(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2017-200922
(P2017-200922A)
(43)公開日　平成29年11月9日(2017.11.9)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 8/9794	(2017.01)	A61K	8/9794	4C076
A61K 36/899	(2006.01)	A61K	36/899	4C083
A61K 47/10	(2006.01)	A61K	47/10	4C088
A61K 47/12	(2006.01)	A61K	47/12	
A61K 47/16	(2006.01)	A61K	47/16	

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 31 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-102381 (P2017-102381)
(22)出願日　平成29年5月24日 (2017.5.24)
(62)分割の表示　特願2014-501559 (P2014-501559)の分割
原出願日　平成24年3月26日 (2012.3.26)
(31)優先権主張番号　61/468,053
(32)優先日　平成23年3月27日 (2011.3.27)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　512214568
アーチ　ケミカルズ、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　３０００４　ジョージア、アルファレッタ、ブルーグラス・レイク・パークウェイ　１２００
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100103034
弁理士　野河　信久
(74)代理人　100153051
弁理士　河野　直樹
(74)代理人　100179062
弁理士　井上　正

最終頁に続く

(54)【発明の名称】幼弱細胞と関連するＤＮＡメチル化パターンの採用を細胞にもたらす後成的ＤＮＡメチル化の調節

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化の制御に有効な組成物の提供。
【解決手段】（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体、を含有する局所組成物。哺乳動物細胞に局所適用した時、メチル化の状態を調節して幼弱細胞の後成的な状態のより特徴およびパターンとなるように、ＤＮＡの後成的なメチル化に影響を及ぼすことができる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および
（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体
を含む、ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための局所組成物。
【請求項２】
構成要素（ａ）が、組成物の重量に対して０．０００００００１％～９９％、好ましくは０．０００１％～５０％、より好ましくは０．００１％～２５％、最も好ましくは０．０１％～１０％の量で存在し、構成要素（ｂ）が組成物の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在し、構成要素（ｃ）が組成物の重量に対して１％～９８％、好ましくは８０％～９０％の量で存在する請求項１に記載の組成物。
【請求項３】
構成要素（ａ）が、オリザ・サティバに由来する植物分裂組織の馴化栄養培地である、請求項１または２に記載の組成物。
【請求項４】
前記植物分裂組織の馴化栄養培地が、（ｉ）イネ属植物に由来する植物分裂組織を液体栄養培地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生し、（ｉｉ）前記水不溶性の成分を除去し、それによって前記植物分裂組織の馴化栄養培地を産生することにより調製された、請求項１から３のいずれかに記載の組成物。
【請求項５】
前記植物分裂組織が、植物細胞の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した、化学的、ガス状またはエネルギー的ストレスの存在下で、液体栄養培地中で増殖された、請求項１から４のいずれかに記載の組成物。
【請求項６】
前記植物分裂組織細胞が、オゾンの存在下、液体栄養培地中で増殖された、請求項５に記載の組成物。
【請求項７】
前記保存剤が、基質との組み合わせにおける、サリチル酸、ソルビン酸、フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、エタノール、クォータニウム－１５、グリコースオキシダーゼおよびラクトペルオキシダーゼ、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項１から６のいずれかに記載の組成物。
【請求項８】
前記保存剤が、フェノキシエタノールである、請求項７に記載の組成物。
【請求項９】
前記保存剤が、前記組成物の全重量に対して少なくとも０．５重量％の量で存在する、請求項１から８のいずれかに記載の組成物。
【請求項１０】
水、界面活性剤、乳化剤、コンディショナー、軟化剤、ロウ、油、ポリマー、増粘剤、揮発防止剤、着色剤、湿潤剤、保湿剤、安定化剤、希釈剤、溶媒、香料、植物性薬品、栄養補助剤、薬用化粧品、治療剤、医薬品、抗真菌薬、抗微生物剤、ステロイドホルモン、ふけ防止剤、抗ニキビ成分、日焼け止め剤、保存剤、およびそれらの組み合わせを含む群から選択される少なくとも１つの成分をさらに含む、請求項１から９のいずれかに記載の組成物。
【請求項１１】
（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、および
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤

を含む組成物濃縮物であって、
構成成分（ａ）が組成物の重量に対して０．００００００１％～９９％、好ましくは９０％～９９％、より好ましくは９７％～９９％の量で存在し、構成要素（ｂ）が組成物の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在する、組成物濃縮物。
【請求項１２】
構成要素（ａ）が、オリザ・サティバに由来する植物分裂組織の馴化栄養培地である、請求項１１に記載の組成物濃縮物。
【請求項１３】
（ｉ）イネ属植物に由来する、分化全能性未分化植物細胞を準備するステップ、
（ｉｉ）植物細胞の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した、化学的、ガス状もしくはエネルギー的ストレスの存在下または非存在下のいずれかで、前記植物細胞を液体栄養培地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生するステップ、
（ｉｉｉ）水不溶性の成分を除去して、植物分裂組織の馴化栄養培地を産生するステップ、ならびに
（ｉｖ）植物分裂組織の馴化栄養培地を保存剤および皮膚科学的に許容できる媒体と混合し、それによって請求項１に記載の組成物を作製するステップ
を含む、請求項１に記載の組成物の調製方法。
【請求項１４】
ステップ（ｉ）の植物細胞がオリザ・サティバ由来である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ステップ（ｉｉ）において、植物細胞がオゾンの存在下で増殖する、請求項１３または１４に記載の方法。
【請求項１６】
ステップ（ｉ）の植物細胞が、
（１）イネ属植物に由来する植物分裂組織を固体栄養培地で増殖させること、および（２）安定化した培養物を選択し、それによって前記植物細胞を産生することを含む方法によって調製される、請求項１３から１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
皮膚を局所組成物と接触させることを含むヒトの皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための方法であって、前記局所組成物が、
（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および
（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体
を含む方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化の制御に有効な組成物に関する。より詳細には、本発明は、イネ科植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地を含有する局所組成物、ならびにその製造およびその組成物の使用方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
植物は、古くなった植物から取られた１個の細胞から新たな植物を育てることができる点で、地球上の生物の中でも類を見ないものである。そのような植物細胞の増殖方法は植物組織培養と呼ばれ、１９００年代初頭から知られている。
【０００３】
植物細胞培養物は、局所適用に用いられてきた。例えば、米国特許出願公開第２００８

／０２９９０９２（Ａ１）号は、化粧品において皮膚幹細胞の活力に作用を及ぼすための、脱分化させたリンゴ由来の植物細胞の使用を開示している。同様に、欧州特許出願公開１７３６１６７（Ａ２）号は、ライラック（Ｓｙｒｉｎｇａ　ｖｕｌｇａｒｉｓ）に由来する、ベルボスコシド（ｖｅｒｂｏｓｃｏｓｉｄｅ）を富化させた植物細胞培養液の、皮膚に抗酸化作用を及ぼすことを目的とした局所適用を開示している。米国特許出願公開第２００７／００１５２５２（Ａ１）号は、抽出液に高濃度の抗酸化剤を与えるフェニルプロパノイドを含有する、アジュガ（Ａｊｕｇａ　ｒｅｐｔａｎｓ）に由来する植物培養物の局所適用を開示している。米国特許第６，５５１，６２５号は、サルビア・ミルティオリザ（Ｓａｌｖｉａ　ｍｉｌｔｉｏｒｒｈｉｚａ）に由来する懸濁培養物として増殖させた未分化植物細胞が、美容および局所適用において体臭の発生防止を促進できることを開示している。欧州特許出願公開２１３３３２３（Ａ１）号は、皮膚用の化粧品に使用した時メタロプロテイナーゼ阻害活性を示し得る、３，５－ジカフェオイル－４－マロニルキナ酸を生成させるための組織培養物としてのツボクサ（Ｃｅｎｔｅｌｌａ　ａｓｉａｔｉｃａ）の増殖を開示している。

【０００４】

しかしながら、これまで、出願人の知る限り、皮膚細胞におけるＤＮＡまたは染色体の後成的メチル化に影響を及ぼすことを意図した、植物細胞培養物から作られたいずれの局所治療薬を開示するどのような先行技術も存在していない。

【０００５】

後成学（ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃｓ）は、ＤＮＡ配列の変異以外の機構による遺伝性の遺伝子発現の変化についての学問である。ＤＮＡ配列の変異なしに遺伝子活性を変化させ、さらに娘細胞に遺伝し得るいずれの修飾も、後成的修飾と考えられるであろう。後成的変化は、娘細胞に受け継がれ、ＤＮＡ配列の変化がないにも関わらず、複数世代にわたって持続することがある。後成的な因子および変化が、細胞分化、発育、老化および疾患において重要な役割を果たすことが示されている（Ｃｒｏｐｌｅｙら、２００６；Ｗｅａｖｅｒら、２００６；Ｒａｋｙａｎら、２００３）。

【０００６】

全体的ならびに遺伝子特異的なレベルにおけるＤＮＡメチル化が後成的な記憶に関して重要な役割を果たすことが示され、ＤＮＡメチル化の変化が年齢に関連することが示されている（Ｇｏｐｉｓｅｔｔｙら、２００６；Ｏｔｔａｖｉａｎｏら、１９９４；Ｆｅｎｇら、２００６；Ｂｏｋｓら、２００９）。後成的な変化に関するＤＮＡメチル化は、ＣｐＧジヌクレオチドにおけるシトシン－５で起こる。メチル基がシトシン塩基に結合し、これにグアニンジヌクレオチド塩基が続く。このｐは、ＣとＧとを互いに連結するリン酸エステルを表す。これがＣＧ塩基対とＣｐＧとの区別に役立つ。ＤＮＡメチル化はＣｐＡ、ＣｐＴ、およびＣｐＣ部位でも起こり得るが、現在のところ、シトシンのメチル化と遺伝子転写とを結びつけるデータの大多数は、生物学的ならびに技術的な理由のために、ＣｐＧからのものである。

【０００７】

遺伝子の、ＣｐＧアイランドと呼ばれるＣｐＧが多いプロモーター範囲のメチル化が、遺伝子の転写制御に重要な機構であると確認されている（Ｍｅｔｉｖｉｅｒら、２００８；Ｂｉｒｄ、２００２）。ＣｐＧアイランドは、ＧＣ含量が５５％超である２００塩基対の領域としてＴａｋａｉおよびＪｏｎｅｓ（２００２）によって同定された。ＣｐＧアイランドは、ヒトのプロモーターの中のおよそ７０％に存在する（Ｓａｘｏｎｏｖら、２００６）。遺伝子プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼが最初に結合して遺伝子の転写を開始する、遺伝子の上流のＤＮＡ領域である。プロモーターに関連しているだけでなく、ＣｐＧアイランドはハウスキーピング遺伝子とも関連している。正常細胞においては、ＣｐＧアイランドは典型的にはメチル化されていないので、転写装置はＤＮＡに接触できる。ある特定の疾患においておよび老化によって、ＣｐＧアイランドは異常にメチル化され、遺伝子の通常の転写機能を調節不全にさせる。メチル化は、両鎖上のＣｐＧジヌクレオチドのシトシン残基について対称的に起こる。ＤＮＡメチル化は、生体において初期に、胚

形成の間に確立する。哺乳動物細胞におけるＣｐＧ部位の約７０～８０％はメチル化されているが、ＣｐＧ部位およびそのメチル化の程度はゲノム中に不均一に配分されている（Ｂｉｒｄら、１９８５）。ＣｐＧ部位は、約７０個のヒト遺伝子のプロモーター中で主に見いだされ（Ｓａｘｏｎｏｖら、２００６）、これらの部位はメチル化されていない傾向がある。プロモーター中のＣｐＧアイランドがメチル化されている時、隣接遺伝子の転写抑制をもたらす。発現している遺伝子は、一般にプロモーター領域のメチル化の程度が低く、遺伝子本体のメチル化の程度が高いように思われる（Ｂａｌｌら、２００９）。ＤＮＡメチル化は、クロマチンの密度およびＤＮＡの細胞機構への接近しやすさを変化させ、それによって基礎をなすＤＮＡ配列の転写能力に影響を及ぼすと推定されている。

【０００８】

特定の細胞の特定の遺伝子におけるＤＮＡメチル化のレベルは経時的に変化しやすい。異なる細胞型、例えばヒト多能性幹細胞と体細胞とを比較した時のＤＮＡメチル化のレベル（Ｄｅｎｇら、２００９）も同様である。単一接合子（一卵性）の双生児は、同じ受精卵に由来するので、同じ遺伝子型を持っている。研究によれば、年を取るほど、一卵性双生児における後成的修飾のパターンが異なることが示されており、これは繰り返される細胞分裂を通じた後成的な情報の伝達における小さな欠陥が起こり得ることを示唆している。（Ｆｒａｇａら、２００５）。「エピジェネティックドリフト」と呼ばれるこの課程は、老化と関係がある。双生児の研究によれば、遺伝的要因は、ヒトの一生における変異の２０～３０％を決定するに過ぎないと推定されている。残りの７０～８０％の変異は、環境および他の非遺伝的要因によるものである（Ｆｒａｇａら、２００５；Ｍｉｔｃｈｅｌｌら、２００１；Ｈｅｒｓｋｉｎｄら、１９９６；Ｐｏｕｌｓｅｎら、２００７）。

【０００９】

ＤＮＡメチル化に影響を及ぼす方法は公知である。例えば、米国特許第７，７９０，７４６号は、種々のキノリン誘導体を使用してＤＭＡメチル化を阻害する方法を開示している。しかしながら、この特許は、植物由来の活性成分を、特に遺伝子のプロモーターにおける、ＤＮＡメチル化に影響を及ぼす手段として使用することを開示していない。

【００１０】

化粧品業界において、哺乳動物、特にヒトの皮膚細胞の老化に関連する種々の重要な遺伝子のプロモーター領域のメチル化に影響を及ぼすことによって、老化する皮膚の特性を改善する成分が現在必要とされている。本発明は、この必要への解決策を提供する。

【発明の概要】

【００１１】

一側面において、本発明は、（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地（すなわち、植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）、（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体を含む、ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための局所組成物に関する。

【００１２】

もう１つの側面において、本発明は、（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）、および（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤を含有する組成物濃縮物であって、構成成分（ａ）が組成物濃縮物の重量に対して０．００００００１％～９９％、好ましくは９０％～９９％、より好ましくは９７％～９９％の量で存在し、構成要素（ｂ）が組成物濃縮物の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在する組成物濃縮物に関する。

【００１３】

さらに別の側面において、本発明は、上記の局所組成物の調製方法に関する。前記方法は、（ｉ）イネ属植物に由来する、分化全能性の未分化植物細胞を準備するステップ、（ｉｉ）植物細胞の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した、化学的、ガス状またはエネルギー的ストレスの存在下または非存在下のいずれかで、前記植物細胞を液体栄養培

地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生するステップ、（ｉｉｉ）水不溶性の成分を除去して、植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）を産生するステップ、ならびに（ｉｖ）植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）を保存剤および皮膚科学的に許容できる媒体と混合し、それによって局所組成物を作製するステップを含む。

【００１４】

さらに他の側面において、本発明は、ヒト皮膚細胞においてＤＮＡメチル化を制御する方法に関する。前記方法は、皮膚を本発明の局所組成物に接触させることを含む。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】オゾンストレスをかけた分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）のＨＰＬＣクロマトグラム。

【図２】オゾンストレスをかけていないイネ分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）のＨＰＬＣクロマトグラム。

【図３】インビトロ培養した繊維芽細胞のゲノム全体にわたる遺伝子プロモーターのメチル化のレベルに対する、本発明の植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）の効果を図示するグラフ。

【図４】インビトロ培養した繊維芽細胞のコラーゲン１Ａ１遺伝子プロモーターのメチル化のレベルに対する、本発明の植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）の効果を図示するグラフ。

【図５】インビトロ培養した繊維芽細胞のコラーゲン１Ａ２遺伝子プロモーターのメチル化のレベルに対する、本発明の植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）の効果を図示するグラフ。

【図６】インビトロ培養した繊維芽細胞のコラーゲン１Ａタンパク質のレベルに対する、本発明の植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）の効果を図示するグラフ。

【図７】インビトロ培養した繊維芽細胞のデルマトポンチンタンパク質の発現に対する、本発明の植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）の効果を図示するグラフ。

【発明の詳細な説明】

【００１６】

驚くべきことに、植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞培養物の抽出物）、特にイネ科、好ましくはイネ属、より好ましくはオリザ・サティバ種に由来するものが、ヒト皮膚細胞、例えば、繊維芽細胞、ケラチノサイト、メラノサイトなどに局所投与された時、幼弱な、ならびにとりわけ内因的および外因的に老化した哺乳動物の皮膚細胞の、特に遺伝子のプロモーター領域において、ＤＮＡメチル化を制御できることが今般見いだされた。処理された細胞は、幼弱で、老化していない細胞に見いだされるパターンをより特徴的に示すＤＮＡメチル化パターンを示す。植物分裂組織の馴化栄養培地を含有する局所組成物は、ヒトおよび家畜の治療ならびに栄養学的ならびに美容的な使用のために特に有益である。

【００１７】

したがって、一態様において、本発明は、（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）、（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体を含む、ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための局所組成物を提供する。

【００１８】

上記の本発明の局所組成物に関して、構成要素（ａ）は組成物の重量に対して０．０００００１％～９９％、好ましくは０．０００１％～５０％、より好ましくは０．００１％～２５％、最も好ましくは０．０１％～１０％の量で存在し、構成要素（ｂ）は組成物

の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在し、構成要素（ｃ）は組成物の重量に対して１％～９８％、好ましくは８０％～９０％の量で存在する。

【００１９】

本発明の局所組成物における使用に適する植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）である構成成分（ａ）は、イネ属植物由来であり、好ましくはオリザ・サティバ由来である。

【００２０】

植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）は、（ｉ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の培養物を液体栄養培地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生するステップ、ならびに（ｉｉ）水不溶性の成分を除去して、植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）を産生するステップを含む手順によって調製することができる。

【００２１】

植物分裂組織の培養物を生成する方法は、当技術分野において公知である。典型的には、まず植物を滅菌し、次に分裂組織を植物から摘出して分裂組織から未分化のカルス組織を形成するために固体栄養培地上に置く。

【００２２】

固体栄養培地は、一般に、当業者に公知である。一態様において、例えばＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ培地、スクロース、Ｇａｍｂｏｒｇビタミン、成長ホルモン例えばＩＡＡなど、キネチンならびに寒天などの要素を含有する。

【００２３】

本発明の目的のために、分裂組織から形成したカルス組織は、未分化細胞として維持するのが好ましい。栄養培地において、キネチンに対して相対的に高濃度のオーキシンは発根を促し、これに対して逆の場合には芽形成を、および中間の濃度はカルスの増殖を導く。よって、栄養培地におけるオーキシンおよびキネチンの濃度は、未分化細胞だけが生じるように維持すべきである。

【００２４】

適当な期間の間分裂組織を固体培地において増殖させた後、カルス組織を、分割および新しい固体培地上に移すことによって継代培養した。好ましくは、安定細胞株を得るために、この過程は少なくとも数回繰り返す。本明細書で用いる時、安定細胞株は、一定の形質を有し、生じる活性成分の量に再現性があり、一定の速度で増殖し、および複数世代後にも同じように見える細胞を意味する。典型的には、安定化した培養物は培養物内に変異がほとんどなく、時間および複製によって変異がほとんどないであろう。

【００２５】

当業者が知っているように、組織培養はクローン変異を生じ得る。カルスまたは植物組織中において、細胞中に自然変異が存在する。このソマクローナル変異は細胞集団における変異に依存し、既存のものかまたは培養に誘発されたもののいずれかである。変異は遺伝的な場合も、後成的な場合もある。カルスまたは懸濁培養物におけるこれらの変化は、懸濁培養物からの二次代謝活性成分の産生において大きな利点を有している。したがって、本発明の目的のために、増殖が速く、色や大きさなどの形質が安定しており、一定の速度で増殖し、および他の関心のある性質を有する継代培養細胞株を選択する。

【００２６】

細胞株が安定であると確認した後、固体培地からの細胞、すなわち分化全能性の未分化植物細胞を、液体培地中に播種する。液体培地は、当業者に公知である。例えばＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ培地、スクロース、Ｇａｍｂｏｒｇビタミン、成長ホルモン例えばＩＡＡなど、およびキネチンなどの因子を含有する。

【００２７】

一態様において、細胞は、植物細胞の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した、化学的、ガス状またはエネルギー的ストレスの存在下で、液体栄養培地中で増殖させる。

【００２８】
種々の化学的なまたはエネルギー的なストレスを二次代謝産物の生成を誘発するために使用してもよいが、オゾンは好ましいストレス因子であり、それは細胞を反応器中で酸素化環境下に保つために用いられる酸素供給を通じて、細胞培養物中に容易に導入することができるからである。
【００２９】
オゾンへの暴露は、細胞がより多くの二次代謝産物の合成を促進するのに役立つ。本発明の二次代謝産物としては、これらに限定されないが、植物成長調節因子、植物サイトカイン、フラボノイド、カロテノイド、植物ステロール、サポニン、グルコシノレート、プロテアーゼ阻害因子、植物エストロゲン、硫化物、フィチン酸、アルカロイド、テルペノイド、グリコシド、フェノール、フェナジン、ポリケチド、ペプチド、ポリフェノールなどがあげられる。
【００３０】
ある特定の閾値未満では、オゾンからの軽度のストレスは、植物がそれによってより多くの活性成分を産することで、補償され得る。一方で、より高濃度において、重度のストレスの有害な作用が不可逆的な損傷の原因になることもある。さらに、ストレス耐性の閾値は、ストレス因子の種類、およびオゾンの場合は、暴露時間だけではなく、種特異的な植物のストレス対処能力にも依存する。イネの懸濁培養物が特定のストレス関連の結果を実現するように、適用するオゾン量を最適化することができる。本発明のために有用な典型的なオゾン濃度は、０．０００１～５０ｍＭの範囲に入り得る。より好ましくは、０．０１ｍＭ～５ｍＭのオゾン濃度である。最も好ましくは、０．１ｍＭ～０．５ｍＭのオゾン濃度である。植物細胞は、植物の種、オゾン濃度、通気速度、温度などに応じて、数分から数日間オゾンに暴露してもよい。
【００３１】
植物分裂組織の馴化栄養培地発酵における酸化ストレスを監視する別の方法は、ある一定数の植物細胞が死滅するまでオゾンを加えることである。植物細胞の生存能力を測定する方法は当業者に周知であり、そしてそれは例えばＭＴＴ試験を含んでもよく、その試験は生存ミトコンドリアの機能を実証し、それによって生存している細胞を死滅した細胞と区別して示す比色定量法である。好ましくは、オゾンストレスを与えた後の植物細胞の、細胞の生存率数値は５０％であり、より好ましい程度は７５％であり、および最も好ましい程度は８０％の生存率であろう。
【００３２】
植物細胞のオゾン処理に用いられる市販のオゾン発生装置は、例えば、Ｅｒｗｉｎ Ｓａｎｄｅｒ Ｅｌｅｋｔｒｏａｐｐａｒａｔｅｂａｕ ＧｍｂＨ，Ｕｅｔｚｅ－Ｅｌｔｚｅ，Ｇｅｒｍａｎｙに見ることができる。ほとんどの状況において、オゾン発生装置に加えてオゾン検出装置も用いられる。適当なオゾン検出装置は、Ｄａｓｉｂｉ，Ｇｌａｎｄｌａｅ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから入手可能である。
【００３３】
ここではオゾンが好ましいストレス因子として記述されているが、当業者に公知の他のストレス因子も、二次代謝産物を誘発するために使用することができる。これらのストレス因子には、これらに限定されないが、植物成長調節因子、植物病原性のタンパク質およびポリマー例えばキチンならびに熱およびＵＶを含みこれらに限定されない種々の形態の外部からのエネルギーが含まれる。
【００３４】
細胞は、十分な生物体量が得られるまで、ある特定の時間増殖させる。もし必要であれば、新鮮な液体栄養培地を加えてもよい。一態様において、細胞を１００～４００の光学密度まで増殖させ、その後、生物体を収集して抽出を行い、植物分裂組織の馴化栄養培地をもたらす。抽出過程は、当業者に公知であり、例えば、不溶性成分をろ別し、可溶性成分を植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）として得ることができる。

【００３５】
いずれの理論にも束縛されないが、植物細胞の増殖を通じて、細胞は培地中の化合物を代謝することによって栄養培地を馴化することができ、植物細胞が産生する他の化合物と共に、これらの代謝産物のいくつかを培地中に排出すると考えられる。植物組織の最初の起源は植物分裂組織からのものであるので、本特許出願の目的のために、馴化培地を「植物分裂組織の馴化栄養培地」と呼ぶ。
【００３６】
もし必要であれば、このようにして得られた植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）を、当業者に公知の方法によって、色もしくは臭いを改善するためまたは濃縮するためまたは生成物を完全に乾燥するためにも、さらに処理してもよい。
【００３７】
送達システム、例えばリポソーム、ニアソーム（ｎｉａｓｏｍｅ）、ポリメリソーム（ｐｏｌｙｍｅｒｉｓｏｍｅ）、デンドリメロソーム（ｄｅｎｄｒｉｍｅｒｏｓｏｍｅ）などの中に培地を含有させることによって、または透過性強化機構、例えばイオン導入法などによって、植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）の効力をさらに高めてもよい。
【００３８】
植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）はまた、当業者に公知のいずれの方法、例えば凍結乾燥法、スプレー乾燥法、ベルト乾燥法などによって抽出溶媒を除去して、無水物系に含有させてもよい。無水物形態において、培地は無水ゲル、例えばシリコーンゲルなどの中または無水粉末、例えばファウンデーションおよび固形パウダーなどの中に含有させてもよい。
【００３９】
植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）は、本発明の局所組成物において使用するために好適である。加えて、この馴化培地はまた、追加の植物または微生物発酵によるさらなる修飾の基礎となってもよく、ここで植物分裂組織の馴化栄養培地は進行中の発酵過程に、第二の発酵栄養源として加えられる。
【００４０】
本発明の局所組成物の構成要素（ｂ）は、構成成分（ａ）、すなわち植物分裂組織の馴化栄養培地に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤である。
【００４１】
保存剤は当業者に周知であり、そして例えばサリチル酸またはソルビン酸などの有機酸、例えばフェノキシエタノール、ベンジルアルコール、グリコール、およびエタノールなどの有機アルコール、例えばクォータニウム－１５などの第四級成分、例えばグリコースオキシダーゼおよびラクトペルオキシダーゼなどの酵素と、例えばＢｉｏｖｅｒｔとしてＡｒｃｈ　Ｐｅｒｓｏｎａｌ　Ｃａｒｅ（Ｓｏｕｔｈ　Ｐｌａｉｎｆｉｅｌｄ，ＮＪ）から市販されているグルコースなどの基質との組み合わせなど、またはこれらの保存剤の組み合わせなどの成分があげられる。
【００４２】
好ましい保存剤は、サリチル酸、ソルビン酸、フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、エタノール、クォータニウム－１５、グリコースオキシダーゼおよびラクトペルオキシダーゼと基質との組み合わせ、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。
【００４３】
保存剤は、植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）に、植物分裂組織の馴化栄養培地を実質的に滅菌する抗菌剤、または植物分裂組織の馴化栄養培地を培地中に存在する生きている微生物が増殖しない状態に維持する静菌剤のいずれかとして作用するのに十分な濃度で加えるべきである。保存剤系の有効性を決定する方法は当

業者に周知である。保存剤の有効性を試験する方法として最も普及しているのは、負荷試験である。この試験方法において、微生物は液体の植物分裂組織の馴化栄養培地に制御されたやり方で導入され、培地で試験および増殖させる。もし微生物の濃度が減少するか、または所定の時間にわたって変化しないままのいずれかであれば、培地は微生物汚染から適切に保護されているといわれる。

【００４４】

特に好ましい保存剤はフェノキシエタノールである。

【００４５】

保存剤、および特にフェノキシエタノールは、組成物に対して、好ましくは少なくとも０．５重量％、より好ましくは１．０重量％、最も好ましくは１．２重量％の濃度で使用される。

【００４６】

もし生成物が固体として単離された場合、保存剤は、生成物を乾燥するのに十分な長さで維持するために、おそらくなお必要とされ、乾燥事象の後でも粉末化された生成物中に残存するであろう。乾燥方法は当業者に周知であり、例えば、スプレー乾燥法、凍結乾燥法、ドラム乾燥法、薄膜乾燥法などを含み得る。特に好ましい乾燥方法はスプレー乾燥法であり、例えば米国特許出願公開第２００３／０１９８６８２（Ａ１）号に開示されている。

【００４７】

構成要素（ａ）および（ｂ）は上記されている。本発明の組成物の構成要素（ｃ）は、皮膚科学的に許容できる媒体である。「皮膚科学的に許容できる媒体」という語句は、本明細書で用いる時、媒体が皮膚への局所適用に適しており、優れた美観を有し、本発明の活性成分および他のいずれの成分とも相溶性であり、安全性または毒性の不都合な問題を全く生じる恐れがないことを意味する。

【００４８】

媒体は、幅広い種類の形態でありうる。例えば、水中油型、油中水型、水中油中水型、およびシリコーン中水中油型エマルジョンなどを含むが、これらに限定されないがエマルジョン担体が、本発明において有用である。これらのエマルジョンの粘度は広い範囲にわたることができ、例えば、約１００ｃｐｓ～約２００，０００ｃｐｓである。これらのエマルジョンは、機械式ポンプ容器、または通常の高圧ガスを使用する加圧エアゾール容器のいずれかを用いてスプレーの形態で送達することもできる。これらの担体は、ムースの形態で送達することもできる。他の適当な局所担体は、無水の液体溶媒、例えば油、アルコール、およびシリコーン（例えば、鉱油、エタノール、イソプロパノール、ジメチコン、シクロメチコンなど）；水性の単一相の液体溶媒（例えば、水性アルコール溶媒系）；ならびに増粘型のこれらの無水および水性の単一相の溶媒（ここで、例えば、適当なゴム、樹脂、ロウ、ポリマー、塩などの添加によって、固体または半固体を形成するように溶媒の粘度が高められている）を含む。本発明において有用な局所担体系の例が、以下の４つの参考文献に記載されている：“Ｓｕｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ”Ｃｏｓｍｅｔｉｃｓ＆Ｔｏｉｌｅｔｒｉｅｓ、第１０５巻、１２２～１３９ページ（１９９０年１２月）；“Ｓｕｎ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ　Ｆｏｒｍｕｌａｒｙ”Ｃｏｓｍｅｔｉｃｓ＆Ｔｏｉｌｅｔｒｉｅｓ、第１０２巻、１１７～１３６ページ（１９８７年3月）；Ｆｉｇｕｅｒｏａらへの米国特許第４，９６０，７６４号；およびＦｕｋｕｄａらへの米国特許第４，２５４，１０５号。

【００４９】

適当な媒体についてのより詳細な議論は、Ｂｌａｎｋらに発行された米国特許第５，６０５，８９４、およびＢｉｓｓｅｔｔへの米国特許第５，６８１，８５２号に見られる。媒体は、粉末状の局所組成物、例えば粉末のファウンデーションなどであってもよい。

【００５０】

加えて、本発明の局所組成物は、場合によって他の機能性成分、例えば水、界面活性剤、乳化剤、コンディショナー、軟化剤、ロウ、油、ポリマー、増粘剤、揮発防止剤、着色

剤、湿潤剤、保湿剤、安定化剤、希釈剤、溶媒、香料など、ならびに活性成分、例えば植物性薬品、栄養補助剤、薬用化粧品、治療剤、医薬品、抗真菌薬、抗微生物剤、ステロイドホルモン、ふけ防止剤、抗ニキビ成分、日焼け止め剤、保存剤などを含んでもよい。

【００５１】

本発明の局所組成物は、当業者に公知のいずれの形態であってもよく、例えば、クリーム、ローション、ゲル、セラム、石けん、スティック、粉末などでもよい。組成物は、付けたままにしておく製品または適用後すぐに皮膚から洗い流すことを意図した製品として適用することができ、そのような製品にはボディーソープ、シャンプーなどのようなものが含まれる。

【００５２】

驚くべきことに、本発明の局所組成物を適用すると、年齢に関連した後成的な変化に影響を及ぼし、皮膚の老化のある特定の側面を遅延および軽減することができることが見いだされた。植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）を含有する組成物の局所適用によって、驚くべきことに、老化した細胞が形質転換され、そしてより若く、老化していない細胞が有していたＤＮＡ　ＣｐＧメチル化のパターンを取り戻すように、ＤＮＡメチル化の調節が起こり得ることが見いだされた。ゲノムレベルと特定の遺伝子におけるものの両方のＤＮＡメチル化のパターンを、植物分裂組織の馴化栄養培地の適用によって調節することができる。ゲノムと個々の遺伝子の両方とも可逆的なメチル化状態を有しており、植物分裂組織の馴化栄養培地が皮膚細胞のメチル化状態に影響を与えることができることの確認は、新たな局所治療の機会をもたらす。

【００５３】

たとえ２つの個体においてゲノムが厳密に同一であっても、後成的な修飾による遺伝子発現の調節は、生体または組織の寿命と健康状態の非常に大きな差異の原因になることができる。細胞のＤＮＡメチル化のパターンの調節によって、数ある疾患の中でも、脱毛、皮膚の炎症状態、色素沈着および年齢によるしみ、しわ、老化に関連した皮膚の乾燥、ならびに弾力および皮膚のきめの喪失を潜在的に治療する機会を実現することができる。

【００５４】

後成的なパターン形成および維持は細胞が正常に機能するために非常に重要である。幼弱、および老化皮膚組織のＣｐＧメチル化のプロファイル分析によって、メチル化変異に関する老化およびＵＶＢ照射の役割の特徴付けに言及することができる。遺伝子のプロモーター領域におけるＣｐＧアイランドの位置において、老化とメチル化の間の最も強い正の相関が生じるので、植物分裂組織の馴化栄養培地の有効性についての研究を、これらの重要なメチル化部位に集中させた。

【００５５】

別の態様において、本発明はまた、（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）、および（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤を含む組成物濃縮物であって、構成成分（ａ）が組成物の重量に対して０．００００００１％～９９％、好ましくは９０％～９９％、より好ましくは９７％～９９％の量で存在し、構成要素（ｂ）が組成物の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在する、組成物濃縮物にも関する。

【００５６】

好ましい態様では、組成物濃縮物の構成要素（ａ）は、オリザ・サティバに由来する植物分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）である。

【００５７】

本発明の組成物濃縮物は、当業者に公知のいずれの方法によっても、上記のような局所組成物に好適に組み入れることができる。

【００５８】

本発明のさらに別の態様は、本発明の組成物の調製方法であり、前記方法は、（ｉ）イネ属植物に由来する、分化全能性未分化植物細胞を準備するステップ、（ｉｉ）植物細胞

の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した化学的、ガス状またはエネルギー的ストレスの存在下または非存在下のいずれかで、前記植物細胞を液体栄養培地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生するステップ、（ｉｉｉ）水不溶性の成分を除去して、植物分裂組織の馴化栄養培地を産生するステップ、ならびに
（ｉｖ）植物分裂組織の馴化栄養培地を保存剤および皮膚科学的に許容できる媒体と混合し、それによって本発明の組成物を作製するステップを含む。

【００５９】

本方法の好ましい態様では、ステップ（ｉ）の植物細胞はオリザ・サティバ由来である。

【００６０】

本方法の別の好ましい態様では、ステップ（ｉｉ）において、植物細胞はオゾンの存在下で増殖する。

【００６１】

本方法の特に好ましい態様では、ステップ（ｉ）の植物細胞は、
（１）イネ属植物に由来する植物分裂組織を固体栄養培地で増殖させるステップ、および
（２）安定化した培養物を選択し、それによって前記植物細胞を産生するステップを含む方法によって調製する。

【００６２】

本発明のさらに他の態様は、皮膚を局所組成物と接触させることを含むヒトの皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための方法であって、前記局所組成物が、（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および
（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体を含む。

【００６３】

上記したヒトの皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための方法は、好ましくは非治療用、例えば美容用である。

【００６４】

本発明を、以下の例においてさらに説明する。以下の例は、本発明の特許請求の範囲をどのような形でも限定することなく、本発明の範囲を例示することを意図している。本明細書で示されている全てのパーセンテージは、特に示されない限り、組成物の全重量に基づく重量パーセントである。

【００６５】

例１：

オリザ・サティバ（イネ（ライス））からの植物分裂組織の馴化栄養培地の生成

イネ分裂組織の培養物は固体培地（Ｇａｍｂｏｒｇ　１×ビタミン、スクロース３０ｇ／Ｌ、キネチン１ｍｇ／Ｌ、ＩＡＡ０．２ｍｇ／Ｌ、および寒天１％を含むＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ培地、ｐＨ５．６）上で増殖させ、少なくとも３カ月間継代培養した。この培養系からのカルスを、寒天を除いた上記の培地およそ６０ｍＬが入った多数の２５０ｍＬフラスコ中に播種した。２週間後、培養物を、Ｇａｍｂｏｒｇ　１×ビタミン、スクロース３０ｇ／Ｌ、キネチン１ｍｇ／Ｌ、ＩＡＡ０．２ｍｇ／Ｌ、ｐＨ５．６、ＭｕｒａｓｈｉｇｅおよびＳｋｏｏｇ培地を含有するおよそ１３０ｍＬの液体培地が入った５００ｍＬフラスコ中に移した。２週間後、培養物をおよそ３００ｍＬの液体培地が入った１Ｌフラスコに移した。１４日間の発酵後、６００ｍＬの培養物を、２．３Ｌの作業体積の３Ｌバイオリアクター中に移した。３週間の発酵後、５Ｌの培養物を、２２Ｌの作業容積の３０Ｌバイオリアクター中に移した。３週間の発酵後、４０Ｌの培養物を、２００Ｌの作業容積の２５０Ｌバイオリアクター中に移した。４週間の発酵後、２００Ｌを、全体で４００Ｌの液体培地が入った１０００Ｌバイオリアクター中に移した。２週間の培養後、３５０Ｌの新鮮な培地を加え、全体積を７５０Ｌにした。培養物を２週間増殖させ、その後０．５ｐｐｍのオゾンを送気管に加えた。培養物をさらに１週間増殖させて二

次代謝産物を生じさせ、その後、培養物をＮｉｒｏホモジナイザーを用いてホモジナイズし、ろ過して固形物を除去した。得られた材料は、イネ分裂組織の馴化栄養培地（植物分裂組織の細胞懸濁液の抽出物）または略してイネ培養物と呼ぶ。

【００６６】

例２：

オゾンストレスをかけた例１のイネ分裂組織の馴化栄養培地のＨＰＬＣクロマトグラム

例１の分裂組織の馴化栄養培地の抽出物についてＨＰＬＣ分析を行った。多数のピークが観察されたが、１つだけがビオチン由来であり、これはオゾンがイネ培養物による二次代謝産物の生成を引き起こすことを示している。分析はＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　Ｋｉｎｅｔｅｘ２．６μｍ、１００×４．６ｍｍカラムを用いて行った。溶媒Ａはメタノールであった。溶媒Ｂは５０ｍＭリン酸ナトリウム（ｐＨ４．５）であった。溶媒Ａは１０％で用い、および溶媒Ｂは９０％で、均一濃度で用いた。流速は毎分１．０ｍＬおよびカラム温度は３０℃であった。検出は、波長２００ｎｍで行った。ＨＰＬＣ分析の結果を図１に示す。

【００６７】

例３：

オゾンストレスをかけていないイネ分裂組織の馴化栄養培地のＨＰＬＣクロマトグラム

イネ分裂組織の抽出物を、オゾンを添加しないことを除き、例１の手順に従って調製した。ＨＰＬＣ分析は、例１に記載の条件下で行った。結果を図２に示す。図２に示されるように、ＨＰＬＣクロマトグラム中に非常に少ない二次代謝産物のピークが観察された。

【００６８】

例４：

オゾン処理した例１のイネ分裂組織の馴化栄養培地の適用により、インビトロ培養した繊維芽細胞のゲノム全体にわたる全遺伝子プロモーターにおけるＣｐＧメチル化の平均値が低下する

上記のように、幼弱細胞の重要な形質は、老化した細胞に比べてメチル化のレベルが低いことである。この例は、例１の植物分裂組織の馴化栄養培地２％をインビトロ培養した繊維芽細胞に適用することによって、未処理の対照に比べて細胞のゲノム全体にわたる遺伝子プロモーターにおけるメチル化のレベルが低下したことを示している。

【００６９】

試験方法の概要

この研究のために、内因と外因との複合した老化（継続的な継代培養および繰り返されるＵＶＢ照射）または非老化の期間にわたって、ヒト皮膚繊維芽細胞を採取した。内因的に老化させる手順として、繊維芽細胞を８世代（３週間の培養）にわたって細胞培養した。細胞を１２ウェルプレートで増殖させ、集密するまで増殖（４８～７２時間ごと）させて、採取し、各世代におおよそ１回の細胞集団倍加となるように最初の細胞密度の５０％で再播種した。外因的な老化の局面として、一週間に３回、細胞にＵＶＢを照射した。この群でも８世代にわたって行うことを研究当初は意図していたが、それは達成できなかった。第３世代までに、細胞の複製速度が、もはや細胞を継代できない程度まで減速した。この群を培養物中に３週間保持しておき、ＵＶＢを９回照射した。

【００７０】

老化処理に加えて、繊維芽細胞はまた試験物質によっても処理し、この試験物質は老化過程全体の間を通じて存在した。処理群のリストは以下の通りである：

１．非老化細胞（数日後に培養物から採取する）

２．内因的な老化＋外因的な老化

３．内因的な老化＋外因的な老化＋例１からのイネ培養物２％

培養期間の最後に、細胞培養培地を集め、変化について分析した。

【００７１】

方法

繊維芽細胞の調製および処理

繊維芽細胞を繊維芽細胞増殖培地（ＦＧＭ）１ｍＬが入った１２ウェルプレートの個々のウェル中に播種し、４８～７２時間ごとに培地を交換しながら３７±２℃およびCO_2 ５±１％でインキュベートした。集密に達するとすぐに、細胞を収集し、次いで最初の密度の５０％で再播種した。内因的＋外因的老化の群におけるＵＶＢ照射として、細胞培養培地をリン酸緩衝生理食塩水に交換し、細胞に５～７ｍＪ／ｃｍ^{2}のＵＶＢを照射した。この照射は週に３回行い、照射間隔は少なくとも２４時間とした。

【００７２】

細胞は、上記のように３週間培養した。この期間に、内因的＋外因的老化の群は３回の細胞集団倍加および９回のＵＶＢ照射を受けた。３週間の期間の終わりに、最後の培地交換の４８時間後に細胞培養培地および細胞を収集した。細胞は、残留する試験材料を除去するためにリン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、その後各ウェルに２００μＬの溶解緩衝液（ＥＤＴＡ１ｍＭ、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００　０．５％、フッ化ナトリウム１０ｍＭ、塩化ナトリウム１５０ｍＭ、β－グリセロリン酸２０ｍＭ、ＤＴＴ１ｍＭ、ロイペプチン１０μｇ／ｍＬ、ペプスタチン１０μｇ／ｍＬ、アプロチニン３μｇ／ｍＬ、リン酸緩衝生理食塩水で調製）を加えた。細胞は、およそ１５分間氷上でインキュベートし、完全に溶解させた。その後、溶解物を収集し、分析まで－７５℃で保存した。

【００７３】

メチル化アレイプロトコル

ＤＮＡのＣｐＧメチル化アレイのチップはＡｇｉｌｅｎｔ製であり、２７，６２７のＣｐＧアイランドをカバーする。アレイのために、インビトロ繊維芽細胞から全ゲノムＤＮＡ（５μｇ）を単離し、その後剪断により断片化した（およそ４００～８００塩基の長さ）。この剪断化したゲノムＤＮＡの試料５μｇから、１μｇの全ゲノムＤＮＡを取りおいて、一方で残りの４μｇをメチル化ＤＮＡの単離に使用した。メチル化ＤＮＡは、メチル化ＤＮＡに特異的な抗体で免疫沈降法を用いて分離した。次いで、全ゲノムＤＮＡ１μｇおよびメチル化ＤＮＡを蛍光標識し、ＤＮＡメチル化アレイに施した。ハイブリダイズした後、アレイをスキャンし、次いでアレイ上のフィーチャーの蛍光強度を決定した。全遺伝子プロモーターにおける全ＣｐＧ部位に関する値を平均化し、平均値を決定した。結果を図３に示す。

【００７４】

図３のデータは、イネ分裂組織の馴化栄養培地２％の局所適用が、内因的および外因的に老化した繊維芽細胞のプロモーター領域における全体的なＣｐＧメチル化を、未処理の同様な細胞と比較して減少させることを実証する。

【００７５】

例５：

インビトロ培養した繊維芽細胞のコラーゲン１Ａ１プロモーターにおけるＣｐＧメチル化の平均値は、例１からのオゾン処理したイネ分裂組織の馴化栄養培地の適用によって減少する

老化する間にプロモーターのメチル化が増加する遺伝子の１つにコラーゲン１Ａ１がある（Ｔａｋａｔｓｕら、１９９９）。本例は、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地２％をインビトロ培養した繊維芽細胞に適用することによって、この細胞のコラーゲン１Ａ１遺伝子のプロモーターにおけるメチル化のレベルが、未処理の同様な細胞と比較して減少したことを例示する。試験は上記のように実施した。コラーゲン１Ａ１プロモーターの全ＣｐＧ部位におけるメチル化のレベルを平均化して平均値を求めた。結果を図４に示す。

【００７６】

図４のデータは、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地２％の局所適用が、内因的および外因的に老化した細胞のコラーゲン１Ａ１遺伝子のプロモーターにおけるＤＮＡのＣｐＧメチル化を、未処理の同様な細胞と比較して減少させることを実証する。

【００７７】

例６：

インビトロ培養した繊維芽細胞のコラーゲン１Ａ２プロモーターにおけるＣｐＧメチル化の平均値は、例１のオゾン処理したイネ分裂組織の馴化栄養培地の適用によって減少する

本例は、イネ分裂組織の馴化栄養培地２％をインビトロ培養した繊維芽細胞に適用することによって、この細胞のコラーゲン１Ａ２遺伝子のプロモーターにおけるメチル化のレベルが減少したことを例示する。試験は上記のように実施した。コラーゲン１Ａ２プロモーターの全ＣｐＧ部位におけるメチル化のレベルを平均化して平均値を求めた。結果を図５に示す。

【００７８】

図５のデータは、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地２％の局所適用が、内因的および外因的に老化した細胞のコラーゲン１Ａ２遺伝子のプロモーターにおけるＤＮＡのＣｐＧメチル化を、未処理で増殖した同様な細胞と比較して減少させることを実証する。

【００７９】

例７：

インビトロ培養した繊維芽細胞のコラーゲンタンパク質の量は、例１のオゾン処理したイネ分裂組織の馴化栄養培地の適用によって増加する

本例は、イネ分裂組織の馴化栄養培地２％をインビトロ繊維芽細胞に適用することによって、この細胞のコラーゲン産生が増加したことを例示する。細胞は上述のように増殖および処理した。コラーゲンの定量は、２４時間の時点で採取された培地試料と４８時間の時点で採取された培地の両方について行った。定量のために、０ｎｇ／ｍＬ～６４０ｎｇ／ｍＬの範囲にわたるタイプＩ－Ｃペプチドの一連の標準物質を調製した。次に、ＥＬＩＳＡマイクロプレートを、プレートのフレームから不要なストリップを取り除くことによって調製し、続いてペルオキシダーゼ標識した抗プロコラーゲンタイプＩ－Ｃペプチド抗体１００μＬを、定量に使用する各ウェルに添加した。次に２０μＬの試料（採取した組織培養培地）または標準物質のいずれかを適当なウェルに添加し、マイクロプレートにふたをして、３７℃で３±０．２５時間インキュベートした。インキュベーションした後、ウェルを吸引し、洗浄バッファー４００μＬで３回洗浄した。最後の洗浄液を除去した後、ペルオキシダーゼ基質溶液（過酸化水素＋発色基質としてテトラメチルベンジジン）１００μＬを各ウェルに添加し、プレートを室温で１５±５分間インキュベートした。インキュベーションした後、反応停止液（１Ｎ硫酸）１００μＬを各ウェルに添加し、プレートをマイクロプレートリーダーを使用して４５０ｎｍで読み取った。結果を図６に示す。

【００８０】

図６のデータは、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地２％の局所適用が、内因的および外因的に老化した細胞のコラーゲンタイプ１Ａを、未処理で増殖した同様な細胞と比較して増加させることを実証する。

【００８１】

例８：

インビトロ培養した繊維芽細胞のデルマトポンチンタンパク質の量は、例１からのオゾン処理したイネ分裂組織の馴化栄養培地の適用によって増加する

本例は、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地２％をインビトロ培養した繊維芽細胞に適用することによって、この細胞のデルマトポンチン産生が増加したことを例示する。細胞は上述のように増殖および処理した。デルマトポンチンタンパク質の量はイムノブロッティング法を使用して定量した。

【００８２】

細胞溶解物の精密ろ過ブロッティングおよび免疫検出

膜をトリス緩衝生理食塩水（ＴＢＳ：トリス２０ｍＭ、ｐＨ７．５、塩化ナトリウム１５０ｍＭ）中で平衡化し、バイオドット精密ろ過装置に組み込んだ。組み込んだ後、ＴＢＳ２００μＬをバイオドット装置で使用する各ウェルに添加し、そして全てのウェルにわたって十分な流れがおきることを確実にするために真空にした。次に、各細胞溶解物試料（およそ５μｇ）を装置内のウェルに割り当てて、適合するウェルに加えた。試料は低真

空下でろ過した。試料が割り当てられていないウェルにＴＢＳを添加し、この手順の間に膜が乾ききってしまわないことを確実にした。ブロッティング手順の最後に、各ウェルにわたって、追加のＴＢＳ２００μＬを加えてろ過した。その後、バイオドット装置から膜を取り出し、ＴＢＳ中で５～１０分間洗浄し、次いでブロッキング溶液（トリス緩衝生理食塩水［トリス２０ｍＭ、ｐＨ７．５、塩化ナトリウム１５０ｍＭ、脱脂粉乳１％］）中に置き、ロッカープレート上で室温で少なくとも１時間インキュベートした。

【００８３】

抗体インキュベーションおよび検出

ブロッキングした後、適当な希釈度の検出抗体を含む２０ｍＬのＴＢＳＴ（Ｔｗｅｅｎ－２０　０．１％を添加したＴＢＳ）および脱脂粉乳０．１％に膜を移し、ロッカープレート上で４℃で終夜インキュベートした。このインキュベーションの後、膜をＴＢＳＴ中で３回（１５分間を１回および５分間を２回）洗浄した。続いて、二次抗体（フルオロフォアに結合させたもの）を膜と共に脱脂粉乳０．１％を含むＴＢＳＴ１５ｍＬ中で室温で１時間インキュベートし、次いでＴＢＳで３回（１５分間を１回、５分間を２回）洗浄した。

【００８４】

最終洗浄後、膜をバイオラッドＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍａｇｅｒ　ＦＸ中に置き、フルオロフォアに適合する励起レーザーと発光フィルターとの組み合わせを使用してスキャンを行った。その後、スキャナーが生成した画像をＩｍａｇｅＪ画像解析ソフトウェアを使用して解析した。結果を図７に示す。

【００８５】

図７のデータは、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地２％の局所適用が、老化した細胞のデルマトポンチンの発現を、未処理で増殖した同様な細胞と比較して著しく増加させたことを実証する。

【００８６】

例９：

水中油エマルジョン

以下の処方および手順を使用して、例１からのイネ分裂組織の馴化栄養培地（「イネ培養物」）を水中油エマルジョンに配合した。

【表１】

例１からの抽出液を含む水中油エマルジョン

成分	INCI 名	%
水	水	適量
Versene 100	EDTA 四ナトリウム塩	0.10
グリセリン	グリセリン	2.00
カーボポール Ultrez10	カルボマー	0.20
Brookswax D	セテアリルアルコールおよびセテアレス-20	2.00
Liquiwax DIADD**	ドデカン二酸ジオクチルドデシル	5.00
Loronate TMP-TC	トリメチロールプロパントリカプリル酸/トリカプリン酸	2.00
Arlacel 60	ステアリン酸ソルビタン	1.50
ステアリルアルコール	ステアリルアルコール	0.20
セチルアルコール	セチルアルコール	0.50
ステアリン酸	ステアリン酸	0.50
Myritol 318	カプリル酸/カプリン酸トリグリセリド	2.00
DC 200/100 cst	ジメチコン	0.75
水	水	5.00
TEA 99	トリエタノールアミン	0.25
例１からのイネ培養物	-	1.00
Mikrokill COS	フェノキシエタノールおよびカプリリルグリコールおよびクロルフェネシン	0.75

【００８７】
手順：
相Ａを合わせ、７５℃に加熱する。均一になるまで混合する。
【００８８】
相Ｂを合わせ、７５℃に加熱し、均一になるまで混合する。
【００８９】
ゆっくりと混合しながら、相Ｂを相Ａに加える。２０分間混合する。
【００９０】
予混合物の相Ｃを加え、均一になるまで混合する。加熱を停止する。
【００９１】
サイドケトル中で相Ｄを予混合し、バッチに４０℃未満で加える。均一になるまで混合する。
【００９２】
Ｍｉｋｒｏｋｉｌｌ　ＣＯＳおよび相Ｅの香料を加え、均一になるまで混合する。
【００９３】
例１０：
油中水エマルジョン

以下の処方および手順を使用して、例１からのイネ培養物を油中水エマルジョンに配合した。

【表２】

イネ分裂組織の馴化栄養培地を含有する油中水エマルジョン

成分	INCI 名	%
水	水	100 まで適量
グリセリン	グリセリン	3.00
塩化ナトリウム	塩化ナトリウム	1.00
例 1 からのイネ培養物	-	1.00
Mikrokill COS	フェノキシエタノールおよびカプリリルグリコールおよびクロルフェネシン	0.75
SF1328	シクロメチコンおよびジメチコンコポリオール	10.00
SF 1202	シクロメチコン	8.50
Gel Base Sil	シクロメチコンおよびジメチコン	1.50
Gel Base BSM-PE	シクロメチコンおよびジメチコンおよびフェニルトリメチコンおよびポリエチレン	1.50
		100.00

【００９４】

手順：

相Ａの全成分を一緒に混合する。

【００９５】

相Ｂの成分を記載の順序で合わせ、次の成分を加える前に、均質になるまで各構成成分を十分に混合する。

【００９６】

効果的に混合しながら、相Ａを相Ｂにゆっくりと加える。混合物が粘稠になるにしたがって、次第に撹拌を強めて高剪断力にした。撹拌を１０分間継続した。

【００９７】

例１１：

アイジェル組成物

例１からのイネ培養物をリポソーム組成物中に封入し、次いで封入された抽出物を以下の手順を使用してアイジェル組成物中に組み入れた。

【表３】

イネ分裂組織の馴化栄養培地リポソームを含有するアイジェル

成分	INCI 名	%
水	水	適量
カーボポール Ultrez 21	アクリレート/C10～30 アルキルアクリレートクロスポリマー	0.50
Keltrol CG-SFT	キサンタンガム	0.10
ブチレングリコール	ブチレングリコール	5.00
Mikrokill COS	フェノキシエタノールおよびカプリリルグリコールおよびクロルフェネシン	1.00
Dow Corning 193 界面活性剤	ジメチコンコポリオール	0.30
EDTA 二ナトリウム	EDTA 二ナトリウム	0.10
AMP 95	アミノメチルプロパノール	0.45
例 1 からのイネ培養物を含有するリポソーム	-	1.00

【００９８】

手順：

１．カーボポールＵｌｔｒｅｚ２１を５０℃で水中に分散させ、Ｋｅｌｔｒｏｌ　ＣＧ－ＳＦＴを加える。均一になるまで混合する。

【００９９】

２．ブチレングリコール、Ｍｉｋｒｏｋｉｌｌ　ＣＯＳ、ＡＭＰ、ＥＤＴＡおよびシリコーン１９３を加える。均一になるまで混合する。

【０１００】

３．イネ分裂組織の馴化栄養培地のリポソームをスウィープ撹拌しながら４０℃で加える。均一になるまで混合する。

【０１０１】

５．必要に応じて、ｐＨを５．５に調節する。

【０１０２】

例１２：

封入された、例１からの抽出物

例１からのイネ培養物を、米国特許出願公開第２００３／０１９８６８２（Ａ１）号に概説された手法を使用してポリマーマトリックス中に封入した。

【０１０３】

例１３：

リップスティック組成物

例１からのイネ培養物を、例１２のポリマーマトリックス中に封入し、次いで以下の処方および手順を使用してリップスティック中に配合した。

【表４】

イネ分裂組織の馴化栄養培地を含有するリップスティック

成分	INCI名	%
相(A)		
ヒマシ油	リシナス・コミュニス(Ricinus Communis)(トウゴマ)種子油	31.45
Schercemol TISC	クエン酸トリイソステアリル	15.00
Liquiwax PolyIPL	ダイマージリノール酸ステアリル/PPG-3 ミリスチルエーテル	5.00
Liquiwax PolyEFA	ダイマージリノール酸オクチルドデシル/PPG-3ミリスチルエーテル	15.00
キャンデリラロウ	ユーフォルビア・セリフェラ(Euphorbia・Cerifer)(キャンデリラ)ロウ	6.00
オゾケライト 170D	オゾケライト	2.50
Microwax SP 19	微晶ロウ	3.50
カルナバロウ	コペルニシア・セリフェラ(Copernicia・cerifera)(カルナバ)ロウ	1.50
メチルパラベン	メチルパラベン	0.20
プロピルパラベン	プロピルパラベン	0.10
相(B)		
顔料粉		
赤7レーキ c19-7711	赤7レーキ	0.04
赤6レーキ c19-7712	赤6レーキ	0.17
赤色酸化鉄 A-1205	酸化鉄類	2.00
二酸化チタン Ultra Fine 70110	二酸化チタン	2.00
黒色酸化鉄 c33-134	酸化鉄類	0.05
Liquiwax PolyEFA*	ダイマージリノール酸オクチルドデシル/PPG-3ミリスチルエーテル	4.44
相(C)		
パルミチン酸アスコルビル	パルミチン酸アスコルビル	0.05
フラメンコレッド	雲母および二酸化チタン	10.00
粉末化した例12からのイネ培養物	-	1.00

【０１０４】

手順：
ロウ、油、および保存剤（相Ａ）を合わせ、８３～８７℃に加熱する。
【０１０５】
温度を保持し、均質になるまで混ぜる。
【０１０６】
温度を７５～８０℃に下げ、相Ｂを加え、均質になるまで混合する。
【０１０７】
パール、イネ分裂組織の馴化栄養培地およびパルミチン酸アスコルビル（相Ｃ）を加える。
【０１０８】
型に流し込む。
【０１０９】
例１４：
トナー組成物
以下の処方および手順を使用して、例１からのイネ培養物を水性アルコールトニック剤中に配合した。
【表５】

イネ分裂組織の馴化栄養培地を含有するトナー

成分	INCI 名	%
水	水	100 まで適量
Betafin BP-20*	ベタイン	3.00
例 1 からのイネ培養物	-	1.00
ウィッチヘーゼルおよび 14% アルコール	水およびエタノールおよびウィッチヘーゼル	25.00
Mikrokill COS	フェノキシエタノールおよびカプリリルグリコールおよびクロルフェネシン	0.75

【０１１０】
手順：
１．水を入れ、Ｂｅｔａｆｉｎ　ＢＰ－２０およびイネ分裂組織の馴化栄養培地を加える。均一になるまで混合する。
【０１１１】
２．ウィッチヘーゼルおよびＭｉｋｒｏｋｉｌｌ　ＣＯＳを加え、均一になるまで混合する。
【０１１２】
例１５：
ボディーソープ組成物
以下の処方および手順を使用して、例１からのイネ培養物をボディーソープ中に配合した。

【表６】

イネ分裂組織の馴化栄養培地を含有するボディーソープ

成分	INCI 名	%
水	水	適量
Hamp-ene Na2	EDTA 二ナトリウム	0.10
グリセリン	グリセリン	2.00
Standapol WAQ-Special	ラウリル硫酸ナトリウム	30.00
Standapol ES-2	ラウレス硫酸ナトリウム	25.00
Cerasynt IP	ステアリン酸グリコールおよびステアリン酸およびアミノメチルプロパノール	0.50
Velvetex BA-35	コカミドプロピルベタイン	7.00
コカミド MEA	コカミド MEA	2.00
Mikrokill COS	フェノキシエタノールおよびカプリリルグリコールおよびクロルフェネシン	0.75
例 1 のイネ培養物		1.00

【０１１３】
手順：
１．水を７０℃に加熱し、ＥＤＴＡ二ナトリウム、グリセリンを加え、均一になるまで混合する。
【０１１４】
２．温度を７０℃超に保持し、Ｓｔａｎｄａｐｏｌ ＷＡＱ Ｓｐｅｃｉａｌ、Ｓｔａｎｄａｐｏｌ ＥＳ－２、Ｃｅｒａｓｙｎｔ ＩＰ、コカミド ＭＥＡ、Ｖｅｌｖｅｔｅｘ ＢＡ－３５を加え、均一になるまで混合する。
【０１１５】
３．４５℃ まで冷却し、Ｍｉｋｒｏｋｉｌｌ ＣＯＳおよびオセージオレンジ抽出物を加える。
【０１１６】
４．均質になるまで混合する。
【０１１７】
例１６：
酵母／例１抽出物の発酵産物
例１からのイネ培養物を、酵母サッカロマイセス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）を含有する発酵培地の一部として含ませた。例１からの抽出物の試料を、Ｒｅｄ Ｓｔａｒ Ｙｅａｓｔ（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ、ＷＩ）から入手したＢａｋｅｒ’ｓ Ｙｅａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｍｅｄｉａの水性混合物中に置いた。培地に、Ｒｅｄ Ｓｔａｒから同様に入手した活性なサッカロマイセス・セレビシエ酵母培養物を接種し、制御された好気状態下で混合物を発酵させて、米国特許第２，２３９，３４５号に記載されたストレス状態を用いて得られる生酵母細胞誘導体（ＬＹＣＤ）を得た。
【０１１８】
例１７：

サブミクロンのエマルジョン濃縮物

この例は、例１に記載されたように調製したイネ培養物を含有するサブミクロンのエマルジョン濃縮物を例示する。

【０１１９】

成分	重量％
トリメチロールプロパントリカプリル酸／トリカプリン酸	１８．０
グリセリン	８．０
セテアリルアルコール	２．０
セテアレス２０	２．０
ステアリン酸グリセリル	２．０
ＢＨＴ	０．０１
例１からのイネ培養物	１．０
水	１００．０まで

【０１２０】

参考文献

Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. Nat Biotechnol 27(4): 361-368.

Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell 40: 91-99.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16: 6-21.

Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, Kahn RS, Ophoff RA. (2009) The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. PLoS One. 4(8): e6767.

Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI (2006) Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. Proc Natl Acad Sci 103: 17308-17312.

Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, et al. (2009) Targeted bisulfate sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. Nat Biotechnol 27: 353-360.

Feng YQ, Desprat R, Fu H, Olivier E, Lin CM, et al. (2006) DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. PLoS Genet 2: e65.

Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci 102: 10604-10609.

Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R (2006) DNA methylation and apoptosis. Mol Immunol 43: 1729-1740.

Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW (1996) The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. Hum Genet 97: 319-323.

Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le PC, Jurkowska RZ, et al. (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. Nature 452: 45-50.

Mitchell BD, Hsueh WC, King TM, Pollin TI, Sorkin J, Agarwala R, Schaffer AA, Shuldiner AR (2001) Heritability of life span in the old order Amish. Am J Med Genet 102: 346-352.

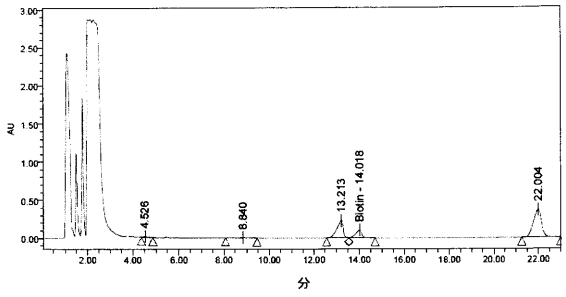
Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, et al. (1994) Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expressi

on in human breast cancer cells. Cancer Res 54: 2552-2555.
Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF (2007) The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. Pediatr Res 61: 38R-42R.
Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, et al. (2003) Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. Proc Natl Acad Sci USA 100: 2538-2543.
Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. Proc Natl Acad Sci USA 103: 1412-1417.
Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T (1999) Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. Mech Ageing Dev 110: 37-48.
Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci USA 99(6): 3740-3745.
Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M (2006) Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. Proc Natl Acad Sci USA 103: 3480-3485.

【図１】

図１

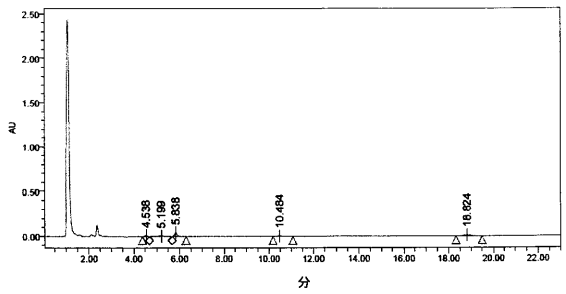
Figure 1



【図２】

図２

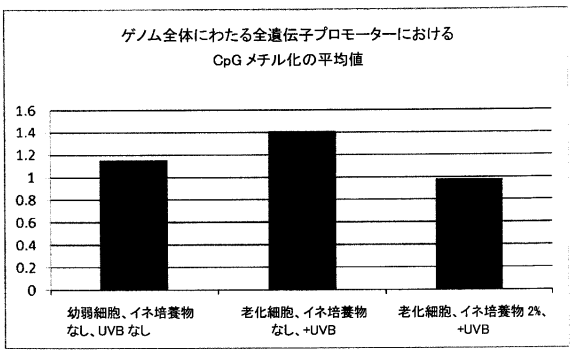
Figure 2



【図３】

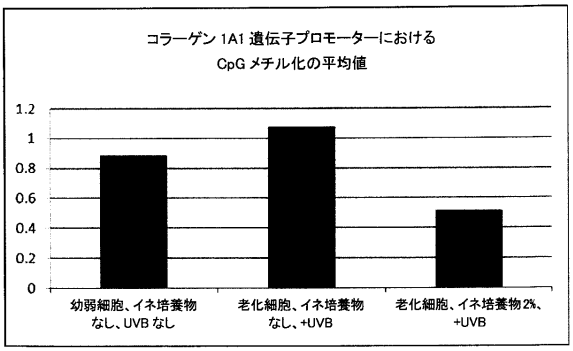
図３

Figure 3



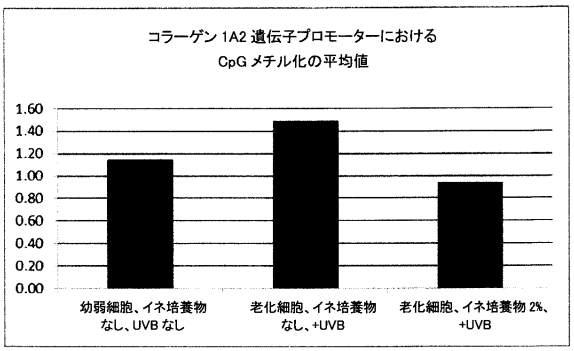
【図４】
図4

Figure 4



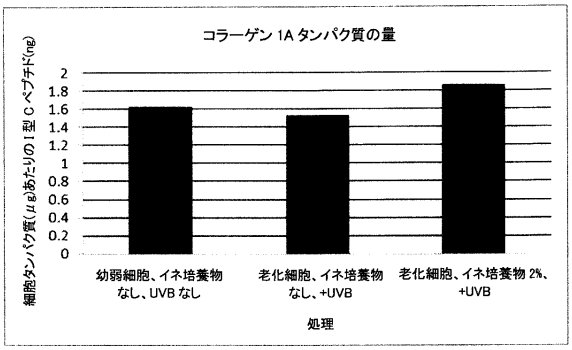
【図５】
図5

Figure 5



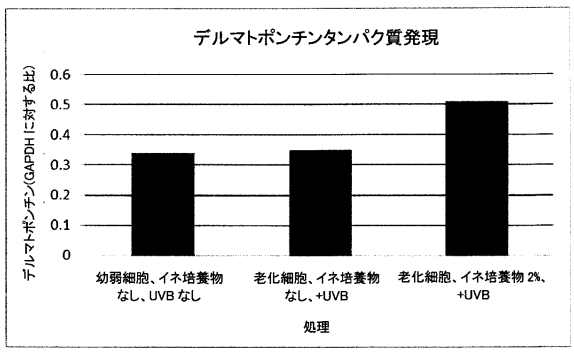
【図６】
図6

Figure 6



【図７】
図7

Figure 7



【手続補正書】
【提出日】平成29年6月22日(2017.6.22)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および
（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体
を含む、ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための局所組成物。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０１２０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０１２０】
参考文献
Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. Nat Biotechnol 27(4): 361-368.
Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. Cell 40: 91-99.
Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16: 6-21.
Boks MP, Derks EM, Weisenberger DJ, Strengman E, Janson E, Sommer IE, Kahn RS, Ophoff RA. (2009) The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. PLoS One. 4(8): e6767.
Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI (2006) Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. Proc Natl Acad Sci 103: 17308-17312.
Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, et al. (2009) Targeted bisulfate sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. Nat Biotechnol 27: 353-360.
Feng YQ, Desprat R, Fu H, Olivier E, Lin CM, et al. (2006) DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. PLoS Genet 2: e65.
Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci 102: 10604-10609.
Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R (2006) DNA methylation and apoptosis. Mol Immunol 43: 1729-1740.
Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sorensen TI, Harvald B, Vaupel JW (1996) The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900. Hum Genet 97: 319-323.
Metivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le PC, Jurkowska RZ, et al. (2008) Cyclical D

NA methylation of a transcriptionally active promoter. Nature 452: 45-50.
Mitchell BD, Hsueh WC, King TM, Pollin TI, Sorkin J, Agarwala R, Schaffer AA, Shuldiner AR (2001) Heritability of life span in the old order Amish. Am J Med Genet 102: 346-352.
Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, et al. (1994) Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. Cancer Res 54: 2552-2555.
Poulsen P, Esteller M, Vaag A, Fraga MF (2007) The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. Pediatr Res 61: 38R-42R.
Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, et al. (2003) Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. Proc Natl Acad Sci USA 100: 2538-2543.
Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. Proc Natl Acad Sci USA 103: 1412-1417.
Takatsu M, Uyeno S, Komura J, Watanabe M, Ono T (1999) Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. Mech Ageing Dev 110: 37-48.
Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci USA 99(6): 3740-3745.
Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M (2006) Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. Proc Natl Acad Sci USA 103: 3480-3485.

以下に、出願当初の特許請求の範囲に記載された発明を付記する。

［１］

（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、

（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および

（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体

を含む、ヒト皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための局所組成物。

［２］

構成要素（ａ）が、組成物の重量に対して０．００００００１％～９９％、好ましくは０．０００１％～５０％、より好ましくは０．００１％～２５％、最も好ましくは０．０１％～１０％の量で存在し、構成要素（ｂ）が組成物の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在し、構成要素（ｃ）が組成物の重量に対して１％～９８％、好ましくは８０％～９０％の量で存在する［１］に記載の組成物。

［３］

構成要素（ａ）が、オリザ・サティバに由来する植物分裂組織の馴化栄養培地である、［１］または［２］に記載の組成物。

［４］

前記植物分裂組織の馴化栄養培地が、（ｉ）イネ属植物に由来する植物分裂組織を液体栄養培地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生し、（ｉｉ）前記水不溶性の成分を除去し、それによって前記植物分裂組織の馴化栄養培地を産生することにより調製された、［１］から［３］のいずれかに記載の組成物。

［５］

前記植物分裂組織が、植物細胞の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した、化学的、ガス状またはエネルギー的ストレスの存在下で、液体栄養培地中で増殖された、［１］から［４］のいずれかに記載の組成物。

［６］

前記植物分裂組織細胞が、オゾンの存在下、液体栄養培地中で増殖された、［５］に記載の組成物。
［７］
前記保存剤が、基質との組み合わせにおける、サリチル酸、ソルビン酸、フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、エタノール、クォータニウム－１５、グリコースオキシダーゼおよびラクトペルオキシダーゼ、ならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される、［１］から［６］のいずれかに記載の組成物。
［８］
前記保存剤が、フェノキシエタノールである、［７］に記載の組成物。
［９］
前記保存剤が、前記組成物の全重量に対して少なくとも０．５重量％の量で存在する、［１］から［８］のいずれかに記載の組成物。
［１０］
水、界面活性剤、乳化剤、コンディショナー、軟化剤、ロウ、油、ポリマー、増粘剤、揮発防止剤、着色剤、湿潤剤、保湿剤、安定化剤、希釈剤、溶媒、香料、植物性薬品、栄養補助剤、薬用化粧品、治療剤、医薬品、抗真菌薬、抗微生物剤、ステロイドホルモン、ふけ防止剤、抗ニキビ成分、日焼け止め剤、保存剤、およびそれらの組み合わせを含む群から選択される少なくとも１つの成分をさらに含む、［１］から［９］のいずれかに記載の組成物。
［１１］
（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、および
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤
を含む組成物濃縮物であって、
構成成分（ａ）が組成物の重量に対して０．００００００１％～９９％、好ましくは９０％～９９％、より好ましくは９７％～９９％の量で存在し、構成要素（ｂ）が組成物の重量に対して０．０１％～１０％、より好ましくは０．１％～５％、最も好ましくは０．４％～２％の量で存在する、組成物濃縮物。
［１２］
構成要素（ａ）が、オリザ・サティバに由来する植物分裂組織の馴化栄養培地である、［１１］に記載の組成物濃縮物。
［１３］
（ｉ）イネ属植物に由来する、分化全能性未分化植物細胞を準備するステップ、
（ｉｉ）植物細胞の二次代謝産物の発現を誘発することを意図した、化学的、ガス状もしくはエネルギー的ストレスの存在下または非存在下のいずれかで、前記植物細胞を液体栄養培地中で増殖させて、水溶性および水不溶性の成分を含有する混合物を産生するステップ、
（ｉｉｉ）水不溶性の成分を除去して、植物分裂組織の馴化栄養培地を産生するステップ、ならびに
（ｉｖ）植物分裂組織の馴化栄養培地を保存剤および皮膚科学的に許容できる媒体と混合し、それによって［１］に記載の組成物を作製するステップ
を含む、［１］に記載の組成物の調製方法。
［１４］
ステップ（ｉ）の植物細胞がオリザ・サティバ由来である、［１３］に記載の方法。
［１５］
ステップ（ｉｉ）において、植物細胞がオゾンの存在下で増殖する、［１３］または［１４］に記載の方法。
［１６］
ステップ（ｉ）の植物細胞が、
（１）イネ属植物に由来する植物分裂組織を固体栄養培地で増殖させること、および（２

）安定化した培養物を選択し、それによって前記植物細胞を産生することを含む方法によって調製される、［１３］から［１５］のいずれかに記載の方法。
［１７］
皮膚を局所組成物と接触させることを含むヒトの皮膚細胞におけるＤＮＡメチル化を制御するための方法であって、前記局所組成物が、
（ａ）イネ属植物に由来する植物分裂組織の馴化栄養培地、
（ｂ）構成成分（ａ）に関して滅菌または静生物効果を与えるのに十分な量で存在する保存剤、および
（ｃ）皮膚科学的に許容できる媒体
を含む方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 47/46	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/46	
Ａ６１Ｐ 17/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ａ６１Ｑ 19/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｑ	19/00	

(74)代理人 100189913
弁理士 鵜飼 健
(72)発明者 ジェームズ・ビンセント・グルーバー
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 ０７８８２－４００２、ワシントン、ニュー・ハンプトン・ロード ５６
(72)発明者 フィリップ・レデット・ルートビッヒ
アメリカ合衆国、ニュージャージー州 ０８８１２－１２５０、デュネレン、マディソン・アベニュー ８、アパートメント ４

Ｆターム(参考) 4C076 CC18 DD37R DD39R DD41R DD66R EE60R FF70
4C083 AA111 AA112 AA122 AA162 AB232 AB242 AB332 AB432 AC072 AC102
AC122 AC171 AC172 AC182 AC242 AC311 AC392 AC402 AC422 AC442
AC472 AC482 AC532 AC542 AC642 AC712 AC782 AD071 AD092 AD152
AD172 AD352 AD471 AD642 BB01 BB46 BB48 BB51 CC02 CC13
CC23 DD11 DD32 DD33 DD45 EE12
4C088 AB74 CA25 MA63 NA14 ZA89

【外国語明細書】
2017200922000001.pdf