

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6583704号
(P6583704)

(45) 発行日 令和1年10月2日 (2019. 10. 2)

(24) 登録日 令和1年9月13日 (2019. 9. 13)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

G O 1 N 33/50 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 P 17/00 (2006. 01)

A 6 1 K 8/97 (2017. 01)

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/50 Z N A Z

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 17/00

A 6 1 K 8/97

請求項の数 7 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-195068 (P2014-195068)
 (22) 出願日 平成26年9月25日 (2014. 9. 25)
 (65) 公開番号 特開2016-63784 (P2016-63784A)
 (43) 公開日 平成28年4月28日 (2016. 4. 28)
 審査請求日 平成29年7月5日 (2017. 7. 5)

(73) 特許権者 000113470
 ポーラ化成工業株式会社
 静岡県袋井市愛野 1 2 3 4 番地
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (74) 代理人 100151596
 弁理士 下田 俊明
 (72) 発明者 三輪 隆博
 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町 5 6 0 ポー
 ラ化成工業株式会社 横浜研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 色素沈着改善剤のスクリーニング法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ケラチノサイトにおけるエキソサイトーシス関連因子の活性を指標として、色素沈着改善剤をスクリーニングする方法であって、

前記エキソサイトーシス関連因子が *s y n t a x i n - 3* 又は *S N A P - 2 3* である、方法。

【請求項 2】

前記エキソサイトーシス関連因子の活性が、エキソサイトーシス関連因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量であり、

被験物質を添加したケラチノサイトにおける前記遺伝子の発現量が、被験物質を添加しなかったケラチノサイトにおける該遺伝子の発現量と比較して大きい場合に、前記被験物質は色素沈着改善作用を有すると判定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記被験物質を添加したケラチノサイトにおけるエキソサイトーシス因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量が、被験物質を添加しなかったケラチノサイトにおける該遺伝子の発現量に対して 1 0 % 以上大きい場合に、前記被験物質は色素沈着改善作用を有すると判定する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の方法を行う工程、及び前記工程で色素沈着改善作用を有すると判定された物質を組成物に配合する工程を含むことを特徴とする組成物の設計

10

20

方法。

【請求項 5】

前記組成物が皮膚外用剤である、請求項 4 に記載の設計方法。

【請求項 6】

前記組成物が化粧品（ただし、医薬部外品を含む）である、請求項 4 又は 5 に記載の設計方法。

【請求項 7】

前記組成物が美白用である、請求項 4 ～ 6 の何れか一項に記載の設計方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、ケラチノサイトのメラニン排出機構を利用して色素沈着改善剤をスクリーニングする方法に関する。また、メラニン排出機構の活性化という新たな機序に基づく色素沈着改善剤にも関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚における日焼け後の色素沈着、シミ、肝斑、老人性色素斑等は、皮膚に存在するメラノサイト（色素細胞）の活性化によりメラニン生成が著しく亢進した状態である。これらの皮膚色素沈着に関連するトラブルの発生や悪化は肌の美しさを妨げるものであるため、従来これらを防止又は改善する作用を有する成分に関する研究が盛んになされており、

20

様々な作用機序に基づく美白成分が創出されている。

例えば、アスコルビン酸類、過酸化水素、コロイド硫黄、グルタチオン、ハイドロキノン、カテコール等（非特許文献 1）が、美白成分としてよく知られている。さらに近年、新たな作用機序に基づいた美白成分が種々開発されている。メラニン生成抑制を標的とするものとしては、チロシナーゼ関連蛋白阻害剤（特許文献 1）、エンドセリン作用抑制剤（特許文献 2）、プロトンポンプ阻害剤（特許文献 3）、ステムセルフアクター結合阻害剤（特許文献 4）等がある。また、生成したメラニンの表皮への移動抑制を標的とするものとしては、メラノサイトのデンドライト伸張抑制剤（特許文献 5）、メラニン移送又は放出抑制剤（特許文献 6）等がある。

【0003】

30

ところで、皮膚において表皮の最下部である基底層に位置するメラノサイトで合成されたメラニンは、隣接するケラチノサイト（表皮角化細胞）に受け渡される。ケラチノサイトは分裂して徐々に押し上げられ、最後は細胞核のない角質細胞に変化して垢となって剥がれ落ちる（ターンオーバー）。約 28 日周期のターンオーバーに従って、メラニンも細胞とともに剥がれ落ちる。この表皮ターンオーバー促進を標的とするものとして、インテグリン産生促進剤（特許文献 7）等も報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2010 - 195732 号公報

40

【特許文献 2】特開 2012 - 020950 号公報

【特許文献 3】特開 2011 - 178760 号公報

【特許文献 4】特開 2008 - 031094 号公報

【特許文献 5】特開 2003 - 113027 号公報

【特許文献 6】特開 2008 - 143796 号公報

【特許文献 7】特開 2006 - 045087 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】メラニン色素の制御と美白剤の開発（フレグランスジャーナル社、臨時増刊）、No. 14、P. 118 - 126（1995）

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

前述のような既知の作用機序に基づいた美白成分では、ある程度の色素沈着改善効果は認められるものの、十分に満足のいく効果が得られているとは言い難いのが現状である。また、より高い美白効果を得るため、異なる作用機序に基づく成分をひとつの組成物に含有させることも一般的であることから、新たな作用機序に基づく美白成分も求められている。

そのため、今なおより高い効果が得られる美白用化粧料の開発を目指して、色素沈着改善に有効な新たな成分の探索や、色素沈着改善剤の標的となり得る新たな作用機序の検討がなされている。

10

本発明は、かかる状況に鑑み、新たな作用機序に基づく色素沈着改善剤として有効な成分を探索することを目的とし、そのための新たなスクリーニング法を確立することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者は上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、メラニンを取り込んだケラチノサイトではエキソサイトーシス活性が低下するという知見を得た。また、エキソサイトーシス活性が低下したケラチノサイトでは、エキソサイトーシス関連因子の発現が増加/減少していることも見出した。さらに、エキソサイトーシス関連因子の活性を調節すると、ケラチノサイトのメラニン排出作用が活性化することも見出した。そして、これらの知見に基づいて、エキソサイトーシス関連因子の活性調節剤が色素沈着改善剤となり得ることを見出して、本発明を完成するに至った。

20

【0008】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 細胞におけるエキソサイトーシス関連因子の活性を指標として、色素沈着改善剤をスクリーニングする方法（以下、「本発明のスクリーニング方法」とも記す）。

[2] 前記エキソサイトーシス関連因子の活性が、エキソサイトーシス関連因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量であり、

被験物質を添加した細胞における前記遺伝子の発現量が、被験物質を添加しなかった細胞における該遺伝子の発現量と比較して小さい又は大きい場合に、前記被験物質は色素沈着改善作用を有すると判定する、[1]に記載の方法。

30

[3] 前記エキソサイトーシス関連因子が、VAMP-1、syntaxin-2、syntaxin-3、syntaxin-4、SNAP-23、annexin-1、annexin-2、myosin V、myosin-10、及びmyosin2aから選択される、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 前記エキソサイトーシス関連因子が、syntaxin-3又はSNAP-23である、[3]に記載の方法。

[5] 前記被験物質を添加した細胞におけるエキソサイトーシス因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量が、被験物質を添加しなかった細胞における該遺伝子の発現量に対して10%以上変動がある場合に、前記被験物質は色素沈着改善作用を有すると判定する、[2]～[4]のいずれかに記載の方法。

40

[6] [1]～[5]のいずれかに記載の方法により色素沈着改善作用を有すると判定された物質を含有する組成物（以下、「本発明の組成物」とも記す）。

[7] 皮膚外用剤である、[6]に記載の組成物。

[8] 化粧料（ただし、医薬部外品を含む）である、[6]又は[7]に記載の組成物。

[9] 美白用である、[6]～[8]の何れかに記載の組成物。

[10] [1]～[5]の何れかに記載の方法により色素沈着改善作用を有すると判定された物質を組成物に配合する工程を含むことを特徴とする組成物の製造方法。

【発明の効果】

50

【 0 0 0 9 】

本発明により、新たな作用機序に基づく肌の色素沈着改善剤として有効な成分を探索することができる、スクリーニング法が提供される。また、本発明により、新たな機序に基づく色素沈着改善剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】メラニン取り込みによる、エキソサイトーシス関連因子の mRNA 発現量の変化を表すグラフ。

【図 2】エキソサイトーシス活性化による、メラニン排出量の変化を表すグラフ。

【図 3】エキソサイトーシス活性化による、二値化したメラニン分布画像の黒色領域の総面積の変化を表すグラフ。

【図 4】エキソサイトーシス活性化による、エキソサイトーシス関連因子の mRNA 発現量の変化を表すグラフ。

【図 5】エキソサイトーシス関連因子の発現阻害による、メラニン排出量の変化を表すグラフ。

【図 6】エキソサイトーシス関連因子の発現を促進する植物エキス添加時のメラニン分布画像。

【図 7】エキソサイトーシス関連因子の発現を促進する植物エキス添加時の、二値化したメラニン分布画像の黒色領域の総面積の変化を表すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 1 】

本発明のスクリーニング方法は、細胞におけるエキソサイトーシス関連因子の活性を指標として、色素沈着改善剤をスクリーニングすることを特徴とする。

本発明におけるエキソサイトーシス関連因子とは、ケラチノサイトの細胞膜に存在し、エキソサイトーシス機構に関与するタンパク質をいう。

エキソサイトーシス (Exocytosis: 開口分泌) とは、細胞外への分泌形態のひとつである。細胞外で合成されたタンパク質等の物質は、分泌顆粒内に貯留され、エキソサイトーシスによって細胞外へ出される。分泌顆粒は細胞内線維群の働きによって細胞質内を移動し、細胞膜へと接近する。そして分泌顆粒膜外層が細胞膜内層と、分泌顆粒膜内層が細胞膜外層とそれぞれ融合し、これにより分泌顆粒内腔が細胞外界と連絡し、顆粒内容物は細胞外へ遊出する。本明細書では、この一連の機構に関与する種々のタンパク質をエキソサイトーシス関連因子という。

【 0 0 1 2 】

本発明者は、メラニンを取り込んだケラチノサイトではエキソサイトーシス活性が低下するということ、エキソサイトーシス活性が低下したケラチノサイトではエキソサイトーシス関連因子の発現が増加 / 減少していること、さらに、エキソサイトーシス関連因子の活性を調節すると、ケラチノサイトのメラニン排出機構が活性化することを見出した。ケラチノサイトのメラニン排出機構が活性化すると、メラニンの細胞外へ排出が促され、ケラチノサイト内にメラニンが滞留することが抑えられる。したがって、エキソサイトーシス関連因子の活性調節剤は、色素沈着改善剤となり得る。

【 0 0 1 3 】

本発明の好ましい態様において、前記エキソサイトーシス関連因子の活性とは、エキソサイトーシス関連因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量である。ここで、遺伝子の発現量とは、該遺伝子の mRNA の転写量と、該遺伝子がコードするタンパク質の翻訳量との何れかを指すものとする。

【 0 0 1 4 】

また、本発明のスクリーニング方法の別の好ましい態様においては、被験物質を添加した細胞におけるエキソサイトーシス関連因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量が、被験物質を添加しなかった細胞における該遺伝子の発現量と比較して変動する場合に、前記被験物質は色素沈着改善作用を有すると判定される。ここで、発現量の変動

は、エキソサイトーシスを促進する方向に関与する遺伝子については発現量が大きくなること、及びエキソサイトーシスを抑制する方向に関与する遺伝子については発現量が小さくなることを含む。

ここで、エキソサイトーシス関連因子は、小胞輸送関連タンパク質として知られる VAMP - 1、syntaxin - 2、syntaxin - 3、syntaxin - 4、SNAP - 23、annexin - 1、及び annexin - 2、並びにモータータンパク質として知られる myosin V、myosin - 10、及び myosin 2a が好ましく挙げられる。これらのうち、VAMP - 1、syntaxin - 4、annexin - 1、annexin - 2 及び myosin V は、被験物質を添加した時にその遺伝子の発現量が被験物質を添加しなかった時に比較して小さい場合に、前記被験物質は色素沈着改善剤作用を有すると判定される。また、syntaxin - 2、syntaxin - 3、SNAP - 23、myosin - 10、及び myosin 2a は、被験物質を添加した時にその遺伝子の発現量が被験物質を添加しなかった時に比較して大きい場合に、前記被験物質は色素沈着改善剤作用を有すると判定される。

10

本発明のスクリーニング方法においてその活性を指標とするエキソサイトーシス関連因子は、一種でもよいし、二種以上を組み合わせてもよい。スクリーニングの精度の観点から二種以上のエキソサイトーシス関連因子を組み合わせることが好ましく、例えば syntaxin - 3 及び SNAP - 23 の組み合わせがより好ましい。syntaxin - 3 及び SNAP - 23 は、同時に作用することでケラチノサイトにおけるエキソサイトーシスが機能すると考えられており、これらの発現量とともに増加させる物質は優れた色素沈着改善作用を有すると判定できる。

20

【0015】

エキソサイトーシス関連因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量は、任意の方法を用いて測定することができる。例えば、当該遺伝子の配列に特異的に結合する配列を有する DNA 断片をプライマーとして用いて PCR を行い、定量的な検出を行う。なお、上述した種々の因子をコードする遺伝子配列はそれぞれ公開されており、当業者は適宜プライマーを設計して PCR に供することができる。

また、例えば、当該タンパク質の細胞内存在量を、常法で定量的に測定して、遺伝子の発現量としてもよい。

【0016】

30

スクリーニングに用いる細胞の種類は、エキソサイトーシス関連因子を発現し得る細胞であれば特に限定されないが、ケラチノサイト又はファイibroプラストが好ましく、ケラチノサイトがより好ましく、ヒト由来ケラチノサイトがさらに好ましい。細胞の培養の条件としては、通常の培養条件、例えば市販の KG2 培地を用いる他、本発明のスクリーニング方法の実行を妨げない、具体的にはエキソサイトーシス関連因子を構成するタンパク質をコードする遺伝子の発現量の測定を妨げない培養条件であれば、特段の限定なく適用することができる。

【0017】

本発明のスクリーニング方法が対象とする被験物質は、純物質、動植物由来の抽出物、またはそれらの混合物等のいずれであってもよい。

40

動植物由来の抽出物は、動物又は植物由来の抽出物自体のみならず、抽出物の画分、精製した画分、抽出物又は画分、精製物の溶媒除去物の総称を意味するものとし、植物由来の抽出物は、自生若しくは生育された植物、漢方生薬原料等として販売されるものを用いた抽出物、市販されている抽出物等が挙げられる。

抽出操作は、植物部位の全草を用いるほか、植物体、地上部、根茎部、木幹部、葉部、茎部、花穂、花蕾等の部位を使用することができるが、予めこれらを粉碎あるいは細切して抽出効率を向上させることが好ましい。抽出溶媒としては、水、エタノール、イソプロピルアルコール、ブタノールなどのアルコール類、1, 3 - ブタンジオール、ポリプロピレングリコールなどの多価アルコール類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、テトラヒドロフランなどのエーテル類等の極性溶媒から選択される一

50

種又は二種以上が好適なものとして例示することができる。具体的な抽出方法としては、例えば、植物体等の抽出に用いる部位又はその乾燥物 1 質量に対して、溶媒を 1 ~ 30 質量部加え、室温であれば数日間、沸点付近の温度であれば数時間浸漬し、室温まで冷却した後、所望により不溶物及び / 又は溶媒除去し、カラムクロマトグラフィー等で分画精製する方法が挙げられる。

【0018】

本発明のスクリーニング方法における手順の一例を以下に挙げるが、本発明の趣旨を逸脱しない限り以下の内容に限定されるものではなく、適宜変更して実施することができる。

まず、細胞に被験物質を添加し、24時間インキュベーションする。その後、該細胞から mRNA を抽出し、指標とするエキソサイトーシス関連因子をコードする遺伝子の発現量を、該遺伝子の特異的に検出するプライマーを用いて RT - PCR を行い、定量的に測定する。コントロールとして被験物質を添加しなかった細胞においても該遺伝子の発現量を測定する。被験物質を添加した細胞における該遺伝子の発現量が、被験物質を添加しなかった細胞における該遺伝子の発現量（コントロール）に対して小さく又は大きくなった場合、好ましくはコントロールに対して 10 % 以上、より好ましくは 15 % 以上、さらに好ましくは 20 % 以上変動した場合に、前記被験物質は色素沈着改善作用を有すると判定する。該判定された物質は、色素沈着改善剤となり得る。

【0019】

本明細書において「色素沈着」とは、メラニンがケラチノサイトに滞留することをいう。また、色素沈着を「改善」とするとは、すでにメラニンを取り込んだケラチノサイトにおいて細胞外にメラニンを排出することを促進することをいう。また、色素沈着の「改善」には色素沈着の「予防」も含み、「予防」は、メラノサイトからメラニンを受け渡されたケラチノサイトにおいて、エキソサイトーシス機構の活性が低下するのを防止し、メラニンの細胞外排出作用を維持又は増強することをいう。色素沈着を改善又は予防することにより、肌の色みが薄く又は明るくなり、美白効果が得られ得る。

色素沈着が改善されたことは、細胞レベルでは、細胞内のメラニン総量が減少し、細胞内のメラニン集合体として測定される面積がコントロールに比して小さくなったことを、顕微鏡の明視野画像を解析することにより確認することができる。または、細胞外に排出されたメラニン量を測定し、コントロールに比して大きくなったことによっても確認することができる。

また、肌組織レベルでは、色彩色差計、分光測色計等の周知の測色計による測定や、目視評価等により色素沈着が改善されたことを確認することができる。

【0020】

本発明のスクリーニング方法により色素沈着改善作用を有すると判定された物質（色素沈着改善剤）は、任意の調製方法により組成物に含有させることができる。

組成物としては、化粧品、医薬部外品、医薬品などが好適に例示でき、日常的に使用することから、化粧品、医薬部外品がより好ましい。その投与経路としては、特に限定されるものではないが、色素沈着改善作用を発揮するために皮膚への貯留性、標的部位への到達効率等を考慮し、経皮投与を採用して皮膚外用剤とすることが好ましい。

【0021】

本発明の色素沈着改善剤を含有する組成物は、美白用途に好適に用いることができる。

従来の美白剤や美白用皮膚外用剤は、チロシナーゼ合成阻害などにより、メラニンの生成を抑制して肌を美白へと導くものであった。

それに対して、本発明のスクリーニングにより色素沈着を改善すると判定された物質（色素沈着改善剤）は、新しいメカニズムによる美白剤となり得る。

通常、皮膚において表皮の最下部である基底層に位置するメラノサイトで合成されたメラニンは、隣接するケラチノサイトに受け渡される。ケラチノサイトは分裂して徐々に押し上げられ、最後は細胞核のない角質細胞に変化して垢となって剥がれ落ちる（ターンオーバー）。約 28 日周期のターンオーバーに従って、メラニンも細胞とともに剥がれ落ち

10

20

30

40

50

るため、生成したメラニンが肌細胞からなくなるには時間がかかる。しかしながら、本発明の色素沈着改善剤は、前述のようにメラニン取り込みにより活性が低下したケラチノサイトのメラニン排出機構を活性化する作用を有するため、ターンオーバーを待たずして、積極的にメラニンを細胞外へ排出することができる。また、加齢、過剰な紫外線、肌への過度の刺激、ストレスなどによりターンオーバーの周期が乱れると、新陳代謝が停滞し、メラニンも表皮に滞留してしまい、色素沈着が進んでシミ等の症状となり得るところ、本発明の色素沈着改善剤は、積極的にメラニンを細胞外へ排出し、メラニンの滞留を抑え、色素沈着が生じるのを防ぐことができる。

【0022】

本発明の組成物における、色素沈着改善剤の含有量（配合量）は、通常、0.00001質量%以上、好ましくは0.0001質量%以上、より好ましくは0.001質量%以上であり、通常15質量%以下、好ましくは10質量%以下、より好ましくは5質量%である。色素沈着改善剤の含有量（配合量）が少なすぎると所望の効果が得られにくい場合があり、多すぎると効果が頭打ちになるばかりか組成物の処方自由度を損なう場合があるからである。

また、組成物に含有させる色素沈着改善剤の種類は、一種類のみでなく二種類以上であってもよい。

【0023】

本発明の組成物の製造に際しては、化粧料、医薬部外品、医薬品などの製剤化で通常使用される任意成分を配合することができる。例えば、スクワラン、ワセリン、マイクロクリスタリンワックスなどの炭化水素類、ホホバ油、カルナウバワックス、オレイン酸オクチルドデシルなどのエステル類、オリーブ油、牛脂、椰子油などのトリグリセライド類、ステアリン酸、オレイン酸、レチノイン酸などの脂肪酸、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、オクチルドデカノール等の高級アルコール、スルホコハク酸エステルやポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム等のアニオン界面活性剤類、アルキルベタイン塩等の両性界面活性剤類、ジアルキルアンモニウム塩等のカチオン界面活性剤類、ソルビタン脂肪酸エステル、脂肪酸モノグリセライド、これらのポリオキシエチレン付加物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル等の非イオン界面活性剤類、ポリエチレングリコール、グリセリン、1,3-ブタンジオール等の多価アルコール類、増粘・ゲル化剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、色剤、防腐剤、粉体等を任意に配合することができる。

【0024】

また、本発明の組成物には、本発明の色素沈着改善剤以外の、美白用成分も配合してもよい。例えば、アスコルビン酸類、過酸化水素、コロイド硫黄、グルタチオン、ハイドロキノン、カテコール等の美白成分、チロシナーゼ関連蛋白阻害剤、エンドセリン作用抑制剤、プロトンポンプ阻害剤、ステムセルフクター結合阻害剤等のメラニン生成抑制剤、デンドライト伸張抑制剤、メラニン移送又は放出抑制剤、インテグリン産生促進剤などが挙げられる。従来の美白用成分とは作用機序の異なる本発明の色素沈着改善剤と組み合わせることにより、相加・相乗効果が期待できる。

組成物の製造は、常法に従ってこれらの成分を処理・配合することにより、困難なく行うことができる。

【実施例】

【0025】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0026】

<参考例1>メラニン取り込みによるエキソサイトーシス関連因子の発現への影響の検討
以下の手順で、メラニンを取り込ませたケラチノサイトにおけるエキソサイトーシス関連因子の発現変化を検討した。

トリプシン処理によりB16マウスメラノーマ細胞 5×10^6 個を回収し、PBS 3

10

20

30

40

50

mLで懸濁した。遠心し(1000rpm、2分)上清を除いた後、冷ホモジナイズバッファー(0.25M sucrose、10mM Tris、10mM KCl)2.5mLを加え細胞を懸濁した。氷浴上で、2.5mL注射筒と25G注射針で20回ホモジナイズした後、遠心(700g、10分、4℃)した。上清を回収し、90%(v/v)percollを361.3μL、上清を800μL加え懸濁した(最終濃度28%(v/v)percoll)。遠心(20000g、45分、4℃)し、エッペンチューブの底近くに見える黒い層を回収し、単離メラノソームとした。

新生児ヒト皮膚ケラチノサイトを、KG2培地で24穴プレートに 5.0×10^4 細胞数/ウェルとなるように播種した。播種24時間後、最終濃度0.01%(v/v)となるように単離メラノソームを添加したKG2培地(500μL/ウェル)に交換した。その24時間後、PBSで十分にピペッティングして細胞膜に付着したメラノソームを除去し、24穴プレートのケラチノサイトにRNeasy Mini Kit(QIAGEN社)のRLT bufferを添加しmRNAを抽出した。Quantitect Primer Assayを用いてRT-PCRを行い、ケラチノサイトに発現している小胞輸送関連タンパク質(syntaxin3及びSNAP-23)、モータータンパク(myosin10、myosinV、myosin2a)のmRNA量を測定した。なお、ヒトsyntaxin3及びSNAP-23遺伝子の塩基配列及びコードされるアミノ酸配列を、それぞれ配列番号1~4に示す。用いたプライマーを配列番号5~8に示す。18srRNAを内在性コントロールとして、各遺伝子のmRNA発現量を比較CT法により算出し、メラノソーム非添加のケラチノサイトにおける遺伝子発現量を「1」とした場合の相対値を、メラノソーム添加ケラチノサイトにおける遺伝子発現量とした。

図1に示すように、メラニン取り込みによってケラチノサイトにおいてsyntaxin3及びSNAP-23の何れも発現量が低下したことが分かる。

【0027】

<参考例2>エキソサイトーシス促進時のメラニン排出量の検討

以下の手順で、メラニンを取り込ませたケラチノサイトにおけるエキソサイトーシス促進時のメラニン排出の有無について確認した。

参考例1と同様に単離メラノソームを取得した。

新生児ヒト皮膚ケラチノサイトを、KG2培地で24穴プレートに 7.0×10^4 個/ウェルとなるように播種した。播種24時間後、最終濃度0.01%(v/v)となるように単離メラノソームを添加したKG2培地(500μL/ウェル)に交換した。その24時間後、PBSで十分にピペッティングして細胞膜に付着したメラノソームを除去し、エキソサイトーシス促進試薬であるPhorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を最終濃度100nMとなるように添加し、15分間曝露してエキソサイトーシスを活性化した。コントロールとしてPMA非添加のケラチノサイトも同様に用意した。その後、KG2培地に交換し、24時間培養した後、培養上清を回収、-80℃にて保管した。

-80℃にて保管した培地を取り出し、培地を溶解後、ELISA法にて培地中のメラノソーム量を定量した。定量方法を以下に示す。まず、ELISA plate(住友ベークライト社、カタログNo. MS-8596F)に回収した培地を100μL添加し、4℃にて一晩反応させた。その後、培地を除去し、3%BSA入りのPBS溶液を各ウェルに300μL添加し、1時間室温にてブロッキングした。溶液を除去し、3%BSA入りのPBSで1000倍に希釈した1次抗体:gp100(abcam、カタログNo. ab137078)を各ウェルに100μL添加し、2時間室温で反応させた。その後、溶液を除去し、0.1%Tween20入りのPBS溶液にて3回洗浄した。さらに、3%BSA入りのPBSで1000倍に希釈した2次抗体:Anti Rabbit IgG H&L(HRP)(abcam、カタログNo. ab6721)を各ウェルに100μL添加し、2時間室温で反応させた。その後、溶液を除去し、0.1%Tween20入りのPBS溶液にて3回洗浄した。100μLのTMB溶液(セラケアライフサイエンス、カタログNo. 52-00-01)を添加し、20分間発色させ、1N塩酸溶液

を添加して反応を停止させた。450 nmの吸光度を測定し、PMA非添加のケラチノサイトにおける吸光度値を「1」とした場合の相対値を、PMA添加ケラチノサイトにおけるメラニン排出量とした。

図2に示すように、エキソサイトーシスを促進したケラチノサイトにおいて、細胞外へのメラニン排出量が増加したことが分かる。

【0028】

<参考例3>メラニン取り込みによるエキソサイトーシス関連因子の発現への影響の検討

参考例2と同様に、PMA添加によりエキソサイトーシスを活性化したケラチノサイトと、コントロールのPMA非添加のケラチノサイトとを調製した。KG2培地に交換し、24時間培養した後、培地を除き、細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定・封入した。共焦点顕微鏡にてメラニン分布画像を取得し、画像解析ソフトImage Jを用いて二値化し、同視野面積における黒色領域の総面積を計測した。

図3に示すように、エキソサイトーシスを促進したケラチノサイトにおいて、メラニン分布量が小さく、色素沈着が改善したことが分かる。

【0029】

<参考例4>メラニン排出時のエキソサイトーシス関連因子の発現への影響の検討

以下の手順で、メラニン排出時のケラチノサイトに発現しているエキソサイトーシス関連因子の発現変動を確認した。

新生児ヒト皮膚ケラチノサイトを、KG2培地で24穴プレートに 5.0×10^4 細胞数/ウェルとなるように播種した。播種24時間後、PMAを最終濃度100 nMとなるように添加し、15分間曝露、エキソサイトーシスを活性化した。コントロールとしてPMA非添加のケラチノサイトも同様に用意した。24時間培養した後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社)のRLT bufferを添加しmRNAを抽出し、Quantitect Primer Assayを用いてRT-PCRを行い、メラニン取り込み時に発現低下している因子(syntaxin3、SNAP-23)のmRNA量を測定した。なお、配列番号5~8に示すプライマーを用いた。18srRNAを内在性コントロールとして、各遺伝子のmRNA発現量を比較CT法により算出し、PMA非添加のケラチノサイトにおける遺伝子発現量を「1」とした場合の相対値を、PMA添加ケラチノサイトにおける遺伝子発現量とした。

図4に示すように、エキソサイトーシスを促進したケラチノサイトにおいて、syntaxin3及びSNAP-23の発現量が増加したことが分かる。

【0030】

<参考例5>エキソサイトーシス関連因子の発現阻害によるメラニン排出量への影響の検討

以下の手順で、ケラチノサイトに発現しているエキソサイトーシス関連因子(syntaxin3、SNAP-23)の発現をsiRNAを用いて阻害したときのメラニン排出への影響を検討した。

参考例1と同様に単離メラノソームを取得した。

新生児ヒト皮膚ケラチノサイトを、KG2培地で24穴プレートに 7.0×10^4 細胞数/ウェルとなるように播種した。播種24時間後、最終濃度0.01%となるように単離メラノソームを添加したKG2培地(500 µL/ウェル)に交換した。その24時間後、PBSで十分にピペッティングして細胞膜に付着したメラノソームを除去し、次いで抗生物質無添加のKG2培地(250 µL/ウェル)に交換した。別途、トランスフェクション試薬(Opti-Mem 50 µL + TransIT-TKO (Mirus社) 1 µL)を調製し、よく混和した後、10分間インキュベートした。このトランスフェクション試薬にFlexiTube syntaxin3 siRNA (QIAGEN社、カタログNo. SI03035942)又はSNAP-23 siRNA (QIAGEN社、カタログNo. SI00056448)を最終濃度50 nMになるように添加し、よく混和した後、10分間インキュベートした。このsiRNA添加トランスフェクション試薬を、前記ケラチノサイトに添加した(50 µL/ウェル)。比較のためsiRNA添加

トランスフェクション試薬非添加のケラチノサイトも同様に用意した。24時間後、培地を除きPBSで洗浄し、PMAを最終濃度100nMとなるように添加し、15分間曝露してエキソサイトーシスを活性化し、さらに24時間後培養した。コントロールとしてPMA非添加のケラチノサイトも同様に用意した。培養上清を回収、-80℃にて保管した。

-80℃にて保管した培地を取り出し、培地を溶解後、参考例2と同様に培地中のメラノソーム量を定量した。450nmの吸光度を測定し、PMA非添加のケラチノサイトにおける吸光度値を「1」とした場合の相対値を、各ケラチノサイトにおけるメラニン排出量とした。

図5に示すように、エキソサイトーシス関連因子の発現を阻害したケラチノサイトにおいて、エキソサイトーシス促進試薬を用いても細胞外へのメラニン排出量が抑制されたことが分かる。

【0031】

<実施例1>エキソサイトーシス関連因子のmRNA発現量を指標としたスクリーニング以下の手順で、エキソサイトーシス関連因子のsyntaxin3又はSNAP-23の活性を指標とした色素沈着改善剤のスクリーニングを行った。

新生児ヒト皮膚ケラチノサイトを、KG2培地で24穴プレートに 5.0×10^4 細胞数/ウェルとなるように播種した。播種24時間後、被験物質として表1に示す植物抽出エキスを添加した(1μL/ウェル)。24時間後、培地を除きPBSで洗浄し、24穴プレートのケラチノサイトにRNeasyMiniKit(QIAGEN社)のRLT bufferを添加しmRNAを抽出し、Quantitect Primer Assayを用いて指標として、RT-PCRを行い、syntaxin3及びSNAP-23の各発現量を測定した。なお、配列番号5～8に示すプライマーを用いた。18srRNAを内在性コントロールとしてsyntaxin3及びSNAP-23の各mRNA発現量を比較CT法により算出し、前記エキスを非添加のケラチノサイトにおけるsyntaxin3及びSNAP-23の各mRNA発現量を「1」とした場合の相対値を、前記エキスを添加ケラチノサイトにおける遺伝子発現量とした。

表1に示すように、エンメイソウエキスの添加により、syntaxin3及びSNAP-23の両方の遺伝子発現量が増加したことがわかる。

【0032】

【表1】

表1

被験試料	mRNA 発現量	
	Syntaxin-3	SNAP-23
なし (コントロール)	1	1
エンメイソウエキス	1.9	1.2
モモ葉エキス	1.6	-
センキュウエキス	-	1.6
アマチャヅルエキス	0.60	0.39

【0033】

<実施例2>エキソサイトーシス関連因子のmRNA発現量を促進するエキスによる色素沈着改善効果の確認

参考例1と同様に単離メラノソームを取得した。

新生児ヒト正常ケラチノサイトを、4穴チャンバースライドにそれぞれ 7.0×10^4 個/ウェルとなるように播種した。播種24時間後、最終濃度0.01%(v/v)となるように単離メラノソームを添加したKG2培地(1000μL/ウェル)に交換した。その24時間後、PBSで十分にピペッティングして細胞膜に付着したメラノソームを除

去した。ポジティブコントロールとして、PMAを最終濃度100nMとなるように添加し、15分間曝露してエクソサイトーシスを活性化し、さらに24時間培養した。一方、被検物質として、実施例1でsyntaxin3及びSNAP-23の両方のmRNA発現量が増加した試料（エンメイソウエキス）を最終濃度1%になるように添加した（10μL/ウェル）さらに24時間培養した。培養後、培地を除き、細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定・封入した。共焦点顕微鏡にてメラニン分布画像を取得した（図6）。該画像を画像解析ソフトImageJを用いて二値化し、同視野面積における黑色領域の総面積を計測した。

図7に示すように、エンメイソウエキスを添加したケラチノサイトにおいて、メラニン分布量が小さく、色素沈着が改善したことが分かる。

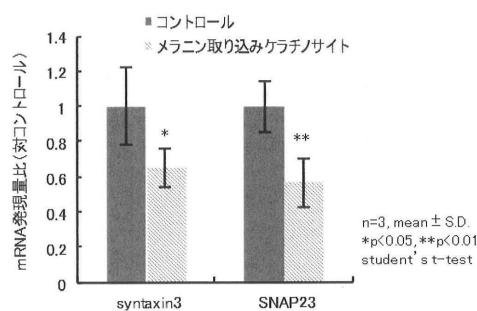
10

【産業上の利用可能性】

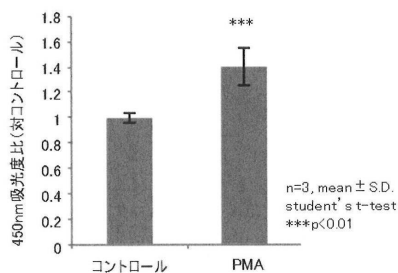
【0034】

本発明のスクリーニング法により、新たな作用機序に基づく美白剤として有効な成分を探索することができるため、産業上非常に有用である。

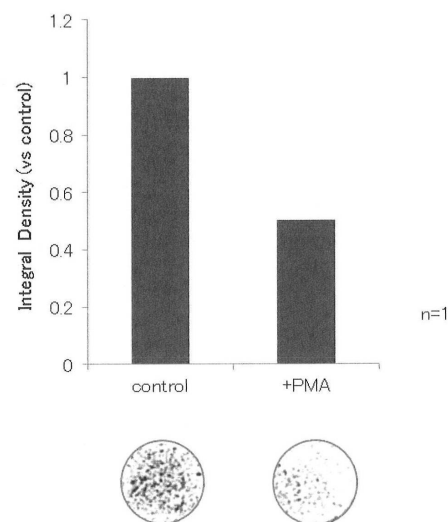
【図1】



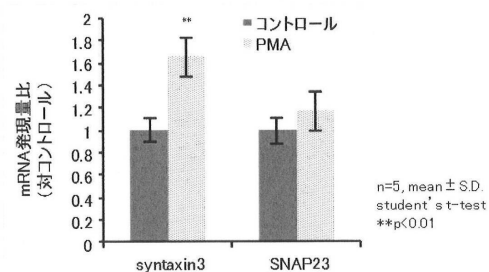
【図2】



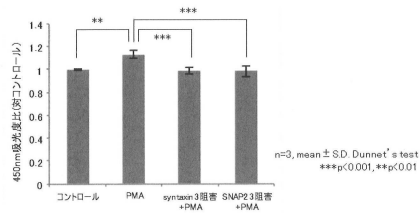
【図3】



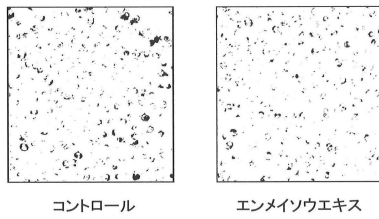
【図4】



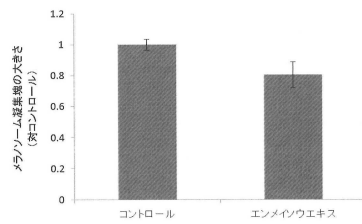
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006583704000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 Q	19/02 (2006.01)	A 6 1 Q	19/02
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
C 1 2 Q	1/686 (2018.01)	C 1 2 Q	1/686 Z

(72)発明者 望月 麻友
 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特開2009-221200(JP,A)
 特開2017-195901(JP,A)
 国際公開第2013/033520(WO,A1)
 特開2014-048235(JP,A)
 特開2010-081913(JP,A)
 特開2012-255710(JP,A)
 国際公開第2009/113446(WO,A1)
 特開2007-289063(JP,A)
 特開2006-045084(JP,A)
 特開2008-232693(JP,A)
 特表2007-517866(JP,A)
 特開2004-244326(JP,A)
 特開2012-171960(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12Q 1/02
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
 WPIDS(STN)