

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6342391号
(P6342391)

(45) 発行日 平成30年6月13日(2018.6.13)

(24) 登録日 平成30年5月25日(2018.5.25)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	M
			G O 1 N	33/53	D

請求項の数 16 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2015-521027 (P2015-521027)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月15日(2013.7.15)
 (65) 公表番号 特表2015-528699 (P2015-528699A)
 (43) 公表日 平成27年10月1日(2015.10.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/064926
 (87) 国際公開番号 W02014/009566
 (87) 国際公開日 平成26年1月16日(2014.1.16)
 審査請求日 平成28年4月22日(2016.4.22)
 (31) 優先権主張番号 1256766
 (32) 優先日 平成24年7月13日(2012.7.13)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 503028525
 ラボラトワール エクспанシアンス
 フランス国、92400 クルブヴォア、
 アヴニュー ドゥ ラルシュ 10
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100126099
 弁理士 反町 洋
 (72) 発明者 フィリップ、ムシカ
 フランス国ベルサイユ、リュ、ド、ラ、パ
 ロワス、32

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小児皮膚の分子マーカーの同定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーを同定するための方法であって、下記の工程：

a) 16歳未満のドナーから得られた少なくとも1つの再生皮膚培養物(A)において候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

b) 少なくとも1つの対照再生皮膚培養物(B)において前記候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

c) 前記工程a)の発現レベルと前記工程b)の発現レベルとの間の比を計算する工程、および

d) 前記候補マーカーが小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーであるかどうかを判定する工程

を含んでなり、

前記生物学的マーカーが、

- ・ ストレス応答マーカー G P 3 X (グルタチオンペルオキシダーゼ3)、
- ・ M G S T 1 (ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ1) および I L - 8 (インターロイキン8) からなる群から選択される炎症マーカー、
- ・ 免疫マーカー D E F B 1 (デフェンシン 1)、
- ・ C L D N 1 (クローディン1)、 I V L (インボルクリン) および K R T 1 (ケラチン1) からなる群から選択される表皮バリアマーカー、ならびに/または

・FN1 (フィブロネクチン1)、NID1 (ニドゲン1)、NOTCH1 (Notchホモログ1, 移行関連)、KRT19 (ケラチン19)、ITGB1BP1 (インテグリン1結合タンパク質)、ITGA6 (インテグリン6) およびITGB4 (インテグリン4) からなる群から選択される多能性皮膚幹細胞マーカーからなる群から選択される遺伝マーカーまたはタンパク質マーカーである、方法。

【請求項2】

培養物(A)が0~1か月齢の間の新生児、1か月~2歳の間の乳児、および2~16歳の間の小児からなる群から選択されるドナーから得られる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記候補マーカーが
 ・前記対照培養物(B)が成人から得られる場合、かつ
 ・前記工程c)の比が1と異なる場合
 に小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーである、請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項4】

前記候補生物学的マーカーの発現レベルが工程a)において少なくとも2つの再生皮膚培養物(A)および(A')で測定される、請求項1~3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記培養物(A)および(A')が2つの異なる年齢群に属する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記対照培養物(B)が成人ドナーから得られる、請求項1~5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項7】

前記候補生物学的マーカーが遺伝子マーカーであり、該遺伝子マーカーの発現レベルが、ノーザンブロット、サザンブロット、PCR、RT-PCR、RT定量的PCR、SAGEおよびその派生形、核酸チップ、特に、cDNAチップ、オリゴヌクレオチドチップおよびmRNAチップ、組織チップおよびRNA-Seqから選択される方法を用いて決定される、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記候補生物学的マーカーが、請求項1に記載のいずれかの遺伝子のタンパク質産物であるタンパク質マーカーである、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項9】

前記タンパク質マーカーの発現レベルが、免疫組織学、免疫沈降、ウエスタンブロット、ドットブロット、ELISAまたはELISPOT、タンパク質チップ、抗体チップ、もしくは免疫組織化学と併用する組織チップ、FRETまたはBRET技術、特に共焦点顕微鏡および電子顕微鏡法を含む顕微鏡または組織化学法、1または複数の励起波長および好適な光学的方法の使用に基づく方法、例えば、電気化学的方法(ボルタンメトリーおよび電流滴定技術)、原子間力顕微鏡、および高周波法、例えば、多極性、共焦点および非共焦点共鳴分光法、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折率または屈折率の検出(例えば、表面プラズモン共鳴の手段、偏光解析法、共振ミラー法の手段などによる)、フローサイトメトリー、放射性同位元素または磁気共鳴イメージング、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)の手段、HPLC-質量分光光度法の手段、液体クロマトグラフィー/質量分光光度法/質量分析(LC-MS/MS)の手段による分析から選択される方法を用いて決定される、請求項8に記載の方法。

40

【請求項10】

有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物の忍容性を評価するための方法であって、下記の工程:

- a) 少なくとも1つの小児再生皮膚培養物(A)を取得する工程、
- b) 有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物を培養物(A)と接触させる工程、

50

c) 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも 1 つの候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

d) 対照再生皮膚培養物において前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

e) 前記工程 c) の発現レベルと前記工程 d) の発現レベルとの間の比を計算する工程、および

f) 前記有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物が小児の皮膚によって十分忍容されるかどうかを判定する工程

を含み、

前記生物学的マーカーが IL - 8 (インターロイキン 8) である、方法。

【請求項 1 1】

前記工程 d) の対照培養物が、前記有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物と接触されていない培養物である、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記方法が前記有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物で処置した培養物 (A) における細胞生存率を決定し、対照培養物における細胞生存率を決定し、両者を比較するためのさらなる工程を含む、請求項 1 0 または 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

培養物 (A) および / または (A') および / または (B) が、0 ~ 1 か月齢の間の新生児、1 か月 ~ 2 歳の間の子供、および 2 ~ 16 歳の子供からなる群から選択されるドナーから得られる、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記培養物の細胞が、皮膚組織の外植片または皮膚細胞に分化した幹細胞から得られる、請求項 1 0 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記培養物が、少なくとも線維芽細胞またはケラチノサイトを含んでなる、請求項 1 0 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

再生皮膚が、真皮モデル、表皮モデル、皮下組織モデル、真皮と表皮とを含む皮膚モデル、および真皮と表皮と皮下組織とを含む皮膚モデルを含む群から選択される、請求項 1 0 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

緒論

皮膚は、全身を覆う、抵抗性がありかつ柔軟な組織の形態として一緒に分類される細胞および高分子のセットである。皮膚の主な機能は、内部環境および外部環境の間である種の交換を可能としつつ、環境傷害に対して保護バリアを作り出すというものである。皮膚は身体の生理条件と環境条件によって変調される多くの代謝プロセスの場である。皮膚は、表皮と真皮という 2 つの連結された層に皮下組織を伴ったものからなる。

【0002】

表皮は、身体の保護をその主な役割とし、皮膚の最上層を形成し、皮膚の不透過性およびその抵抗性を保証する。その中には、基底層(stratum basalis)、有棘層(stratum spinosum)、顆粒層(stratum granulosum)、および角質層(stratum corneum)の 4 つの独立した細胞層を識別することができる。表皮には種々の細胞種が共存するが、ケラチノサイトが大多数を占める(90%)。その特徴的な活性は、表皮中の総タンパク質の 95% に相当するケラチンの合成である。水に不溶性線維性タンパク質であるケラチンは、外的攻撃(熱、冷、脱水)から皮膚を保護する表皮の角質層の部分形成する。

【0003】

表皮は、真皮 - 表皮接合部または表皮基底膜として知られる領域によって真皮に結合されている。この構造は真皮と表皮との接着を確保し、皮膚の弾力を部分的に担う機械的支

10

20

30

40

50

持として働く。表皮は、基底ケラチノサイトと真皮線維芽細胞の両方によって作り出され、基底膜と真皮乳頭層に存在するアンカーシートを連結する、アンカーシートの一部であるⅠⅤ型コラーゲンを高レベルで含有する。

【 0 0 0 4 】

皮膚の内層である真皮は、細胞外マトリックスとして知られる複合媒体中に分散している細胞（線維芽細胞）からなる線維弾性結合組織である。このマトリックスは、コラーゲンおよびエラスチン線維、糖タンパク質（フィブロネクチンおよびラミニン）およびプロテオグリカン（中心タンパク質＋グリコサミノグリカンまたはGAG）からなる。これらの化合物の性質および量が皮膚の機械的特性を決定し、加齢において獲得される皮膚表面の最も顕著な生理病理学的変化の源となる。

10

【 0 0 0 5 】

皮下組織は、皮膚の最下層の最も厚い層である。皮下組織は真皮に陥入し、コラーゲンおよびエラスチン線維によって下層の真皮に結合されている。皮下組織は、脂肪の蓄積と貯蔵に特化した細胞種である脂肪細胞から本質的になる。皮下組織を形成する脂肪細胞は、結合組織によって別の小葉に分類される細胞である。脂肪細胞はエネルギー貯蔵庫として働き、熱的および機械的保護としても働く。

【 0 0 0 6 】

子宮外生活への適応は、出生時に始まり、生後1年間続くプロセスである。生後1か月は、子宮外環境への生理学的適応を可能とする皮膚の機能的再編の期間に相当する。

【 0 0 0 7 】

例えば、皮膚の酸性化は出生後に高まり、1か月前後で、成人で見られる値と同等の値に達する。他方、皮脂分泌は、出生時には顕著であるが、1週目の終わりから低下し、思春期までは、成人で見られるレベルより低いレベルに留まる(Fluhr et al., Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)。

20

【 0 0 0 8 】

ラマン分光技術を用いた従来の生物計測学的測定に関連する最近の臨床試験では(Fluhr et al., Br J Dermatol, 166(3): 483-90, 2012)、角質層の水和程度および水分含量が出生時(1~15日齢の新生児)では低いが、天然保湿因子(NMF)レベルは最大であることを示した。その後、このレベルは低下するが、水和は安定する。著者らは、皮膚のこの低い酸性化と低い水和が補償的調節機構を活性化し(特に、顕著なNMF産生を伴って)、新生児の新しい環境への適応を可能とするとの仮説を立てている。同じ研究で、6か月の乳児におけるNMFレベルは成人群で見られるものより低いと分かったことが示されている。別のグループによって示されたこの低いNMFレベル(Nikolovski et al., J Invest Dermatol, 128: 1728-36, 2008)は、乳児の皮膚が、水を取り込む能力に関してある種の未成熟性を示し、それに関連する、バリア機能の質と能力に影響を及ぼすと考えられる機構を調節していることを示唆する。

30

【 0 0 0 9 】

不完全な皮膚成熟は、重大な臨床結果を持ち得る。例えば、高いpH値によって微生物病原体の増殖が有利となることが知られている(Korting et al., Acta Derm Venereol., 70(5): 429-431, 1990)。従って、生後1か月以内に皮膚の酸性化をさらに低減するような洗浄剤を使用しないことが重要である。

40

【 0 0 1 0 】

よって、生後の第一段階に含まれる複雑なプロセスを理解することで、各年齢群に特に好適な忍容性および有効性を備えた有効薬剤または有効薬剤の組合せを同定することができると思われる。しかしながら、我々は、生後1か月または1年以内の皮膚変化の生物学的マーカーおよび分子マーカーを持っていない。

【 0 0 1 1 】

従って、当技術分野では、出生時から成人までの皮膚変化に特異的なマーカーを同定する必要がある。

【 図面の簡単な説明 】

50

【 0 0 1 2 】

【図 1】再生表皮 (A) およびケラチノサイト (B) における、年齢の関数としてのバリア機能遺伝子 *CLDN1*、*IVL*、*KRT1* の発現の進行。1 か月の発現レベルを任意に 1 0 0 % とした。

【図 2】年齢の関数としてのストレス応答遺伝子 *GP3X* (A) および生得免疫遺伝子 *DEFB1* (B) の発現の進行。1 か月の発現レベルを任意に 1 0 0 % とした。

【図 3】ケラチノサイトにおける、年齢の関数としての炎症遺伝子 *MGST1* の発現の進行。1 か月の発現レベルを任意に 1 0 0 % とした。

【図 4】ケラチノサイトにおける、年齢の関数としての幹細胞遺伝子：*FN1*、*NID1*、*NOTCH1*、*KRT19*、*IGTB1P1*、*ITGA6* および *ITGB4* の発現の進行。1 か月の発現レベルを任意に 1 0 0 % とした。

【図 5】1 か月のドナーから得た再生表皮に対する、アボカド・ペルセオース (avocado peraseose) に基づくベビー用品の忍容性の組織学的分析の手段による評価。パラフィン包埋組織をヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。

【発明の具体的説明】

【 0 0 1 3 】

本発明は、出生時から思春期までの小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーを提供することを目的とする。

【 0 0 1 4 】

よって、本発明による方法は、小児の皮膚に差次的に発現される分子マーカー、すなわち、小児の皮膚と成人の皮膚で発現が異なる分子マーカーを同定することを可能とする。よって、本発明は、出生時由来の皮膚を分子レベルで特徴付けるために、また、その変化を経時的にモニタリングするために好適である。

【 0 0 1 5 】

用語「小児」は、本発明によれば、1 6 歳未満の被験者を意味する。従って、本発明による小児の範疇には、0 ~ 1 か月齢の間の新生児、1 か月 ~ 2 歳の間の子供、および少なくとも 2 歳の子供が含まれる。「新生児」は、本明細書で使用する場合、十分等しく満期出生でも未熟出生でもよい。

【 0 0 1 6 】

あいまいさを排除するために、本出願で使用する用語「小児」は、さらに明瞭化することなく、その最も一般的な意味、すなわち、1 6 歳未満の被験者を指すものと理解されるべきである。本発明による「成人」は、小児でない被験者、すなわち言い換えれば、1 6 歳以上の被験者である。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、本発明による方法は、皮膚の人種的もしくは地理学的起源、またはそのフォトタイプを問わずに使用され得る。従って、それはコーカサス、アフリカ、アジア、南アメリカ、メラネシアまたは他の起源のものであってよく、さらに、本発明に影響を及ぼさない限り、フォトタイプ I、II、III、IV、V または VI を有してよい。実際に、本発明は、ドナーの年齢に依存するのみで、いずれの皮膚タイプも特徴付ける生物学的マーカーを同定することを目的とする。

【 0 0 1 8 】

さらに、当業者は、本発明の教示が粘膜にも適用され得ることを容易に理解するであろう。粘膜は上皮組織および下にある結合組織の薄い層であり、皮膚と同様に、内部環境と外部環境の間の境界にある。さらに、これらの粘膜の一部は皮膚に隣接している。

【 0 0 1 9 】

よって、本発明は、1 6 歳未満の小児の皮膚を特徴付ける少なくとも 1 つの生物学的マーカーを同定するための方法であって、下記の工程：

a) 1 6 歳未満のドナーから得られる皮膚細胞のサンプル (A) を取得する工程、

b) 工程 a) のサンプルにおいて候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、および

10

20

30

40

50

c) 前記候補マーカーが16歳未満の小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーであるかどうかを判定する工程を含んでなる方法に関する。

【0020】

本発明による「生物学的マーカー」は、16歳未満の小児の細胞の代謝と成人の細胞の代謝の間の少なくとも1つの違いによって定義される。有利には、本発明による生物学的マーカーは、新生児、乳児および/または2~16歳の小児の細胞の代謝と成人の細胞の代謝の間の少なくとも1つの違いによって定義される。

【0021】

本発明による用語「小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカー」は、16歳未満の小児の皮膚において特異的に発現が高いまたは発現が低いマーカーを意味する。言い換えれば、小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーは、年齢によって発現が異なり、小児の皮膚と成人の皮膚との間で差次的に発現されるマーカーである。

10

【0022】

上記のように、皮膚は、出生後の期間において機能のおよび構造的に変化する。特に、経表皮水分喪失(trans epidermal water loss) (TEWL)、角質層水和または皮膚表面のpHなどの種々のパラメーターの変動は、一般に0歳と16歳との間で見られるだけでなく、より具体的には、この年齢の範囲内でも見られる。従って、これらのパラメーターは、新生児、乳児、2~16歳の間の小児の間で異なる(Fluhr et al., Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)。特に、これらのパラメーターの具体的変動が、これらの各年齢群内で見られ得る。

20

【0023】

従って、用語「小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカー」は、本出願で使用する場合、成人よりも新生児および/または乳児および/または2~16歳の間の小児で発現の高いまたは発現の低いいずれの生物学的マーカーも包含する。従って、本発明による小児の皮膚を特徴付けるマーカーは、これらの3つのカテゴリーの1つもしくは複数で、または16歳未満の小児の全カテゴリーにおいてであっても、成人よりも発現の高いまたは低いものであり得る。

【0024】

もう1つの好ましい実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、より具体的には、0~1か月齢の間、1か月~2歳の間、または2~16歳の間のドナーである。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0~1か月齢の間の新生児、1か月~2歳の間乳児、および2~16歳の間の小児からなる群から選択される。

30

【0025】

第1の実施態様では、候補生物学的マーカーが、皮膚細胞のサンプル(A)および皮膚細胞の対照サンプル(B)における候補マーカーの発現レベルを比較することにより、小児の皮膚に特異的なマーカーであるかどうかを判定することができる。

【0026】

この第1の実施態様によれば、本発明は、小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーを同定するための方法であって、下記の工程：

40

a) 16歳未満のドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程、

b) 皮膚細胞の少なくとも1つの対照サンプル(B)を取得する工程、

c) 工程a)のサンプルにおいて候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

d) 工程b)のサンプルにおいて前記候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

e) 工程a)の発現レベルと工程b)の発現レベルとの間の比を計算する工程、および

f) 前記候補マーカーが新生児または乳児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーであるかどうかを判定する工程

を含んでなる方法に関する。

50

【0027】

ある好ましい実施態様によれば、本発明は、小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーを同定するための方法であって、下記の工程：

a) 0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間の乳児、および2～16歳の間の小児からなる群から選択されるドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程、

b) 皮膚細胞の少なくとも1つの対照サンプル(B)を取得する工程、

c) 工程a)のサンプルにおいて候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

d) 工程b)のサンプルにおいて前記候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程、

e) 工程a)の発現レベルと工程b)の発現レベルとの間の比を計算する工程、および
f) 前記候補マーカーが小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーであるかどうかを判定する工程

を含んでなる方法に関する。

【0028】

本発明による対照サンプル(B)は、既知の年齢のドナーから得られる皮膚細胞のサンプルである。例えば、対照サンプル(B)は、小児または成人から得ることができる。より具体的には、対照サンプル(B)は、16歳未満または16歳以上のドナーから得ることができる。本発明による方法のある有利な実施態様では、対照サンプル(B)は、0～1か月齢の間、1か月～2歳の間、または2～16歳の間のドナーから得られる。よって、本発明による小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーが、1か月齢未満の新生児の皮膚、1か月～2歳の間の乳児の皮膚、または2～16歳の間の小児の皮膚を特徴付けるマーカーであるかどうかを特定することができる。

【0029】

本発明による方法の工程e)からの比は、対照サンプル(B)の性質に依存することが明らかである。対照サンプル(B)のドナーがサンプル(A)のドナーと同じ年齢群に由来するならば、前記工程e)からの比はおよそ1に等しくなり、他方、サンプルAおよびBのドナーが別の2つの年齢群に由来するならば、工程e)からの比は1と異なることが容易に理解される。従って、サンプル(B)が成人から得られる場合には、サンプル(A)とサンプル(B)の候補マーカーの発現レベル間の比が1より大きいと、前記マーカーが小児の皮膚で特異的に発現が高いことを示す。同様に、また、サンプル(B)が成人から得られる場合、サンプル(A)とサンプル(B)の候補マーカーの発現レベル間の比が1より小さいと、前記マーカーが小児の皮膚で特異的に発現が低いことを示す。

【0030】

好ましい一実施態様では、候補マーカーの発現レベルは、16歳未満のドナーから得られる、皮膚細胞の少なくとも2つのサンプル(A)および(A')で測定される。より優先的には、前記サンプルのそれぞれは、0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間の乳児、および2～16歳の間の小児からなる群から選択されるドナーから得られる。有利には、(A)および(A')は2つの異なる年齢群に属す。より好ましくは、対照サンプル(B)は、成人ドナーから得られる。

【0031】

よって、候補マーカーに関してより正確かつより信頼性のある結論を引き出すことができる。

【0032】

用語「皮膚サンプル」は、本発明によれば、皮膚細胞を含有する任意のサンプルを意味する。よって、本発明による皮膚サンプルとしては、患者から直接得られた新鮮皮膚外植片、懸濁皮膚細胞培養物、単層皮膚細胞培養物、二層皮膚細胞培養物および組織モデル(再生皮膚培養物および再生粘膜培養物を含む)が含まれる。新鮮外植片に対して働かせることは困難である場合が多いことから、本発明の範囲内で皮膚細胞培養物を使用することが特に有利である。有利には、本発明による皮膚細胞としては、正常細胞、健常細胞、罹

10

20

30

40

50

患細胞、または系統由来細胞が含まれる。例えば、培養下に置かれた皮膚細胞は、皮膚組織外植片から得られた細胞であり得る。用語「外植片」または「皮膚外植片」は、本明細書で使用する場合、外科術目的でまたは検査を行うために得られたものであり得る皮膚細胞または組織のサンプルを意味する。

【0033】

特に、外植片は外科的切除の際に得ることができる。用語「切除」は、本明細書で使用する場合、その欠陥または増殖を処置するために種々の幅および深さの皮膚の一部を切断（切除）することからなる外科的手法を意味する。切除は、癌性または疑わしい癌性腫瘍を除去するため、または機能上または美容上の理由で望まれない良性の皮膚欠陥を処置するためのいずれかで行われる。本発明による切除は、例えば、形成手術（乳房、腹壁形成術、リフティング、包皮除去、耳形成術、すなわち、イヤープインバック(ear pinback)、合指または多指など）後に得られる皮膚サンプルを含む。

10

【0034】

一例が生検の手段によっても得られ得る。用語「生検」は、分析の目的で採取される皮膚細胞または組織のサンプルを意味する。当技術分野では複数のタイプの生検手法が知られ、実施されている。最も一般的なタイプとしては、(1) 組織サンプルだけが採取される切開生検；(2) 腫瘍成長のトータルアブレーション、従って、治療的および診断的手順の実施からなる切除生検（または外科的生検）、および(3) 太針であっても細針であってもよいが、針で組織サンプルが採取される針生検が含まれる。例えば、スミアまたは掻爬などのさらなるタイプの生検も存在し、それもまた本発明に含まれる。

20

【0035】

あるいは、前記皮膚細胞は、幹細胞の分化によって得ることもできる(Guenou et al., Lancet, 374(9703): 1745-1753, 2009; Nissan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 108(36): 14861-14866, 2011; Kraehenbuehl et al., Nature Methods, 8: 731-736, 2011)。

【0036】

本発明による皮膚細胞は、生検から得られるものであれ幹細胞の分化から得られるものであれ、皮下組織、真皮および/または表皮に通常存在する少なくとも1つの細胞種を含む。よって、これらの細胞としては、とりわけ、ケラチノサイト、メラノサイト、線維芽細胞、脂肪細胞、内皮細胞、肥満細胞、ランゲルハンス細胞および/またはメルケル細胞が含まれる。優先的には、本発明による皮膚細胞としては、少なくともケラチノサイトおよび/または線維芽細胞が含まれる。より優先的には、本発明による皮膚細胞としては、ケラチノサイトおよび/または線維芽細胞が含まれる。

30

【0037】

多くの皮膚細胞培養法が当業者に知られている。これらの方法はいずれも、本発明による皮膚細胞を培養するために使用可能である。有利には、皮膚細胞は、少なくとも部分的に、細胞代謝および/または細胞機能を維持する条件下で培養および/または保存される。よって、本発明による皮膚細胞の培養物としては、十分等しく懸濁皮膚細胞培養物、単層皮膚細胞培養物、二層皮膚細胞培養物および組織モデル、その再生皮膚培養物および再生粘膜培養物が含まれる。

【0038】

例えば、懸濁皮膚細胞培養は、数十年間、極めて多数の研究室で慣例的に行われている。同様に、単層または二層皮膚細胞培養物も、極めて長年にわたって知られ、使用されている。

40

【0039】

さらに、多くの組織モデル、その再生皮膚モデルおよび再生粘膜モデル(Rosdy et al., In Vitro Toxicol., 10(1): 39-47 1997; Ponc et al., J Invest Dermatol., 109(3): 348-355 1997; Ponc et al., Int J Pharm., 203(1-2): 211-225, 2000; Schmalz et al., Eur J Oral Sci., 108(5): 442-448, 2000; Black et al., Tissue Eng, 11(5-6): 723-733 2005; Dongari-Batgtzoglou and Kashleva, Nat Protoc, 1(4): 2012-2018, 2006; Bechtoille et al., Tissue Eng, 13(11): 2667-2679, 2007; Vrana et al., Invest O

50

ophthalmol Vis Sci, 49(12): 5325-5331, 2008; Kinicoglu et al., Biomaterials, 30(32): 6418-6425, 2009; Auxenfans et al., Eur J Dermatol, 19(2): 107-113, 2009; Kinicoglu et al., Biomaterials, 32(25): 5756-5764, 2011; Costin et al., Altern Lab Anim, 39(4): 317-337, 2011; Auxenfans et al., J Tissue Eng Regen Med, 6(7): 512-518, 2012; Lequeux et al., Skin Pharmacol Physiol, 25(1): 47-55, 2012; EP 2 9 6 7 8 ; EP 2 8 5 4 7 1 ; EP 7 8 9 0 7 4 ; EP 1 4 5 1 3 0 2 B 1 ; EP 1 8 7 8 7 9 0 B 1 ; EP 1 9 7 4 7 1 8 ; US 2 0 0 7 / 0 1 4 8 , 7 7 1 ; US 2 0 1 0 / 0 , 0 9 9 , 5 7 6 ; WO 0 2 / 0 7 0 7 2 9 ; WO 2 0 0 6 / 0 6 3 8 6 4 ; WO 2 0 0 6 / 0 , 6 3 8 6 5 ; WO 2 0 0 7 / 0 6 4 3 0 5)が当業者に利用可能であり、本発明の範囲内に含まれる。

10

【0040】

有利には、組織モデルには、再生皮膚モデルおよび再生粘膜モデルを含む。好ましくは、再生皮膚モデルは、本質的に間質細胞、より詳しくは線維芽細胞を含有する真皮モデル、本質的にケラチノサイトからなる表皮モデル、皮下組織モデル、真皮と表皮とを含む皮膚モデル、および真皮と表皮と皮下組織とを含む皮膚モデルを含む群から選択される。少なくとも1つの真皮を含むこれらのモデルは結合タイプの組織を形成するが、1つの表皮(at one epidermis)を含むモデルは、当該組織の特徴的な層を含む層状上皮を形成する。例えば、表皮モデルでは、基底層(stratum basalis)、有棘層(stratum spinosum)、顆粒層(stratum granulosum)、および角質層(stratum corneum)を識別することが可能である。さらに、好ましくは、本発明による再生粘膜モデルは、口腔、歯肉、膺または角膜の粘膜モデルである。

20

【0041】

有利には、前記モデルは、好ましくは、半透性合成膜、特に、半透性ニトロセルロース膜、半透性ナイロン膜、テフロン膜またはスポンジ、ポリカーボネートまたはポリエチレン、ポリプロピレン、半透性ポリエチレンテレフタレート(PET)膜、無機半透性アノポア、セルロースアセテートまたはエステル(HATF)膜、半透性バイオポア-CM膜、半透性ポリエステル膜、ポリグリコール酸膜またはフィルムからなる群から選択される不活性基質から選択されるマトリックス基質を含んでなる真皮マトリックスの結合タイプの組織モデルである。

30

【0042】

この群には、例えば、Skin²(商標)モデルZK1100およびDerma graft(商標)およびTranscyte(商標)真皮モデル(Advanced Tissue Sciences)：

・細胞培養処理プラスチック(真皮シートの形成: Michel et al., In Vitro Cell. Dev Biol.-Animal, 35: 318-326, 1999)；

・ヒアルロン酸(Hyalograft(商標)3D-Fidia Advanced Biopolymers)および/またはコラーゲン(例えば、等価真皮またはコラーゲン格子)および/またはフィブロネクチンおよび/またはフィブリンに基づくゲルまたは膜；この群には、例えば、Vitrix(商標)真皮モデル(Organogenesis)が含まれる；

40

・1または複数のグリコサミノグリカンおよび/または任意選択のキトサンを含有するために好適なコラーゲンから製造された、表面加工されていてもよい多孔質マトリックス(例えば、等価真皮)(EP 0 2 9 6 0 7 8 A 1、WO 0 1 / 9 1 1 8 2 1 および WO 0 1 / 9 2 3 2 2)

が含まれる。

【0043】

この群にはまた、例えば、Mimederma(商標)真皮モデル(Coletica)も含まれる。

【0044】

50

これらのマトリックス基質は、間質細胞、特に、線維芽細胞を含んでなる。

【0045】

有利には、前記皮膚モデルは、好ましくは、半透性合成膜、特に、半透性ニトロセルロース膜、半透性ナイロン膜、テフロン膜またはスポンジ、ポリカーボネートまたはポリエチレン、ポリプロピレン、半透性ポリエチレンテレフタレート（PET）膜、無機半透性アノポア、セルロースアセテートまたはエステル（HATF）膜、半透性バイオポア - CM膜、半透性ポリエステル膜からなる群から選択される不活性基質；

この群には、再生表皮モデル（Skinethic（商標））およびEpiDerm（商標）モデル（Mattek Corporation）が含まれ；

・ヒアルロン酸および/またはコラーゲンおよび/またはフィブロネクチンおよび/またはフィブリンに基づくフィルムまたは膜から選択されるマトリックス基質を含んでなる表皮モデルである。

【0046】

この群において、特に、Laserskin（商標）（Fidia Advanced Biopolymers）、Episkin（商標）（L'Oréal）のモデルを挙げることができる。

【0047】

これらのモデルは、真皮部分に線維芽細胞を植え込むことができる。

【0048】

線維芽細胞が組み込まれていてもよいこれらのモデルは、ケラチノサイトの植え込みおよび表皮再生の基質として機能する。有利には、ケラチノサイトの他に、色素細胞、免疫担当細胞、神経細胞が導入され、好ましくは、免疫担当細胞はランゲルハンス細胞である。

【0049】

有利には、前記組織モデルは、好ましくは、

・半透性合成膜、特に、半透性ニトロセルロース膜、半透性ナイロン膜、テフロン膜またはスポンジ、ポリカーボネートまたはポリエチレン、ポリプロピレン、半透性ポリエチレンテレフタレート（PET）膜、無機半透性アノポア、セルロースアセテートまたはエステル（HATF）膜、半透性バイオポア - CM膜、半透性ポリエステル膜からなる群から選択される不活性基質であって、前記不活性基質は間質細胞、特に、線維芽細胞を含有してもよい不活性基質；

・間質細胞、特に、線維芽細胞を含んでなる、コラーゲンおよび/またはヒアルロン酸および/またはフィブロネクチン、および/またはフィブリンに基づくゲル；

・1または複数のグリコサミノグリカンおよび/または場合によりキトサンを含有するために好適なコラーゲンから製造された、場合により表面加工されていてもよい多孔質マトリックスであって、これらの多孔質マトリックスは間質細胞、特に、線維芽細胞を組み込んでいる多孔質マトリックス；

・ヒトまたは動物起源の脱上皮化(deepidermised)真皮または死滅真皮から選択される真皮または絨毛膜マトリックス基質を含んでなる再生皮膚または粘膜組織モデルである。

【0050】

この群では、特に、Mimeskin（Coletica）、EpiDermFT（商標）、EpiAirway（商標）、EpiOcular（商標）、EpiOral（商標）、EpiGingival（商標）、EpiVaginal（商標）（Mattek Corporation）、ヒト角膜上皮（HCE）、ヒト口腔上皮（HOE）、ヒト歯肉上皮（HGE）、ヒト膈上皮（HVE）（Skinethic（商標））、Phenion（商標）Full Thickness Skin Model（Phenion）Apligraf（商標）（Organogenesis）、ATS-2000（Cell Systems（商標） Biotechnologie Vertrieb）

10

20

30

40

50

モデルおよびSkin 2TM (ZK1200-1300-2000 Advanced Rissue Science)を挙げることができる。

【0051】

さらに、組織療法に特に意図されるモデルも利用可能であり、これらも本発明の範囲内で使用可能である。Epidex (Modex Therapeutiques)、Epibase (商標) (Laboratoire Genevrier)、Epicell (商標) (Genzyme)、Autoderm (商標) およびTransderm (商標) (Innogenetics) モデルを挙げることができる。

【0052】

次に、このマトリックス基質にケラチノサイトを植え込み、表皮を再生させ、最終的には再生皮膚を得る。

【0053】

使用する皮膚モデルは、内皮細胞 (CE)、ならびに / または免疫細胞、例えば、リンパ球、マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞および / もしくは脂肪細胞、ならびに / または皮膚付属物、例えば、身体および頭部の毛、および皮脂腺など、少なくとも1つの補足的細胞種が組み込まれているモデルを含んでなることが有利である。

【0054】

本発明による候補生物学的マーカーは、好ましくは、遺伝子マーカー、タンパク質マーカー、脂質マーカーまたは代謝マーカーである。これらのタイプのマーカーのそれぞれについて、前記生物学的マーカーの発現を測定するため、ひいては16歳未満の小児の細胞と成人の細胞との間の発現の違いを識別するために、当業者には多くの方法が利用可能である。

【0055】

第1の実施態様では、前記マーカーは、遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーである。

【0056】

この場合、本発明による方法は、皮膚細胞サンプルの採取と生物学的マーカーの発現の測定との間に1または複数の中間工程を含んでなってもよく、前記工程は、前記皮膚細胞サンプルからのmRNAサンプル (または対応するcDNA) またはタンパク質サンプルの抽出に相当する。細胞サンプルからのmRNA (およびその逆転写によるcDNA) またはタンパク質の調製または抽出は、当業者に周知の常法に過ぎない。

【0057】

mRNA (または対応するcDNA) またはタンパク質サンプルが得られれば、mRNA (すなわち、そのサンプル中に存在する全mRNAまたはcDNAの)、またはタンパク質 (すなわち、そのサンプル中に存在する全タンパク質の) のいずれかに関するマーカーの発現が測定できる。従って、この目的に使用される方法は、変換のタイプ (mRNA、cDNAまたはタンパク質) および利用可能なサンプルのタイプに依存する。

【0058】

マーカーの発現は、mRNA (または対応するcDNA) に関して測定され、当業者に慣用されている技術が適用できる。例えばトランスクリプトーム解析などの、遺伝子発現レベルを解析するためのこれらの技術には、より高い処理量のためのPCR (ポリメラーゼ連鎖反応、DNAを使用する場合)、RT-PCR (逆転写PCR、RNAを使用する場合) または定量的RT-PCRまたは核酸アレイ (DNAアレイおよびオリゴヌクレオチドアレイを含む) などの周知の方法が含まれる。

【0059】

用語「核酸アレイ」は、本明細書で使用する場合、マイクロチップ、スライドガラス、またはマイクロスフェアのサイズを有するピースであり得る基質に結合された複数の異なる核酸プローブを意味する。マイクロチップは、ポリマー、プラスチック、樹脂、多糖類、シリカ、またはシリカ、炭素、金属、無機ガラス、もしくはニトロセルロースに基づく材料からなり得る。

10

20

30

40

50

【0060】

プローブは、cDNA(「cDNAアレイ」)、mRNA(「mRNAアレイ」)またはオリゴヌクレオチド(「オリゴヌクレオチドアレイ」)などの核酸であり得、前記オリゴヌクレオチドは一般におよそ25~60ヌクレオチドの間の長さを持たせるために好適である。

【0061】

特定の遺伝子の発現プロファイルを決定するために、前記遺伝子の全体または一部に対応する核酸を標識した後に、ハイブリダイゼーション条件下でアレイと接触させると、前記の標識された標的核酸とチップ表面に結合されているこの核酸に相補的なプローブの間で複合体の形成が起こる。その後、これらの標識されたハイブリダイズ複合体の存在を検出する。

10

【0062】

これらの技術は、生体サンプル(細胞、組織など)中の特に1つの遺伝子、または複数の遺伝子、またはさらにはゲノムの全遺伝子(全ゲノムまたは全トランスクリプトーム)の発現レベルをモニタリングするために好適である。これらの技術は当業者によって慣例的に使用され、従って、本明細書でそれらを詳説する必要はない。遺伝子発現解析(cDNAアレイ)および定量的PCRに基づく本発明の実施態様の例は、実験の節に記載されている。

【0063】

あるいは、サンプル中のmRNA量に基づいて遺伝子発現を決定するのに好適な現行のまたは将来的な技術はいずれも使用することができる。例えば、当業者は、標識核酸プローブとのハイブリダイゼーション、例えば、ノーザンブロット(mRNAに対して)またはサザンブロット(cDNAに対して)の手段によるだけでなく、serial analysis of gene expression(SAGE)法およびその派生形、例えば、Long SAGE、Super SAGE、Deep SAGEなども用いて、遺伝子の発現を測定することができる。また、組織チップ(TMA:「組織マイクロアレイ」)を使用することもできる。通常組織アレイとともに使用される試験としては、免疫組織化学および蛍光in situハイブリダイゼーションが含まれる。mRNAに関する分析のためには、組織アレイを蛍光in situハイブリダイゼーションと組み合わせることができる。

20

【0064】

最後に、サンプル中のmRNAの量を測定するために大量並行シーケンシング(RNA-Seqまたは「全トランスクリプトームショットガンシーケンシング」)を使用することができる。この目的で、複数の大量並行シーケンシング法が利用可能である。このような方法は、例えば、米国特許第4,882,127号;同第4,849,077号;同第7,556,922号;同第6,723,513号;WO03/066896;WO2007/111924US2008/0020392;WO2006/084132;US2009/0186349;US2009/0181860;US2009/0181385;US2006/0275782;EP-B1-1141399;Shendure & Ji, Nat Biotechnol., 26(10): 1135-45, 2008; Pihlak et al., Nat Biotechnol., 26(6): 676-684, 2008; Fuller et al., Nature Biotechnol., 27(11): 1013-1023, 2009; Mardis, Genome Med., 1(4): 40, 2009; Metzker, Nature Rev. Genet., 11(1): 31-46, 2010に記載されている。

30

40

【0065】

タンパク質に関してマーカーの発現を測定する場合、特に、免疫沈降、免疫組織学、ウェスタンブロット、ドットブロット、ELISAまたはELISPOT、タンパク質アレイ、抗体アレイ、または免疫組織化学と併用する組織アレイなどの周知の技術において特異的抗体を使用することができる。使用可能な他の技術としては、FRETまたはBRET技術、特に共焦点顕微鏡および電子顕微鏡法を含む顕微鏡または組織化学法、1または複数の励起波長と好適な光学的方法の使用に基づく方法、例えば、電気化学的方法(ボルタンメトリーおよび電流滴定技術)、原子間力顕微鏡、および高周波法、例えば、多極性

50

、共焦点および非共焦点共鳴分光法、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折率または屈折率の検出（例えば、表面プラズモン共鳴の手段、偏光解析法、共振ミラー法の手段などによる）、フローサイトメトリー、放射性同位元素または磁気共鳴イメージング、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）の手段、HPLC-質量分光光度法の手段、液体クロマトグラフィー/質量分光光度法/質量分析（LC-MS/MS）の手段による分析といった周知の技術において特異的抗体を使用することができる。これらの技術は総て当業者に周知であり、本明細書でそれらを詳説する必要はない。

【0066】

優先的には、候補遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーは、細胞代謝マーカー、ストレス応答マーカー、炎症マーカー、免疫マーカー、アポトーシスマーカー、細胞成長/増殖および周期マーカー、細胞シグナル伝達マーカー、遊走および分化マーカー、表皮バリアマーカー、接着マーカーおよび多能性皮膚幹細胞のマーカーを含む群から選択される。

10

【0067】

遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーが属するクラスを決定したい当業者は、容易に、関連の科学文献を調べるか、例えば、the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)に収められているものなどの公開データベースを参照することができる。

【0068】

より優先的には、前記細胞エネルギー代謝マーカーはIGFL3（IGF様ファミリーメンバー3）であり、前記ストレス応答マーカーはGPX3（グルタチオンペルオキシダーゼ3）であり、前記炎症マーカーはMGST1（ミクロソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ1）、IL-1（インターロイキン-1）およびIL-8（インターロイキン8）からなる群から選択され、前記免疫マーカーはDEFB1およびDEFB4（デフェンシン1および4）からなる群から選択され、前記細胞周期マーカーはCDKN1（サイクリン依存性キナーゼ阻害剤）であり、前記分化マーカーはBARX2（BARXホメオボックス2）またはSCEL（サイエリン(sciellin)）、前記表皮バリアマーカーはCLDN1（クローディン1）、IVL（インボルクリン）、およびKRT1（ケラチン1）からなる群から選択され、前記接着マーカーはCADM1（細胞接着分子1）であり、かつ/または前記多能性皮膚幹細胞マーカーはFN1（フィブロネクチン1）、NID1（ニドゲン1）、NOTCH1（Notchホモログ1、移行関連）、KRTI9（ケラチン19）、ITGB1BP1（インテグリン1結合タンパク質）、ITGA6（インテグリン6）およびITGB4（インテグリン4）からなる群から選択される。

20

30

【0069】

遺伝子CLDN1（NM_021101）は、密着結合の最も重要な成分の1つであるタンパク質クローディン1をコードする。遺伝子IVL（NM_005547）によりコードされているインボルクリンは、角質細胞の角膜エンベロープの形成に参与する。遺伝子KRT1（NM_006121）は、ケラチノサイトの細胞内ネットワークを形成するケラチン1をコードする。BARX2（NM_003658）は、表皮の形成およびその分化の際の接着を調節する転写因子をコードする。最後に、遺伝子SCEL（NM_001160706；NM_003843；NM_144777）の産物であるサイエリンは、角膜エンベロープタンパク質の調節に参与する。

40

【0070】

GPX3（NM_002084）は、酸化ストレスに対して防護的役割を持つグルタチオンペルオキシダーゼをコードする。デフェンシンをコードするDEFB1（NM_005218）およびDEFB4（NM_004942）は、より具体的には、生得免疫遺伝子であり、その産物は同じ抗微生物ペプチドファミリーに属す。

【0071】

遺伝子MGST1（NM_145792；NM_001267598；NM_1457

50

64 ; NM__001260511 ; NM__020300 ; NM__001260512 ; NM__145791) は、炎症メディエーター生産に関する炎症タンパク質であるミクソソームグルタチオントランスフェラーゼをコードする。

【0072】

遺伝子 IL - 1 (NM__000575 ; NM__000576 ; NM__001243211 ; NM__000577) および IL - 8 (NM__000584) は、重要な炎症メディエーターである2つのサイトカインをコードする。

【0073】

FN1 (NM__212482 ; NM__002026 ; NM__212476 ; NM__212478 ; NM__212474 ; NM__054034) は、幹細胞接着プロセスに関するフィブロネクチン1をコードする。遺伝子 NOTCH1 (NM__017617) は、幹細胞の維持に関する。遺伝子 NID1 (NM__002508) によりコードされるタンパク質ニドゲン1またはエンタクチンは、マトリックスとの相互作用において幹細胞に関する基底膜の成分である。遺伝子 KRT19 (NM__002276) によりコードされるタンパク質ケラチン19は、幹細胞で特異的に発現されるケラチンファミリーのメンバーである。最後に、ITGB1BP1 (NM__022334 ; NM__004763)、ITGA6 (NM__001079818 ; NM__000210)、ITGB4 (NM__000213 ; NM__001005731 ; NM__001005619) はそれぞれ、インテグリン 1結合タンパク質、インテグリン 6およびインテグリン 4をコードし、総て、マトリックスへの幹細胞の接着に不可欠である。

【0074】

stratum granulosum (顆粒層) の上層に位置する、「オドランド小体」と呼ばれるラメラ体は、ステロール、リン脂質およびグルコシルセラミド、ならびに特異的ヒドロラーゼを含有している。これらの酵素は、リン脂質とグルコシルセラミドを遊離脂肪酸およびセラミドに変換し、これらはコレステロールおよびコレステロール硫酸とともに、細胞間ラメラ二重膜を形成する。前記の層は、外的攻撃からの皮膚の保護および十分な表皮内水層の維持を助ける (Jungerstend et al., Contact Dermatitis, 58(5): 255-262, 2008)。しかしながら、この皮膚バリア機能は、年齢とともに、特に、出生時および成人の間で変化する (Fluhr et al., Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)。細胞間ラメラ二重膜中の脂質の他には、皮膚は、モノ、ジおよびトリグリセリド、遊離脂肪酸、ワックスおよびエステル化ワックス、スクアレンおよびステロールを含んでなる、脂質と呼ばれる脂肪物質の混合物を産生および分泌する。脂質分泌は、出生時から成人にかけて変化する。従って、この分泌は、出生後第1週目のうちに増加し、その後、思春期前に再び増加するまでは低下している (Fluhr et al., Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)。

【0075】

さらなる実施態様によれば、本発明による生物学的マーカーは、このように脂質マーカーである。

【0076】

特に、本発明による脂質マーカーは、角質層脂質マーカーまたは皮脂マーカーであり得る。

【0077】

有利には、本発明による脂質マーカーは、角質層脂質マーカーである。好ましくは、前記脂質は、リン脂質、セラミド、ステロールおよび遊離脂肪酸から選択される。

【0078】

用語「リン脂質」は、本明細書で使用する場合、リン酸基を含んでなる任意の脂質を意味する。有利には、本発明によるリン脂質は、ホスホグリセリドおよびスフィンゴミエリンからなる群から選択される。本発明による「ホスホグリセリド」は、2つのアルコール官能基が脂肪酸で、そして3つめのアルコール官能基がリン酸でエステル化されたグリセロールエステルである。有利には、脂肪酸は飽和または不飽和であり、14 ~ 20個の炭素原子を含む。好ましくは、本発明によるホスホグリセリドは、ホスファチジルエタノー

10

20

30

40

50

ルアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルイノシトールからなる群から選択される。用語「スフィンゴミエリン」は、長鎖塩基（スフィンゴシンまたはジヒドロスフィンゴシン）、アミン官能基をアミド化する脂肪酸、および第一級アルコール官能基をエステル化し、その後、アミノアルコールによりエステル化される（コリン）リン酸基からなる分子を意味する。

【0079】

本明細書において用語「ステロール」は、遊離ヒドロキシル基を有するステロイドのサブグループに属す脂質、および前記脂質の任意の誘導体を意味する。ステロールは天然起源でも合成起源でもよい。有利には、本発明によるステロールは、コレステロールまたはコレステロール硫酸から選択される。

10

【0080】

本発明による「セラミド」は、スフィンゴシンおよび脂肪酸のアミド化(amidification)反応から得られる脂質である。従って、セラミドは、アミド結合によって - ヒドロキシ酸、 - ヒドロキシ酸または様々な疎水鎖長を有する非ヒドロキシ酸に結合されているスフィンゴシンまたはフィトスフィンゴシン塩基からなる。ヒトの角質層では、CER 1 ~ 9 と呼ばれる9つのセラミドクラスが同定されている（例えば、Dayan, Cosm & Toil, 121(1): 37-44 2006; Jungerstend et al., Contact Dermatitis, 58(5): 255-262 2008; Farwick et al., Cosm & Toil, 124(2): 63-72; Masukawa et al., J Lipid Res., 50(8) 1708-1719, 2009参照）。本発明によるセラミドは、より優先的には、前記セラミド CER 1 ~ 9 からなる群から選択される。

20

【0081】

本発明による脂質マーカーはまた、皮脂マーカーであってもよい。好ましくは、このような脂質マーカーは、モノ、ジおよびトリグリセリド、遊離脂肪酸、ワックスおよびエステル化ワックス、スクアレンおよびステロールからなる群から選択される。

【0082】

「グリセリド」、またはアシルグリセロールもしくはグリセロ脂質は、脂肪酸のエステルおよびグリセロールである。それらが1本の脂肪酸鎖でエステル化されているか、2本の脂肪酸鎖でエステル化されているかまたは3本の脂肪酸鎖でエステル化されているかに基づいて、モノ、ジまたはトリグリセリドと呼ばれる。

【0083】

本発明によれば、用語「ワックス」は、種々のセリド、アルコールおよび遊離脂肪酸と多くの場合には長鎖飽和炭化水素とからなる脂肪物質を意味する。用語「セリド」は、本明細書において、脂肪酸および長鎖脂肪族アルコールのモノエステルを意味し、セリドアルコールは一般に、炭素鎖の長さは、脂肪酸については炭素14 ~ 30個、脂肪アルコールについては炭素16 ~ 36個と異なるが、等しい数の飽和および非分岐炭素を有する第一級アルコールである。

30

【0084】

本発明によるスクアレンは、式：(E) 2, 6, 10, 15, 19, 23 - ヘキサメチル - 2, 6, 10, 14, 18, 22 - テトラコサヘキセンを有する、30個の炭素原子と50個の水素原子とを有するイソプレノイドであるトリテルペンである。

40

【0085】

最後に、皮膚表面は、皮膚がその水和を維持すること、および外的攻撃からそれ自体を保護することを可能とする保護膜に覆われている。この表面皮膜は、とりわけ、汗、水、皮脂およびその他の脂質から本質的になる水和脂質膜を含んでなる。これらはセラミド、トリグリセリドおよび脂肪酸を、ほぼ等しい割合で含む。水和脂質膜の脂質は、特異的な三次元構造を持つ。

【0086】

皮膚細胞サンプルにおいて脂質含量を測定するために、当業者には多くの方法が利用できる。これらの方法としては、とりわけ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC、例えば、Sullivan et al., Arch Ophthalmol., 120(12): 1689-99, 2002参照）、例えば、蒸

50

発光散乱検出器と連結した高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD、Nordback et al., J. High Resolut. Chromatogr., 22: 483-486, 1999; Torres et al., J. Chromatogr. A., 1078: 28-34, 2005参照）；薄層クロマトグラフィー（TLC、例えば、Downing et al., J Invest Dermatol., 77(4): 358-360, 1981; Nordstrom et al., J Invest Dermatol., 87(2): 260-263, 1986）；核磁気共鳴（NMR、例えば、Robosky et al., J Lipid Res., 49(3): 686-692, 2008参照）；*in vivo*共焦点ラマンマイクロスペクトロスコピー；質量分析、ガスクロマトグラフィー連結質量分析（GC-MS、O'Neill et al., J Chromatogr Sci., 14(1): 28-36, 1976参照）；超高速液体クロマトグラフィー（UPLC、Rainville et al., J Proteome Res., 6(2): 552-558, 2007; Castro-Per ez et al., J Proteome Res., 10(9): 4281-4290, 2011参照）が含まれる。また、皮膚、
10
より詳しくは、stratum corneum（すなわち角質層）、ラメラまたは側生組織におけるこれらの脂質の組織を、X線回折(Bouwstra et al., J Invest Dermatol., 97(6): 1005-1012, 1991; van Smeden et al., J Lipid Res., 52(6): 1211-1221, 1991)などの技術を用いて、またはフーリエ変換赤外線分光法(Gorcea et al., Int J Pharm. Nov 10, 2011)を用いて、または電子顕微鏡形態計測分析(Daehnhardt-Pfeiffer et al., Skin Pharmacol Physiol., 25(3): 155-161, 2012)を用いて、または分子解析と組み合わせた種々の皮膚切片の電子顕微鏡分析(Iwai et al., J Invest Dermatol., Apr 26, 2012)を用いて分析することができる。

【0087】

本発明のさらなる実施態様によれば、候補生物学的マーカーは代謝マーカーである。
20

【0088】

本発明による用語「代謝マーカー」は、エネルギー代謝を含む皮膚の代謝プロセスの全般的調節に関与するマーカーを意味する。本発明による「代謝」は、皮膚細胞において絶えず起こっている分子変換およびエネルギー変換のセットに相当する。言い換えれば、用語「代謝」は、本明細書において、例えば、皮膚細胞がエネルギーを生産および使用する、その特性を維持する、再生する、毒性化合物を排除するなどのいずれの反応も含んでなる。

【0089】

本発明による代謝マーカーは、特に、成人の皮膚と比べた場合に、16歳未満の小児、より詳しくは、新生児、乳児および/または2～16歳の小児の皮膚に差次的に存在する皮膚代謝産物を含む。本発明に関して、「差次的」とは、対照サンプルよりも測定サンプルで異なるレベルを意味する。例えば、小児（または新生児、乳児および/もしくは2～16歳の小児）の皮膚に差次的に存在する代謝産物は、成人の皮膚よりも前記小児の皮膚に多量に存在し得る。あるいは、この代謝産物は、成人の皮膚よりも小児（または新生児、乳児および/もしくは2～16歳の小児）の皮膚に少量に存在し得る。
30

【0090】

皮膚の代謝マーカーは、当業者に周知である。前記マーカーは例えば、Fluhr et al. (Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)またはJungerstend et al. (Contact Dermatitis, 58(5): 255-262, 2008)に記載されている。本発明による生物学的マーカーとしては、例えば、エイジンまたは天然保湿因子、すなわちNMFなどの表皮構築および皮膚バリア機能マーカーが含まれる。これらは水を保持する特性を有する吸湿性物質の混合物である(Fluhr et al., Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)。これらのNMFのいくつかは、特に、カスパーゼ14およびペプチジルアルギニンデイミナーゼ(PAD1)などの酵素を含む反応カスケードに従うフィラグリンのタンパク質分解から得られる。さらなる表皮および真皮の吸湿性分子、例えば、ヒアルロン酸は、十分な水分レベルの維持を助け、皮膚のしなやかさとボリュームを与える。このグリコサミノグリカン、ヒアルロナンシ
40
ンターゼ1型、2型または3型により合成され、一方、ヒアルリノダーゼ(hyaluridases)により分解される。皮膚バリア機能は本質的に角質層によって提供され、構造的役割と機能的役割との両方を備えた細胞間脂質および角質細胞の両方を含む。例えば、グルコセレブロシダーゼおよび酸性スフィンゴミエリナーゼなどの酵素が、これらの重要な脂質
50

の合成および成熟に付随し、また、特に、トランスグルタミナーゼなどのさらなる酵素も、角質細胞を形成するタンパク質の組織化を行う。総ての表皮層が形成され、分化が完了すると、カリクレイン5および7などの酵素を含む落屑プロセスが、角質細胞の排除を可能とする。表皮下で、真皮は、メタロプロテイナーゼおよびエラスターゼを含む、細胞外マトリックスの再編またはリモデリングを受け得る。

【0091】

さらに、皮膚のホルモン濃度も年齢とともに変化することが知られている。よって、本発明のさらなる態様によれば、皮膚の代謝マーカーは、ホルモン、特に、性ホルモン/ステロイド、例えば、エストロゲンおよびアンドロゲン（例えば、エストラジオール、プロゲステロンおよびテストステロン）、副腎ホルモン、すなわち、ステロイド（例えば、DHEA、コルチゾール）、甲状腺ホルモン（例えば、チロキシンおよびトリヨードチロシン(triiodothyrosine)、グルココルチコイド（例えば、コルチゾールまたはヒドロコルチゾン）、神経ホルモン（例えば、プロオピオメラノコルチンおよび副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone)などである。

10

【0092】

本発明による代謝マーカーはまた、抗酸化酵素、特に、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなどの酵素活性を含み得る。

【0093】

皮膚の代謝マーカーとしてはまた、細胞からの外因性毒性化合物（または生体異物）の排除に関連する酵素活性も含まれる。この排除プロセス、または生体変換は、一般に、官能基化工程またはフェーズIと抱合工程またはフェーズIIの二段階を含むことが長年知られている。従って、生体変換では、フェーズI酵素とフェーズII酵素の2種類の活性を用いる。これらの2種類の酵素活性は皮膚細胞に存在し、皮膚の代謝マーカーに含まれる（例えば、Ahmad and Mukhtar, *J Invest Dermatol.*, 123: 417-425, 2004; Cheung et al., *J Dermatol Sci*, 31: 9-19, 2003; Gelardi et al., *Toxicol in Vitro*, 15: 701-711, 2001; Hotchkiss S.A.M., 1998. *Dermal metabolism*. In: Roberts, M.S., Walters K.A. (Eds.) *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 43-101; Janmohamed et al *Biochem Pharmacol*, 62: 777-786, 2001; Katiyar et al., *J Invest Dermatol*, 114: 328-333, 2000; Mosset et al., *Food Chem Toxicol*, 38: 361-370, 2000; Oesch et al., *Drug Metab Rev*, 39: 659-698, 2007; Oesch et al., *Biochem Pharmacol*, 27: 17-20, 1978; Pillai et al., *Pharm Res*, 21: 1146-1152, 2004; Raza et al., *J Invest Dermatol*, 96: 463-467, 1991; Nordquist and Oreland, *J Neural Transm*, 114: 713-716, 2007参照)。

20

30

【0094】

有利には、本発明による皮膚の代謝マーカーは、フェーズI酵素である。用語「フェーズI酵素」は、酸化を行うのに好適な酵素を意味する。優先的には、本発明によるフェーズI酵素は、シトクロムP450ファミリーの酵素、フラビンモノオキシゲナーゼ、モノアミンオキシダーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、アルデヒド(aldehyde)デヒドロゲナーゼ、エステラーゼまたはエポキシドヒドロラーゼである。用語「シトクロムP450」は、本明細書で使用する場合、タンパク質部分であるアポタンパク質からなる酵素と、4つの共有結合によって鉄原子と結合されているプロトポルフィリンからなる補欠分子族とを意味し、前記酵素は極めて多様な分子の酸化的代謝に関与する。本発明による「フラビンモノオキシゲナーゼ」は、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を固定し、NADPHの補助を伴って多くの外因性化合物中に存在するリン、窒素または硫黄などの求核分子の酸素化を触媒する酵素である。用語「モノアミンオキシダーゼ」は、本明細書において、第一級アミンの酸化的脱アミノ化を触媒してアルデヒドを生成する酵素を意味する。「アルコールまたはアルデヒドデヒドロゲナーゼ」は、アルコール官能基の、アルデヒドまたはケトンへ、次いでカルボン酸への酸化を触媒する酵素である。本発明による用語「エステラーゼ」は、エステル官能基の加水分解、従って、対応するアルコールおよびカルボン酸官能基の放出に関与する酵素を意味する。本発明による「エポキシドヒドロラ

40

50

ーセ」は、水和およびジオールの形成の手段によってエポキシドの解毒を行う酵素である。より優先的には、本発明によるフェーズI酵素は、CYP1A、CYP2CおよびCYP3Aから選択されるシトクロムP450である。

【0095】

あるいは、本発明による皮膚の代謝マーカーは、フェーズII酵素である。用語「フェーズII酵素」は、抱合を行うために好適な酵素を意味する。優先的には、本発明による「フェーズII酵素」は、トランスフェラーゼ、すなわち、求核基質（アルコール、カルボン酸、アミンまたはチオール）と求電子性水溶性基質との間の反応を触媒する酵素である。より優先的には、本発明によるフェーズIIは、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ、スルホトランスフェラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼまたはN-アセチルトランスフェラーゼである。用語「UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ」は、本明細書で使用する場合、分子の酸素、窒素または硫黄原子にグルクロン酸を固定してグルクロニド化合物を形成するために好適な酵素を意味する。本発明による「スルホトランスフェラーゼ」は、官能基化された分子への活性型の硫酸基の付加を触媒し、前記硫酸基は3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホスルフェート(PAPS)によって与えられる。本発明による「グルタチオン-S-トランスフェラーゼ」(GST)は、還元型グルタチオンと求電子性生体異物（芳香族化合物、エポキシドなど）との間の抱合を触媒する酵素のスーパーファミリーである。本発明による用語「N-アセチルトランスフェラーゼ」(NAT)は、種々の化合物（芳香族アミン、スルホンアミド、ヒドラジンなど）のアセチル化の手段による生体変換を担う酵素を意味する。

10

20

【0096】

本発明による皮膚の代謝マーカーはまた、皮膚色素沈着関連マーカーを含む。

【0097】

皮膚の色素沈着は、ケラチノサイト内のメラニン粒子の存在の結果である。従って、第1の側面によれば、本発明による皮膚色素沈着関連マーカーは、メラニンである。メラニンは、皮膚の主要な色素であり、皮膚のメラニンレベルがその色（明、暗など）を決定し、紫外線に対する様々な程度の保護を与える。用語「メラニン」は、本明細書で使用する場合、フェオメラニンおよびユーメラニンの両方を包含する。本発明による「フェオメラニン」または「フェメラニン」は、硫黄に富むベンゾチアジン化合物から本質的になる黄色または赤褐色色度である。「ユーメラニン(Eumalenin)」は、本明細書では、硫黄を欠き、褐色～黒の色素を形成する、DHI(5,6-ジヒドロキシインドール)単位とDHICA(5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸)単位とからなるヘテロ性の高い共重合体を意味する。ユーメラニンおよびフェオメラニンは当業者に周知である（例えば、Bertolo et al., *m/s*, 17(2): 177-185, 2001; Ito and Wakamatsu, *Pigment Cell Res*, 16(5): 523-531, 2003; Ebanks et al., *Int J Mol Sci*, 10: 4066-4087, 2009参照）。

30

【0098】

第2の側面によれば、本発明による皮膚色素沈着関連マーカーは、メラニン合成を調節する酵素活性である。有利には、前記マーカーは、「チロシナーゼ」型の活性である。本発明によるチロシナーゼ活性は、チロシンのジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)への、また、DOPAのドーパキノンへの水酸化を触媒し得る酵素活性である。チロシナーゼの例は、例えば、マウスのalbino遺伝子座の産物、およびさらなる哺乳類種におけるそのホモログに相当する。チロシナーゼにより触媒される反応は、ユーメラニンの生合成とフェオメラニンの生合成に共通である(Bertolo et al., *m/s*, 17(2): 177-185, 2001; Ebanks et al., *Int J Mol Sci*, 10: 4066-4087, 2009)。

40

【0099】

あるいは、皮膚色素沈着関連マーカーは、フェオメラニンまたはユーメラニン合成に特異的な酵素活性である。優先的には、前記酵素活性は、ユーメラニン合成に特異的である。より優先的には、前記酵素活性はDHIコキシダーゼ（またはTRP-1またはTYRP1またはgp75）型のドーパクロムトートメララーゼ(DOPochrome tauomerase)（ま

50

たはTRP-2もしくはTYRP2)型活性である。DHICAオキシダーゼは、本明細書では、5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸(DHICA)の、インドール5,6-キノン-2-カルボン酸(carboxylic acid)の酸化を触媒し得る酵素活性を表す。このような活性は、例えば、brownマウス遺伝子座の産物の相同タンパク質によって保持されている。DOPAクロムトートメラーゼは、ドーパクロムのDHICAへの酸化を触媒し得る酵素活性であり、例えば、slatyマウス遺伝子の相同遺伝子によってコードされている。

【0100】

本明細書では、本発明による種々の酵素活性により触媒される反応の産物はまた、皮膚色素沈着マーカーの定義によってもカバーされると理解される。従って、DOPA、ドーパキノン、ロイコドーパクロム、ドーパクロム、DHI、インドール-5,6-キノン、DHICA、インドール5,6-キノン-2-カルボン酸は総て、システイニル-ドーパおよび1,4-ベンゾチアジニルアラニン同様に、本発明による皮膚の生物学的マーカーである(例えば、Bertolo et al., m/s, 17(2): 177-185, 2001の図1参照)。

【0101】

皮下組織は、トリグリセリドの合成および貯蔵に特化した細胞である脂肪細胞を含む。従って、皮下組織は、白色脂肪または白色脂肪組織を形成する白色脂肪細胞と、褐色脂肪または褐色脂肪組織を形成する褐色脂肪細胞を含み得る。後者は特に、生命の始まりの際に存在する。

【0102】

本発明による生物学的マーカーとしてはまた、脂肪細胞関連マーカーが含まれる。特に、本発明によるマーカーは、白色脂肪細胞の数と褐色脂肪細胞の数との間の比を含む。白色脂肪細胞は球形細胞であり、直径およそ100マイクロメートルであり、細胞質は、ゴルジ体、粗面小胞体、滑面小胞体およびミトコンドリアを含有する薄い細胞質の輪に囲まれた大きな1つの脂質胞(トリグリセリド)を含む。白色脂肪細胞とは異なり、褐色脂肪細胞は、中央核および多くの小さな脂質胞の詰まった細胞質(この細胞は多房性と言われる)およびミトコンドリアを有する。

【0103】

白色脂肪細胞は、ひとまとめにアジポサイトカインとして知られる多くのペプチドを分泌し(Avram et al., J Am Acad Dermatol, 53(4): 671-683, 2005)、とりわけ、レプチン、アディプシン、アディポネクチン、およびタンパク質ASP(アシル化刺激タンパク質)が含まれる。好ましい一実施態様では、本発明による脂肪細胞関連マーカーはアジポサイトカインであり、より優先的には、前記マーカーは、レプチン、アディプシン、アディポネクチン、レジスチン、およびタンパク質ASPから選択される。用語「レプチン」は、本明細書において、Ob遺伝子によりコードされ、満腹感を制御することにより体内の脂肪貯蔵および食欲を調節する16kDaのタンパク質を意味する。有利には、レプチンは、NP_000221.1で表されるペプチド配列を有する。用語「アディプシン」または「因子D」または「補因子D(CFD)」は、セリンプロテアーゼ活性を有し、CFD遺伝子によりコードされる253残基のタンパク質を意味する。有利には、アディプシンは、NP_001919で表されるペプチド配列を有する。用語「アディポネクチン」または「AdipoQ」、「Acr30」(adipocyte complement-related protein of 30kD)、「APM1」(adipose most abundant gene transcript 1)、または「GBP28」(gelatin-binding protein of 28kD)は、とりわけ、脂質およびグルコース代謝の調節に参与する244アミノ酸のタンパク質を意味する。有利には、このタンパク質は、NP_001171271.1で表されるアミノ酸配列を有する。「レジスチン」または「ADSF」(adipose tissue-specific secretory factor)または「XCP1」(C/EBP-epsilon-regulated myeloid-specific secreted cysteine-rich protein)は、RSTN遺伝子によりコードされている108アミノ酸を有するタンパク質である。有利には、レジスチンタンパク質は、タンパク質配列NP_0011803.1を有する。タンパク質「ASP」は、本発明によれば、脂肪

10

20

30

40

50

細胞に特異的であって、これらの細胞へのグルコース取り込みおよび非エステル化脂肪酸貯蔵を調節するC3補因子(NP__000055.2)の切断産物である。

【0104】

白色脂肪細胞は、保存されているトリグリセリドから遊離脂肪酸の形態でエネルギーを放出することができ、これが脂肪分解である。さらに好ましい実施態様では、本発明による脂肪細胞関連マーカーとしては、脂肪分解、すなわち、トリグリセリド加水分解に関連する酵素活性が含まれる。優先的には、前記酵素活性は、リパーゼ型の活性である。本発明による「リパーゼ」は、エステル官能基を加水分解することができ、かつ、トリグリセリドのグリセロールおよび脂肪酸への変換に特化した水溶性酵素である。本発明によるリパーゼは、より優先的には、ホルモン感受性リパーゼ、モノグリセリドリパーゼまたは脂肪トリグリセリドリパーゼである(Lafontan and Langin, Prog Lipd Res, 48(5): 275-297, 2009)。「ホルモン感受性リパーゼ」は、本明細書で使用する場合、トリグリセリドをジグリセリドに、さらにジグリセリドをモノグリセリドに加水分解することができる酵素であり、その活性は、タンパク質キナーゼA(PKA)によるリン酸化を介して細胞内cAMPレベルにより調節される。ホルモン感受性リパーゼの例はヒトHSLタンパク質に相当し、その配列はNP__005348.2で示される。用語「モノグリセリドリパーゼ」は、モノグリセリドをグリセロールと脂肪酸に加水分解することができる膜に会合した酵素を表す。ヒトモノグリセリドリパーゼは、タンパク質MAGL、MGLまたはMGLL(NP__001243514)に相当する。本発明による「脂肪トリグリセリドリパーゼ」は、トリグリセリドを、ただしトリグリセリドだけを加水分解することができる(従って、ジグリセリドおよび/またはモノグリセリドを加水分解することはできない)酵素であり、PKAによりリン酸化されない。例えば、識別番号NP__065109.1に相当する配列を有するヒトATGLタンパク質が挙げられる。

10

20

【0105】

前述のように、本発明による生物学的マーカーは当業者に周知である。前記生物学的マーカーをアッセイするための方法が記載され、長年研究室で慣用されており、従って、本明細書でさらに詳しくそれらを記載する必要はない。

【0106】

本発明の1つの有利な実施態様によれば、候補マーカーの発現は、対照マーカーの発現に対して正規化される。本発明による「対照マーカー」は、その発現が対象とする細胞種およびドナーの年齢によらずに同一であるマーカーである。言い換えれば、対照マーカーは、小児、特に、新生児、乳児および/または2~16歳の間の小児、ならびに成人で、同程度で発現される。

30

【0107】

1つの特定の実施態様によれば、候補マーカーが遺伝子マーカーまたはタンパク質マーカーである場合、対照マーカーは、被験者の年齢またはそのタンパク質産物によらず、総ての細胞種で発現される遺伝子である。1つのより具体的な実施態様では、前記対照マーカーは、総ての細胞種で発現され、細胞の生存に不可欠な基本機能を提供するハウスキーピング遺伝子である。ハウスキーピング遺伝子のリストは、例えば、Eisenberg et al. (Trends in Genetics 19: 362-365, 2003)に示されている。本発明による好ましいハウスキーピング遺伝子は、B2M、TFRC、YWHAZ、RPL0、18S、GUSB、UBC、TBP、GAPDH、PPIA、POLR2A、ACTB、PGK1、Hprt1、IPO8およびHMBsからなる群から選択される遺伝子である。

40

【0108】

本発明が有効薬剤、化粧品出発材料および/または化粧品処方物の容易な単離および特性評価を可能とするという利点を与えることは、当業者に自明である。特に、本発明は、有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物の忍容性、皮膚浸透および有効性を容易に確認することを可能とする。例えば、場合によっては、これらの薬剤、これらの組成物またはこれらの処方物に十分な忍容性があるか、また、例えば、炎症関連マーカーなどのストレスを示すマーカーの発現を誘導しないかを確認することを求めることができる。

50

【0109】

よって、本発明はまた、有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物の忍容性を評価するための方法であって、下記の工程：

- a) 小児の皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；
- b) 有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物をサンプル(A)と接触させる工程；
- c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；
- d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；
- e) 工程c)の発現レベルおよび工程d)の発現レベルの間の比を計算する工程；および
- f) 前記有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物が小児の皮膚によって十分認容されるかどうかを判定する工程を含む方法に関する。

10

【0110】

より好ましい実施態様では、サンプル(A)のドナーは、より詳しくは、0～1か月齢、1か月齢～2歳の間または2～16歳の間ドナーである。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間乳児、および2～16歳の間小児からなる群から選択される。

【0111】

本発明による対照サンプルは、有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物と接触されていないサンプルであり、工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の有意な比較を可能とする。例えば、有効薬剤、組成物または処方物で処理されていないサンプル(A)が対照として使用可能である。この場合、本発明による生物学的マーカーの発現レベルは、有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物に接触させる前および接触させた後のサンプル(A)で測定される。

20

【0112】

有効薬剤は、その有効薬剤が本発明による生物学的マーカーの発現を変調しなければ、小児の皮膚により十分認容される有効薬剤である。同様に、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物は、その生物学的マーカーの発現がサンプル(A)へのその添加により変調されなければ十分な忍容性がある。前記変調は、場合によって、特に、生物学的マーカーの性質によって、前記マーカーの発現の増強または低下に相当し得る。特に、炎症マーカーの発現は、小児の皮膚が攻撃された際に増強することが知られている。他方、これらの炎症マーカーの発現は、本出願の実験結果によって実証されるように、十分認容される有効薬剤、組成物または処方物によっては影響を受けない。好ましい実施態様では、工程c)の生物学的マーカーは、炎症マーカーである。より好ましくは、工程c)の生物学的マーカーはIL1またはIL8である。

30

【0113】

本発明による方法は、薬剤、組成物または処方物で処理したサンプルおよび対照サンプルにおける細胞生存率の比較をさらに含んでなり得る。この場合、薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物は、サンプルの細胞生存率がその有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物の存在によって影響を受けなければ、小児の皮膚により十分認容される。

40

【0114】

よって、さらに好ましい実施態様によれば、本発明による方法は、有効薬剤、皮膚化粧品組成物または化粧品処方物で処理されたサンプル(A)における細胞生存率を決定し、対照サンプルにおける細胞生存率を決定し、両者を比較するためのさらなる工程を含む。

【0115】

細胞生存率を決定するための多くの試験が当業者に利用可能であり、美容術において慣用されている。特に、例えば、Mosman et al. (J Immunol Methods, 65(1-2): 55-63, 1983)に記載のMTT検査が挙げられる。

50

【0116】

また、例えば、遺伝子および/またはパリアタンパク質などの、異なる年齢群に特徴的なマーカーの発現増強を誘導する薬剤を検出することも対象とされ得る。

【0117】

よって、さらなる側面において、本発明は、小児の皮膚、より詳しくは、新生児、乳児および/または2～16歳の小児の皮膚に効果を有する有効薬剤を単離するために好適である。生物学的マーカーの同定は、これらのマーカーの発現を変調するまたはしない有効薬剤を同定するために好適である。

【0118】

よって、本発明はまた、小児用の皮膚化粧料組成物を調製するための有効薬剤を同定するための方法であって、下記の工程：

- a) 小児の皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；
- b) 候補有効薬剤をサンプル(A)と接触させる工程；
- c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；
- d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；
- e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および
- f) 前記有効薬剤が小児の皮膚用の皮膚化粧料組成物を調製するための有効薬剤であるかどうかを判定する工程

を含む方法に関する。

【0119】

より好ましい実施態様では、サンプル(A)のドナーは、より詳しくは、0～1か月齢の間、1か月齢～および2歳の間、または2～16歳の間のドナーである。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間の子供、および2～16歳の間の小児からなる群から選択される。

【0120】

よって、本発明はまた、小児用の皮膚化粧料組成物を調製するための有効薬剤を同定するための方法であって、下記の工程：

- a) 0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間の子供、および2～16歳の間の小児からなる群から選択されるドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；
- b) 候補有効薬剤をサンプル(A)と接触させる工程；
- c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；
- d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；
- e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および
- f) 前記有効薬剤が小児の皮膚用の皮膚化粧料組成物を調製するための有効薬剤かどうかを判定する工程

を含む方法に関する。

【0121】

本発明による対照サンプルは、候補有効薬剤と接触されていないサンプルであり、工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の有意な比較を可能とする。例えば、候補有効薬剤で処理されていないサンプル(A)が対照として使用可能である。この場合、本発明による生物学的マーカーの発現レベルは、候補有効薬剤に接触させる前および接触させた後のサンプル(A)で測定される。

【0122】

候補有効薬剤は、その有効薬剤が本発明による生物学的マーカーの発現を変調するために好適であれば、小児の皮膚用の皮膚化粧料組成物を調製するための有効薬剤である。前記変調は、場合によって、特に、生物学的マーカーの性質によって、前記マーカーの発現の増強または低下に相当し得る。特に、皮膚バリアマーカーの発現を刺激するまたは炎症

10

20

30

40

50

マーカ-を制限する有効薬剤を単離することが対象とされ得る。

【0123】

さらなる側面において、本発明は、小児の皮膚、より詳しくは、新生児、乳児および/または2~16歳の小児の皮膚用の処方物の開発に使用するために好適な出発材料を単離するために好適である。

【0124】

本発明による処方物は、一般に特性に関して表される要件に近づけるために、種々の出発材料の混合物から得られる調製物である。本発明による処方物は、化粧品、医薬、栄養および/または栄養補助食品の分野で使用され得る。それらはヒトまたは動物において、局所適用または経口適用によって使用され得る。

10

【0125】

よって、本発明は、忍容性および皮膚浸透を高める出発材料を同定するために好適である。本発明による生物学的マーカ-の同定は、これらのマーカ-の発現を変調するまたはしない出発材料を同定するために好適である。よって、本発明は、小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物を調製するのに好適な出発材料を同定するための方法であって、下記の工程：

a) 16歳未満のドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；

b) 候補出発材料をサンプル(A)と接触させる工程；

c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカ-の発現レベルを測定する工程；

20

d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカ-の発現レベルを測定する工程；

e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および
f) 前記候補出発材料が小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物を調製するための出発材料であるかどうかを判定する工程を含む方法に関する。

【0126】

1つのより好ましい実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、より詳しくは、0~1か月齢の間、1か月齢~2歳の間、または2~16歳の間のドナーである。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0~1か月齢の間の新生児、1か月~2歳の間の子供、および2~16歳の間の小児からなる群から選択される。

30

【0127】

よって、本発明はまた、小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物を調製するために使用するのに好適な出発材料を同定するための方法であって、下記の工程：

a) 0~1か月齢の間の新生児、1か月~2歳の間の子供、および2~16歳の間の小児からなる群から選択されるドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；

b) 候補出発材料をサンプル(A)と接触させる工程；

c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカ-の発現レベルを測定する工程；

40

d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカ-の発現レベルを測定する工程；

e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および
f) 前記候補出発材料が小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物を調製するための出発材料であるかどうかを判定する工程を含む方法に関する。

【0128】

本発明による対照サンプルは、候補出発材料と接触されていないサンプルであり、工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の有意な比較を可能とする。例えば、候補出発材料で処理されていないサンプル(A)が対照として使用可能である。この場合、

50

本発明による生物学的マーカーの発現レベルは、候補出発材料に接触させる前および接触させた後のサンプル(A)で測定される。

【0129】

よって、本発明は、処方物で使用するのに好適な出発材料を単離および特徴付けるために好適であるだけでなく、さらに、すでに調製された処方物を試験するため、小児の皮膚に対する忍容性、有効性、毒性学および皮膚浸透に関して最適な品質を有するものを同定するためにも好適であることが明らかである。実際に、当業者ならば、ある処方物が小児の皮膚に使用可能であるかどうかを決定するためには、本発明による1または複数の生物学的マーカーの発現を測定するだけでは十分でないことを容易に理解するであろう。

【0130】

よって、本発明は、小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物を同定するための方法であって、下記の工程：

a) 16歳未満のドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；

b) 候補処方物をサンプル(A)と接触させる工程；

c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および

f) 前記候補化粧品処方物が小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物であるかどうかを判定する工程

を含む方法に関する。

【0131】

1つのより好ましい実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、より詳しくは、0~1か月齢、1か月齢~2歳の間のまたは2~16歳の間のドナーである。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0~1か月齢の間の新生児、1か月~2歳の間の乳児、および2~16歳の間の小児からなる群から選択される。

【0132】

よって、本発明は、小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物を同定するための方法であって、下記の工程：

a) 0~1か月齢の間の新生児、1か月~2歳の間の乳児、および2~16歳の間の小児からなる群から選択されるドナーから得られる皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A)を取得する工程；

b) 候補処方物をサンプル(A)と接触させる工程；

c) 本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける少なくとも1つの生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

d) 対照サンプルにおいて前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および

f) 前記候補化粧品処方物が小児用の化粧品、医薬、栄養補助食品および/または栄養補助処方物であるかどうかを判定する工程

を含む方法に関する。

【0133】

本発明による対照サンプルは、候補処方物と接触されたサンプルであり、工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の有意な比較を可能とする。例えば、候補処方物で処理されていないサンプル(A)が対照として使用可能である。この場合、本発明による生物学的マーカーの発現レベルは、候補出発材料に接触させる前および接触させた後のサンプル(A)で測定される。

【0134】

本発明のさらなる態様によれば、小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーは、小児を侵す皮膚障害を特徴付けるために好適である。より詳しくは、本発明による前記生物学的

10

20

30

40

50

マーカーを用い、新生児、乳児および/または2～16歳の間の小児を侵す皮膚疾患を特徴付けることができる。

【0135】

用語「皮膚障害」は、本明細書において、被験者の皮膚に存在しがちないずれの異常反応も意味する。これらの病態は、皮膚自体（すなわち、表皮、真皮および/または皮下組織）と、それに付属する毛穴、汗腺および皮脂腺、毛または爪との両方を侵す。

【0136】

本発明による皮膚障害は、損傷を受けている、または状態が十分でない皮膚に相当する病変を生じる。損傷した皮膚としては、例えば、過敏性皮膚、乾燥皮膚、太陽、放射性、寒冷、ストレスもしくは汚染によるか、アレルギー、じんま疹、湿疹、および他の形態の皮膚炎、例えば、アトピー性皮膚炎、膿痂疹、刺激性皮膚炎、特に、臀部の刺激性皮膚炎(irritative dermatitis)もしくはおむつかぶれ、接触性皮膚炎、皮膚および頭皮の脂漏性皮膚炎(seborrheic dermatitis)（新生児頭部皮膚炎）、乾癬、Leiner-Moussous病によるか、または創傷もしくは火傷によって損傷を受けた皮膚が含まれる。よって、「皮膚障害」には、ドライパッチ、管腫（結節性、皮下または平面を含む）、血管腫、乳児性座瘡、青年期座瘡、魚鱗癬（例えば、尋常性、先天性、ハーレクインなど）などといった多様な障害が含まれる。皮膚障害はまた、例えば、寄生虫、ウイルス、細菌または真菌起源の外部感染によっても発生または増悪し得る。従って、皮膚障害としては特に、疣贅、ストロフルス、疥癬、シラミ寄生、または真菌症が含まれる。最後のものは、身体上の寄生性顕微鏡的真菌の増殖により引き起こされる寄生的感染からなる。最も多い真菌症の形態の中でも、皮膚酵母増殖により引き起こされるカンジダ症およびピチロスポルム症(pityriasis)が挙げられる。

【0137】

この特定の実施態様によれば、本発明は、小児を侵す皮膚障害の少なくとも1つの生物学的マーカーを同定するための方法であって、下記の工程：

a) 前記皮膚障害に罹患している被験者から得られる小児の皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A')を取得する工程；

b) 健常被験者から得られる小児の皮膚細胞の少なくとも1つの対照サンプル(B)を取得する工程；

c) 工程a)のサンプルにおいて、上記の本発明の方法に従って同定された小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーである少なくとも1つの候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

d) 工程b)のサンプルにおいて、前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

e) 工程a)の発現レベルと工程b)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および

f) 前記候補生物学的マーカーが小児を侵す皮膚障害の生物学的マーカーであるかどうかを判定する工程

を含む方法に関する。

【0138】

好ましい実施態様によれば、サンプル(A')は、ドナー、より詳しくは、0～1か月齢の間、1か月齢～2歳の間または2～16歳の間のドナーから得られる。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間乳児、および2～16歳の間の小児からなる群から選択される。

【0139】

優先的には、前記候補生物学的マーカーは、その発現レベルが健常な皮膚と前記皮膚障害の臨床的特徴を呈する皮膚とで異なれば、皮膚障害の生物学的マーカーである。より好ましくは、前記マーカーが皮膚障害に罹患している被験者と健常被験者とで差次的に発現されれば、前記マーカーはその皮膚障害を特徴付ける。これにより、工程e)で、1と異なる比が生じる。

【0140】

10

20

30

40

50

当業者が容易に理解できるように、小児（特に、新生児、乳児および／または2～16歳の小児）における皮膚疾患の特異的マーカーを同定することは、前記皮膚疾患を治療するための有効薬剤を単離するのに好適であるという即時的利益を持つ。

【0141】

よって、本発明は、小児における皮膚障害を治療するための有効薬剤を同定するための方法であって、下記の工程：

a) 前記皮膚障害に罹患している被験者から得られる小児の皮膚細胞の少なくとも1つのサンプル(A')を取得する工程；

b) 候補有効薬剤を前記サンプル(A')の表面に接触させる工程；

c) 工程b)のサンプル(A')において、上記の本発明の方法に従って同定された小児を侵す前記皮膚障害の少なくとも1つの候補生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

d) 少なくとも1つの対照サンプルにおいて前記生物学的マーカーの発現レベルを測定する工程；

e) 工程c)の発現レベルと工程d)の発現レベルとの間の比を計算する工程；および

f) 前記候補有効薬剤が小児において皮膚障害を治療するための有効薬剤であるかどうかを判定する工程

を含む方法に関する。

【0142】

好ましい実施態様によれば、サンプル(A')は、ドナー、より詳しくは、0～1か月齢の間、1か月齢～2歳の間または2～16歳の間ドナーから得られる。言い換えれば、この実施態様によれば、サンプル(A)のドナーは、0～1か月齢の間の新生児、1か月～2歳の間乳児、および2～16歳の間小児からなる群から選択される。

【0143】

有利には、前記皮膚障害を治療するための有効薬剤は、前記皮膚障害の前記生物学的マーカーの発現を変調することができる。よって、候補がその候補で処理されていない細胞(A')と処理された細胞とで前記生物学的マーカーの異なる発現を生じれば、その候補は本発明による有効薬剤であるといえる。この場合、工程d)の対照は、有利には非処理サンプル(A')である。より有利には、前記有効薬剤は、処理されたサンプルにおける前記生物学的マーカーの発現レベルを変調するために好適であり、その結果、その発現レベルは健常サンプルにおいて見られる発現レベルと同等となる。この場合、工程d)は、少なくとも2つの対照サンプル(1つは非処理サンプル(A')に相当し、他は健常サンプル(B)に相当する)における前記生物学的マーカーの発現レベルの測定を含む。候補マーカーが皮膚障害を治療するための有効薬剤であれば、処理(A')と非処理(A')との発現レベルの間の比が1と異なること、一方、(A')と(B)との発現レベルの間は1に近いということが確認されるべきである。

【0144】

本発明を、下記の実施例を用いてさらに具体的に説明する。

【実施例】

【0145】

実施例 1

小児の皮膚を特徴付ける生物学的マーカーを同定するために、発明者らは、小児の年齢に応じてゲノム解析研究を行った。

【0146】

材料および方法

皮膚サンプルは、1か月齢、3か月齢、3歳、6歳および11歳、および成人のドナーにおいて採取した(ドナーの性別によって包皮除去または乳房形成術)。

【0147】

これらのサンプルを用いて再生皮膚モデルを作製した。従って、再生表皮は、Poumay et al. (Arch Dermatol Res, 296(5): 203-211, 2004)による技術を用いて、選択された種

10

20

30

40

50

々のドナーで作製した。2日間の浸漬培養の後、再生表皮を気/液界面で5または9日間培養した。この培養期間において、2～3日毎に培地を補充した。

【0148】

インキュベーション終了時に、表皮をすすぎ、半分を冷凍し、半分をホルムアルデヒド溶液中で固定した。表皮の構造を確認するために、ミクロトームを用い、固定組織において横断面をとった。

【0149】

これらの再生表皮と並行して、種々のサンプルからケラチノサイトの単層培養物を作製した。これらの種々のケラチノサイトを12ウェルプレートの培養培地中に播種した。48時間のインキュベーション後(再生表皮の場合の気液継代の日)、細胞シートをTri
pure Isolation Reagent(商標)(Roche Applied
Science)を用いて溶解させ、-80で冷凍した。

【0150】

インキュベーションの終了時に、表皮または細胞シートをTri
pure Isolation Reagent(商標)を用いて溶解させ、供給者が推奨しているプロトコルに従い、全RNAを抽出した。RNAの量および質をBioanalyzer(Agilent
Technologies)を用いて評価した。各RNAサンプルをアリコートに分け、サンプルの一部をマイクロチップハイブリダイゼーションに使用し、残りを定量的RT-PCR実験に使用するまで冷凍した。

【0151】

RNAを増幅し、GeneChip 3'IVT Express Kit(Affymetrix)を供給者が推奨しているプロトコルに従って用いて標識した。次に、それらをAffymetrix(商標)GeneAtlas(商標)フルイディクスステーションハイブリダイゼーションステーションにおいてAffymetrix(商標)チップに45で16時間ハイブリダイズさせた。この工程は、「3'IVTアレイ」用GeneAtlas(商標)ハイブリダイゼーション、洗浄および染色キット」のキット(Affymetrix(商標))を用いて行った。U219チップは、GeneAtlas(商標)イメージングステーションスキャナを用いて解析した。

【0152】

チップハイブリダイゼーションの手段によって得られたデータは、Affymetrix
が供給しているソフトウェア(Affymetrix(商標)GCOS、Affymetrix(商標)Expression Console)を用いて処理および正規化した。

【0153】

チップハイブリダイゼーションの手段によって得られた結果は、RT定量的PCR(RT-qPCR)の手段によって確認した。このために、まず、スーパースク립トII酵素(Gibco)を用い、オリゴ(dT)の存在下で、RNAを逆転写してcDNAを得た。

【0154】

結果

組織学的解析は、再生した表皮の総てが、ドナーに無関係に、5日目および12日目に、遺伝解析結果を検証するのに好適な、予想された形態を持っていたことを示した。特に、基底層、有棘層、顆粒層および角質層が各表皮に見られた。さらに、予想されたように、5日目よりも12日目でその厚さが増していた。

【0155】

ゲノム分析は、ドナーの年齢によって発現が異なる複数のマーカーを同定するために好適であった。これらの結果をRT定量的PCRの手段によって確認した。次に、マーカーを、Ariadne Genomics Pathway Studio(商標)を用いて、生物学的機能によって類別した。

【0156】

このようにして遺伝子CLDN1、IVL、KRT1を含む皮膚バリア遺伝子の一群を同定することができた。これらの表皮バリア機能遺伝子の発現は、再生表皮において年齢とともに増加し(図1A)、他方、これらの遺伝子は最も若い被験者ではほとんど発現していない。これらの結果を、ケラチノサイトにおけるRT定量的PCR分析の手段によって確認した(図1B)。再生表皮およびケラチノサイトで得られた結果は、発現プロファイルに関して類似しており、これにより、採用したアプローチが検証される。さらに、これらの結果は、Fluhr et al. (Exp Dermatol., 19(6): 483-492, 2010)の結果と同様に、皮膚バリア機能の年齢に伴う成熟を示すということに留意されたい。

【0157】

同様に、ストレス応答(GPX3)および生得防護(DEFB1)遺伝子の発現も年齢とともに増加する(それぞれ図2Aおよび2B)。

【0158】

他方、MGST1遺伝子の発現は年齢とともに低下する(図3)。この遺伝子は、1および3か月の小児において有意に発現されるが、その後、その転写は少なくとも5分の1まで低下する。

【0159】

最後に、幹細胞遺伝子FN1、NOTCH1、NID1、KRT19、ITGBP1、ITGA6およびITGB4の発現は、出生後は高いが、年齢とともに低下する(図4)。

【0160】

実施例2

アボカドC7糖に基づく製品(アボカド・ペルセオース、例えば、WO2005/115421、WO2008/025847およびWO2011/073281参照)の忍容性を、1か月齢のドナー由来の再生表皮において評価した。

【0161】

材料および方法

実施例1で明示したように、1か月齢のドナー由来のケラチノサイトを用いて表皮を再生させた。製品として、クレンジングクリームおよびモイスチュアライジングローション(両者ともアボカド・ペルセオースを含有する)をこれらの再生表皮に16時間適用した。対照再生表皮サンプルに0.4%SDSを適用することにより対照を採った。

【0162】

IL-8タンパク質は、Eliisa試験を用い、培養上清においてアッセイした。細胞生存率はMTT検定を用いて評価した。最後に、組織学的分析を、ヘマトキシリンおよびエオジン染色の手段により、パラフィンに包埋された組織に対して行った。

【0163】

結果

表1に報告されている結果は、細胞生存率は、アボカド・ペルセオースを含有するクレンジングクリームまたはモイスチュアライジングローションを適用することによって影響を受けないことを示す。対照的に、SDSで処理した表皮の細胞生存率は、処理後になお生存した細胞がわずか2%であったことから、極めて有意に減少する。

【0164】

さらに、生細胞層の厚さは、アボカド・ペルセオースを含有する製品で処理したサンプルでは対照と同等のレベルで維持される。対照的に、組織学的分析は、SDSで処理した表皮の生細胞の層は、対照で見られた厚さの50~60%に相当するに過ぎないことを示す(図5)。

【0165】

これらの細胞生物学的結果は、種々の処理に応答したIL-8サイトカイン活性化分析により確認される。SDSはこのタンパク質の発現に有意な増強を誘導するが、再生表皮がアボカド・ペルセオースを含有するクレンジングクリームまたはモイスチュアライジングローションで処理される場合には影響は見られない。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 6 】

従って、これらの結果は総て、アボカド・ペルセオースを含有する両製品に毒性がなく、十分な忍容性があることを示す。

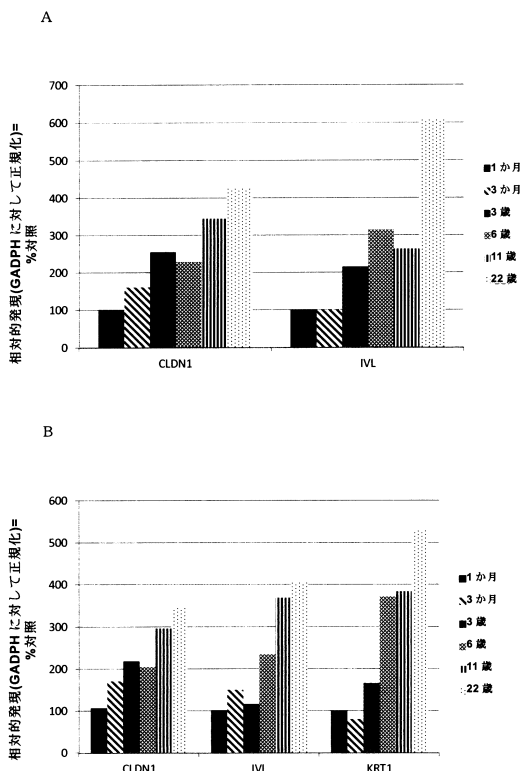
【 0 1 6 7 】

【表 1】

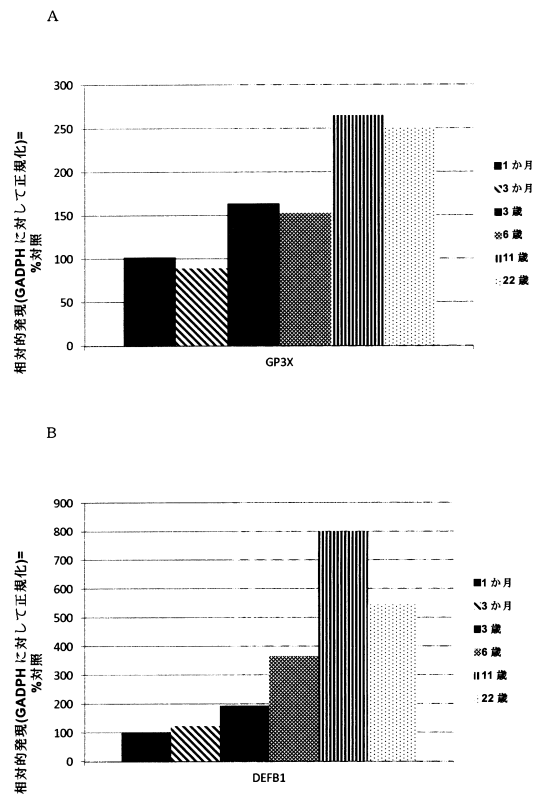
表 1

	対照	+ 0.4% SDS	+洗浄リーム	+モイスチュアライジングローション
生存率	100%	2%	84%	93%
IL8 炎症分子	100%	602%	99%	89%
生存層の厚さ	100%	58%	88%	87%

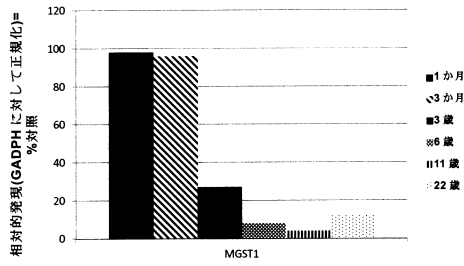
【 図 1 】



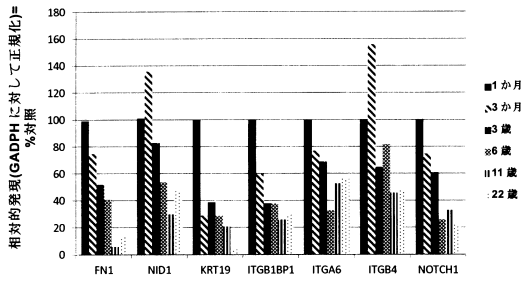
【 図 2 】



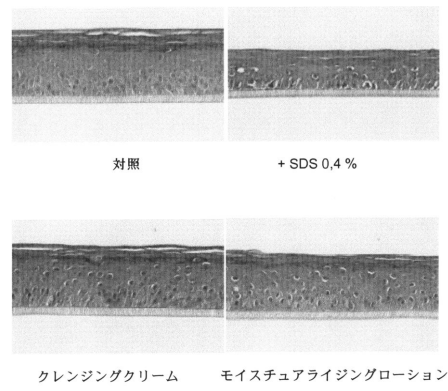
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 カロリーヌ、ボードアン
フランス国ランブイエ、リュ、ラブレ、26、ビス

審査官 植原 克典

(56)参考文献 国際公開第2011/069913(WO, A1)
特表2012-508006(JP, A)
特開2011-067214(JP, A)
国際公開第2011/107679(WO, A1)
CHINESE JOURNAL OF BURNS, 中国, 2011年 2月 1日, Vol.27, No.1, p.26-31
Journal of Cell Science, 1996年, vol.109, p.1017-1028
ARCHIVES OF DERMATOLOGY, 米国, 1994年 1月 1日, Vol.130, No.1, p.82-86
British Journal of Dermatology, 2012年 3月 1日, Vol.166, p.483-490
British Journal of Dermatology, 1980年, Vol.103, p.643-649
Pediatric Dermatology, 2006年, Vol.23, No.2, p.109-113
Skin Research and Technology, 2001年, Vol.7, p.227-237
Toxicology in Vitro, 2003年, Vol.17, p.311-321
Toxicology in Vitro, 2004年, Vol.18, p.231-243

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	鉴定小儿皮肤的分子标志物的方法		
公开(公告)号	JP6342391B2	公开(公告)日	2018-06-13
申请号	JP2015521027	申请日	2013-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	科学发展实验室		
申请(专利权)人(译)	LABORATOIRES 捻膨大青色扫描		
当前申请(专利权)人(译)	LABORATOIRES 捻膨大青色扫描		
[标]发明人	フィリップムシカ カロリーヌボードアン		
发明人	フィリップ、ムシカ カロリーヌ、ボードアン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5044 C12Q1/6876 C12Q1/6888 C12Q2600/148 C12Q2600/158 G01N33/5088 G01N33/6881 G01N33/6893 G01N33/92 G01N2800/20 G01N2800/60		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12Q1/02 G01N33/53.M G01N33/53.D		
代理人(译)	中村KoTakashi 反町隆史博		
优先权	2012056766 2012-07-13 FR		
其他公开文献	JP2015528699A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定用于表征儿童皮肤的生物标志物的方法。因此，本发明的方法可以鉴定在儿童皮肤中比在成人皮肤中表达不同的分子标记物。因此，本发明使皮肤能够从分子水平从出生开始表征，并随着年龄对其变化进行追踪。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6342391号 (P6342391)
(45) 発行日 平成30年6月13日 (2018. 6. 13)	(24) 登録日 平成30年5月25日 (2018. 5. 25)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1 / 6 8 (2018. 01)	C 1 2 Q 1 / 6 8 Z N A A	
C 1 2 N 1 5 / 0 9 (2006. 01)	C 1 2 N 1 5 / 0 0 A	
C 1 2 Q 1 / 0 2 (2006. 01)	C 1 2 Q 1 / 0 2	
G O 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G O 1 N 3 3 / 5 3 M	
	G O 1 N 3 3 / 5 3 D	
		請求項の数 16 (全 31 頁)
(21) 出願番号 特願2015-521027 (P2015-521027)	(73) 特許権者 503028525 ラボラトワール エクспанシオンス フランス国、92400 クルブヴォア、 アヴニユ ドゥ ラルシュ 10	
(86) (22) 出願日 平成25年7月15日 (2013. 7. 15)	(74) 代理人 100091487 弁理士 中村 行孝	
(65) 公表番号 特表2015-528699 (P2015-528699A)	(74) 代理人 100117787 弁理士 勝沼 宏仁	
(43) 公表日 平成27年10月1日 (2015. 10. 1)	(74) 代理人 100126099 弁理士 反町 洋	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/064926	(72) 発明者 フィリップ、ムシカ フランス国ベルサイユ、リュ、ド、ラ、パ ロワス、32	
(87) 国際公開番号 W02014/009566		
(87) 国際公開日 平成26年1月16日 (2014. 1. 16)		
審査請求日 平成28年4月22日 (2016. 4. 22)		
(31) 優先権主張番号 1256766		
(32) 優先日 平成24年7月13日 (2012. 7. 13)		
(33) 優先権主張国 フランス (FR)		

(54) 【発明の名称】 小児皮膚の分子マーカーの同定方法

最終頁に続く