

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-257347

(P2013-257347A)

(43) 公開日 平成25年12月26日(2013.12.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	4 C O 8 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 7	4 C O 8 4
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08	

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L 公開請求 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-201619 (P2013-201619)
 (22) 出願日 平成25年9月27日 (2013.9.27)

(71) 出願人 000113470
 ポーラ化成工業株式会社
 静岡県静岡市駿河区弥生町6番48号
 (74) 代理人 100100549
 弁理士 川口 嘉之
 (74) 代理人 100126505
 弁理士 佐貫 伸一
 (74) 代理人 100131392
 弁理士 丹羽 武司
 (74) 代理人 100151596
 弁理士 下田 俊明
 (72) 発明者 竹内 啓貴
 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポー
 ラ化成工業株式会社横浜研究所内

最終頁に続く

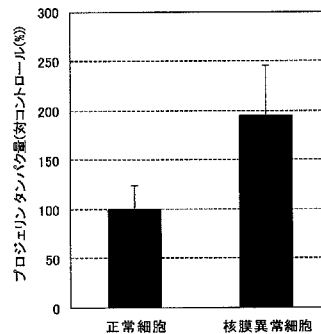
(54) 【発明の名称】 スクリーニング方法及び抗老化用の組成物

(57) 【要約】

【課題】化粧品原料(但し、医薬部外品を含む)として好適な成分、特に新たな作用機序に基づいた抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に選別することができるスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】被検物質を接触させた細胞と被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価し、これらの核膜異常状態の差を指標とすることによって、抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に選別することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価し、被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態の差を指標として、抗老化作用を有する成分を選別することを特徴とする、抗老化作用のある成分のスクリーニング方法。

【請求項 2】

前記細胞が、核膜異常が生じた細胞である、請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

前記核膜異常が生じた細胞が、下記 (a) ~ (c) の何れかの細胞である、請求項 2 に記載のスクリーニング方法。

10

(a) 核膜異常が生じている患者から採取した細胞

(b) 圧力を加えることによって核膜異常を生じさせた細胞

(c) アンチセンスオリゴを接触させることによって核膜異常を生じさせた細胞

【請求項 4】

前記細胞が、ヒト線維芽細胞である、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

核膜異常因子の量を測定すること及び / 又は核形態を定量することによって細胞の核膜異常状態を評価する、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法。

20

【請求項 6】

前記核膜異常因子が、プロジェリン (Progerin) である、請求項 5 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

プロジェリンタンパクの量を測定することによって核膜異常因子の量を測定する、請求項 6 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】

プロジェリン mRNA の発現量を測定することによって核膜異常因子の量を測定する、請求項 6 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 9】

細胞の核染色像を画像解析することによって核形態を定量する、請求項 5 ~ 6 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法。

30

【請求項 10】

前記核染色像が、ラミン A タンパクの免疫染色による染色像又は DAPI による染色像である、請求項 8 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 11】

被検物質を接触させていない細胞に比べて、被検物質を接触させた細胞の核膜異常が抑制されている場合に、前記被検物質を抗老化作用を有する成分として選別する、請求項 1 ~ 10 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 12】

皮膚の抗老化作用を有する成分を選別するものである、請求項 1 ~ 11 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法。

40

【請求項 13】

シワの予防作用又は改善作用を有する成分を選別するものである、請求項 12 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有する、抗老化用組成物。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 13 の何れか 1 項に記載のスクリーニング方法によって選別された抗老化作

50

用を有する成分を含有する、皮膚外用剤。

【請求項 16】

化粧品（但し、医薬部外品を含む）である、請求項 15 に記載の皮膚外用剤。

【請求項 17】

シワの予防又は改善用である、請求項 15 又は 16 に記載の皮膚外用剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化粧品原料等として好適な抗老化作用を有する成分のスクリーニング方法、並びに当該抗老化作用を有する成分を含有してなる抗老化用の組成物に関する。

10

【背景技術】

【0002】

真核生物の核を細胞質から隔離する役割を果たす核膜は、内膜と外膜よりなる脂質二重膜構造を有すると共に、核ラミナと呼ばれる成分が核膜構造の形成・維持に重要な役割を果たしている。核ラミナは、ラミンやラミン結合蛋白質により形成され、内膜の内側（核質側）の中間径フィラメントによる格子状の裏打ち構造を構築し、核の状態を保持するほか、クロマチンの構造変化の動態や機能制御（例えば、非特許文献 1 を参照）にも関与することが知られている。このため、ラミン等の核膜上の蛋白質成分の異常は、核膜異常が関連する組織特異的な遺伝病や老化などの多細胞生物に特有な問題を引き起こす生体分子として注目されている。

20

【0003】

前記の核膜異常が関連する疾患としては、先天的遺伝子異常を原因とするハッチソン・ギルフォード・プロジェリア症候群（HGPS）が有名である。HGPS は、原因遺伝子の特定により、ヒト 1 番染色体上にあるラミン A（LMNA）遺伝子の異常プロセッシングにより、プロジェリンと呼ばれる異常タンパクが産生され、核膜に異常が生じることにより、老化促進が引き起こされることが明らかにされている。本疾患の主要な症状としては、身長、体重の発育が乏しいことのほか、症状の進行に伴い皮膚の老化、高コレステロール血症、動脈硬化の亢進、糖尿病、骨粗鬆症、老年性の白内障、白髪、脱毛などの早老変化が顕著になることが挙げられる。このことは、核膜異常が、様々な老化現象の発現に深く関与していることを示唆している。また近年、HGPS に観察されるのと類似の核膜異常が正常老化皮膚細胞や、紫外線を照射した正常皮膚細胞において確認されたこと（例えば、非特許文献 2、3 を参照）により、核膜異常現象と正常皮膚老化との関連性に注目が集まっている。しかしながら、核膜異常現象が、いかなる生体反応を経由し老化現象を促進・顕在化させるかに関する研究は、はじまったばかりであり、その詳細な機構については、得られた知見も限られているのが現状である（例えば、非特許文献 4 を参照）。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】古川和広ほか、蛋白質・核酸・酵素、46（15）、（2001）

【非特許文献 2】Paola Scaffidi et al., Science, 312（5776）、1059 - 1063（2006）

40

【非特許文献 3】Takeuchi Hirotsuka, Thomas M. Ruenger, J. Invest. Dermatol., 133（7）、1857 - 62（2013）

【非特許文献 4】Dayle McClintock et al., Pros One, 12（e1269）、1 - 12（2007）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、化粧品原料（但し、医薬部外品を含む）として好適な成分、特に新たな作用

50

機序に基づいた抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に選別することができるスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、被検物質を接触させた細胞と被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価し、これらの核膜異常状態の差を指標とすることによって、抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に選別することができることを見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明は、以下に示す通りである。

< 1 > 被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価し、被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態の差を指標として、抗老化作用を有する成分を選別することを特徴とする、抗老化作用のある成分のスクリーニング方法。

< 2 > 前記細胞が、核膜異常が生じた細胞である、< 1 >に記載のスクリーニング方法。

< 3 > 前記核膜異常が生じた細胞が、下記(a)~(c)の何れかの細胞である、< 2 >に記載のスクリーニング方法。

(a) 核膜異常が生じている患者から採取した細胞

(b) 圧力を加えることによって核膜異常を生じさせた細胞

(c) アンチセンスオリゴを接触させることによって核膜異常を生じさせた細胞

< 4 > 前記細胞が、ヒト線維芽細胞である、< 1 >~< 3 >の何れかに記載のスクリーニング方法。

< 5 > 核膜異常因子の量を測定すること及び/又は核形態を定量することによって細胞の核膜異常状態を評価する、< 1 >~< 4 >の何れかに記載のスクリーニング方法。

< 6 > 前記核膜異常因子が、プロジェリン(Progerin)である、< 5 >に記載のスクリーニング方法。

< 7 > プロジェリントタンパクの量を測定することによって核膜異常因子の量を測定する、< 6 >に記載のスクリーニング方法。

< 8 > プロジェリンmRNAの発現量を測定することによって核膜異常因子の量を測定する、< 6 >に記載のスクリーニング方法。

< 9 > 細胞の核染色像を画像解析することによって核形態を定量する、< 5 >~< 6 >の何れかに記載のスクリーニング方法。

< 10 > 前記核染色像が、ラミンAタンパクの免疫染色による染色像又はDAPIによる染色像である、< 9 >に記載のスクリーニング方法。

< 11 > 被検物質を接触させていない細胞に比べて、被検物質を接触させた細胞の核膜異常が抑制されている場合に、前記被検物質を抗老化作用を有する成分として選別する、< 1 >~< 10 >の何れかに記載のスクリーニング方法。

< 12 > 皮膚の抗老化作用を有する成分を選別するものである、< 1 >~< 11 >の何れかに記載のスクリーニング方法。

< 13 > シワの予防作用又は改善作用を有する成分を選別するものである、< 12 >に記載のスクリーニング方法。

< 14 > < 1 >~< 13 >の何れかに記載のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有する、抗老化用組成物。

< 15 > < 1 >~< 13 >の何れかに記載のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有する、皮膚外用剤。

< 16 > 化粧品(但し、医薬部外品を含む)である、< 15 >に記載の皮膚外用剤。

< 17 > シワの予防又は改善用である、< 15 >又は< 16 >に記載の皮膚外用剤。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に判別することができ

10

20

30

40

50

ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】正常細胞及び核膜異常線維芽細胞におけるプロジェリンタンパク量を示した図である。

【図2】正常細胞及び核膜異常線維芽細胞におけるプロジェリンmRNA発現量を示した図である。

【図3】正常細胞及び核膜異常線維芽細胞におけるコンター比を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

< 抗老化作用を有する成分のスクリーニング方法 >

本発明の一態様である抗老化作用を有する成分のスクリーニング方法（以下、「本発明のスクリーニング方法」と略す場合がある。）は、被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価し、被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態の差を指標として、抗老化作用を有する成分を選別することを特徴とする。

本発明者らは、化粧品原料（但し、医薬部外品を含む）として好適な成分、特に新たな作用機序に基づいた抗老化作用を有する成分を選別することができるスクリーニング方法を求めて研究を重ねた結果、被検物質を接触させた細胞と被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価し、これらの核膜異常状態の差を指標とすることによって、抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に選別することができることを見出した。

核膜異常が関連する疾患としては、先天的遺伝子異常を原因とするハッチソン・ギルフォード・プロジェリア症候群（HGFS）が有名である。HGFSは、原因遺伝子の特定により、ヒト1番染色体上にあるラミンA（LMNA）遺伝子の異常プロセッシングにより、プロジェリンと呼ばれる異常タンパクが産生され、核膜に異常が生じることにより、老化促進が引き起こされることが明らかにされている。本発明者らは、核膜異常を抑制することが老化の抑制に繋がることを確認するとともに、被検物質を接触させた細胞の核膜異常状態を評価することが抗老化作用を有する成分を選別する上で非常に有効であることを見出したのである。

【0010】

本発明のスクリーニング方法において使用する細胞は、核膜を有するものであればその具体的種類は特に限定されないが、角化細胞、線維芽細胞等が挙げられる。これらの中でも、線維芽細胞が好ましく、ヒト線維芽細胞が特に好ましい。ヒト線維芽細胞を使用することによって、特に皮膚の抗老化作用を有する成分をより精度良く選別するものと考えられる。

また、本発明のスクリーニング方法において使用する細胞は、正常な細胞のほか、核膜異常が生じた細胞であってもよい。核膜異常が生じた細胞を使用することによって、抗老化作用を有する成分をより精度良く選別することができる。

なお、「核膜異常が生じた細胞」として、下記（a）～（c）の何れかの細胞を挙げることができる。

（a）核膜異常が生じている患者から採取した細胞

核膜異常が生じている患者は、例えば後述する核膜異常状態の評価方法によって判別することができる。

（b）圧力を加えることによって核膜異常を生じさせた細胞

本発明者らは、細胞に圧力を加えることによって、効率的に核膜異常を生じさせることができるという新たな知見を見出している。圧力を加える方法として、例えばシリコン製の培養容器（STB-CH-4W、ストレッチ株式会社）等を水平方向に伸展させ、伸展状態を保持しながら細胞を培養した後に、横方向に33%収縮して8日間培養することで横方向の圧力刺激を加えることによって核膜異常を生じさせることができる。かかる方法は、精度良く、かつ簡便に核膜異常を生じさせることができる方法であり、抗老化作用

10

20

30

40

50

を有する成分をより精度良く、かつより簡便に選別することに繋がる。

(c) アンチセンスオリゴを接触させることによって核膜異常を生じさせた細胞

アンチセンスオリゴは、核膜異常を生じさせることができるものであれば特に限定されないが、Fong L. G.らの方法(Human Molecular Genetics, 18(13), 2462-2471)により提示された、特定の配列を有するアンチセンスオリゴを使用することが好ましい。

また、本発明のスクリーニング方法は、採取等した細胞をそのまま使用するほか、培養した細胞を使用してもよい。細胞の培養は、例えば被検物質を接触させる細胞の場合、被検物質を接触させる前に行っても、被検物質を接触させた後に行っても、或いは被検物質を接触させる前及び被検物質を接触させた後の両方に行ってもよい。また、核膜異常が生じた細胞を使用する場合、核膜異常を生じさせる前に行っても、核膜異常を生じさせた後に行っても、或いは核膜異常を生じさせる前及び核膜異常を生じさせた後の両方に行ってもよい。なお、培養条件は、使用する細胞に応じて公知の培養方法を適宜採用することができる。

10

【0011】

本発明のスクリーニング方法は、「被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態を評価する」ことを特徴とするが、核膜異常状態を評価する具体的な評価方法は特に限定されず、光学顕微鏡等によって核膜を観察する等の公知の方法を適宜採用することができるが、核膜異常状態を定量的に表すことができる評価方法によって評価することが好ましい。具体的には、核膜異常因子の量を測定すること、及び核形態を定量することが挙げられる。

20

「核膜異常因子」とは、具体的には核膜異常の原因となるタンパク質を意味し、核膜異常因子の量が多いほど核膜異常が進んでいると評価することができる。なお、核膜異常因子として、例えばプロジェリン(Progerin)等が挙げられる。

核膜異常因子の量を測定する方法は、特に限定されないが、タンパク発現量を測定する方法、及びmRNA発現量を測定する方法等が挙げられる。タンパク発現量を測定する方法としては、ウェスタンブロット法(western blotting)、酵素結合免疫吸着法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)等が挙げられる。一方、mRNA発現量を測定する方法としては、ノーザンブロット法(northern blotting)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法、リアルタイムPCR(Real time PCR)法、さらにはリアルタイムPCR(Real time PCR)とRT-PCRを組み合わせた方法等が挙げられる。

30

【0012】

核形態を定量する方法は、特に限定されないが、光学顕微鏡等によって核を観察し、核の寸法、面積等の核膜異常状態を表す数値を測定する方法が挙げられる。なお、光学顕微鏡等によって核を観察する場合において、核の染色を行ってもよい。染色方法も特に限定されず、公知の方法を適宜採用することができるが、例えばラミンAタンパクの免疫染色、DAPIによる染色が挙げられる。また、核膜異常状態を表す数値を測定するために、画像をコンピューターに取り込み、公知の画像解析ソフトを利用して測定を行ってもよい。本発明のスクリーニング方法においては、細胞の核染色像を画像解析することによって核形態を定量することが好ましく、ラミンAタンパクの免疫染色による染色像又はDAPIによる染色像を画像解析することによって核形態を定量することが好ましい。

40

また、光学顕微鏡等によって核を観察して測定した核の寸法、面積等の数値を直接使用するほか、これらの数値に基づいて核のコンター比等の数値を算出してもよい。コンター比は、式(コンター比 = $4 \times \text{面積} / \text{周辺長}^2$)によって算出することができる値であり、1に近づくほど正円であり、0に近づくほど輪郭が歪んでいることを表す。従って、核のコンター比が0に近づくほど核膜異常が進んでいると評価することができる。

【0013】

50

本発明のスクリーニング方法は、「被検物質を接触させた細胞及び被検物質を接触させていない細胞の核膜異常状態の差を指標として、抗老化作用を有する成分を選別する」ことを特徴とするが、具体的には被検物質を接触させていない細胞に比べて、被検物質を接触させた細胞の核膜異常が抑制されている場合に、被検物質を抗老化作用を有する成分として選別するものである。

なお、抗老化作用を有する成分をより精度良く選別するため、或いは抗老化作用の強い成分を選別するために、核膜異常が抑制されているか否かの判断について独自の基準を設けて判断してもよい。

例えば、プロジェリンの量を測定することによって細胞の核膜異常状態を評価する場合、下記式によって算出されるプロジェリンの量の比率が、好ましくは95%以下、より好ましくは80%以下となった場合に、核膜異常が抑制されていると判断することが挙げられる。

(プロジェリンの量の比率) = (被検物質を接触させた細胞のプロジェリンの量) / (被検物質を接触させていない細胞のプロジェリンの量) × 100

また、核のコンター比を算出することによって細胞の核膜異常状態を評価する場合、被検物質を接触させた細胞の核のコンター比が被検物質を接触させていない細胞の核のコンター比に対して増加する場合、より好ましくは統計学的に有意に増加する場合に、核膜異常が抑制されていると判断することが挙げられる。

【0014】

本発明のスクリーニング方法は、「抗老化作用を有する成分を選別する」ことを特徴とするが、抗老化作用を有する成分が対象とする具体的な老化現象は特に限定されず、核膜異常との関連性がある皮膚の老化、高コレステロール血症、動脈硬化の亢進、糖尿病、骨粗鬆症、老年性の白内障、白髪、脱毛等の老化現象に広く適用することができる。但し、本発明のスクリーニング方法は、皮膚の抗老化作用を有する成分を選別するものであることが好ましく、シワの予防作用又は改善作用を有する成分を選別するものであることがより好ましい。

【0015】

本発明のスクリーニング方法が選別対象とする被検物質の種類は、特に限定されず、単純な化学物質、植動植物由来の抽出物、植動植物由来の抽出物の分画精製物、及びこれらの混合組成物等に広く適用することができる。

例えば、植物由来の抽出物として、自生又は生育された植物、漢方生薬原料等として販売される日本産のものを抽出及び/又は精製したものを使用するほか、丸善製薬株式会社等の会社より販売されている市販の抽出物を購入し、使用することも挙げられる。前記抽出に用いる植物部位も特に限定されず、全草を使用するほか、植物体、地上部、根茎部、木幹部、葉部、茎部、花穂、花蕾等の部位を使用することもできる。抽出に際し、植物体などの抽出に用いる部位は、予め、粉碎或いは細切して抽出効率を向上させるように加工することが好ましい。抽出物製造においては、植物体等の抽出に用いる部位乃至はその乾燥物1質量部に対して、溶媒を1~30質量部加え、室温であれば数日間、沸点付近の温度であれば数時間浸漬する。浸漬後は、室温まで冷却し、所望により不溶物を除去した後、溶媒を減圧濃縮するなどにより除去することが出来る。しかる後、シリカゲルやイオン交換樹脂を充填したカラムクロマトグラフィーなどで分画精製し、所望の抽出物を得ることが出来る。

前記抽出溶媒としては、極性溶媒が好ましく、水、エタノール、イソプロピルアルコール、ブタノールなどのアルコール類、1,3-ブタンジオール、ポリプロピレングリコールなどの多価アルコール類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、テトラヒドロフランなどのエーテル類から選択される1種乃至は2種以上が好適に例示することができる。

【0016】

<抗老化用組成物・皮膚外用剤>

本発明のスクリーニング方法によって、抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便

10

20

30

40

50

に選別することができることを前述したが、本発明のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有する抗老化用組成物（以下、「本発明の抗老化用組成物」と略す場合がある。）も本発明の一態様である。

本発明の抗老化用組成物は、本発明のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有するものであれば、その用途は特に限定されず医薬品、化粧品、食品、飲料等として利用することができる。また、抗老化作用を有する成分以外の成分についても特に限定されず、食品、医薬品、化粧品等の用途に基づき、それぞれの製剤化で使用される任意成分を含有することができる。例えば、経口投与組成物であれば、乳糖や白糖等の賦形剤、デンプン、セルロース、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル等の界面活性剤、マルチトールやソルビトール等の甘味剤、クエン酸等の酸味剤、リン酸塩等の緩衝剤、シエラックやツェイン等の皮膜形成剤、タルク、ロウ類などの滑沢剤、軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル等の流動促進剤、生理食塩水、ブドウ糖水溶液等の希釈剤、矯味矯臭剤、着色剤、殺菌剤、防腐剤、香料等が挙げられる。経皮投与組成物であれば、スクワラン、ワセリン、マイクロクリスタリンワックス等の炭化水素類、ホホバ油、カルナウバワックス、オレイン酸オクチルドデシル等のエステル類、オリーブ油、牛脂、椰子油等のトリグリセライド類、ステアリン酸、オレイン酸、レチノイン酸等の脂肪酸、オレイルアルコール、ステアシルアルコール、オクチルドデカノール等の高級アルコール、スルホコハク酸エステルやポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム等のアニオン界面活性剤類、アルキルベタイン塩等の両性界面活性剤類、ジアルキルアンモニウム塩等のカチオン界面活性剤類、ソルビタン脂肪酸エステル、脂肪酸モノグリセライド、これらのポリオキシエチレン付加物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル等の非イオン界面活性剤類、ポリエチレングリコール、グリセリン、1,3-ブタンジオール等の多価アルコール類、増粘・ゲル化剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、色剤、防腐剤、粉体等が挙げられる。

【0017】

本発明のスクリーニング方法によって、抗老化作用を有する成分を精度良く、かつ簡便に選別することができることを前述したが、本発明のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有する皮膚外用剤（以下、「本発明の皮膚外用剤」と略す場合がある。）も本発明の一態様である。

本発明の皮膚外用剤は、本発明のスクリーニング方法によって選別された抗老化作用を有する成分を含有するものであれば、その他については特に限定されないが、抗老化作用を有する成分の含有量は、皮膚外用剤全量に対し、通常0.00001質量%～15質量%、好ましくは0.0001質量%～10質量%、より好ましくは0.001質量%～5質量%である。抗老化作用を有する成分の含有量が、少なすぎると目的とする抗老化作用が発揮されず、多すぎても効果が頭打ちになり、この系の自由度を損なう場合が存するためである。

また、本発明の皮膚外用剤は、化粧品（但し、医薬部外品を含む）であることが好ましく、シワの予防又は改善用の皮膚外用剤であることが好ましい。

【実施例】

【0018】

以下に、実施例を挙げて本発明に付いて更に詳細に説明を加えるが、本発明がかかる実施例にのみ限定を受けないことは、言うまでもない。

【0019】

[実施例1]

<試験例1：プロジェリン量の変化を指標とした核膜異常状態評価>

正常ヒト皮膚線維芽細胞を、24穴プレート（BD Falcon社製）に70000 cells/wellになる様に播種し、10%FBS/DMEM（FBS：ハナ・ネスコバイオ社製、DMEM：シグマアルドリッチ社製）で24時間培養した。次いで核膜異

10

20

30

40

50

常誘導のため、100 nMのラミンAアンチセンスオリゴ(GTGACGTGC ACTGA : シグマジェノシス合成品)をLipofectamin 2000 (ライフテクノロジーズ製)を用いてトランスフェクションした。なお、コントロールとしてスクランブルオリゴ(TGGCGGCAAGCCCTCA : シグマジェノシス合成品)を同手法にてトランスフェクションした細胞も用意した。その後それぞれの被検物質を所定濃度加え、7日間培養した。培養後に得られた細胞を、Lysisバッファー(20 mM Tris-HCl (pH 7.2)、150 mM NaCl、1.0% NP-40、1錠 Proteinase inhibitor cocktail / 50 mL 超純水)にて溶解し、DCプロテインアッセイ(パイオラッド製)にてタンパク量を調整後、E-PAGE L (ATTO製)を用いて電気泳動を行った。泳動により分離されたタンパクを、Immobilon-P (ミリポア製)に電圧をかけることで転写し、400倍希釈したヤギ抗Lamin A / C抗体(サンタクルズ製)及び内在性コントロールとしてウサギ抗-アクチン抗体(アブカム製)を反応させた。TBSバッファー(ミリポア製)にて洗浄後、5000倍希釈したHRP含有抗ヤギIgG抗体(ZyMax製)及び抗ウサギIgG抗体(ZyMax製)を反応させ、洗浄した後、SuperSignal WestFemto Maximum Sensitivity Substrate (サーモサイエンティフィック製)にてHRPを発色させた。その後CoolSaver (ATTO製)にて画像を取得し、画像解析ソフトImageJ (NIH製)にてプロジェリン及び-アクチンのバンド強度を計測した。プロジェリンのバンド強度 / -アクチンのバンド強度を求め、さらにアンチセンスオリゴをトランスフェクションした核膜異常細胞の値を1とした時の比を算出した。また、同様に、ラミンAアンチセンスオリゴもしくはスクランブルオリゴをトランスフェクションして7日間培養した細胞を、RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製)を用いmRNAを抽出し、SuperScript VIL0 cDNA synthesis Kit (ライフテクノロジーズ製、配列非公開)を用い、cDNAを合成し、リアルタイムPCR (ライフテクノロジーズ製)にてプロジェリンmRNA (プライマー配列 : (1) 5' - ACTG C A G C A G C T C G G G G - 3' , (2) 5' - T C T G G G G G C T C T G G G C - 3' , プローブ配列 : 5' - F A M - C G C T G A G T A C A A C C T - M G B - 3'、ライフテクノロジーズ合成品)の発現量を測定した。スクランブルオリゴとラミンAアンチセンスオリゴ導入細胞のプロジェリン量を比較した結果を図1に、プロジェリンmRNA発現量を比較した結果を図2に、アンチセンスオリゴ導入細胞に対して被験物質もしくは溶媒対照を添加した際のプロジェリン量を比較した結果を表1に示す。表1の結果より、プロジェリンの産生を抑制する植物抽出物が存在することが判る。

10

20

30

【0020】

【表 1】

表 1

被験物質	プロジェリンタンパク量 (対溶媒対象(%))	評価
アカヤジオウ根エキス	89	○
アマチャエキス	63	○
アマモエキス	53	○
加水分解イネ葉エキス	73	○
加水分解コメヌカエキス	71	○
加水分解ダイズエキス(黒大豆)	90	○
カクコンエキス/アロエエキス(2)/クロレラエキ	143	×
カミツレ花エキス	112	×
カンゾウ葉エキス	494	×
サンゴ草抽出液	92	○
シラン根エキス	95	○
ダイズ発酵エキス	63	○
トウキ根エキス	85	○
党参抽出物加水分解液	70	○
ナス果実エキス	31	○
ナツメ果実エキス	70	○
乳酸桿菌/ハイビスカス花発酵液	66	○
ヒメフウロエキス	78	○
ビルベリー葉エキス	46	○
ビワ葉エキス	169	×
ブルーン分解物	268	×
ムラサキシキブ果実エキス	84	○
メマツヨイグサ抽出液	114	×
ラクtofelin液	67	○
ワイルドタイムエキス	126	×

10

20

【 0 0 2 1 】

[実施例 2]

30

< 試験例 2 : 核形態の変化を指標とした核膜異常状態評価 >

正常ヒト皮膚線維芽細胞を、24穴プレート(BD Falcon社製)に70000 cells/wellになる様に播種し、10%FBS/DMEM(FBS:ハナ・ネスコバイオ社製、DMEM:シグマアルドリッチ社製)で24時間培養した。次いで核膜異常誘導のため、100nMのラミンAアンチセンスオリゴ(GTGACGTGCACCTGA:シグマジェノシス合成品)をLipofectamin2000(ライフテクノロジーズ製)を用いてトランスフェクションした。なお、コントロールとしてスクランブルオリゴ(TGGCGGCAAGCCCTCA:シグマジェノシス合成品)を同手法にてトランスフェクションした細胞も用意した。その後それぞれの被験物質を所定濃度加え、7日間培養した。培養後に得られた細胞を、アセトン(和光純薬製)にて固定し、150倍希釈したマウス抗LaminA/C抗体(Abcam製)を4で一昼夜反応させた。続いてPBS(-)(和光純薬製)にて洗浄後、200倍希釈した抗マウスIgG抗体(Alexa488)(ライフテクノロジーズ製)を37で1時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、10000倍希釈したDAPI(シグマアルドリッチ製)を室温で5分反応させた。PBS(-)で洗浄後、フルオロマウントG(コスモバイオ製)にて封入し、共焦点顕微鏡LMS510(カルツァイス製)にて画像を取得した。得られた画像から、画像解析ソフトIP-Lab(ScanaLytics製)を用いて1細胞核あたりの周辺長及び面積を計測し、式(4×面積/周辺長²)にてコンター比を算出した。スクランブルオリゴとラミンAアンチセンスオリゴ導入細胞のコンター比を比較した結果を図3に、アンチセンスオリゴ導入細胞に対して被験物質もしくは溶媒対照を添加した際のコンタ

40

50

一比を比較した結果を表2に示す。表2の結果より、核膜異常を抑制する植物抽出物が存在することが判る。

【0022】

【表2】

表2

被験物質	コンター比		有意差	評価
	溶媒対象	被検物質		
ビルベリー葉エキス	0.805	0.835	有り	◎
加水分解ダイズエキス(黒大豆)	0.784	0.836	有り	◎
加水分解コマユカエキス	0.768	0.831	有り	◎
乳酸桿菌/ハイビスカス花発酵	0.782	0.816	有り	◎
党参抽出物加水分解液	0.773	0.807	有り	◎
ラクトフェリン液	0.763	0.795	有り	◎
シラン根エキス	0.800	0.819	有り	◎
ダイズ発酵エキス	0.789	0.813	有り	◎
ナス果実エキス	0.816	0.815	無し	×
加水分解イネ葉エキス	0.785	0.803	無し	○
アマチャエキス	0.844	0.861	無し	○
ヒメフウロエキス	0.863	0.808	無し	×

10

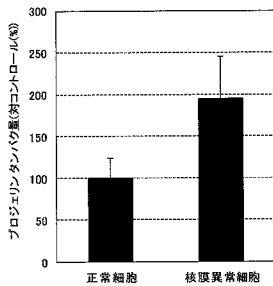
20

【産業上の利用可能性】

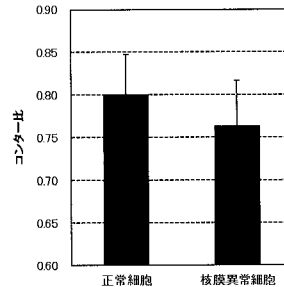
【0023】

本発明は、化粧品(但し、医薬部外品を含む)等に好適な、抗老化作用を有する成分をスクリーニング方法、並びに、当該成分を含有する組成物を提供する。

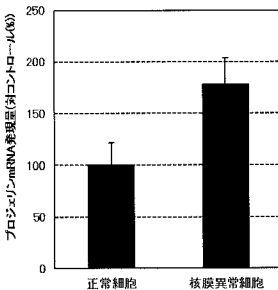
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

2013257347000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	8/96 (2006.01)	A 6 1 K	8/96	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
A 6 1 K	8/97 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
		G 0 1 N	33/48	P
		A 6 1 K	8/97	

(72)発明者 楊 一幸

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(72)発明者 田代 佳奈江

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

(72)発明者 穴戸 まゆみ

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ化成工業株式会社横浜研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB01 DA14 DA36 FB01 FB03 GB02

4B063 QA18 QQ08 QQ17 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR62 QR77 QS02

QS33 QS34 QX01 QX02

4C083 AA011 AA012 AA112 AD412 BB51 CC02 EE12

4C084 AA17 MA63 NA14 ZA892 ZB222

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013257347A5	公开(公告)日	2016-08-12
申请号	JP2013201619	申请日	2013-09-27
[标]申请(专利权)人(译)	宝丽化学工业有限公司		
申请(专利权)人(译)	波拉化工有限公司		
[标]发明人	竹内啓貴 楊一幸 田代佳奈江 穴戸まゆみ		
发明人	竹内 啓貴 楊 一幸 田代 佳奈江 穴戸 まゆみ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P17/00 A61P43/00 A61Q19/08 A61K8/96 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/48 A61K8/97		
FI分类号	G01N33/53.D A61K45/00 A61P17/00 A61P43/00.107 A61Q19/08 A61K8/96 C12Q1/02.ZNA C12Q1/68. A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.N G01N33/53.Y G01N33/48.P A61K8/97		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/GB02 4B063 /QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ17 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4C083/AA011 4C083 /AA012 4C083/AA112 4C083/AD412 4C083/BB51 4C083/CC02 4C083/EE12 4C084/AA17 4C084 /MA63 4C084/NA14 4C084/ZA892 4C084/ZB222		
代理人(译)	川口义行		
其他公开文献	JP2013257347A		

摘要(译)

摘要：要解决的问题：提供一种能够准确和简单地选择作为化妆品基本成分（包括准药物）的优良成分的筛选方法，特别是基于新的作用机理具有抗衰老作用的成分。解决方案：通过评估与待检查材料接触的细胞的核膜的异常状况以及与待检查材料非接触的细胞并使用差异，可以准确和简单地选择具有抗衰老作用的成分。在这些细胞的核膜的异常条件之间作为指标。