



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105770077 B

(45)授权公告日 2020.04.07

(21)申请号 201610118362.X
(22)申请日 2012.03.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105770077 A
(43)申请公布日 2016.07.20
(30)优先权数据
2011-057126 2011.03.15 JP

A61K 31/197(2006.01)
A61K 31/047(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61K 8/9789(2017.01)
A61K 8/34(2006.01)
A61K 8/46(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)

(62)分案原申请数据
201280023435.7 2012.03.14

(56)对比文件

CN 1294896 C,2007.01.17,说明书第1页第2段、第2页第2-5段、第5页第1段.

CN 101062002 A,2007.10.31,说明书第2页第3段.

CN 101180029 A,2008.05.14,说明书第2页第3段、第4页第1段.

(73)专利权人 株式会社资生堂
地址 日本东京都

Yayoi Kamata 等.Bleomycin Hydrolase is regulated biphasically in a differentiation and cytokine-dependent manner.《Journal of biological chemistry》.2011,第286卷(第10期),8204-8212.

(72)发明人 日比野利彦 山田章子 福岛秀和

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 曾祯 段承恩

审查员 刘国宝

权利要求书1页 说明书14页

序列表5页 附图22页

(51)Int.Cl.
A61K 36/738(2006.01)
A61K 36/232(2006.01)
A61K 36/756(2006.01)
A61K 36/53(2006.01)

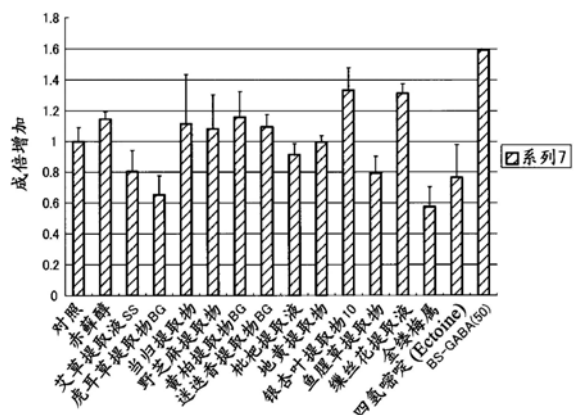
(54)发明名称

博来霉素水解酶产生促进剂

(57)摘要

本发明提供新的博来霉素水解酶产生促进剂。本发明提供含有选自缬丝花提取物、当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物、迷迭香提取物、苯磺酰GABA和赤藓醇中的1种或多种作为活性成分的博来霉素水解酶产生促进剂、天然保湿因子产生促进剂、干燥肌肤改善剂。

对 BH mRNA 表达的效果



1. 活性成分用于制造博来霉素水解酶产生促进剂的用途, 该活性成分是缣丝花提取物。
2. 活性成分用于制造博来霉素水解酶产生促进剂的用途, 该活性成分是选自当归提取物、黄柏提取物、迷迭香提取物、苯磺酰GABA和赤藓醇中的1种或多种。

博来霉素水解酶产生促进剂

[0001] 本申请是申请日为2012年3月14日、申请号为201280023435.7、发明名称为“博来霉素水解酶产生促进剂”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供博来霉素水解酶产生促进剂、含有该博来霉素水解酶产生促进剂的天然保湿因子产生促进剂或干燥肌肤改善剂。

背景技术

[0003] 表皮的颗粒层的角蛋白纤维在角化时与被称为丝聚蛋白的蛋白质结合而凝聚,形成被称为“角蛋白模型”的特异性形态。颗粒细胞内的透明角质颗粒中存在大量作为丝聚蛋白的前体物质的丝聚蛋白原(由10~12个丝聚蛋白单元纵向排列而成),角化时,在生成丝聚蛋白单体的同时通过去磷酸化而使角蛋白纤维凝聚。然后,通过称作肽基精氨酸脱亚氨酶(PAD)的酶的作用而被脱亚氨基化,游离为角蛋白,然后在角质层上层被分解成氨基酸等。已知这些氨基酸被称为天然保湿因子(natural moisturizing factor,NMF),对角质层水分量的保持承担重要的作用,此外具有紫外线吸收能力(Blank I.H.J.I.Dermatol.,18,433(1952);Blank I.H.J.I.Dermatol.,21,259(1953))。

[0004] 自从明确了作为NMF的主成分的氨基酸来自丝聚蛋白以来,对于呈现干燥肌肤的病态与丝聚蛋白的相关性进行了研究。近年来,明确了在老年性干皮病、特应性疾病等的干燥肌肤中,角质层中的氨基酸减少(Horii I.et al.,Br.J.Dermatol.,121,587-592(1989);Tanaka M.et al.,Br.J.Dermatol.,139,618-621(1989))。

[0005] PAD与丝聚蛋白的精氨酸残基作用而脱亚氨基化,转换成瓜氨酸残基。认为这样通过丝聚蛋白被脱亚氨基化,丝聚蛋白与角蛋白纤维的亲性和性变弱,角蛋白纤维游离,其结果是丝聚蛋白容易受到蛋白酶的作用,最终被分解成NMF。

[0006] 本发明者明确了,作为将以PAD脱亚氨基化后的丝聚蛋白分解的酶,特定为钙蛋白酶-1,作为其分解产物的小的肽片段被博来霉素水解酶(BH)分解成氨基酸单元、即NMF(Journal of Investigative Dermatology(2008),Volume 128,ABSTRACTS,S90,539;第30回日本分子生物学会年会·第80回日本生化学会大会合同大会讲演要旨集,第583页;JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 284,NO.19,pp.12829-12836,2009,3P-0251;和日本特愿2008-135944号(以下称为第944号申请))。

[0007] 最近的研究已知,特应性皮炎的一部分是由于丝聚蛋白原基因的异常而产生的,在特应性皮炎患者的5-50%左右中发现该基因的异常(Smith FJD,et al.Nat Genet 38:337-42(2006);Aileen Sandilands1,et al.,J.I.Dermatol.,127,1282-1284(2007)和Nomura T,et al.,J.I.Dermatol.,128(6):1436-41(2008))。然而,特应性皮炎患者的皮肤中,丝聚蛋白的表达不是一定会剧烈降低。

[0008] 现有技术文献

[0009] 非专利文献

- [0010] 非专利文献1:Blank I.H.J.I.Dermatol.,18,433 (1952)
- [0011] 非专利文献2:Blank I.H.J.I.Dermatol.,21,259 (1953)
- [0012] 非专利文献3:Horii I.et al.,Br.J.Dermatol.,121,587-592 (1989)
- [0013] 非专利文献4:Tanaka M.et al.,Br.J.Dermatol.,139,618-621 (1989)
- [0014] 非专利文献5:Kamata et al.,J.Biochem.,141,69-76,2007
- [0015] 非专利文献6:Journal of Investigative Dermatology (2008),Volume 128, ABSTRACTS,S90,539
- [0016] 非专利文献7:第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会讲演要旨集,第583页,3P-0251
- [0017] 非专利文献8:JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 284,NO.19,pp.12829-12836, 2009
- [0018] 非专利文献9:Smith FJD,et al.Nat Genet 38:337-42 (2006)
- [0019] 非专利文献10:Aileen Sandilands1,et al.,J.I.Dermatol.,127,1282-1284

发明内容

[0020] 发明所要解决的课题

[0021] 本发明者的课题是提供博来霉素水解酶产生促进剂。

[0022] 用于解决课题的方法

[0023] 在上述第944号申请中,本发明者明确了博来霉素水解酶的活性增强介由NMF的产生而改善皮肤屏障功能。这样,认为博来霉素水解酶在NMF产生的最终阶段起作用。然而,有趣的是,关于由于特应性皮炎而产生的干燥肌肤,在多数特应性皮炎患者中依然可见丝聚蛋白的表达,因此预想是由于与丝聚蛋白基因的异常不同的原因而产生的。

[0024] 本发明者基于人皮肤中的博来霉素水解酶的表达降低不仅与由于NMF产生机制的异常而产生的皮肤屏障功能的降低有关,而且与主要由免疫异常引起的特应性皮炎、以及由于该皮炎而产生的干燥皮肤等有关这一假说,对由干燥肌肤人试验得到的该酶的表达变化进行了验证,并且进行了其表达控制机制的分析等。其结果是,本发明者发现,博来霉素水解酶的表达降低与由于特应性皮炎而产生的干燥肌肤相关,并且在编码该酶的基因的5'旁侧区内存在显著诱导该酶的表达的调控区。具体而言,本发明者对BH的5'-旁侧区进行了克隆化。在其缺失分析中,在-216bp上游中鉴定了出对BH启动子活性重要的区。在电泳迁移率变动分析中,明确了在试管内MZF-1、Sp-1和干扰素调节因子(IRF)-1/2可以与该区结合。而且,在MZF-1和Sp-1基序的定点诱变中,BH启动子活性大大降低。这些数据暗示出BH表达介由MZF-1和Sp-1而被增量调节。有趣的是,作为Th1细胞因子的干扰素(IFN)- γ 使BH的表达有意义地减少。在定点诱变和使用小干扰RNA的分析中,证实了IFN- γ 对BH表达的抑制效果。另一方面,作为Th2细胞因子的IL-4对BH表达完全不显示直接作用。然而,由于IL-4在培养角质形成细胞中对MZF-1和Sp-1进行减量调节,因此提示IL-4可以作为BH调整的抑制基因起作用。最后,研究了患有AD的患者的皮肤中的BH表达。BH活性和表达在AD病变皮肤中大大减少,因此暗示出AD中的丝聚蛋白分解途径的缺陷。如上,本发明者发现,BH的转录在分化中和炎症中这两者中被调节。因此,本发明者对于各种药剂、生药调查了其博来霉素水解酶产生促进活性,结果发现了规定的药剂、生药具有这样的活性,从而完成了本发明。

[0025] 本申请包含以下发明。

[0026] (1) 博来霉素水解酶产生促进剂, 含有选自缬丝花提取物、当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物、迷迭香提取物、苯磺酰GABA和赤藓醇中的1种或多种作为活性成分。

[0027] (2) 根据(1)所述的博来霉素水解酶产生促进剂, 是含有选自缬丝花提取物、当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物、迷迭香提取物、苯磺酰GABA和赤藓醇中的1种或多种作为活性成分的天然保湿因子产生促进剂。

[0028] (3) 根据(1)所述的博来霉素水解酶产生促进剂, 是含有选自当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物、迷迭香提取物、苯磺酰GABA和赤藓醇中的1种或多种作为活性成分的干燥肌肤改善剂。

[0029] (4) 干燥肌肤的改善或预防方法, 包含将(1)~(3)的任一项所述的博来霉素水解酶产生促进剂应用于需要改善或预防干燥肌肤的受试者的步骤。

[0030] (5) 根据(4)所述的方法, 干燥肌肤是由特应性皮炎引起的。

[0031] (6) 用于改善或预防干燥肌肤的、(1)~(3)的任一项所述的博来霉素水解酶产生促进剂的用途。

[0032] (7) 根据(6)所述的用途, 干燥肌肤是由特应性皮炎引起的。

[0033] 发明的效果

[0034] 本发明者可以提供新的NMF产生促进剂、干燥肌肤改善剂。

附图说明

[0035] 图1是显示通过胶带剥离(tape stripping)而获得的人皮肤提取液中的博来霉素酶量与胶带剥离的次数的关系的蛋白质印迹图。

[0036] 图2是显示人皮肤提取液中的博来霉素酶量与干燥肌肤的关系的蛋白质印迹图。T、A: 来自不感觉干燥的受试者的样品; N: 来自感觉略干燥的受试者的样品, 以及M: 来自感觉干燥的受试者的样品。

[0037] 图3是显示人的腕的角质层提取液中的博来霉素水解酶量与其酶活性的关系的图。横轴的编号表示受试者的识别编号。

[0038] 图4是对于图3中所得的博来霉素水解酶量与活性的关系通过最小二乘法得到的一次近似。

[0039] 图5是关于人的腕的角质层提取液中的博来霉素水解酶和皮肤参数(A: 游离氨基酸, B: 活性, C: TEWL)的统计学分析。BH low: 博来霉素水解酶量 <10 , 活性 <1.5 (nmol/分钟/ml); BH high: 博来霉素水解酶量 ≥ 10 , 活性 ≥ 1.5 (nmol/分钟/ml)。

[0040] 图6是肌肤分类用问卷调查流程图。

[0041] 图7是按照图6的流程图分类后的受试者的角质层的皮肤参数测定结果。

[0042] 图8是显示正常皮肤中的博来霉素水解酶和丝聚蛋白的局部存在的组织染色图。

[0043] 图9是显示特应性患者皮肤中的博来霉素水解酶和丝聚蛋白的局部存在的组织染色图。

[0044] 图10是显示使用定量PCR得到的角质形成细胞的分化与博来霉素水解酶的表达量的关系的图。纵轴的值表示将80%汇合的表达量设为1的情况下的相对量。

[0045] 图11是显示编码博来霉素水解酶的基因的5' 旁侧区的示意图。

- [0046] 图12是显示使用了人表皮角质形成细胞的BH启动子的萤光素酶检测的结果的图。
- [0047] 图13是显示转录因子SP1、MZF1和GATA1的表达与UV照射的关系的图。
- [0048] 图14是显示正常人表皮角化细胞中的博来霉素水解酶和蛋白酶的表达式与UV照射的关系的图。
- [0049] 图15是为了通过PCR制成BH的5' -旁侧区的连续5' -缺失突变株而使用的引物。
- [0050] 图16是为了通过实时定量RT-PCR来分析BH和相关因子的转录水平而使用的引物。
- [0051] 图17是电泳迁移率变动分析中使用的探针。
- [0052] 图18 (A) 显示人BH的5' -旁侧区的示意图。5' -旁侧区内的推定转录因子结合部位是通过采用Genome Net MOTIF程序进行的检索而明确的。(B) 缺失分析中确定的BH的启动子区。(C) 对显示包含BH的最小启动子的序列和推定转录因子结合部位的-216/-1区的核苷酸序列的推定转录因子结合部位加了下划线。
- [0053] 图19 (A) 通过定点诱变进行的BH启动子中的转录因子结合部位的特性确定。显示推定转录因子结合部位的缺失构建体的示意图和培养角质形成细胞中的其萤光素酶活性。定点诱变在跨越-616/+1区的核苷酸序列的构建体中实施。(B) 显示MZF-1、Sp-1、GATA-1或IRF-1/2对BH启动子的顺式作用元件的结合。实验通过使用来自培养角质形成细胞的核提取物、和包含推定转录因子结合部位MZF-1、Sp-1、GATA-1或IRF-1/2的生物素化双链寡核苷酸探针的电泳迁移率变动分析 (EMSA) 来进行。道1表示核提取物中的生物素化探针的结合图,道2表示与2倍过量的非标记探针竞争后的生物素化探针的结合图。
- [0054] 图20 (A) BH表达的实时RT-PCR分析。显示Th1、Th2和Th17细胞因子对BH基因表达的效果。(B) IRF-1/2结合部位的突变分析。显示在IFN- γ 存在下的培养角质形成细胞中的BH启动子活性。将角质形成细胞用包含BH启动子区的完整IRF-1/2结合部位的pGL3-216进行转染,用IFN- γ 处理24小时(上画面)。将角质形成细胞用 Δ pGL3-616 (IRF-1/2缺失突变体) 转染,在10ng/ml的IFN- γ 或IL-4存在下或不存在下处理24小时(下画面)。(C) 用于判断IRF-1/2是否为BH的IFN- γ 诱导性减量调节的必须介质的使用了小干扰RNA (siRNA) 的IRF-1和IRF-2基因表达的测定。将角质形成细胞用IRF-1或IRF-2的siRNA (40nM) 转染,培养24小时,用10ng/ml的IFN- γ 处理,再培养24小时,然后进行RNA分离。右画面显示IRF-1和IRF-2的沉默的效果。
- [0055] 图21 (A) 用于调查表皮中的转录调节机制的通过实时PCR法进行的增殖型或分化型细胞中的BH、钙蛋白酶I和推定转录因子的表达分析。(B) 培养角质形成细胞中的转录因子MZF-1、Sp-1、GATA-1、IRF-1和IRF-2表达谱分析。
- [0056] 图22 (A) IFN- γ 对推定转录因子IRF-1和IRF-2的表达式的效果。(B) IL-4对推定转录因子IRF-1、IRF-2、MZF-1和Sp-1的表达式的效果。
- [0057] 图23 (A) 正常表皮中的通过用抗BH抗体和抗丝聚蛋白抗体的双重染色而显示的、颗粒层中的BH与丝聚蛋白的同时局部存在。(B) 来自AD患者的病变皮肤与非病变皮肤的提取物的BH活性。
- [0058] 图24显示各种生药和药剂的博来霉素水解酶酸性促进效果。

具体实施方式

- [0059] 博来霉素水解酶是分子量250~280kDa (六聚体) 的细胞质半胱氨酸肽水解酶,最

初知道的功能是在癌的组合化学疗法中频繁使用的糖肽博来霉素的代谢失活。包含半胱氨酸蛋白质分解酶木瓜蛋白酶超家族的特征性活性部位残基,编码基因在人中存在于基因座17q11.2(Takeda et al., J Biochem., 119, 29-36, 1996)。存在于所有组织,也已知其存在于皮肤中(Kamata et al., J. Biochem., 141, 69-76, 2007),但关于与丝聚蛋白的关系,在本发明者搞清楚之前还完全未知。

[0060] 由组织染色的结果明确了,博来霉素水解酶与丝聚蛋白同样地在正常皮肤中在表皮上层大量表达(图8)。另一方面,在特应性皮炎患者中,在特应性皮炎部该酶和丝聚蛋白的表达降低(图9)。这强烈启示,不是丝聚蛋白原基因的异常而是其分解酶系的异常成为特应性皮炎的原因。此外,特应性皮炎患者的皮肤中,不仅病变部博来霉素水解酶活性有意义地低,而且非病变部博来霉素水解酶活性也有意义地低(数据未显示)。

[0061] 此外,对于博来霉素水解酶的表达量的变化,使用培养角质形成细胞进行了研究,结果可知,该酶在未分化的角质形成细胞中不怎么表达,与此相对,在达到汇合并进行分化后的角质形成细胞中高表达;在基底细胞中几乎不表达,而在分化进行并向表皮细胞移行后高表达(图10)。该结果支持了上述细胞染色的结果。图11表示编码博来霉素水解酶的基因的5'-旁侧区、特别是转录调控区、和与该区结合的转录因子。为了博来霉素水解酶的表达,只要包含从该酶的编码序列到至少216bp下游的区即可。认为在图11所记载的转录因子中,通过增强该区所含的IRF-1、IRF-2、MZF-1、SP-1、GATA-1的结合活性,从而博来霉素水解酶的表达特别增强。事实上,博来霉素水解酶通过紫外线(UV)照射而其表达被增强(数据未显示),此时MZF-1、GATA-1的表达增强与UV的强度和照射时间之间可见相关关系(图13)。

[0062] 博来霉素水解酶产生促进也会受到细胞因子影响。例如,已知与特应性皮炎相关的、作为Th2细胞因子的一种的白介素-4(IL-4),对博来霉素水解酶的表达进行减量调节。这证实了特应性皮炎患者的皮肤中所见的博来霉素水解酶的低表达。另一方面,与IL-4相反地具有抑制IgE产生的作用的Th1细胞因子的代表干扰素 γ ,有意义地增强博来霉素水解酶的表达。此外,Th2细胞因子中作为炎症性细胞因子的代表的肿瘤细胞坏死因子 α (TNF α)也使该酶的表达有意义地增强。不仅是这些物质,博来霉素水解酶的表达和/或活性也会由于UV照射而被增强。虽然结果未显示,但确认了在体表面中,容易受到紫外线照射的面颊等的皮肤中的博来霉素水解酶的活性由于UV照射而被增强。

[0063] 缬丝花提取物、当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物和迷迭香提取物有时在皮肤外用剂中被使用,但任一提取物均未被知晓具有博来霉素水解酶产生促进效果、NMF产生促进效果、干燥肌肤改善效果。例如,缬丝花提取物不过被已知具有神经酰胺合成促进效果(日本特开2006-111560)、胶原酶抑制效果(日本特开2006-241148)这样的效果。苯磺酰GABA(苯磺酰- γ 氨基丁酸)、赤藓醇也同样地有时在皮肤外用剂中被使用,但任一药剂均未被知晓具有博来霉素水解酶促进效果、NMF产生促进效果、干燥肌肤改善效果。

[0064] 上述提取物可以通过常规方法获得,例如可以将成为其来源的植物的一部分或全部与提取溶剂一起在常温或加热下进行浸渍或加热回流后,过滤、浓缩而获得。还可以在溶剂提取之前,使提取部位干燥。作为提取溶剂,只要是通常在提取中使用的溶剂就可以任意使用,可以将下述溶剂分别单独或组合使用,所述溶剂例如:有机溶剂,例如甲醇、乙醇、丙二醇、1,3-丁二醇、甘油等醇类、含水醇类、氯仿、二氯乙烷、四氯化碳、丙酮、乙酸乙酯、己烷等,或者水性溶剂,例如水、生理盐水、磷酸缓冲液、硼酸缓冲液等。优选作为溶剂,适合使用

选自水、甲醇、乙醇、1,3-丁二醇中的1种或2种以上。

[0065] 用上述溶剂提取而得的提取物可以直接使用,或者使用例如通过冻结干燥等浓缩而得的提取物,另外可以使用根据需要使用吸附法、例如离子交换树脂除去杂质而得的提取物,和/或用多孔高分子(例如アンバーライトXAD-2)的柱吸附后,用所需的溶剂溶出,进一步浓缩而得的提取物。

[0066] 缣丝花提取物、当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物和迷迭香提取物等提取物和/或苯磺酰GABA、赤藓醇等药剂,浓度依赖性地显示博来霉素水解酶产生促进作用。因此,从这样的观点出发,本发明的博来霉素水解酶产生促进剂中的缣丝花提取物、当归提取物、黄柏提取物、野芝麻提取物和/或迷迭香提取物等提取物的配合量,在制剂总量中,作为干燥物为0.0001~20.0质量%,优选为0.0001~10.0质量%,更优选为0.001~1质量%。苯磺酰GABA和/或赤藓醇等药剂的配合量,在制剂总量中,作为干燥物为0.0001~20.0mmol,优选为0.0001~10.0mmol,更优选为0.001~1mmol。

[0067] 本发明的博来霉素水解酶产生促进剂可以按照常规方法制造,另外作为构成本发明的博来霉素水解酶产生促进剂的成分,可以由上述提取物和/或药剂1种或2种以上单独调制,但可以根据需要适宜配合通常在包含准药品的化妆品、医药品等皮肤外用剂中使用成分,例如油分、表面活性剂、粉末、着色剂、水、醇类、增稠剂、螯合剂、硅氧烷类、抗氧化剂、紫外线吸收剂、保湿剂、香料、各种药效成分、防腐剂、pH值调节剂、中和剂等。

[0068] 对本发明的博来霉素水解酶产生促进剂的剂型不特别限定,可采取例如,溶液系、可溶化系、乳化系、粉末分散系、水-油双层系、水-油-粉末三层系、软膏、凝胶、气雾剂等任意剂型。另外,对使用形态也不特别限定,可采取例如,化妆水、乳液、霜、精华、胶冻剂、凝胶、软膏、面膜(pack)、面膜(mask)、粉底等任意形态。

[0069] 本发明的博来霉素水解酶产生促进剂通过应用于肌肤,可以在用于实现干燥肌肤的预防和/或改善的美容方法中利用。对所述美容方法中的本发明的博来霉素水解酶产生促进剂的用法、用量也不特别限定,可以根据剂型和/或处置的肌肤的皱纹的状态来适宜确定,典型地为每天数次、例如1次~5次,适量、例如每1平方cm² 0.1ml~1ml,可以直接擦在肌肤上,还可以使其适量浸入纱布等中之后贴合在肌肤上。

[0070] 以下,列举具体例更具体地说明本发明。另外,本发明不受这些具体例限定。

[0071] 实施例

[0072] 本实验中使用了以下材料。

[0073] 钙蛋白酶I从EMD Bioscience社购入。博来霉素水解酶从人表皮角质层按照非专利文献5来制作。人IL-4和IFN- γ 从PEPROTECH EC(London,England)购入。人IL-13和IL-17A/F为R&D SYSTEM(MINNEAPOLIS,MN)制。由Bachem Bioscience(Bubendorf,Switzerland)获得瓜氨酸4-甲基香豆酰-7-酰胺(Cit-MCA)。所使用的其他全部化学物质均为试剂级。

[0074] 角质形成细胞的培养

[0075] 将来自新生儿期表皮的正常人表皮角质形成细胞(Kurabo,Osaka,Japan)在包含低浓度(0.03mM)的钙和HKGS Growth Supplement(Cascade Biologics)的EpiLife培养基(Cascade Biologics,Portland,OR)中培养。对全部的细胞一边加入5%的CO₂一边在37℃孵育,然后传代4代以内使用。在汇合70%、汇合100%、汇合2天后和在2mM的钙中汇合2天后

采集角质形成细胞。

[0076] 实验1

[0077] 考虑博来霉素水解酶在NMF产生的最终阶段起作用。在该情况下,可能在干燥肌肤中本酶的表达降低。本实验中,对于皮肤中的博来霉素水解酶的表达和/或活性的降低是否与干燥肌肤相关进行了研究。

[0078] 通过在腕的皮肤表面粘贴透明胶带(セロテープ(注册商标)(NICHIBAN))之后剥离的胶带剥离,来采集皮肤角质层样品。裁切附着有皮肤角质层的该胶带,浸渍在提取缓冲液(0.1M Tris-HCl (pH值8.0), 0.14M NaCl, 0.1% Tween-20, 1ml)中,进行超声波处理(20秒×4),制成角质层提取液。将该提取液进行蛋白质印迹。所用的抗博来霉素水解酶(BH)抗体使用由镰田等(Journal of Biological Chemistry 2009)制作的抗体。具体而言,将角质层提取液进行SDS电泳后,转印至Immobilon-P(Millipore社),将该被转印的膜洗涤后,与抗BH抗体在室温反应1小时。再通过洗涤除去抗体后,与HRP结合二抗反应。洗涤后,将通过ECL Plus Western Blotting Detection Kit(GE Healthcare)而发光的BH蛋白带印相于X射线膜,通过带的浓淡来推定表达量。将结果示于图1和图2中。

[0079] 图1中,样品1是本人自己认为是干燥肌肤的人的皮肤角质层样品,样品2是认为不是干燥肌肤的健康学生的皮肤角质层样品。此外,图2中的样品T和A来自不感觉干燥的受试者,样品N来自感觉略干燥的受试者,并且样品M来自感觉干燥的受试者。样品1中的博来霉素水解酶的表达量少,另一方面,样品2中的该酶表达量多。由该结果可知,样品1、2分别来自干燥肌肤、湿润肌肤。此外,由使用了样品1的结果可知,在干燥肌肤中,越接近作为NMF产生场所的表皮表面,博来霉素水解酶量越低。图2中,样品T和A表示由不特别感觉干燥的样品得到的提取液的蛋白质印迹图像,样品N和M表示由强烈意识到干燥的样品得到的提取液的蛋白质印迹图像。

[0080] 实验2

[0081] 本实验中,对于人皮肤中的博来霉素水解酶的量、活性的个体差异和该酶量与活性的相关进行了研究。按照实验1中记载的方法,由20~25岁的40名女学生的腕的皮肤制成角质层提取液。按照Kamata等(J.Biol.Chem., Vol.284, Issue 19, 12829-12836, May 8, 2009)的方法测定该提取液中的博来霉素水解酶量及其酶活性。表达量通过蛋白质印迹进行评价,并且关于酶活性,通过测定作为荧光底物的Cit-β-NA的分解量来对该酶的氨肽酶活性进行评价。将结果示于图3,并且将其相关图示于图4。正如由图4的结果明确的那样,博来霉素水解酶量与其活性之间存在相关关系。

[0082] 接下来,对于上述角质层提取液,关于博来霉素水解酶和各种皮肤参数进行了统计学分析。本实验中,将40人的角质层提取液分成以下2种。在用光密度计将由蛋白质印迹的结果明确了博来霉素水解酶量进行了数值化,然后以1作为任意单位而表示的情况下,博来霉素水解酶量小于10并且该酶的活性小于1.5nmol/分钟/ml的提取液:博来霉素水解酶的蛋白质量少,并且活性低的提取液(BH low);除此以外的提取液:蛋白质量多,并且活性高的提取液(BH high)。

[0083] 游离氨基酸按照Kamata等(J.Biol.Chem., Vol.284, Issue 19, 12829-12836, May 8, 2009)的方法进行测定。具体而言,使以钙蛋白酶I分解后的丝聚蛋白肽与各提取液反应,使用荧光胺来定量氨基,从而测定游离氨基酸量。将游离氨基酸的测定结果示于图5A。图5A

中的纵轴的单位表示测定样品3ml中的总游离氨基酸量(nmol)。

[0084] 关于博来霉素水解酶的活性,如上所述,通过测定作为荧光底物的Cit- β -NA的分解量来评价该酶的氨肽酶活性。将博来霉素水解酶活性的测定结果示于图5B。图5B中的纵轴的单位表示Cit- β -NA的分解量(nmol/分钟/ml)。

[0085] 上述学生的皮肤的TEWL使用Vapometer(经皮水分流失TEWL测量仪)(Delfin Technologies,Ltd,Finland)进行测定,作为g/m²/小时而表示。将TEWL的测定结果示于图5C。

[0086] 如图5C所示,在博来霉素水解酶活性低的组(2.5U<)和高的组之间,角质层水分量存在有意义的差别。此外,在该酶的量与活性这两者都低的组中,游离氨基酸少,而且TEWL也高(图5A和5C)。

[0087] 虽然数据未显示,但在游离氨基酸低的组(1000<)和高的组之间,NMF、尿刊酸的量存在有意义的差别,而且在NMF低的组(0.8<)和高的组之间,尿刊酸存在有意义的差别。此外,在TEWL低的组(2.5<)和高的组之间,NMF、乳酸、脲存在有意义的差别。如果考虑到尿刊酸由丝聚蛋白中大量包含的组氨酸形成,则可知博来霉素水解酶在丝聚蛋白分解中是重要的。

[0088] 由本实验的结果可知,在博来霉素水解酶的绝对量少,的情况下,游离氨基酸量和屏障功能都显著降低。虽然数据未显示,但在使用了来自面颊的角质层提取液的情况下,也确认了博来霉素水解酶量与屏障功能的比例关系。

[0089] 实验3

[0090] 本实验中,基于图6所记载的流程图对上述女学生进行问卷调查,将各学生的肌肤分成湿润肌肤、干燥肌肤、干燥型油性肌肤、油性肌肤这4类。将问卷调查结果与上述实验2中测定的皮肤参数的结果的相关关系示于图7。由图7可知,分类成油性干燥肌肤的学生的博来霉素水解酶活性有意义地高。

[0091] 实验4

[0092] 本实验中,对于皮肤中的博来霉素水解酶与丝聚蛋白的局部存在进行研究。

[0093] 免疫组织化学染色

[0094] 免疫组织化学染色通过Kamata等(J.Biol.Chem.,Vol.284,Issue 19,12829-12836,May 8,2009)所记载的方法来进行。材料使用5 μ m厚的人皮肤的冷冻切片、以及抗大鼠BH IgG。具体而言,在知情同意的基础上,由东京医科大学的患有特应性皮炎的患者获得人皮肤标本。本研究被与伦理(Human Ethics)有关的东京医科大学设施内审查委员会和资生堂特别部会承认。

[0095] 将人特应性皮炎(病变皮肤与非病变皮肤)和正常皮肤的切片与抗大鼠BH IgG和抗人丝聚蛋白IgG一起在室温孵育1小时,然后,用PBS洗涤,然后与作为荧光结合二抗的Alexa Fluor 555或488(molecular Probes Inc.,Eugene,OR)一起进一步孵育。将DAPI(4',6'-二脒基-2-苯基吲哚;Molecular Probes)用于核的可视化。

[0096] 将正常皮肤的组织染色结果示于图8,然后将来自健常者的皮肤(正常皮肤)与来自特应性皮炎患者的皮肤(特应性皮炎部)的对比结果示于图9。如图8所示,博来霉素水解酶在表皮上层高表达,显示与丝聚蛋白同一的局部存在。另一方面,特应性皮炎部与正常皮肤相比,博来霉素水解酶和丝聚蛋白的表达低(图9)。

[0097] 定量PCR

[0098] 角质形成细胞中的博来霉素水解酶的表达量使用Light Cycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 按照以下方法通过定量PCR来测定。试剂使用Light Cycler FastStart DNA Master CYBR Green I。在SYBR Green I master mix 10 μ l中分别加入以下的博来霉素水解酶引物0.6 μ l、水6.8 μ l, 使总量为20 μ l, 以95 $^{\circ}$ C 15秒、55 $^{\circ}$ C 20秒、72 $^{\circ}$ C 20秒进行45个循环的PCR。所得的结果通过与作为持家基因的G3PDH的结果比较来进行校正。

[0099] 正向引物:TGTGGTTTGGCTGTGATGTT (序列号1)

[0100] 反向引物:GCACCATCCTGATCATCCTT (序列号2)

[0101] 将上述定量PCR的结果示于图10。如图10所示, 与80%汇合的角质形成细胞、即未分化的角质形成细胞相比, 在达到汇合即分化后的角质形成细胞中, 博来霉素水解酶高表达。换言之, 由本实验结果可知, 该酶在分化前的基底细胞中不太表达。该定量PCR的结果证实了上述组织染色的结果。

[0102] 实验5

[0103] 1) 使用了人表皮角质形成细胞的BH启动子的萤光素酶检测:

[0104] 在增殖期(约80%汇合)或分化后(汇合后, 曝露于空气, 添加2mM钙, 然后继续培养2天得到的)的角质形成细胞中加入裂解液(200 μ l, 使细胞溶解。测定中使用了Bright-Glo Luciferase assay System (Promega Co., Madison, WI, USA)。将样品20 μ l移至规定的管中, 使用Auto Lumat Plus (LB953) Berthold GmbH&Co. KG. Bad Wildbad Germany) 进行测定。由图12的结果可知, 为了博来霉素水解酶表达, 上述转录调控区只要具有从该酶的编码序列到至少216bp下游的区即可。

[0105] 2) 对NHEK的UV照射:

[0106] 照射30mJ或60mJ的UVB (Torex F120S-E-30/DMR, 20W, Toshiba Medical Supply), 在3小时后、24小时后、48小时后用规定的方法回收RNA, 通过定量PCR来测定博来霉素水解酶和钙蛋白酶的mRNA表达。测定的结果是, 30mJ照射后48小时回收的样品最高表达博来霉素水解酶的mRNA (图13)。

[0107] 3) 细胞因子对博来霉素表达的影响

[0108] 将IL-4 (终浓度:0.1、1.0、10ng/ml)、TNF α (终浓度:0.1、1.0、10ng/ml)、IFN γ (终浓度:1.0、10、100ng/ml) 分别添加至增殖期的培养角质形成细胞中, 孵育24小时后, 使用Isogen采集RNA。通过定量PCR来测定博来霉素水解酶的mRNA表达。将结果示于图14。由图14的结果可知, 作为Th2细胞因子的一种的白介素-4 (IL-4) 对博来霉素水解酶的表达进行减量调节。

[0109] 实验6

[0110] 人BH基因的特性确定

[0111] 1) BH的5' -旁侧区的克隆化

[0112] 基于人BH基因的核苷酸序列, 使用基因特异性引物1 (GSP1) 5' - tccctcgagtcctgtatcagagcagctaca-3' (序列号3) 和基因特异性引物2 (GSP2) 5' - tgaacacgcgtccgagctgctcatggcg-3' (序列号4), 按照制造商的操作说明书使用Genome Walker Kit (Clontech, Mountain View, CA) 对5' -旁侧区扩增。简而言之, 在5%的二甲亚砷

的存在下,使用Ex Taq DNA聚合酶(Takara,Shiga,Japan),使用制造商推荐的两步PCR方案:将94°C25秒、然后72°C4分钟进行7个循环,接着将94°C25秒、然后67°C4分钟进行32个循环,接着67°C4分钟进行最后的延伸,使用GSP1和接头引物(AP)1进行一次PCR。接下来,将一次PCR混合物进行稀释,然后作为使用了GSP2和AP2的二次PCR扩增的模板来使用。代替7个循环而使用5个循环的初次循环,接着代替32个循环而使用20个循环,除此以外,二次PCR与一次PCR相同。通过使用图15所列举的引物的PCR来产出BH的5'-旁侧区的连续5'-缺失突变株。扩增后,将全部PCR产物克隆化到pGEM-T简易载体(Promega,Madison,WI)内,然后使用ABI Prism 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems,Foster City,CA)进行序列确定。

[0113] 为了构建报告质粒pGL3-1216/+1,在以下条件下进行PCR:最初的变性94°C4分钟、将94°C30秒、60°C1分钟、72°C1分钟进行30个循环,接着最后延伸72°C4分钟,使用作为模板的pGEM-T-1216/+1以及包含限制位点Kpn I和Mlu I的1组特异性BH引物(5'-ccgggtaccatcagagttccttagaa-3'(序列号5)和5'-taaatacgcggttgccgcccacgctgccg-3'(序列号6))。将所得的PCR产物用Kpn I和Mlu I消化,然后克隆化到pGL3-Basic载体(Promega)内。另外,pGL3-Basic载体包含萤火虫萤光素酶基因。通过使用QIAGEN Plasmid Midi Kit(QIAGEN,Duesseldorf,Germany)来调制全部构建物。

[0114] 2) 定点诱变

[0115] 按照制造商的操作说明书,使用Quick change site-directed mutagenesis Kit(Stratagene,La Jolla,CA)来实施MZF-1、Sp-1和IRF-1/2结合部位的突变诱导。为了对Sp-1制作缺失变异,使用5'-ggaccccgtttcagcctccccgcc-3'(序列号7)(突变体Sp-1位点的正向引物)和5'-ggcggggaggctgaaacggggtcc-3'(序列号8)(突变体Sp-1位点的反向引物)。关于MZF-1突变体,使用5'-gactcagcaacgcggtttgtccctccgc-3'(序列号9)(突变体MZF-1位点的正向引物)和5'-gcggagggacaaaaccgcttgctgagtca-3'(序列号10)(突变体MZF-1位点的反向引物)。关于IRF-1/2突变体,使用5'-gccgccgagcctccggcgctcc-3'(序列号11)(突变体IRF-1/2位点的正向引物)和5'-ggagcgccggaggctcggcgcc-3'(序列号12)(IRF-1/2位点的反向引物)。

[0116] 3) 转染和启动子活性的计测

[0117] 将角质形成细胞以 5×10^4 细胞/孔的密度在12孔组织培养板内培养,然后使用FuGene HD Transfection试剂(Roche Diagnostics,Basel,Switzerland),使用各个构建物1 μ g进行转染。为了校正转染效率,在全部细胞中同时转染包含处于HSV-TK启动子控制下的海肾(Renilla)萤光素酶基因的pGL4.74[hRluc-TK]载体(Promega)。只要没有特别的限制,则在转染24小时后收集细胞,然后每1孔使用250 μ l的Passive裂解液(Promega)进行溶解。使用Dual Luciferase Reporter Assay System(Promega)和Autolumat plus luminometer(Berthold Technologies,Bad Wildbad,Germany)分析萤光素酶活性。将海肾萤光素酶活性,对于萤火虫萤光素酶活性进行标准化。关于各构建物,独立地实施3次转染,然后将结果作为平均值来表示。

[0118] 4) 实时定量RT-PCR分析

[0119] 通过实时定量RT-PCR来分析BH和相关因子的转录水平。按照制造商的操作说明书使用ISOGEN(Nippon Gene,Tokyo,Japan)从培养细胞提取总RNA。使用SuperScript(商标)

II (Invitrogen, Carlsbad, CA) 反转录成cDNA。按照制造商的操作说明书使用LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) 通过LightCycler raid cyclor系统来进行实时RT-PCR。关于所使用的引物的信息示于图16。使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为基准基因。通过由LightCycler分析软件得到的融解曲线的定量分析确认了扩增后的片段的特异性。将mRNA的量相对于GAPDH的mRNA进行标准化, 然后最终作为相对于未处理对照的mRNA的比来显示。

[0120] 5) IRF-1和IRF-2的基于siRNA的抑制

[0121] 按照制造商的操作说明书, 使用40nM的siIRF-1、siIRF-2和siControl A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 以及Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen, Carlsbad, CA) 来转染培养角质形成细胞。将该细胞在不含抗生素的培养基中培养24小时, 然后, 提取总RNA, 并且如上所述, 通过实时RT-PCR进行分析。

[0122] 6) 电泳迁移率变动分析 (EMSA)

[0123] 通过将单链生物素化寡核苷酸和单链未标记寡核苷酸进行退火来调制双链寡核苷酸探针 (图17)。通过使用Nuclear Extraction Kit和EMSA gel shift Kit (Panomics, Santa Clara, CA) 来进行核的提取和EMSA。将核提取物 (4 μ g) 与1 \times 结合缓冲液和1 μ g多聚d (I-C)、以及与MZF-1、Sp-1、IRF-1/2和GATA-1结合部位对应的生物素化探针 (50pmol) 一起在15 $^{\circ}$ C孵育30分钟。为了进行竞争分析, 将2倍过量的未标记探针在添加生物素化探针前加入至结合反应。接下来将这些孵育混合物与0.5 \times TBE缓冲液一起在8%的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 然后转印至Biodyne B尼龙膜 (Pall, Port Washington, NY)。通过使用EMSA gel shift Kit中的化学发光检测试剂将带可视化。

[0124] 7) 结果

[0125] 人BH基因启动子的分离和特性确定

[0126] 通过采用Genome Net MOTIF程序进行的检索, 明确了人BH的5' -旁侧区内的多数推定转录因子结合部位 (图18A)。特别是, 在靠近转录起始位点的位置的-216/+1区中, 存在与被MZF1、Sp-1、IRF-1/2和GATA-1/2识别的共有序列高度一致的序列, 因此启示这些转录因子与BH启动子活性的调节有关。为了更严密地确定BH的启动子区, 进行了缺失分析 (图18B)。在用pGL3-816进行了转染的分化型角质形成细胞中检测到了最高水平的萤光素酶活性。然而, 缺失质粒的相对萤光素酶活性高地残留直到缺失进入pGL3-216为止。在构建体中, 包含 (表示成pGL3-444) 片段-444/+1的质粒在培养角质形成细胞中显示有意义地低的活性, 启示-616/-444区中的上游抑制基因活性的存在。这些结果证实了-216/-1区包含用于BH基因转录的最小启动子, 因此将其核苷酸序列示于图18C。该序列未包含TATA-盒或CCAAT-盒, 因此启示该基因的持家性质。另一方面, 若干转录因子结合部位, 例如MZF-1、Sp-1、IRF-1/2和GATA-1/2等存在于该核心启动子区。

[0127] 参与BH基因调节的潜在性顺式元件的鉴定

[0128] 为了确定参与BH基因表达的转录调节的最小启动子的潜在性顺式元件, 构建了以各顺式元件作为靶标的一系列缺失突变株。在MZF-1、Sp-1和IRF-1/2的结合部位缺失的情况下, 启动子活性被大幅减量调节 (图19A)。

[0129] 此外, 调查了这些转录因子是否分别可以与推定结合部位实际结合。因此, 使用来自培养角质形成细胞的核提取物以及包含MZF-1、Sp-1、GATA-1或IRF-1/2结合部位的生物

素化双链寡核苷酸探针来进行电泳迁移率变动分析(EMSA)。如图19B所示,Sp-1、MZF-1和IRF1/2与BH启动子的对应靶标部位结合,但GATA-1/2不结合。这些结果显示出-216~-105bp的启动子区的这些结合部位在用于BH转录的顺式元件中是不可缺少的。

[0130] BH基因表达的细胞因子介导的调节

[0131] BH是NMF产生酶,因此也可能与AD的病态生理有关。因此,调查了Th1、Th2和Th17细胞因子对BH基因表达的效果。图20A显示,在增殖型角质形成细胞中,作为Th1细胞因子的IFN- γ 以用量依赖方式对BH mRNA表达进行减量调节。另一方面,Th2和Th17细胞因子对BH的表达完全不显示有意义的效果。由分化型角质形成细胞得到同样的结果(数据未登载)。为了阐明IFN- γ 在BH基因表达的调节中的作用,进行启动子分析,特定细胞因子应答要素。如图20B所示,在用-131~-120之间包含IRF-1/2结合序列的pGL3-BH-616转染后的培养角质形成细胞中,IFN- γ 对BH启动子活性进行减量调节。该序列缺失后,IFN- γ 也不再抑制启动子活性(图20B)。此外,为了判断IRF-1/2是否是BH的IFN- γ 诱导性减量调节的必须介质,使用小干扰RNA(siRNA)来抑制IRF-1和IRF-2基因表达。IFN- γ 的活性在用IRF-1或IRF-2的siRNA(40nM)的任一者转染后的培养角质形成细胞中有意地被抑制(图20C)。这些结果强烈启示,IRF-1/2结合序列对于BH基因表达的IFN- γ 诱导性减量调节是不可缺少的。

[0132] 培养角质形成细胞中的BH和相关因子的表达

[0133] 为了调查表皮中的转录调节的机制,通过实时PCR法来分析增殖型或分化型细胞中的BH、钙蛋白酶I和推定转录因子的表达。如图21A所示,与例如增殖型角质形成细胞相比,如汇合期的2天后(3.6倍)和以高钙浓度培养后(8.6倍)等那样,BH mRNA在分化型角质形成细胞中被增量调节。这些结果与启动子分析数据一致(图18B)。关于钙蛋白酶I(约2.5倍的增量调节)也得到同样的结果。此外,在培养角质形成细胞中,研究了各种转录因子例如MZF-1、Sp-1、GATA-1、IRF-1和IRF-2等的表达谱。如图21B所示,这些转录因子沿着BH的表达而在分化型角质形成细胞中被增量调节。然而,GATA-1mRNA表达与其它因子相比有意义地低($<1/32$)。可以认为GATA-1在角质形成细胞中并未承担重要的作用。因此启示BH介由MZF-1和Sp-1以分化依赖方式被合成。IRF-1和IRF-2还通过分化刺激被增量调节的事实,显示出BH表达对IFN- γ 为非常敏感性。

[0134] Th1和Th2细胞因子对推定转录因子的表达的效果

[0135] 对于这些转录因子的细胞因子依赖性调节进一步进行调查。图22A显示IFN- γ 以用量依赖的方式对IRF-1mRNA表达进行强烈的增量调节。同样地,IRF-2表达在IFN- γ 的存在下被增量调节。对比之下,IRF-1和IRF-2的表达仅在100ng/ml的IL-4存在下被有意义地增强(图22B)。有趣的是,MZF-1和Sp-1都在10ng/ml的IL-4存在下最有效地被减量调节(图22C)。这些结果启示,BH表达分别直接和间接地通过Th1和Th2细胞因子被调节。

[0136] 特应性皮炎皮肤中BH被减量调节

[0137] FLG的功能丧失型突变与AD的发病机制相关,但可能不仅基因缺损,而且分解途径的障碍也与AD的病理相关。因此,接下来研究AD患者的病变皮肤和非病变皮肤中的BH和丝聚蛋白的局部存在以及BH活性。对于正常表皮,用抗BH抗体和抗丝聚蛋白抗体的双重染色显示,在上面表皮中,特别是如先前所报告的那样在颗粒层中,BH和丝聚蛋白同时局部存在(图23A)。在更高的倍率下明确显示,BH从颗粒层至角化层局部存在,另一方面,丝聚蛋白被限定在颗粒细胞中。对比之下,BH表达在该研究中诊察的AD患者(n=7)的病变皮肤和非病

变皮肤中急剧减少。虽然全部这些患者通常检测到有意义的染色,但是显示比较弱的丝聚蛋白染色(图23A)。除了免疫组织化学以外,在来自18个AD患者和30个健康志愿者得到的胶带剥离样品的角质细胞提取物中计测BH活性。来自AD患者的病变皮肤和非病变皮肤的提取物与来自健康常人的相比,显示(分别低至27.1和8.8%)实质上低的BH活性(图23B)。这些结果证实,BH与丝聚蛋白同时局部存在化,而且其活性在患有AD的患者的皮肤中急剧降低。

[0138] 考察

[0139] 该研究中,通过启动子区的克隆化和功能的特征化研究了BH基因表达的调节机制。启动子分析中,在-216bp上游中鉴定出对BH启动子活性而言重要的区(图18B)。该区中,推定MZF-1和Sp-1结合部位对BH启动子活性显示有意义的效果(图18C和19A)。有趣的是,报告了Sp-1和MZF-1也参与作为对于丝聚蛋白分解的开始而言重要的酶的PAD1的调节。Sp-1为在哺乳动物细胞中作为转录因子起作用的锌指蛋白质Sp/Kruppel样家族的典型成员。认为参与包含增殖、凋亡、分化和肿瘤性转化的细胞功能的几乎全部方面。在人表皮中,Sp-1是包含套膜蛋白(involucrin)、兜甲蛋白(loricrin)、谷氨酰胺转氨酶、PAD1、2和3的基因在内的参加表皮分化的基因的重要调节因子。MZF-1是属于锌指蛋白质Krupple家族的转录因子,在分化全能性造血性细胞以及骨髓祖细胞中表达。然而,在哺乳动物表皮中的转录调节中的MZF-1的功能并未被报告。与增殖型角质形成细胞相比,发现在分化型角质形成细胞中使MZF-1和Sp-1以及BH同时增量调节(图21B),与持家的作用相比,还是显示分化中的BH的作用。我们的结果明确显示,这些转录因子作为用于角质形成细胞最终分化中的BH的基本转录调节的活化因子起作用。

[0140] 另一方面,顺式作用元件的调查进一步规定了该区内的IRF-1/2结合部位。使用EMSA,确认了IRFs对BH启动子区的直接结合(图19B)。该结合序列的定点诱变导致BH启动子活性的有意义的减少(图19A)。因此,IRF-1/2转录因子在基本条件下对于BH基因的最小启动子活性应该也是必要的。IRF家族是转录因子的群,迄今为止,9个IRF成员(IRF-1~9)在各种细胞型和组织中被鉴定。这些IRF分子在IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ 的刺激下在抗病毒防御、免疫应答/调节和细胞生长调节中发挥作用。IRF-1和IRF-2显示作为与大量的IFN- γ 诱导性基因的调节相关的激动剂-拮抗剂对发挥作用。有趣的是,IFN- γ 显著地抑制BH mRNA表达(图20A和B)。在敲低(knockdown)和定点诱变分析中,确认了IRF-1/2结合部位参与BH表达的IFN- γ 介导性抑制(图20B和C)。这些结果明确显示出,IRF-1/2为人角质形成细胞中的BH基因的IFN- γ 介导性减量调节的介质。另一方面,作为Th2细胞因子的IL-4和IL-13在24小时孵育期间完全不显示直接作用(图20A)。然而,这些Th2细胞因子有意义地抑制了作为激活分子的MZF-1和Sp-1的表达。因此,Th2细胞因子负调节BH表达是妥当的。

[0141] 此外,也显示BH在病变和非病变AD皮肤中急剧地被减量调节(图23A和B)。丝聚蛋白突变是AD等的屏障障碍相关疾病的主要危险因素,但在突变分析中,被指出爱尔兰的发生比例低于50%,此外日本的仅占~20%的比例。假定了不仅丝聚蛋白合成不全,而且丝聚蛋白的分解伤害也与屏障功能的崩溃相关。明确的是,NMF的减少导致干燥肌肤,这会促进屏障的崩溃。公知AD为Th2极化疾病。然而,最近的报告启示,Th1细胞因子也在AD中承担作用。例如,“内源性AD”的免疫学特征在于IL-4、IL-5和IL-13的低表达以及IFN- γ 的高表达。此外,从Th1向Th2的移动在AD皮肤中从急性相向慢性相之间发生。我们的结果显示出,在AD中,IFN- γ 可能承担比预想更重要的作用。

[0142] 作为结论,我们的结果显示出,人表皮中的BH转录以双重方式被调节。一个途径处于角质形成细胞最终分化的控制下,而另一途径依赖于Th1和Th2细胞因子。这些途径相互相关,因此平衡向着BH表达的减量调节容易地移动。BH的降低导致NMF的不足,由此引起干燥肌肤,或者进而引起屏障的崩溃。这些结果对BH调节和AD的发病机制提供了新的见解。

[0143] 实验7

[0144] 显示博来霉素水解酶产生促进效果的药剂·生药的筛选

[0145] 将来源于正常的包皮的人角质形成细胞(Cascade Biologics社、波特兰、马里兰州),在包含补充了表皮生长因子(0.1ng/ml)、胰岛素(10μg/ml)、氢化可的松(0.5μg/ml)、牛下垂体提取物(0.4%)、庆大霉素(50μg/ml)、两性霉素B(50ng/ml)的MCDB 153培养基的角质形成细胞增殖培养基中,在图24所示的各种生药提取物或药剂(5-50μg/ml)存在下,在室温培养24小时。作为对照使用0.1%1,3-丁二醇。

[0146] RT-PCR

[0147] 将从如上所述培养的人角质形成细胞分离出的总RNA(500ng)使用随机六聚体(Random Hexamer)和Superscript II RNase H-逆转录酶(Gibco-BRL社、葛底斯堡、马里兰州)进行逆转录后,使用Taq DNA聚合酶(Takara社、京都、日本国)和下述的引物进行PCR扩增。将94℃30秒、60℃1分钟、72℃1分钟这样的扩增循环进行40次。

[0148] 由图24的结果可知,与对照相比,缬丝花提取物(10μg/ml)、当归提取物(10μg/ml)、黄柏提取物(10μg/ml)、野芝麻提取物(10μg/ml)和迷迭香提取物(10μg/ml)等提取物、以及苯磺酰GABA(50μg/ml)、赤藓醇(50μg/ml)使博来霉素水解酶的表达有意义地增强。因此可知,这些提取均促进博来霉素水解酶的表达。在PCR中使用的引物如下。

[0149] 正向引物:5'-TGTGGTTTGGCTGTGATGTT-3'(序列号13)

[0150] 反向引物:5'-GCACCATCCTGATCATCCTT-3'(序列号14)

[0151] 另外,作为内部对照将GAPDH进行PCR扩增,使用的引物如下。

[0152] 正向引物:GGTGAAGGTCGGAGTCAACGATTTGGTCG(序列号15)

[0153] 反向引物:TATTGGAACATGTAAACCATGTAGTTGAGG(序列号16)。

序列表

	<110> 株式会社资生堂	
	<120> 博来霉素水解酶产生促进剂	
	<130> Z787-PCT	
	<150> JP2011-057126	
	<151> 2011.03.15	
	<160> 16	
	<170> PatentIn 版本 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0001]	<223> G3PDH 正向引物	
	<400> 1	
	tgtggtttgg ctgtgatgtt	20
	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> G3PDH 反向引物	
	<400> 2	
	gcaccatcct gatcatcctt	20
	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	BH 基因特异性引物 1	
	<400>	3	
		tccctcgagt ctgtatcaga gcagctaca	29
	<210>	4	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	BH 基因特异性引物 2	
	<400>	4	
		tgaacacgcg tccgagctgc tcatggcg	28
	<210>	5	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
[0002]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	含 Kpn 1 的 BH 特异性引物	
	<400>	5	
		ccgggtacca tcagagtcc ttagaa	26
	<210>	6	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	含 Mlu 1 的 BH 特异性引物	
	<400>	6	
		taaatacgcg ttggcgccca cgctgccg	28
	<210>	7	

<211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> Sp-1 位点正向引物

 <400> 7
 ggaccccggtt tcagcctccc cgcc 24

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> Sp-1 位点反向引物

 <400> 8
 ggcggggagg ctgaaacggg gtcc 24

[0003]

<210> 9
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> MZF-1 位点正向引物

 <400> 9
 gactcagcaa cgcggttttg tccctcgc 29

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> MZF-1 位点反向引物

 <400> 10

	gcggagggac aaaaccgcgt tgctgagtca	30
	<210> 11	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> IRF-1/2 位点正向引物	
	<400> 11	
	gccgccgagc ctccggcgct cc	22
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0004]	<223> IRF-1/2 位点反向引物	
	<400> 12	
	ggagcggccgg aggctcggcg gc	22
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> BH 的正向引物	
	<400> 13	
	tgtggtttgg ctgtgatgtt	20
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	BH 的反向引物	
	<400>	14	
		gcaccatcct gatcatcctt	20
	<210>	15	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	GAPDH 的正向引物	
[0005]	<400>	15	
		ggtgaaggtc ggagtcaacg gatttggtcg	30
	<210>	16	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	GAPDH 的反向引物	
	<400>	16	
		tattggaaca tgtaaaccat gtagttgagg	30

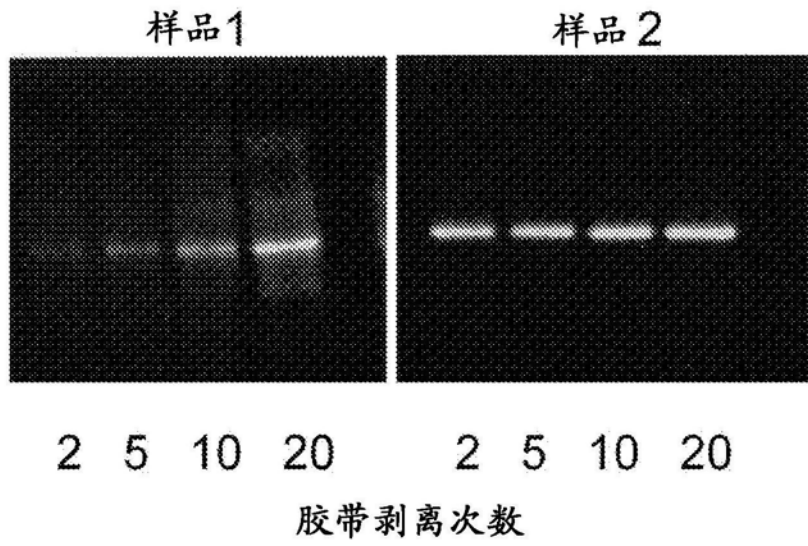
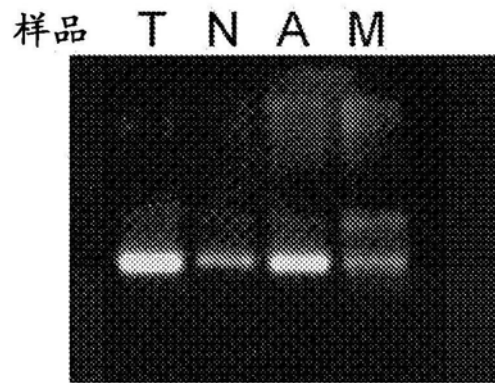


图1



T, A: 不感觉干燥,

N: 略干燥, M: 干燥

图2

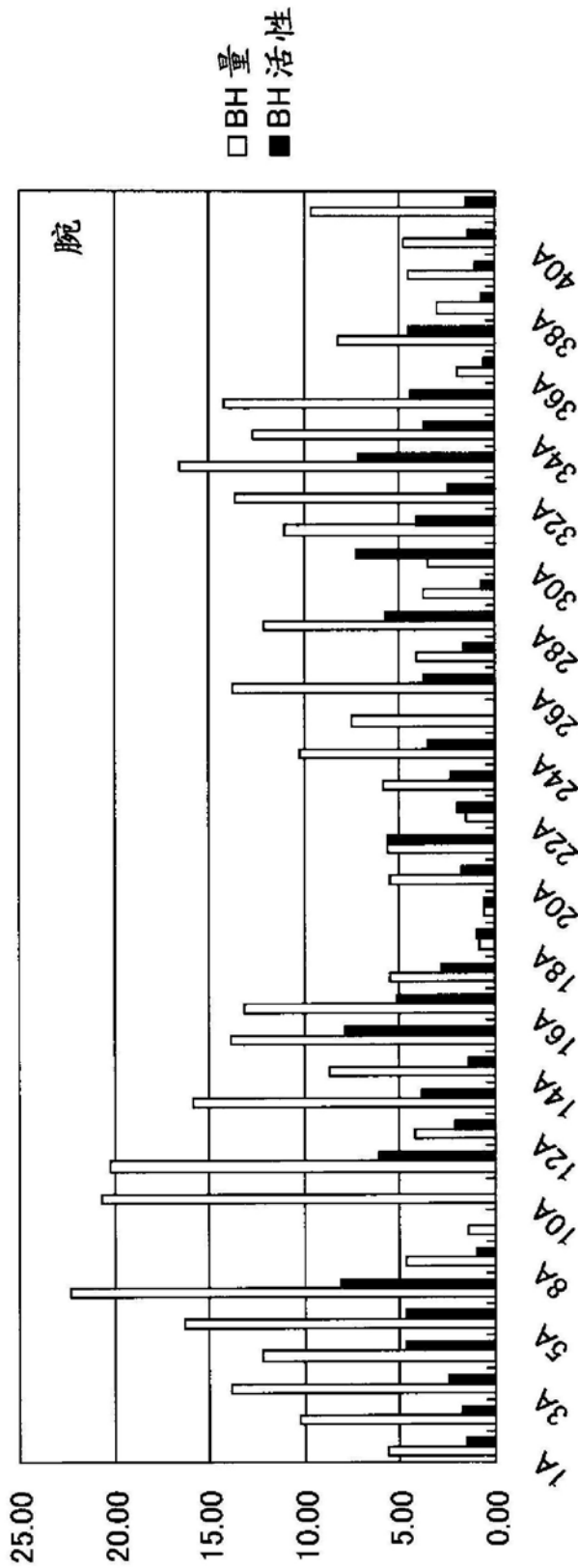


图3

$$y = 0.2264x + 0.9652$$

$$R^2 = 0.3294$$

Peason: $r=0.574$

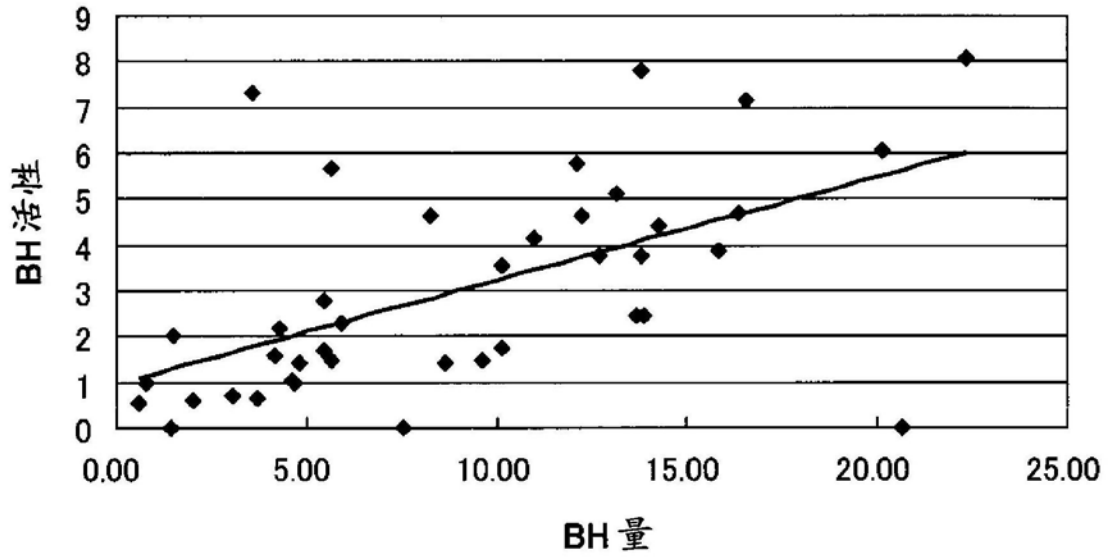


图4

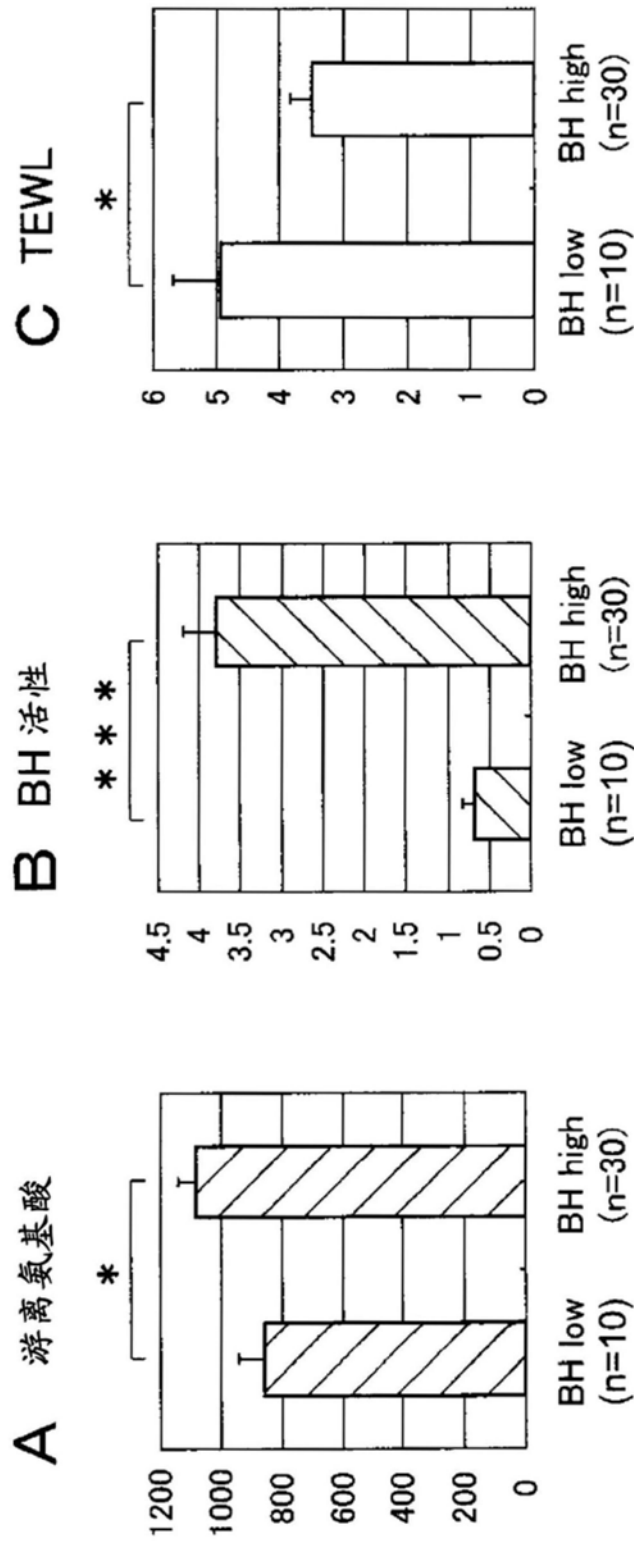


图5

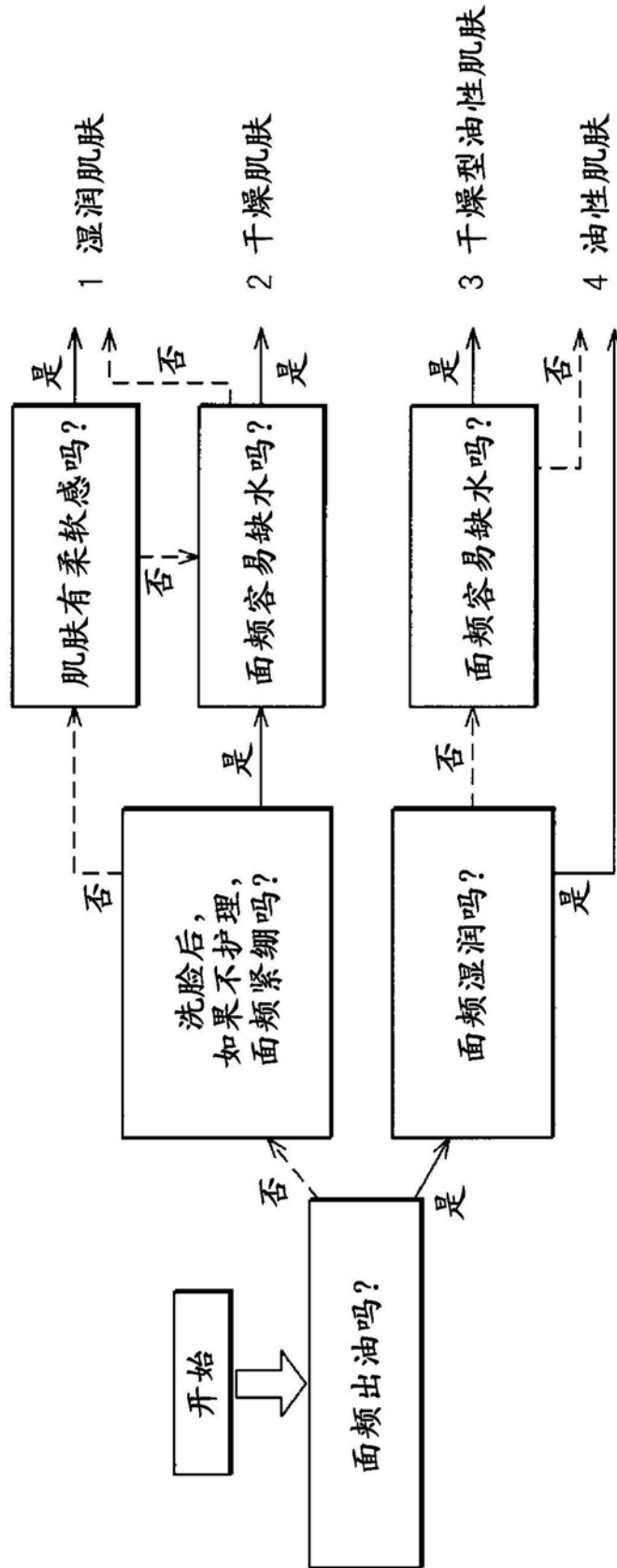


图6

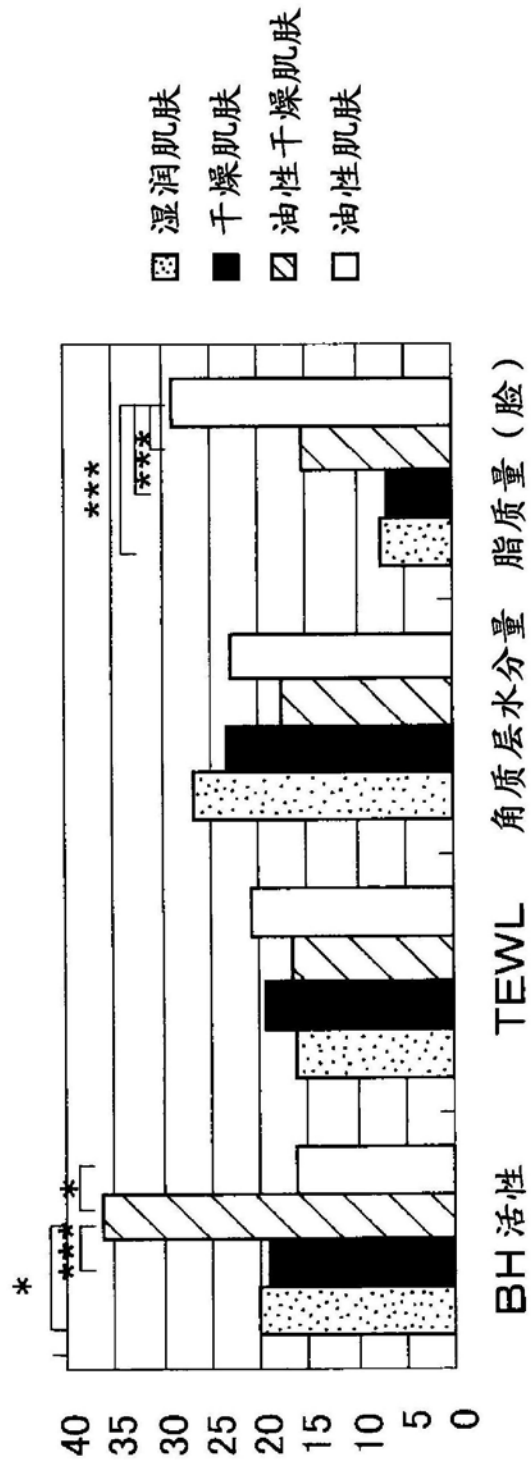


图7

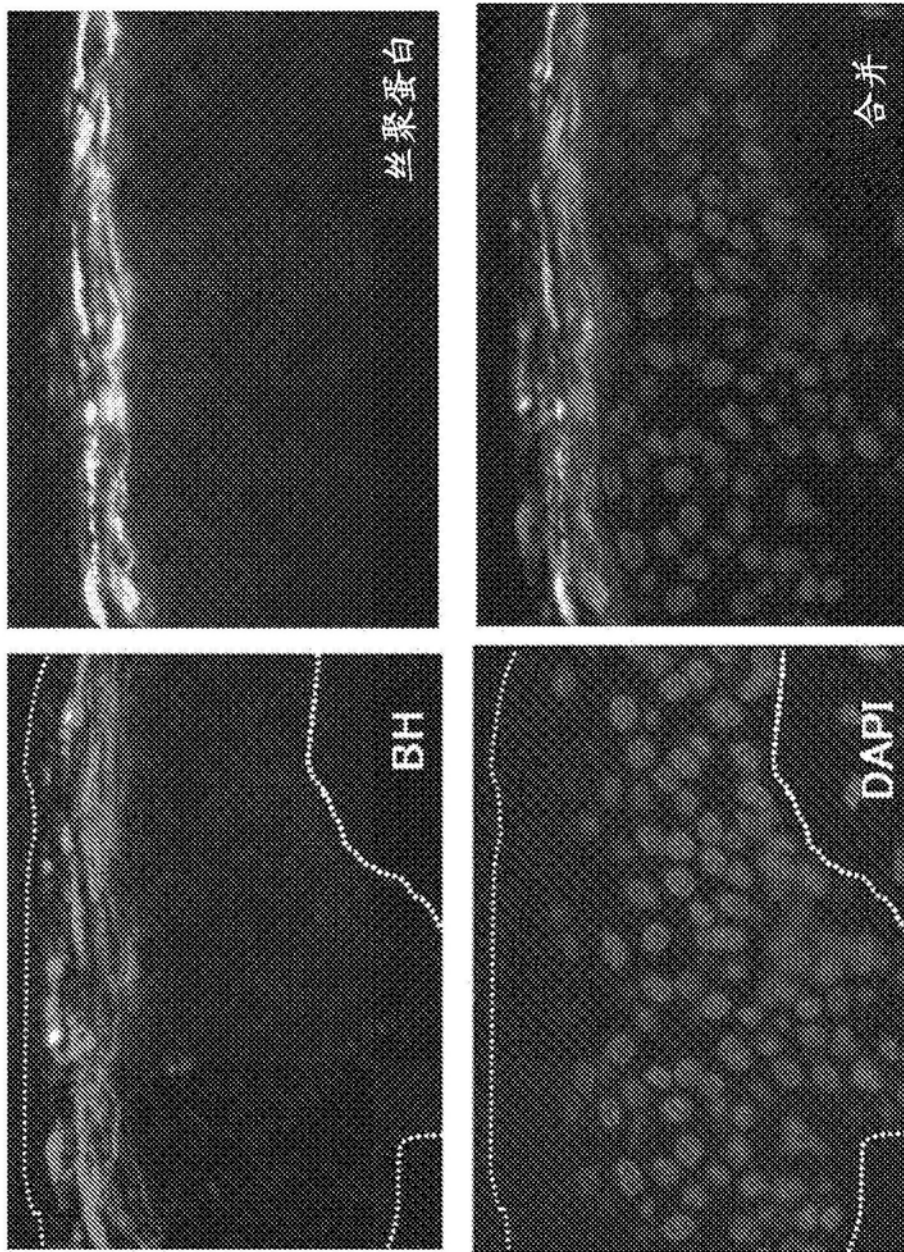


图8

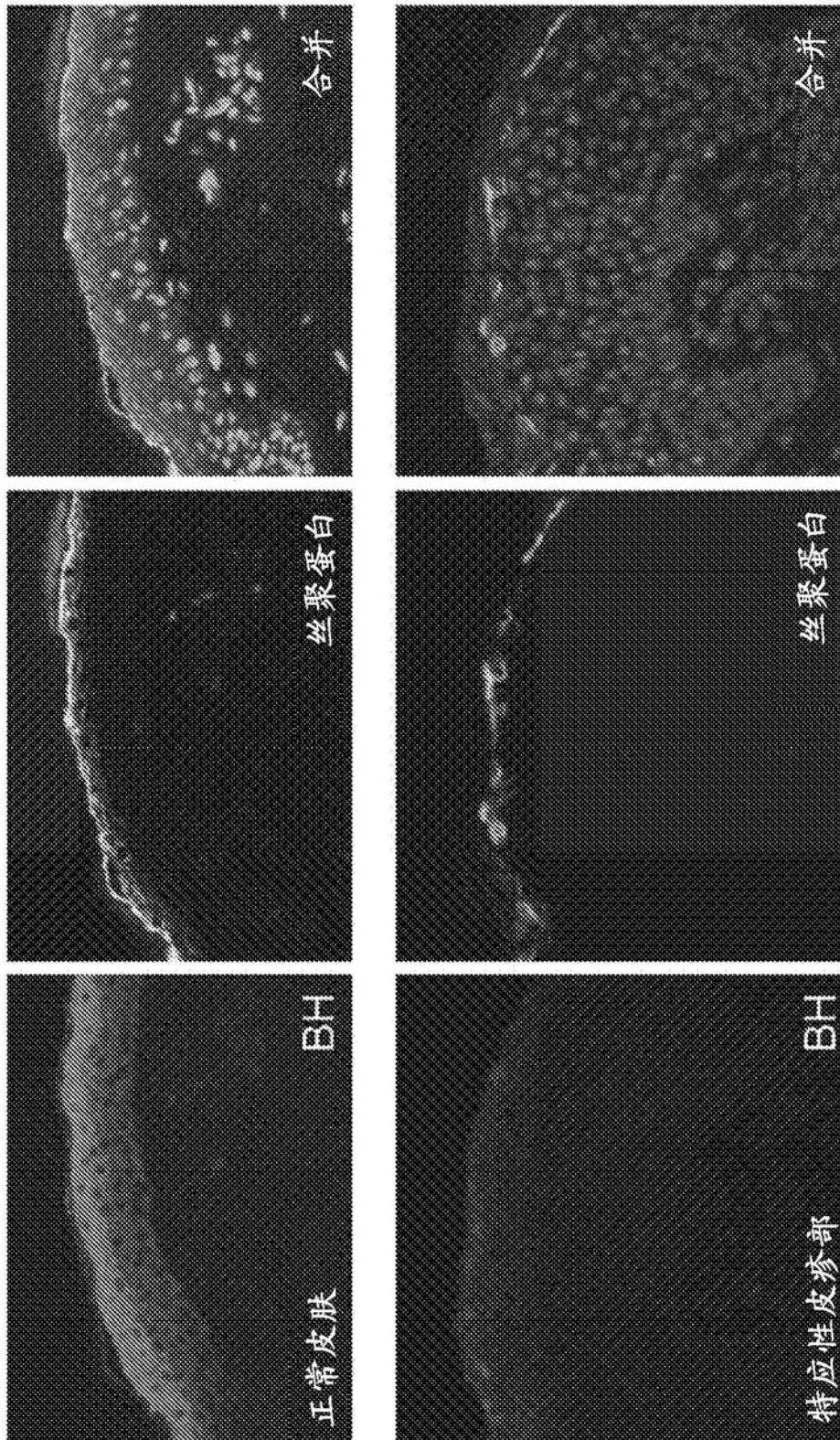


图9

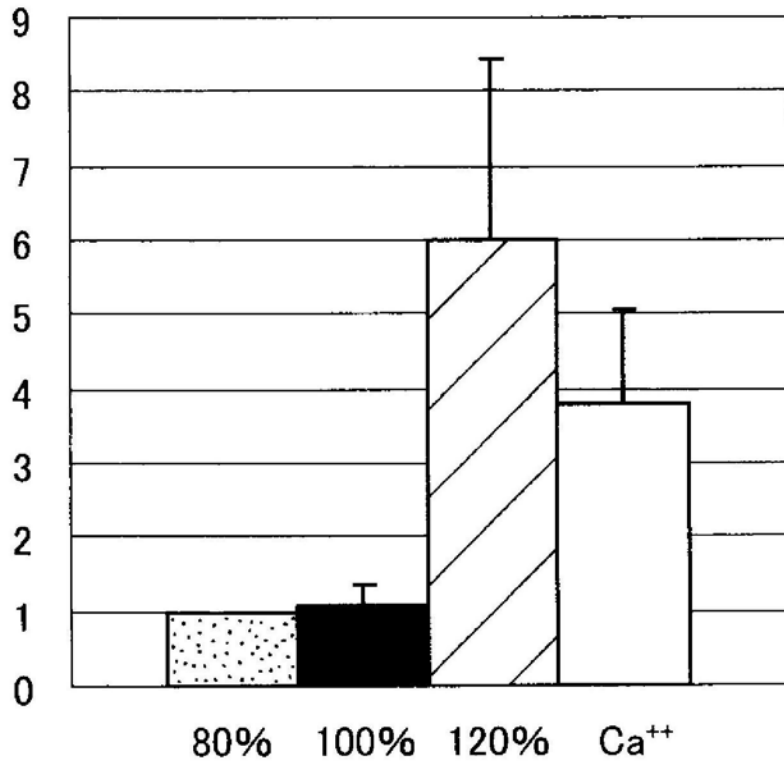


图10

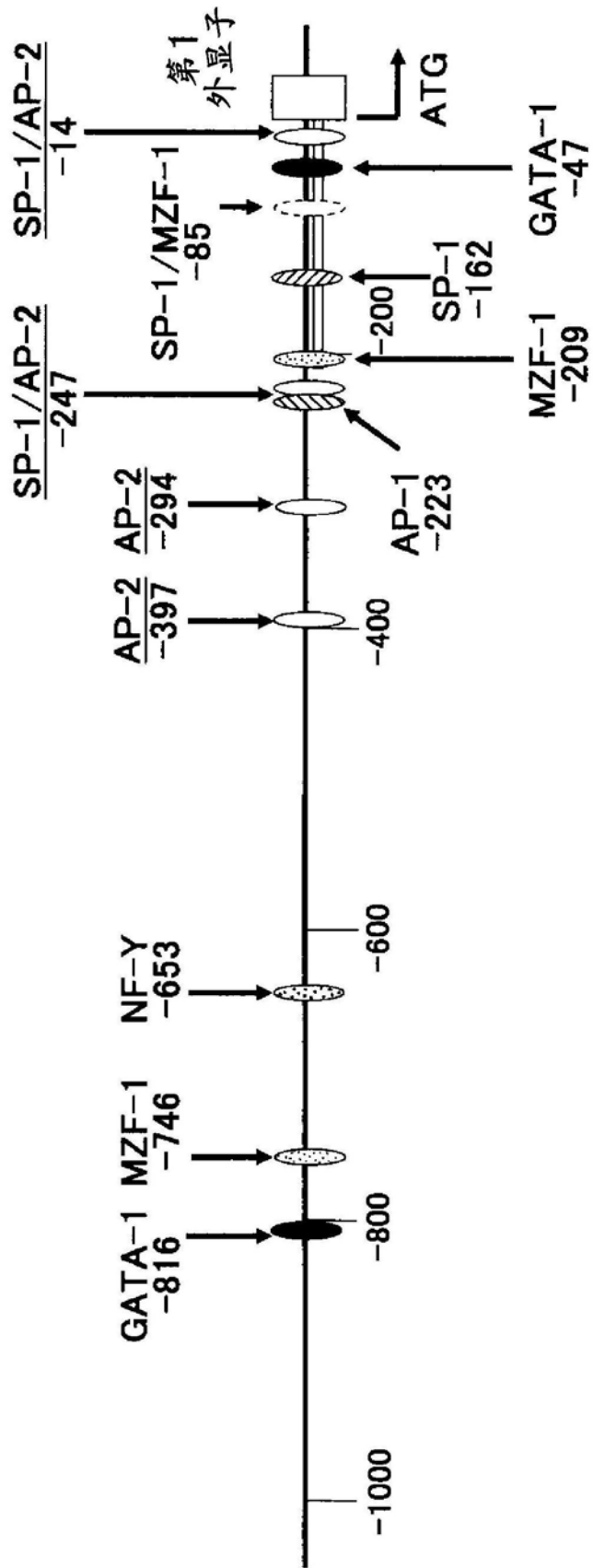


图11

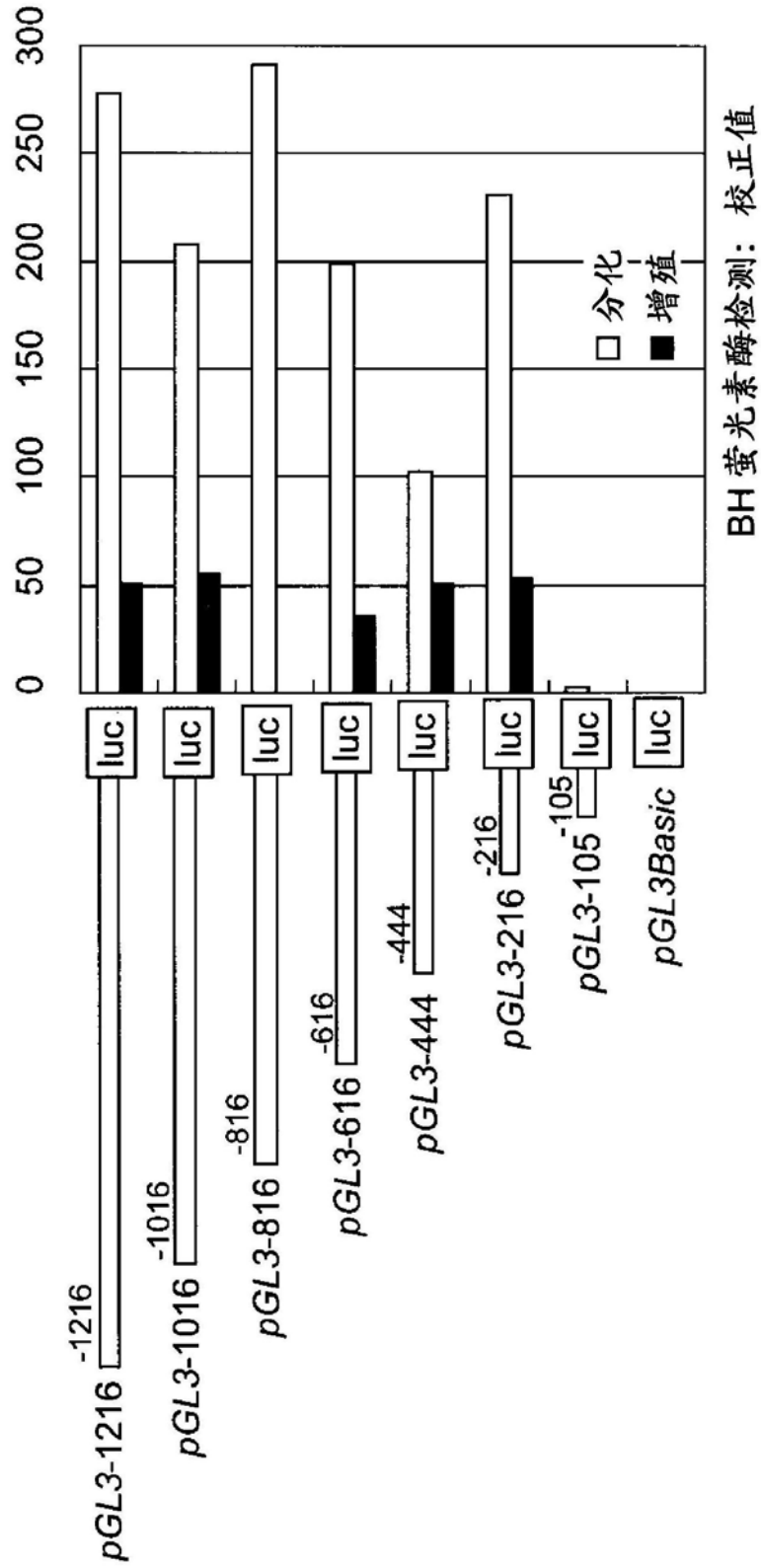


图12

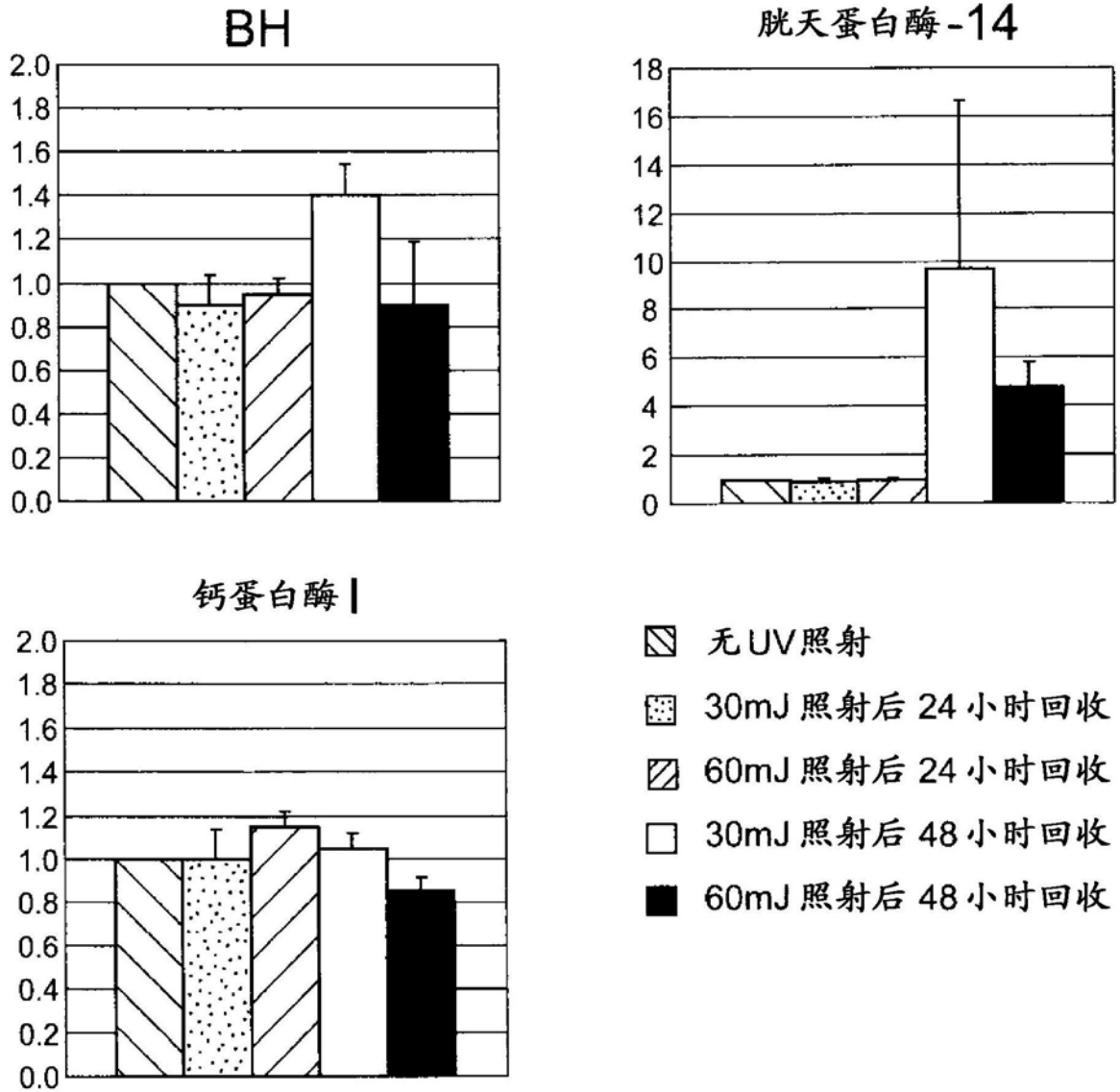


图13

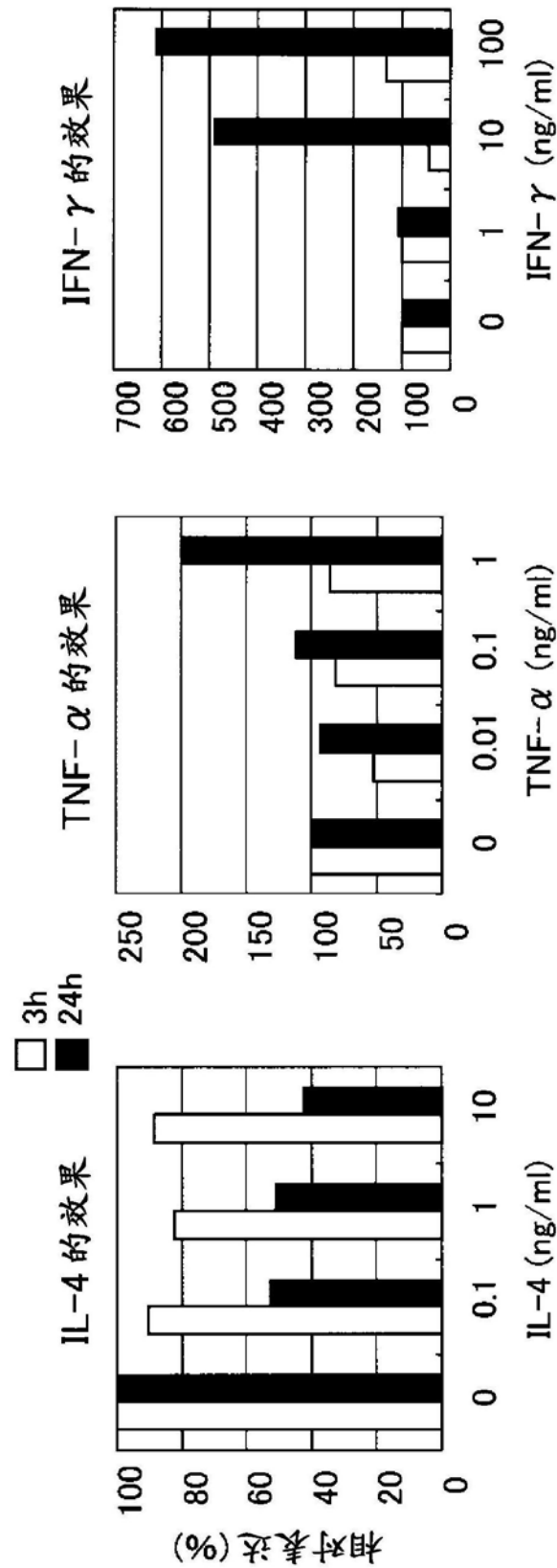


图14

名称	序列
BH-1216 KpnI (正向)	5' -CCGGGTACCATCAGAGTTCCTTAGAA-3'
BH-1016 KpnI (正向)	5' -CCGGGTACCCAAGGTTTTTACAATCT-3'
BH-816 KpnI (正向)	5' -CACGGTACCTGGGTTAGTGTTCCTTGAA - 3'
BH-616 KpnI (正向)	5' -CGAGGTACCTCCTTGTGACATATCGA - 3'
BH-444 KpnI (正向)	5' -AATGGTACCTTGGAGCGGGCCTGA - 3'
BH-216 KpnI (正向)	5' -AATGGTACCAGGGGGGAGTTTTGTCC - 3'
BH-171 KpnI (正向)	5' -AATGAAGGTACCTCAGCCTCCCCGCCG - 3'
BH-134 KpnI (正向)	5' -ACGGGTACCAGCCGGTTTCCTTTTTTC - 3'
BH-105 KpnI (正向)	5' -AATGGTACCTGCGAGAGACAGGTCG - 3'
BH+1 MluI (反向)	5' -TAAATACGCGTTGGCGCCCACGCTGCCG - 3'

图15

探针	序列
Sp-1	(正义) 5'-TCTCCCAGCCTCAGTCTCCAGCCTCAG-3' (反义) 5'-AGAGGGTCCGAGTCAGAGGGTCCGAGTC-3'
MZF-1	(正义) 5'-CGCGAGGGGGGAGTTCGAGGGGGGAGTTT-3' (反义) 5'-GCGCTCCCCCCTCAAGCTCCCCCCTCAA-3'
IRF-1/2	(正义) 5'-CCGGTTTTCTTTTTCGCGTTTTCTTTTTTC-3' (反义) 5'-GGCCAAAGGAAAAAGCGCCAAAGGAAAAAG-3'
GATA-1	(正义) 5'-GCAGCGCAATCCCGGCAGCGCAATCCCGGC-3' (反义) 5'-CGTCGCGTTAGGGCCGTCGCGTTAGGGCCG-3'

图16

基因	序列	退火
BH	(正向) 5'-TGTGGTTTGGCTGTGATGTT-3' (反向) 5'-GCACCATCCTGATCATCCTT-3'	55°C
Calpain-I	(正向) 5'-ACATGGAGGCCATCACTTTC-3' (反向) 5'-GGTCCACGTTGTTCCACTCT-3'	55°C
Sp-1	(正向) 5'-AGCGACCAAGATCACTCCAT-3' (反向) 5'-TGGGTGACTCAATTCTGCTG-3'	58°C
MZF-1	(正向) 5'-TAGAGCCCTTGCTCACGTTT-3' (反向) 5'-GGGCATTGTCTAGGTGGAAA-3'	58°C
IRF-1*	(正向) 5'-GAACTCCCTGCCAGATATCGAG-3' (反向) 5'-TGCTCTTAGCATCTCGGCTGGA-3'	58°C
IRF-2*	(正向) 5'-TGGATGCATGCGGCTAGA-3' (反向) 5'-CATCTGAAATTCGCCTTCC-3'	58°C
GATA-1	(正向) 5'-ATTGTCAGTAAACGGGCAGG-3' (反向) 5'-TCTGAATACCATCCTTCCGC-3'	58°C

图17

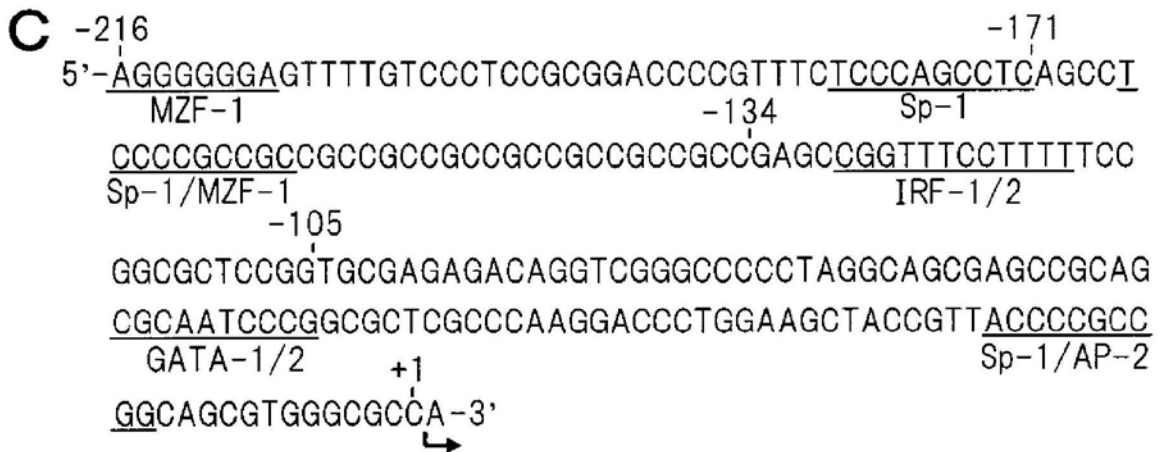
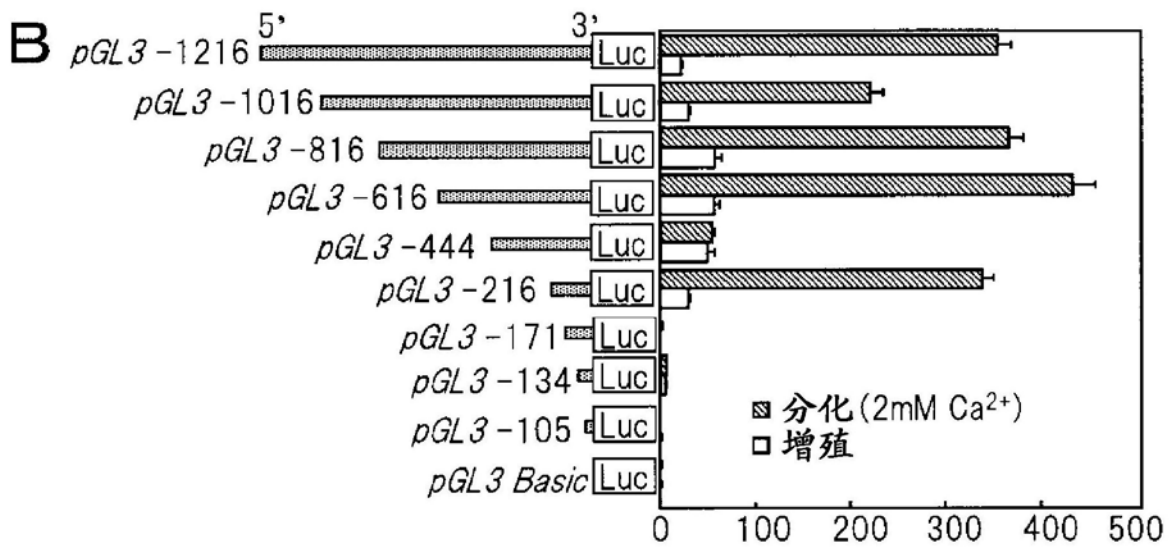
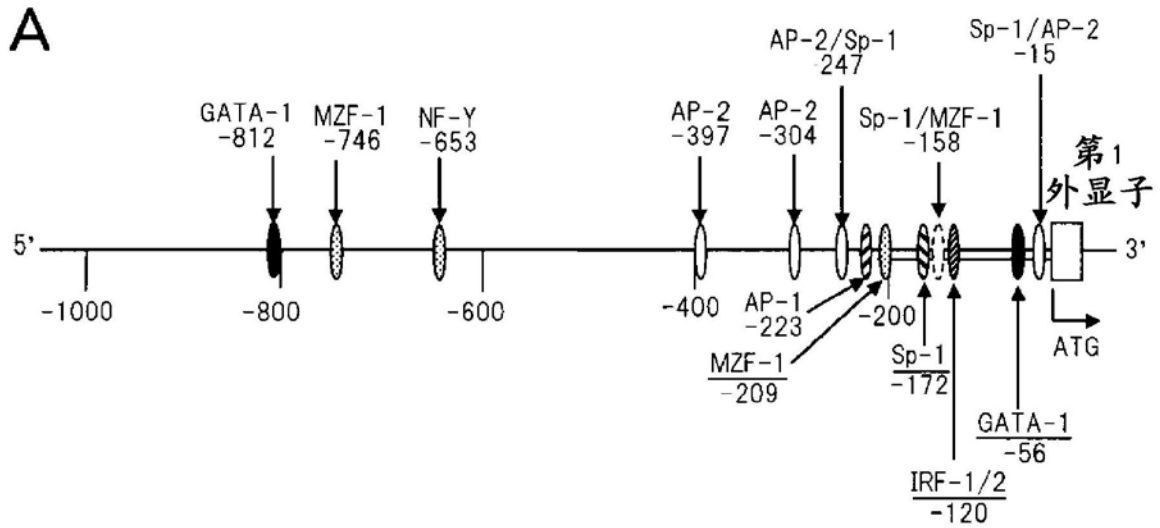


图18

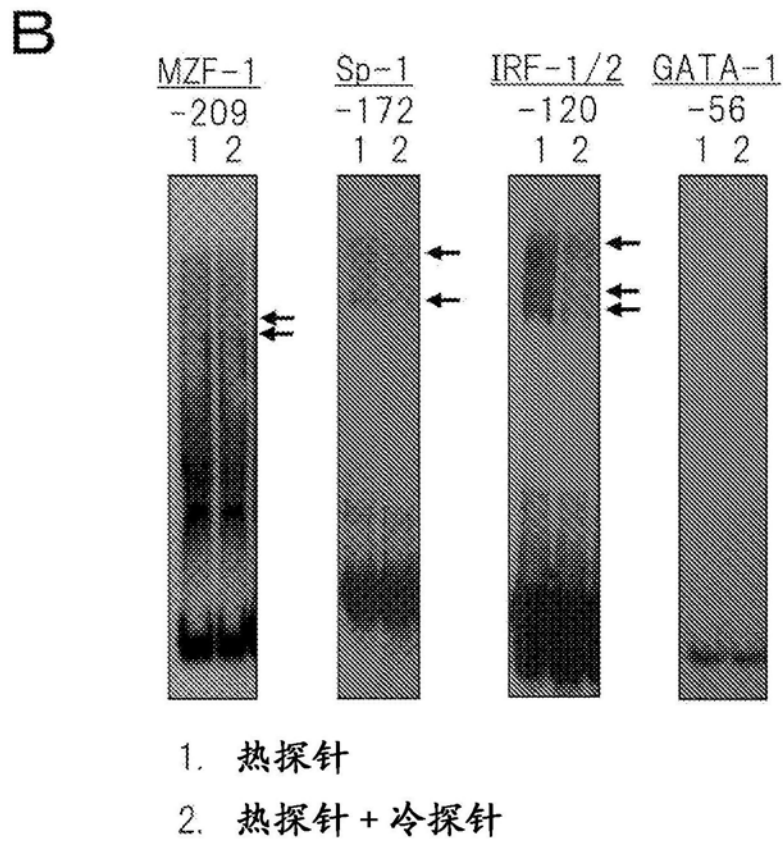
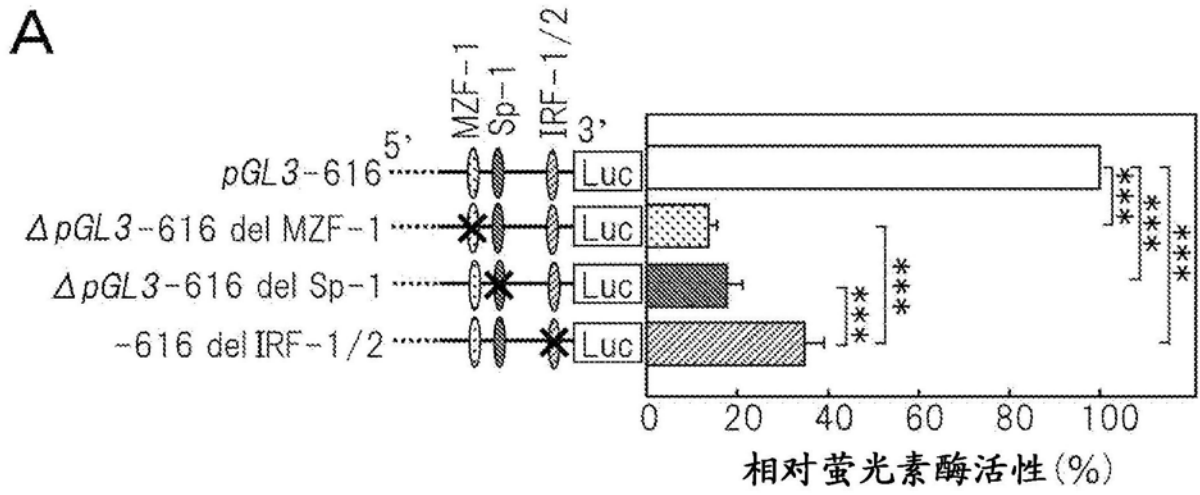


图19

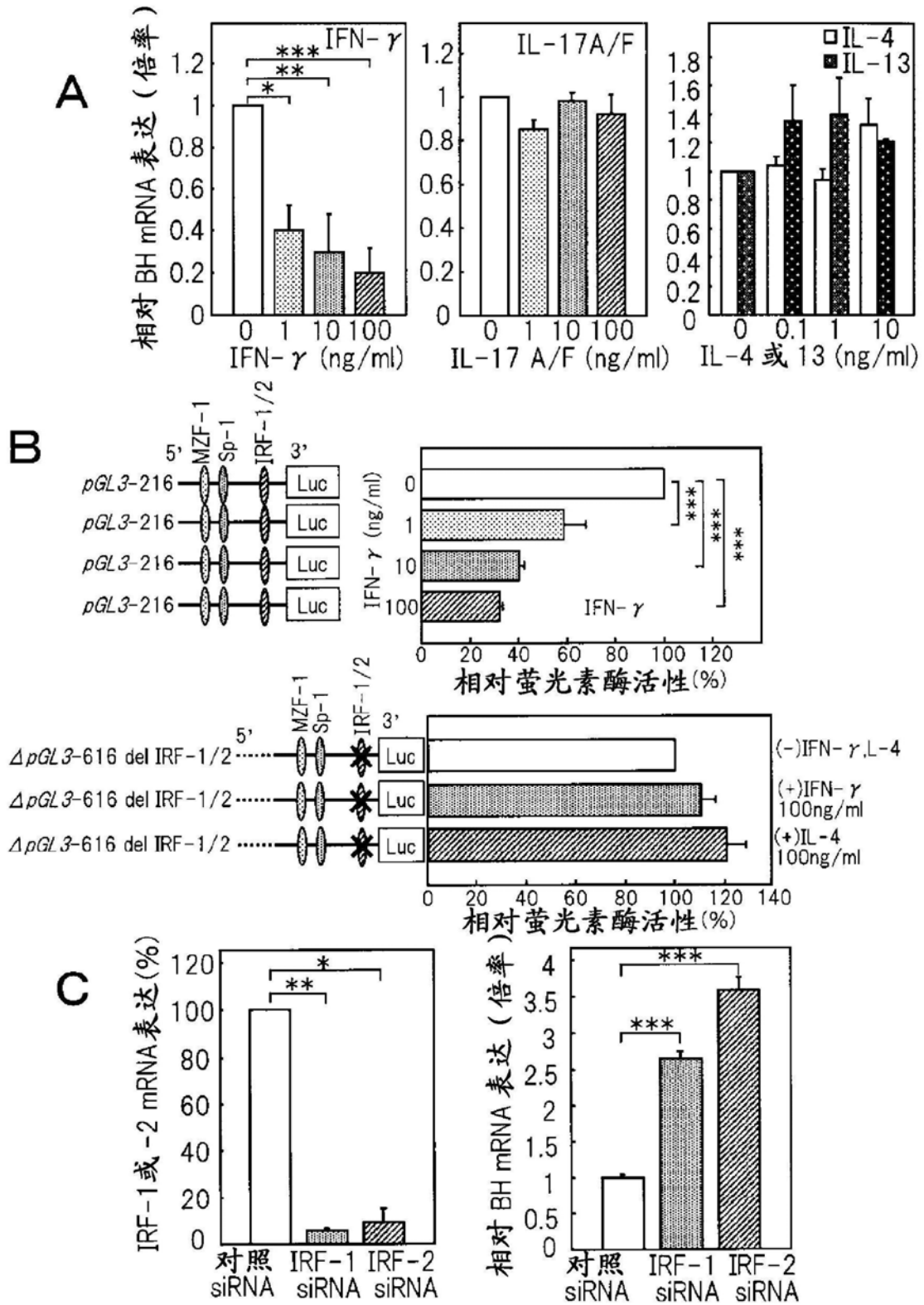


图20

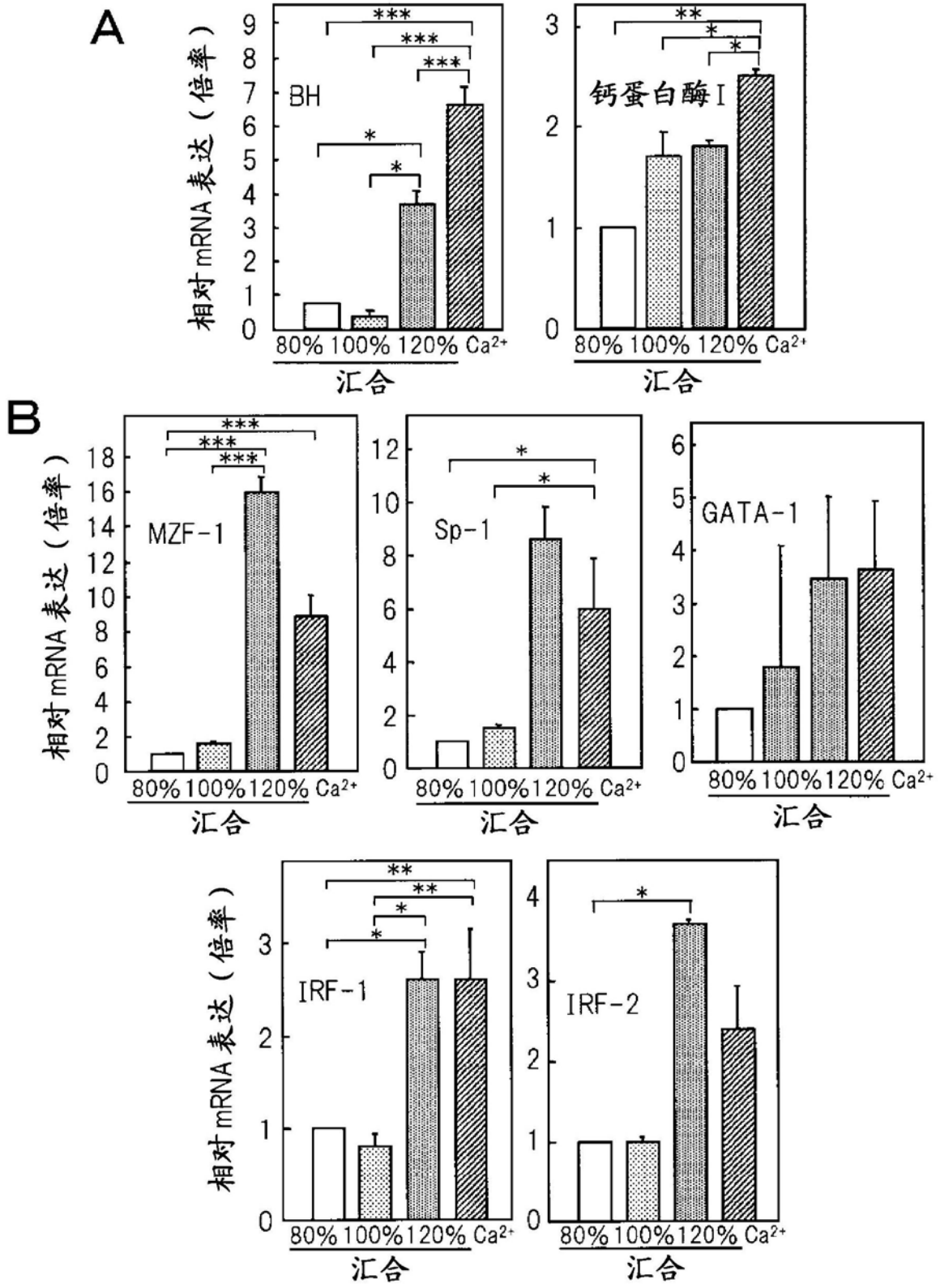


图21

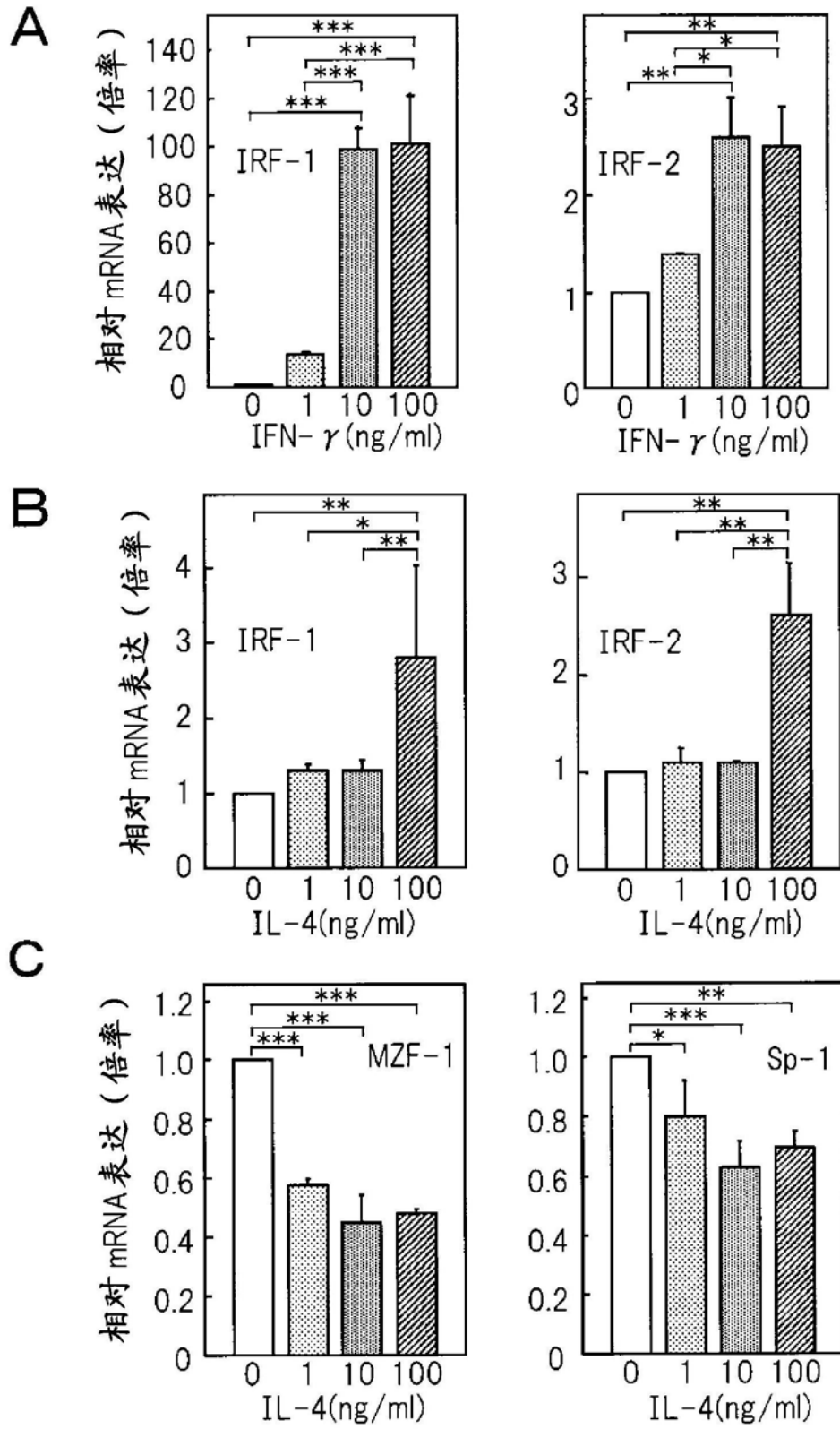


图22

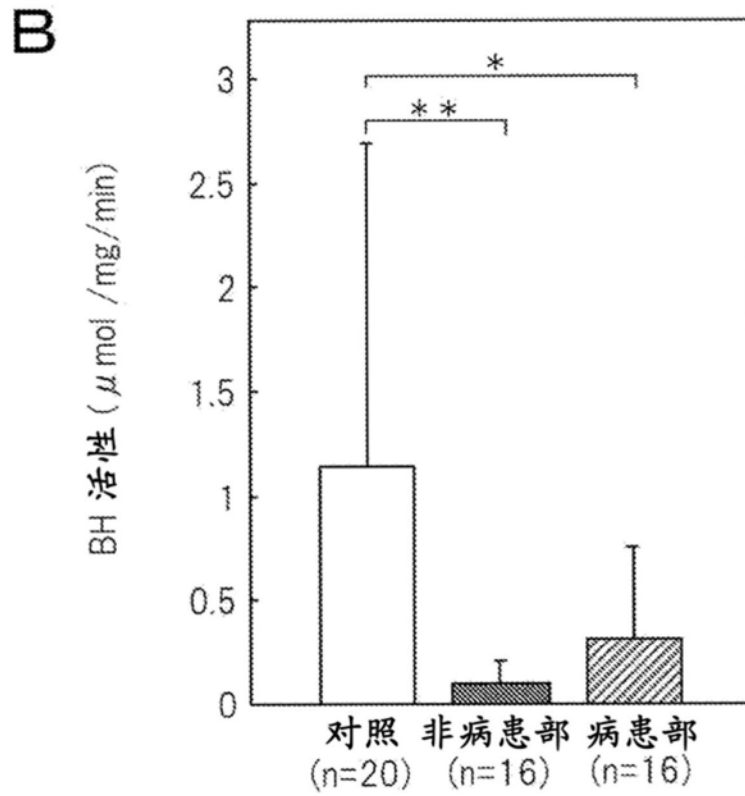
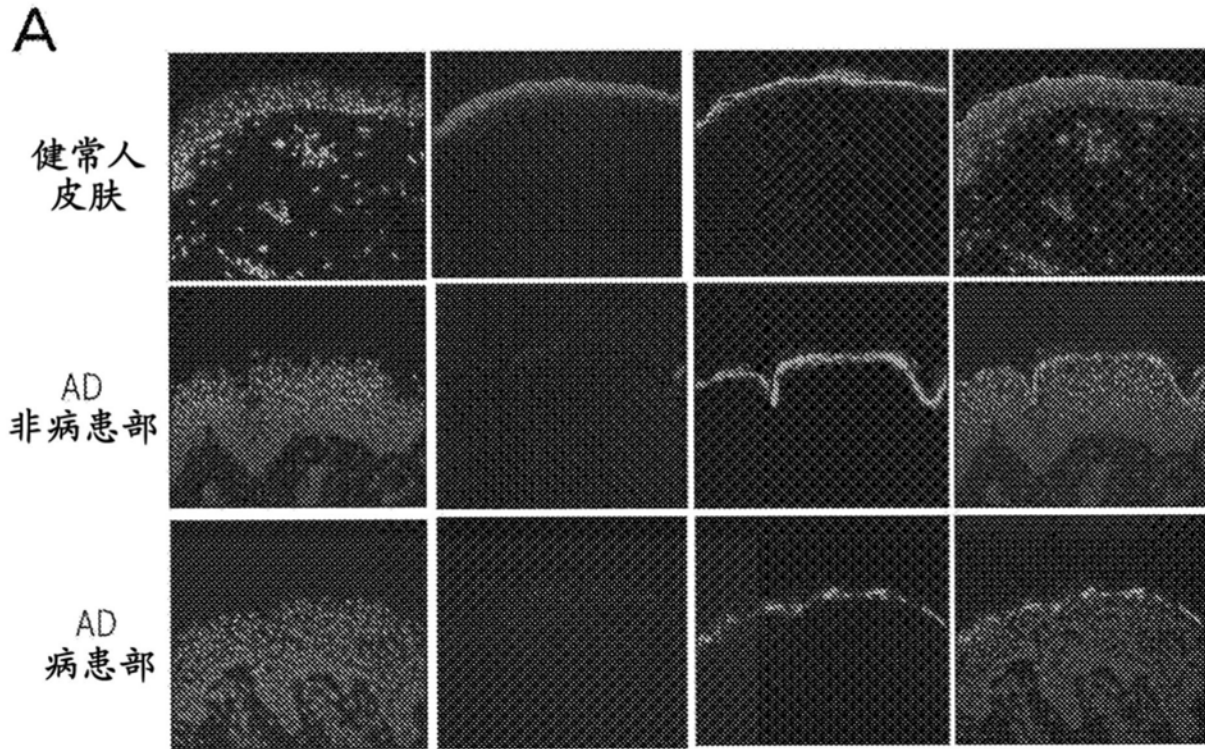


图23

对 BH mRNA 表达的效果

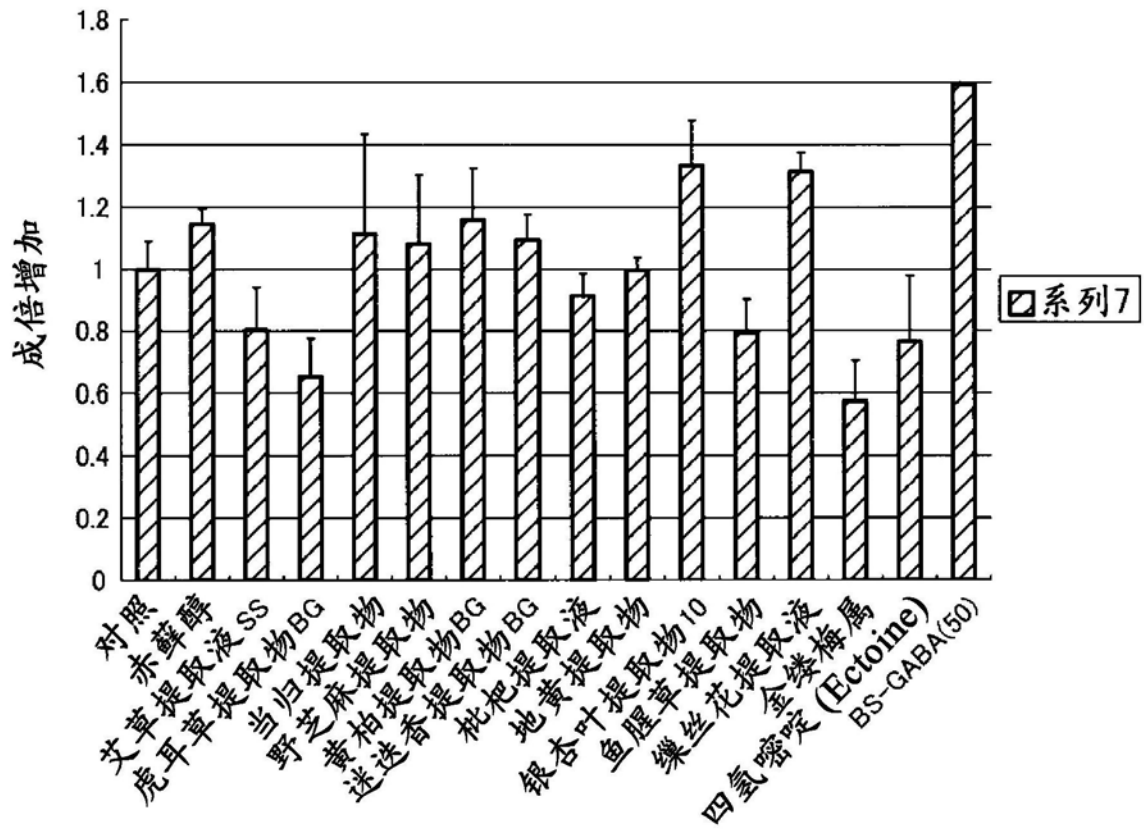


图24