

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6603551号
(P6603551)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	8/63	(2006.01)	A 6 1 K	8/63	Z N A
A 6 1 Q	7/02	(2006.01)	A 6 1 Q	7/02	
A 6 1 Q	9/04	(2006.01)	A 6 1 Q	9/04	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/704	(2006.01)	A 6 1 K	31/704	

請求項の数 6 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-221322 (P2015-221322)
 (22) 出願日 平成27年11月11日(2015.11.11)
 (65) 公開番号 特開2017-88547 (P2017-88547A)
 (43) 公開日 平成29年5月25日(2017.5.25)
 審査請求日 平成30年9月14日(2018.9.14)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 〇号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

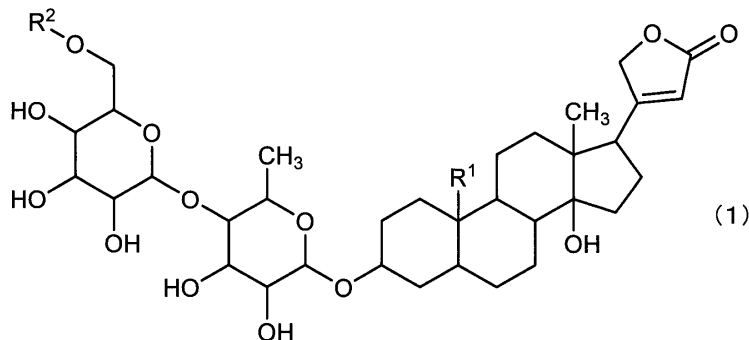
(54) 【発明の名称】 毛成長抑制剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(1)で表される化合物を有効成分とする毛成長抑制剤。

【化 1】

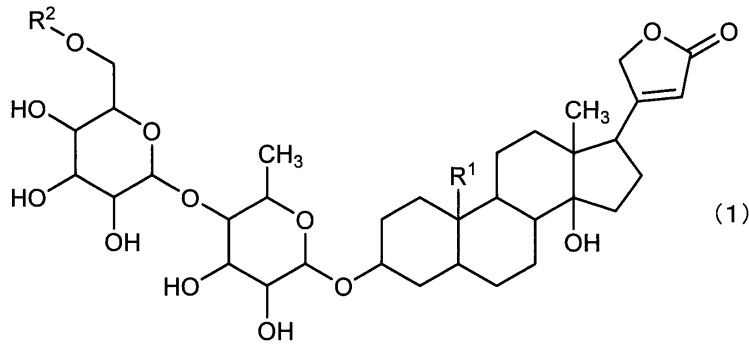


〔式中、R¹ はメチル基、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基又はカルボキシ基を示し、R² は水素原子又は単糖残基を示す。〕

【請求項 2】

下記式(1)で表される化合物を有効成分とする除毛又は脱毛剤。

【化2】



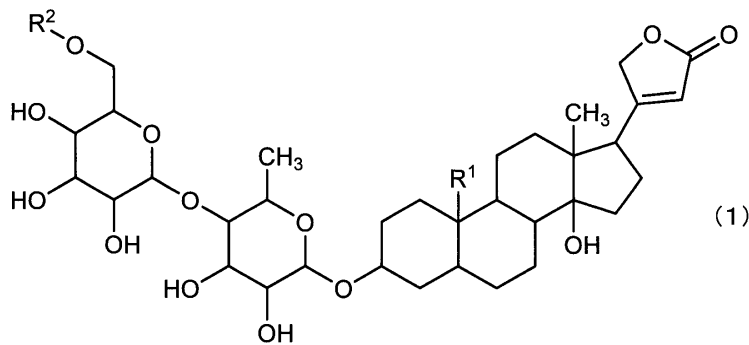
10

〔式中、 R^1 はメチル基、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基又はカルボキシ基を示し、 R^2 は水素原子又は単糖残基を示す。〕

【請求項3】

下記式(1)で表される化合物を有効成分とするKRT85及び/又はKRT36発現抑制剤。

【化3】



20

〔式中、 R^1 はメチル基、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基又はカルボキシ基を示し、 R^2 は水素原子又は単糖残基を示す。〕

30

【請求項4】

FOXN1によるKRT85遺伝子及び/又はKRT36遺伝子の転写活性を阻害し、KRT85及び/又はKRT36の発現を抑制する請求項3記載のKRT85及び/又はKRT36発現抑制剤。

【請求項5】

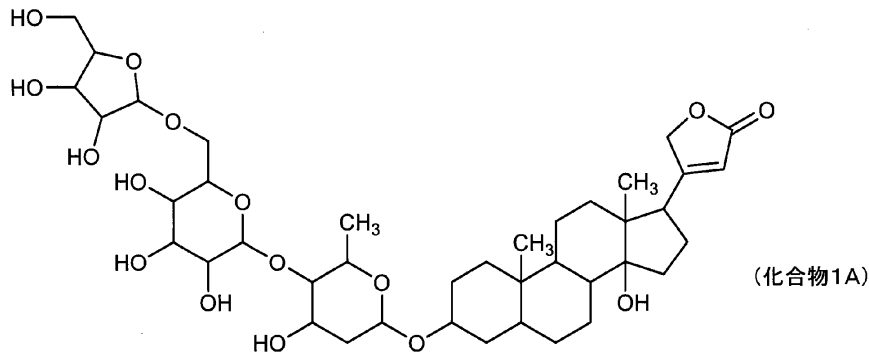
式(1)で表される化合物が、 R^1 がメチル基であり、 R^2 がペントース残基である化合物、又は R^1 がヒドロキシメチル基で、 R^2 が水素原子である化合物である、請求項1記載の毛成長抑制剤、請求項2記載の除毛又は脱毛剤、又は請求項3若しくは請求項4記載のKRT85及び/又はKRT36発現抑制剤。

40

【請求項6】

下記1Aで表される化合物。

【化4】



10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、毛成長抑制剤に関する。

【背景技術】

【0002】

頭髮や体毛は、生物学的には頭部、胸部、手足等の重要な器官を防護するものである。しかしながら、近年、特に手足等における体毛は、美的外観上無い方が好ましいとする傾向が高まっている。

20

【0003】

体毛を除去する方法としては、毛抜き、シェーバー、脱毛器等を用いる機械的除去方法、脱毛剤や除毛剤を用いた化学的作用による除去方法が挙げられる。化学的作用による脱毛方法としては、生薬抽出物や特定の化合物を用いて発毛や育毛過程を抑制することが挙げられ、例えば、ザクロ抽出物が、線維芽細胞増殖因子 - 7、血管内皮細胞増殖因子、インシュリン様成長因子 - 1 等の mRNA の発現を抑制し、抑毛効果を発揮することが報告されている（特許文献 1）。

【0004】

しかしながら、これらの体毛除去方法は、皮膚に対して物理的又は化学的刺激を伴う場合があり、また抑毛作用という点では未だ不十分であるため、一定期間経過後には再び体毛除去処理を行わなければならない。したがって、安全でより手間のかからない体毛除去方法の開発が望まれている。

30

【0005】

一方、ステロイド配糖体のうちラクトン環を有する化合物は、心筋に作用して心筋の収縮力を増大させる強心作用を有しており、強心配糖体として知られている。しかしながら、強心配糖体に毛成長制御作用があることは全く知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】特開 2010 - 013442 号公報

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、毛の成長を抑制し、除毛又は脱毛に有用な毛成長抑制剤を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、毛成長を抑制する物質を探索した結果、特定のステロイド配糖体に毛成長抑制作用があることを見出した。また併せて、これらがケラチンの発現制御に関わる転

50

写因子である FOXN1 によるケラチン遺伝子 (KRT85 及び KRT36) の転写を阻害し、当該ケラチンの発現を抑制することを見出した。

【0009】

すなわち本発明は、以下に係るものである。

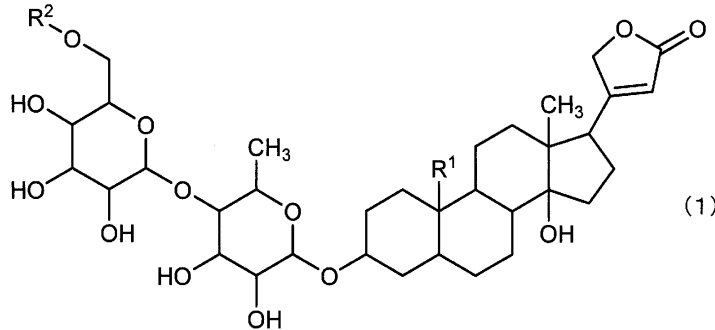
1) 下記式 (1) で表される化合物を有効成分とする毛成長抑制剤。

2) 下記式 (1) で表される化合物を有効成分とする除毛又は脱毛剤。

3) 下記式 (1) で表される化合物を有効成分とする KRT85 及び / 又は KRT36 発現抑制剤。

【0010】

【化1】



10

20

【0011】

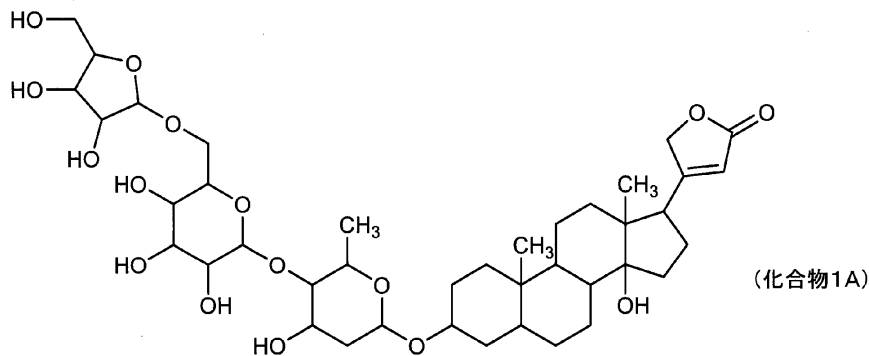
[式中、R¹ はメチル基、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基又はカルボキシ基を示し、R² は水素原子又は単糖残基を示す。]

【0012】

4) 下記 1A で表される化合物。

【0013】

【化5】



30

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、生体に対して安全であり、且つ毛成長抑制効果の高い毛成長抑制剤、脱毛又は除毛剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】 FOXN1 による KRT85 遺伝子の転写の活性化。MOCK : MOCK / pcDNA3.1 (+) を過剰発現した場合、FOXN1 : FOXN1 / pcDNA3.1 (+) を過剰発現した場合。

【図2】 FOXN1 による KRT36 遺伝子の転写の活性化。MOCK : MOCK / pcDNA3.1 (+) を過剰発現した場合、FOXN1 : FOXN1 / pcDNA3.1 (+) を過剰発現した場合。

50

【図3】化合物1Aの単離工程。

【図4】化合物1Bの単離工程。

【図5】化合物1A及び1BのKRT85 mRNA発現抑制効果。Vehicle：対照群、化合物1A：化合物1A添加群、化合物1B：化合物1B添加群。

【図6】化合物1A及び1BのKRT36 mRNA発現抑制効果。Vehicle：対照群、化合物1A：化合物1A添加群、化合物1B：化合物1B添加群。

【図7】化合物1AのNMRの化学シフト値。

【図8】化合物1BのNMRの化学シフト値。

【発明を実施するための形態】

【0016】

10

本発明の式(1)で表される化合物(以下、「本発明の化合物」とも称する)中、 R^1 で示されるメチル基、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基及びカルボキシ基のうち、好ましくはメチル基又はヒドロキシメチル基である。

【0017】

R^2 で示される単糖残基としては、好ましくはヘキソース又はペントース残基であり、ヘキソース残基としては、グルコシル基、ガラクトシル基、マンノシル基、及びフラクトシル基等が挙げられ、ペントース残基としては、リキソシル基、キシロシル基、アラビノシル基、リボシル基等が挙げられる。

【0018】

本発明の化合物においては、 R^1 がメチル基である場合、 R^2 は単糖残基であるのが好ましく、ペントース残基であるのがより好ましい。 R^1 がメチル基であり、 R^2 がペントース残基である化合物(化合物1A)は、新規化合物である。

20

また、 R^1 がヒドロキシメチル基である場合、 R^2 は水素原子である(化合物1B)のが好ましい。

【0019】

式(1)で表される化合物には、エナンチオマー、ラセミ体又はジアステレオマー等の立体異性体が存在し得るが、本発明においては、全ての立体異性体及びそれぞれの異性体の混合物が包含される。

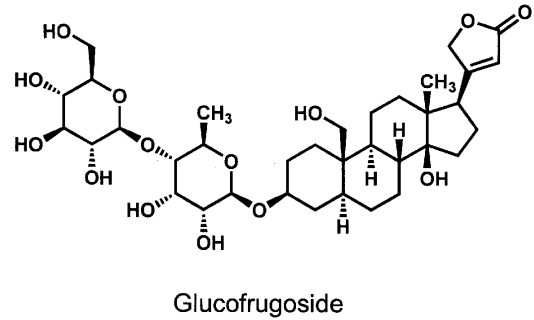
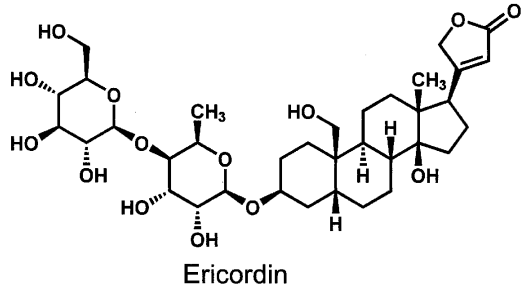
【0020】

R^1 がヒドロキシメチル基で、 R^2 が水素原子である化合物(化合物1B)には、例えば以下に示す化合物が報告されているが、本発明においてはこれらに限定されるものではない。

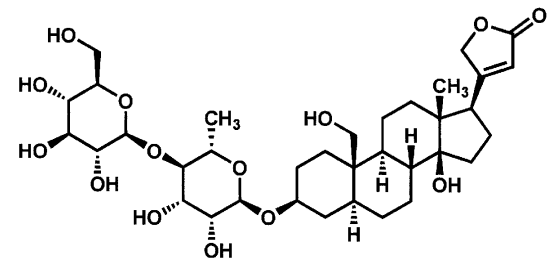
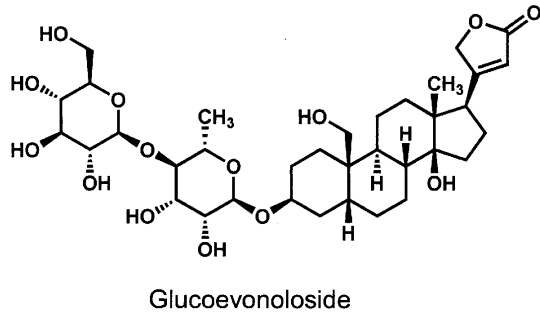
30

【0021】

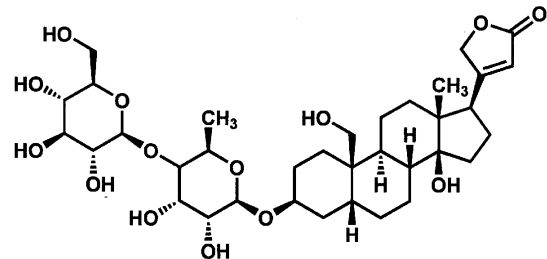
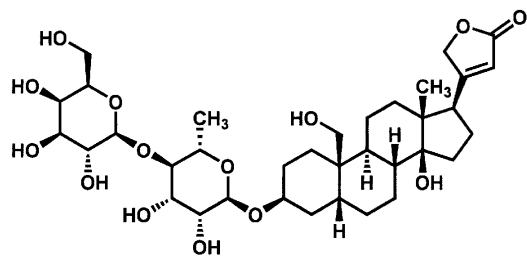
【化3】



10



20



30

【0022】

本発明の化合物は、植物体から抽出・精製することにより取得することができる。植物体からの抽出・精製は、例えば、ニシキギ科ニシキギ属のイースタンワフー（学名：E u o n y m u s a t r o p u r p u r e u s）の樹皮や、ガガイモ科トウワタ属のオオトウワタ（学名：A s c l e p i a s s y r i a c a）の根等から溶剤抽出して得られる抽出物を、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等の適当な分離精製手段を用いて分離・精製することにより得ることができる。

以下に、上記化合物1A及び化合物1Bの単離例を示す。

【0023】

<化合物1Aの単離>

40

1) イースタンワフーの樹皮の細断物に50%エタノールを加えて抽出し、ろ過してイースタンワフー抽出物を得る。

2) 1)で得られたイースタンワフー抽出物を、溶媒留去したのち、得られた固形物を酢酸エチル-水で液-液分配し、水層を乾固して固形分を得る。

3) 2)で得られた固形分をダイヤイオンHP20（三菱化学）を充填したカラムに供し、水-エタノール混合溶媒で溶出し、4画分を得る。

4) 3)で得られたエタノール溶出画分を、溶媒留去したのち、ODSカラム（0.1%ギ酸水-アセトニトリル混合溶媒）に供して、5画分を得る。

5) 4)で得られた化合物1A含有画分の溶媒を留去し、化合物1Aを単離する。

【0024】

50

< 化合物 1 B の単離 >

1) オオトウワタの根の細断物に 50% エタノールを加えて攪拌抽出し、ろ過してオオトウワタ抽出物を得る。

2) 1) で得られたオオトウワタ抽出物を、溶媒留去したのち、得られた固形物を酢酸エチル - 水で液 - 液分配し、水層を乾固して固形分を得る。

3) 2) で得られた固形分をダイヤイオン HP20 (三菱化学) を充填したカラムに供し、水 - エタノール混合溶媒で溶出し、4 画分を得る。

4) 3) で得られた 40% エタノール溶出画分を、溶媒留去したのち、ODS カラム (0.1% ギ酸水 - アセトニトリル混合溶媒) に供して、5 画分を得る。

5) 4) で得られた化合物 1 B 含有画分の溶媒を留去し、化合物 1 B を単離する。

10

【 0 0 2 5 】

尚、斯かる抽出・分画によれば、本発明の化合物が、単独のみならず、数種の混合物として取得される場合があるが、本発明においては、これらの何れをも用いることができる。

【 0 0 2 6 】

得られた本発明の化合物は、そのまま用いてもよく、適宜な溶媒で希釈した希釈液として用いてもよく、あるいは濃縮エキスや乾燥粉末としたり、ペースト状に調製したのもよい。また、凍結乾燥し、用時に、通常抽出に用いられる溶剤、例えば水、エタノール、水・エタノール混液等の溶剤で希釈して用いることもできる。また、リポソーム等のベシクルやマイクロカプセル等に内包させて用いることもできる。

20

【 0 0 2 7 】

後記実施例で示すように本発明の化合物は、ヘアシャフトを構成するケラチンとして知られている KRT85 及び KRT36 の各遺伝子に対する FOXN1 の転写活性を阻害し、KRT85 及び KRT36 の mRNA の発現を抑制する。

KRT85 遺伝子に変異があるヒトは、全身性の欠毛症状や脱毛症状を示すことが報告され <1) M Naeem et al., J Med Genet. 2006 Mar; 43(3): 274-279.、2) Yutaka Shimomura et al., Journal of Investigative Dermatology (2010) 130, 892-895 >、また、髪において、KRT36 は、KRT85 と発現部位が一部重なることが報告されており <Lutz Langbein et al., Journal of Investigative Dermatology (2010) 130, 55-73 >、KRT36 は KRT85 と同様に毛髪に重要であることが示唆される。したがって、KRT85 及び KRT36 の発現が抑制されれば、毛の成長が抑制されると考えられる。

30

【 0 0 2 8 】

FOXN1 は、winged-helix ファミリーに属する転写因子の一つで、ヌードマウスの原因遺伝子であることが知られており <Mecklenburg L. et al. Exp Dermatol. 14(11):797-810. (2005) >、FOXN1 にナンセンス変異を持つヒトは、先天性の脱毛症状を示すことが知られている <Frank J. et al. Nature. 398(6727):473-4. (1999) >。FOXN1 は、KRT85 遺伝子の転写を活性化することが知られていたが <Schlake T et al. Dev Dyn. 217(4):368-76. (2000) >、本発明者らは、FOXN1 を過剰発現することより、KRT85 遺伝子の他、KRT36 遺伝子についてもその転写が活性化されることを明らかにした (参考例 1 参照)。すなわち、FOXN1 は、毛の成長に重要であると考えられるケラチン分子の発現制御に深く関与すると考えられ、FOXN1 による当該ケラチン遺伝子の転写活性を阻害することより毛の成長を抑制できると考えられる。

40

【 0 0 2 9 】

したがって、本発明の化合物は、毛成長抑制が所望される動物、好ましくはヒトに投与することにより、毛成長を抑制し、当該作用により皮膚から毛を除去することができる。すなわち、本発明の化合物は、毛成長抑制剤、除毛又は脱毛剤となり、毛成長抑制作用によって毛の本数や太さを減らして除毛や脱毛の処理を容易にしたり、又は処理後の毛の成長を遅らせて除毛や脱毛の処理の持続性を高め、必要な除毛や脱毛処理の頻度を減少させたりすることができる。また、本発明の化合物は、KRT85 及び / 又は KRT36 の発現抑制剤となり得る。

50

また、本発明の化合物は、毛成長抑制剤、除毛又は脱毛剤、又はK R T 8 5及び/又はK R T 3 6の発現抑制剤を製造するために使用することができる。

また、本発明の化合物は、毛成長抑制、除毛又は脱毛、又はK R T 8 5及び/又はK R T 3 6の発現抑制のために使用することができる。

ここで、本発明の化合物のヒトへの使用は、治療的使用であってもよいが、非治療的使用であってもよい。「非治療的」とは、医療行為を含まない、すなわち人間を手術、治療又は診断する方法を含まない、より具体的には医師、又は医療従事者もしくは医師の指示を受けた者が人間に対して手術、治療又は診断を実施する方法を含まない概念である。本発明において、非治療的使用としては、美容的又は審美的な目的での脱毛、除毛もしくは毛成長抑制のための本発明の化合物の使用、例えばエステティシャン、美容師、理容師、トリマー等による使用等が挙げられる。

10

【0030】

本発明において、「毛成長抑制」とは、毛又は毛包の伸長を抑制する作用、あるいは毛径を縮小させる作用を意味する。また、成長を抑制される「毛」としては、頭髮、ひげ、手足や体幹部の毛等の頭髮以外の体毛が挙げられるが、好ましくは頭髮以外の体毛である。

【0031】

また、本発明のK R T 8 5及び/又はK R T 3 6の発現抑制には、遺伝子レベルでの発現抑制及びタンパク質レベルでの発現抑制が包含される。遺伝子レベルでの発現抑制にはm R N Aの発現抑制、好ましくはm R N Aへの転写抑制が挙げられ、タンパク質レベルでの発現抑制には翻訳における抑制が含まれるが、好ましくはK R T 8 5及び/又はK R T 3 6のm R N Aの発現抑制であり、より好ましくは、F O X N 1によるK R T 8 5及び/又はK R T 3 6遺伝子の転写阻害によるK R T 8 5及び/又はK R T 3 6のm R N Aの発現抑制が挙げられる。

20

尚、K R T 8 5とは、N C B Iのデータベース(O M I M) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>]にM I M I D : * 6 0 2 7 6 7として登録されているタンパク質を指し、K R T 3 6とは、M I M I D : * 6 0 4 5 4 0として登録されているタンパク質を指す。また、F O X N 1とは、M I M I D : * 6 0 0 8 3 8として登録されているタンパク質を指す。

【0032】

本発明の毛成長抑制剤、除毛又は脱毛剤、又はK R T 8 5及び/又はK R T 3 6の発現抑制剤は、毛成長抑制、除毛又は脱毛、K R T 8 5及び/又はK R T 3 6の発現抑制を目的とした、化粧品、医薬品、医薬部外品であり得、又は毛成長抑制、除毛又は脱毛、又はK R T 8 5及び/又はK R T 3 6の発現抑制を目的とした、化粧品、医薬品、医薬部外品を製造するための原料又は素材であり得る。

30

【0033】

本発明の化合物を含む、化粧品、医薬品、医薬部外品等の各種製剤の形態は、経口又は非経口投与の形態のいずれでも良いが、非経口投与の形態であるのが好ましく、皮膚外用剤であるのがより好ましい。具体的には、軟膏、乳化化粧料、クリーム、乳液、ローション、ジェル、エアゾール、パッチ、テープ、スプレー等の形態で用いるのが好ましい。

40

【0034】

当該皮膚外用剤は、毛成長抑制のみを目的とするものに限らず、保湿、美白、スキンケア、制汗、デオドラント、洗浄等の他の用途と毛成長抑制の用途を併せ持つ製剤であってもよい。

【0035】

上記製剤組成物は、それぞれ一般的な製造法により、本発明の化合物を、製剤上許容し得る担体、例えば、各種油剤、界面活性剤、ゲル化剤、防腐剤、酸化防止剤、溶剤、アルコール、水、キレート剤、増粘剤、紫外線吸収剤、乳化安定剤、pH調整剤、色素、香料等とともに混合、分散した後、所望の形態に加工することによって得ることができる。また、これらの製剤組成物には、本発明の化合物の他、それぞれ化粧品、医薬部外品、医薬品

50

等の製剤の種類に応じて、適宜、他の植物抽出物、殺菌剤、保湿剤、抗菌剤、清涼剤等の薬効成分を本発明の効果を妨害しない範囲で適宜配合することができる。また、毛成長抑制効果を更に高めるべく、他の抑毛成分を適宜配合することもできる。

【0036】

当該製剤組成物中の本発明の化合物の含有量は、一般的に好ましくは0.00001質量%以上、より好ましくは0.0001質量%以上、且つ好ましくは10質量%以下、より好ましく5質量%以下であり、また好ましくは0.00001~10質量%、より好ましくは0.0001~5質量%である。

【0037】

上記医薬品、医薬部外品、化粧料の投与量は、対象の毛成長の抑制を達成できる量であり得る。好ましくは、有効量とは、投与群の毛包伸長を、未投与群の95%以下、好ましくは90%以下、より好ましくは80%以下に低下させることができる量であり得る。また好ましくは、有効量とは、投与群の毛径を、未投与群の95%以下、好ましくは90%以下、より好ましくは80%以下に低下させることができる量であり得る。

10

【0038】

当該投与量は、対象者の状態、体重、性別、年齢又はその他の要因に従って変動し得るが、成人(60kg)1人当たり1日、本発明の化合物として、例えば好ましくは0.01mg以上、より好ましくは0.1mg以上であり、且つ好ましくは1000mg以下、より好ましくは100mg以下である。また、好ましくは0.01~100mg、より好ましくは0.1~100mg、さらにより好ましくは1~10mgである。

20

また、当該製剤は、任意の摂取・投与計画に従って摂取・投与され得るが、1日1回~数回に分け、数週間~数カ月間継続して投与することが好ましい。

上記化粧品、医薬品又は医薬部外品の適用の対象としては、それを必要としていれば特に限定されないが、毛成長抑制、除毛又は脱毛を目的とするヒトが好ましい。

【0039】

上述した実施形態に関し、本発明においては更に以下の態様が開示される。

<1>下記式(1)で表される化合物を有効成分とする毛成長抑制剤。

<2>下記式(1)で表される化合物を有効成分とする除毛又は脱毛剤。

<3>下記式(1)で表される化合物を有効成分とするKRT85及び/又はKRT36発現抑制剤。

30

【0040】

<4>毛成長抑制剤を製造するための、下記式(1)で表される化合物の使用。

<5>除毛又は脱毛剤を製造するための、下記式(1)で表される化合物の使用。

<6>KRT85及び/又はKRT36発現抑制剤を製造するための、下記式(1)で表される化合物の使用。

【0041】

<7>毛成長抑制に使用するための、下記式(1)で表される化合物。

<8>除毛又は脱毛に使用するための、下記式(1)で表される化合物。

<9>KRT85及び/又はKRT36発現抑制に使用するための、下記式(1)で表される化合物。

40

【0042】

<10>下記式(1)で表される化合物を適用することを含む毛成長抑制方法。

<11>下記式(1)で表される化合物を適用することを含む除毛又は脱毛方法。

<12>下記式(1)で表される化合物を適用することを含むKRT85及び/又はKRT36発現抑制方法。

【0043】

<13>上記<3>、<6>、<9>又は<12>において、KRT85及び/又はKRT36の発現抑制は、FOXN1によるKRT85遺伝子及び/又はKRT36遺伝子の転写活性を阻害することによりなされるものである。

<14>上記<1>~<13>において、式(1)で表される化合物は、好ましくは、R

50

¹ がメチル基であり、² がペントース残基である化合物、又は¹ がヒドロキシメチル基で、² が水素原子である化合物である。

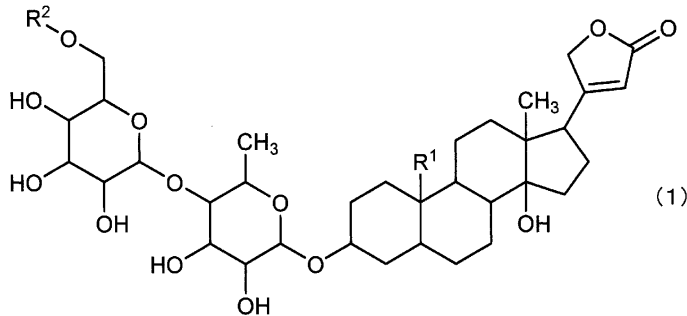
< 15 > 上記 < 7 > ~ < 9 > において、上記使用は、好ましくは、美容的又は審美的な目的での脱毛、除毛もしくは毛成長抑制のための非治療的な使用である。

< 16 > 上記 < 10 > ~ < 12 > において、上記方法は、好ましくは、美容的又は審美的な目的での脱毛、除毛もしくは毛成長抑制のための非治療的な方法である。

< 17 > 上記 < 1 > ~ < 2 >、< 4 > ~ < 5 >、< 7 > ~ < 8 >、< 10 > ~ < 11 > において、毛は頭髪以外の体毛である。

【 0 0 4 4 】

【 化 4 】



10

【 0 0 4 5 】

〔 式中、¹ はメチル基、ヒドロキシメチル基、アルデヒド基又はカルボキシ基を示し、² は水素原子又は単糖残基を示す。 〕

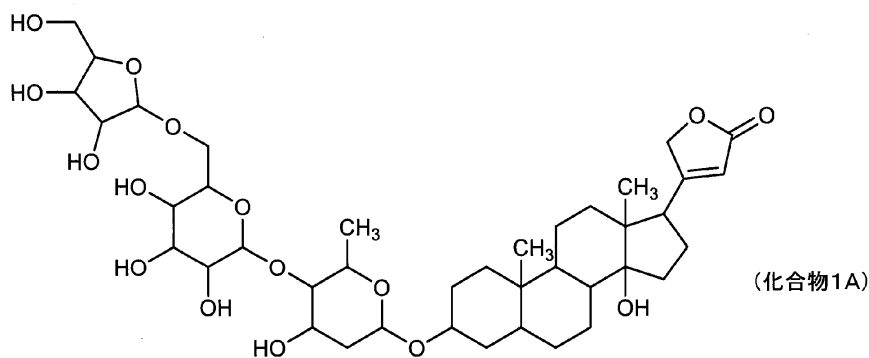
20

【 0 0 4 6 】

< 18 > 下記 1 A で表される化合物。

【 0 0 4 7 】

【 化 6 】



30

【 実施例 】

【 0 0 4 8 】

以下、実施例を示し、本発明をより具体的に説明する。

40

参考例 1 FOXN1 による KRT85 遺伝子及び KRT36 遺伝子の転写活性化
(1) ヒト腎細胞 (HEK293A 細胞) は ATCC より購入し、DMEM (High Glucose、10% Heat-inactivated FBS) 中で、37、5% CO₂ 条件下で培養した。

HEK293A 細胞を 6 well plate に 8×10^5 cells/well になるよう 2 mL ずつ播種した。

24 時間後に、ヒト FOXN1 の cDNA が発現用ベクターに挿入されたヒト FOXN1 発現プラスミド (FOXN1 / pcDNA3.1(+)) 及びコントロールプラスミド (MOCK / pcDNA3.1(+)) を LipofectAMINE 2000 reagent (Life Technologies) を用いて、細胞にトランスフェクショ

50

ンした。トランスフェクションは付属の使用説明書に従って実施した。

24時間後に、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。total RNAの調製は付属の使用説明書に従って実施した。total RNAは分光光度計にて濃度を測定した。

濃度をそろえたtotal RNAとOligo(dT)20を用い、ThermoScript RT-PCR system (Life Technologies)を用いて、逆転写反応を行った。逆転写反応は付属の使用説明書に従って行った。逆転写反応後のサンプルは、使用まで-20℃で保存した。

Real-time PCRによるmRNA発現の定量は、POWER SYBR-green PCR master mix (Applied biosystems)を用いて、7500リアルタイムPCRシステム (Applied biosystems)を用いて行った。反応液は全量で50μLとし、95℃で15秒の変性反応、60℃で1分のアニーリング及び伸長反応の条件で増幅した。

KRT85 mRNA発現量又はKRT36 mRNA発現量は、コントロール遺伝子RPLP0 mRNA発現量により補正した。

RT-PCRに使用したプライマーを以下に示す。

【0049】

【表1】

KRT85 forward	CATGTGACCTCGCAGTTGAGA	配列番号1
KRT85 reverse	GTTCACTGAATAGCAAGACCTGTCC (NM_002283.3)	配列番号2
KRT36 forward	GTGGTACGAGTTTCAGATCCCAT	配列番号3
KRT36 reverse	GATCTTCTGCTGGAAATCTCGA (NM_003771.4)	配列番号4
RPLP0 forward	TCCTGAGTGATGTGCAGCTGAT	配列番号5
RPLP0 reverse	AGCACTTCAGGGTTGTAGATGCT (NM_053275.3)	配列番号6

【0050】

得られた数値は平均値±標準偏差で示し、MOCKとFOXN1の数値データに関して、non-paired t-testで有意差検定を行った。

【0051】

(2) 結果

結果を図1及び図2に示す。

FOXN1過剰発現により、KRT85 mRNA発現量及びKRT36 mRNA発現量が有意に増加することが確認された。よって、FOXN1がKRT85遺伝子及びKRT36遺伝子の転写を活性化することが示された。

【0052】

製造例1 化合物1Aの単離

(1) イースタンワフー (Euonymus atropurpureus) の乾燥樹皮20gに50%エタノール水溶液200mLを加え、室温で7日間浸漬した。これをろ過し、イースタンワフー抽出物を得た。

【0053】

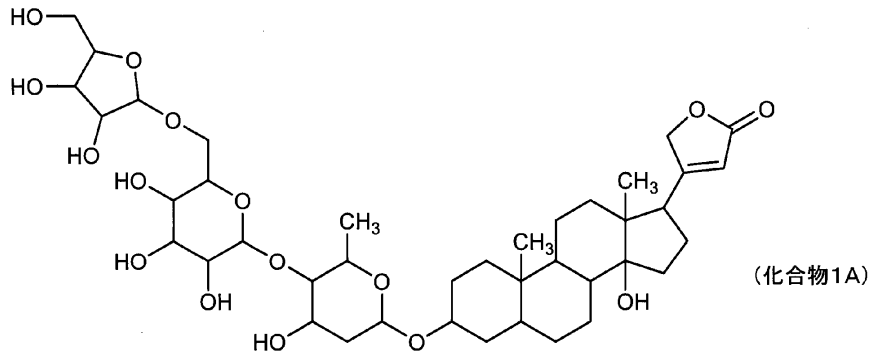
(2) (1)で得られたイースタンワフー抽出物の固形分1.0gを酢酸エチル-水で液-液分配した。その水層を乾固した後、Diaion HP-20で4画分に分画した。そのうち、99.5%エタノール溶出画分をODSカラムで5画分に分画し、それぞれW100-1~5とした。これら画分を、分画前で1%(w/v)になるようにそれぞれ50%エタノールで希釈し、W100-1~5画分とした(図3参照)。W100-3画分をNMR分析した結果を以下に示す。その結果、W100-3画分は、以下に示す化合物1A (4-(3-((5-((6-(((3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)oxy)

methyl)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-4-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-14-hydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)furan-2(5H)-one) であると同定された。

NMR (ピリジン - D₅) : 図 7 に示す。

【 0 0 5 4 】

【 化 7 】



10

【 0 0 5 5 】

製造例 2 化合物 1 B の単離

(1) オオトウワタ (*Asclepias syriaca*) の乾燥根 2 0 g に 5 0 % エタノール水溶液 2 0 0 m L を加え、室温で 7 日間浸漬した。これをろ過し、オオトウワタ抽出物を得た。

20

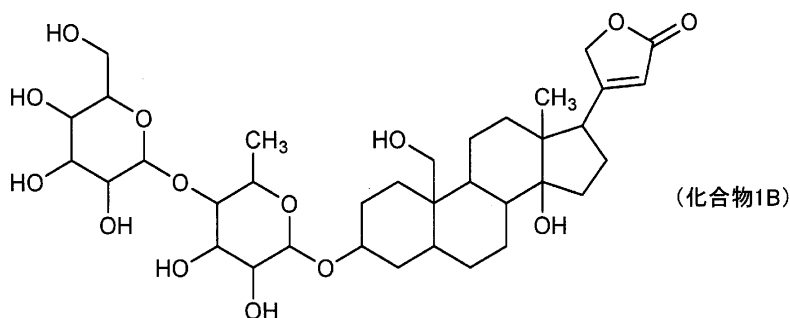
(2) (1) で得られたオオトウワタ抽出物の固形分 1 . 0 g を酢酸エチル - 水で液 - 液分配した。その水層を乾固した後、Diaion HP - 2 0 で 4 画分に分画した。そのうち、4 0 % エタノール溶出画分を O D S カラムで 5 画分に分画し、それぞれ W 4 0 - 1 ~ 5 とした。これら画分を、分画前で 1 % (w / v) になるようにそれぞれ 5 0 % エタノールで希釈し、W 4 0 - 1 ~ 5 画分とした (図 4 参照) 。 W 4 0 - 3 画分を N M R 分析した結果を以下に示す。その解析の結果、W 4 0 - 3 画分は、以下に示す化合物 1 B (4 - (3 - ((3 , 4 - dihydroxy - 6 - methyl - 5 - ((3 , 4 , 5 - trihydroxy - 6 - (hydroxymethyl) tetrahydro - 2 H - pyran - 2 - yl) oxy) tetrahydro - 2 H - pyran - 2 - yl) oxy) - 1 4 - hydroxy - 1 0 - (hydroxymethyl) - 1 3 - methyl hexadecahydro - 1 H - cyclopenta [a] phenanthren - 1 7 - yl) furan - 2 (5 H) - one) であると同定された。

30

NMR (ピリジン - D₅) : 図 8 に示す。

【 0 0 5 6 】

【 化 7 】



40

【 0 0 5 7 】

実施例 1 K R T 8 5 及び K R T 3 6 の発現抑制効果

(1) ヒト腎細胞 (H E K 2 9 3 A 細胞) は A T C C より購入し、D M E M (H i g h G l u c o s e 、 1 0 % H e a t - i n a c t i v a t e d F B S) 中で、3 7 、 5 % C O ₂ 条件下で培養した。

50

ヒトFOXN1のcDNAが発現用ベクターに挿入されたヒトFOXN1発現プラスミド(FOXN1/pcDNA3.1(+))を制限酵素処理により平滑化し、LipofectAMINE 2000 reagent(Life Technologies)を用いて、HEK293A細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションは付属の使用説明書に従って実施した。24時間後に、G418(Promega)を添加し遺伝子が導入された細胞を選別し、カップ法によりFOXN1安定発現細胞を得た。

FOXN1安定発現細胞を12well plateに 4×10^5 cells/wellになるよう2mLずつ播種した。

24時間後に、試験物質を添加した。試験物質としては、製造例1及び2で単離した化合物1A又は化合物1Bを分画前で0.1vol%(最終濃度0.001質量%)となるように培地に添加した。対照として、同量の50%エタノール溶液(Vehicle)を培地に添加した。

10

24時間後に、RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。total RNAの調製は付属の使用説明書に従って実施した。total RNAは分光光度計にて濃度を測定した。

濃度をそろえたtotal RNAとOligo(dT)20を用い、ThermoScript RT-PCR system(Life Technologies)を用いて、逆転写反応を行った。逆転写反応は付属の使用説明書に従って行った。逆転写反応後のサンプルは、使用まで-20で保存した。

参考例1と同様に、Real-time PCRにより、mRNAの発現量を求めた。

20

尚、KRT85 mRNA発現量又はKRT36 mRNA発現量は、コントロール遺伝子RPLP0 mRNA発現量により補正した。

得られた数値は平均値±標準偏差で示し、Vehicleと試験物質添加群の数値データに関して、non-paired t-testで有意差検定を行った。

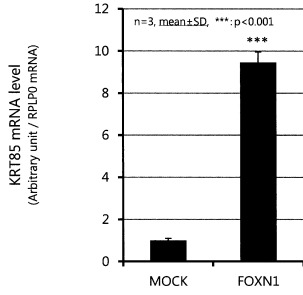
【0058】

(2) 結果

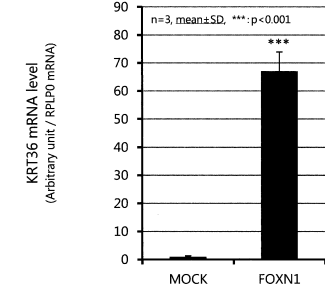
結果を図5及び図6に示す。

化合物1A及び化合物1Bの添加により、FOXN1の過剰発現によって増加したKRT85 mRNA発現量及びKRT36 mRNA発現量が減少することが確認された。

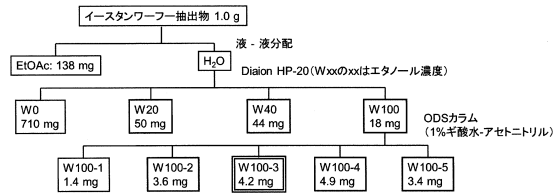
【 図 1 】



【 図 2 】



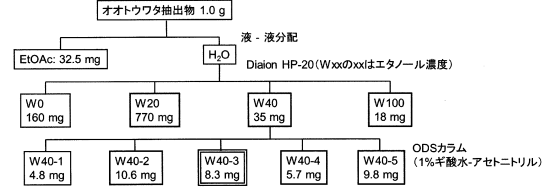
【 図 3 】



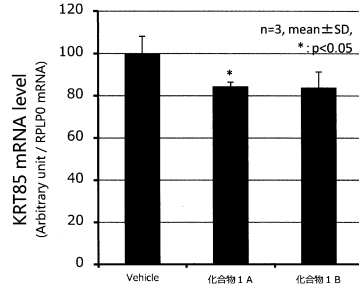
【 図 7 】

位置	13C/ppm	1H/ppm	J/Hz
C1	30.8	1.51	m
		1.68	m
C2	27.1	1.60	m
		1.90	m
C3	73.2	4.23	m
C4	30.5	1.52	m
		1.90	m
C5	37.0	1.78	m
C6	27.0	1.15	m
		1.77	m
C7	22.0	1.30	m
		2.06	m
C8	41.8	1.74	m
C9	35.5	1.70	m
C10	35.5		
C11	21.5	1.14	m
		1.29	m
C12	39.8	1.33	m
		1.38	m
C13	50.1		
C14	84.6		
C15	33.1	1.84	m
		2.04	m
C16	27.3	1.53	m
		2.05	m
C17	51.4	2.76	8.8, 5.6 (dd)
C18	16.2	0.99	s
C19	23.9	0.85	s
C20	176.1		
C21	73.7	5.04	8.1, 1.1 (dd)
		5.32	8.1, 1.1 (dd)
C22	117.6	6.12	brs
C23	174.6		
C1'	98.7	5.41	9.7, 1.0 (dd)
C2'	39.3	2.22	12.3, 9.7, 2.6 (ddd)
		2.45	12.3 (brd)
C3'	67.7	4.92	m
C4'	84.1	3.85	9.4, 2.7 (dd)
C5'	88.9	4.37	9.4, 6.1 (dd)
C6'	18.8	1.59	6.1 (d)
C1''	105.8	4.88	7.7 (d)
C2''	75.0	3.90	7.7 (t)
C3''	78.3	4.16	7.7 (t)
C4''	72.0	3.99	8.8 (brt)
C5''	76.8	4.07	m
C6''	70.0	4.09	m
C1'''	105.4	4.92	8.8 (d)
C2'''	72.4	4.44	8.8 (d)
C3'''	74.3	4.15	m
C4'''	68.1	4.29	m
C5'''	66.5	3.71	10.9 (d)
		4.27	m

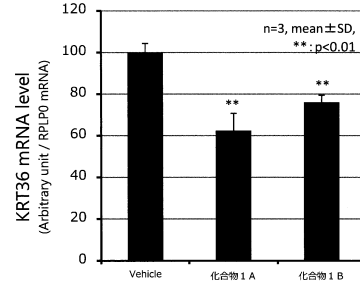
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 8 】

位置	13C/ppm	1H/ppm	J/Hz
C1	32.5	0.83	13.2, 3.4 (td)
		2.64	13.2, 3.6 (dt)
C2	30.7	2.04	m
		2.24	m
C3	77.4	4.03	m
C4	35.4	1.61	12.4 (q)
		1.86	m
C5	44.7	1.07	m
C6	28.7	1.11	m
		1.16	m
C7	28.1	1.17	m
		2.34	m
C8	42.2	2.072	m
C9	50.6	1.00	m
C10	39.8		
C11	23.4	1.76	m
		1.97	m
C12	40.3	1.25	13.6, 3.4 (td)
		1.38	13.6, 3.4 (dt)
C13	50.2		
C14	84.8		
C15	33.1	1.85	m
		2.06	m
C16	27.3	1.94	m
		2.067	m
C17	51.5	2.75	8.8, 5.3 (ddd)
C18	16.3	1.01	s
C19	59.0	3.910	m
		4.04	m
C20	176.2		
C21	73.7	5.02	18.1, 1.6 (dd)
		5.30	18.1, 1.6 (dd)
C22	117.6	6.09	s
C23	174.6		
C1'	99.4	5.43	7.9 (d)
C2'	72.1	3.912	m
C3'	72.5	3.06	m
C4'	83.6	3.83	9.5, 2.4 (dd)
C5'	68.8	4.52	9.5, 6.3 (dd)
C6'	18.5	1.72	6.3 (d)
C1''	106.4	5.07	m
C2''	75.2	3.98	m
C3''	78.0	4.25	m
C4''	71.5	4.26	m
C5''	78.0	3.94	m
C6''	62.5	4.36	11.7, 4.8 (dd)
		4.44	11.7, 2.6 (dd)

【配列表】

0006603551000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00	
C 0 7 J 19/00	(2006.01)	C 0 7 J 19/00	C S P
A 6 1 K 36/37	(2006.01)	A 6 1 K 36/37	
A 6 1 K 36/27	(2006.01)	A 6 1 K 36/27	
A 6 1 K 125/00	(2006.01)	A 6 1 K 125:00	
A 6 1 K 129/00	(2006.01)	A 6 1 K 129:00	

(72)発明者 渡邊 学
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 大越 慶太
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 長澤 安曇
 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

審査官 池田 周士郎

(56)参考文献 特開 2 0 1 1 - 0 9 7 9 2 7 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 8 1 0 8 0 (U S , A 1)
 特開 2 0 0 4 - 1 3 7 1 6 1 (J P , A)
 特表 2 0 1 1 - 5 3 0 5 3 5 (J P , A)
 特開昭 5 8 - 0 9 2 7 0 0 (J P , A)
 特開 2 0 0 0 - 1 9 1 4 5 9 (J P , A)
 特開平 1 1 - 1 4 7 8 9 4 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9
 A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0
 A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8
 C 0 7 J 1 / 0 0 - 7 5 / 0 0
 A 6 1 K 3 1 / 3 3 - 3 3 / 4 4
 A 6 1 P 1 7 / 0 0 - 1 7 / 1 8
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 A 6 1 K 1 2 5 / 0 0
 A 6 1 K 1 2 9 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)