

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6681974号
(P6681974)

(45) 発行日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月26日(2020.3.26)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 8/49 (2006.01)	A 6 1 K 8/49
A 6 1 Q 19/02 (2006.01)	A 6 1 Q 19/02
A 6 1 K 31/352 (2006.01)	A 6 1 K 31/352
A 6 1 K 8/9789 (2017.01)	A 6 1 K 8/9789
A 6 1 K 36/38 (2006.01)	A 6 1 K 36/38

請求項の数 8 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-508209 (P2018-508209)	(73) 特許権者	516172857
(86) (22) 出願日	平成28年9月20日 (2016.9.20)		インダストリーアカデミック コーオペ レイション ファウンデーション キョン サン ナショナル ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2018-523678 (P2018-523678A)		大韓民国 660-701 キョンサンナ ムード チンジューシ チンジューデロ 501
(43) 公表日	平成30年8月23日 (2018.8.23)	(74) 代理人	100108453
(86) 国際出願番号	PCT/KR2016/010466		弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開番号	W02017/052155	(74) 代理人	100110364
(87) 国際公開日	平成29年3月30日 (2017.3.30)		弁理士 実広 信哉
審査請求日	平成30年2月15日 (2018.2.15)	(74) 代理人	100133400
(31) 優先権主張番号	10-2015-0133301		弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成27年9月21日 (2015.9.21)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β-マンゴスチンを有効成分として含有する肌美白用組成物

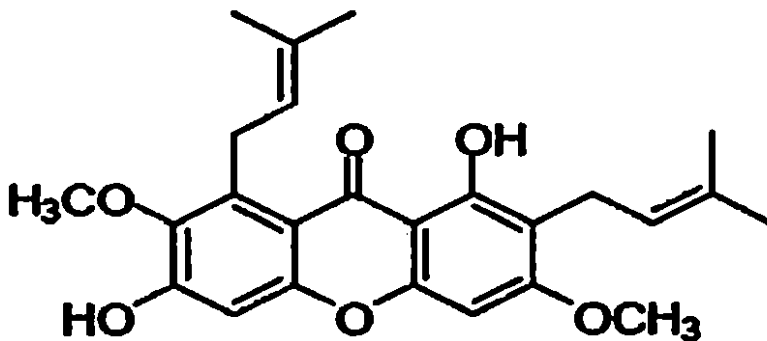
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の化学式 1 で表示される β-マンゴスチン または化粧品学的に許容可能なその塩からなる、肌美白剤。

【化 1】

化学式 1



【請求項 2】

前記 β-マンゴスチン は、マンゴスチンの果皮から分離したものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の肌美白剤。

【請求項 3】

前記 - マンゴスチンは、マンゴスチン果皮をクロロホルムで抽出して分離したものであることを特徴とする、請求項 1 に記載の肌美白剤。

【請求項 4】

溶液、懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、せっけん、界面活性剤を含有しているクレンジング、オイル、ファウンデーション及びスプレーのうち選択されたいずれか一つの剤形である組成物を製造するのに使用されることを特徴とする、請求項 1 に記載の肌美白剤。

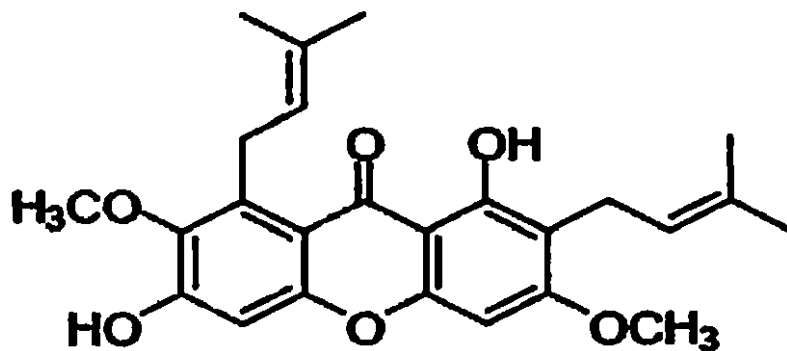
【請求項 5】

下記の化学式 1 で表示される - マンゴスチンまたは薬学的に許容可能なその塩からなる、メラニン色素の過多沈着疾患の治療剤。

10

【化 2】

化学式 1



20

【請求項 6】

前記メラニン色素の過多沈着疾患は、そばかす、老人性斑点、肝斑、シミ、茶色点もしくは黒点、日光色素斑、緑黒皮症、薬物使用後の過多色素沈着、妊娠肝斑、または擦り傷、火傷もしくは皮膚炎による炎症後の過多色素沈着であることを特徴とする、請求項 5 に記載のメラニン色素の過多沈着疾患の治療剤。

30

【請求項 7】

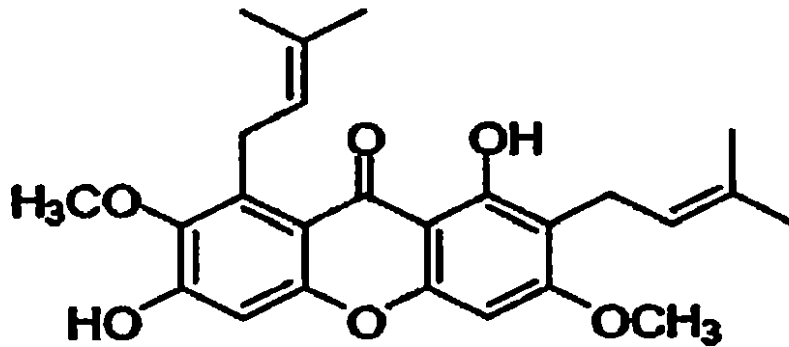
注射剤、クリーム、パッチ、噴霧剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、リニメント剤、ペースト剤及びカタプラスマ剤のうち選択されたいずれか一つの剤形である組成物を製造するのに使用されることを特徴とする、請求項 5 に記載のメラニン色素の過多沈着疾患の治療剤。

【請求項 8】

下記の化学式 1 で表示される - マンゴスチンまたは薬学的に許容可能なその塩からなる、メラニン色素の過多沈着改善剤。

【化3】

化学式1



10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 - マンゴスチンを有効成分として含有する肌美白用組成物に係り、さらに具体的には、チロシナーゼ (ty r o s i n a s e) 及び TRP - 1 (ty r o s i n a s e - r e l a t e d p r o t e i n - 1) の活性を阻害してメラニンの生成及び既に生成されているメラニン含有量を低減させることを特徴とするマンゴスチン由来の - マ

20

【背景技術】

【0002】

肌は、身体組織のうち直接的に外部環境に露出されており、人体の内部と外部環境との間の防御の壁の役割をして化学物質や紫外線を含む外部の環境汚染物質及び微生物の浸透を防御することで周りの環境から生体を保護する。また肌はメラニン、ヘモグロビン、カロチンなどによって色が定められるが、このうちでもメラニンが最も重要な役割を行う。メラニンは、人間の肌色を定める以外にも紫外線吸収作用、そして自由ラジカル消去剤などのように肌保護作用を行う。しかし、紫外線への過多露出、大気汚染、ストレスなどの外部の環境変化によってメラニンが過剰に生成すれば、肌内で色素沈着現象を引き起こして肌の黒化またはシミ、そばかすなどの原因となる。肌の黒化は内的及び外的要因に対する肌細胞の反応によって発生するものであり、代表的な要因は紫外線への露出によるものである。すなわち、肌が紫外線に露出されればチロシナーゼが活性化するが、前記チロシナーゼが肌組織に存在するチロシンに作用してドパ (D O P A) 及びドパキノンを生

成させる酸化過程によって、肌色素細胞であるメラノサイト内のメラノソームでメラニンという重合体が合成され、このようなメラニンが肌の角質形成細胞であるケラチノサイトに伝達され、角質化過程によって肌表面に到達して紫外線から肌を保護する。よって、メラニンは人体になくてはならない紫外線防御剤であり、またタンパク質、地質、核酸などの生体成分を変形させる多様なラジカルを除去する効果的な自由ラジカル消去剤の役割を担っている。しかし、メラニンが局所的に過度に合成されるか、または肌病変及び老化

による肌の生理機能が低下すれば、メラニンが肌表面に沈着してシミ、そばかす及び多様な色素沈着を引き起こすようになる。前記のように肌黒化の原因及びメカニズムが明らかになるにつれて、美白化粧料の製造において肌黒化過程に関与する酵素であるチロシナーゼの活性阻害効果を持つ物質を化粧料に取り合わせるか、またはメラニン生成過程の一部の反応を阻害することでメラニンの生成を低減させる方法が一般的に使われている。このような目的のために使われている代表的な物質としては、アスコルビン酸、コウジ酸、ヒドロキノンなどの化学物質と桑白皮エキス、甘草エキスなどの植物エキスがある。しかし、アスコルビン酸はチロシナーゼ活性阻害効果が足りないだけでなく分子自体の安定性が低くてメラニン生成抑制剤として好適ではなく、コウジ酸はチロシナーゼの阻害活性に優れるが、化粧料に取り合わせる時に変色し、経時的に力価が低下するなど安定性に問

30

40

50

題があるだけでなく、肌刺激が大きくて使用上限界があり、ヒドロキノンには肌刺激及び安定性の問題のため化粧品への使用が制限されている。よって、新しく効果的な美白成分の開発への関心が集中しつつある。

【0003】

一方、マンゴスチン (*Garcinia mangostana*) はマレーシアが原産地である双子葉植物ムクロジ唐辛子科の常緑高木であって、香りがあり甘酸っぱくて実の中の女王と呼ばれるほど美味しい。マンゴスチンの果肉の色素は、タンニンを含含有しているため簡単に色が変わらないため染料として使用できる。マンゴスチンは受精せずに種子を作って植えるため昔から同じ品種が栽培され、栽培が難しく限られた地方のみで育つと知られている。マンゴスチンは、インドネシア、マレーシア、台湾、フィリピン、インド、スリランカなどに分布している。マンゴスチンは殺菌、抗菌、抗アレルギー作用があり、ベータカロチンを多量含有している発ガン物質であるニトロソアミンの生成を阻害すると知られている。また、マンゴスチンは骨粗鬆症予防、視力増進、食欲増進、消化促進、便秘予防、肝機能活性化、結核予防、心臓保護などの効果があると知られている。マンゴスチンの皮にはキサントンが多量含有されていて前記のような優秀な薬理効果を奏すると報告されている。

10

【0004】

一方、日本公開特許第2007-153773号にはキサントン誘導体及びそれを含む肌外用剤及び医薬組成物について開示しており、韓国登録特許第1299013号にはマンゴスチンエキスを含有する色素化疾患の治療用組成物について開示している。しかし、本発明のマンゴスチン由来の - マンゴスチンを有効成分として含有する肌美白用組成物について開示したところがない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、前記のような要求に応じて導出されたものであり、本発明者はマンゴスチンの果皮から - マンゴスチン (- mangostin) を分離し、 - マンゴスチンがチロシナーゼ及びTRP-1 (tyrosinase-related protein - 1) の発現を抑制し、かつメラノソームのオートファジーを誘導するため、本発明の - マンゴスチンがメラニン生成を抑制するだけではなく既に生成されているメラニンを除去する効果まで奏することを確認した上で本発明を完成した。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

前記課題を解決するために、本発明は - マンゴスチンまたは化粧品学的に許容可能なその塩を有効成分として含有する肌美白用化粧料の組成物を提供する。

【0007】

また、本発明は - マンゴスチンまたは薬学的に許容可能なその塩を有効成分として含有するメラニン色素の過剰沈着疾患の予防または治療用の薬学組成物を提供する。

【0008】

また、本発明は - マンゴスチンまたは薬学的に許容可能なその塩を有効成分として含有するメラニン色素の過剰沈着予防または改善用の健康機能食品組成物を提供する。

40

【発明の効果】

【0009】

本発明は - マンゴスチンを有効成分として含有する肌美白用組成物に係り、本発明の - マンゴスチンはチロシナーゼ及びTRP-1 (tyrosinase-related protein - 1) の発現を抑制してメラノソームのオートファジーを誘導するため、本発明の - マンゴスチンがメラニンの生成を抑制するだけではなく、 - MSH (melanocyte-stimulating hormone) によって既に生成されているメラニンを除去する効果まで奏するということが分かった。よって、本発明の - マンゴスチンは肌ホワイトニング及びライトニングのための機能性素材として有用に使

50

われうる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明の一実施形態によるマンゴスチンの果皮から分離及び精製したキサントン系列である -、 -、及び - マンゴスチンの化学構造を示すものである。

【図2】本発明の一実施形態による -、 -、及び - マンゴスチンを濃度別に B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞で処理した時の細胞生存性を示すものである。

【図3】本発明の一実施形態による - M S H 及び - マンゴスチンを濃度別に処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞のペレット色変化を示すものである。

【図4 A】本発明の一実施形態による - M S H 及び - マンゴスチン (A) 及び - マンゴスチン (B) を処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のメラニン含有量変化を示すものである。

10

【図4 B】本発明の一実施形態による - M S H 及び - マンゴスチンを濃度別に処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のメラニン含有量 (A) 及び L - D O P A 酸化 (B) に対する低減効果を示すものである。

【図5】本発明の一実施形態による - M S H 及び - マンゴスチンを濃度別に処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のチロシナーゼ (T y r) 及び T R P - 1 (t y r o s i n a s e - r e l a t e d p r o t e i n - 1) のタンパク質発現量の変化を示すものである。 - チューブリンはローディング・コントロールであり、 - M は - マンゴスチンである。

20

【図6】B 1 6 F 1 0 細胞でのチロシナーゼの減少がプロテアソーム媒介によるものであるかどうかを確認するために、本発明の一実施形態による - M S H、 - マンゴスチン及び M G 1 3 2 を処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のチロシナーゼ (A) の発現、メラニン含有量 (B) 及び L - D O P A 酸化 (C) の程度を示すものである。

- チューブリンはローディング・コントロールであり、M G 1 3 2 はプロテアソーム抑制剤であり、 - M は - マンゴスチンである。

【図7】B 1 6 F 1 0 細胞において - マンゴスチンで誘導された脱色効果がリソゾームに依存的なタンパク質分解によるものであるかどうかを確認するために、本発明の一実施形態による - M S H、 - マンゴスチン及びパフィロマイシン A 1、クロロキン (C Q) 及び 3 - M A (3 - m e t h y l a d e n i n e) を処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のチロシナーゼ、p 6 2、P M E L、L C 3 B - I 及び L C 3 B - II の発現度を示すものである。 - チューブリンはローディング・コントロールであり、パフィロマイシン A 1、クロロキン及び 3 - M A はオートファジー抑制剤であり、 - M は - マンゴスチンである。

30

【図8】本発明の一実施形態による - M S H、 - マンゴスチン及び 3 - M A を処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のメラニン含有量変化を示すものである。

3 - M A はオートファジー抑制剤であり、 - M は - マンゴスチンである。

【図9】本発明の一実施形態による - M S H 及び - マンゴスチンを処理した時、m R F P - E G F P - L C 3 B 発現構造体でのオートファジーによるメラノソームの分解を示すものである。

40

【図10】B 1 6 F 1 0 細胞において - マンゴスチンで誘導されたオートファジーによる脱色効果を確認するために、本発明の一実施形態によるオートファゴソーム伸長に関する A T G 5 (a u t o p h a g y - r e l a t e d g e n e 5) をノックダウンさせた後で - M S H 及び - マンゴスチンを処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のチロシナーゼ、p 6 2 及び P M E L の発現 (A) 及びメラニン含有量 (B) のレベル変化を示すものである。 - チューブリンはローディング・コントロールであり、 - M は - マンゴスチンである。

【図11】本発明の一実施形態による - M S H を処理してメラニンを合成した後で - マンゴスチン及び 3 - M A を処理した時の、B 1 6 F 1 0 マウスメラノーマ細胞内のチロシナーゼ及び P M E L の発現 (A) 及び既に生成されているメラニン含有量 (B) のレベ

50

ル変化を示すものである。 - チューブリンはローディング・コントロールであり、 - Mは - マンゴスチンである。

【発明を実施するための形態】

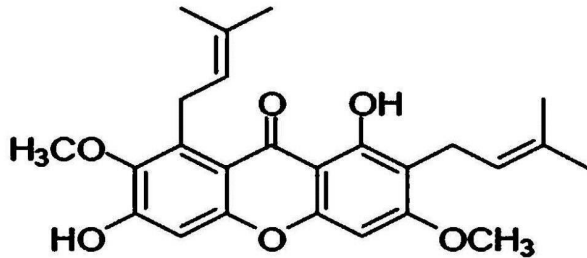
【0011】

本発明の目的を達成するために、本発明は下記の化学式1で表示される - マンゴスチンまたは化粧品学的に許容可能なその塩を有効成分として含有する肌美白用化粧料の組成物を提供する。

【0012】

【化1】

化学式1



【0013】

本発明の肌美白用化粧料の組成物の有効成分は、前記化学式1で表示される構造を持つ - マンゴスチンである。本発明の - マンゴスチンは、メラニン細胞でメラニン生成及び既に生成されているメラニンを有意的に低減させて肌美白活性を持つ。

【0014】

本発明の組成物の有効成分として化粧品学的に許容可能なその塩としては化粧品学的に許容可能な遊離酸によって形成された酸付加塩が有用である。酸付加塩は通常の方法、例えば、化合物を過量の酸水溶液に溶解させ、かつこの塩を水混和性有機溶媒、例えば、メタノール、エタノール、アセトンまたはアセトニトリルを使って沈澱させて製造できる。同一モル量の化合物及び水中の酸またはアルコール（例えば、グリコールモノメチルエーテル）を加熱し、次いで前記混合物を蒸発させて乾燥させるか、または析出された塩を吸引濾過させることができる。この時、遊離酸としては有機酸及び無機酸を使うことができ、無機酸としては塩酸、リン酸、硫酸、硝酸、酒石酸などを使うことができ、有機酸としてはメタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アセト酸、トリフルオロアセト酸、マレイン酸、コハク酸、シュウ酸、安息香酸、酒石酸、フマル酸、マンデル酸、プロピオン酸、クエン酸、乳酸、グリコール酸、グルコン酸、ガラクトロン酸、グルタミン酸、グルタル酸、グルクロン酸、アスパラギン酸、アスコルビン酸、カルボン酸、バニル酸、ヨウ化水素酸などを使えるが、これらに限定されるものではない。

【0015】

一方、美白効果とは、紫外線への露出、ホルモンバランスの変化、遺伝的プログラムなどの各種要因により発生する黒っぽい肌やシミ、そばかす、ダークサークルを改善または防止する効果、肌を透明で美しくする効果、あるいは透明感のある美しい肌を維持する効果、肌のくすみを減らしてツヤ及び弾力性を増大させる効果などを示す。一般的に、黒っぽい肌やシミ、そばかす、ダークサークルは紫外線による刺激やホルモンバランスの変化などによってメラノサイトが刺激され、それによって生合成されたメラニン色素が肌に沈着して発生すると知られている。よって、メラニンの生成を抑制できるならば、黒っぽい肌やシミ、そばかす、ダークサークルを予防・改善できる。

【0016】

前記 - マンゴスチンのメラニン生成の抑制機能を、培養色素細胞を使う試験法で確認した。色素細胞とは、メラニン生成機能を持つ細胞であって、この細胞を通常的に培養した場合にメラニン色素が蓄積して黒色化する。これに対し、この培養系内にメラニン生成の抑制機能を持つ物質があれば、メラニンの生成が抑制されて相対的に白色化する。この

10

20

30

40

50

相対的な白色化の程度からメラニン生成の抑制機能を予想できる。

【0017】

本発明の肌美白用化粧料の組成物において前記 - マンゴスチンは、マンゴスチンの果皮から分離したものでありうるが、これに限定されるものではない。

【0018】

本発明の肌美白用化粧料の組成物において前記 - マンゴスチンは、マンゴスチン果皮をクロロホルムで抽出して分離したものでありうるが、これに限定されるものではない。

【0019】

本発明の肌美白用化粧料の組成物において前記 - マンゴスチンは、チロシナーゼまたは TRP - 1 (tyrosinase - related protein - 1) の活性を阻害できるが、これに限定されるものではない。

10

【0020】

本発明の肌美白用化粧料の組成物において前記 - マンゴスチンは、メラニンの生成を抑制するか、または既に生成されているメラニンを除去できるが、これに限定されるものではない。

【0021】

本発明の一実施形態による化粧料組成物において、前記肌美白用化粧料の組成物は、肌外用軟膏、クリーム、柔軟化粧水、栄養化粧水、パック、エッセンス、ヘアトニック、シャンプー、リンス、ヘアコンディショナー、ヘアトリートメント、ゲル、スキンローション、皮膚軟化剤、スキントナー、アストリンゼント、ローション、ミルクローション、モイスチャーローション、栄養ローション、マッサージクリーム、栄養クリーム、モイスチャークリーム、ハンドクリーム、ファウンデーション、栄養エッセンス、日焼け止め、せっけん、クレンジングフォーム、クレンジングローション、クレンジングクリーム、ボディローション及びボディクレンザーからなる群から選択されたいずれか一つの剤形を持つことができるが、これに限定されるものではない。これら各剤形からなる化粧料組成物はその剤形の製剤化に必要で好適な各種の基剤及び添加物を含有することができ、これら成分の種類及び量は当業者によって容易に選定されうる。

20

【0022】

本発明の化粧料組成物は、有効成分以外にさらに同一または類似した機能を持つ肌美白活性成分を1種以上含有することができる。肌美白活性成分としてはコウジ酸及びその誘導体、アルブチン、アスコルビン酸及びその誘導体、ヒドロキノン及びその誘導体、レゾルシノール、シクロアルカノン、メチレンジオキシフェニルアルカノール、2,7-ジニトロインダゾールまたはつるみかんエキス、米エキス、甘草エキスなどの植物エキスなどがあるが、これに限定されるものではない。

30

【0023】

本発明の化粧料組成物の剤形がペースト、クリームまたはゲルである場合には、担体成分として動物繊維、植物繊維、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、シリカ、タルクまたは酸化亜鉛などが用いられる。

【0024】

本発明の化粧料組成物の剤形がパウダーまたはスプレーである場合には、担体成分としてラクトース、タルク、シリカ、アルミニウムヒドロキシド、カルシウムカルシウムシリケートまたはポリアミドパウダーが用いられ、特にスプレーの場合にはクロロフルオロヒドロカーボン、プロパン・ブタンまたはジメチルエーテルのような推進体を含有することができる。

40

【0025】

本発明の化粧料組成物の剤形が溶液または乳濁液である場合には、担体成分として溶媒、溶媒化剤または乳濁剤が用いられ、例えば、水、エタノール、イソプロパノール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチルグリコールオイル、グリセロール脂肪族エステル、ポ

50

リエチレングリコールまたはソルビタンの脂肪酸エステルがある。

【0026】

本発明の化粧品組成物の剤形が懸濁液である場合には、担体成分として水、エタノールまたはプロピレングリコールのような液体希釈剤、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールエステル及びポリオキシエチレンソルビタンエステルのような懸濁液剤、微小結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、アガまたはトラカントなどが用いられる。

【0027】

本発明の化粧品組成物の剤形が界面活性剤含有のクレンジングである場合には、担体成分として脂肪族アルコール硫酸塩、脂肪族アルコールエーテル硫酸塩、スルホンコハク酸モノエステル、アセトチオネート、イミダゾリウム誘導体、メチルタウリン、サルコシネート、脂肪酸アミドエーテル硫酸塩、アルキルアミドベタイン、脂肪族アルコール、脂肪酸グリセリド、脂肪酸ジエタノールアミド、植物性油、リノリン誘導体またはエトキシ化グリセロール脂肪酸エステルなどが用いられる。

10

【0028】

本発明の化粧品組成物は、蛍光物質、殺菌剤、屈水性誘発物質、保湿剤、芳香剤、芳香剤担体、タンパク質、溶解剤、糖誘導体、日光遮断剤、ビタミン、植物エキスなどを含有する賦形剤をさらに含有することができる。

【0029】

また本発明は、 - マンゴスチンまたは薬学的に許容可能なその塩を含有するメラニン色素の過多沈着疾患の予防または治療用の薬学組成物を提供する。

20

【0030】

前記塩としては、薬学的に許容できるものならば特に限定されず、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、フッ化水素酸、臭化水素酸、ギ酸、酢酸、酒石酸、乳酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸などを使用できる。酸付加塩以外にも水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエチルアミン、3次ブチルアミンのような塩基付加塩も使用できる。

【0031】

本明細書で使われる用語「メラニン色素の過多沈着」は、肌または爪の特定部位でのメラニンの過度な増加によって他の部位に比べて黒くまたは暗くなることを意味する。前記メラニン色素の過多沈着疾患はそばかす、老人性斑点、肝斑、シミ、茶色点もしくは黒点、日光性色素斑、緑黒皮症、薬物使用後の過剰色素沈着、妊娠肝斑、または擦り傷や火傷などの傷もしくは皮膚炎による炎症後の過剰色素沈着などを含有するが、これらに限定されるものではない。

30

【0032】

本発明の薬学組成物は有効成分以外に薬学的に許容される担体を含有することができる、このような担体は製剤化時に通常用いられるものであって、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、澱粉、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微細結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム及びミネラルオイルなどを含有するが、これらに限定されるものではない。本発明の薬学的組成物は前記成分以外に潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁液剤、保存剤などをさらに含有することができる。好適な薬学的に許容される担体及び製剤はレミングトンの薬学的科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995) に詳細に記載されている。

40

【0033】

本発明による薬学組成物の好適な投与量は製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、性別、病的状態、食べ物、投与時間、投与経路、排泄速度及び反応感応性のような要因に

50

よって多様に処方される。一方、本発明の薬学組成物の投与量は、好ましくは、1日あたり0.0001ないし100mg/kg(体重)である。

【0034】

本発明の薬学組成物は経口または非経口で投与でき、非経口投与の場合に、肌に局所的に塗布、静脈内注入、皮下注入、筋肉注入、腹腔注入、経皮投与できる。本発明の薬学組成物がメラニン色素の過剰沈着疾患を治療または予防するために適用される点に鑑みれば、肌に局所的に塗布されることが望ましい。

【0035】

本発明の組成物に含まれる有効成分の濃度は治療の目的、患者の状態、必要期間などに鑑みて定めることができ、特定範囲の濃度に限定されるものではない。

10

【0036】

本発明の薬学組成物は当業者が容易に行える方法によって、薬学的に許容される担体または賦形剤を用いて製剤化することで単位用量の形に製造されるか、または多用量の容器内に内入させて製造される。この時に剤形は注射剤、クリーム、パッチ、噴霧剤、軟膏剤、硬膏剤、ローション剤、リニメント剤、パスタ剤及びカタプラズマ剤のうち選択されたいずれか一つの剤形に製造されてもよく、分散剤または安定化剤をさらに含有することができる。

【0037】

また本発明は、 α -マンゴスチンまたは薬学的に許容可能なその塩を有効成分として含有するメラニン色素の過剰沈着予防または改善用の健康機能食品組成物を提供する。

20

【0038】

本発明の健康機能食品組成物を食品添加物として使う場合、前記健康機能食品組成物をそのまま添加するか、または他の食品または食品成分と共に使われ、通常的な方法によって好適に使われる。有効成分の混合量はその使用目的(予防または改善)によって好適に使われる。一般的に、食品または飲み物の製造時に本発明の健康機能食品組成物は原料に対して15重量部以下、望ましくは10重量部以下の量で添加される。しかし、健康及び衛生を目的とするか、または健康調節を目的として長期間にわたって摂取する場合には前記量は前記範囲以下であり、安定性面で何の問題もないため有効成分は前記範囲以上の量で使われうる。

【0039】

30

前記健康機能食品の種類に特に制限はない。前記健康機能食品組成物を添加できる食品の例としては、肉類、ソーセージ、パン、チョコレート、キャンデー類、スナック類、お菓子類、ピザ、ラーメン、その他の麺類、ガム類、アイスクリーム類などの酪農製品、各種スープ、飲料、お茶ドリンク剤、アルコール飲料及びビタミン複合剤などがあり、通常の意味の健康食品をいずれも含む。

【0040】

また、本発明の健康機能食品組成物は食品、特に機能性食品に製造されうる。本発明の機能性食品は食品の製造時に通常的に添加される成分を含有し、例えば、タンパク質、炭水化物、脂肪、栄養素及び調味剤を含有する。例えば、ドリンク剤に製造される場合には有効成分以外に天然炭水化物または香味剤を追加成分として含有させる。前記天然炭水化物は単糖類(例えば、グルコース、フルクトースなど)、二糖類(例えば、マルトース、スクロースなど)、オリゴ糖、多糖類(例えば、デキストリン、シクロデキストリンなど)、または糖アルコール(例えば、キシリトール、ソルビトール、エリスリトールなど)であることが望ましい。前記香味剤は、天然香味剤(例えば、ソーマチン、ステビア抽出物など)と合成香味剤(例えば、サッカリン、アスパルテームなど)を用いられる。

40

【0041】

前記健康機能食品組成物以外にさまざまな栄養剤、ビタミン、電解質、風味剤、着色剤、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲み物に使われる炭酸化剤などをさらに含有することができる。前記添加される成分の割合はあまり重要ではないが、

50

本発明の健康機能食品組成物100重量部に対して0.01ないし0.1重量部の範囲で選択されることが一般的である。

【0042】

以下、実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明する。これら実施例はひたすら本発明をさらに具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらによって制限されるものではないということは当業者に明らかである。

【実施例】

【0043】

<材料及び方法>

1. 試料の準備

マンゴスチン (*Garcinia mangostana*) の果皮はベトナムから収集し、2009年8月ランシフード社 (www.lanseacokr.com、韓国 ソウル) から提供してもらった。証拠標本は慶北大学 (韓国) の植物標本室に保管した。

【0044】

2. マンゴスチンの分離及び抽出

マンゴスチンを分離及び抽出するために、乾燥したマンゴスチンの果皮0.5kgを粉末化した後、常温でクロロホルムで抽出した。エキスは減圧濃縮器を用いて濃縮させ、暗赤色の残留物(65.6g)を得るために使った溶媒を完全に除去するために乾燥器に保管した。前記残留物の一部(5g)はn-ヘキサン/アセトンの段階的勾配として、シリカゲル(5×50cm、230~400 mesh、500g)カラムクロマトグラフィ[30:1(1.5L)、15:1(1.5L)、10:1(1.5L)、8:1(1.5L)、6:1(1.5L)、4:1(1.5L)、1:1(1.5L)及びアセトン(2L)]方法を実施し、薄層クロマトグラフィ・プロファイルとの比較に基づいて5個の小分画物(CC1~CC5)に区分した。マンゴスチン(252mg)を得る小分画物CC2は、ヘキサン/エチルアセテート勾配(30:1 1:1)を用いたフラッシュカラムクロマトグラフィ法、マンゴスチンの豊かな、マンゴスチン(2453mg)を得る小分画物CC3はヘキサン/エチルアセテート勾配(20:1 1:1)を用いたフラッシュカラムクロマトグラフィ法、及びマンゴスチンの豊かな、マンゴスチン(415mg)を得る小分画物CC4はヘキサン/エチルアセテート勾配(15:1 1:1)を用いたフラッシュカラムクロマトグラフィ法を実施した。精製された化合物は、下記の先行文献のデータと本発明の¹H及び¹³C NMRデータとを比べることで確認した(Ryu et al., 2011, *Phytochemistry* 72, 2148-54)。

【0045】

3. 細胞培養及び化合物

B16F10マウスメラノーマ細胞ラインはATCC(American Type of Culture Collection, USA)から提供してもらい、前記細胞は10%のFBS(fetal bovine serum)及び1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, USA)が添加されたDME(Dulbecco's Modified Eagle's)培地に5%のCO₂加湿培養器で37°Cの条件の下で培養された。MSH(melanocyte-stimulating hormone)、パフィロマイシンA1、3-MA(3-methyladenine)及びクロロキンはシグマ・アルドリッチ、チロシン-EDTAはロンザ(Lonza, USA)及びMTT([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)はアムレスコ(Amresco, USA)から購買して下記の実施例に使った。

【0046】

4. 細胞生存性の測定

B16F10細胞は96・ウェルプレートに24時間培養した後、前記細胞に多様な濃度のマンゴスチン、マンゴスチン、及びマンゴスチンを処理して24時間培養した。次いで、前記細胞

10

20

30

40

50

にMTT (5 μ g / m L) 溶液を添加して3時間培養した後、培地を除去して細胞をDMSOで処理して20分間培養し、マイクロプレート・リーダー (B i o - R a d) を用いて595nmで吸光度を測定した。

【 0 0 4 7 】

5 . メラニン含有量の測定

メラニン含有量の測定は、ヤングら (Y a n g e t a l . , 2 0 0 6 , A c t a p h a r m a c o l o g i c a S i n i c a 2 7 , p p . 1 4 6 7 - 7 3) の方法をやや変形して実施した。B16F10細胞を6・ウェルプレートに分注して24時間培養させた後、前記細胞に - マンゴスチン及び - MSHをそれぞれ1 μ Mずつ処理して48時間培養した。培養された細胞はトリプシン処理法で65 でDMSOが含まれている1N NaOHで24時間溶かして収穫し、マイクロプレート・リーダー (B i o - R a d) を用いて415nmでメラニン含有量を測定した。

10

【 0 0 4 8 】

6 . チロシナーゼ活性の測定

チロシナーゼ活性はオグシラ (O h g u s h i e t a l . , 2 0 0 9 , B i o l o g i c a l & p h a r m a c e u t i c a l b u l l e t i n 3 2 , 3 0 8 - 1 0) の方法をやや変形して測定した。B16F10細胞を6・ウェルプレートに分注して24時間培養させた後、前記細胞に - マンゴスチン及び - MSHをそれぞれ1 μ Mずつ処理して48時間培養した後、培養された前記細胞を収穫して氷で1時間の間に1%のトリトンX - 1 0 0 溶液で溶解させた。タンパク質は4時間の間に5%のCO₂加湿培養器で37 条件の下で100 μ l (2 m g / m l) のL - D O P Aと共に培養し、マイクロプレート・リーダー (B i o - R a d) を用いて490nmで吸光度を測定した。

20

【 0 0 4 9 】

7 . RNA抽出及びRT - PCR

総RNAはRiboEX試薬 (G e n e A l l B i o t e c h n o l o g y C o . L t d , S e o u l , K o r e a) を用いて細胞から抽出し、cDNAは逆転写 (T h e r m o S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A , U S A) を通じて2 μ gのRNAを用いて合成した。PCRは、Solg^TM e - Taq DNAポリメラーゼキット (S o l G e n t C o . L t d , D a e j e o n , K o r e a) を用いて実施し、下記の表1に示したように各プライマーを用いた。

30

【 0 0 5 0 】

【表1】

本発明に使われたプライマー

目標の遺伝子	配列番号	正方向／逆方向	塩基配列
チロシナーゼ	1	正方向	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT
	2	逆方向	TGGTGCTTCATGGGCAAAATC
TRP - 1	3	正方向	GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC
	4	逆方向	AAGACGCTGCACTGCTGGTCT

【 0 0 5 1 】

8 . ウェスタンブロットの分析

総タンパク質は、RIPA溶解バッファ (5 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 % の N P - 4 0 、 0 . 5 % の デ オ キ シ コ ー ル 酸 塩 及 び 0 . 1 % の S D S) を用いて抽出した。前記タンパク質は10 ~ 15%のSDS - PAGE上で分離した後、PVDFメンブレイン (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a , M A , U S A) に移入した。前記メンブレインは0 . 1 % の ツ イ ン 2 0 を 含 有 す る T B S (t r i s - b u f f e r s a l i n e) に1時間の間に5%のスキムミルク及び一次抗体と共に培養させた。チロシナーゼ及びTRP - 1に対する抗体はサンタクルーズ (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y , U S A) 、 L C 3 B 、 p 6 2 及 び A T G 5 はCST (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y , U S A) 、 P M E L (p r e m e l a n o s o m e p r o t e i n) に対する抗体はAbcam (U K) か

40

50

ら購買し、信号感知は向上した化学発光 (Bio-Rad) を通じて確認した。

【0052】

9. 遺伝子移入及び遺伝子抑制

B16F10細胞は、リポフェクタミン3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて mRFP-EGFP-LC3B (Kimura et al., 2007, Autophagy 3, 452-60) に感染させ、前記細胞に -マンゴスチン (10 μM) 及び -MSH (1 μM) を処理して共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo) を用いて分析した。

【0053】

マウス ATG5 siRNA に好適な siRNA はジェノリユーション (Seoul, Korea) から合成し、B16F10細胞は製造社 (Invitrogen社) の指示に従ってリポフェクタミン3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて siATG5 に感染させた後、前記細胞に -マンゴスチン (10 μM) 及び -MSH (1 μM) を48時間の間に処理した後、その結果を確認した。

10

【0054】

10. 統計分析

すべてのデータは unpaired Student's t-test を用いて分析し、結果は $P < 0.05$ である場合に統計的に有意であると見なした。

【0055】

<実施例1> 本発明の -マンゴスチン処理による細胞生存性の分析

本実施例1ではメラニン細胞で脱色を誘導する機能的植物代謝産物を探すために、3種の食用キサントン系列である -、 -、及び -マンゴスチンをマンゴスチンの果皮から分離及び精製した (図1)。前記3種のキサントン系列の細胞毒性を確認するために、B16F10細胞に多様な濃度の -、 -、及び -マンゴスチンを処理して24時間培養し、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 分析を通じて細胞生存性を確認した。その結果、図2に示したようにアルファ及び -マンゴスチンを処理した場合、20 μM 及び 40 μM で強い細胞毒性を示した一方、 -マンゴスチンを処理した場合には40 μM でも細胞毒性を示していないということが分かった。

20

【0056】

<実施例2> 本発明の -マンゴスチン処理によるメラニン含有量の分析

-マンゴスチンが -MSH によって誘導された色素沈着を抑制できるかどうかを調べるため、B16F10細胞を -MSH 及び -マンゴスチンで処理して72時間培養した。その結果、図3に示したように -MSH のみで処理した場合に細胞ペレットが黒色に変わったが、 -マンゴスチンと共に処理した場合にペレットの色が黒色から白色に変わった。すなわち、 -マンゴスチンが -MSH によって誘導された色素沈着を抑制した。また、3種のキサントン系列である -、 -、及び -マンゴスチンのメラニン含有量の低減効果を比べた結果、 -マンゴスチン及び -MSH で共に処理した場合、 -MSH で単独処理した時より約20%のメラニン含有量を低減させ、 -マンゴスチンはメラニン含有量をさらに増加させた (図4A)。一方、本発明の -マンゴスチンは濃度依存的にメラニン含有量及びL-DOPA酸化度を効果的に低減させた (図4B)。特に、 -マンゴスチンと同じ濃度である5 μM を処理した場合に約40%のメラニン含有量を低減させたため、 -マンゴスチンより美白活性が顕著であるということが分かった。また、前記実施例1で調べたように、 -マンゴスチンは細胞毒性が強いため、産業的に有用な美白活性成分としては -マンゴスチンより -マンゴスチンがさらに有用であるということが分かる。

30

40

【0057】

<実施例3> 本発明の -マンゴスチン処理によるプロテアソームに非依存的なメラノソーム除去効果の確認

-マンゴスチンの美白効果を確認するために、チロシナーゼ及びTRP-1について

50

R T - P C R 及びウエスタンブロッティング分析を行った。その結果、図 5 に示したように、 α -マンゴスチンは α -M S H によって誘導されたチロシナーゼ及び T R P - 1 の発現量を効果的に低減させた。

【 0 0 5 8 】

B 1 6 F 1 0 細胞における前記チロシナーゼの減少がプロテアソーム媒介によることであるかどうかを確認するために、プロテアソーム抑制剤である M G 1 3 2 及び本発明の α -マンゴスチンで共に処理した結果、図 6 の (A) に示したように M G 1 3 2 を処理した細胞ではチロシナーゼの発現量が増加せず、メラニン含有量及び L - D O P A 酸化を測定して分析した結果、図 6 の (B) 及び (C) に示したようにメラニン生成及び L - D O P A 酸化にも影響を及ぼしていない。このような結果を通じて、 α -マンゴスチンの脱色効果がプロテアソームによって媒介されるものではなく、他のメカニズムを通じて起きることが分かった。

10

【 0 0 5 9 】

< 実施例 4 > 本発明の α -マンゴスチン処理によるオートファジーに依存的なメラノソーム除去効果の確認

オートファジーは、オートファゴソームとリソゾームとの融合過程を通じて起きるものであり、 α -マンゴスチンで誘導された脱色効果が前記オートファジー過程にリソゾームに依存的なタンパク質分解を通じて起きるかどうかを確認するために、B 1 6 F 1 0 細胞に α -マンゴスチン、 α -M S H 及びリソゾーム活性を阻害するバフィロマイシン A 1 (液胞タイプの H⁺ - A T P a s e 抑制剤) を処理した。その結果、図 7 に示したように前記条件の下でバフィロマイシン A 1 は α -マンゴスチンで誘導されたチロシナーゼの発現抑制を阻害した。すなわち、バフィロマイシン A 1 はオートファゴソーム及びリソゾームの融合を抑制するということが分かった。また、他のオートファジー抑制剤であるクロロキン (C Q) 及び 3 - メチルアデニン (3 - M A) も α -マンゴスチンで誘導されたチロシナーゼの発現抑制を阻害し、オートファジー抑制剤のマーカーである p 6 2 及び P M E L の発現抑制を阻害するということが分かり、3 - M A を処理したグループで α -マンゴスチンにより低減したメラニン含有量が再び増加するということが分かった (図 8) 。

20

【 0 0 6 0 】

α -マンゴスチンがメラノソームのオートファジーを誘導できるかどうかを確認するために、m R F P - E G F P - L C 3 B 発現構造体を B 1 6 F 1 0 細胞に感染させて前記細胞を α -マンゴスチン及び α -M S H 処理した。その結果、図 9 に示したように L C 3 B II はメラノソームメンブレインの形成に関するため、 α -M S H で単独処理した群では黄色メラノソームの数が増加した。一方、 α -M S H 及び α -マンゴスチンで共に処理した群で赤い点の数は増加し、点の総数は減少した。オートファゴソームがメラノソームを取り囲んだ後でリソゾームと融合すれば、オートファゴソーム内の pH は落ちねばならず、E G F P は酸性 pH の条件の下で消滅せねばならない。よって、前記結果を通じて α -マンゴスチンによって増加したオートファジーでメラノソームの分解が起きたということが分かった。

30

【 0 0 6 1 】

また、オートファジー過程で重要な役割を行うオートファゴソームの伸長に関する A T G 5 (a u t o p h a g y - r e l a t e d g e n e 5) の阻害が α -マンゴスチンの媒介された脱色効果に影響を与えられるかどうかを確認した。その結果、図 1 0 に示したように A T G 5 のノックダウンは α -マンゴスチンの存在の下で減少したチロシナーゼ、p 6 2 及び P M E L の発現及びメラニン含有量レベルを再び高め、オートファゴソーム形成過程の中に結合される A T G 5 - A T G 1 2 の発現量を低減させた。すなわち、 α -マンゴスチンがメラノーマ細胞でオートファジーの誘導を通じてメラニンを除去するということが分かった。

40

【 0 0 6 2 】

< 実施例 5 > 本発明の α -マンゴスチン処理による既に生成されているメラノソーム除去効果の確認

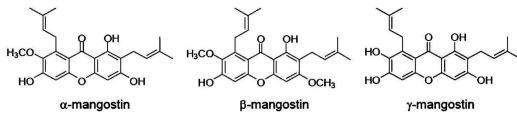
50

メラニン細胞刺激ホルモンである α -MSH によって既に生成されているメラニンを除去する α -マンゴスチンの活性を確認するために、B16F10細胞を2日間 α -MSH 処理した後、メラニンを合成した後で本発明の α -マンゴスチン及びオートファジー抑制剤である3-MAで処理した。その結果、図11に示したように本発明の α -マンゴスチンが相当量のチロシナーゼ及びPMELの発現量を低減させるだけではなく、既に生成されているメラニン含有量も効果的に低減させるということが分かった。

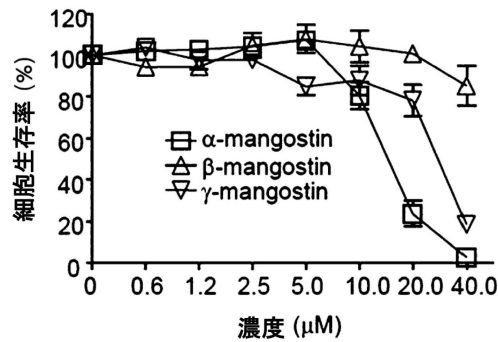
【0063】

本発明の α -マンゴスチンで誘導されたオートファジーはメラノサイトで脱色を調節し、 α -マンゴスチンのようなメラノソームオートファジーの特異的な誘導剤は、肌ホワイトニングやライトニング製剤の開発において非常に有用な素材として活用できると判断される。

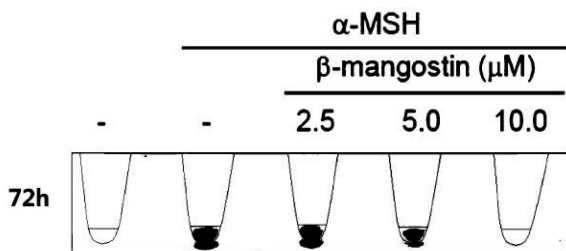
【図1】



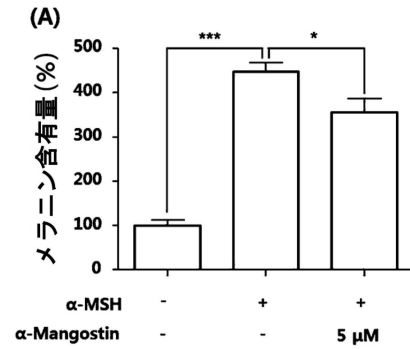
【図2】



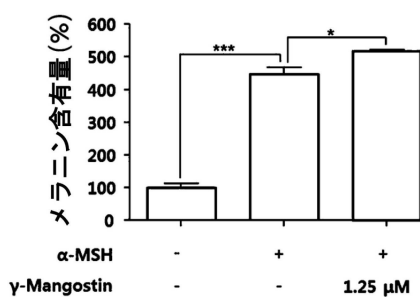
【図3】



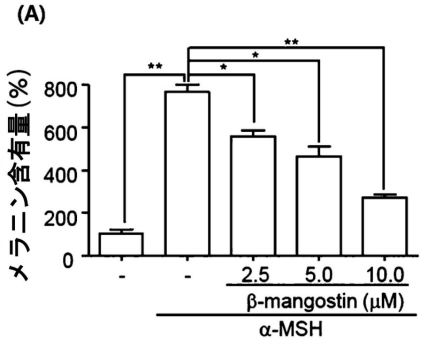
【図4A】



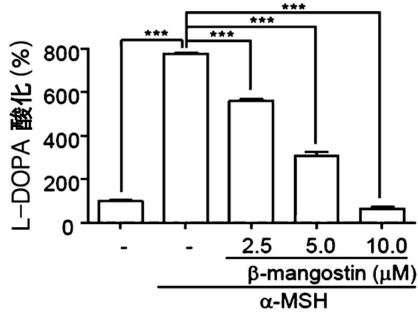
(B)



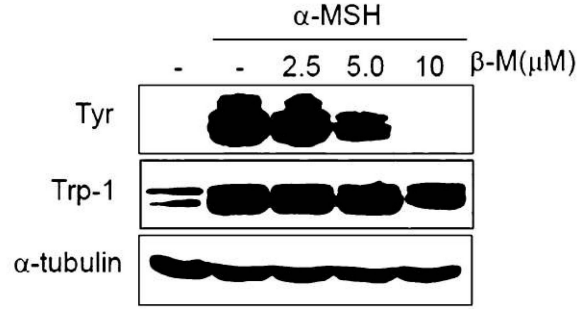
【 図 4 B 】



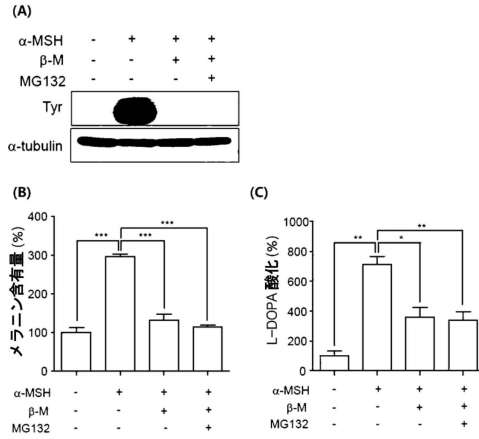
(B)



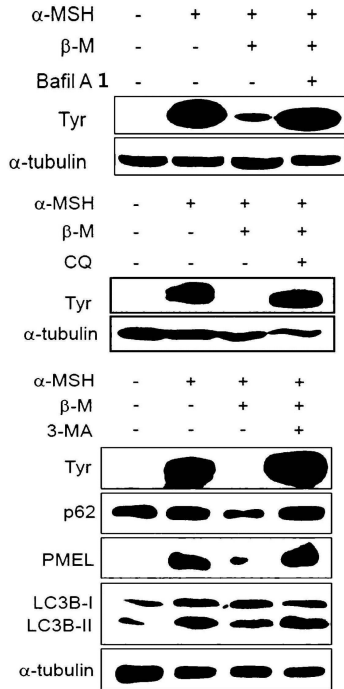
【 図 5 】



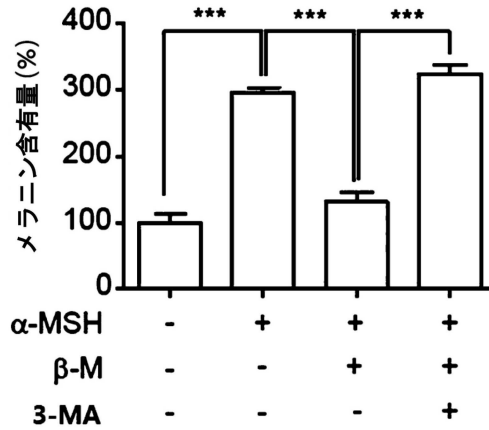
【 図 6 】



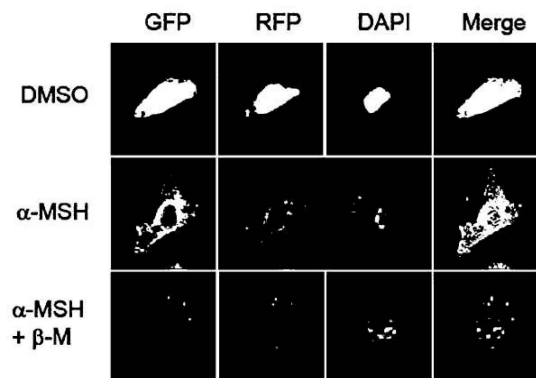
【 図 7 】



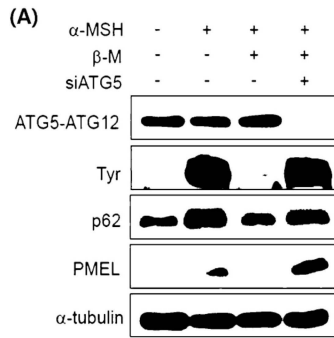
【 図 8 】



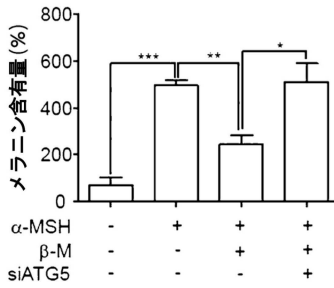
【 図 9 】



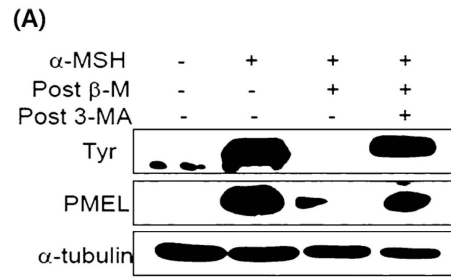
【 図 1 0 】



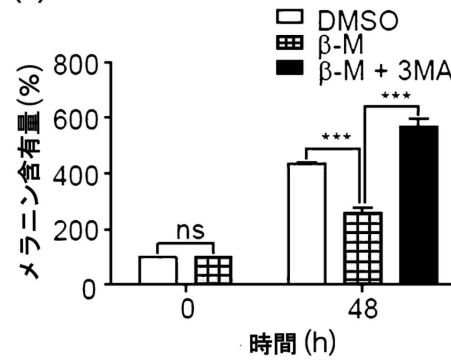
(B)



【 図 1 1 】



(B)



【 配列表 】

0006681974000001.app

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 Q	1/02	(2006.01)	A 6 1 Q	1/02	
A 6 1 Q	19/10	(2006.01)	A 6 1 Q	19/10	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08	
A 6 1 K	9/10	(2006.01)	A 6 1 K	9/10	
A 6 1 K	9/06	(2006.01)	A 6 1 K	9/06	
A 6 1 K	9/12	(2006.01)	A 6 1 K	9/12	
A 6 1 K	9/70	(2006.01)	A 6 1 K	9/70	4 0 1
A 2 3 L	33/105	(2016.01)	A 2 3 L	33/105	Z N A
C 0 7 D	311/86	(2006.01)	C 0 7 D	311/86	
A 6 1 K	131/00	(2006.01)	A 6 1 K	131:00	

- (72)発明者 キム, クワン ドン
大韓民国, キョンサンナム - ド, チンジュ - シ, ソクカブ - ロ 5 3 ボン - ギル, 2 8 , 1 0 4 - 9 0 1
- (72)発明者 ユ, ジ ユン
大韓民国, キョンサンナム - ド, チンジュ - シ, ソクカブ - ロ 5 3 ボン - ギル, 2 8 , 1 0 4 - 1 1 0 2
- (72)発明者 リュ, ヒョン ウォン
大韓民国, テジョン, ソ - ク, テドク - テロ 1 7 5 ボン - ギル, 6 0 , 1 2 0 7
- (72)発明者 パク, ソチョン
大韓民国, チュンチョンナム - ド, タンジン - シ, ハブドク - ウブ, ウンメミ - ギル, 1 1 1 - 5 5
- (72)発明者 リ, キウォン
大韓民国, キョンサンナム - ド, チャンウォン - シ, ソンサン - グ, ウォニ - デロ, 7 7 4 , 1 0 3 - 2 5 1 3
- (72)発明者 パク, キ フン
大韓民国, キョンサンナム - ド, チンジュ - シ, チョジャン - ロ 1 4 ボン - ギル, 2 9 , 2 0 5 - 4 0 2
- (72)発明者 オ, サンソク
大韓民国, キョンサンナム - ド, チンジュ - シ, マルチゴガエ - ロ 1 1 3 , 1 0 1 - 1 3 0 4

審査官 山崎 直也

- (56)参考文献 特開平04 - 244004 (JP, A)
中国特許出願公開第103393576 (CN, A)
国際公開第2013/129334 (WO, A1)
特開2012 - 131789 (JP, A)
国際公開第2006/137139 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9
A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0
A 6 1 P 1 7 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)