

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6647302号
(P6647302)

(45) 発行日 令和2年2月14日 (2020.2.14)

(24) 登録日 令和2年1月16日 (2020.1.16)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06 Z N A
C O 7 K 5/08 (2006.01)	C O 7 K 5/08
C O 7 K 5/10 (2006.01)	C O 7 K 5/10
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64
A 6 1 Q 19/02 (2006.01)	A 6 1 Q 19/02

請求項の数 5 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-527690 (P2017-527690)
(86) (22) 出願日	平成27年11月23日 (2015.11.23)
(65) 公表番号	特表2017-536375 (P2017-536375A)
(43) 公表日	平成29年12月7日 (2017.12.7)
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/012571
(87) 国際公開番号	W02016/085208
(87) 国際公開日	平成28年6月2日 (2016.6.2)
審査請求日	平成30年11月5日 (2018.11.5)
(31) 優先権主張番号	10-2014-0164481
(32) 優先日	平成26年11月24日 (2014.11.24)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)

(73) 特許権者	511055522
	ケーエヌユー—インダストリー コーポレ—ション ファウンデーション
	大韓民国 24341 カンウォン—ド, チュンチョン—シ, カンウォンデハク—ギル 1
	1, Gangwondaehak—gil, Chuncheon—si, Gangwon—do 24341, Republic of Korea

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SFRP5由来ペプチド断片およびそれを含有する皮膚美白用化粧料組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1～5および9のペプチドからなる群から選択されるSfrp5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片。

【請求項2】

配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるSfrp5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を有効成分として含む、皮膚美白用の化粧料組成物。

【請求項3】

配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるSfrp5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を有効成分として含む、皮膚色素沈着抑制用の化粧料組成物。

【請求項4】

前記皮膚色素沈着が、紫外線暴露によって誘導された皮膚色素沈着である、請求項3に記載の化粧料組成物。

【請求項5】

配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるSfrp5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を含む、Wntシグナル伝達経路の抑制を研究または分析するための試薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

【0001】

本発明は、S f r p 5 (secreted frizzled protein 5) に由来するペプチド断片、ならびに該ペプチド断片を有効成分として含む皮膚美白用および／または皮膚色素沈着抑制用の化粧品組成物に関する。また、本発明は、前記ペプチド断片を含む、W n t シグナル伝達経路の抑制を研究または分析するための試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

メラニンとは、目や皮膚、毛などに見られる暗褐色の色素であり、一定量以上の紫外線を吸収することによって紫外線の透過を遮断し、身体の保護または体温の維持において有益な役割を果たしている。しかし、過剰な紫外線に暴露されると、皮膚を透過する紫外線を遮断するためにメラニンが過剰に分泌され、皮膚が変色する原因となることが多い。メラニンは、メラニン生成酵素（例えばチロシナーゼ）とホルモンとが同時に作用することによって生成されることが知られている。

10

【0003】

悪性黒色腫は、メラニン形成細胞（すなわちメラノサイト）の悪性化により形成される腫瘍である。悪性黒色腫は、メラノサイトが存在する身体部位のいずれにおいても発生しうるが、その発生率は皮膚で最も高い。また、その悪性度は、様々な皮膚腫瘍中でも著しく高いことが知られている。悪性黒色腫の発生率は、西洋諸国に比べて東洋諸国の方が相対的に低いが、年々上昇しており、20歳から発生率の上昇が始まり、40歳以上で急激に上昇する傾向を示す。悪性黒色腫は、遺伝的要因および／または紫外線暴露から主に発生すると考えられている。

20

【0004】

W n t は、様々な体細胞から分泌される細胞内シグナル伝達分子であり、3つの経路、すなわち、古典的W n t 経路、非古典的平面内細胞極性経路、および非古典的W n t ／カルシウム経路に関与することが知られている。正常条件下において、W n t は、W n t 阻害因子(W I F)などのW n t 拮抗物質と結合しているため、シグナル伝達に関与することはない。しかし、W I FなどのW n t 拮抗物質を発現することができない特定の状況下では、W n t は受容体であるFrizzledと結合してシグナル伝達を発生する。S f r p 5 (secreted frizzled protein 5) は、分泌型タンパク質であり、W I Fと同様にW n t 拮抗物質の1つとして知られている。S f r p 5は、FrizzledのW n t 結合部位と同一性を有する部位を含んでいるため、W n t とFrizzledタンパク質との結合を調節する。メラノサイトにおいてW n t と受容体(Frizzled)とが結合すると、 β -カテニンが活性化し、メラニンの生合成を調節するM I T Fの発現が促進される。したがって、W n t シグナル伝達経路を調節することによってM I T Fの発現が抑制され、それによって色素沈着を低減することができると期待される。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明者らは、W n t と結合することによってW n t とFrizzledとの結合を抑制する様々なS f r p 5由来ペプチド断片を設計し、その活性を評価した。驚くべきことに、本発明者らは、S f r p 5由来の特定のペプチド断片が、W n t シグナル伝達経路の抑制を介して、皮膚細胞におけるメラニン生成および皮膚色素沈着に対する抑制活性を示すことを見出した。

40

【0006】

したがって、本発明は、S f r p 5由来の特定のペプチド断片を提供することを目的とする。

【0007】

また、本発明は、S f r p 5由来の特定のペプチド断片を有効成分として含む、皮膚美白用および／または皮膚色素沈着抑制用の化粧品組成物を提供することを目的とする。

【0008】

50

さらに、本発明は、S f r p 5由来の特定のペプチド断片を含む、W n t シグナル伝達経路の抑制を研究または分析するための試薬を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一態様によれば、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片が提供される。

【0010】

本発明の別の一態様によれば、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を有効成分として含む、皮膚美白用の化粧料組成物が提供される。

10

【0011】

一実施形態において、本発明の化粧料組成物は、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を有効成分として含む、皮膚色素沈着抑制用の化粧料組成物であってもよい。前記皮膚色素沈着は、紫外線暴露によって誘導された皮膚色素沈着であってもよい。

【0012】

本発明のさらに別の一態様によれば、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を含む、W n t シグナル伝達経路の抑制を研究または分析するための試薬が提供される。

【発明の効果】

20

【0013】

S f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来の特定のペプチド断片、すなわち配列番号1～9のペプチドが、メラノサイトにおいてメラニン生成を抑制することによって、皮膚美白活性および／または皮膚色素沈着抑制活性を示すことが本発明により見出された。したがって、前記ペプチド断片は、皮膚美白用の化粧料組成物、特に皮膚色素沈着抑制用の化粧料組成物に有用に適用することができる。また、前記ペプチド断片は、生物学的分野および／または医学分野において、研究用または分析用試薬、すなわちW n t シグナル伝達経路の抑制剤として有用に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

30

【図1】図1 a～図1 cは、マウス悪性黒色腫細胞株において、M I T FまたはC R E Bとβ-カテニンとの結合に対する本発明のペプチドの効果の評価することによって得られた結果を示す。

【図2】ヒト表皮メラノサイトにおいて、W n t シグナル伝達経路と関連した分子の発現および活性化に対する本発明のペプチド断片の抑制効果を評価することによって得られた結果を示す。

【図3】マウス悪性黒色腫細胞株におけるメラニン形成に対する本発明のペプチド断片の抑制活性を評価することによって得られた結果を示す。

【図4】マウス悪性黒色腫細胞株におけるチロシナーゼ活性に対する本発明のペプチド断片の効果を評価することによって得られた結果を示す。

40

【図5】ヒト表皮メラノサイトにおけるメラニン生成酵素の発現に対する本発明のペプチド断片の効果を評価することによって得られた結果を示す。

【図6】ヒト表皮メラノサイトにおけるメラニン生成酵素の遺伝子発現に対する本発明のペプチド断片の効果を評価することによって得られた結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を提供する。また、本発明は、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を有効成分として含む、皮膚美白用の化粧料組成物を提供する。

50

【0016】

S f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片、すなわち配列番号1～9のペプチドが、メラノサイトにおいてメラニン生成を抑制することによって、表皮の色素沈着に対する抑制活性を示すことが本発明により見出された。したがって、前記ペプチド断片は、皮膚美白用の化粧料組成物、特に皮膚色素沈着抑制用の化粧料組成物に有用に適用することができる。

【0017】

一実施形態において、本発明の化粧料組成物は、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を有効成分として含む、皮膚色素沈着抑制用の化粧料組成物であってもよい。「皮膚色素沈着」とは、内的要因および外的要因によって引き起こされる皮膚ケラチノサイトでの過剰な色素蓄積を意味し、好ましくは紫外線暴露によって誘導された皮膚色素沈着を含む。

10

【0018】

本発明の化粧料組成物は、従来の方法に従って様々な形態で製造されてもよい。例えば、前記化粧料組成物は、化粧品、化粧水、クリーム、ローションなどの形態で製造されてもよく、これらは、クレンジングウォーター、収斂液、または保湿液で希釈して使用してもよい。また、前記化粧料組成物は、化粧料組成物の分野で通常使用されている、安定剤、溶解補助剤、ビタミン、顔料、着香剤などの通常の添加剤を含んでいてもよい。前記化粧料組成物において、前記ペプチド断片は、皮膚美白効果または皮膚色素沈着抑制効果をもたらすのに十分な量で含まれていてもよく、例えば組成物の全重量に対して、0.001～10重量%の範囲の量で含まれていてもよく、好ましくは、0.01～1重量%の範囲の量で含まれていてもよい。

20

【0019】

本発明はさらに、配列番号1～9のペプチドからなる群から選択されるS f r p 5 (secreted frizzled protein 5) 由来ペプチド断片を含む、W n t シグナル伝達経路の抑制を研究または分析するための試薬を提供する。本発明の試薬は、様々な研究分野、例えば生物学分野および／または医学分野において、研究用または分析用試薬として有用に使用することができる。前記研究用または分析用試薬は、ペプチド断片そのままの形態であってもよく、適切な担体（例えばリン酸緩衝食塩水（PBS））に溶解または分散した形態であってもよい。

30

【0020】

以下、実施例および試験例により本発明をさらに詳細に説明する。しかし、以下の実施例および試験例は、本発明を例示することのみを目的とし、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0021】

実施例1：ペプチド断片の合成

自動ペプチド合成機（PeptreX-R48、Peptron社製、テジョン、大韓民国）を用いて、配列番号1～9のペプチド断片をF M O C 固相法で合成した。合成したペプチド断片は、C 1 8 分析用R P カラム（資生堂カプセルパック）を使用した逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相H P L C）（Prominence LC-20AB、島津製作所製、日本）によって精製および分析し、質量分析装置（HP 1100シリーズ LC/MSD、Hewlett-Packard社製、ローズビル、米国）を使用して同定した。

40

【0022】

【表 1】

ペプチド名	配列番号	アミノ酸配列
SE215A	配列番号 1	Lys-Ile-Gly-Ala-Gln-Lys
SE215B	配列番号 2	Lys-Ile-Gly-Ala
SE215C	配列番号 3	Ile-Gly-Ala-Gln
SE215D	配列番号 4	Gly-Ala-Gln-Lys
SE215E	配列番号 5	Lys-Ile-Gly
SE215F	配列番号 6	Ile-Gly-Ala
SE215G	配列番号 7	Gly-Ala-Gln
SE215H	配列番号 8	Ala-Gln-Lys
SE215I	配列番号 9	Cys-Glu-Ala-Val

10

【0023】

実施例 2：ペプチド断片を含有する組成物の製造

配列番号 1～9 の前記ペプチド断片を、1 M の濃度になるようにリン酸緩衝食塩水（PBS）にそれぞれ溶解した。得られたタンパク質溶液を以下の試験例で使用した。

【0024】

試験例 1：マウス悪性黒色腫細胞株 B16F1 における CREB または MITF と β -カテニンとの結合に対する本発明のペプチド断片の効果の評価

20

β -カテニンの活性化は、Wnt シグナル伝達経路において重要な役割を果たしているが、この β -カテニンの活性化に対する本発明のペプチド断片の効果を *in situ* 近接ライゲーションアッセイにより評価した。この評価は、市販キットである DUOLINK II *in situ* キット（Olink Bioscience 社製、スウェーデン）を用いて行った。

【0025】

12 mm のガラス底を有する 24 ウェルプレートの各ウェルに 1 ml の DMEM を入れ、マウス悪性黒色腫細胞株 B16F1 細胞（韓国細胞株バンク、ソウル）を加えた（1 ウェル当たり 5×10^4 個の細胞）。細胞を 5% CO₂ インキュベーターにおいて 37℃ で 24 時間培養して安定化させた。メラノサイト刺激ホルモンである α -MSH（Sigma 社製、ミズーリ州、米国）（0.1 μ M）および本発明のペプチド断片（1 μ M）を各ウェルに加えた。細胞を 5% CO₂ インキュベーターにおいて 37℃ で 24 時間培養した後、4% パラホルムアルデヒドで固定した。12 mm のガラス底上の細胞にブロッキング溶液を 1 滴加え、37℃ で 30 分間インキュベートした。Wnt 受容体が活性化されると、CREB（サイクリック AMP 応答配列結合タンパク質）と β -カテニンとの相互作用が増加する。これらの相互作用レベルを測定するために、抗 CREB ポリクローナル抗体（Santa Cruz 社製、カリフォルニア州、米国）および抗 β -カテニンマウスモノクローナル抗体（Santa Cruz 社製、カリフォルニア州、米国）を用いて前記細胞を 37℃ で処理した。30 分間インキュベートした後、細胞を PLA プローブ溶液で 37℃ で 1 時間処理し、次いでライゲーション溶液で 30 分間処理し、次いで増幅溶液で 100 分間処理した。洗浄緩衝液で細胞を洗浄した後、共焦点顕微鏡を用いて赤色のスポットの数を測定した。この結果を図 1 a および図 1 b に示す。図 1 a および図 1 b において、対照群（Control）は非処理群を意味し、 α -MSH は α -MSH のみで処理した群（すなわち、ペプチドによる処理を行わなかった群）を意味する。

30

40

【0026】

図 1 a および図 1 b に示すように、CREB と β -カテニンとの結合は、配列番号 1～8 のペプチドによって顕著に減少した。この結果から、本発明のペプチド断片は、メラノサイトにおいて β -カテニンの活性化を効果的に抑制することによって、Wnt シグナル伝達経路を抑制することが示された。

【0027】

50

また、前記と同様の方法によって、M I T Fと β -カテニンとの結合に対する配列番号5、8または9のペプチドの抑制効果を調査した。M I T Fと β -カテニンとの結合は、これらのペプチドを用いた処理によって顕著に減少した（図1c参照）。この結果から、本発明のペプチド断片は、メラノサイトにおいてM I T Fと β -カテニンとの結合を効果的に抑制することによって、メラニンの形成を抑制することが示された。

【0028】

実験例2：ヒト表皮メラノサイトにおける β -カテニンの発現およびG S K-3のリン酸化に対する本発明のペプチド断片の効果の評価

β -カテニンの発現およびG S K-3のリン酸化は、W n tシグナル伝達経路の活性化において重要な役割を果たしているが、 β -カテニンの発現およびG S K-3のリン酸化に対する本発明のペプチド断片の効果をウエスタンブロッティングアッセイにより評価した。6ウェルマイクロプレートの各ウェルに2mlのD M E Mを入れ、ヒト表皮メラノサイト（Cascade Biologics社製、#C-0245C；ポートランド、オレゴン州、米国）を加えた（1ウェル当たり 1.5×10^5 個の細胞）。細胞を5% C O₂ インキュベーターにおいて37℃で24時間培養して安定化させた。メラノサイト刺激ホルモンである α -M S H（Sigma社製、ミズーリ州、米国）と、所定の濃度の本発明のペプチド断片（配列番号8のペプチド）とを各ウェルに加えた。細胞を48時間培養した後、細胞からタンパク質を抽出した。得られた抽出物を、抗 β -カテニン抗体（Santa Cruz社製、カリフォルニア州、米国）および抗p G S K-3抗体（Cell Signaling Technology社製、マサチューセッツ州、米国）を用いたウエスタンブロッティングアッセイに供し、 β -カテニンの発現レベルおよびG S K-3のリン酸化レベルを測定した。この結果を図2に示す。図2に示すように、 β -カテニンの発現レベルおよびG S K-3のリン酸化レベルは、配列番号8のペプチドによって濃度依存的に減少した。したがって、本発明のペプチド断片は、メラノサイトにおいてW n tシグナル伝達経路を抑制できることが分かる。

【0029】

実験例3：マウス悪性黒色腫細胞株B 1 6 F 1 0におけるメラニン形成に対する抑制活性の試験

6ウェルマイクロプレートの各ウェルに、B 1 6 F 1 0細胞（韓国細胞株バンク、ソウル）（1ウェル当たり 1.5×10^5 個の細胞）と2mlのD M E Mとを加え、5% C O₂ インキュベーターにおいて37℃で24時間培養した。 α -M S H（Sigma社製、ミズーリ州、米国）（100nM）を各ウェルに加え、最終濃度が0.1 μ M、1 μ Mまたは10 μ Mとなるように配列番号8のペプチドを各ウェルに加えた。 α -M S H（100nM）およびアルブチン（0.01%）でそれぞれ処理した群を陽性対照群として用いた。細胞を24時間さらに培養した後、各培養物の写真を撮影し、それぞれのメラニン形成量を比較した。

【0030】

図3に示すように、配列番号8のペプチドで処理した群において、各細胞培養物の褐色はペプチドの濃度に依存して減少し、陽性対照群と類似した色を示した。この結果から、本発明のペプチド断片は、メラノサイトにおいて α -M S Hの刺激によるメラニン色素の形成を抑制することが示された。

【0031】

実験例4：マウス悪性黒色腫細胞株B 1 6 F 1 0におけるチロシナーゼ活性に対する抑制活性の試験

本発明のペプチド断片がチロシナーゼ活性を抑制するかどうかを評価した。24ウェルプレートの各ウェルに、B 1 6 F 1 0細胞（韓国細胞株バンク、ソウル）（1ウェル当たり 5×10^4 個の細胞）と1mlのD M E Mとを加え、5% C O₂ インキュベーターにおいて37℃で24時間培養して安定化させた。メラノサイト刺激ホルモンである α -M S H（Sigma社製、ミズーリ州、米国）と、所定の濃度の配列番号8のペプチドとを各ウェルに加えた。細胞を72時間培養した後、細胞からタンパク質を抽出した。得られた抽出物を96ウェルプレートの各ウェルに加え（1ウェル当たり30 μ g）、L-ジヒドロキシ

フェニルアラニン（L-DOPA）溶液（100 μ L）を用いて37℃で2時間処理した。 α -MSH（100 nM）およびアルブチン（0.01%）でそれぞれ処理した群を陽性対照群として用いた。2時間後、各培養物の写真を撮影し、マイクロリーダーを用いて培養物のチロシナーゼ活性を490 nmで測定した。

【0032】

図4に示すように、 α -MSHのみで処理した対照群において、チロシナーゼ活性は増加した。これに対して、 α -MSHおよび配列番号8のペプチドの両方で処理した試験群では、チロシナーゼ活性は濃度依存的に減少した。この結果から、本発明のペプチド断片はチロシナーゼ活性に対する抑制活性を有することが示された。

【0033】

実験例5：ヒト表皮メラノサイトにおけるメラニン生成酵素のタンパク質発現に対する抑制活性の試験

ヒト表皮メラノサイトにおけるメラニン生成酵素のタンパク質発現に対する本発明のペプチド断片の効果を、ウエスタンブロッティングアッセイを用いて評価した。6ウェルマイクロプレートの各ウェルに、ヒト表皮メラノサイト（Cascade Biologics社製、#C-0245 C；ポートランド、オレゴン州、米国）（1ウェル当たり1.5 $\times$ 10⁵ 個の細胞）と2 mlのDMEMとを加え、5% CO₂ インキュベーターにおいて37℃で24時間培養して安定化させた。メラノサイト刺激ホルモンである α -MSH（Sigma社製、ミズーリ州、米国）と、所定の濃度の本発明のペプチド断片（配列番号8のペプチド）とを各ウェルに加えた。細胞を24時間培養した後、細胞からタンパク質を抽出した。得られた抽出物を、抗MITF抗体（Abcam社製、マサチューセッツ州、米国）、抗チロシナーゼ抗体（Santa Cruz社製、カリフォルニア州、米国）、抗TRP-1抗体（Santa Cruz社製、カリフォルニア州、米国）および抗TRP-2抗体（Santa Cruz社製、カリフォルニア州、米国）を用いたウエスタンブロッティングアッセイに供し、MITF、チロシナーゼ、TRP-1およびTRP-2の発現レベルを測定した。この結果を図5に示す。図5に示すように、MITF、チロシナーゼ、TRP-1およびTRP-2の発現レベルは、配列番号8のペプチドによる処理によって濃度依存的に減少した。したがって、本発明のペプチド断片は、ヒト表皮メラノサイトにおいて、MITF、チロシナーゼ、TRP-1およびTRP-2の合成を抑制することが分かる。

【0034】

実験例6：ヒト表皮メラノサイトにおけるメラニン生成酵素の遺伝子発現に対する抑制活性の試験

本発明のペプチド断片が、メラニン生成酵素の遺伝子発現を抑制するかどうかを評価した。6ウェルプレートの各ウェルに、ヒト表皮メラノサイト（1ウェル当たり1.5 $\times$ 10⁵ 個の細胞）と2 mlのDMEMとを加え、5% CO₂ インキュベーターにおいて37℃で24時間培養して安定化させた。メラノサイト刺激ホルモンである α -MSH（Sigma社製、ミズーリ州、米国）と、所定の濃度の配列番号8のペプチドとを各ウェルに加えた。細胞を72時間培養した後、細胞から全RNAを抽出し、cDNAを合成した。cDNAの合成は、Reverse Transcription Master Premix（Elpis Biotech社製、テジョン、大韓民国）を用いて行った。合成された各cDNAを鋳型として使用し、ROTOR Q GENE装置を用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行った。RT-PCRに使用したプライマーセットを以下の表2に示す。各RT-PCR溶液は、1 μ lのcDNA、10 μ lのTOPreal qRT-PCR2X Premix（Enzynomics社製、テジョン、大韓民国）、2 μ lのプライマーセット（10 pmol）および7 μ lの蒸留水を混合することによって調製した。RT-PCRは、最初に94℃で10分間；次いで、94℃で10秒間、58℃で30秒間、および72℃で1分間を40サイクルの条件で行った。

【0035】

【表 2】

	配列番号	プライマーの配列	
MITF	10	フォワード	CTCGAGCTCATGGACTTTCC
	11	リバース	CCAGTTCCGAGGTTGTTGTT
チロシナーゼ	12	フォワード	ATCCAGAAGCTGACAGG
	13	リバース	TTTGAGAGGCATCCGCTA
TRP-1	14	フォワード	AGCAGTAGTTGGCGCTTTGT
	15	リバース	TCAACCAGGTGGTTTTGTGA
TRP-2	16	フォワード	TGCCACAACATGGATGAACT
	17	リバース	TTGTGCCCCACCAAACAGTAA
GAPDH	18	フォワード	GCAAATTCCATGGCACCGT
	19	リバース	CCAAAATCAAGTGGGGCGA

10

【0036】

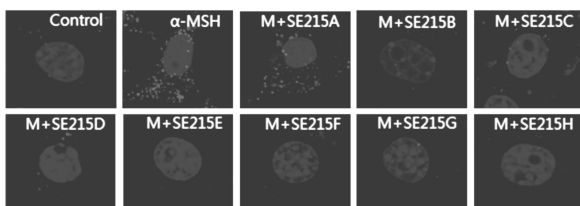
MITF、チロシナーゼ、TRP-1およびTRP-2の遺伝子発現をRT-PCRによって測定することによって得られた結果を図6に示す。

【0037】

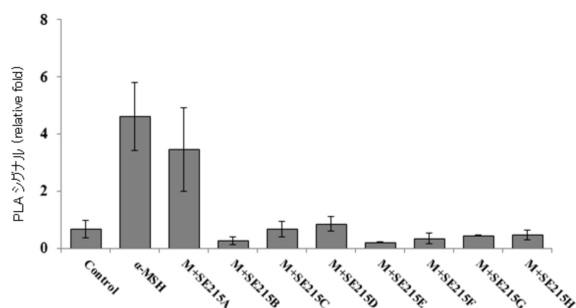
図6に示すように、 α -MSHのみで処理した対照群において、MITF、チロシナーゼ (TYR)、TRP-1およびTRP-2の遺伝子発現が増加した。これに対して、 α -MSHおよび本発明のペプチド断片 (すなわち配列番号8のペプチド) の両方で処理した試験群では、MITF、チロシナーゼ、TRP-1およびTRP-2の遺伝子発現が濃度依存的に減少した。この結果から、本発明のペプチド断片は、MITF、チロシナーゼ、TRP-1およびTRP-2の遺伝子発現を抑制することが示された。

20

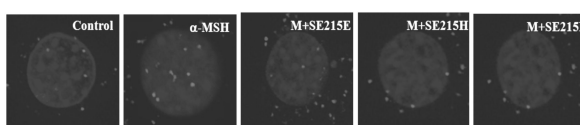
【図 1 a】



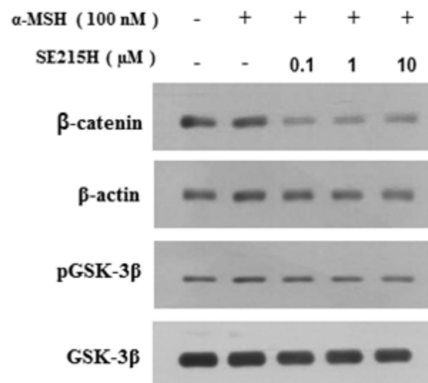
【図 1 b】



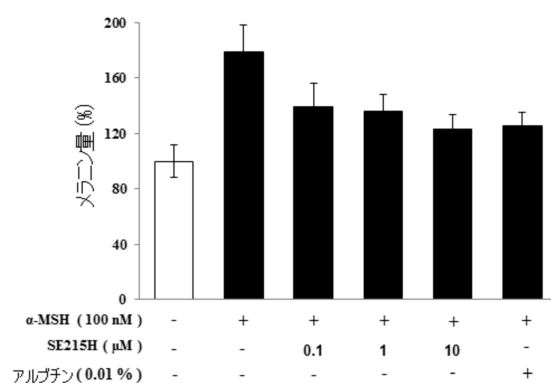
【図 1 c】



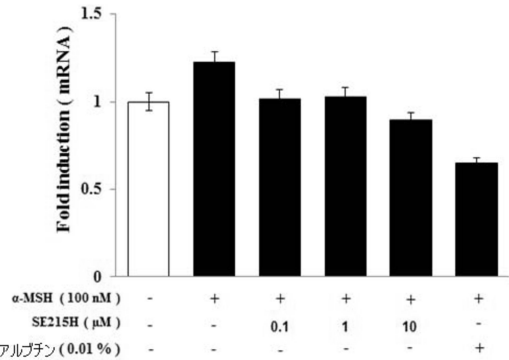
【図 2】



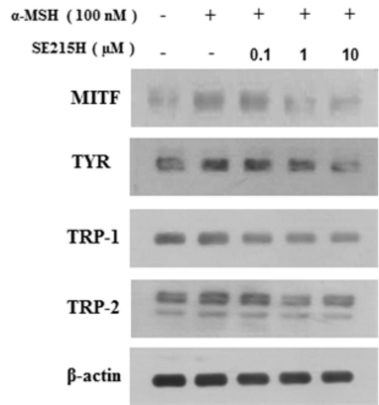
【図 3】



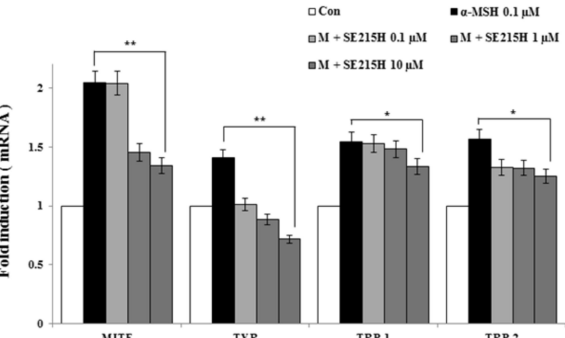
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0006647302000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 Q 17/00 (2006.01) A 6 1 Q 17/00

(73)特許権者 512104502

スバデリクサー インコーポレイテッド

大韓民国 2 4 3 4 1 カンウォンード, チュンチョンーシ, カンウォンデハクーギル 1, メディカル スクール ビルディング 1-410
Medical School Building 1-410, 1, Gangwondaehak-gil, Chuncheon-si, Gangwon-do 24341, Republic of Korea

(74)代理人 100077012

弁理士 岩谷 龍

(72)発明者 ハン, チャンヒ

大韓民国 2 4 4 0 1 カンウォンード, チュンチョンーシ, トンネーミョン, ウィソルーギル 19ボンーギル 80-7 105-903

(72)発明者 イム, トンヨン

大韓民国 1 2 7 9 1 キョンギード, クァンジューシ, キョンチュンーデロ 1460ボンーギル 20-5 105-301

審査官 牧野 晃久

(56)参考文献 特表2005-537245 (JP, A)

特表2004-513912 (JP, A)

特開平03-264536 (JP, A)

特開2013-067582 (JP, A)

REN F. et al., Systemic screening of milk protein-derived ACE inhibitors through a chemically synthesised tripeptide library, Food Chemistry, 2011年 4月 1日, Vol.128, p.761-768

YOKOYAMA K. et al., Peptide Inhibitors for Angiotensin I-Converting Enzyme from Thermo-lysin Digest of Dried Bonito, Biosci. Biotech. Biochem, 1992年, Vol.56, No.10, p.1541-1545

WU J. et al., Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure-Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides, J. Agric. Food Chem, 2006年 4月 1日, Vol.54, p.732-738

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1/00- 19/00

A 6 1 K 8/00- 8/99

A 6 1 Q 1/00- 90/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)