

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3705820号
(P3705820)

(45) 発行日 平成17年10月12日(2005.10.12)

(24) 登録日 平成17年8月5日(2005.8.5)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 7/48
A 6 1 K 31/00
A 6 1 K 31/20
A 6 1 K 31/57

A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 7/48
A 6 1 K 31/00

W
F
H

請求項の数 4 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-526224
(86) (22) 出願日 平成9年1月17日(1997.1.17)
(65) 公表番号 特表2000-503660(P2000-503660A)
(43) 公表日 平成12年3月28日(2000.3.28)
(86) 国際出願番号 PCT/US1997/000791
(87) 国際公開番号 W01997/025969
(87) 国際公開日 平成9年7月24日(1997.7.24)
審査請求日 平成12年9月5日(2000.9.5)
審判番号 不服2002-16258(P2002-16258/J1)
審判請求日 平成14年8月26日(2002.8.26)
(31) 優先権主張番号 588, 771
(32) 優先日 平成8年1月19日(1996.1.19)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
ザ ユニバーシティ オブ ミシガン
アメリカ合衆国, ミシガン 48109-
0314, アン アーバー, タウマン ヘ
ルス ケア センター 1910, メディ
カル センター, デパートメント オブ
ダーマトロジ
(74) 代理人
弁理士 社本 一夫
(74) 代理人
弁理士 今井 庄亮
(74) 代理人
弁理士 増井 忠式
(74) 代理人
弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚の光老化を抑制する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

紫外線B(UVB)照射に曝されることで、人間の皮膚が光老化することを防ぐための組成物において、UVB誘導MMP、AP-1及びNF- κ Bの一方もしくは両方、またはjunもしくはfos蛋白質の活性化および/または産出に関わるGTP結合蛋白質もしくはキナーゼの少なくとも一つ、の産出又は活性を抑制するのに十分な量で、グルココルチコイドを含んでなる、前記組成物。

【請求項2】

グルココルチコイドが、クロベタゾル、そのエステル誘導体、またはその塩である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記皮膚が赤くなることを引き起こすのに必要な最小線量以下のUVBの線量に曝されることによって誘導される光老化を抑制することを特徴とする、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項4】

前記UVB線量が、約5mJ/cm²以上であることを特徴とする請求項3に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、光保護の分野にある。特に、本発明は、マトリックス・金属プロテイナーゼ(

Matrix Metalloproteinase : MMP) 製造および / または活動の抑制剤を使う、損傷を受けていない皮膚の光老化を抑制するための方法に関する。

背景

光老化は、日光に対する繰り返された被曝の結果としての、皮膚の外見及び機能の変化を記述するために使用される用語である。日光の構成要素である紫外線 (UV)、特に中間 UV (UVB と呼ばれる、波長 290 - 320 nm) は、光老化を引き起こす主な動因である。光老化を引き起こすのに必要な UVB の被曝量は現在のところ知られていない。紅斑や日焼けを引き起こすレベルでの UVB に対する繰り返しの被曝は、しかしながら、普通、光老化と連想される。臨床的に、光老化は、肌荒れ、しわが寄る、斑の着色、土色になる、たるみ、毛細管拡張症、ほくろ、紫斑病、容易に傷がつくこと、萎縮、繊維症的デピグメントされた (depigmented) 範囲、最終的に前悪性の及び悪性の腫瘍、によって特徴づけられる。光老化は、普通、顔、耳、頭の髪のはげた部分、首、と手のような、日光に習慣的に曝される皮膚に起こる。

老齢でない皮膚の光老化の抑制と、すでに光老化した皮膚の手入れのための方法は、利用することができる。サンスクリーン (Sunscreens) は、日光に習慣的に曝される皮膚の範囲の光老化を抑制するために普通使われる。サンスクリーンは、UV を、吸収、反射、あるいは、散乱させる、局所の調剤である。いくつかは、酸化亜鉛、酸化チタニウム、粘土、フェリー塩化物のような不透明な微粒子の材料に基礎を置く。そのような調剤は、目に見え、吸蔵するので、多くの人々は、これらの不透明な系統的論述を、美容に受け入れることができないと考える。他のサンスクリーンは、透明で、無色の、p - アミノ安息香酸 (PABA)、フェノール (Oxybenzone)、二酸化安息香酸 (dioxybenzone)、メチルヘキシル - 桂皮酸 (cinnamide)、及びブチルメソキシ - ジベンゾイルメタン (butylmethoxydibenzoylmethane)、のような薬品を、それらが目に見える波長の光を吸収しないで、含有する。これらの透明なサンスクリーンは、美容に、受け入れられるかも知れない一方で、それらは、比較的短命で、洗浄や発汗により除去されるという影響を受けやすい。加えて、すべてのサンスクリーンは、ビタミン D の製造を減少させる。

リエガー (Rieger, M.M.) は、「Cosmetic and Toiletries」(1993年) 108の 43 - 56 頁において、皮膚の UV に誘導される老化において、反応性酸素種 (ROS) の役割を検討する。この記事は、皮膚に対する知られている酸化防止剤の局所の適用が、皮膚の中の ROS の存在を減少させ、その結果、光損傷を減少させることができることを報告する。

レチノイド (Retinoids) は、太陽で損害を与えられた皮膚における光老化を阻止するために使われた。米国特許 No. 4,877,805 は、光老化の過程を減速させるための、干渉療法としての、光老化した皮膚の処置を記述する。この特許は、老化の結果が出現するまでに、そのような処置を開始することの意味は小さいことを示している。これに関して、本出願人は、損傷を受けていない皮膚の光老化を妨ぐためにレチノイドの使用を提案するような技術について全く知らない。

MMP は、結合組織の生理学及び病理学上の破壊における主要な役割を演じる酵素の一群である。10 を超える一群の要素が、確認されている。それらは、共通の名前によってだけでなく、数字によって (MMP - 1, MMP - 2, など) 呼ばれる。それらは、いくつかの構造及び機能の特徴を共用するが、それらの組織基質の特異性において相違するように見える。それらは、コラーゲン・タイプ I、II、III、VII、VIII、IX、およびゼラチンを滅成する間質性のコラーゲナーゼ (MMP - 1) 及び PMN - コラーゲナーゼ (MMP - 8) ; コラーゲン・タイプ IV、V、VII、X、XI、ゼラチン、エラスチン、およびファイブロネクチン (fibronectin) を滅成する 72 kDa (MMP - 2) および 92 kDa (MMP - 9) タイプ IV コラーゲナーゼ / ゼラチナーゼ (gelatinases) ; ファイブロネクチン、PG の核 (core) 蛋白質、コラーゲン・タイプ IV、V、IX、および X、ラミニン (laminin) およびエラスチンを滅成するストロメリシン - 1 (stromelysin-1) (MMP - 3) 、ストロメリシン - 2 (stromelysin-2) (MMP - 10) 及びストロメリシン - 3 (stromelysin-3) (MMP - 3) ; コラーゲン・タイプ IV、ゼラチン、ラミニン、ファイブ

10

20

30

40

50

ロネクチンおよびPGの核蛋白質を滅成するPUMP-1(MMP-7);そしてエラスチン及びファイブロネクチンを滅成するメタロエラスターゼ(metalloelastase)(MMP-12)、を含む。

MMP遺伝子の遺伝子蛋白質合成は、転写の要素AP-1及びNF-Bによって誘導される。エンジェル(Angel, P.)等による、「Cell」(1987年)49の729-739頁、および、佐藤(Sato, H.)とセイキ(Seiki, M.)による、「Oncogene」(1993年)8の395-405頁。AP-1とNF-Bの活動性は、サイトカイン(cytokine)(例えば、インターロイキン(interlukins)IL-1、IL-6、及びTNF)、成長要素(TGF、bFGF)、及び、オキシダント、熱、紫外線照射のような環境ストレス、によって調停される。AP-1を構成する、jun蛋白質(C-jun、jun-B、および、jun-D)およびfos蛋白質(C-fos、fos-B、fra-1、及び、fra-2)の、AP-1の誘導および製造は、多数の分子(例えば、RAC、CDC42、MEKK、JNKK、JNK、RAS、RAF、MEK、及び、ERK)によって調停される。AP-1とNF-Bは、UV光に曝された哺乳類の細胞の中で、活性化されることが知られている。デバリー(Devary, Y.)等による、「Science」(1993年)261の1442-1445頁。ウラスケク(Wlaschek, M.)は、「Photochemistry and Photobiology」(1994年)59(5)の550-556頁において、繊維母細胞のUVA照射が、IL-1、IL-6調停されたMMP-1の誘導に終わること、及び、そのような誘導が、光老化におけるコラーゲンの損失に寄与すること、をまた報告する。

MMPの抑制剤、または、遺伝子蛋白質合成に影響を与える転写要素が、また知られている。ヒル(Hill, P.A.)等は、「Biochem J」(1995年)308の167-175頁に、二つのMMP抑制剤、CT1166とRO31-7467を開示する。ゴウラヴァラム(Gowravaram, M.R.)らは、「J Med Chem」(1995年)38の2570-2581頁において、MMPを抑制する一連のヒドロキサマト(hydroxamate)の発展について述べており、MMPの抑制剤として知られるメルカプタン、ホスホン酸塩(phosphonate)、ホスフィン酸塩(phosphinate)、ホスホルアミ데이트(hosphoramidate)、およびN-N-カルボキシ-アルキルについて、言及している。この論文は、MMP抑制剤が、MMPの特異性ポケットの部分集合を拘束する、亜鉛とペプチドの破片をキレート化する一部分を含むことを示す。ホッジソン(Hodgson, J.)は、「Biotechnology」(1995年)13の554-557頁において、ガラージン(Galardin)、パチマスタット(Batimastat)、およびマリマスタット(Marimastat)を含む、いくつかのMMP抑制剤の臨床の状態を再検討する。他のMMP抑制剤は、ブタンジアミド(butanediamide)(コンウェイ(Conway, J.G.)等、「J Exp Med」(1995年)182の449-457頁)、TIMPs(マウチ(Mauch, C.)等、「Arch Dermatol Res」(1994年)287の107-114頁)、及び、レチノイド(ファンジュル(Fanjul, A.)等、「Nature」(1994年)372の107-111頁;ニコルソン(Nicholson, R.C.)等、「EMBO Journal」(1990年)9(13)の4443-4454頁;及びバイリー(Bailly, C.)等、「J Invesig Derm」(1990年)94(1)の47-51頁)を含む。

発明の開示

本発明は、出願人の、UVBの曝露は、曝された皮膚において、急速にAP-1及びNF-Bを増加させ、MMPの誘導を導くことの発見に基礎を置く。UVBの曝露から生じるMMPの高められたレベルは、皮膚における結合性組織を悪化させる。そのような損傷は、もし不完全に修復されたなら、UVBの曝露の繰り返しにより蓄積される太陽傷になり、また、光老化の原因となる。

従って、出願人は、UVBへの皮膚の露出のために、UVB誘導MMPsの誘導及び/又は活動性を抑制するために十分な量の被曝に先立ち、人にUVB誘導MMPの抑制剤を与えることにより、ダメージを受けていない人間の皮膚の光老化を抑制する。意外にも、これは、紅斑を引き起こす線量のみならず紅斑点を引き起こす線量以下のUVBの線量で、発生する。

本発明の他の様相は、繰り返しのUVB曝露のために、ダメージを受けていない皮膚の光

10

20

30

40

50

老化を防ぐために、薬剤の製造において、UVB誘導MMPの誘導又は活動性の抑制剤の使用にある。

【図面の簡単な説明】

図面において、

図1は、UVBがMMPの生産を誘導する筋道を示すフローチャートである。

図2 a - d, 3 a - b, 4 a - d, 及び5 a - e は、実施例において記述された試験結果のグラフである。

発明を実施するための形態

本発明は、損傷を与えられていない人間の皮膚、即ち、光老化の結果を示さない皮膚、の光老化を抑制（即ち、減少させるか、防止する）するために利用される。この発明による処理は、典型的に、日々の生活で習慣的に太陽に曝される、頭、首、手、及び腕のような皮膚に対し、そのような皮膚が光老化の証拠となる信号を示すまえに、実行されるべきである。紅斑の原因となる線量以下の線量のUVBへの繰り返しの曝露は、光老化を引き起こし得るので、本発明は、そのような低い線量の曝露を条件として、皮膚に実行されるべきである。この点について、多くの平均的な皮膚を持つ人々では、30 - 50 mJ/cm²の範囲のUVBの線量が、紅斑の原因となる。従って、本発明は、この範囲（典型的には、数分の日光の曝露に相当する約5 mJ/cm²以上）以下の線量に曝された皮膚の光老化を抑制するだろう。

光老化は、皮膚の細胞外の細胞間質のUVBに誘導されるMMPによる悪化を防ぐことによって、本発明にしたがって、抑制されるか防止される。これは、日光に曝されるべき皮膚にMMP抑制剤を与えることにより遂行される。この点に関し、「MMP抑制剤」なる語は、そのような皮膚におけるUVB誘導されるMMPの表出を、直接あるいは間接に防止する（即ち、著しく減少させるか、あるいは排除する）か、そのようなMMPの酵素の活動を防止する、それらの薬剤を指す。「間接的な防止」は、転写要因AP-1とNF-B、及び/又は、UVB誘導されるMMPsの表出を減少又は排除する方法で、皮膚におけるjunとfosの蛋白質誘導を引き起こす3キナーゼカスケードに含まれる1またはそれ以上の分子の、一方又は両方との相互作用を意味する。

図1は、UVB誘導されるMMPの表出の経路を図示する。図1に示されるように、UVBへの曝露は、サイトカイン（cytokines）と成長要因を交互に誘導するAP-1及びNF-Bの活動を刺激する反応性酸素中間生成物（Reactive Oxygen Intermediates: ROIs）を発生する。それらサイトカイン及び要因とそれらの受容体との相互作用は、少ないGTP（グアノシン5'-二リン酸）結合蛋白質RAC/CDC42及びRASを引き起こす。それらの蛋白質は、AP-1を形成するjun及びfos蛋白質の製造のための主要部である3キナーゼカスケードを活性化する。AP-1は、あるMMPの表出を誘導する。光老化を抑制する薬品は、MMP、転写要因AP-1及びNF-B、及び/又は、1又はそれ以上の図1に示される3キナーゼカスケードに含まれる分子、に作用する。アスピリンとE5510（Fujimori、T.等によって、「Jpn J Pharmacol」（1991年）、55（1）、81-91頁に記述されている）は、NF-Bの活性化を阻止する。B-581のようなファルネシル転移酵素抑制剤（Garcia、A.M.等によって、「J Biol Chem」（1993年）268（25）の18415-18418頁に記述されている）、BZA-5B（Dalton、M.B.によって「Cancer Res」（1995年）、55（15）の3295-3304頁に記述されている）、；ファルネシルアセテート、および、（-ヒドロキシファルネシル（hydroxyfarnesyl））燐酸は、ゲラニルゲラニル転移酵素（geranyl geranyltransferase）抑制剤と、リソフィリン（lisofylline）が、JNKカスケードの活性化を妨げるのに対し、RASに作用して、ERKカスケードの活性化を妨げる。SB202190（Lee、J.C.等によって、「Nature」（1994年）372の739-746頁に記述されている）やPD98059（Dudley、D.T.等により、「PNAS」（USA）（1995年）92の7686-7689頁に記述されている）のような化合物は、カスケードの中で、特定のキナーゼを抑制する。Fanjul等によって、（「Nature」（1994年）372の104-110頁に）記述されているようなAP-1拮抗作用のための特効薬である、米国特許No

10

20

30

40

50

.4,877,805に開示されているようなレチノイド及び解離しているレチノイド、グルココルチコイド (glucocorticoid)、及びビタミンD3は、AP-1を標的とする。他のレチノイド、加えてレチノールは、EP 379367 A2に開示されているように、自然及び同調の類似体のビタミンA (レチノール)、ビタミンAアルデヒド (レチナル (retinal))、ビタミンA酸 (レチノイン (retinoic) 酸、すべての変形及び13のcisレチノイン酸を含む)、及びその他、を含む。最後に、MMPsは、BB2284 (Gearig A. J. H.らにより「Nature」(1994年)370の555-557頁に記述されている)、GI129471 (McGeehan G. M.等により、「Nature」(1994年)370の558-561頁に記述されている)、TIMPS、ガラージン、パチマスタット、マリマスタット、ヒドロキサマト、その他知られている抑制剤、によって抑制されるだろう。

1又はそれ以上のこれらMMP抑制剤は、むしろ、日光に曝されなければならない皮膚に局部的に施される。そのような投与のために、通常それらは、クリーム、ジェル、軟膏、スプレー、あるいはローションのような明確な形にされる。従来の、薬理学及び化粧品に受け入れられる手段は、抑制剤を明確な形にするために使用されるだろう。そのような手段の例は、米国特許No.4,877,805及びEPA Pub.No.0586106 A1に記述されている。示されているように、1又はそれ以上の抑制剤が、与えられたフォーミュレーション (formulation) の中に存在しているだろう。例えば、皮膚のMMPの崩壊をの結果に含まれる2又はそれ以上の異なる分子に作用する抑制剤の組み合わせが使用される。フォーミュレーションは、また、緩和剤、皮膚浸透強化剤、色素剤、及び香料のような添加物を含むだろう。さらに、フォーミュレーションは、皮膚に対する抑制剤の確認された解放を供給する吸収性微粒子 (例えば重合体の玉) のような成分を含むだろう。フォーミュレーションにおける抑制剤の重量濃度は、通常、0.01%から10%、より普通には、0.1%から1%であろう。標準的には、フォーミュレーションの約50mgが、皮膚の1cm²毎に、適用される。

抑制剤は、日光に曝されるまえの損傷を受けていない皮膚にむしろ適用される。適用管理 (すなわち、毎日、毎週、その他) は、主として抑制剤の寿命 (例えば、代謝、皮膚の中の半生) と、それらの行動の的となる分子とに依存する。また、それは、入浴、発汗、および、日光への被曝の範囲によって影響される。通常、それらは日々適用されるだろう。本発明は、以下の例のより更に説明される。これらの例は、どのような意味においても、本発明を、制限するものではない。

実施例

UVB誘導される光老化の分子基礎の決定

MMPの高UVB線量誘導

UVB曝露に続く、MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-2 mRNA, 蛋白質、及び、酵素の活動レベルにおける変化の時間経過は、以下のように決定された。

被験者は、軽い日焼けのための光に当たる大人のコーカソイド人種 (ほぼ、同数の男女) であった。各被験者のための、かろうじて知覚できる皮膚が赤くなる (最小の紅斑線量、または「MED」) の引き起こすのに必要なUVB線量は、24時間の照射の後、決定された。すべての被験者のための、1MEDは、30-50mJ/cm²の範囲とされた。被験者の尻は、4つのF36T12・ERE-VHO・UVB管を含むウルトラライト・パネライト・ランプにより、2MEDのUVBに照らされた。照射の強度は、IL443光線療法放射計とSED/UVB/W光検出器により監視された。光源から48cmで測定されたUVB出力は、0.5mW/cm²だった。各被験者について、照射から8, 16, 24, 48、及び72時間後に、ケラトメ (keratome) により4つの場所 (1つは、非照射、3つは照射された場所) から皮膚が採取された。組織は、即座に冷凍され、すべてのRNAは、分離され、Fisher, G. J.等により、「J Invest Dermatol」(1991年)96の699-707に記述されたようなノーザン・プロット (Northern blot) により分析された。バンドの強度は、燐光体イメージャー (Phosphor Imager) によって測定された。MMP複写のための値は、制御遺伝子36B4のために、それらに標準化された。これらのテストの結果は、図2a (MMP-1)、図2b (MMP-3)、図2c (MMP-9) および

10

20

30

40

50

、図2 d (MMP - 2) に示される。結果は、平均 \pm SEM (8, 16, 48 及び 72 時間の場合、 $n = 6$ 、UVB 制御なし及び 24 時間の場合、 $n = 17$) であり、非照射の皮膚に対する標準化された値のフォールドインクリース (fold increase) のように与えられる。図に示されたバンドは、いくつかの人間からの合成物です

図2 a 乃至 d に示されるように、MMP - 1、MMP - 3、及び MMP - 9 mRNA の誘導は、16 から 24 時間の範囲で最高 (6 - 60 フォールド) で、48 から 72 時間の範囲で、ベースライン近くに戻った。MMP - 2 mRNA は、検出可能であったが、24 時間の照射後、唯一 1.6 フォールドに高められた。MMP - 1 及び MMP - 9 蛋白質の誘導、及び 2 MED UVB による活動の時間経過は、それらの mRNA のために観測されるそれらと平行に進んだ。MMP - 2 蛋白質も活動もどちらも誘導されなかった

10

MMP - 3 (ストロメリシン I) の特定のプローブでの UVB 処理された皮膚のノーザン分析は、全長さ (full-length) の MMP - 3 のプローブで選られた結果とまったく同一の結果を生じ (図2 b)、一方、MMP - 10 (ストロメリシン II) の特定のプローブで雑種を作らせること (hybridization) は、まったく信号を生じなかった。これは、ストロメリシンの中で、UVB が、ストロメリシン I を主に誘導することを示す。

MMP の低 UVB 誘導

上述したように、被験者は、0.01 から 2 MED まに及び UVB 線量に曝された。全厚さの皮膚のサンプル (6 mm 円柱) が、照射後 24 時間後に処理又は非処理の場所から得られた。サンプルは、20 mM のトリ (Tris) HCL (pH 7.6) 及び 5 mM の CaCl_2 の中で均質化され、10 分間 $3000 \times g$ で遠心分離機により分離された。表面に浮いているものは、ウエスタンブロット (Western blot) ($100 \mu\text{g}$ / レーン) によって、化学ルミネッセンスを使って、MMP - 1 及び MMP - 9 蛋白質を測定するために使用され、Hu, C. L. 等による「Anal Biochem」(1978年) 88 の 638 - 643 にしたがって、3H 微小繊維のコラーゲン ($100 \mu\text{g}$ / 分析物) の加水分解により活動状況を測定するために使用され、Hibbs, M. S. 等による「J Biol Chem」(1985年) 260 の 2493 - 2500 にしたがって、ゼラチンジモグラフィ (zymography) ($20 \mu\text{g}$ / 分析物) を測定するために使用される。使用された MMP - 1 および MMP 抗体は、それぞれ、Werb, Z. 等により、「J Cell Biol」(1989年) 109 の 877 - 899 頁と、Murphy, G. 等による「Biochem J」(1989年) 258 の 463 - 472 頁に、記述されている。これらの試

20

30

験の結果は、図3 a 及び b に示されている。図3 a において、MMP - 1 蛋白質の値は、白抜きのバーによって示されているのに対して、MMP - 1 の活動の値は、ハッチングされたバーによって示される。図3 a の差し込み図は、2つの被験者からのウエスタンブロット (Western blots) の典型を示す。より大きい 54 KDa バンドは、傷ついていない MMP - 1 であり、より小さい 45 KDa バンドは、MMP - 1 の蛋白質加水分解の処理され、活性化された形である。

図3 b において、MMP - 9 蛋白質の値は、白抜きのバーで示され、MMP - 9 の活動の値は、ハッチングされたバーで示される。図3 b の差し込み図は、ウエスタンブロットの典型 (左のパネル) とジモグラム (zymogram) (右のパネル) を示す。ジモグラム上の多重バンドは、MMP - 9 の蛋白質加水分解処理された活動の形に、蛋白質加水分解処理される。

40

バンド強度は、レーザー濃度測定によって測定された。結果は、平均 \pm SEM ($n = 10$) として与えられる。

図3 a 及び b に示されるように、MMP - 1 と MMP - 9 の蛋白質と活動は、線量によって決まり、両方の MMP のために、蛋白質と活動における変化は、互いに反映した。MMP - 1 は、試験された UVB のすべての線量によって誘導され、MMP - 9 は、0.1 MED 以上の線量によって誘導された。誘導は、1 MED で最高で、0.1 MED でおよそ最高の半分であった。0.1 MED の UVB は、知覚できるほど皮膚を赤くすることのない、夏の日光放射の 2 から 3 分に等しい。

AP - 1 及び NF - B の低線量 UVB の誘導

50

上述したように、被験者は照射され、組織サンプルが採取された。核抽出物は、Fisher, G. J. 等により「J Biol Chem」(1994年) 269の20629 - 20635頁に記述されているように、サンプルから準備された。10⁸個の細胞を含む生体組織片(およそ200mg、濡れた重さ)の検査は、平均して、500μgの核抽出蛋白質を生成した。電気泳動の流動性シフト分析(8μgの核抽出蛋白質)は、³²Pと名づけられた、AP-1及びNF-κB一致を含む、DNA精査を使って実行され、Fisher, G. J. 等により、上記に記述されているように、DNA結合の連続に変化させられた。超変化(supershifts)のための抗体は、サンタ・クルツ・バイオテクノロジーから得られた。jun及びfosの抗体は、それぞれ、すべてのjun及びfosの族の要素に対して、ひろい反応性を持った。NF-κB抗体は、p65/RelAのために独特(specific)であった。これらの分析の結果は、図4a, 4b, 4c, 及び4dに示されている(NSは、非独特な例を示す)。これらの図のための差し込み図は、合成物を遅らせたAP-1及びNF-κBの典型を示す。+Competeは、名づけられていないプローブの100倍の超過の付加を示し、Mutは、変化させられた³²Pのプローブを示す。

図4aは、照射されていない皮膚と、照射された(2MEDのUVBの後、4時間)皮膚における、AP-1とNF-κBの結合を表す。図4aに示されるように、それらのDNA応答要素に対する両方の転写酵素の結合は、変化させられ、名づけられたプローブと、遅くされた合成物によって明示されるように、独特である。抗体の超変化は、特定のAP-1及びNF-κBの遅くされた合成物が、jun及びfos蛋白質及びRelA蛋白質をそれぞれ含むUVB照射された皮膚からの抽出部で観測された、ということを示した。

図4b及び4cは、2MED UVBによる、AP-1及びNF-κBのDNA結合の誘導の時間経過をそれぞれ示す。報告された結果は、平均±SEM、n=9、である。図示のように、両方の要素の誘導は、15分以内に現れた。

図4dは、AP-1(白抜きのバーで示される)とNF-κB(斜めのハッチングされたバーで示す)の誘導の線量依存性を示す。DNAの結合は、照射の後、30分測定された。図示されるように、両方の要素の最大の誘導の半分は、ほぼ0.1MEDで引き起こされ、最大の誘導は、1MEDで引き起こされた。これらの要素の誘導のためのUVB線量の依存性は、MMP-1とMMP-9の誘導のための上記に報告した、これら2つのMMPにおける、UVB誘導された増加要因における、これらの複写要因と一致する、それらと厳密に一致した。

AP-1、MMP-1及びMMP-9のUVB誘導の抑制

0.1%の全トランスレチノ酸(all-trans retinoic acid)(t-RA)及びそのビークル(vehicle)(70%エタノール及び30%プロピレングリコール)、または、0.05%のグルココルチコイド(GC)クロベタゾル(clobetasol)プロピオン塩酸及びそのビークル(白色ワセリンの中に2%プロピレングリコールと2%ソルビタン(sorbitan)セスキオレート(sesquileate))は、Fisher, G. J. 等による「J Invest Dermatol」(1991年)96の699-707頁に記述されているように、48時間の間、被験者に適用(300mgフォーミュレーション/6cm²の皮膚)された。処置された皮膚の場所は、そのとき、2MEDのUVBが照射された。皮膚は、上述したように、AP-1測定のため曝露の後30分、又は、MMP測定のために曝露の後24時間で得られた。AP-1測定とMMP-1及びMMP-9の測定は、上述のように行われた。t-RAが、UVBで誘導された皮膚が赤くなることを変えたかどうかを決定するために、被験者は、0.1%のt-RAとそのビークルとを24時間の間処置した。処置された領域は、10-80mJ/cm²のUVBに照射され、ミノルタ色度計(chromameter)により、24時間後に皮膚の赤くなること決定された。これらの試験の結果は、図5a, 5b, 5c, 5d及び5eに示されている。

図5aは、AP-1の測定を報告する。図示されるように、予めt-RAで処置した皮膚は、UVB誘導されたAP-1のDNA結合が、およそ70%減少した。

図5b及び5cは、MMP-1及びMMP-9の測定を報告する。図示されるように、t

10

20

30

40

50

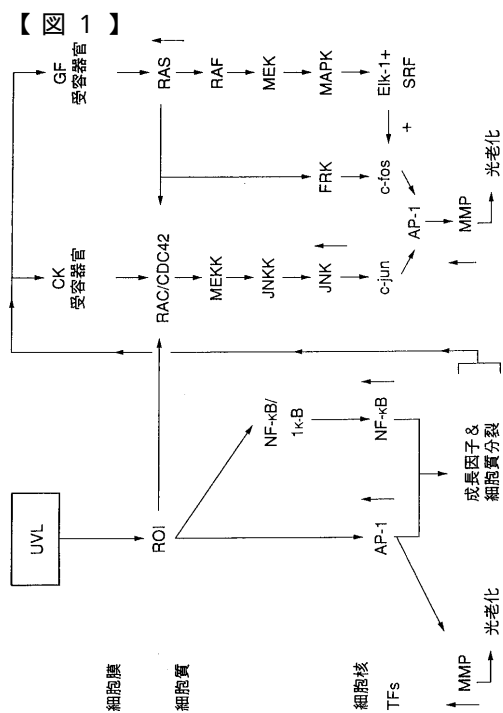
- R Aのあらかじめの処置は、U V B誘導されたM M P - 1とM M P - 9のm R N A s、蛋白質、及び活動を5 0 %から8 0 %減少させた。

図5 dは、皮膚が赤くなることに関するt - R Aのあらかじめの処置の効果についての試験を報告する。図示されるように、t - R Aの吸収は、U V Bの範囲(t - R Aは、最大波長3 5 1 nm)と重なり合うけれども、t - R Aは、U V B誘導された皮膚の赤くなることを減少させなかった。これは、A Pを与える(-land) M M P誘導における認められる減少が、t - R Aによる吸収のためというよりもむしろ、特異性(specific)であることを示す。

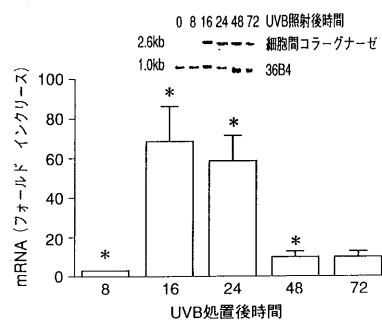
図5 eは、G Cでの皮膚のあらかじめの処置の効果を報告する。図示されるように、G Cのあらかじめの処置は、M M P - 1とM M P - 9の活動を、t - R Aのあらかじめの処理から観測されたそれらに似た範囲に減少させる。

10

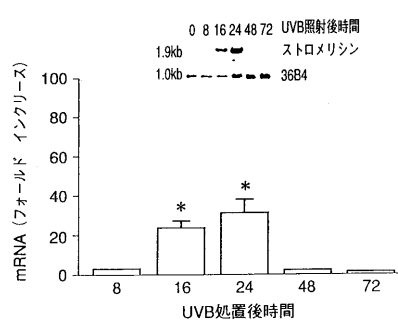
上記の詳細な説明で参照された出版物は、これによって、明白に参照により併合された。



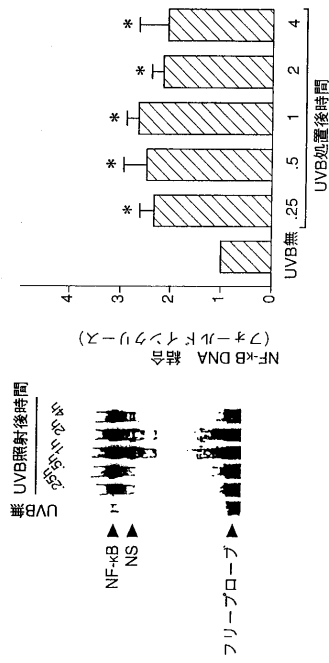
【図2】



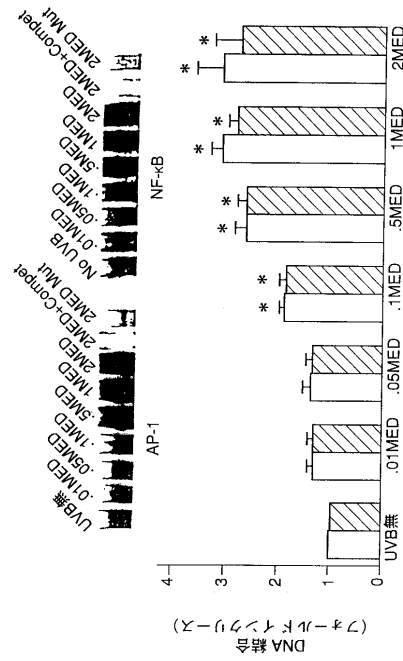
(b)



(c)

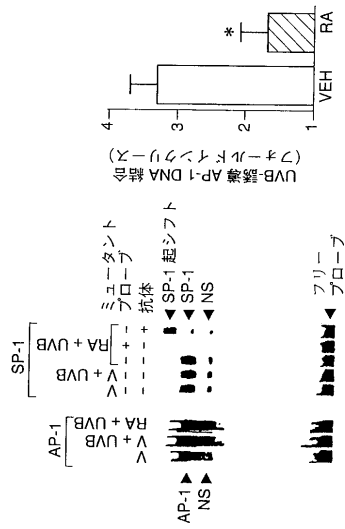


(d)

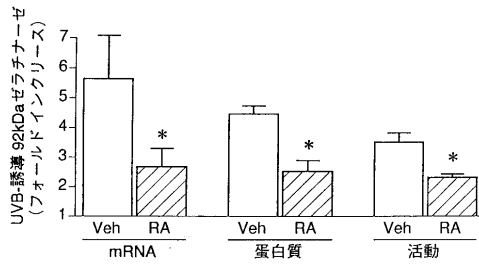


【 5 】

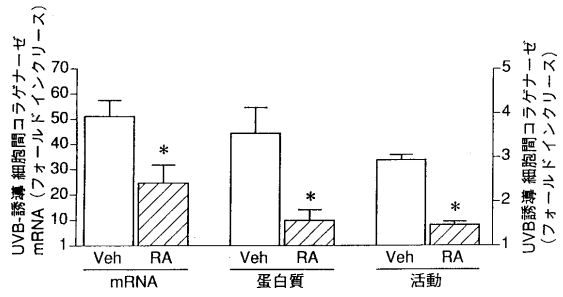
(a)



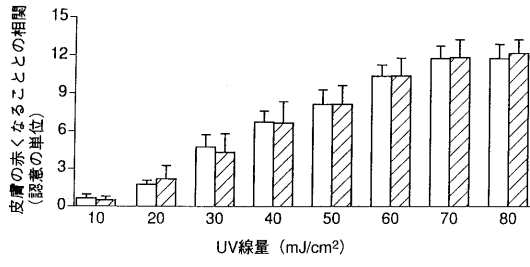
(b)



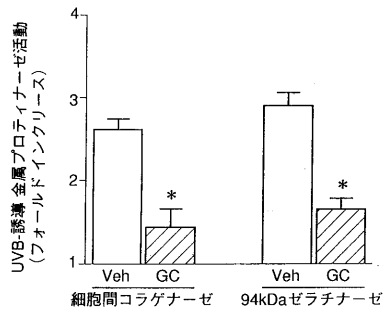
(c)



(d)



(e)



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

A 6 1 K 31/59

A 6 1 K 31/20

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/57

A 6 1 K 31/59

A 6 1 K 45/00

(74)代理人

弁理士 富田 博行

(74)代理人

弁理士 村上 清

(72)発明者 ヴォルヒース, ジョン ジェイ.

アメリカ合衆国, ミシガン 48109 0314, アン アーバー, タウマン ヘルス ケア
センター 1910, メディカル センター, デパートメント オブ ダーマトロジ, ザ ユニバ
ーシティ オブ ミシガン 内

(72)発明者 フィッシャー, ゲーリー ジェイ.

アメリカ合衆国, ミシガン 48109 0528, アン アーバー, イースト キャサリン 1
301, ルーム 6558, ビルディング クリースジ I, デパートメント オブ ダーマトロ
ジ, ザ ユニバーシティ オブ ミシガン 内

合議体

審判長 森田 ひとみ

審判官 中野 孝一

審判官 谷口 博

(56)参考文献 国際公開第94/09756 (WO, A1)

特開昭62-185005 (JP, A)

米国特許第5002760 (US, A)

国際公開第93/10755 (WO, A1)

特表平1-500355 (JP, A)

特表平10-513168 (JP, A)

特開平2-288822 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A61K7/00-7/50

31/00-31/80, 38/00-38/58, 45/00-45/08