

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6502636号
(P6502636)

(45) 発行日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(24) 登録日 平成31年3月29日(2019.3.29)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 8/9789 (2017.01) A 6 1 K 8/9789
A 6 1 K 31/05 (2006.01) A 6 1 K 31/05
A 6 1 K 36/73 (2006.01) A 6 1 K 36/73
A 6 1 Q 17/04 (2006.01) A 6 1 Q 17/04
A 6 1 Q 19/08 (2006.01) A 6 1 Q 19/08

請求項の数 2 (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-179584 (P2014-179584)
 (22) 出願日 平成26年9月3日(2014.9.3)
 (65) 公開番号 特開2016-53007 (P2016-53007A)
 (43) 公開日 平成28年4月14日(2016.4.14)
 審査請求日 平成29年8月10日(2017.8.10)

特許法第30条第2項適用 a) 平成26年3月5日
 2014年度(平成26年度)日本農芸化学会大会講演
 要旨集「皮膚の光老化に対するリンゴポリフェノールの
 作用」にて発表 b) 平成26年3月28日 日本農芸
 化学会2014年度(平成26年度)大会「皮膚の光老
 化に対するリンゴポリフェノールの作用」にて発表

前置審査

(73) 特許権者 595048544
 ちふれホールディングス株式会社
 埼玉県川越市芳野台二丁目8番59
 (73) 特許権者 000000055
 アサヒグループホールディングス株式会社
 東京都墨田区吾妻橋一丁目23番1号
 (74) 代理人 100067448
 弁理士 下坂 スミ子
 (74) 代理人 100167117
 弁理士 打越 佑介
 (72) 発明者 武智 貴之
 埼玉県川越市芳野台2-8-59 株式会
 社ちふれ化粧品内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C y r 6 1 発現抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リンゴポリフェノールを含有する、UVBによる真皮におけるC y r 6 1の発現を抑制
 または阻害することにより皮膚の皺および弛みの発生を軽減するための抑制剤。

【請求項2】

前記リンゴポリフェノールの含有量は少なくとも5 μ g / m Lである、請求項1に記載
 の抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、システインリッチ蛋白質61(以下、「C y r 6 1」と言う。)の発現抑制
 剤に関し、特に、波長290~320nmの紫外線によってヒトの皮膚にC y r 6 1が発
 現されるのを抑制または阻害することにより、皮膚の皺および弛みの発生を軽減するた
 めの抑制剤に関するものである。

【背景技術】

【0002】

紫外線を浴びることがヒト皮膚の光老化の要因となることは知られている。紫外線の中
 でも人体に有害なものとしては、波長320~400nmの紫外線(以下、「UVA」と
 言う。)、波長290~320nmの紫外線(以下、「UVB」と言う。)、波長200
 ~290nmの紫外線(以下、「UVC」と言う。)がある。(なお、波長についての分

類は、UVA：315～400nm、UVB：280～315nm、UVC：100～280nmとするものもあるが、本発明では、それらを厳密に規定するものではない。）

【0003】

このうち、UVCは、強い殺菌作用があり、生体に対する破壊性が最も強いが、物質による吸収が著しく、通常は大気を通することができず、人体への影響はないと言える。一方、UVAおよびUVBはオゾン層を通過して地表に到達する。地表に到達する紫外線の99%を占めるUVAは、皮膚の真皮層に浸透して、皮膚のハリを保っているコラーゲンとエラスチンの2つの繊維を壊す分解酵素であるコラゲナーゼを増やし、コラーゲン繊維を小さく切断すると共にエラスチンを変性し、それにより、皮膚は張りや弾力を失って弛み、皺、皸など（光老化）を生じている。これに加え、UVAは、皮膚の細胞を遺伝子レベルで傷つけ、皮膚の免疫力を低下させてしまう。これに対し、UVBは、ヒト皮膚に曝露されると、即時的な皮膚反応として炎症性の紅斑反応や浮腫のようなサンバーン反応を引き起こし、炎症後の皮膚では、活性化された色素細胞によりメラニンの産生を高めて色素沈着が生じるだけでなく、UVBを長期間浴びることは、皮膚の免疫機能を低下させて皮膚癌の発症原因となることが知られている。このため、光老化に焦点を当てた研究はUVAについて行われてきたが、UVBについては、主に炎症や色素沈着、皮膚癌に焦点を当てた研究が盛んに進められており、皮膚の皺および弛みの発生に焦点を当てた研究は実質的になされていないのが実情である。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

20

【0004】

【非特許文献1】特定非営利活動法人アンチエイジングネットワークHP「光老化 紫外線によるダメージ」<http://www.anti-ageing.jp/cause/hikari/>

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、これまで皮膚の光老化防止を意図する際に主要な原因と考えられていなかったUVBによる皮膚の影響を分析し、UVBによる光老化を引き起こす要因を解明することにより、皮膚の皺および弛みの発生を軽減できる抑制剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

本発明による抑制剤は、コラーゲンの産生を抑制する因子であるCyr61が、ヒト皮膚の真皮には到達しないUVBによって、真皮に発現することに着目して発明されたものであり、リンゴポリフェノールを含有することにより、UVBによるCyr61の発現を抑制または阻害し、それにより、皮膚の皺および弛みの発生を軽減する。

【0007】

本発明による抑制剤はまた、リンゴポリフェノールを少なくとも5μg/mL含有することにより、UVBによるCyr61の発現を確実に抑制または阻害し、それにより、皮膚の皺および弛みの発生を軽減する。

【発明の効果】

40

【0008】

本発明による抑制剤は、UVBによるCyr61の発現を抑制または阻害することにより、皮膚の真皮におけるコラーゲンの産生が抑制されるのを回避し、UVBによる皮膚の皺および弛みの発生を軽減することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、本発明のCyr61発現試験を説明するためのフロー図である。

【図2】図2は、本発明の試験で得られた、UVB照射によるCyr61の発現状態を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 1 0 】

〔 リンゴポリフェノールの製造 〕

リンゴ未熟果を洗浄後、破碎・搾汁して果汁を得た。搾汁して得た果汁からペクチンなどの不溶性成分を酵素分解および/または濾過することにより除去した。この果汁をカラムに通液し、ポリフェノール成分をカラムに保持させ、糖類・有機酸類などを水洗浄によって除去した。こののち、アルコール水溶液を用いてカラムよりポリフェノール成分を溶出し、ポリフェノール画分を得た。このポリフェノール画分を減圧濃縮後、噴霧乾燥し、リンゴポリフェノール (A P) を得た。このリンゴポリフェノール (A P) を用いて以下の試験を行った。

【 0 0 1 1 】

10

〔 C y r 6 1 発現試験 〕

本発明による抑制剤の U V B 照射時における C y r 6 1 抑制効果を調べるために、サンプルをそれぞれ作製して試験し、各サンプル内に含まれる C y r 6 1 の発現量を調べた。

(1) サンプル A P 5 (U V B +)

図 1 は、サンプルの作製および C y r 6 1 発現量の測定方法を示す図である。

ステップ A : 不死化ヒト角化細胞株である H a C a T 細胞を 3.5×10^6 cells / 100 mm dish で培養した。

ステップ B : 24 時間培養後に、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリンゴポリフェノール (A P) を含む 5 % 血清入り培地 (F B S - D M E M) に置換してさらに培養した。

ステップ C : 24 時間培養後に、細胞を洗浄し、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリンゴポリフェノール存在下、 $25 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の強度で細胞に U V B 照射を行った。

20

ステップ D : 照射後ただちに、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のリンゴポリフェノールを含む 5 % 血清入り培地に置換してさらに培養した。

ステップ E : 24 時間培養後に、培養上清を回収した。

ステップ F : この培養上清を用いて、あらかじめ 4×10^5 cells / 35 mm dish で播種して 24 時間培養しておいた正常ヒト真皮繊維芽細胞である N H D F 細胞を培養した。

ステップ G : 48 時間培養後に、この培養上清をサンプルとして、ウェスタンブロッティングを実施して、サンプル内に含まれる C y r 6 1 の発現量を調べた。

(2) サンプル A P 5 0 (U V B +)

上述したサンプル A P 5 のステップ B、C および D におけるリンゴポリフェノールの含有量を $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ にそれぞれ変更し、サンプル A P 5 と同様にしてサンプルを作製し、サンプル内に含まれる C y r 6 1 の発現量を調べた。

30

【 0 0 1 2 】

(3) サンプル N o n e、A P M、N A C ; (U V B +)

比較または参考のために、サンプル A P 5 のステップ B、C および D におけるリンゴポリフェノールの代わりに、

a) リンゴポリフェノールを用いない場合 (サンプル N o n e)

b) 抗老化成分として知られている、水溶性のビタミン C 誘導体であるアスコルビン酸リン酸マグネシウム、 $1156 \mu\text{g} / \text{mL}$ を用いた場合 (サンプル A P M)

c) 抗酸化剤の試薬として知られる N - アセチル - L - システイン、 $816 \mu\text{g} / \text{mL}$ を用いた場合 (サンプル N A C)

40

における各サンプルを同様に作製して試験し、各サンプル内に含まれる C y r 6 1 の発現量を調べた。

【 0 0 1 3 】

(4) サンプル A P 5、A P 5 0、N o n e、A P M、N A C ; (U V B -)

また、U V B 照射の有無による違いを確認するために、前述したサンプル A P 5 のステップ C における U V B 照射を行わずに、サンプル A P 5、A P 5 0、N o n e、A P M および N A C を同様に作製して試験し、各サンプル内に含まれる C y r 6 1 の発現量を調べた。

【 0 0 1 4 】

50

〔試験結果〕

上述の各発現試験によりサンプルに含まれたC y r 6 1の発現量を図2に示す。なお、図中、「U V B +」で括られたグループのサンプルが、U V B照射が行われたサンプルであり、「U V B -」で括られたグループのサンプルは、U V B照射が行われなかったサンプルである。両グループの各対応するサンプルを比較すると、コラーゲン産生抑制因子であるC y r 6 1の発現量は、いずれのサンプル間においても、グループU V B +におけるC y r 6 1の発現量がグループU V B -におけるよりも大きくなっていることが確認された。

【0015】

このことから、ヒト皮膚の真皮に到達することのないU V Bが表皮に曝露されると、表皮からシグナル分子が発せられ、そのシグナル分子が真皮に届くことによってC y r 6 1が発現されると考えるのが妥当である。

【0016】

一方、U V B照射したときの本発明のサンプルA P 5およびサンプルA P 5 0におけるC y r 6 1発現量は、リンゴポリフェノールを用いないサンプル(サンプルN o n e)のC y r 6 1発現量の約60%(サンプルA P 5)、約20%(サンプルA P 5 0)に抑制されることが判明した。

【0017】

このことから、少なくとも5 μ g / m Lのリンゴポリフェノールを含むことにより、コラーゲンの産生を抑制する因子であるC y r 6 1の発現を抑制または阻害できることを意味している。

【0018】

〔コラーゲン遺伝子発現試験〕

本発明のC y r 6 1抑制剤による効果を確認するために、本発明のサンプルA P 5およびA P 5 0、並びに比較用サンプルN o n eについて、U V Bを照射しないとき(U V B -)と、照射したとき(U V B +)におけるコラーゲン遺伝子の発現量を測定した。

【0019】

(1) サンプルA P 5 (U V B +)

C y r 6 1発現試験で述べたサンプルA P 5のステップA ~ Fを行った。次いで、

ステップG' : 24時間培養後に、培養したN H D F細胞からm R N Aを回収した。

ステップH' : 回収したm R N Aを逆転写反応によりc D N Aを作製し、このc D N Aを鋳型として、内部標準遺伝子であるG A P D HおよびI型コラーゲンの構成成分の一つ、 α 1鎖をコードする遺伝子であるC O L 1 A 1の遺伝子発現量をリアルタイムP C Rで定量的に解析した。

(2) サンプルA P 5 0 (U V B +)

上記のステップB、CおよびDにおけるリンゴポリフェノールの含有量を50 μ g / m Lにそれぞれ変更して、サンプルA P 5と同様にサンプルを作製し、G A P D HおよびC O L 1 A 1の遺伝子発現量を定量的に解析した。

【0020】

(3) サンプルN o n e (U V B +)

上記のステップB、CおよびDにおけるリンゴポリフェノールを用いずに、サンプルA P 5と同様にサンプルを作製し、G A P D HおよびC O L 1 A 1の遺伝子発現量を定量的に解析した。

【0021】

(4) サンプルN o n e (U V B -)

上記のステップB、CおよびDにおけるリンゴポリフェノールを用いずに、かつ、ステップCにおけるU V B照射を行わずに、サンプルA P 5と同様にサンプルを作製し、G A P D HおよびC O L 1 A 1の遺伝子発現量を定量的に解析した。

【0022】

〔試験結果〕

この結果を表 1 に示す。

【表 1】

表 1：コラーゲン遺伝子発現率（％）

UVB無照射 (UVB-)	UVB照射 (UVB+)		
サンプルNone	サンプルNone	サンプルAP5	サンプルAP50
100	55	87	92

10

【0023】

表 1 から明らかなように、本発明のリンゴポリフェノールを含むサンプル A P 5 およびサンプル A P 5 0 におけるコラーゲン遺伝子の発現量は、U V B 照射しないときのリンゴポリフェノールを含まないサンプル N o n e の 9 0 % 前後を確保しており、また、U V B 照射したときのサンプル N o n e の 1 . 6 倍程度多く発現している。このことから、本発明のリンゴポリフェノールを含むサンプル A P 5 およびサンプル A P 5 0 が、C y r 6 1 によるコラーゲンの産生抑制を抑制または阻害していることが確認された。

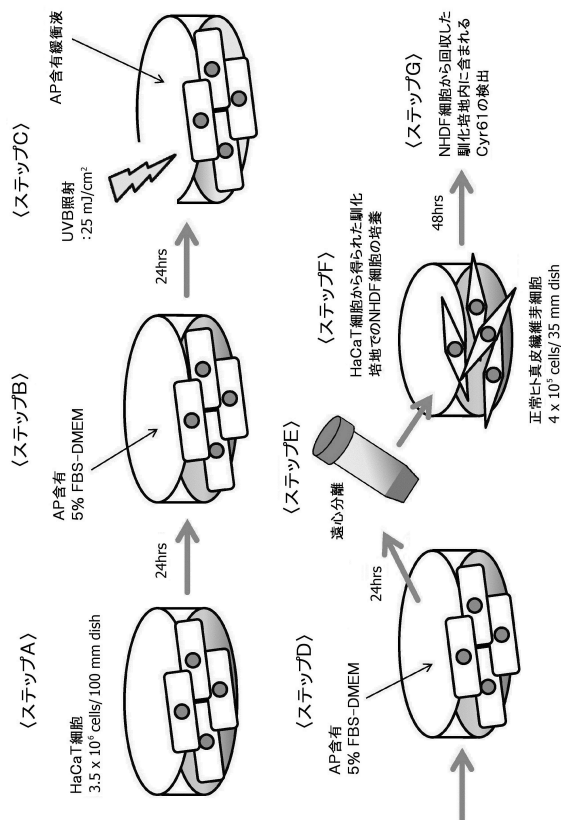
【産業上の利用可能性】

【0024】

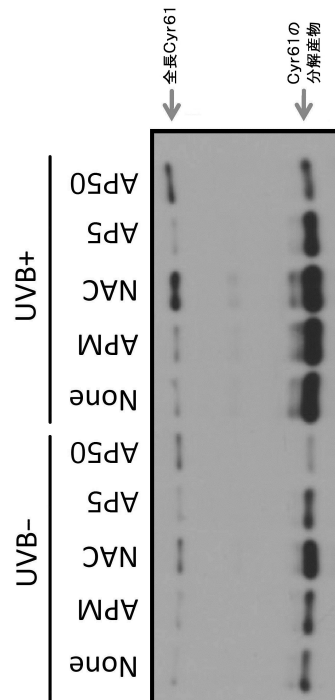
20

本発明の C y r 6 1 発現抑制剤は、化粧水、乳液、クリーム、美容液、ファンデーション、日焼け止め等の化粧品、皮膚外用剤、医薬品等のような、紫外線ケアに用いられる製品に含有させることにより、U V B による皮膚の皺および弛みの発生を軽減することができる。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 17/16 (2006.01) A 6 1 P 17/16

(72)発明者 土江 久美子
埼玉県川越市芳野台 2 - 8 - 5 9 株式会社ちふれ化粧品内
(72)発明者 小山 摂司
埼玉県川越市芳野台 2 - 8 - 5 9 株式会社ちふれ化粧品内

審査官 田中 則充

(56)参考文献 特開平 0 9 - 1 7 5 9 8 2 (J P , A)

(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 K 3 6 / 7 3
A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0
A 6 1 P 1 7 / 0 0 - 1 7 / 1 8