

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-90112

(P2010-90112A)

(43) 公開日 平成22年4月22日(2010.4.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/64 (2006.01)	A 6 1 K 35/64 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 15 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-201984 (P2009-201984)	(71) 出願人	391020171
(22) 出願日	平成21年9月1日 (2009.9.1)		株式会社クキンピーガーデン
(31) 優先権主張番号	特願2008-233696 (P2008-233696)		静岡県静岡市清水区馬走北2番8号
(32) 優先日	平成20年9月11日 (2008.9.11)	(74) 代理人	100075812
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 吉武 賢次
		(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
		(74) 代理人	100143971
			弁理士 藤井 宏行
		(72) 発明者	鎌 倉 昌 樹
			富山県射水市戸破1854-2-B201
			最終頁に続く

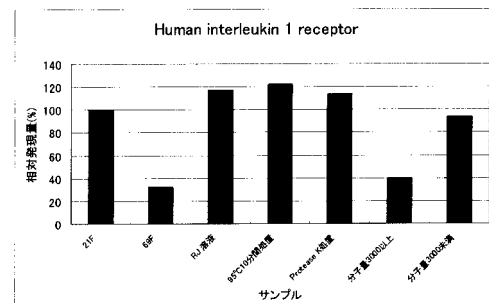
(54) 【発明の名称】 遺伝子発現抑制剤および遺伝子発現促進剤並びにそれらの検出方法

(57) 【要約】

【課題】ローヤルゼリーを含む遺伝子の発現抑制剤および発現促進剤並びにそれらの検出方法の提供。

【解決手段】ローヤルゼリーまたはその画分を含んでなる発現抑制剤は、配列番号1～5からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現抑制作用を有し、ローヤルゼリーまたはその画分を含んでなる発現促進剤は配列番号6～13からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現促進作用を有する。これらの遺伝子の発現抑制剤または発現促進剤は、抗炎症作用、角化異常蓄積抑制作用、創傷治癒促進作用、および/または保湿作用を有する。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ローヤルゼリーを含んでなる、配列番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 2】

分子量 3000 未満のローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 3】

熱処理に対して安定なローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 1 および 2 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤。

10

【請求項 4】

熱処理に対して不安定なローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 4 の塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 5】

非ペプチド性のローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 4 の塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 6】

ペプチド性のローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 1 および 2 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 7】

抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の遺伝子発現抑制剤。

20

【請求項 8】

ローヤルゼリーを含んでなる、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現促進剤。

【請求項 9】

分子量 3000 未満のローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現促進剤。

【請求項 10】

熱処理に対して安定なローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現促進剤。

30

【請求項 11】

非ペプチド性のローヤルゼリー中の画分を含んでなる、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現促進剤。

【請求項 12】

創傷治癒促進作用および / または保湿作用を有する、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の遺伝子の発現促進剤。

【請求項 13】

投与方法が経皮投与である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の遺伝子発現抑制剤。

【請求項 14】

投与方法が経皮投与である、請求項 8 ~ 12 のいずれか一項に記載の遺伝子発現促進剤。

40

【請求項 15】

細胞における遺伝子発現を抑制または促進する、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の検出方法であって、

(a) 前記細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の存在下において培養する工程、そして

(b) 前記工程 (a) により得られる細胞において、遺伝子発現の抑制または促進を検出する工程

を含んでなり、

50

前記工程 (b) において遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その分画および / または化合物をその遺伝子発現を抑制するものとして検出し、前記工程 (b) において遺伝子発現の促進が検出された場合には、その分画および / または化合物の遺伝子発現を促進するものとして検出する、方法。

【請求項 16】

前記工程 (b) が、前記工程 (a) により得られる細胞における遺伝子発現の強度と、該ローヤルゼリーの分画および / または化合物の非存在下で培養された細胞における遺伝子発現の強度とを比較することを含んでなる、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

細胞における老化を抑制する、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の検出方法であって、

(c) 非若年期由来細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の存在下または非存在下において培養する工程、並びに若年期由来細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の非存在下において培養する工程、そして

(d) 前記工程 (c) により得られる細胞において、遺伝子発現の抑制または促進を検出する工程

を含んでなり、

前記工程 (d) において、該ローヤルゼリー中の非存在下の若年期由来細胞の遺伝子発現が、該分画および / または化合物の非存在下の非若年期由来細胞の遺伝子発現と比較して抑制または促進されていた場合に、該分画および / または化合物の存在下における非若年期由来細胞の遺伝子発現強度が、該分画および / または化合物の非存在下における若年期由来細胞の遺伝子発現強度と比較して同程度となる該ローヤルゼリー中の分画および / または化合物を検出することを特徴とする、方法。

【請求項 18】

前記細胞が哺乳類細胞である、請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記哺乳類細胞がヒト由来の細胞である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記遺伝子が、抗炎症作用、角化異常蓄積抑制作用、創傷治癒促進作用、および / または保湿作用を有するタンパク質をコードする遺伝子である、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記遺伝子が配列番号 1 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記工程 (b) または前記工程 (d) が、マイクロアレイおよび / またはリアルタイム PCR を用いて検出するものである、請求項 15 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

発明の分野

本発明は、遺伝子発現抑制剤および遺伝子発現促進剤並びにそれらの検出方法に関する。

【0002】

背景技術

現在、ローヤルゼリー (RJ) は、健康食品、医薬品、化粧品など世界中で広く利用されており、血管拡張、血圧降下、抗菌作用等の薬理作用、および栄養生理的作用が報告されている。

【0003】

これまでに、ローヤルゼリーのアルカリ可溶化分画から抽出されたコラーゲン産生促進

10

20

30

40

50

活性を有する因子およびその作用機序が報告されている (Biosci. Biotechnol. Biochem. (2004) 68(4). 767-773 (非特許文献 1))。また、ローヤルゼリー蛋白質加水分解物の化粧品用途、特に、美白化粧品、スキンケア化粧品、抗老化化粧品、美肌化粧品シワ改善 / シワ予防用化粧品が開示されている (特開 2 0 0 8 - 1 1 0 9 2 7 号公報 (特許文献 1))。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、ローヤルゼリーおよびローヤルゼリーの分画による抗炎症作用、創傷治癒促進作用、保湿作用、または角化異常蓄積抑制作用を有する遺伝子の発現抑制剤または発現促進剤並びにそれらの検出方法について本発明者らの知る限りでは報告はない。

【 先行技術文献 】

10

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 8 - 1 1 0 9 2 7 号公報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Biosci. Biotechnol. Biochem. (2004) 68(4). 767-773

【 発明の概要 】

【 0 0 0 7 】

本発明者は、今般、特定の遺伝子の発現抑制剤および発現促進剤並びにそれらの検出方法を見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

20

【 0 0 0 8 】

従って、本発明は、特定の遺伝子の発現抑制剤および発現促進剤並びにそれらの検出方法の提供をその目的としている。

【 0 0 0 9 】

そして、本発明の第一の態様によれば、ローヤルゼリーを含んでなる配列番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現抑制剤である。

【 0 0 1 0 】

また、本発明の別の態様によれば、ローヤルゼリーを含んでなる配列番号 6 ~ 1 3 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現促進剤である。

【 0 0 1 1 】

30

さらに、本発明の別の態様によれば、細胞における遺伝子発現を抑制または促進する、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の検出方法であり、

(a) 前記細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の存在下において培養する工程、そして

(b) 前記工程 (a) により得られる細胞において、遺伝子発現の抑制または促進を検出する工程

を含んでなり、

前記工程 (b) において遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その分画および / または化合物がその遺伝子発現を抑制するものとして検出され、前記工程 (b) において遺伝子発現の促進が検出された場合には、その分画および / または化合物が遺伝子発現を促進するものとして検出される方法である。

40

【 0 0 1 2 】

また、本発明の別の態様によれば、細胞における老化を抑制する、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の検出方法であり、

(c) 非若年期由来細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の存在下または非存在下において培養する工程並びに若年期由来細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の非存在下において培養する工程、そして

(d) 前記工程 (c) により得られる細胞において、遺伝子発現の抑制または促進を検出する工程

を含んでなり、

50

前記工程 (d) において、該ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の非存在下の若年期由来細胞の遺伝子発現が、該非存在下の非若年期由来細胞の遺伝子発現と比較して抑制または促進されていた場合に、該存在下においての非若年期由来細胞の遺伝子発現強度が、該非存在下における若年期由来細胞の遺伝子発現強度と比較して同程度となる該ローヤルゼリー中の分画および / または化合物を検出する方法である。

【 0 0 1 3 】

本発明の方法によれば、遺伝子発現抑制剤および遺伝子発現促進剤並びにそれらの検出方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 4 】

【図 1】図 1 は、21 歳ヒト女性線維芽細胞 (2 1 F) の Human interleukin 1 receptor 遺伝子の発現量を 1 0 0 とした場合の、「6 9 F」、「RJ 溶液」、「95 10 分間処置」、「Protease K 処置」、「分子量 3000 以上」、および「分子量 3000 未満」の遺伝子の相対的発現量を表す。「6 9 F」は 6 9 歳ヒト女性線維芽細胞 (6 9 F) の相対発現量を表し、「RJ 溶液」は下記 RJ 溶液分画を加えた培地で培養した 6 9 F の相対発現量を表し、「95 10 分間処置」は下記 95 10 分間処置分画を加えた培地で培養した 6 9 F の相対発現量を表し、「Protease K 処置」は下記 Protease K 処置分画を加えた培地で培養した 6 9 F の相対発現量を表し、「分子量 3000 以上」は下記分子量 3000 以上分画を加えた培地で培養した 6 9 F の相対発現量を表し、「分子量 3000 未満」は下記分子量 3000 未満分画を加えた培地で培養した 6 9 F の相対発現量を表す。

【図 2】図 2 は、図 1 と同様、2 1 F の Human Actin alpha 遺伝子の発現量を 1 0 0 とした場合の、「6 9 F」、「RJ 溶液」、「95 10 分間処置」、「Protease K 処置」、「分子量 3000 以上」、および「分子量 3000 未満」の遺伝子の相対的発現量を表す。

【図 3】図 3 は、図 1 と同様、2 1 F の Human Na⁺/H⁺ exchanger 遺伝子の発現量を 1 0 0 とした場合の、「6 9 F」、「RJ 溶液」、「95 10 分間処置」、「Protease K 処置」、「分子量 3000 以上」、および「分子量 3000 未満」の遺伝子の相対的発現量を表す。

【図 4】図 4 は、図 1 と同様、2 1 F の Human tumor necrosis factor 遺伝子の発現量を 1 0 0 とした場合の、「6 9 F」、「RJ 溶液」、「95 10 分間処置」、「Protease K 処置」、「分子量 3000 以上」、および「分子量 3000 未満」の遺伝子の相対的発現量を表す。

【図 5】図 5 は、図 1 と同様、2 1 F の Human interleukin 3 遺伝子の発現量を 1 0 0 とした場合の、「6 9 F」、「RJ 溶液」、「95 10 分間処置」、「Protease K 処置」、「分子量 3000 以上」、および「分子量 3000 未満」の遺伝子の相対的発現量を表す。

【図 6】図 6 は、図 1 と同様、2 1 F の Human keratin 2 遺伝子の発現量を 1 0 0 とした場合の、「6 9 F」、「RJ 溶液」、「95 10 分間処置」、「Protease K 処置」、「分子量 3000 以上」、および「分子量 3000 未満」の遺伝子の相対的発現量を表す。

【発明の具体的説明】

【 0 0 1 5 】

遺伝子の発現促進剤および発現抑制剤

本発明による遺伝子発現抑制剤または遺伝子発現促進剤に含まれるローヤルゼリーおよびローヤルゼリー中の画分は、特に限定されず、いずれの種類のミツバチ由来のものであってもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明によるローヤルゼリーを含む遺伝子の発現抑制剤が抑制する遺伝子は、配列番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子であれば特に限定されないが、好ましくは配列番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子である。これらの遺伝子の発現を抑制することにより、抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用が発揮される。

【 0 0 1 7 】

また、ローヤルゼリー中の分子量 3 0 0 0 未満の画分は、配列番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現を抑制でき、好ましくは配列

10

20

30

40

50

番号 1 ~ 5 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子の発現を抑制できる。これらの遺伝子の発現を抑制することにより、抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用が発揮される。

【 0 0 1 8 】

さらに、熱処理に対して安定なローヤルゼリー中の画分は配列番号 1 および 2 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現を抑制でき、好ましくは配列番号 1 および 2 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子の発現を抑制できる。これらの遺伝子の発現を抑制することにより、抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用が発揮され、好ましくは抗炎症作用が発揮される。ここで、前記熱処理とは、60 以上の熱を加えることをいい、好ましくは 95 以上の熱を加えることをいう。また、熱処理に対して安定とは、前記熱処理を行った場合にも変性しないことをいう。

10

【 0 0 1 9 】

また、熱処理に対して不安定なローヤルゼリー中の画分は配列番号 4 の塩基配列を含む遺伝子の発現を抑制でき、好ましくは配列番号 4 の塩基配列からなる遺伝子の発現を抑制できる。これらの遺伝子の発現を抑制することにより、抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用が発揮され、好ましくは角化異常蓄積抑制作用が発揮される。ここで、前記熱処理とは、前述と同様の意味を表す。また、熱処理に対して不安定とは、前記熱処理を行った場合に変性することをいう。

20

【 0 0 2 0 】

また、非ペプチド性のローヤルゼリー中の画分は、配列番号 4 の塩基配列を含む遺伝子の発現を抑制でき、好ましくは配列番号 4 の塩基配列からなる遺伝子の発現を抑制できる。これらの遺伝子の発現を抑制することにより、抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用が発揮され、好ましくは角化異常蓄積抑制作用が発揮される。非ペプチド性のローヤルゼリー中の画分とは、プロテアーゼ等により処理した場合でも、分解されないローヤルゼリー中の画分をいう。プロテアーゼによる処理は、プロテアーゼによる処理であれば、そのプロテアーゼの種類は限定されないが、好ましくはプロテアーゼ K により処理することが好ましい。

【 0 0 2 1 】

また、ペプチド性のローヤルゼリー中の画分は、配列番号 1 または 2 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現を抑制でき、好ましくは配列番号 1 または 2 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子の発現を抑制できる。これらの遺伝子の発現を抑制することにより、抗炎症作用および / または角化異常蓄積抑制作用が発揮され、好ましくは抗炎症作用が発揮される。ペプチド性のローヤルゼリー中の画分とは、プロテアーゼ等により処理した場合に、分解されるローヤルゼリー中の画分をいう。

30

【 0 0 2 2 】

さらに、本発明によるローヤルゼリーを含む遺伝子発現促進剤が促進する遺伝子は、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子であれば特に限定されないが、好ましくは配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子である。これらの遺伝子の発現を促進することにより、創傷治癒促進作用および / または保湿作用が発揮される。

40

【 0 0 2 3 】

また、ローヤルゼリー中の分子量 3000 未満の画分は、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現を促進でき、好ましくは配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子の発現を促進できる。これらの遺伝子発現を促進することにより創傷治癒促進作用および / または保湿作用が発揮される。

【 0 0 2 4 】

また、熱処理されたローヤルゼリーの画分は、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択さ

50

れる少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現を促進でき、好ましくは、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子の発現を促進できる。これらの遺伝子の発現を促進することにより創傷治癒促進作用および / または保湿作用が発揮される。ここで、熱処理とは、前述と同様の意味を表す。

【0025】

さらに、非ペプチド性のローヤルゼリー中の画分は、配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子の発現を促進でき、好ましくは配列番号 6 ~ 13 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子の発現を促進できる。これらの遺伝子発現を促進することにより、創傷治癒促進作用および / または保湿作用が発揮される。非ペプチド性のローヤルゼリー中の画分とは、前述と同様の意味を表す。

10

【0026】

本発明による発現抑制剤または発現促進剤は、ローヤルゼリーまたはローヤルゼリーの各画分をそのまま用いてもよく、また他の賦形剤、結合剤等とともに、経口または経口投与に適した剤形とされてよい。

【0027】

前記賦形剤としては、例えば乳糖、白糖、ブドウ糖、コーンスターチ、マンニトール、ソルビトール、デンプン、 α 化デンプン、デキストリン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、またはリン酸水素カルシウム等を挙げることができる。

20

【0028】

本発明による発現抑制剤または発現促進剤の投与方法は、特に限定されないが、好ましくは経皮投与である。

【0029】

検出方法

本発明による検出方法は、細胞における遺伝子発現を抑制または促進する、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の検出方法であって、

(a) 前記細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の存在下において培養する工程、そして

(b) 前記工程 (a) により得られる細胞において、遺伝子発現の抑制または促進を検出する工程

30

を含んでなり、

前記工程 (b) において遺伝子発現の抑制が検出された場合には、その分画および / または化合物をその遺伝子発現を抑制するものとして検出し、前記工程 (b) において遺伝子発現の促進が検出された場合には、その分画および / または化合物の遺伝子発現を促進するものとして検出する方法である。

【0030】

また、本発明の好ましい態様によれば、前記工程 (b) が、前記工程 (a) により得られる細胞における遺伝子発現の強度と、該ローヤルゼリーの分画および / または化合物の非存在下で培養された細胞における遺伝子発現の強度とを比較することを含んでなる検出方法である。

40

【0031】

さらに、本発明の別の態様によれば、細胞における老化を抑制する、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の検出方法であって、

(c) 非若年期由来細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の存在下または非存在下において培養する工程、並びに若年期由来細胞をローヤルゼリー中の分画および / または化合物の非存在下において培養する工程、そして

(d) 前記工程 (c) により得られる細胞において、遺伝子発現の抑制または促進を検出する工程

を含んでなり、

50

前記工程 (d) において、該ローヤルゼリー中の非存在下の若年期由来細胞の遺伝子発現が、該分画および / または化合物の非存在下の非若年期由来細胞の遺伝子発現と比較して抑制または促進されていた場合に、該分画および / または化合物の存在下における非若年期由来細胞の遺伝子発現強度が、該分画および / または化合物の非存在下における若年期由来細胞の遺伝子発現強度と比較して同程度となる該ローヤルゼリー中の分画および / または化合物を検出することを特徴とする方法である。

【 0 0 3 2 】

本発明の好ましい態様によれば、前記工程 (a) および工程 (c) において用いられる細胞は、特に限定されないが、哺乳類細胞であることが好ましい。このような哺乳類細胞としては、様々なものが当技術分野において知られており、例えば、マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒト等由来の細胞が挙げられ、その中でもヒト由来の細胞が特に好ましい。また、細胞種は特に限定されないが、例えば、線維芽細胞、ケラチノサイト等の細胞が挙げられ、中でも線維芽細胞が好ましい。

10

【 0 0 3 3 】

本発明の検出方法に用いられる若年期由来細胞とは、概ね各生物の平均寿命の 1 / 2 未満の週齢または年齢の個体から採取した細胞であるが、例えばヒトでは 3 0 歳以下の個体から採取した細胞を表し、好ましくは 2 5 歳以下の個体から採取した細胞を表す。また、非若年期由来細胞とは、概ね各生物の平均寿命の 1 / 2 以上の週齢または年齢の個体から採取した細胞であるが、例えばヒトでは 3 1 歳以上の個体から採取した細胞を表し、好ましくは 4 0 歳以上の個体から採取した細胞を表す。

20

【 0 0 3 4 】

本発明の検出方法における培養は、当技術分野において周知の標準的な方法、例えば、ローヤルゼリーと、細胞とをインキュベートすることによって行うことができる。培養における培地、温度、時間、ローヤルゼリーの量、細胞の量、および添加物などは、当業者であれば適切に選択することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明の検出方法の遺伝子発現に用いられる遺伝子は、特に限定されないが、抗炎症作用、角化異常蓄積抑制作用、創傷治癒促進作用、および / または保湿作用を有するタンパク質をコードする遺伝子が好ましく、より好ましくは配列番号 1 ~ 1 3 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列を含む遺伝子であり、さらにより好ましくは配列番号 1 ~ 1 3 からなる群から選択される少なくとも一つの塩基配列からなる遺伝子である。

30

【 0 0 3 6 】

遺伝子の発現が同程度とは、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の非存在下の非若年期由来細胞の遺伝子発現強度と比較して、該存在下の非若年期由来細胞の遺伝子発現強度が、ローヤルゼリー中の分画および / または化合物の非存在下の若年期由来細胞の遺伝子発現に、わずかでも近づいた場合には「同程度」とする。好ましくは、該存在下の非若年期由来細胞の遺伝子相対発現量が、非存在下の若年期由来細胞の遺伝子相対発現量と比べて、 $\pm 40\%$ 以内であることが好ましく、より好ましくは $\pm 30\%$ 以内であり、さらにより好ましくは $\pm 20\%$ 以内である。

40

【 0 0 3 7 】

本発明の方法における工程 (b) および工程 (d) は、工程 (a) および工程 (c) により得られる細胞の遺伝子発現の抑制または促進を検出する方法であれば特に限定されないが、マイクロアレイおよび / またはリアルタイム P C R を用いて検出することが好ましい。

【 実施例 】

【 0 0 3 8 】

以下、実施例によって本発明をより詳細に説明するが、これら実施例により本発明が限定されるものではない。

【 0 0 3 9 】

D N A マイクロアレイ解析

50

DNAマイクロアレイ解析には、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した69歳ヒト女性線維芽細胞(69F)と、21歳ヒト女性線維芽細胞(21F)とを用いた。前記二種の細胞を培養するための培地として、MEM培地(DSファーマバイオメディカル株式会社製)に非必須アミノ酸を1%(w/v)と、非動化した子ウシ血清(FBS)(MOREGATE)を10%(v/v)となるように加えた培地(m-MEM培地)を用いた。

【0040】

前記m-MEM培地において、69Fと、21Fとが 2.5×10^5 cells/10cm dishの濃度となるように調製して、CO₂インキュベータを用い、5%CO₂、37℃にて培養した。6時間培養後、69Fを培養しているm-MEM培地をローヤルゼリー(RJ)(株)クワンピーガーデン社製、中国浙江省産)添加m-MEM培地(1.0mg/mL)またはRJ無添加m-MEM培地に交換し、さらにCO₂インキュベータを用い、5%CO₂、37℃にて48時間培養した。培養後、前記69Fと21FとからRNeasy Mini Kit(キアゲン社製)を用いてRNAを抽出し、Whole Genome Oligo DNA マイクロアレイ(遺伝子数: 4万4千)ヒト用(Agilent社製)を用い、One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis(Cy3-labeled)により、13種の遺伝子に関してDNAマイクロアレイ解析を行った。DNAマイクロアレイ解析の解析結果を下記表1に示す。

【表 1】

配列 番号	Entrez GeneID*	Gene Symbol**	遺伝子名	69F/21F***	69F+RJ/21F***	69F+RJ/69F***
1	7124	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	12.61	1.40	0.11
2	3562	IL3	interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	10.28	1.39	0.13
3	163702	IL28RA	interleukin 28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor)	10.02	1.40	0.14
4	3849	KRT2	keratin 2 (epidermal ichthyosis bullosa of Siemens)	7.02	1.77	0.25
5	391458	KRT18P46	keratin 18 pseudogene 46	8.90	2.50	0.28
6	150159	NHEDC1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger domain containing 1	0.30	0.73	2.42
7	3386	ICAM4	intercellular adhesion molecule 4 (Landsteiner-Wiener blood group)	0.37	0.86	2.30
8	51332	SPTBN5	spectrin, beta, non-erythrocytic 5	0.46	0.98	2.15
9	7850	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	0.52	1.02	1.98
10	58	ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	0.42	0.71	1.70
11	51412	ACTL6B	actin-like 6B	0.44	0.75	1.69
12	119	ADD2	adducin 2 (beta)	0.43	0.73	1.68
13	366	AQP9	aquaporin 9	0.38	0.59	1.54

* Entrez GeneID は NCBI Entrez Gene データベース(URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の GeneID を表す。

** Gene Symbol は NCBI Entrez Gene データベース(URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)の Official Symbol を表す。

***各検体組合せの発現変動比を表し、69F/21F は 69F の発現量を 21F の発現量で割ったもの、69F+RJ/21F は RJ 添加 m-MEM 培地中で培養した 69F の発現量を 21F の発現量で割ったもの、69F+RJ/69F は RJ 添加 m-MEM 培地中で培養した 69F の発現量を 69F の発現量で割ったものである。

10

20

30

40

RJ 3gを100mlの蒸留水に溶解した後、遠心分離（5000rpm、10分間、4℃）し、その上清（上清1）を以下の各工程で反応させ、RJの成分分画のRJ 溶液分画、95℃10分間処置分画、Protease K処置分画、分子量3000以上分画、および分子量3000未満分画を調製した。

・RJ 溶液分画：MEM培地により上記上清1を1.0mg/mlの濃度となるように調製した。

・95℃10分間処置分画：上記上清1を95℃、10分間過熱し、その後遠心分離（15000rpm、10分、4℃）した。その上清を、その濃度が1.0mg/mlとなるようにMEM培地に添加した。

・Protease K処置分画：上記上清1にProtease K（和光純薬工業株式会社製）を1ug/mlの濃度となるように添加し、37℃で1回反応させ、その後遠心分離（15000rpm、10分間、4℃）し、その上清を、その濃度が1.0mg/mlとなるようにMEM培地に添加した。

・分子量3000以上分画：上記上清1を分子量3000の限外ろ過膜が結合したチューブ（Amicon Ultra:日本ミリポア株式会社製）で遠心分離（15000rpm、30分間、4℃）し、その濃縮液を、その濃度が1.0mg/mlとなるようにMEM培地に添加した。

・分子量3000未満分画：上清1を分子量3000の限外ろ過膜が結合したチューブ（Amicon Ultra:MILLIPORE）で遠心分離（15000rpm、30分間、4℃）し、その通過液を、その濃度が1.0mg/mlとなるようにMEM培地に添加した。

【0042】

若年期由来細胞および老年期由来細胞の培養

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した69歳ヒト女性線維芽細胞（69F）と21歳ヒト女性線維芽細胞（21F）とを用いた。前記二種の細胞を培養するための培地として、MEM培地（DSファーマバイオメディカル株式会社製）に非必須アミノ酸を1%（w/v）と、非動化した子ウシ血清（FBS）（MOREGATE）を10%（v/v）となるように加えた培地（m-MEM培地）を用いた。

【0043】

前記m-MEM培地において、69Fと21Fとが 2.5×10^5 cells/10cm dishの濃度となるように調製して、CO₂インキュベータを用い、5%CO₂、37℃にて培養した。6時間培養後、69Fを培養しているm-MEM培地をRJ（（株）クエンビーガーデン社製、中国浙江省産）添加m-MEM培地（1.0mg/mL）、上記成分分画（RJ 溶液分画、95℃10分間処置分画、Protease K処置分画、分子量3000以上分画、および分子量3000未満分画）添加培地m-MEM培地、またはRJ無添加m-MEM培地に交換した。さらに、上記細胞を、CO₂インキュベータを用いて、5%CO₂、37℃にて48時間培養した。培養後、前記69Fと21FとからRNeasy Mini Kit（キアゲン社製）を用いてRNAを抽出した。

【0044】

RT-PCR

逆転写反応

上記RNAからのcDNAの合成は、PrimeScript RT reagent Kit（タカラバイオ株式会社製）を用いて行った。以下のような組成の溶液を調製した。一反応20μl当たり200ngのtotal RNAを添加し、逆転写反応（37℃、15分間、85℃、1分間）を行い、cDNAを合成した。

化合物名	添加量
5×PrimeScript Buffer	4.0 μl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0 μl
Oligo dT Primer	1.0 μl
Random 6 mers	1.0 μl
total RNA (100ng/ul)	2.0 μl
RNase Feed H ₂ O	1 μl
合計	20 μl

【0045】

リアルタイム（RT）-PCR反応

RT-PCRに用いたプライマーは以下のとおりである。

Human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH):

- ・ GCACCGTCAAGGCTGAGAAC (Forward) (配列番号 1 4)
- ・ TGGTGAAGACGCCAGTGGA (Reverse) (配列番号 1 5)

Human interleukin 1 receptor (IL1R)

- ・ AAGGAAGCCTCCTCCACGTT(Forward) (配列番号 1 6)
- ・ CATCCATATTCCCCCAAAA(Reverse) (配列番号 1 7)

Human Actin alpha (Actin)

- ・ CACTGAGCGTGGCTACTCCTT (Forward) (配列番号 1 8)
- ・ CGCCATCTCGTTCTCGAAGT(Reverse) (配列番号 1 9)

Human aquaporin 9 (アクアポリン)

- ・ TCCTCCCTGGGACTGAACAG(Forward) (配列番号 2 0)
- ・ AGGGCCCACTACAGGAATCC(Reverse) (配列番号 2 1)

Human Na⁺/H⁺ exchanger (Na⁺/H⁺ exchanger)

- ・ AGCATGGATGCCAAAGCTA(Forward) (配列番号 2 2)
- ・ ATCTTCGCATATGGTTCCAA(Reverse) (配列番号 2 3)

Human tumor necrosis factor (TNF2)

- ・ TCTCGAACCCCGAGTGACA(Forward) (配列番号 2 4)
- ・ GGCCCGCGGTTCA(Reverse) (配列番号 2 5)

Human interleukin 3 (IL-3)

- ・ GGGTTAACTGCTCTAACATGATCGA(Forward) (配列番号 2 6)
- ・ GAAGTCCAGCAAAGGCAAAGG(Reverse) (配列番号 2 7)

Human keratin 2 (keratin)

- ・ CGAGCTGAACCGCGTGAT(Forward) (配列番号 2 8)
- ・ CTTGTTCTGGCATCCTTGAG(Reverse) (配列番号 2 9)

【 0 0 4 6 】

逆転写反応で合成したcDNAを滅菌MilliQ水で5倍希釈を5段階行い、希釈溶液のRT-PCRを実施した。各サンプルについて検量線を作成し、細胞中のmRNA量を定量化した。RT-PCR用の96穴プレート (Applied Biosystems社製) に下記の組成の溶液(SYBR Premix Ex Taq: タカラバイオ株式会社製)を18 µl/wellで分注した。その後、各2 µl/wellのcDNA希釈液を入れ、ピペティングで混合した。cDNAを鋳型として、以下のPCR条件にてABI PRISM 7500 (Applied Biosystems社製) を用いてRT-PCRを行い、肝細胞中の目的因子のmRNA発現量を定量化した。結果を図 1 ~ 6 に表す。

【 0 0 4 7 】

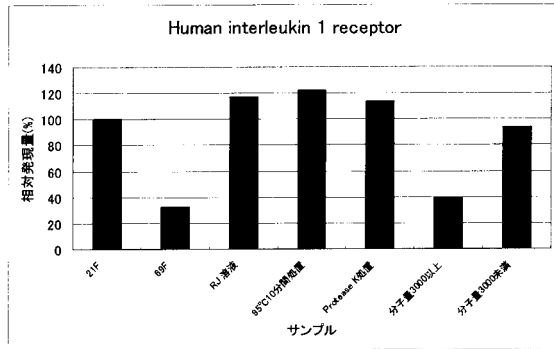
< 反応液 >	1反応	(45反応分)
SYBR Premix Ex Taq	10 µl	450 µl
Primer Forward 50 µM	0.08 µl	3.6 µl
Primer Reverse 50 µM	0.08 µl	3.6 µl
DyeII	0.40 µl	18 µl
滅菌MilliQ水	7.44 µl	334.8 µl
合計量	18 µl	810 µl

【 0 0 4 8 】

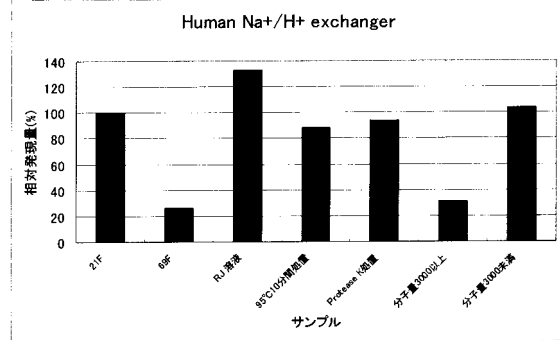
PCR条件

95 °Cで10秒間反応後、95 °Cで5秒間 (熱変性) 反応させ、60 °Cで35秒間 (40サイクル) (アニールングおよび伸長反応) 反応させた後、95 °Cで15秒間、そして60 °Cで60秒間反応後、95 °Cで15秒間反応させた。

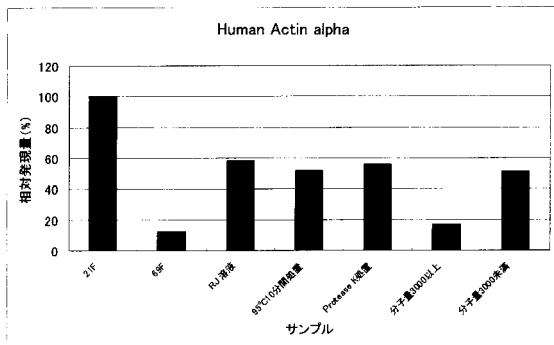
【図 1】



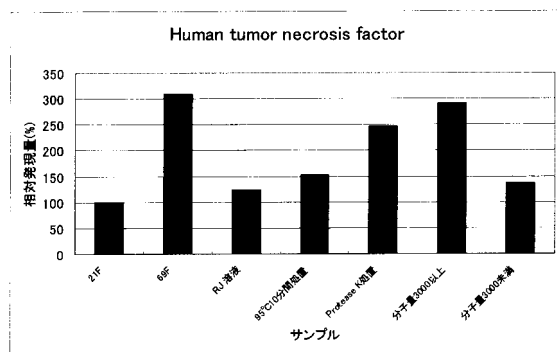
【図 3】



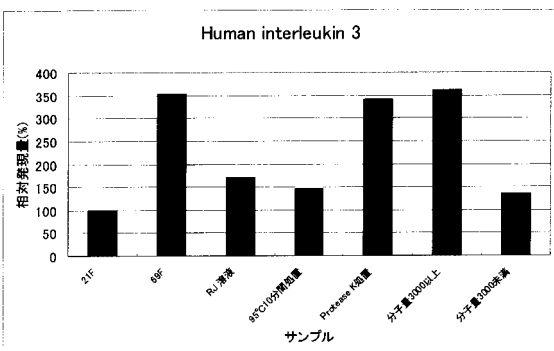
【図 2】



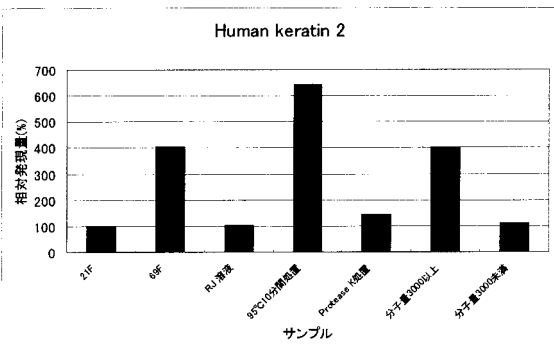
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

2010090112000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 小 田 忠 信

東京都港区南麻布 1 - 2 - 3 3 麻布仙台坂ガーデン株式会社クエンビーガーデン内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA02 CA20 HA14

4B063 QA01 QA18 QQ20 QR77 QS25 QS34 QX02

4C087 AA01 AA02 BB22 MA63 NA14 ZA89 ZB11 ZC19 ZC20