ、アルカリ性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、あるいはそれらを含有する酵素製剤等を用いることができる。得られた酵素分解物を逆浸透膜処理して濃縮液を回収する。濃縮液（コラーゲンペプチド）は、そのまま用いてもよく、適宜乾燥して粉末化してから用いてもよい。

[0044] また、コラーゲンペプチドの出発原料として、市販のコラーゲン（例えば、新田ゼラチン社製「マリンジェンＳＰ－０３（ＰＦ）」）を用いることもできる。あるいは、市販の低分子コラーゲンを用いることもできる。市販品として、成和化成社製の「プロモイスＷ－３２」、「プロモイスＷ－３２ＬＳ」、「プロモイスＷ－３２ＮＯ」、「プロモイスＷ－３２Ｒ」（以上、重量平均分子量４００）、成和化成社製の「プロモイスＷ－５２」、「プロモイスＷ－５２Ｐ」、「プロモイスＷ－５２Ｑ」（以上、重量平均分子量２０００）、一丸ファルコス社製の「ファルコニックスＣＴＰ－Ｆ（ＢＧ）」（重量平均分子量５０００）、ニッピ社製の「ニッピコラーゲン－ＡＦＤ」、「ニッピコラーゲン－ＦＣＰ」、「ニッピコラーゲン－ＦＣＰ－Ｇ」（重量平均分子量３０００～５０００）、Ｊａｖｅｎｅｃｈ社製の「ジェリーフィッシュコラーゲン」等があげられる。低分子コラーゲンの重量平均分子量は、約２００～２００００が好ましく、約１０００～１００００がより好ましく、約２０００～５０００がさらに好ましい。

[0045] 本発明において、遊走付与剤として上記コラーゲン類を用い、これを皮膚外用剤として調製する場合、上記コラーゲン類の含有量は、皮膚外用剤の全重量に対して、０．００００１重量％以上が好ましく、０．０００１重量％以上がより好ましく、０．００１重量％以上がさらにより好ましい。また、使用感の低下を抑制する観点から皮膚外用剤の全重量に対して、例えば、２０重量％以下が好ましく、１０重量％以下がより好ましく、５重量％以下が

さらに好ましく、３重量％以下が最も好ましい。

[0046] また、本発明において、遊走付与剤としてオリゴペプチド類を用いる場合は、そのなかでも、特に、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種を用いることが好適であり、とりわけ、トリペプチド類、テトラペプチド類、それらの誘導体を用いることがより好ましい。なかでも、グリシン、ヒスチジン、リシン、トレオニン、およびセリンから選択されるアミノ酸で構成されるオリゴペプチド類が好ましい。そして、上記オリゴペプチド類の誘導体としては、特に、末端のアミノ基またはカルボキシル基がさらに変換された、例えば末端のカルボキシル基がエステル化されたオリゴペプチドや、金属と錯形成したオリゴペプチド等が好適に用いられる。より具体的には、トリペプチド－１－銅（グリシン、ヒスチジン、リシンで構成されるトリペプチドの銅錯化合物）、カプロオイルテトラペプチド－３（リシン、トレオニン、セリンで構成されるテトラペプチドとカプロン酸との反応生成物）等が好適に用いられる。

[0047] 上記オリゴペプチド類も、単独で用いても二種以上を併用してもよい。

[0048] 本発明において、遊走付与剤として上記オリゴペプチド類を用い、これを皮膚外用剤として調製する場合、上記オリゴペプチド類の含有量は、皮膚外用剤の全重量に対して、０．０００００１重量％以上とすることができ、０．００００１重量％以上が好ましく、０．０００１重量％以上がより好ましく、０．００１重量％以上がさらにより好ましい。また、皮膚外用剤の全重量に対して、例えば、１重量％以下が好ましく、０．５重量％以下がより好ましく、０．３重量％以下がさらに好ましく、０．１重量％以下が最も好ましい。

[0049] 本発明に用いられる遊走付与剤の更なる具体例として、コラーゲン及びオリゴペプチド類の誘導体の組み合わせが挙げられる。コラーゲン及びオリゴペプチド類の組み合わせとしては、コラーゲン、脂肪酸（例えば、カプロン酸、パルミチン酸）と反応して誘導体形成したオリゴペプチド、及び金属と

錯形成したオリゴペプチドの組み合わせが好ましく、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせがより好ましく、クラゲ由来コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせが更に好ましい。コラーゲン（例えば、クラゲ由来コラーゲン）、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせにおける各成分の混合比は特に制限されるものではないが、１：０．０１～１０：０．０１～１０（重量基準）であることが好ましく、１:０．０３～５：０．０３～５（重量基準）であることがより好ましく、１：０．０５～３：０．０５～３（重量基準）であることが更に好ましい。

[0050] そして、上記遊走付与剤を、皮膚に適用する方法としては、例えば、上記遊走付与剤を皮膚外用剤（化粧料を含む）の成分として含有させ、その皮膚外用剤を、剤形に応じた形で、皮膚に適用させることが好適である。

[0051] このような皮膚外用剤としては、精製水や純水の水溶液や、低級アルコール、多価アルコール等と水との混合溶液の形で用いることができる。また、油性成分と水性成分とを乳化したクリーム状の形にすることができる。さらに、ゼリー状にしたり、固形化して所定形状に賦形したり、顆粒状や粉末状にしたりすることもできる。

[0052] そして、固形化もしくは顆粒状、粉末状にしたものは、使用時に水等で溶解して皮膚に塗布することが好ましい。一方、溶液状、乳液状、クリーム状、ローション状、ペースト状、ムース状、ジェル状のものは、それをそのまま皮膚に塗布することができる。さらに、エアゾール状、スプレー状のものは、噴射型容器からこれを皮膚に向かって噴射して用いることができる。

[0053] また、液状やクリーム状等に調製された遊走付与剤含有組成物を、別に用意したシート基材に担持させたものであってもよい。さらに、上記遊走付与剤含有組成物自体をシート状に成形したものであってもよい。そして、このようにして得られるシート状の皮膚外用剤を皮膚に貼付することにより、所定時間継続的に、遊走付与剤を皮膚に供給することができる。

[0054] 上記皮膚外用剤において、上記遊走付与剤とともに用いることのできる任

意成分としては、皮膚に適用される美容用組成物の成分として一般に用いられる、各種の成分をあげることができる。

[0055] 例えば、アニオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、シリコーンオイル、ワックス、アルコール類、天然抽出物、蛋白質加水分解物、殺菌剤、抗炎症剤、防腐剤、抵酸化剤、紫外線吸収剤、ｐＨ調整剤、キレート剤、保湿剤、乳化剤、ビタミン剤、各種美白成分、顔料、染料、香料等があげられる。

[0056] 本発明の皮膚外用剤によれば、従来知られていなかった、真皮層の下にある脂肪由来幹細胞に対し遊走付与効果を奏する、特殊な遊走付与剤を皮膚表面側から提供して、真皮層に浸透させることができるため、この遊走付与剤の作用によって、脂肪由来幹細胞が真皮層側に遊走し、真皮層内で多く存在するようになる。このため、真皮層において脂肪由来幹細胞が豊富に存在することとなり、皮膚のハリや弾力に寄与する線維芽細胞の老化や損傷が、上記脂肪由来幹細胞による多分化能によって、ごく短いサイクルで新しい線維芽細胞に入れ替わっていくため、皮膚のハリや弾力が向上し、優れた美容効果を得ることができる。

[0057] また、脂肪由来幹細胞が、それ自身、真皮層における細胞外基質（ＥＣＭ）の構築に関連する因子を分泌するとともに、線維芽細胞を賦活化する作用を有することから、真皮層に豊富に脂肪由来幹細胞が存在すると、真皮層内の線維芽細胞自体が賦活化され、より一層、優れた美容効果を得ることができる。

[0058] さらに、脂肪由来幹細胞は、それ自身、Ｉ型コラーゲン、ＭＭＰ１（マトリックスメタプロテアーゼ１：コラーゲンの切断と再構築に関与する酵素）、ヒアルロン酸、ＴＩＭＰ１（組織メタプロテアーゼ阻害物質：ＭＭＰ１を阻害してバランス調整する酵素）等のＥＣＭ関連因子を産生することが知られている。このことから、真皮層に豊富に脂肪由来幹細胞が存在すると、真皮層内の状態が、より良好に保たれることになり、それによっても、優れた美容効果を得ることができる。

[0059] したがって、本発明は、脂肪由来幹細胞を、遊走付与剤を用いて真皮層に遊走させるものだけでなく、脂肪由来幹細胞を、浸透や注入等によって真皮層に直接導入して、脂肪由来幹細胞と線維芽細胞とを共存させることにより、皮膚状態の向上効果を得るようにする美容方法をも、提案するものである。

[0060] このような美容方法において、脂肪由来幹細胞の浸透や注入は、例えば、経皮吸収促進剤との併用による浸透、電気パルスを利用したエレクトロポレーションによる浸透、シリンジを用いた注射による注入等によって行うことができる。一般には、簡便かつ効率的に線維芽細胞と脂肪由来幹細胞とを共存させ得るという点から、本明細書に記載されるような遊走付与剤を皮膚に適用する方法により両細胞を共存させることが好ましい。

[0061] そして、本発明で用いられる遊走付与剤のなかには、脂肪由来幹細胞に対し、遊走付与剤作用を奏するだけでなく、増殖促進作用を奏するものがある。したがって、そのような遊走付与剤を用いることにより、脂肪層にある脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させるだけでなく、脂肪由来幹細胞自体の増殖を促進して、より一層、真皮層における脂肪由来幹細胞の数を顕著に増大させることができ、極めて優れた美容効果を得ることができる。

[0062] ちなみに、本発明で用いられる遊走付与剤において、脂肪由来幹細胞に対する遊走付与剤作用だけでなく、増殖促進作用も奏することが知られている物質としては、前述の、コラーゲン類、オリゴペプチド類、あるいはオリゴペプチドの誘導体類があげられる。

[0063] 上述した本発明は、脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を含有する、皮膚状態の向上用皮膚外用剤と捉えることもできる。本発明はまた、脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を含有し、皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤と捉えることもできる。本発明は更に、皮膚状態の向上に使用するための皮膚外用剤の製造における、脂肪由来幹細胞の遊走付与剤の使用と捉えることもできる。これらの実施形態における各要素の具体的な態様は、上記で説明したとおりである。

[0064] さらに本発明は、試料を含有する調製培地を用いて、脂肪由来幹細胞の遊走活性を評価する工程を包含する、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分をスクリーニングする方法を提供するものである。

[0065] 本発明のスクリーニング方法において、脂肪由来幹細胞の遊走活性を評価する工程は、任意の細胞遊走アッセイ手法により行うことができる。例えば、試料を含有する調製培地および試料を含有しない標準培地をそれぞれ用意する工程、上記調製培地または上記標準培地を用いて、トランスウェルにおいて脂肪由来幹細胞を所定期間培養する工程、調製培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の遊走活性が、標準培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の遊走活性よりも高いことを指標として、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分を選択する工程を包含する方法等により実施することができる。当該細胞遊走アッセイ手法は、スクラッチ処理等を施して創傷状態を模したものではないので、創傷により誘発される因子等の影響下における脂肪由来幹細胞の遊走活性を評価するものではない。よって、皮膚状態が非創傷皮膚の状態である場合の遊走活性を評価しているともいえる。したがって、上記細胞遊走アッセイ手法は、非創傷皮膚の状態を向上させる成分のスクリーニング方法として実施することもできる。上記スクリーニング方法では、試料を含まない標準培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の遊走活性を予め測定しておき、それを標準値として、試料を含有する調製培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の遊走活性を対比することによっても実施することができる。

[0066] 一つの実施の形態として、本発明のスクリーニング方法は、例えば、二層培養法により行うことができる。具体的には、例えば、第１の二層培養デバイス（プレート等）を準備し、その上部ウェルに、脂肪由来幹細胞を播種するとともに、その下部ウェルに試料を含有する調製培地を供給する工程と、第２の二層培養デバイスを準備し、その上部ウェルに、脂肪由来幹細胞を播種するとともに、その下部ウェルに試料を含有しない標準培地を供給する工程と、上記第１、第２の二層培養デバイスにおいて所定期間培養を行う工程と、それぞれの二層培養デバイスで上部ウェルと下部ウェルとを隔てる多孔

性フィルタを介して上部側から下部側へ移動した脂肪由来幹細胞の数を、任意の細胞数測定手法によって計測し、第２の二層培養デバイスの下部側における脂肪由来幹細胞数に対する第１の二層培養デバイスの下部側における脂肪由来幹細胞数の増加率を指標として、試料の遊走付与剤特性を評価する工程とを備える方法によって実施することができる。本発明のスクリーニング方法において、二層培養デバイスとしては、例えば、ボイデンチャンバー、スキャフォールド（多孔性三次元培養スキャフォールド等）、ジグモンドチャンバー等を使うことができる。さらに、上記のスクリーニング方法において、細胞数測定手法としては、Ｃａｌｃｅｉｎ－ＡＭ等を使って蛍光発色の増強を評価する方法、クリスタルバイオレット試薬、ＭＴＴ試薬、ＷＳＴ試薬等を使って吸光度を測定する方法等をあげることができる。

[0067] 本発明のスクリーニング方法において、脂肪由来幹細胞を培養する工程の期間は、この細胞の倍加時間より短い期間であることが好ましい。例えば、脂肪由来幹細胞を培養する工程の期間は、２４時間未満であることが好ましく、２２時間以下であることがより好ましく、２０時間以下であることがさらにより好ましい。

[0068] さらに、本発明のスクリーニング方法は、脂肪由来幹細胞の増殖促進活性を評価する工程を包含することもできる。このような工程を包含することにより、脂肪由来幹細胞に対して、真皮層への遊走付与作用を奏するだけでなく、真皮層における脂肪由来幹細胞自体の増殖を促進する作用も奏することができる、皮膚状態の向上により一層効果的な美容成分を選択することができる。

[0069] 上記のような脂肪由来幹細胞の増殖促進活性を評価する工程は、任意の細胞増殖アッセイ手法により行うことができる。例えば、試料を含有する調製培地と試料を含有しない標準培地のそれぞれに脂肪由来幹細胞を播種し、所定期間培養後の各培地における脂肪由来幹細胞数を測定して、試料を含有しない標準培地に比べて、試料を含有する調製培地での細胞数が有意に増加している場合に、脂肪由来幹細胞の増殖促進活性があると評価することができ

る。細胞数の測定は、上述のような、当該分野で公知の任意の細胞数測定手法で行うことができ、例えば、ＷＳＴ試薬等を使った吸光度の測定で行うことができる。上記の脂肪由来幹細胞の増殖促進活性を評価する工程では、試料を含有しない標準培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の細胞数を予め測定しておき、それを標準値として、試料を含有する調製培地を用いたときの脂肪由来幹細胞の細胞数を対比することによっても実施することができる。

[0070] 脂肪由来幹細胞の増殖促進活性を評価する工程において、脂肪由来幹細胞を培養する工程の期間は、この細胞の倍加時間より長い期間であることが好ましい。例えば、脂肪由来幹細胞を培養する工程の期間は、３０時間以上であることが好ましく、５０時間以上であることがより好ましく、７０時間以上であることがさらにより好ましい。

[0071] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、創傷部位ではない非創傷皮膚（すなわち、健常な皮膚）の状態を向上させる成分を選択するために用いられる。このような非創傷部位の状態を向上させる成分は、創傷の治療のために用いられる医薬ではなく、健常な皮膚の状態を改善する美容成分（化粧料に用いられる成分等）として使用することができる。

[0072] 一実施形態において、本発明のスクリーニング方法は、標識した脂肪由来幹細胞層、真皮モデル層及び表皮角化細胞層をこの順に積層した三次元の皮膚モデル（非創傷皮膚モデル）を使用した、非創傷皮膚の状態を向上させる成分のスクリーニング方法であってもよい。当該スクリーニング方法で選抜された成分は、非創傷皮膚の状態を向上させる美容方法に用いることができる。本実施形態に係るスクリーニング方法は、標識した脂肪由来幹細胞層、真皮モデル層及び表皮角化細胞層をこの順に積層した三次元の皮膚モデルを用意する工程と、上記皮膚モデルに試料を適用し、所定期間培養する工程と、培養後の皮膚モデルにおいて、標識を利用して真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数を測定する工程と、真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数を指標として、非創傷皮膚の状態を向上させる成分を選抜する工程と、を含む。非創傷皮膚モデ

ルは、例えば、二層培養デバイスの上部ウェルの底面に、標識した脂肪由来幹細胞を播種及び培養して標識した脂肪由来幹細胞層を形成させるステップと、標識した脂肪由来幹細胞層の上に真皮モデル層（例えば、線維芽細胞を混ぜたコラーゲンゲルからなる層等）を積層するステップと、真皮モデル層の上に表皮角化細胞を播種及び培養して表皮角化細胞層を形成させるステップとを含む方法により作製することができる。非創傷皮膚モデルに試料を適用する方法としては、例えば、表皮角化細胞層上に試料を添加して適用する方法に加え、試料の添加と共に超音波導入又はイオン導入を併用する方法、試料と共に経皮吸収促進剤を添加して適用する方法、二層培養デバイスの下部ウェル中に試料を添加し多孔性フィルタを介して適用する方法等を挙げることができる。また非創傷皮膚モデルへの試料の適用は、非創傷皮膚モデルの作製の過程で真皮モデル層のコラーゲンゲル等に予め試料を含ませること等によっても実施することができる。試料を適用した後の培養期間は、例えば、７日間以下であることが好ましく、５日間以下であることがより好ましく、３日間以下であることがさらにより好ましい。培養後の皮膚モデルにおいて、標識を利用して真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数を測定する工程は、例えば、非創傷皮膚モデルを縦方向等に薄くスライス（切片化）して、真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞の標識を計数することで測定できる。脂肪由来幹細胞を標識する方法としては、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、シアン色蛍光タンパク質（ＣＦＰ）等の蛍光タンパク質を発現させる方法、細胞標識試薬（Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｅシリーズ（Ｔｈｅｒｍｏ社製）等）を使う方法等を挙げることができる。真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数を指標として、非創傷皮膚の状態を向上させる成分を選抜する工程は、例えば、試料を適用せずに同じ操作を実施したときの真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来幹細胞数と比較して、試料を適用したときの真皮モデル層及び／又は表皮角化細胞層に遊走した脂肪由来

幹細胞数が多い場合に、非創傷皮膚の状態を向上させる成分と判断して選抜することができる。

[0073] なお、本発明において、遊走付与剤による脂肪由来幹細胞に対する遊走付与作用の有無については、例えば、下記の試験および判断基準によって確認することができる。

[0074] ＜遊走付与作用の確認試験および判断基準＞

ヒト脂肪由来幹細胞（クラボウ社製、Ｓｔｅｍｌｉｆｅ培地［Ｌｉｆｅｌｉｎｅ社提供］で培養７継代目）の培地を、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）に交換し、さらに２０時間培養した。

一方、０．１容量％ウシ胎児血清（栄養源）を用いて、遊走付与作用の有無を調べる試料を所定濃度で溶解した培地を調製した。また、０．１容量％ウシ胎児血清を含有し試料を含有しないＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（ブランク）を用意した。

[0075] そして、９６ウェル、メンブレンの孔径８μｍのボイデンチャンバー（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製、型番：３３８４）の下部ウェルに、上記調製培地を、１ウェルあたり２００μＬ供給した。また、上記ボイデンチャンバーの上部ウェルに、ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地で２０時間培養したヒト脂肪由来幹細胞を、１ウェルあたり３００００細胞播種し、３７℃、５容積％CO_2下で２０時間培養した。

[0076] また、滅菌水で１０倍希釈した１０ｘ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（細胞剥離液、ＴＲＥＶＩＧＥＮ社製）に、ＤＭＳＯ（和光純薬工業社製）で１．６６ｍｇ／ｍＬに溶解したＣａｌｃｅｉｎ　ＡＭ（蛍光色素、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ社製）を１．２μＬ／ｍＬ添加することにより、ヒト脂肪由来幹細胞の数と蛍光発色の強弱との間に相関関係を有する蛍光発色用の指標液を調製した。

[0077] 上記ボイデンチャンバーから上下のウェルの培地を取り出し、ＰＢＳ（－）（ＤＯＪＩＮＤＯ社製）で洗浄した後、下部ウェルに、上記蛍光発色用の指標液を、１ウェルあたり１００μＬ供給し、遮光、３７℃、５容積％CO_2

下で１時間インキュベートした。そして、インキュベート後の下部ウェルの指標液を、黒壁・透明床の９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ社製）に移し、蛍光強度（励起波長４８５ｎｍ、検出波長５２０ｎｍ）を測定した。各試験は３重で実施した（ｎ＝３）。

[0078] すなわち、上述のとおり、ヒト脂肪由来幹細胞の数と蛍光発色の強弱との間に相関関係があることから、ブランクを測定して得られる蛍光強度を基準（１００％）として、下部ウェルの蛍光強度の増減を求めることにより、遊走付与作用の有無を確認した。なお、遊走の有無の判断は、下記の表１に示す評点に従い、幹細胞遊走率（ブランクに対する増加率）が５％以上（評点＋以上）であれば「遊走付与作用有り」と判断した。

[0079] [表1]

幹細胞遊走率（％）	評点
～９５未満	－
９５以上～１０５未満	±
１０５以上～１２０未満	＋
１２０以上～１３０未満	＋＋
１３０以上～１４０未満	＋＋＋
１４０以上～	＋＋＋＋

[0080] ＜増殖促進作用の確認試験および判断基準＞

０．１容量％ウシ胎児血清を含むＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製）を用いて、遊走付与作用の有無を調べる試料を所定濃度で溶解した培地を調製した。また、試料無添加の０．１容量％ウシ

胎児血清含有ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（ブランク）を用意した。

[0081] そして、９６ウェルのプレートにヒト脂肪由来幹細胞（クラボウ社製、Ｓｔｅｍｌｉｆｅ培地［Ｌｉｆｅｌｉｎｅ社提供］で培養５継代目）を、上記の調製培地で１ウェルあたり３０００細胞となるように播種し、３７℃、５容積％CO_2下で７２時間培養した後、細胞が賦活化されたか否かの指標として、細胞の呼吸活性を、Ｃｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８（ＤＯＪＩＮＤＯ社製）を用いたＷＳＴ－８法にて測定した。すなわち、ヒト脂肪由来幹細胞を７２時間培養した後、各ウェルの培地をＣｅｌｌ Ｃｏｕｎｔｉｎｇ Ｋｉｔ－８含有ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地に交換し、遮光、３７℃、５容積％CO_2下で４時間インキュベートした後、波長４５０ｎｍ（対照波長６３０ｎｍ）の吸光度を測定した。各試験は３重で実施した（ｎ＝３）。

[0082] すなわち、ＷＳＴ－８試薬を用いることによって、呼吸活性の大小（細胞数に比例）を、溶液の吸光度（波長４５０ｎｍ）として測定した。そして、ブランクの培地を測定して得られる吸光度を基準（１００％）として、試料調製培地の吸光度の増減を求めることにより、増殖促進作用の有無を確認した。なお、増殖促進の有無の判断は、下記の表２に示す評点に従い、幹細胞増殖率（ブランクに対する増殖率）が５％以上（評点＋以上）であれば「幹細胞増殖促進作用有り」と判断した。

[0083]

[表2]

幹細胞増殖率（%）	評点
～９５未満	－
９５以上～１０５未満	±
１０５以上～１２０未満	＋
１２０以上～１３０未満	＋＋
１３０以上～１４０未満	＋＋＋
１４０以上～	＋＋＋＋

[0084] ＜遊走付与作用と増殖促進作用＞

なお、本細胞の倍加時間は、通常２４時間以上であることが知られており、前記遊走付与作用の確認試験では、ヒト脂肪由来幹細胞を播種して２０時間後に取り出して洗浄し、蛍光発色の強度を測定している。したがって、この試験においては、ヒト脂肪由来幹細胞自身の増殖効果は含まれておらず、遊走による細胞の増加のみを評価している。一方、上記増殖促進作用の確認試験では、ヒト脂肪由来幹細胞を播種して７２時間後の吸光度を測定しており、単純に自己増殖による細胞の増加を評価している。

実施例

[0085] 以下、本発明の実施例について、比較例と併せて詳細に説明する。

[0086] ［実施例１～５、比較例１］

本発明の美容方法に用いられる遊走付与剤である、クラゲ由来コラーゲン（ジェリーフィッシュコラーゲン、アリスタライフサイエンス社製）、トリペプチド－１－銅（カッパーペプチド、アリスタライフサイエンス社製）、

カプロオイルテトラペプチド－３（クロノライン、アリスタライフサイエンス社製）、ジプロピレングリコールの四種類について、前記の方法にしたがって、その遊走付与作用と増殖促進作用の確認試験を行った。また、比較例１として、ラベンダーオイルについて、同様の試験を行った。それらの結果を下記の表３～８に示す。なお、遊走付与剤の適用濃度は、下記の表３～８にそれぞれ示すとおりである。

[0087] [表3]

実施例１				
評価物質	評価項目	適用濃度 (mg/mL)	ブランクに対する割合(%)	評　価
クラゲ由来コラーゲン	遊走付与作用	０．１	１１０	＋
		１．０	１２８	＋＋
	増殖促進作用	０．１	１１３	＋
		１．０	１２２	＋＋

[0088] [表4]

実施例２				
評価物質	評価項目	適用濃度 (mg/mL)	ブランクに対する割合(%)	評　価
トリペプチド－１－銅	遊走付与作用	０．００１	１３０	＋＋＋
		０．０１	１２５	＋＋
		０．１	１３１	＋＋＋
	増殖促進作用	０．０１	１３０	＋＋＋
		０．１	１６０	＋＋＋＋

[0089] [表5]

実施例３				
評価物質	評価項目	適用濃度 (mg/mL)	ブランクに対する割合(%)	評　価
カプロオイルテトラペプチドー３	遊走付与作用	０．０１	１０９	＋
		０．１	１３３	＋＋＋
		１．０	１３２	＋＋＋
	増殖促進作用	０．０１	１２０	＋＋
		０．１	１２３	＋＋
		１．０	１１７	＋

[0090] [表6]

実施例４				
評価物質	評価項目	適用濃度 (mg/mL)	ブランクに対する割合(%)	評　価
ジプロピレングリコール	遊走付与作用	０．０００００１	１０９	＋
		０．００００１	１２５	＋＋
		０．０００１	１５０	＋＋＋＋
	増殖促進作用	０．０００００１	１１５	＋
		０．００００１	１０８	＋
		０．０００１	１１７	＋

[0091]

[表7]

実施例５				
評価物質	評価項目	適用濃度 (mg/mL)	ブランクに対する割合(%)	評　価
コンプレックスＡ＊	遊走付与作用	０．０００３	１１２	＋
		０．００３	１２２	＋＋
		０．０３	１６２	＋＋＋＋

＊：コンプレックスＡは、クラゲ由来コラーゲン、トリペプチドー１ー銅、カプロオイルテトラペプチドー３の三者を１：１：１の割合（重量基準）で配合した物質である。

[0092] [表8]

比較例１				
評価物質	評価項目	適用濃度 (mg/mL)	ブランクに対する割合(%)	評　価
ラベンダーオイル	遊走付与作用	０．０００００１	７１	－
		０．００５	７８	－
		０．０１	７９	－
	増殖促進作用	０．００２	１０３	±
		０．００５	１１７	±
		０．０１	１０２	±

[0093] 上記の結果から、実施例１～５は、用いた遊走付与剤によってヒト脂肪由来幹細胞がメンブレンの上部側から下部側に遊走していることがわかる。したがって、この遊走付与剤を用いた皮膚外用剤を皮膚に適用すれば、優れた美容効果が得られる。これに対し、比較例１の、ラベンダーオイルを用いた

ものは、増殖促進作用のみを示し、遊走付与作用を有していない。したがって、実施例１～５のような、優れた美容効果を得ることはできない。

[0094] ［実施例６］

図１に示すように、１２ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ社製）からなる下部ウェル２において、上部ウェル１にスキャフォールド３を一体化してなる多孔性三次元培養スキャフォールド（Ａｌｖｅｔｅｘ　Ｓｃａｆｆｏｌｄ　１２ｗｅｌｌインサート、リプロセル社製）をＩ型コラーゲン（ｒａｔ　ｔａｉｌ由来、ライフテクノロジー社製、濃度０．８ｍｇ／ｍＬ）でコーティングしたもの（真皮環境を想定）を設置し、ヒト脂肪由来幹細胞を播種した。そして、下部ウェル２に、実施例５で用いた評価物質（クラゲ由来コラーゲン、トリペプチド－１－銅、カプロオイルテトラペプチド－３の三者を１：１：１の割合で配合したもの）を０．３ｍｇ／ｍＬ含む培地を添加し、５日間培養した（スキャフォールド遊走試験）。培養後、組織を４重量％パラホルムアルデヒド液で固定し、パラフィンに包埋した。ミクロトームを用いて組織を垂直方向に厚み１０μｍの薄切片に切り取り、Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８染色によって、その切断面に存在するヒト脂肪由来幹細胞の核を青く可視化した。この切断面を蛍光顕微鏡（ＩＸ７１、オリンパス社製、×１０倍）で撮像し、得られたスキャフォールド切片写真を図２に示す。

[0095] ［比較例２］

上記と同様のスキャフォールド遊走試験において、下部ウェル２（図１参照）の培地として、評価物質を全く含まないものを用いた。それ以外は、上記実施例６と同様にして、スキャフォールド切片写真を得た。これを図３に示す。

[0096] 図２、図３の対比から、評価物質（実施例１～３で用いた三種類の評価物質を１：１：１の割合で配合したもの）を含む実施例６の培地では、これを含まない比較例２に比べて、大幅にスキャフォールド３内にヒト脂肪由来幹細胞が入り込んでいることがわかる。また、スキャフォールド３の上から約１／４の厚み部分（図２、図３においてＡで示す）より下の厚み部分（同じ

くＢで示す）に移動した細胞を「遊走した細胞」と定義し、「遊走細胞数／全細胞数」の比率を下記の表９に示す。細胞カウントは解析ソフトＩｍａｇｅＪを用いて行った。この結果は、実施例６の培地に含まれた三種類の評価物質が、ヒト脂肪由来幹細胞の遊走を促進させていることを裏付けるものである。

[0097] [表9]

	遊走細胞数	全細胞数	遊走細胞の割合
実施例６	４９	８６	５７％
比較例２	３１	８８	３５％

[0098] さらに、真皮層内に脂肪由来幹細胞を多く存在させることの意義について、以下の確認試験を行った。

[0099] ［確認試験１：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞におけるＩ型コラーゲン産生量の比較］

ヒト真皮線維芽細胞（クラボウ社製）およびヒト脂肪由来幹細胞（Ｌｉｆｅｌｉｎｅ社）をメーカー推奨環境で４継代目まで培養し、１００ｍｍシャーレに１．４×10^6ｃｅｌｌｓずつ播種した。一晩インキュベート後、培地を０．２容量％ウシ胎児血清含有ＤＭＥＭ／Ｆ１２に交換し、さらに培養した。そして、培地を交換してから４８時間後に、ヒト真皮線維芽細胞の培養上清（ＤＦ）とヒト脂肪由来幹細胞の培養上清（ＡＤ）を回収し、培養上清ＤＦ、ＡＤ中のＰＩＰ濃度をＥＬＩＳＡ法により定量した（タカラバイオ社製、ＰＩＰ　ＥＩＡ　ｋｉｔ：ＭＫ１０１を使用）。なお、ＰＩＰとは、Ｉ型コラーゲン前駆体であるＩ型プロコラーゲンが成熟Ｉ型コラーゲンになる際に切られ遊離する断片ペプチドのことであり、Ｉ型コラーゲン産生量に相関する。したがって、ＰＩＰ濃度が高ければ高いほど、Ｉ型コラーゲン産生量が多いと評価することができる。その結果は、図４に示すとおりであり、

Ｉ型コラーゲン産生量は、ヒト脂肪由来幹細胞の方が、ヒト真皮線維芽細胞に比べて顕著に多いことがわかる。

[0100] ［確認試験２：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞におけるＭＭＰ１産生量、活性の比較］

上記確認試験１と同様にして、ヒト真皮線維芽細胞の培養上清（ＤＦ）とヒト脂肪由来幹細胞の培養上清（ＡＤ）とを回収した。そして、培養上清ＤＦ、ＡＤ中のＭＭＰ１濃度を、ＥＬＩＳＡ法により定量した（Ｒ＆Ｄ社製、ｔｏｔａｌ　ＭＭＰ１　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ：ＤＹ９０１を使用）。また、また蛍光標識したコラーゲンを分解する系において、上記培養上清ＤＦ、ＡＤのＭＭＰ１活性を測定した（Ｒ＆Ｄ社製、Ｈｕｍａｎ　Ａｃｔｉｖｅ　ＭＭＰ１　Ｆｌｕｏｒｏｋｉｎｅ　Ｅ　ｋｉｔ：Ｆ１Ｍ００を使用）。それらの結果は、図５、図６に示すとおりであり、ＭＭＰ１の産生量も、活性も、ヒト真皮線維芽細胞に比べてヒト脂肪由来幹細胞の方が多い（高い）ことがわかる。

[0101] ［確認試験３：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞におけるヒアルロン酸産生量の比較］

上記確認試験１と同様にして、ヒト真皮線維芽細胞の培養上清（ＤＦ）とヒト脂肪由来幹細胞の培養上清（ＡＤ）とを回収した。そして、培養上清ＤＦ、ＡＤ中のヒアルロン酸濃度を、ＥＬＩＳＡ法により定量した（Ｒ＆Ｄ社製、Ｈｙａｌｕｒｏｎａｎ　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ：ＤＨＹＡＬ０を使用）。その結果は、図７に示すとおりであり、ヒアルロン酸産生量は、ヒト真皮線維芽細胞に比べてヒト脂肪由来幹細胞の方が顕著に多いことがわかる。

[0102] ［確認試験４：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞におけるＴＩＭＰ１産生量の比較］

上記確認試験１と同様にして、ヒト真皮線維芽細胞の培養上清（ＤＦ）とヒト脂肪由来幹細胞の培養上清（ＡＤ）とを回収した。そして、培養上清ＤＦ、ＡＤ中のＴＩＭＰ１濃度を、ＥＬＩＳＡ法により定量した（Ｒ＆Ｄ　Ｓ

ｙｓｔｅｍｓ社製、Ｈｕｍａｎ　ＴＩＭＰ－１　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ：ＤＴＭ１００を使用）。その結果は、図８に示すとおりであり、ＴＩＭＰ１産生量は、ヒト真皮線維芽細胞に比べてヒト脂肪由来幹細胞の方が顕著に多いことがわかる。

[0103] ［確認試験５：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞とを直接共培養したときの、ヒト真皮線維芽細胞におけるＴＩＭＰ１産生量］

ヒト真皮線維芽細胞（クラボウ社製）をメーカー推奨環境で培養し、２．５μＭ　Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ社製：Ｃ３４５５７）にて染色した。このヒト真皮線維芽細胞と、メーカー推奨環境で培養したヒト脂肪由来幹細胞（Ｌｉｆｅｌｉｎｅ社製）とを、ヒト脂肪由来幹細胞の含有比率を変えながら、１００ｍｍシャーレに、細胞数が等しく合計９×１０^{5}ｃｅｌｌｓずつになるよう播種し、ヒト脂肪由来幹細胞の含有量（全細胞数に対するヒト脂肪由来幹細胞の細胞数の割合）が、０％、１０％、３０％となる三種類のシャーレをつくった。そして、これらを７２時間培養後、セルソーターを用いてＣｅｌｌ　Ｔｒａｃｅ　Ｖｉｏｌｅｔに染まっているヒト真皮線維芽細胞のみを単離し、６ウェルプレートに２×１０^{5}ｃｅｌｌｓずつ播種した。翌日、培地を０．２容量％ウシ胎児血清含ＤＭＥＭ／Ｆ１２に交換し、４８時間後に、培養上清を回収し、培養上清中のＴＩＭＰ１濃度を、ＥＬＩＳＡ法により定量した（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製、Ｈｕｍａｎ　ＴＩＭＰ－１　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ：ＤＴＭ１００を使用）。その結果は、図９に示すとおりであり、ヒト脂肪由来幹細胞との直接共培養によって、ヒト真皮線維芽細胞のＴＩＭＰ１産生量が増加していることがわかる。

[0104] ［確認試験６：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞とを直接共培養したときの、ヒト真皮線維芽細胞におけるヒアルロン酸産生量］

上記確認試験５と同様にして、ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞とを直接共培養することにより、ヒト脂肪由来幹細胞の含有量が異なる三種類の培養上清を得た。これらの培養上清のヒアルロン酸濃度を、ＥＬＩＳＡ

法により定量した（Ｒ＆Ｄ社製、Ｈｙａｌｕｒｏｎａｎ　Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ　ＥＬＩＳＡ　ｋｉｔ：ＤＨＹＡＬ０を使用）。その結果は、図１０に示すとおりであり、ヒト脂肪由来幹細胞との直接共培養によって、ヒト真皮線維芽細胞のヒアルロン酸産生量が増加していることがわかる。

[0105] ［確認試験７：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞とを直接共培養したときの、ヒト真皮線維芽細胞におけるＩ型コラーゲン産生量］

上記確認試験５、６と同様にして、ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞とを直接共培養することにより、ヒト脂肪由来幹細胞の含有量が異なる三種類の培養上清を得た。これらの培養上清のＩ型コラーゲン濃度を、ＥＬＩＳＡ法により定量した（タカラバイオ社製、ＰＩＰ　ＥＩＡ　ｋｉｔ：ＭＫ１０１を使用）。その結果は、図１１に示すとおりであり、ヒト脂肪由来幹細胞との直接共培養によって、ヒト真皮線維芽細胞のＩ型コラーゲン酸産生量が増加していることがわかる。

[0106] ［確認試験８：ヒト脂肪由来幹細胞とヒト真皮線維芽細胞における細胞外基質の遺伝子発現量の比較］

上記確認試験１～７は、細胞におけるタンパク質または多糖類の産生量レベルでの確認であることから、遺伝子発現レベルにおいても、ヒト脂肪由来幹細胞（Ｌｉｆｅｌｉｎｅ社製）の方がヒト真皮線維芽細胞（クラボウ社製）に比べて優れているか否かについて、それぞれの細胞における細胞外基質関連因子の遺伝子発現量をマイクロアレイにより解析して評価した。そして、ヒト真皮線維芽細胞における遺伝子発現量を１としたときの、ヒト脂肪由来幹細胞における遺伝子発現量を、底２の対数の値に換算すると、下記の表１０に示すような結果が得られた。したがって、ＭＭＰ１、ＴＩＭＰ１、ＨＡＳ２（高分子ヒアルロン酸合成酵素２）の三者について、ヒト脂肪由来幹細胞がヒト真皮線維芽細胞に比べて、遺伝子レベルにおいても、高発現であることがわかる。

[0107]

[表10]

幹細胞における遺伝子発現量 ＊	
ＭＭＰ１	１．６６
ＴＩＭＰ１	２．４６
ＨＡＳ２	３．０６

＊：線維芽細胞における遺伝子発現量を１としたときの
幹細胞における発現比を、底を２とする対数の値として示す。

産業上の利用可能性

[0108] 本発明は、脂肪由来幹細胞を利用して皮膚状態を向上させる美容方法、あるいはこれに用いる皮膚外用剤、並びに遊走付与剤、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法として、広く利用することができる。

符号の説明

[0109] １…上部ウェル、２…下部ウェル、３…スキャフォールド。

請求の範囲

[請求項1] 脂肪由来幹細胞の遊走付与剤を皮膚に適用することにより、脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させ、皮膚状態を向上させることを特徴とする美容方法。

[請求項2] 上記遊走付与剤が、ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種である請求項１記載の美容方法。

[請求項3] 上記ポリオール化合物が、炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールの少なくとも一種である請求項２記載の美容方法。

[請求項4] 上記炭素数３～６のアルキル基に水酸基を２つ以上有するポリオールが、ジプロピレングリコール、１，２－ブチレングリコール、１，３－ブチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－プロパンジオール、１，２－ペンタンジオール、１，２－ヘキサンジオール、エチレングリコールおよびジエチレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である請求項３記載の美容方法。

[請求項5] 上記親水性生体物質が、単糖類、二糖類、オリゴ糖類、多糖類、ムコ多糖類、コラーゲン類、オリゴペプチド類およびポリペプチド類からなる群から選ばれた少なくとも一種である請求項２～４のいずれか一項に記載の美容方法。

[請求項6] 上記オリゴペプチド類が、ジペプチド類、トリペプチド類、テトラペプチド類およびそれらの誘導体からなる群から選ばれた少なくとも一種である請求項５記載の美容方法。

[請求項7] 上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅、カプロオイルテトラペプチド－３、及びジプロピレングリコールからなる群から選ばれた少なくとも一種である請求項１～６のいずれか一項に記載の美容方法。

[請求項8] 上記遊走付与剤が、コラーゲン、トリペプチド－１－銅及びカプロオイルテトラペプチド－３の組み合わせである請求項１～７のいずれ

か一項に記載の美容方法。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか一項に記載の美容方法に用いられる皮膚外用剤であって、皮膚への適用によって脂肪由来幹細胞を真皮層に遊走させる遊走付与剤を含有することを特徴とする皮膚外用剤。

[請求項10] ポリオール化合物および親水性生体物質の少なくとも一種を含有する脂肪由来幹細胞の遊走付与剤。

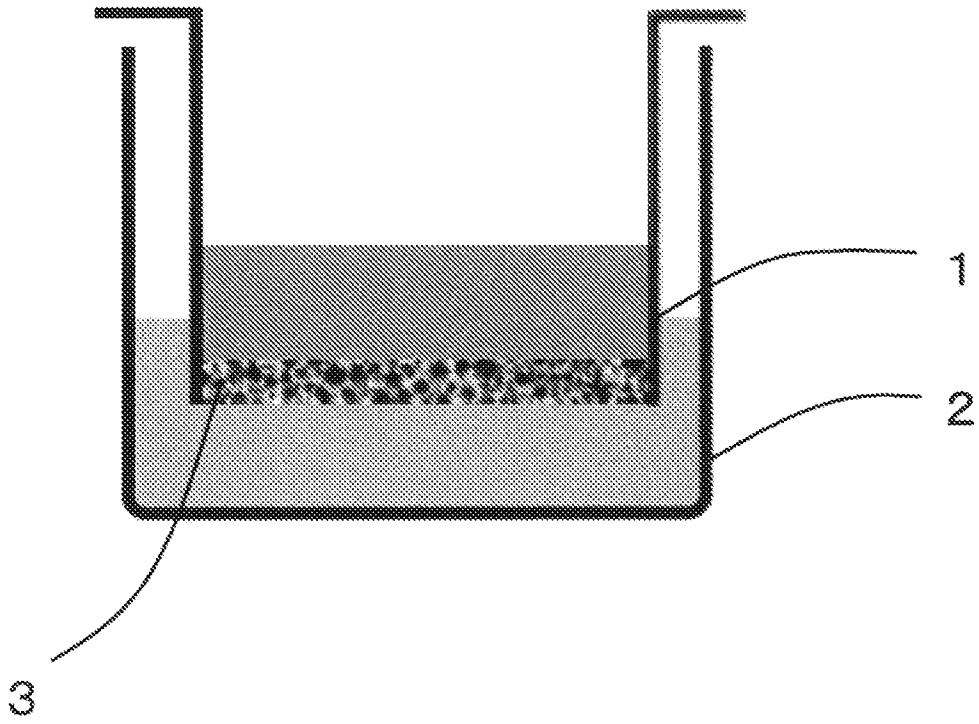
[請求項11] 試料を含有する調製培地を用いて、脂肪由来幹細胞の遊走活性を評価する工程を包含する、皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法。

[請求項12] 皮膚状態が非創傷皮膚の状態である、請求項１１記載の皮膚状態を向上させる美容方法に用いられる成分のスクリーニング方法。

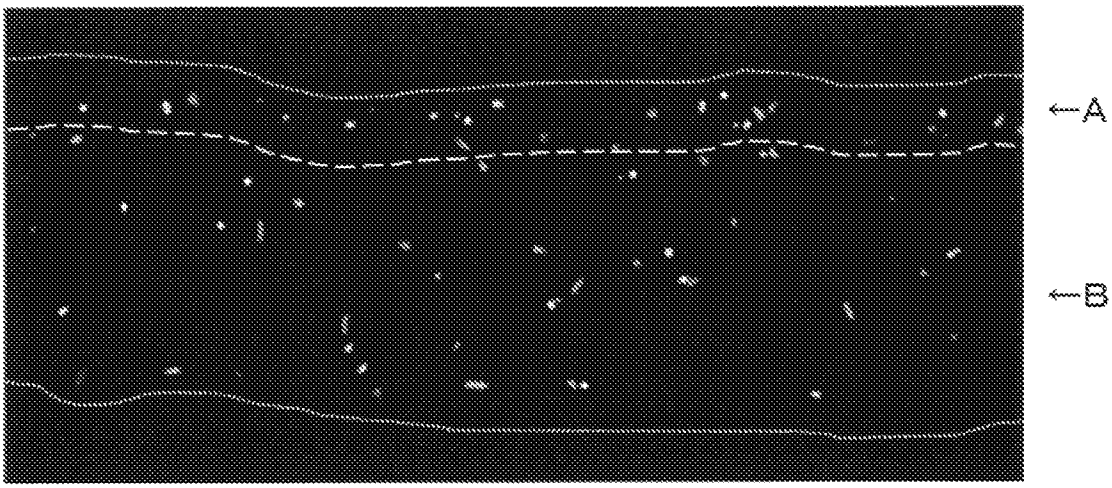
[請求項13] 真皮層において、線維芽細胞と脂肪由来幹細胞とを共存させることにより、皮膚状態を向上させることを特徴とする美容方法。

[請求項14] 脂肪由来幹細胞を遊走、注入、または浸透させることにより、線維芽細胞と脂肪由来幹細胞とを共存させる、請求項１３記載の美容方法。

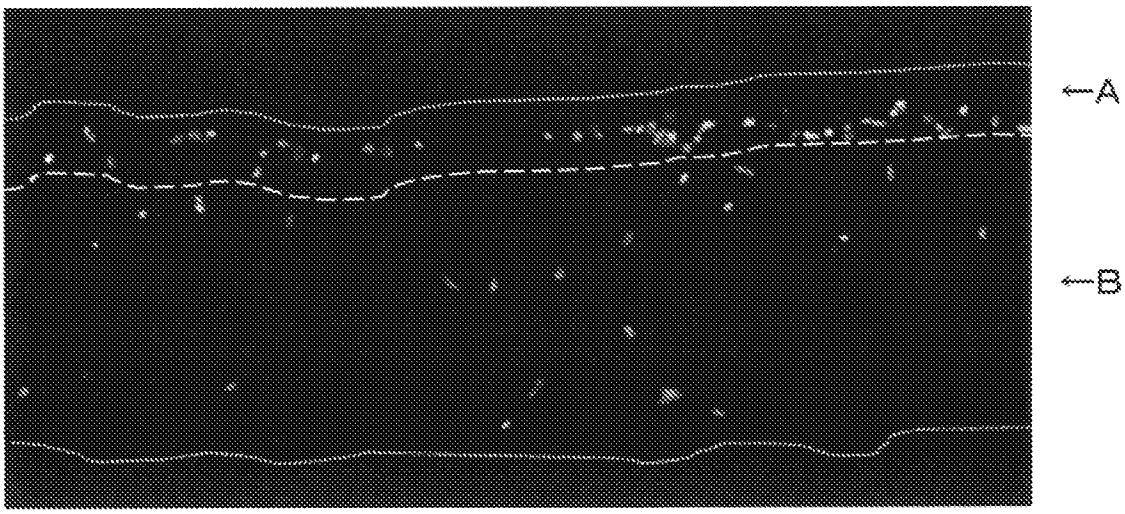
[図1]



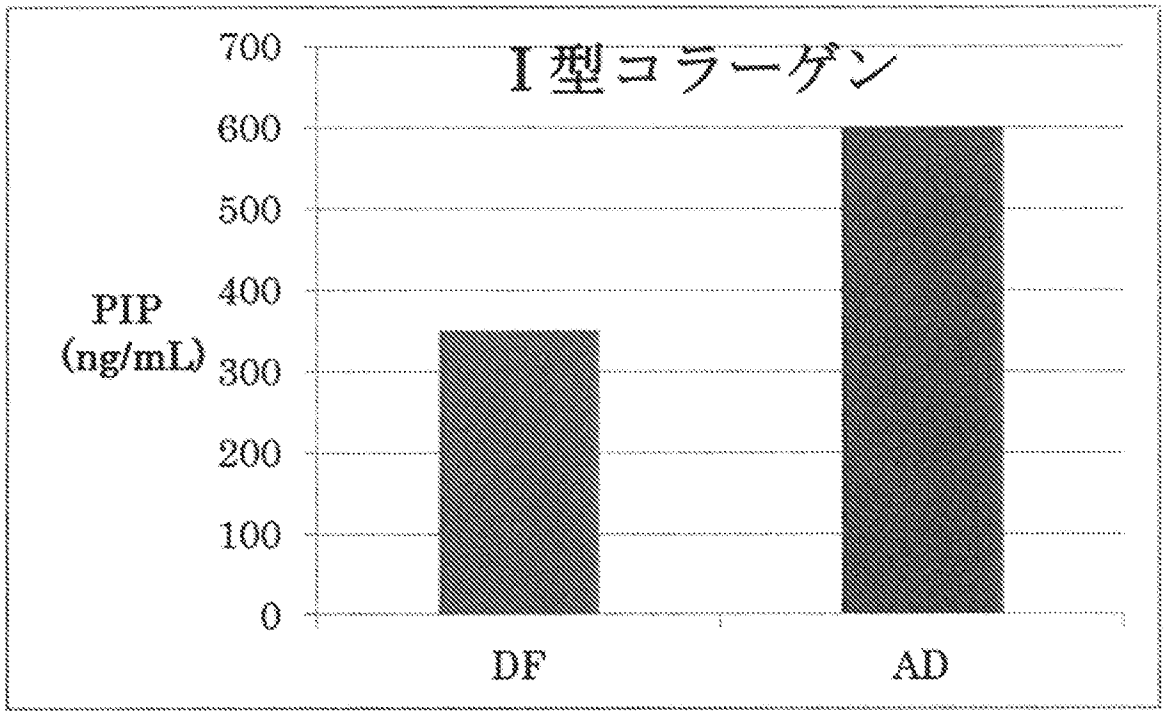
[図2]



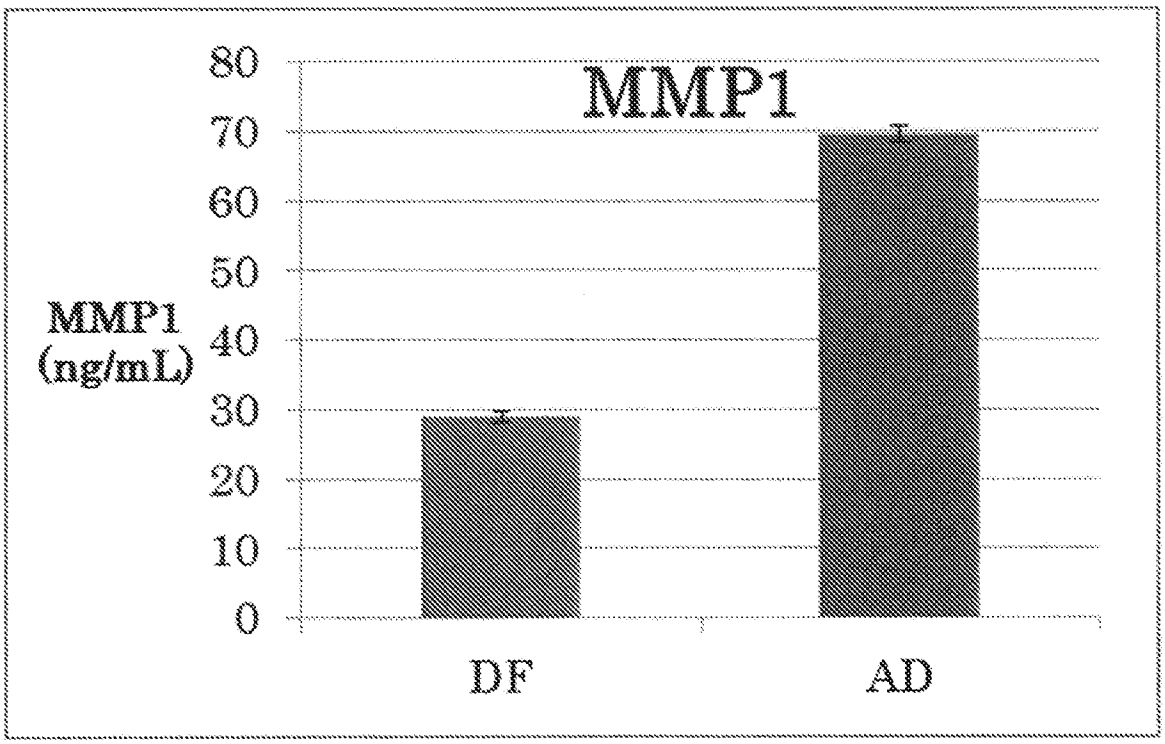
[図3]



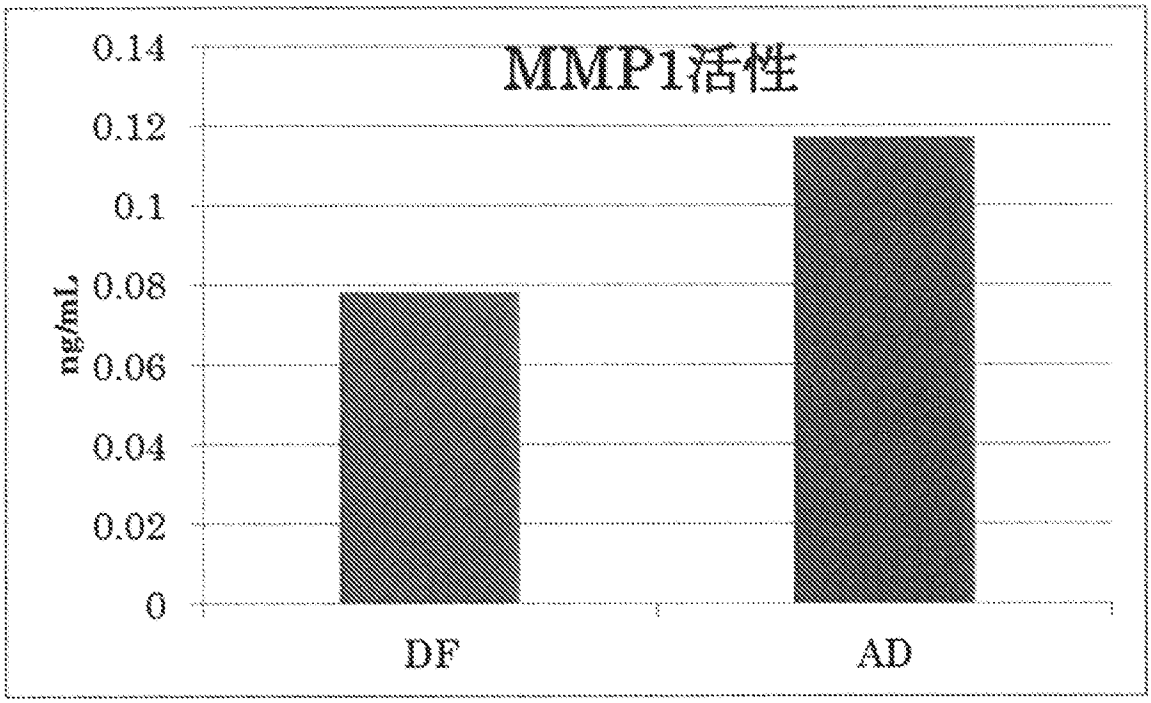
[図4]



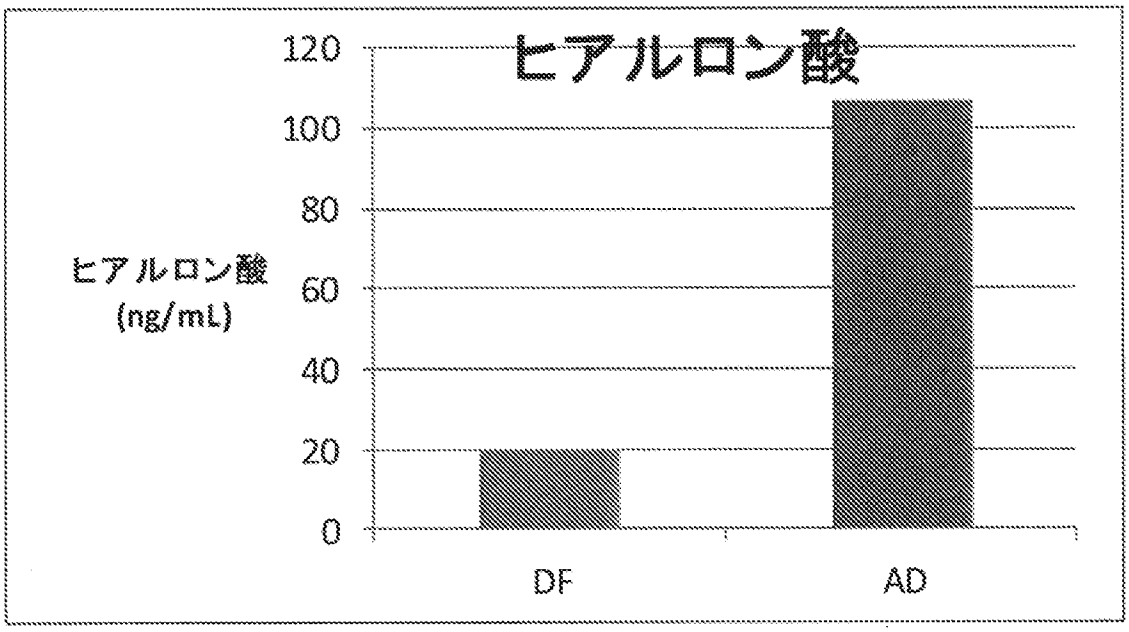
[図5]



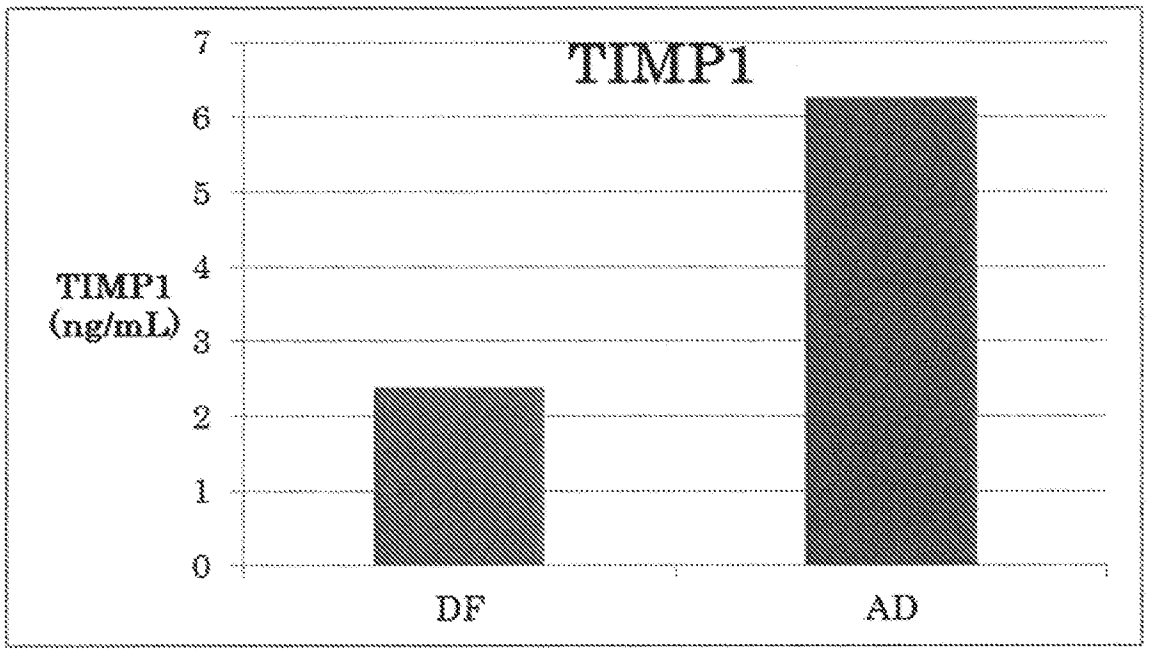
[図6]



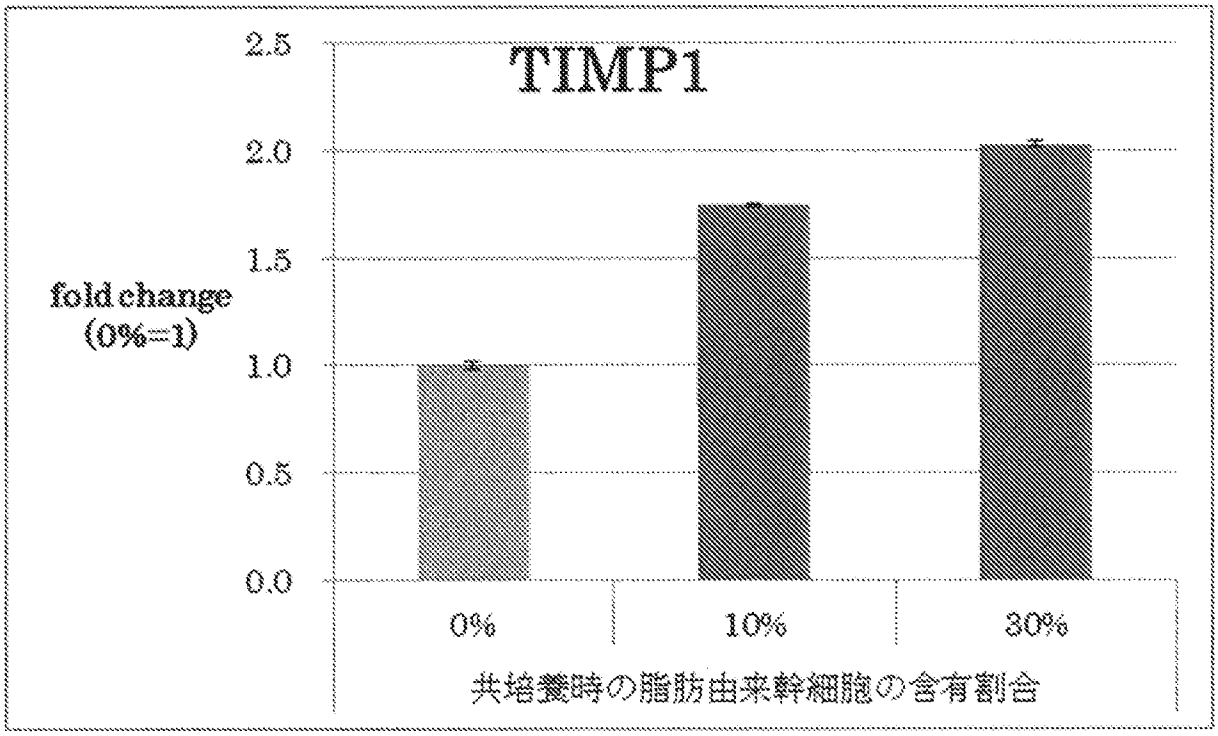
[図7]



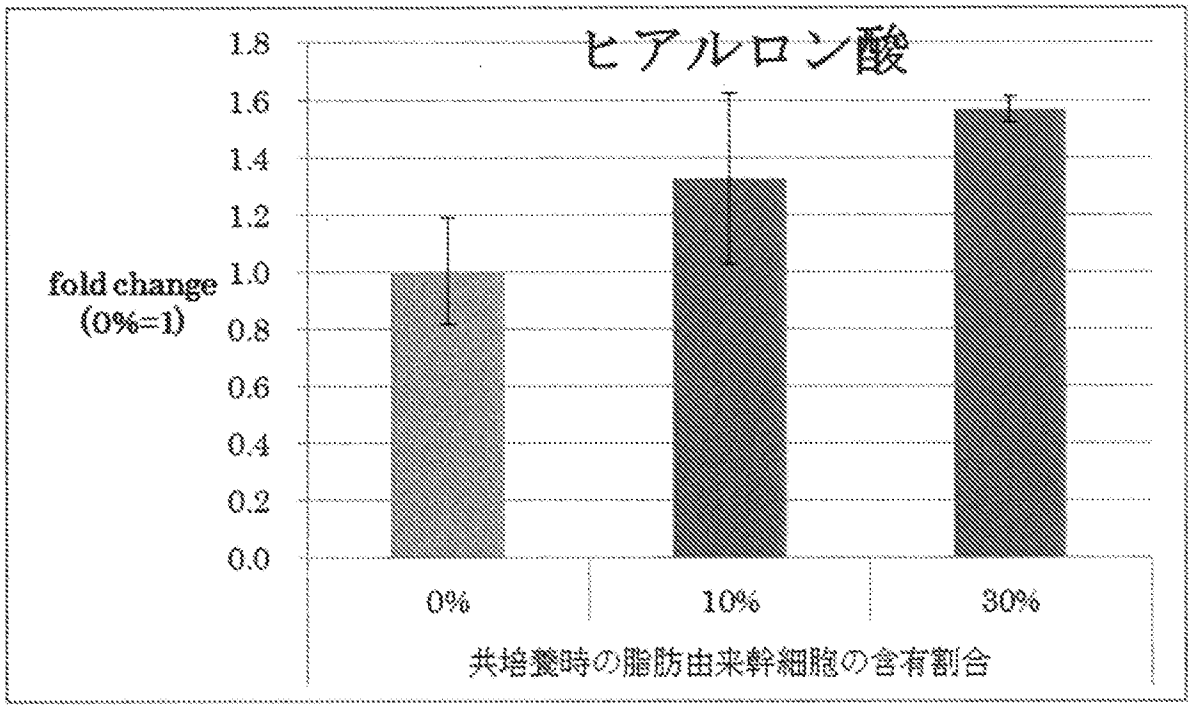
[図8]



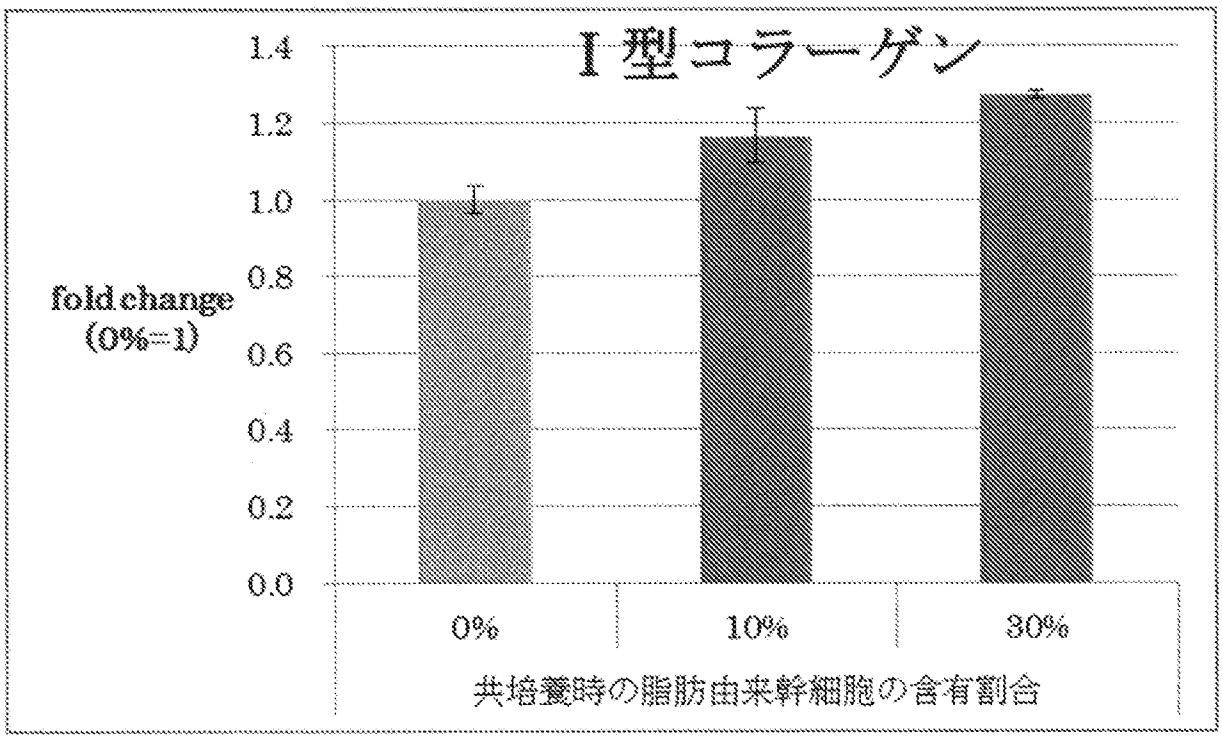
[図9]


TIMP1
fold change
(0%=1)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0%
10%
30%
共培養時の脂肪由来幹細胞の含有割合

[図10]


ヒアルロン酸
fold change
(0%=1)
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0%
10%
30%
共培養時の脂肪由来幹細胞の含有割合

[図11]


Ⅰ型コラーゲン
fold change
(0%=1)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0%
10%
30%
共培養時の脂肪由来幹細胞の含有割合

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/065560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
A61K8/34, A61K8/39, A61K8/60, A61K8/64, A61K8/65, A61K8/73, A61K31/047, A61K31/7004, A61K31/7016, A61K31/702, A61K31/715, A61K31/726, A61K38/00, A61K38/17, A61K45/00, A61P17/00, A61P43/00, A61Q19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/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 Y A	JP 2014-214094 A (Pharmicell Co., Ltd.), 17 November 2014 (17.11.2014), claims; paragraphs [0017], [0021] to [0033]; example 1; experimental example 2 (Family: none)	1-2,5,7, 9-10,13-14 1-2,5,7, 9-10,13-14 3-4,6,8, 11-12
X Y A	JP 2013-507956 A (RNL Bio Co., Ltd.), 07 March 2013 (07.03.2013), claims; paragraphs [0048] to [0050] & US 2012/0276044 A1 claims; paragraphs [0073] to [0075] & WO 2011/049414 A2 & EP 2511365 A2 & KR 10-2011-0044722 A & CN 102666840 A & RU 2012121191 A	10 1-2,5,7,9-14 3-4,6,8

☒ 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	Date of mailing of the international search report
25 July 2016 (25.07.16)	09 August 2016 (09.08.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/065560

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 1-207220 A (Lion Corp.), 21 August 1989 (21.08.1989), claims; page 1, lower right column, lines 3 to 7; page 2, lower left column, line 9 to page 3, upper left column, line 7; examples (Family: none)	1-7,9-10, 13-14 8,11-12
X A	JP 7-285844 A (Naris Cosmetics Co., Ltd.), 31 October 1995 (31.10.1995), claims; paragraphs [0009], [0013] to [0017]; examples (Family: none)	1-7,9-10, 13-14 8,11-12
X Y A	JP 2010-77046 A (Nikko Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 April 2010 (08.04.2010), claims; paragraphs [0001], [0010] to [0014]; examples (Family: none)	1-2,5-7, 9-10,13-14 7-9 3-4,11-12
X Y A	WO 2009/138801 A2 (NBLABS LTD.), 19 November 2009 (19.11.2009), claims; page 4, line 30 to page 5, line 2; examples & GB 2460054 A	1-2,5-7, 9-10,13-14 7-9 3-4,11-12
X Y A	PIKART, L. et al., GHK-Copper Peptide in skin Remodeling and Anti-aging, SOFW JOURNAL, 2010.06, Vol.136, No.6, P.10,12-14,16-18,20, ISSN:0942-7694	1-2,5-7, 9-10,13-14 7-9 3-4,11-12
X Y	KIM, Won-Serk et al., Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors, Journal of Dermatolgical Science, 2009, Vol.53, No.2, p.96-102, ISSN:0923-1811	13-14 11-14
X Y	PARK, Byung-Soon et al., Adipose-Derived Stem Cells and Their Secretory Factors as a Promising Therapy for Skin Aging, Dermatologic Surgery, 2008, Vol.34, No.10, p.1323-1326, ISSN:1076-0512	13-14 11-14
X Y	JP 2009-539546 A (RNL Bio Co., Ltd.), 19 November 2009 (19.11.2009), claims; paragraph [0028]; example 5 & WO 2007/145438 A1 claims; page 8, lines 12 to 18; example 5 & KR 10-2007-0119497 A & CN 101473030 A	13-14 11-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/065560

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/036211 A1 (Shiseido Co., Ltd.), 22 March 2012 (22.03.2012), claims; paragraphs [0007] to [0008], [0032] to [0033] & US 2013/0184348 A1 claims; paragraphs [0016] to [0017], [0060] to [0062] & EP 2617835 A1 & TW 201216973 A	11-12
A	JP 2009-538917 A (Therapuetic Peptides, Inc.), 12 November 2009 (12.11.2009), paragraphs [0014], [0024] to [0025] & US 2010/0144643 A1 & US 2011/0250153 A1 & WO 2007/143006 A2 paragraphs [0015], [0025] to [0026] & EP 2037942 A2 & CA 2654008 A & KR 10-2009-0053752 A & CN 101600441 A	7-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/065560

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61K8/34(2006.01)i, *A61K8/39*(2006.01)i, *A61K8/60*(2006.01)i, *A61K8/64*(2006.01)i, *A61K8/65*(2006.01)i, *A61K8/73*(2006.01)i, *A61K31/047*(2006.01)i, *A61K31/7004*(2006.01)i, *A61K31/7016*(2006.01)i, *A61K31/702*(2006.01)i, *A61K31/715*(2006.01)i, *A61K31/726*(2006.01)i, *A61K38/00*(2006.01)i, *A61K38/17*(2006.01)i, *A61K45/00*(2006.01)i, *A61P17/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *A61Q19/00*(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０６５５６０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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））

Int.Cl.　A61K8/34, A61K8/39, A61K8/60, A61K8/64, A61K8/65, A61K8/73, A61K31/047, A61K31/7004, A61K31/7016, A61K31/702, A61K31/715, A61K31/726, A61K38/00, A61K38/17, A61K45/00, A61P17/00, A61P43/00, A61Q19/00

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６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 (JDreamIII), CAplus/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	JP 2014-214094 A (ファミセル　カンパニー　リミテッド) 2014.11.17, 特許請求の範囲, 段落[0017], [0021]-[0033], 実施例1, 実験例２（ファミリーなし）	1-2, 5, 7, 9-10, 13-14
Y		1-2, 5, 7, 9-10, 13-14
A		3-4, 6, 8, 11-12

☑　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矛盾するものではなく、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	国際調査報告の発送日
２５．０７．２０１６	０９．０８．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｄ　９５４６
松本　直子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４２１

C（続き）．　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 Y A	JP 2013-507956 A（アールエヌエル　バイオ　カンパニー　リミテッド）2013.03.07，特許請求の範囲，段落[0048]-[0050] & US 2012/0276044 A1，特許請求の範囲，段落[0073]-[0075] & WO 2011/049414 A2 & EP 2511365 A2 & KR 10-2011-0044722 A & CN 102666840 A & RU 2012121191 A	10 1-2,5,7,9-14 3-4,6,8
X A	JP 1-207220 A（ライオン株式会社）1989.08.21，特許請求の範囲，1頁右下欄3-7行，2頁左下欄9行-3頁左上欄7行，実施例（ファミリーなし）	1-7,9-10, 13-14 8,11-12
X A	JP 7-285844 A（株式会社ナリス化粧品）1995.10.31，特許請求の範囲，段落[0009]，[0013]-[0017]，実施例（ファミリーなし）	1-7,9-10, 13-14 8,11-12
X Y A	JP 2010-77046 A（日興製薬株式会社）2010.04.08，特許請求の範囲，段落[0001]，[0010]-[0014]，実施例（ファミリーなし）	1-2,5-7, 9-10,13-14 7-9 3-4,11-12
X Y A	WO 2009/138801 A2 (NBLABS LIMITED) 2009.11.19，特許請求の範囲，4頁30行-5頁2行，実施例 & GB 2460054 A	1-2,5-7, 9-10,13-14 7-9 3-4,11-12
X Y A	PIKART, L. et al., GHK-Copper Peptide in skin Remodeling and Anti-aging, SOFW JOURNAL, 2010.06, Vol.136, No.6, P.10,12-14,16-18,20, ISSN:0942-7694	1-2,5-7, 9-10,13-14 7-9 3-4,11-12
X Y	KIM, Won-Serk et al., Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors, Journal of Dermatolgical Science, 2009, Vol.53, No.2, p.96-102, ISSN:0923-1811	13-14 11-14
X Y	PARK, Byung-Soon et al., Adipose-Derived Stem Cells and Their Secretory Factors as a Promising Therapy for Skin Aging, Dermatologic Surgery, 2008, Vol.34, No.10, p.1323-1326, ISSN:1076-0512	13-14 11-14

Ｃ（続き）．　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 Y	JP 2009-539546 A (アールエヌエル　バイオ　カンパニー，リミティッド) 2009.11.19, 特許請求の範囲，段落[0028]，実施例5 & WO 2007/145438 A1，特許請求の範囲，8頁12-18行，実施例5 & KR 10-2007-0119497 A & CN 101473030 A	13-14 11-12
Y	WO 2012/036211 A1 (株式会社資生堂) 2012.03.22, 請求の範囲，段落[0007]-[0008]，[0032]-[0033] & US 2013/0184348 A1，特許請求の範囲，段落[0016]-[0017]，[0060]-[0062] & EP 2617835 A1 & TW 201216973 A	11-12
A	JP 2009-538917 A (セラピューティックス　ペプタイズ，インコーポレーテッド) 2009.11.12, 段落[0014]，[0024]-[0025] & US 2010/0144643 A1 & US 2011/0250153 A1 & WO 2007/143006 A2，段落[0015]，[0025]-[0026] & EP 2037942 A2 & CA 2654008 A & KR 10-2009-0053752 A & CN 101600441 A	7-8

発明の属する分野の分類
A61K8/34(2006.01)i, A61K8/39(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)i, A61K8/65(2006.01)i, A61K8/73(2006.01)i, A61K31/047(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61K31/7016(2006.01)i, A61K31/702(2006.01)i, A61K31/715(2006.01)i, A61K31/726(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K38/17(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i