

(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
2020年11月19日(19.11.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/230331 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 8/9789 (2017.01) A61P 43/00 (2006.01)
A23L 29/206 (2016.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 36/58 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 36/736 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 36/78 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/019573

(22) 国際出願日: 2019年5月16日(16.05.2019)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

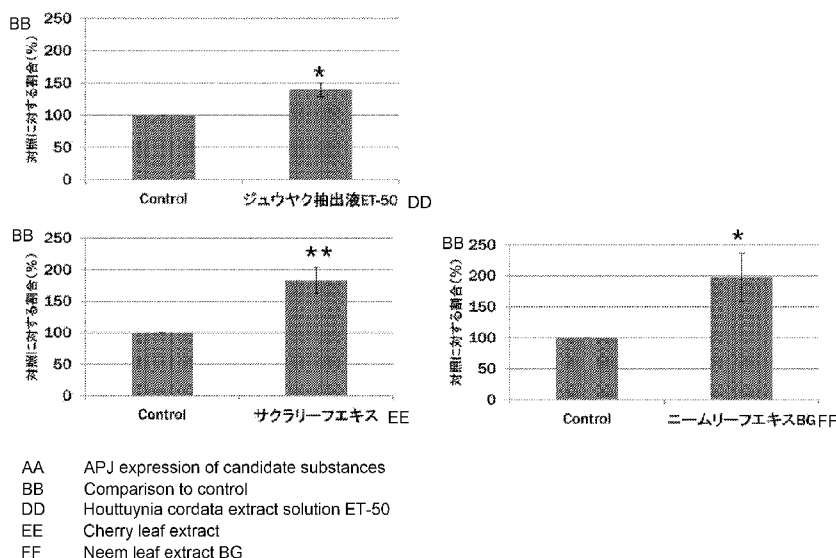
(71) 出願人: 株式会社 資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 加治屋 美加(KAJIYA, Mika); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). 加治屋 健太朗(KAJIYA, Kentaro); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). 上田 有紀(UEDA, Yuki); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP). 松尾 綾野(MATSUO, Ayano); 〒1040061 東京都中央区銀座7丁目5番5号 株式会社資生堂内 Tokyo (JP).

(54) Title: APJ EXPRESSION PROMOTER

(54) 発明の名称: A P J 発現促進剤

図10 候補物質のAPJ発現



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a substance that improves skin elasticity and a method for screening for substances having a skin elasticity-improving action. Provided are an APJ expression promoter and an agent that is effective in improving skin elasticity through vascular stabilization by using said promoter to enhance the expression of APJ. The APJ expression promoter, which includes one or a plurality of crude drugs selected from the group consisting of Houltuyenia cordata extract, cherry leaf extract, and neem leaf extract, is effective in improving skin

(74) 代理人：青 木 篤，外 (AOKI, Atsushi et al.);
〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5
番1号 虎ノ門37森ビル青和特許
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, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, 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：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

elasticity through vascular stabilization. A screening method according to the present invention makes it possible to select a substance having a skin elasticity-improving action.

(57) 要約：皮膚弾力を改善する物質、並びに、皮膚弾力改善作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。APJ発現促進剤およびかかる剤を用いてAPJの発現を増強させることによる血管の安定化を介し皮膚弾力改善に有効な剤を提供する。ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスからなる群から選択される1又は複数の生薬を含むAPJ発現促進剤は、血管の安定化を介し皮膚弾力改善に有効である。本発明のスクリーニング方法により、皮膚弾力を改善作用を有する物質を選択することができる。

明 細 書

発明の名称： A P J 発現促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、APJ発現促進剤に関する。

背景技術

[0002] 皮膚弾力は、見た目の年齢や外観に影響が大きく、皮膚弾力を維持、改善することは、美容上の大きな課題である。皮膚弾力は、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸といった、真皮層のマトリックスに関する研究が多くなされている。例えば、真皮層のコラーゲンの量が大きく影響することはよく知られている。従来の美容方法では、皮膚弾力の改善を達成するために、真皮線維芽細胞の賦活化により弾性線維を増加させることに注力してきており、真皮線維芽細胞の賦活作用や、コラーゲン産生促進作用を有する成分が発見され、化粧品に応用されている。

[0003] これまでに、コラーゲンの産生促進させることで皮膚の加齢変化を予防・改善する天然物由来の成分としては、イソフラボン化合物、フィトステロールなどが報告され、またボタンボウフウ（国際公開第2013/099378号）、コノテガシワ種子（国際公開第2012/057123号）、リュウキュウチク、オオイタビ及びツルナ（特開2011-195505号公報）などの植物エキスを見出している。また、線維芽細胞において発現するインテグリンなどの接着分子を介して、線維芽細胞が細胞外マトリクスと相互作用し、かかる相互作用がハリに関与することが知られている（非特許文献1）。これまでの知見は、皮膚弾力とコラーゲンまたは線維芽細胞の接着分子との関係に着目するものである。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第5808769号公報

特許文献2：特開2012-20942号公報

特許文献3：特開2013-209339号公報

特許文献4：国際公開第2012/133825号

特許文献5：特開2018-172410号公報

特許文献6：特表2019-501899号公報

特許文献7：国際公開第2007/072980号

特許文献8：特許第5648149号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：J. Inv. Dermatology (2013) vol. 133, 899-906

非特許文献2：BLOOD, 2010, VOLUME 115, NUMBER 15, 3166-3174

非特許文献3：DIABETES, VOL. 62, JUNE 2013, 1970-1980

非特許文献4：J Cell Physiol. 2019;234:61-74

非特許文献5：Kidoya et al., EMBO J. 2008 Feb 6;27(3):522-34

非特許文献6：Kajiya et al., J Dermatol Sci. 2018 Oct;92(1):3-5

非特許文献7：Nakatani et al., Skin Res Technol. 2013 Feb;19(1):e332-8

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、従来の皮膚弾力改善剤や手法とは異なるメカニズムにより、皮膚弾力を改善する物質、並びに、皮膚弾力改善作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは皮膚弾力を改善すべく鋭意研究した結果、APJの発現を増強させることによる血管の安定化、機能向上を介して、及び/又は加齢による皮膚血管の減少を抑制することで皮膚弾力が改善することを発見し、更には、APJの発現を促進する新規な物質も発見し本発明に至った。

[0008] 本発明は、下記の発明に関する：

(1) 皮膚弾力を改善するための、APJ発現促進剤。

(2) ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスカ
らなる群から選択される1又は複数の生薬からなる、APJ発現促進剤。

(3)

(1) 又は (2) に記載のAPJ発現促進剤を含む、皮膚弾力改善剤。

(4)

APJ発現を指標とした皮膚弾力改善剤のスクリーニング方法。

(5)

候補薬剤を含む培地で生体試料を培養すること、

生体試料におけるAPJ発現を測定すること、および

対照に比較してAPJ発現が増加した場合に、候補薬剤を皮膚弾力改善作用を有する物質として決定すること、

を含む (4) に記載のスクリーニング方法。

(6)

APJ発現を決定するための試薬を含む、(4) 又は (5) のいずれか1項に記載のスクリーニング方法を実施するためのキット。

(7)

対象のAPJ発現を促進させることを含む、対象の皮膚弾力を改善するための美容目的の方法。

(8)

対象のAPJ発現の促進は、(3) に記載の皮膚弾力改善剤を対象に投与することにより達成される、(7) に記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明のAPJ発現促進剤は、APJの発現を促進することができる。APJの発現が促進されると、血管の安定化が図られ、皮膚弾力が改善される。ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスからなる群から選択される1又は複数の生薬を含むAPJ発現促進剤は、血管の安定化を介し皮膚弾力改善に有効である。また、本発明のスクリーニング方法により、皮膚弾力を改善作用を有する物質を選択することができる。本発明のスクリーニング方法により選択された皮膚弾力改善剤は、APJの発現促進により、血管の安定化を介して、皮膚弾力を改善する。皮膚弾力を改善することにより、シ

ワ、たるみといった肌の問題を改善することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、3D血管形成真皮モデル作成の様子を示す。

[図2]図2は、抗PECAM-1/CD31抗体で染色した血管（緑）および抗type I Collagen抗体で染色したI型コラーゲン（赤）の局在を示す血管形成モデルの顕微鏡写真である。

[図3]図3の左図は、ヒト皮膚切片の音速（硬さ）値（m/s）を超音波音速顕微鏡により、測定した得た画像と同切片の血管（赤）を可視化した免疫染色画像を重ね合わせたものである。代表例として、若年者（20歳）と中高齢者（50歳）について示している。右図は、血管周囲の音速（硬さ）値を定量化し、若年者（10～20歳）と中高齢者（50～70歳）の平均を示したグラフである。図中、***は、Studentのt検定により有意差があることを示す（*** $p<0.001$ ）。

[図4]図4は、コラーゲン濃度（mg/ml）と貯蔵弾性率 G' （Pa）との関係を示すグラフである。

[図5]図5は、コラーゲン濃度（mg/ml）と接触力（mN）との関係を示すグラフである。

[図6]図6は、各濃度（mg/ml）を有するコラーゲングル内で培養した3D血管形成真皮モデルを抗PECAM-1/CD31抗体で染色し血管（緑）を、およびCy3 α SMA抗体で染色しペリサイト（赤）を可視化した顕微鏡写真である。

[図7]図7の左図は、コラーゲングル濃度と各濃度を有するコラーゲングル内で培養した血管内皮細胞におけるAPJのmRNA発現量の関係を示すグラフであり、ゲル濃度が0mg/ml（-）の場合の発現量を100とした相対値（%）で示す。

図中、*、**は、Studentのt検定により有意差があることを示す（* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ ）。右図は、コラーゲングルにおいて形成された3D血管形成真皮モデルにおける抗PECAM-1/CD31抗体で染色した血管（緑）、Hoechstで染色した細胞核（青）、および抗APJ抗体で染色したAPJ（赤）の局在を示す顕微鏡写真である。

[図8]図8の左図は、APJ高発現ベクターをトランスフェクトしてAPJを高発現させた3D血管形成真皮モデル作成の概略を示す。右図は、対照およびAPJを高発現させた3D血管形成真皮モデルにおける抗PECAM-1/CD31抗体で染色した血管構造(赤)を示す顕微鏡写真である。

[図9]図9は、本願から導かれる皮膚の弾性とAPJの発現、及びそれに伴う血管安定化との関係の概念を示す模式図である。

[図10]図10は、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスをを用いた場合のAPJの発現を、対照(control)を100とした場合の相対値(%)として示す。図中、*、**は、Studentのt検定により対照に対し有意差があることを示す(* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。

発明を実施するための形態

[0011] APJ (別名、AGTRL1: Angiotensin receptor like 1) は、血管系、神経系、脂肪細胞などで広く発現が報告されている7回膜貫通型のGタンパク質共役型の受容体である。APJの発現は、心臓では心筋収縮作用、神経系ではバソプレシンの発現の制御、血管やリンパ管の安定、体液の調節機構等に関与することが示されている。血管系においては、血管内皮細胞や壁細胞などに発現することが報告されており、心血管系や末梢血管などの血管形成において重要な役割を果たすと考えられる。血管では、アペリン(APJ endogenous ligand)がAPJ受容体に結合することにより、血圧降下、血管新生、動脈硬化、虚血の回復等に関与していることが報告されている。また、様々なAPJアゴニストの探索や、APJアゴニストを用いた心血管不全、血管障害、気分障害など各種疾患の治療も研究されている(特許文献1~7、非特許文献1~5)。

[0012] しかしながらこれまでの知見で、皮膚弾力とAPJ発現との関連については知られていない。驚くべきことに、本発明者らは、APJの発現を促進することにより血管の安定化が起こり血管周囲でコラーゲンが合成される、つまり皮膚弾力が改善することを発見した。更には、皮膚弾力に大きく関与するマトリックス弾性といった周囲環境の物性に応じてAPJの発現が変化することも発見した。つまり、血管におけるAPJ発現とコラーゲン合成等による皮膚弾力とい

った物性は密接に相互作用しており、生体内ではAPJが周囲のマトリックス環境の物性に応じて発現増強すること、その結果血管構造を安定化し、周囲でコラーゲン合成が促され皮膚は適切な弾性を維持する機序を発見した。

[0013] 本発明は、このような発明者らの知見に基づくものであり、皮膚弾力を改善するためのAPJ発現促進剤に関する。1実施形態では、本発明のAPJ発現促進剤は、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスからなる群から選択される1又は複数の生薬からなる又は含む。しかしながら、APJの発現を促進することができる物質であればこれらに限定されず、例えば、特許文献3、4、7、非特許文献4、等に記載のようなAPJ活性化剤を用いてもよい。

[0014] ジュウヤク (*Houttuynia cordata*) は、別名ドクダミとも呼ばれ、日本各地、中国、ベトナムなどのアジア地域に広く分布するドクダミ科ドクダミ属の多年草である。葉、茎、花、根などの植物体が、利尿作用、高血圧、動脈硬化等の薬用として用いられている。ジュウヤクエキスは、ジュウヤクの植物体、特に地上部を抽出した抽出物のことをいう。

[0015] サクラリーフは、サクラ属 (*Prunus*) に属する植物、例えば、ソメイヨシノ (*Prunus yedoensis* Matsum.)、オオシマザクラ (*Prunus lannesiana* var. *speciosa*.)、サトザクラ (*Prunus serrulata*) といった植物の葉を指す。サクラ属は、日本各地、東アジア、北アメリカ等各地に見られるバラ科の落葉広葉樹である。サクラリーフには、保湿作用、美白作用、抗炎症作用などを有することが知られている。サクラリーフエキスは、サクラ属の葉を抽出した抽出物のことをいう。

[0016] ニーム (*Azadirachta indica*) とは、別名インドセンダンとも呼ばれるインド原産のセンダン科の樹木である。ニームは、インドやスリランカ等において、殺菌作用、保湿作用等の効果を目的としてアーユルヴェーダなどに用いられている。ニームリーフエキスは、ニームの葉を抽出した抽出物のことをいう。

[0017] 上述の植物の抽出物は、化粧品原料や健康食品材料として市販のものを使

用してもよく、常法により得てもよい。抽出方法は特に限定されるものではないが、溶媒を用いた抽出法が好ましい。抽出を行う際には、原料植物を抽出溶媒とともに常温又は加熱して浸漬または加熱還流した後、濾過し、濃縮して得ることができる。植物体をそのまま使用することもできるが、顆粒状や粉末状に粉碎して抽出に供した方が、穏和な条件で短時間に高い抽出効率で有効成分の抽出を行うことができる。抽出温度は特に限定されるものではなく、粉碎物の粒径や溶媒の種類等に応じて適宜設定すればよい。通常は、室温から溶媒の沸点までの範囲内で設定される。また、抽出時間も特に限定されるものではなく、粉碎物の粒径、溶媒の種類、抽出温度等に応じて適宜設定すればよい。さらに、抽出時には、攪拌を行ってもよいし、攪拌せず静置してもよいし、超音波を加えてもよい。

[0018] 抽出溶媒としては、通常抽出に用いられる溶媒であれば任意に用いることができ、例えば、水性溶媒、例えば水、生理食塩水、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、あるいは有機溶媒、例えばエタノール、プロピレングリコール、1、3-ブチレングリコール、グリセリン等のアルコール類、含水アルコール類、クロロホルム、ジクロルエタン、四塩化炭素、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン等を、それぞれ単独あるいは組み合わせて用いることができる。

[0019] このような抽出操作により、有効成分が抽出され、溶媒に溶け込む。抽出物を含む溶媒は、そのまま使用してもよいが、滅菌、洗浄、濾過、脱色、脱臭等の慣用の精製処理を加えてから使用してもよい。また、必要により凍結乾燥などにより濃縮あるいは任意の溶媒で希釈してから使用してもよい。さらに、溶媒を全て揮発させて固体状（乾燥物）としてから使用してもよいし、該乾燥物を任意の溶媒に再溶解してから使用してもよい。

[0020] また、原料の植物を圧搾することにより得られる圧搾液にも抽出物と同様の有効成分が含まれているので、抽出物の代わりに圧搾液を使用することもできる。

[0021] 本発明のAPJ発現促進剤は、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスからなる群から選択される1又は複数の生薬からなって

もよく、又は有効成分として含有してもよい。また、本発明の皮膚弾力改善剤は、本発明のAPJ発現促進剤を含有する。例えば、本発明の皮膚弾力改善剤は、APJ発現を促進し、発現が促進されたAPJが血管に作用し安定化することにより、血管周囲でコラーゲン合成が促進され、皮膚弾力を改善することができる。

[0022] 皮膚弾力の改善とは、皮膚の状態を柔らかすぎず、硬すぎない最適な状態にすることをいう。例えば、柔らかすぎる場合はむくみや浮腫のような状態であり、硬すぎる場合はしこり、いば、腫瘍といった状態である可能性も考えられるため、限定されないものの、実施例に記載のようなヒト頬の接触力の平均である約17.5mNを中心とした接触力、例えば、約10.0mN～22.0mN、約12.0mN～20.0mNといった範囲の接触力、あるいは、このような範囲の接触力に対応するコラーゲン濃度を中心とし、かつ、APJの発現量が高い約0.5～1.00mg/ml、約0.6～0.9mg/mlのコラーゲングル濃度に対応する弾性率、例えば、約5.0～30.0Pa、約5.0～20.0Paといった範囲の貯蔵弾性率でもよい。また、老化に伴い皮膚が弾力を失い柔らかくなることが知られている。よって、皮膚弾力の改善とは、例えば老化やむくみ等により低くなった弾力、例えば、5.0mN未満、6.0mN未満、7.0mN未満、8.0mN未満、9.0mN未満、10.0mN未満、11.0mN未満、12.0mN未満、13.0mN未満、14.0mN未満、15.0mN未満、16.0mN未満、17.0mN未満といった接触力、から上昇させることであってもよく、あるいは、約10.0mN～22.0mN、約12.0mN～20.0mNといった適正值の範囲内にある現在の弾力を上記適正值の範囲内で更に上昇させることであってもよい。上昇は、例えば、接触力又は貯蔵弾性率を、有意水準を5%とした統計学的有意差（例えばスチューデントのt検定）を有する上昇であってもよく、及び／又は、例えば、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上の上昇であってもよい。あるいは、皮膚の接触力又は貯蔵弾性率を上記適正值の範囲内で維持することであってもよい。

[0023] APJ発現の促進は、例えば、生体試料におけるAPJのmRNA量又はタンパク質

量が、本発明のAPJ発現促進剤を添加すると、添加しない場合と比べて増加することを意味してもよい。増加は、例えば、有意水準を5%とした統計学的有意差（例えばスチューデントのt検定）を有する増加であってもよく、及び／又は、例えば10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、100%以上の増加であってもよい。

[0024] 本発明のAPJ発現促進剤及び皮膚弾力改善剤（以降これらを総称して「本発明の剤」という場合がある。）は、上記の有効成分の何れか1種を単独で含有してもよく、2種類以上を任意の組み合わせ及び比率で含有してもよい。

[0025] 本発明の剤は、上記の有効成分を、1種又は2種以上の他の成分、例えば賦形剤、担体及び/又は希釈剤等と組み合わせた組成物とすることもできる。組成物の組成や形態は任意であり、有効成分や用途等の条件に応じて適切に選択すればよい。当該組成物は、その剤形に応じ、賦形剤、担体及び/又は希釈剤等及び他の成分と適宜組み合わせた処方で、常法を用いて製造することができる。

[0026] 本発明の剤は経口的にあるいは非経口的（経皮投与、静脈投与、腹腔内投与、等）に適宜に使用され、任意の経路で投与されてもよいが、皮膚の血管に作用するよう経皮投与が好ましい。

[0027] 本発明の剤は、化粧品、医薬品、医薬部外品等に配合してヒト及び動物に使用してもよく、各種の飲食品、例えばサプリメントなどの栄養補助食品に配合してヒト及び動物に摂取させてもよいし、或いは医薬製剤としてヒト及び動物に投与してもよい。

[0028] 本発明を化粧品、医薬品、医薬部外品等の皮膚外用剤に適用する場合、上記抽出物といった有効成分の配合量（乾燥質量）は、それらの種類、目的、形態、利用方法などに応じて、適宜決めることができる。例えば、化粧料全量中に、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスをそれぞれ約0.000001%～50.0%（乾燥質量換算）を配合でき、特に約0.001%～10.0%（乾燥質量換算）となるように添加してもよい。

[0029] 上記成分に加えて、さらに必要により、本発明の効果を損なわない範囲内

で、通常化粧品、医薬品、医薬部外品等々の皮膚外用剤に用いられる成分、例えば酸化防止剤、油分、紫外線防御剤、界面活性剤、増粘剤、アルコール類、粉末成分、色材、水性成分、水、各種皮膚栄養剤等を必要に応じて適宜配合することができる。

[0030] さらに、エデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等の金属イオン封鎖剤、メチルパラベン、エチルパラベン、ブチルパラベン等の防腐剤、カフェイン、タンニン、ベラパミル、トラネキサム酸及びその誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種生薬、酢酸トコフェロール、グリチルリチン酸及びその誘導体又はその塩等の薬剤、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美白剤、グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類なども適宜配合することができる。

[0031] 本発明の皮膚外用剤は、外皮に適用される化粧料、医薬部外品等、特に好適には化粧料として適用可能であり、その剤型も皮膚に適用できるものであれば限定されず、溶液系、可溶化系、乳化系、粉末分散系、水-油二層系、水-油-粉末三層系、軟膏、化粧水、ゲル、エアゾール等、任意の剤型が適用される。

[0032] 本発明の剤を化粧品として用いる場合は、例えば、フェイスクリーム、マッサージクリーム、ボディクリーム、乳液、ローション、美容液、ジェル、パック、クレンジングクリーム、ハンドクリーム、化粧水、ファンデーション、口紅、リップクリーム、ハンドパウダー、ボディシャンプー、浴用化粧品等の形態として用いてもよい。

[0033] 本発明の剤を飲食品等に配合する場合、植物体又はその抽出物の配合量（乾燥質量）は、それらの種類、目的、形態、利用方法等に応じて適宜決めることができる。例えば、成人一日当たり植物又はその抽出物の摂取量が、約0.00001mg～10.0g（乾燥残分）、約0.001mg～5.0g（乾燥残分）程度になるように配合できる。

- [0034] 飲食品や飼料の形態としては、任意の形態とすることが可能であり、例えば、顆粒状、粒状、ペースト状、ゲル状、固形状、又は、液体状にすることができる。これらの形態には、飲食品等に含有することが認められている公知の各種物質、例えば、結合剤、崩壊剤、増粘剤、分散剤、再吸収促進剤、矯味剤、緩衝剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤やpH調製剤等の賦形剤を適宜含有させることができる。
- [0035] 剤型も任意で、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の経口用固形製剤や、内服液剤、シロップ剤等の経口用液体製剤、又は、注射剤などの非経口用液体製剤など、いずれの形態にも公知の方法により適宜調製することができる。外用製剤であれば、ローション剤、懸濁剤・乳剤、液剤、軟膏剤、貼付剤等の各種形態として使用できる。これらの製剤には、通常用いられる結合剤、崩壊剤、増粘剤、分散剤、再吸収促進剤、矯味剤、緩衝剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤やpH調整剤などの賦形剤を適宜使用してもよい。
- [0036] しかしながら、本発明の剤の採り得る形態は、上述のものに限定されるものではない。
- [0037] また、本発明は、生体試料におけるAPJ発現を指標とした皮膚弾力改善剤のスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング方法は、例えば以下の工程：候補薬剤を含む培地で生体試料を培養すること；生体試料におけるAPJ発現を測定すること；および、対照に比較してAPJ発現が増加した場合に、候補薬剤を皮膚弾力改善作用を有する物質として決定すること；を含む。ここで、対照は、候補薬剤が含まれない培地で培養している点で異なる場合のAPJ発現である。対照についての実験は、本発明のスクリーニング方法と並行して行われていてもよいし、予め行われていてもよい。
- [0038] 本発明のスクリーニング方法で使用する生体試料としては、血管内皮細胞、脂肪細胞など任意であり、APJ発現が測定できれば限定されない。例えば、実施例に記載のようにヒト等の動物の皮下脂肪組織から血管形成を誘導して作成した血管モデルにおける血管内皮細胞、ペリサイトといった血管構成細

胞でもよく、生体から取得された血管内皮細胞、ペリサイト、又はそれらの継代された細胞であってもよく、株化された細胞であってもよく、HUVEC、HAEC、HMVEC等を用いてもよい。あるいは、特許文献3、特許文献4に記載のように、APJ発現細胞を用いてもよい。

[0039] また、候補薬剤を含む培地で生体試料を培養する工程の前に、上述のような生体試料を培養する前培養工程を含んでもよい。前培養工程において、皮下脂肪組織から血管形成を誘導して血管モデルを作成してもよい。また、候補薬剤を含む培地で生体試料を培養する工程の後に、候補薬剤を含まない培地でさらに培養する後培養工程を含んでもよい。候補薬剤を含む培地で生体試料を培養する工程は、前培養工程で得られた培養物に、候補薬剤又はその希釈液を直接添加して培養してもよいし、候補薬剤を含む培地に置換して培養が行われてもよい。

[0040] APJ発現の測定は、生体試料におけるAPJのmRNA量又はタンパク質量を測定することにより決定されうる。mRNA量の測定としては、定量的PCRやノーザンブロッティングなど本技術分野に既知の手法を用いて行うことができる。例えば、実施例に記載のように、APJ mRNAに対するプローブを用いてもよい。タンパク質量については、ウエスタンブロッティング、免疫染色、FACSなどの本技術分野に既知の任意の手法を用いて行うことができる。例えば、APJに特異的に結合する抗体を使用してもよい。あるいは、例えば特許文献3、特許文献4に記載のようなAPJ発現細胞を用いたスクリーニング系を確立して使用してもよい。また、本発明は、APJ発現を決定するための上述の試薬を含む、本発明のスクリーニング方法を実施するためのキットも提供する。

[0041] 本発明のスクリーニング方法によりスクリーニングされた、APJ発現促進剤作用を有する物質は、APJの発現を促進できれば任意の物質であってよい。本発明のスクリーニング方法の1の態様は、血管内皮細胞などの生体試料におけるAPJ発現を指標として、化粧品素材、食品素材、医薬品素材などの任意のライブラリーを用いてスクリーニングを行うことである。このようにして決定されたAPJ発現促進作用を有する物質として、ジュウヤクエキス、サクラリー

フエキス、およびニームリーフエキスからなる群から選択される1又は複数の生薬が挙げられる。

[0042] 以上で説明したとおり、APJ発現の促進が、皮膚弾力を改善することが見出された。よって本発明は、APJ発現促進剤を適用することを含む、皮膚弾力を改善する方法にも関する。皮膚弾力が改善されれば、しわ、たるみの改善が期待される。本明細書の皮膚弾力を改善する方法は、美容を目的とする美容方法に関しており、医師や医療関係者により行われる治療とは区別できる。このような美容方法は、個人的に行われてもよいし、美容室や、化粧品の販売店、エステサロンなどで行われてもよい。

[0043] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

[0044] 以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

実施例

[0045] 実験1：3D血管形成真皮モデルの作成と血管構造・産生コラーゲンの可視化

コラーゲンゲル培養キット（新田ゼラチン）を用いたI型コラーゲンゲル溶液を作製した。具体的には、氷上で15mlチューブ内において、3mg/mlのセルマトリックスコラーゲン溶液2mlに対して、1mM希塩酸2mlで懸濁し、そこに10倍濃縮したMEM500 μ lと、中和させるためのコラーゲンゲル培養キット付属のC bufferを500 μ l攪拌しながら加えた。本溶液を35mm ガラスベースディッシュ（IWAKI）上に100 μ l載せ、37度30分インキュベートすることにより、ゲル化させた。

[0046] ヒト正常皮下脂肪組織を10%FBS含有PBS中で1mm四方に細断し、ゲル化したコラーゲンゲル上に4片載せた。その後、氷上で作製していた残りのI型コラーゲンゲル溶液100 μ lを組織片を覆うように添加し、37度30分インキュベ-

トすることによりゲル化させた。本組織片は増殖因子等の添加因子を加えたE BM-2 (Cambrex ; Verviers, Belgium) に、さらに最終濃度50ng/mlのVEGFAを加えた培養液を用いて、7日から21日間培養を行った。また、2日から3日おきに培地交換を行った。I型コラーゲンの可視化や、APJの発現局在解析では、本モデルを0.9mg/mlの濃度を有するコラーゲンゲルを用いて作製した。

[0047] 培養後、4%パラホルムアルデヒド溶液1mlを加え4度で30分間固定し、免疫染色を施した。一次抗体には、血管内皮細胞に対してシーブ抗PECAM-1/CD31抗体 (AF806、 R&D systems、 MN) 、ペリサイトに対してCy3 α SMA抗体 (c-6198、 Sigma、 MO) 、APJに対してはラビット抗APJ抗体、I型コラーゲンに対してはラビット抗type I Collagen抗体 (ab34710、 Abcam、 UK) を用い、二次抗体には、Alexa Fluor488ドンキー抗シーブ抗体 (A11015、 Molecular Probes、 Eugene、 OR) とAlexa Fluor594ドンキー抗ラビット抗体 (R37119、 Molecular Probes、 Eugene、 OR) を用いた。また、核染色には、Hoechst 33342 (H3570、 Invitrogen、 CA) を用いた。染色後、共焦点顕微鏡LSM880 (Carl Zeiss、 Germany) を用いて3Dの血管構造を検出し、画像化した。

[0048] 図1は、抗PECAM-1/CD31抗体で染色した3D血管形成真皮モデル作成の様子を示す。図1に見られるように、血管内皮細胞が内腔を形成し、3Dの血管構造が形成されていることが確認された。図2は、抗PECAM-1/CD31抗体および抗type I Collagen抗体で染色した血管形成モデルを示す。図2に見られるように、血管周囲にコラーゲンが合成されることがわかった。特に、右図において矢印で示すように、血管周囲にコラーゲンが見られ、特に血管がこれから伸長するであろう足場と考えられる部分にコラーゲンが多く形成されていた。したがって、血管構造の存在がコラーゲン合成、ひいては皮膚弾力に寄与していることが示唆される。

[0049] 実験2：老化における血管の減少と周囲の硬さ低下

前述の実験により、血管構造の存在が皮膚弾力に寄与することが示されたわけであるが、老化皮膚では血管が減少することが知られている（非特許文献6）。そこで、老化による血管の減少を抑制することを目的として、血管

構造がどのように維持されているか、周囲の硬さ物性との相互作用に着目して解析した。

若年者（10～20歳）と中高齢者（50～70歳）のヒト被験者から得た眼瞼皮膚を使用し、表皮下200 μ m範囲に存在する毛細血管周辺領域の硬さを超音波音速顕微鏡（医用超音波顕微鏡、AMS-50SI、本田電子株式会社）により観察した。具体的には、皮膚の凍結切片を作製し、超音波音速顕微鏡で皮膚断面の音速を従来の方法で測定し、音速分布画像を得た（特許文献8）。更に測定後の同切片を用いて、免疫染色を施し、血管構造を可視化した。一次抗体には、シーブ抗Pecam-1抗体（AF806、R&D systems、MN）を用いて血管内皮細胞を、ラビット抗NG2抗体（Milipore）を用いてペリサイトを染色した。二次抗体には、Alexa Fluor 594ドンキー抗シーブ抗体（A-11016、Molecular Probes、Eugene、OR）、Alexa Fluor488ドンキー抗ラビット抗体（A-21206、Molecular Probes、Eugene、OR）を用いた。その後、音速分布画像と免疫染色画像を重ね合わせ、血管周囲50 μ m範囲の音速値を定量化した。定量化解析には、10検体を用い、1組織あたり15ヵ所の血管周囲を定量化した。

結果を図3に示す。図3により老化皮膚では血管の減少と共に、血管周辺領域の音速値が有意に低下することが分かる。つまり、老化における皮膚弾力の減少と血管の減少は関連することが示唆された。

[0050] 実験3：コラーゲンゲルの硬さ測定

実験1と同様の方法で、各濃度（0.24、0.6、0.9、1.2、1.8mg/ml）を有するI型コラーゲンゲル溶液を氷上で作製した。その後、24wellプレート内で37度にて30分ゲル化させ、コラーゲンゲルを作製した。作製したコラーゲンゲルをPhysica MCR 300 Modular Compact Rheometer（Anton Paar、Germany）を用いて貯蔵弾性率（Pa）を測定し、ゲルの硬さを規定した。

結果を図4に示す。図4より、コラーゲンゲル濃度と貯蔵弾性率是对応関係にあることがわかる。

[0051] 実験4：コラーゲンゲルの硬さと皮膚の物性との関係

コラーゲンゲルのコラーゲン濃度と実際の皮膚の物性との関係を調べるた

めに、各濃度（0.24、0.6、1.2、1.8mg/ml）を有するI型コラーゲンゲルの接触力を非特許文献7と同様の方法で皮膚柔軟感センサ（非特許文献7）を用いて測定した。

結果を図5に示す。図5に示すように、コラーゲン濃度と接触力は約2.0mg/mlまでほぼ比例関係にあることがわかる。また、健康なヒト（20-50代、N=168）の頬の皮膚の接触力の平均は約17.5mNであることが同装置を用いて確認されているため、17.5mNに対応するコラーゲン濃度を中心に濃度を振って以下の実験を行った。

[0052] 実験5：コラーゲンゲルの硬さに応答した血管構造変化の解析

実験1と同様の方法でコラーゲンゲルの濃度を变化させることにより、各濃度のI型コラーゲンゲル（0.24、0.9、1.8mg/ml）を作製した。これら各濃度のゲルはそれぞれ、 2.6 ± 0.8 、 14.0 ± 5.4 、 48.1 ± 17.0 （Pa）の貯蔵弾性率を有していた。これらの各濃度のゲルを用いて、実験1と同様の方法により、ヒト正常皮下脂肪組織から3Dの血管形成を誘導した。13日間培養後、実験1と同様に免疫染色法を施し、血管内皮細胞とペリサイトを可視化した。

[0053] 結果を図6に示す。図6より、弾性率が 2.6 ± 0.8 Paの低濃度ゲル（0.24mg/ml）の場合、細く不安定な血管が形成されたが、より高濃度（0.9mg/ml）で高い弾性率（ 14.0 ± 5.4 Pa）を有するゲルの場合、太く安定した血管が形成された。しかしながら、更に高濃度（1.8mg/ml）で高い弾性率（ 48.1 ± 17.0 Pa）を有するゲルの場合、逆に細く不安定な血管が多く観察された。図6の結果より、マトリックスの弾性といった周囲環境の物性に応答して形成される血管の構造が変化することがわかる。更には、血管を安定化するには最適な周囲環境の物性があることも示唆される。図3の結果と併せて考察しても、血管は周囲の硬さを感知してその構造を安定的に維持するが、老化皮膚では周囲の硬さが低下することから、血管の不安定化を引き起こし、血管が減少方向に進むと考えられる。

[0054] 実験6：コラーゲンゲルの硬さに応答した血管細胞発現因子（APJ）の解析

実験1と同様の方法で、各濃度（0、0.12、0.6、0.9、1.2、1.8mg/ml）を有

するI型コラーゲンゲル溶液を氷上で作製した。12wellプレートに 10^5 cells/wellで播種したヒト臍帯血静脈内皮細胞（HUVEC）をコンフルエントまで培養した上に、各I型コラーゲンゲル溶液を $300\mu\text{l/well}$ 添加し、37度でインキュベートすることによりゲル化させ、更に培養を行った。培養6時間後、Trizolを各wellに添加し、細胞破碎を行った。得られた溶液からクロロホルム抽出を行うことで、トータルRNAを得た。得られたトータルRNAをnano dropにより濃度測定し、RNase free waterで 35ng/ml に調整した。その後、TaqMan™ RNA-to-CT™ 1-Step Kit（Applied Biosystems、CA）とヒトAPJ mRNAに対するTaqmanプローブ（Hs00270873、Applied Biosystems、CA）を用いて、APJのmRNA発現量を比較した。

[0055] 結果を図7に示す。左図は、コラーゲンゲル濃度とAPJのmRNA発現量の関係を示すグラフである。APJ mRNA発現量が 0.9mg/ml のコラーゲンゲル条件下で最もピークを迎えることが明らかとなり、低濃度や高濃度のコラーゲンゲル内では発現が減少する様子が認められた。つまり、マトリックスの弾性といった周囲環境の物性に応答してAPJの発現が変化することが分かる。なお、このような物性と発現の関係は、Tie2といった他の血管安定化因子では見られず（データ示さず）、APJ特異的であった。また、本実験で導かれたコラーゲンゲルの弾性は、正常のヒト皮膚弾力に対応するゲル濃度とほぼ一致していた。したがって、マトリックスの弾性に応じてAPJの発現が変化し、血管の安定性に寄与していると考えられ、その弾性は低すぎても高すぎても不適切であり、適正な範囲があることが示唆される。図7右図は、 0.9mg/ml の濃度のコラーゲンゲルにおいて形成された血管モデルにおけるAPJの局在を示す顕微鏡写真である。血管内皮細胞から周囲に向かって伸びるfilopodiaのような細胞突起部位にAPJが局在していることが分かり、APJが周囲のマトリックス環境を直接感知し、血管を安定化している可能性が示唆された。

[0056] 実験7：APJ高発現3D血管形成真皮モデルの作成と構造解析

ヒトAPJ遺伝子配列をpEGFP-N1ベクター（Clontech、CA）に挿入しレンチウイルス導入用APJ高発現ベクターを得た。その後、本ベクターを元に、APJ高

発現レンチウイルスを作製した（オリエンタル酵母）。実験1と同様の手法で3D血管形成真皮モデルを作製した。その後、本モデルを培養開始21日目でレンチウイルス感染によるAPJ発現ベクターのトランスフェクションを行い、5日間培養した。対照はトランスフェクトを行わない以外は同じ条件で作成した血管モデルを培養した。培養後、4%パラホルムアルデヒド溶液を加え4度で30分間固定し、免疫染色を施した。一次抗体には、血管細胞に対してシープ抗Pecam-1抗体（AF806、R&D systems、MN）を用い、二次抗体には、Alexa Fluor 594ドンキー抗シープ抗体（A-11016、Molecular Probes、Eugene、OR）を用いた。染色後、共焦点顕微鏡LSM880（Carl Zeiss、Germany）を用いて3Dの血管構造を検出し、画像化した。

[0057] 結果を図8に示す。図8より、APJの発現を増強させると血管が太く安定化することが示され、既報（非特許文献5）と一致する結果となった。

[0058] 以上の結果より、例えば模式的な図として図9に示すように、皮膚の弾性とAPJの発現は相互作用しており、APJが皮膚の弾性のセンサーとして働くことにより、血管を安定化し、血管周囲でコラーゲン合成が促進され、皮膚弾力へフィードバックされるというサイクルを有する可能性が考えられる。よって、老化等により弾力が減少した皮膚であっても、APJ発現を増強させることによりサイクルを強化し皮膚弾力を改善させることが可能であると考えられる。したがって、以下の実験にて、APJ発現促進作用を有する物質のスクリーニングを行った。

[0059] 実験8：APJ発現を促進する皮膚弾力改善作用を有する物質のスクリーニング方法

候補薬剤として、抗老化作用があるといわれている植物抽出物を含む合計49種類の原料を用いてスクリーニングを行った。香栄興業社製のジュウヤクエキス（ジュウヤク抽出液ET-50）、一丸ファルコス社製のサクラリーフエキス（ファルコレックスサクラリーフB）、および一丸ファルコス社製のニームリーフエキス（ニームリーフリキッドB）を使用した。これらのエキスをジメチルスルホキシド（DMSO）で溶解して最終濃度0.1%（w/w）で試料に調製した

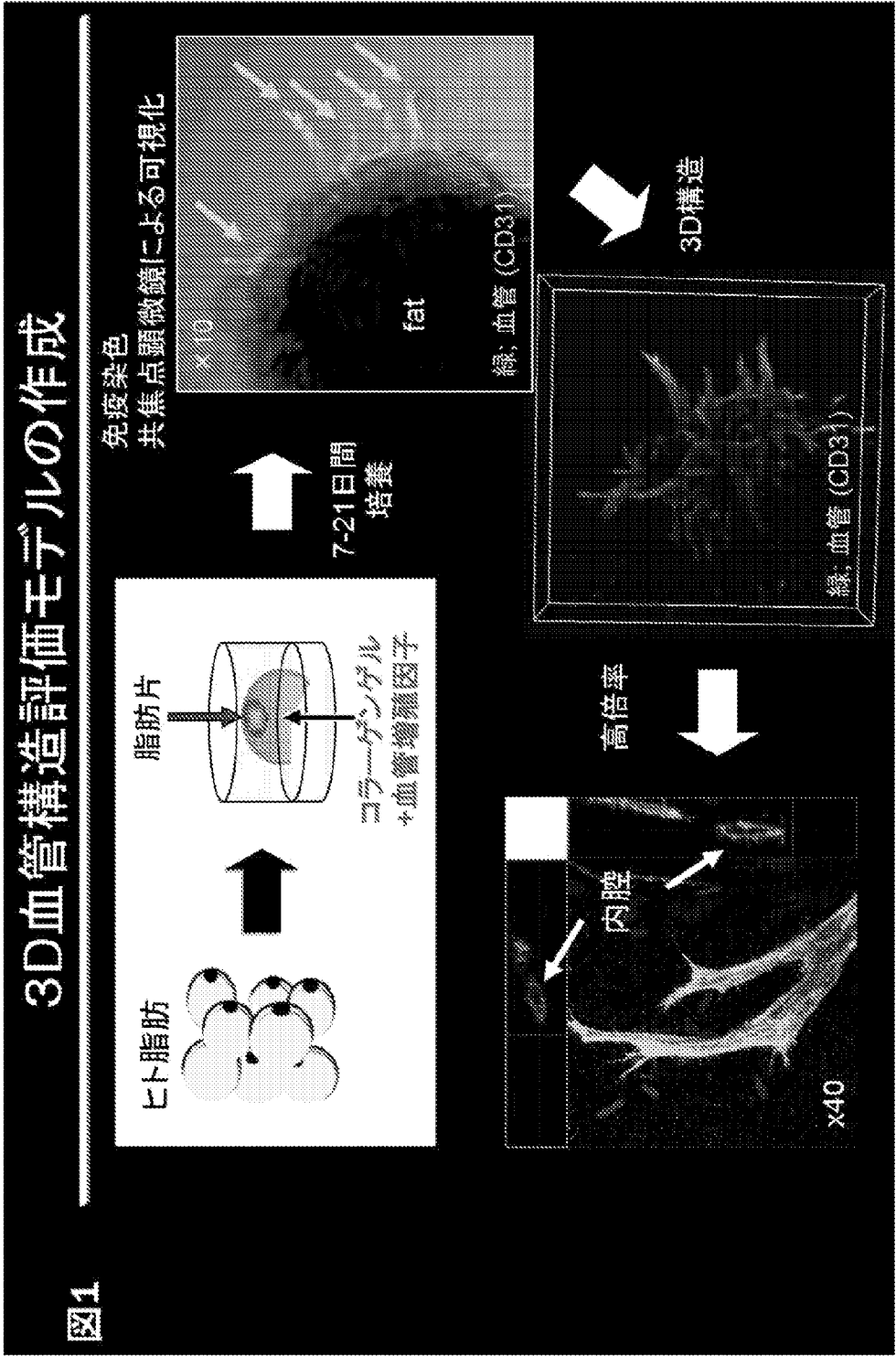
。対照として、これらの抽出物を含まないDMSO溶液を使用した。12wellプレートに 10^5 cells/wellで播種したHUVECをコンフルエントまで培養した上に、上記試料を最終濃度0.1%になるよう添加して、37度でインキュベートして4時間培養を行い、実験6と同様の方法で、APJのmRNA発現量を比較した。

[0060] 結果を図10に示す。図10より、候補薬剤として、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスを用いた場合に、対照に比較してAPJの発現が有意に増加した。これらのエキスを、APJの発現促進作用を有する物質として選択した。

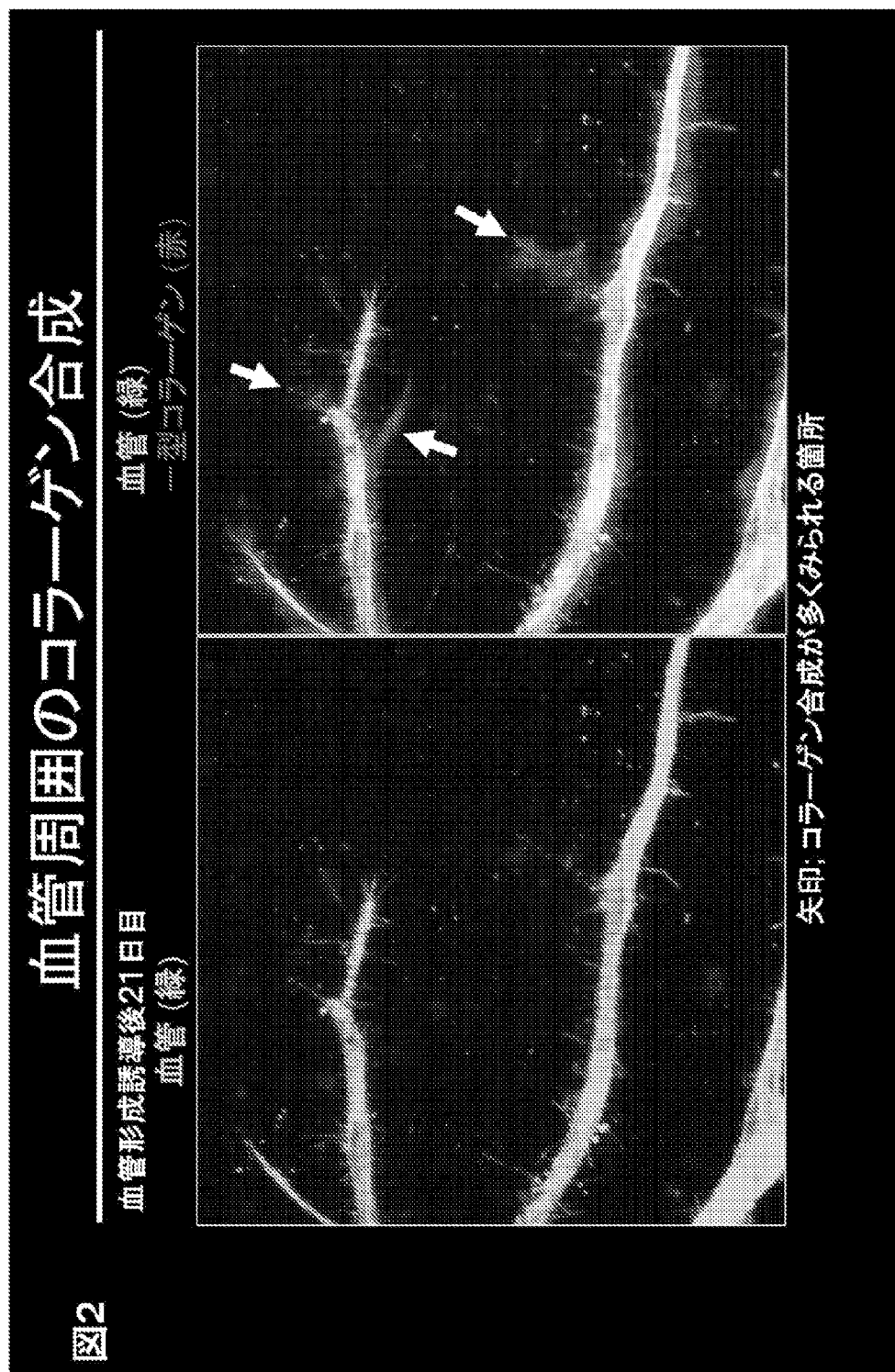
請求の範囲

- [請求項1] 皮膚弾力を改善するための、APJ発現促進剤。
- [請求項2] ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、およびニームリーフエキスからなる群から選択される1又は複数の生薬からなる、APJ発現促進剤。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載のAPJ発現促進剤を含む、皮膚弾力改善剤。
- [請求項4] APJ発現を指標とした皮膚弾力改善剤のスクリーニング方法。
- [請求項5] 候補薬剤を含む培地で生体試料を培養すること、
生体試料におけるAPJ発現を測定すること、および
対照に比較してAPJ発現が増加した場合に、候補薬剤を皮膚弾力改善作用を有する物質として決定すること、
を含む、請求項4に記載のスクリーニング方法。
- [請求項6] APJ発現を決定するための試薬を含む、請求項4又は5のいずれか1項に記載のスクリーニング方法を実施するためのキット。
- [請求項7] 対象のAPJ発現を促進させることを含む、対象の皮膚弾力を改善するための美容目的の方法。
- [請求項8] 対象のAPJ発現の促進は、請求項3に記載の皮膚弾力改善剤を対象に投与することにより達成される、請求項7に記載の方法。

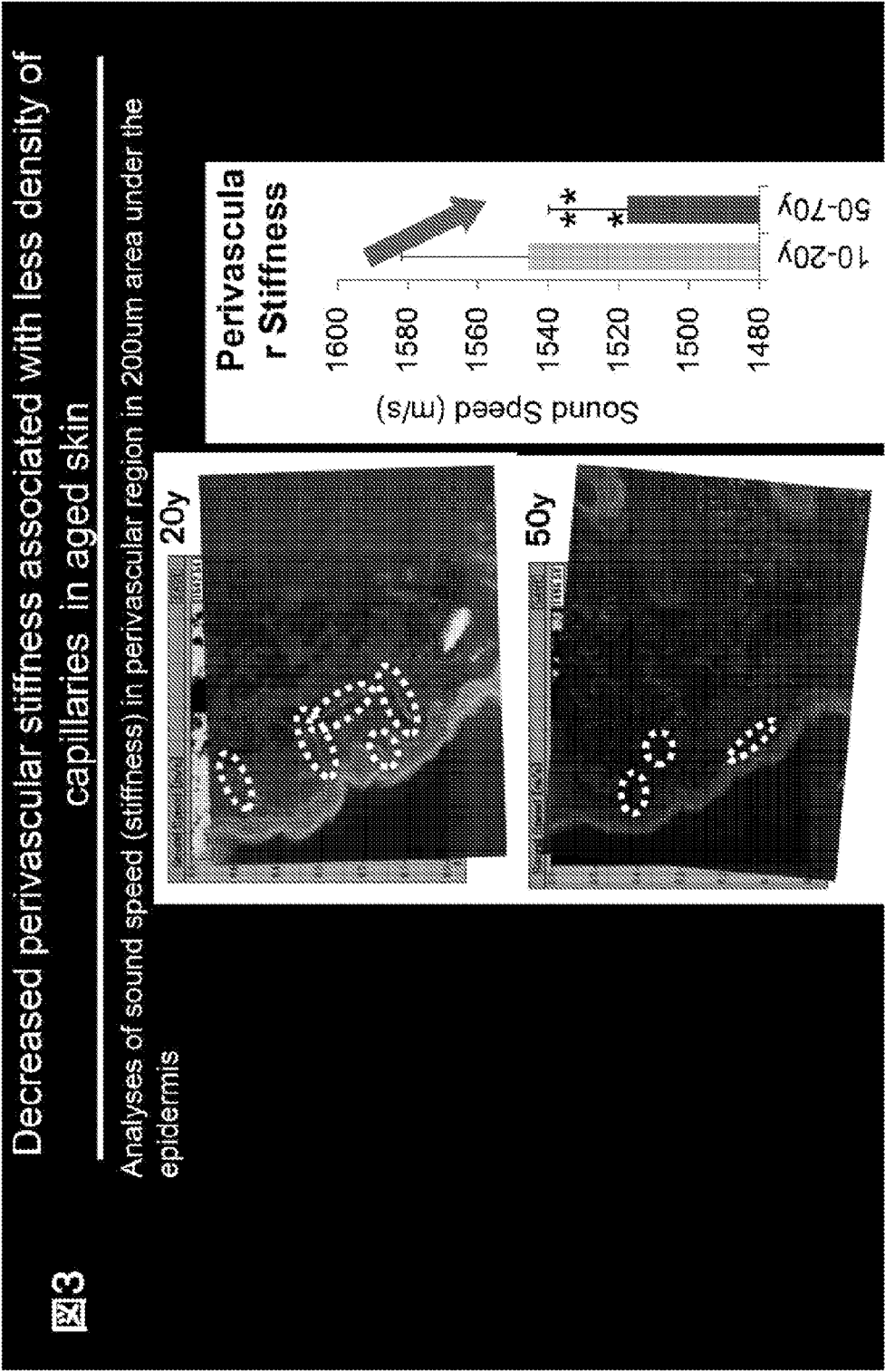
[図1]



[図2]



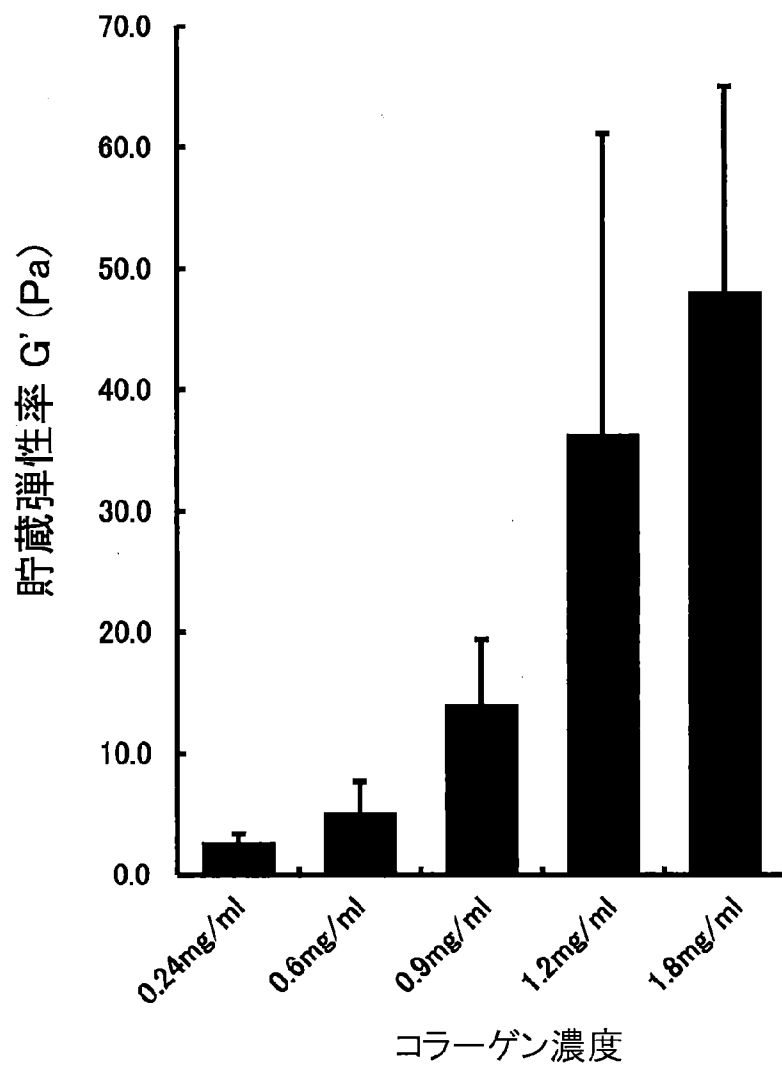
[図3]



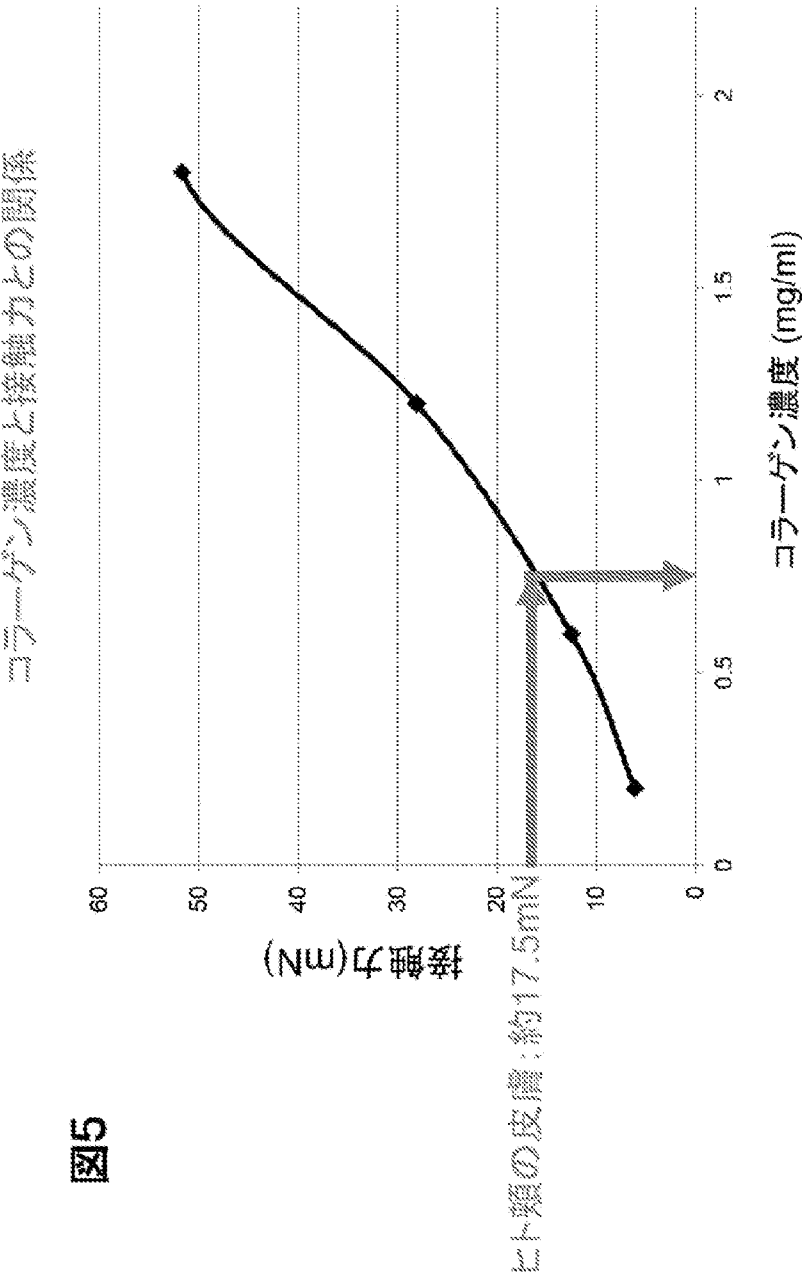
[図4]

図4

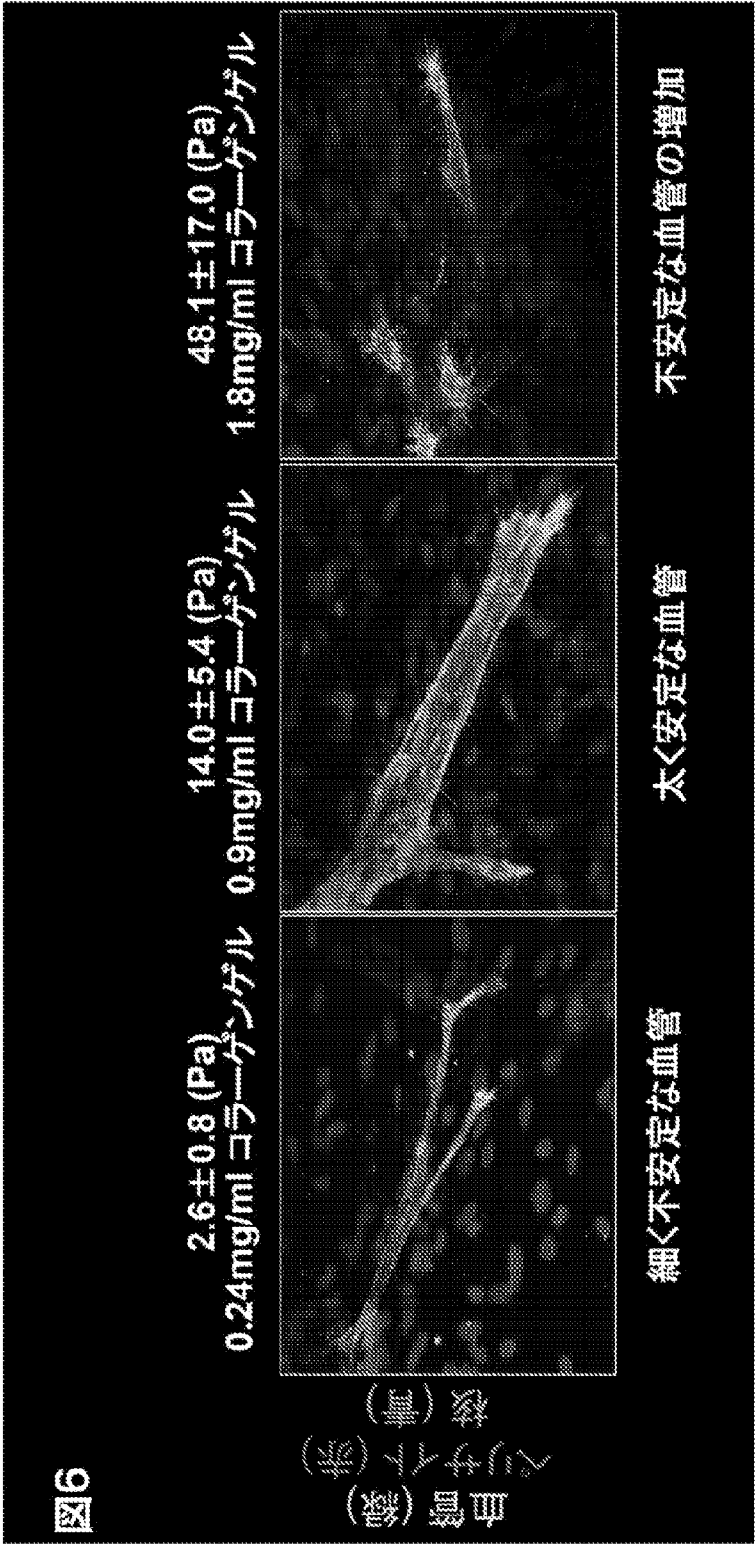
コラーゲン濃度と貯蔵弾性率との関係



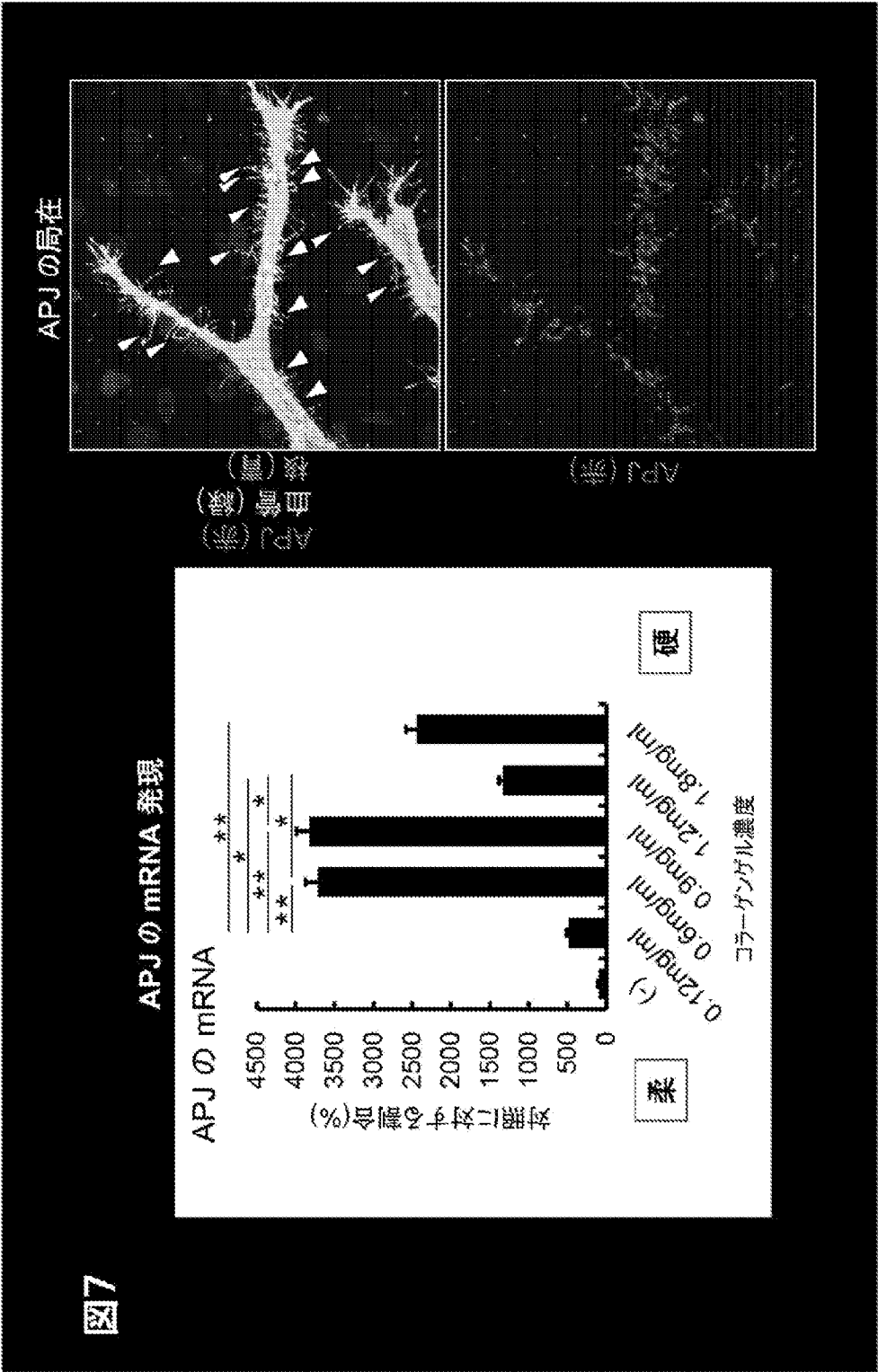
【図5】



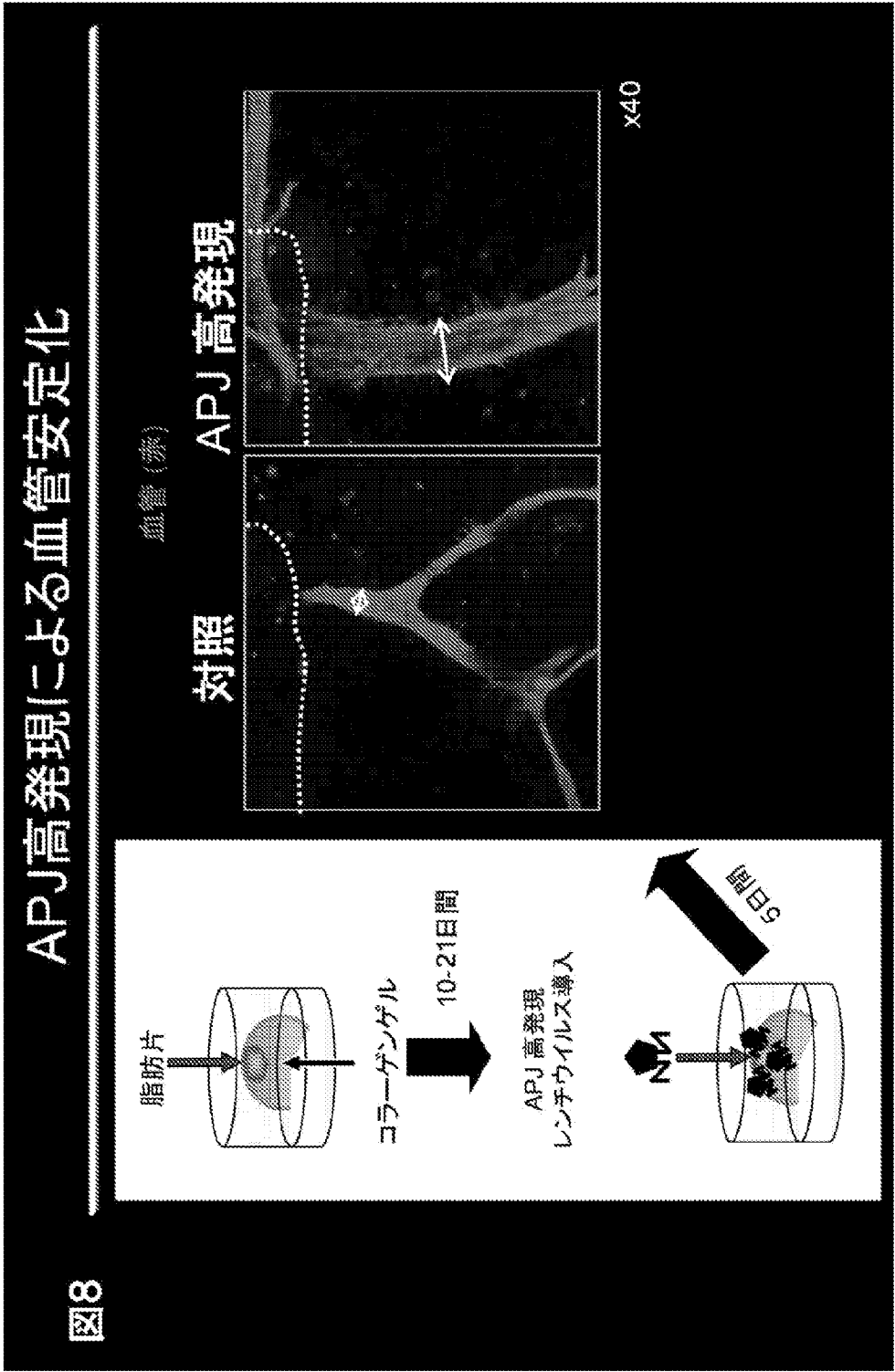
【図6】



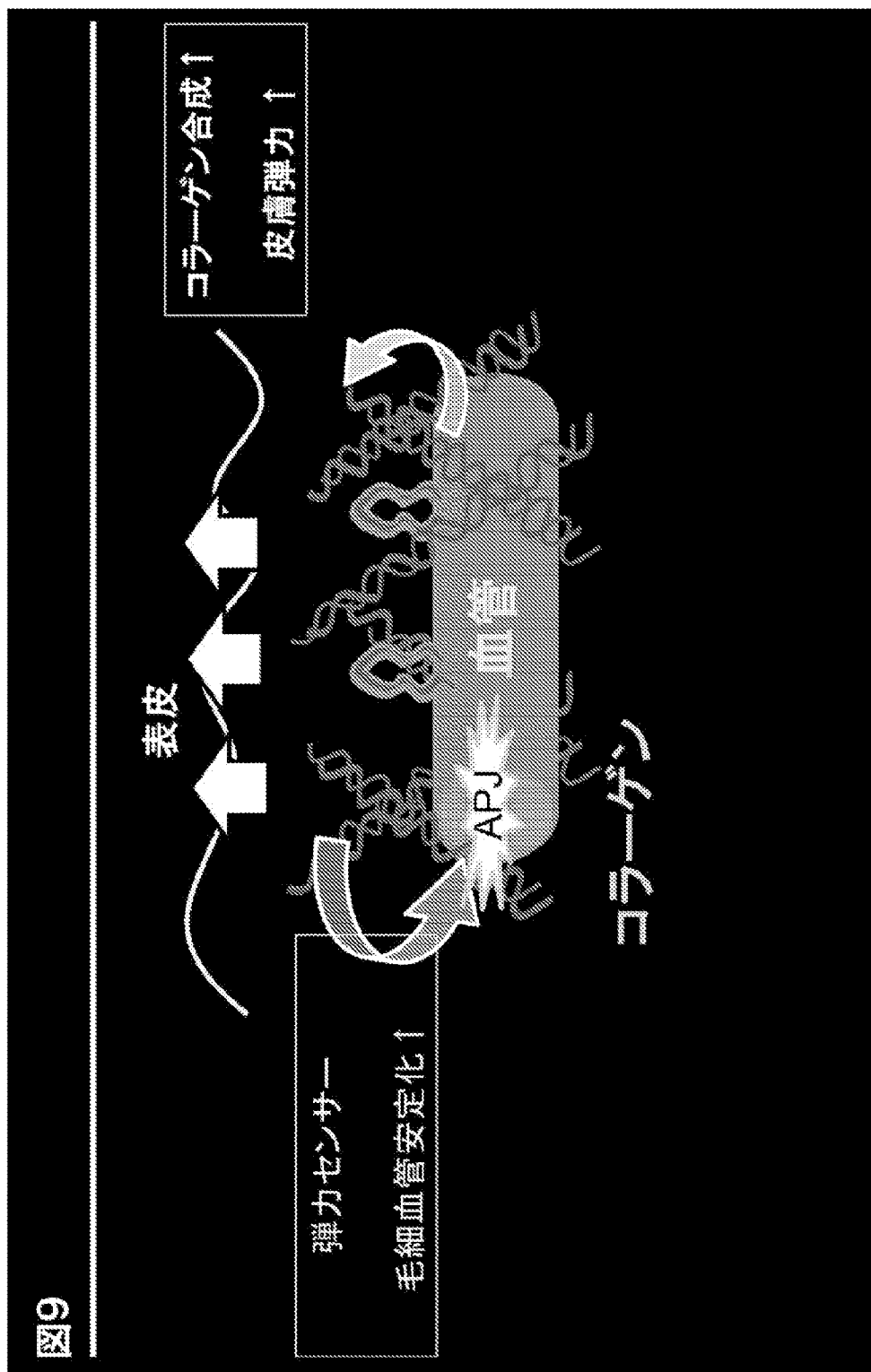
[図7]



[図8]

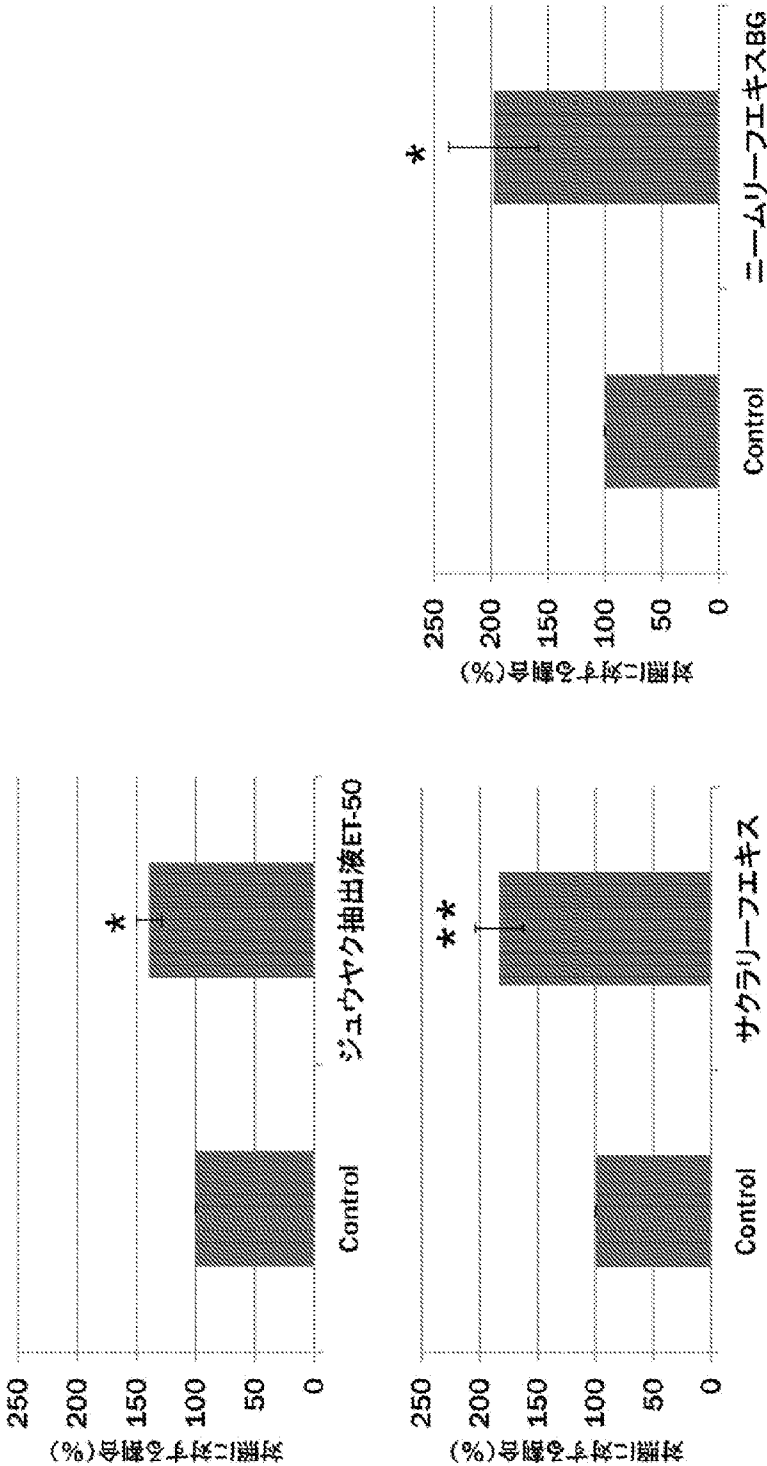


[図9]



[図10]

図10 候補物質のAPJ発現



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/019573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K8/9789(2017.01)i, A23L29/206(2016.01)i, A61K36/58(2006.01)i, A61K36/736(2006.01)i, A61K36/78(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/08(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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)

Int.Cl. A61K8/00-99, 36/00-9068, A61Q1/00-90/00, A61P1/00-43/00, A23L5/00-29/22, C12Q1/00-3/00, G01N33/00-98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2013-209348 A (SHISEIDO CO., LTD.) 10 October 2013, paragraphs [0011], [0012], [0024], [0025] (Family: none)	1, 3-8 1-8
X Y	JP 2014-94966 A (ORIZA YUKA KK) 22 May 2014, paragraphs [0019], [0020], [0045], [0054], [0067] & US 2013/0196937 A1, paragraphs [0049], [0053], [0099], [0109], [0128]-[0130] & US 2015/0174188 A1 & WO 2011/099570 A1 & CN 102883733 A	1-3, 7-8 1-8



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
05.06.2019

Date of mailing of the international search report
25.06.2019

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/JP2019/019573

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	KR 10-2014-0097095 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 06 August 2014, claim 1, paragraph [0047] (Family: none)	1-3, 7-8 1-8
X Y	KR 10-2009-0077619 A (JMB CO., LTD.) 15 July 2009, paragraphs [37]-[92] (Family: none)	1-3, 7-8 1-8
X Y	JP 2013-216646 A (POLA CHEM IND INC.) 24 October 2013, claims 1-2, paragraphs [0012], [0016], [0023]-[0026] (Family: none)	1-3, 7-8 1-8
A	YOKOYAMA, Yoko et al., Inhibitory regulation of skin fibrosis in systemic sclerosis by apelin/APJ signaling, Arthritis & Rheumatology, vol. 70, no. 10, October 2018, pp. 1661-1672, entire text	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/019573

<What is examined>

The description indicates that the problem to be solved by the present invention is to provide a substance that improves skin elasticity by a mechanism that is different from conventional skin elasticity improving agents and processes, and to provide a method for screening the substance (paragraph [0006]).

Meanwhile, claim 2 does not define the APJ expression promoter selected from among a Houltuynia cordata extract, a cherry blossom leaf extract, and a neem leaf extract as being intended for improving skin elasticity.

In addition, claim 7 does not define the cosmetology method for improving skin elasticity of a subject, including promoting the APJ expression in the subject, as resulting from using an APJ expression promoter for improving skin elasticity.

In a case where an APJ expression promoter is not used for improving skin elasticity, it is construed that the problem to be solved by the invention cannot be solved.

Accordingly a means of solving the problem to be solved by the present invention cannot be broadened or generalized to the agents in claims 2-3 that can include an APJ expression promoter that is used for a purpose other than the purpose of improving skin elasticity, or to the methods in claims 7-8 that can include a method for promoting the APJ expression by a method that does not use an APJ expression promoter for improving skin elasticity.

Thus, the invention of claims 2-3 and 7-8 (except claims 3 and 8 as depending directly or indirectly from claim 1) is not disclosed in the description of the present application.

Accordingly examination has been carried out in the scope supported and disclosed by the description of the present application; that is to say, "an APJ expression promoter for improving skin elasticity, the APJ expression promoter being selected from among a Houltuynia cordata extract, a cherry blossom leaf extract, and a neem leaf extract" for claim 2, and "a cosmetology method for improving skin elasticity of a subject by using, onto the subject, an APJ expression promoter for improving skin elasticity" for claim 7 have been examined.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K8/9789(2017.01)i, A23L29/206(2016.01)i, A61K36/58(2006.01)i, A61K36/736(2006.01)i, A61K36/78(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/08(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. A61K8/00-99, 36/00-9068, A61Q1/00-90/00, A61P1/00-43/00, A23L5/00-29/22, C12Q1/00-3/00, G01N33/00-98

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 9 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)

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 Y	JP 2013-209348 A (株式会社 資生堂) 2013.10.10, [0011] - [0012], [0024] - [0025] (ファミリーなし)	1, 3-8 1-8
X Y	JP 2014-94966 A (オリザ油化株式会社) 2014.05.22, [0019] - [0020], [0045], [0054], [0067] & US 2013/0196937 A1, [0049], [0053], [0099], [0109], [0128]-[0130] & US 2015/0174188 A1 & WO 2011/099570 A1 & CN 102883733 A	1-3, 7-8 1-8

☒ 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

0 5 . 0 6 . 2 0 1 9

国際調査報告の発送日

2 5 . 0 6 . 2 0 1 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

片山 真紀

4 Q

4 5 0 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 6 8

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	KR 10-2014-0097095 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 2014. 08. 06, 請求項 1、[0 0 4 7] (ファミリーなし)	1-3, 7-8 1-8
X Y	KR 10-2009-0077619 A (JMB CO., LTD.) 2009. 07. 15, 〈 3 7 〉 — 〈 9 2 〉 (ファミリーなし)	1-3, 7-8 1-8
X Y	JP 2013-216646 A (ポーラ化成工業株式会社) 2013. 10. 24, 請求項 1-2、[0 0 1 2]、[0 0 1 6]、[0 0 2 3] — [0 0 2 6] (ファミリーなし)	1-3, 7-8 1-8
A	YOKOYAMA, Yoko et al., Inhibitory Regulation of Skin Fibrosis in Systemic Sclerosis by Apelin/APJ Signaling, ARTHRITIS & RHEUMATOLOGY, Vol. 70, No. 10, 2018. 10, p. 1661-1672, 全文	1-8

〈調査の対象について〉

本願発明の課題には、従来の皮膚弾力改善剤や手法とは異なるメカニズムにより、皮膚弾力を改善する物質、ならびに、当該物質をスクリーニングする方法を提供することが記載されている（[0006]）。

一方、請求項2において、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、ニームリーフエキスから選択されるAPJ発現促進剤が、皮膚弾力を改善するためのものであることは特定されていない。

また、請求項7には、対象のAPJ発現を促進させることを含む、対象の皮膚弾力を改善するための美容目的の方法が、皮膚弾力を改善するためのAPJ発現促進剤の使用によるものであることは特定されていない。

APJ発現促進剤を、皮膚弾力を改善するためのものとして用いない場合は、上記発明の課題は解決できないものと解される。

したがって、皮膚弾力の改善のため以外の用途で使用するAPJ発現促進剤を含みうる、請求項2－3の剤や、皮膚弾力を改善するためのAPJ発現促進剤の使用以外の方法でAPJ発現を促進させる方法を含みうる、請求項7－8の方法まで、本願発明の課題を解決しうるものとして、拡張ないし一般化することはできない。

よって、請求項2－3、7－8に係る発明（請求項1を直接的または間接的に引用する請求項3、8は除く）は、本願明細書に開示されたものではない。

したがって、調査は本願明細書に裏付けられ開示されている範囲、すなわち、請求項2は、「皮膚弾力を改善するための、ジュウヤクエキス、サクラリーフエキス、ニームリーフエキスから選択されるAPJ発現促進剤。」について、請求項7は、「対象に、皮膚弾力を改善するためのAPJ発現促進剤を使用することにより、対象の皮膚弾力を改善するための美容目的の方法。」について、行った。