

明 細 書

発明の名称：

ヒアルロン酸フラグメントを有効成分とするサーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、及びT L R 4作用剤

技術分野

[0001] 本発明は、ヒアルロン酸フラグメントを有効成分とするサーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、及びT L R 4作用剤に関する。

背景技術

[0002] ヒアルロン酸は、関節、皮膚、脳などの細胞外マトリックスを構成する天然高分子として知られ、従来から、医薬品や化粧品に保湿成分として用いられている。

[0003] ヒアルロン酸は、D－グルクロン酸とN－アセチル－D－グルコサミンの二糖単位が連結した多糖類であり、その分子量によって、高分子量ヒアルロン酸、低分子量ヒアルロン酸、又はヒアルロン酸フラグメントに分類される。高分子量ヒアルロン酸の分子量は一般的に10万から100万程度である。低分子量ヒアルロン酸の分子量は1万から10万程度である。ヒアルロン酸フラグメントの分子量は、400から1万程度である（非特許文献1）。そして、ヒアルロン酸は、生体内でも様々な生理活性を有しており、その生理活性は分子量によって大きく異なる（非特許文献2）。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Science、第228巻第1324～1326頁（1985年）

非特許文献2：Medical Application of Hyaluronan、Akira Asari. Chapter 21、Chemistry and Biology of Hyaluronan、Els

evier, ed: Garg, HG and Hales CA, 457～473頁(2004年)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 特に、ヒアルロン酸フラグメントの生理活性は、高分子量のヒアルロン酸や低分子量のヒアルロン酸とは非常に異なると考えられている。しかしながら、その機能や効用などは未だ明らかではなかった。

[0006] 本発明の目的は、ヒアルロン酸フラグメントを利用した、サーチェイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又はTLR4作用剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意研究し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とするサーチェイン誘導剤。

[2] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖以上10糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、上記[1]記載のサーチェイン誘導剤。

[3] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖又は4糖のヒアルロン酸フラグメントである、上記[1]記載のサーチェイン誘導剤。

[4] 心臓疾患、動脈硬化、骨粗鬆症、炎症性腸炎、認知症、脳卒中、メタボリックシンドローム、癌、肺疾患、腎疾患、糖尿病、変形性関節症、リウマチ、プロジェリア、放射線障害、筋疾患、脳発達障害、神経疾患、高血圧、又は肥満の治療及び／又は予防、又は老化抑制のために用いられる、上記[1]～[3]のいずれか1つに記載のサーチェイン誘導剤。

[5] 医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、上記[1]～[3]のいずれか1つに記載のサーチェイン誘導剤。

〔６〕２糖以上２０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とする組織修復剤。

〔７〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖以上１０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、上記〔６〕記載の組織修復剤。

〔８〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖又は４糖のヒアルロン酸フラグメントである、上記〔６〕記載の組織修復剤。

〔９〕角膜、皮膚、上皮組織、神経組織、又は心筋組織の修復に用いられる、上記〔６〕～〔８〕のいずれか１つに記載の組織修復剤。

〔１０〕医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、上記〔６〕～〔８〕のいずれか１つに記載の組織修復剤。

〔１１〕２糖以上２０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とする肝細胞増殖因子誘導剤。

〔１２〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖以上１０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、上記〔１１〕記載の肝細胞増殖因子誘導剤。

〔１３〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖又は４糖のヒアルロン酸フラグメントである、上記〔１１〕記載の肝細胞増殖因子誘導剤。

〔１４〕肝臓障害の治療及び／又は予防、又は臓器保存のために用いられる、上記〔１１〕～〔１３〕のいずれか１つに記載の肝細胞増殖因子誘導剤。

〔１５〕医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、上記〔１１〕～〔１３〕のいずれか１つに記載の肝細胞増殖因子誘導剤。

〔１６〕２糖以上２０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とする組織恒常性維持剤。

〔１７〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖以上１０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、上記〔１６〕記載の組織恒常

性維持剤。

〔１８〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖又は４糖のヒアルロン酸フラグメントである、上記〔１６〕記載の組織恒常性維持剤。

〔１９〕組織中の細胞の幹細胞性を維持しかつ分化を誘導するために用いられる、上記〔１６〕～〔１８〕のいずれか１つに記載の組織恒常性維持剤。

〔２０〕医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、上記〔１６〕～〔１８〕のいずれか１つに記載の組織恒常性維持剤。

〔２１〕２糖以上２０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とするＴＬＲ４作用剤。

〔２２〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖以上１０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、上記〔２１〕記載のＴＬＲ４作用剤。

〔２３〕前記ヒアルロン酸フラグメントが３糖又は４糖のヒアルロン酸フラグメントである、上記〔２１〕記載のＴＬＲ４作用剤。

〔２４〕角膜、皮膚、肝臓、神経組織、腎臓、肺、心臓、骨格筋、脾臓、又は血管における疾患の治療及び／又は予防のために用いられる、上記〔２１〕～〔２３〕のいずれか１つに記載のＴＬＲ４作用剤。

〔２５〕医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、上記〔２１〕～〔２３〕のいずれか１つに記載のＴＬＲ４作用剤。

発明の効果

〔０００８〕 本発明のサーチュイン誘導剤によれば、２糖以上２０糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有するので、これによりサーチュイン蛋白質の発現を促進することができる。よって、例えば、心臓疾患、動脈硬化、骨粗鬆症、炎症性腸炎、認知症、脳卒中、メタボリックシンドローム、癌、肺疾患、腎疾患、糖尿病、変形性関節症、リウマチ、プロジェリア、放射線障害、筋疾患、脳発達障害、神経疾患、高血圧、又は肥満の

治療及び／又は予防、又は老化抑制のために有効に用いられる。

[0009] 本発明の組織修復剤によれば、2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有するので、これにより組織を修復することができる。よって、例えば、角膜、皮膚、上皮組織、神経組織、又は心筋組織の修復のために有効に用いられる。

[0010] 本発明の肝細胞増殖因子誘導剤によれば、2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有するので、これにより肝細胞増殖因子の発現を促進することができる。よって、例えば、肝臓障害の治療及び／又は予防、又は臓器保存のために有効に用いられる。

[0011] 本発明の組織恒常性維持剤によれば、2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有するので、これにより組織の恒常性を維持することができる。よって、例えば、組織中の細胞の幹細胞性を維持しかつ分化を誘導するために有効に用いられる。

[0012] 本発明のTLR4作用剤によれば、2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有するので、これによりTLR4を介する作用を発揮できる。よって、例えば、角膜、皮膚、肝臓、神経組織、腎臓、肺、心臓、骨格筋、脾臓、又は血管における疾患の治療及び／又は予防のために有効に用いられる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]試験例1においてヒト表皮角化細胞を抗ヒトSIRT1抗体で染色した染色像を示す写真である。

[図2]試験例1におけるサーチュイン蛋白質の発現量の結果を示す図表である。

[図3]試験例2における細胞溶解液におけるサーチュイン酵素活性 (s i r t

1 酵素活性)の結果を示す図表である。

[図4]試験例3においてヒト表皮角化細胞を抗ヒトS I R T 1抗体で染色した染色像を示す写真である。

[図5]試験例3におけるヒト表皮角化細胞の大きさの変化の結果を示す図表である。

[図6]試験例4においてヒト表皮角化細胞を抗ヒトS I R T 1抗体で染色した染色像を示す写真である。

[図7]試験例4において分裂中の細胞であって、その形態が他の細胞より小さく、且つサーチュイン蛋白質が高発現している細胞の単位視野面積当りの細胞数の結果を示す図表である。

[図8]試験例5において分裂中の細胞であって、その形態が他の細胞より小さく、且つサーチュイン蛋白質が高発現している細胞の単位視野面積当りの細胞数の結果を示す図表である。

[図9]試験例6において分裂中の細胞であって、その形態が他の細胞より小さく、且つサーチュイン蛋白質が高発現している細胞の単位視野面積当りの細胞数の結果を示す図表である。

[図10]試験例7においてヒト神経幹細胞 (Gibco human neural stem cells (H9-Derived)) を抗ヒトN e s t i n抗体及び抗ヒトチューブリン抗体で二重染色した染色像を示す写真である。

[図11]試験例8におけるサーチュイン蛋白質の発現量の結果を示す図表である。

[図12]試験例9においてヒト大腸上皮細胞 (H T 2 9細胞) を抗N F - k a p p a B抗体で染色した染色像を示す写真である。

[図13]試験例9におけるN F - k a p p a Bの発現量の結果を示す図表である。

[図14]試験例10におけるN F - k a p p a Bの発現量の結果を示す図表である。

[図15]試験例11において角膜に損傷を与えてから24時間経過時のウサギ

の眼の角膜の様子を撮影したものである。

[図16]試験例 1 1 において角膜に損傷を与えてから 2 4 時間経過時の創傷部位の面積をグラフで示したものである。

[図17]試験例 1 1 において角膜に損傷を与えてから 4 8 時間経過時のウサギの眼の角膜の様子を撮影したものである。

[図18]試験例 1 1 において角膜に損傷を与えてから 4 8 時間経過時の創傷部位の面積をグラフで示したものである。

[図19]試験例 1 2 において角膜に損傷を与えてから 3 3 時間経過時ウサギの眼の角膜組織をヘマトキシリン・エオシン染色したものである。

[図20]試験例 1 4 において保存前の無処置の肝臓又は臓器保存液で保存した後の肝臓の織切片の顕微鏡写真である。

[図21]試験例 1 4 における単位視野面積当りの b l e b (泡沫) 数の結果を示す図表である。

[図22]試験例 1 5 における血中 G O T 値の結果を示す図表である。

[図23]試験例 1 6 において老化誘導したヒト大腸上皮細胞 (H T 2 9 細胞) に対するヒアルロン酸フラグメントの老化抑制効果の結果を示す図表である。

[図24]試験例 1 7 において老化誘導したヒト大腸上皮細胞 (H T 2 9 細胞) に対するヒアルロン酸フラグメントの老化抑制効果の結果を示す図表である。

[図25]試験例 1 8 において老化誘導したヒト大腸上皮細胞 (H T 2 9 細胞) に対するヒアルロン酸フラグメントの老化抑制効果の結果を示す図表である。

[図26]試験例 1 9 において老化誘導したヒト口腔由来上皮細胞 (C a 9 - 2 2 細胞) に対するヒアルロン酸フラグメントの老化抑制効果の結果を示す図表である。

[図27]試験例 2 0 において老化誘導したヒト神経幹細胞 (Gibco human neural stem cells (H9-Derived)) に対するヒアルロン酸フラグメントの老化抑制

効果の結果を示す図表である。

[図28]試験例21において老化誘導したラット骨髄由来間葉系幹細胞に対するヒアルロン酸フラグメントの老化抑制効果の結果を示す図表である。

[図29]試験例22において角化細胞マーカーKeratin K14をヒト表皮角化細胞において検出した結果を示す図表である。

[図30]試験例23において角化細胞マーカーFilaggrinをヒト表皮角化細胞において検出した結果を示す図表である。

発明を実施するための形態

[0014] (ヒアルロン酸フラグメント)

本発明で使用するヒアルロン酸フラグメントは、ヒアルロン酸の構成単位である、D-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンとがグリコシド結合してなる二糖単位を少なくとも含み、2糖以上20糖以下のサイズのことを意味する。具体的には、下記式(1)、式(2)、式(3)又は式(4)で表わされる構造を有するヒアルロン酸フラグメントである。



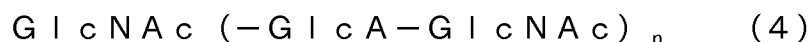
(式(1)中、GlcAはグルクロン酸残基を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、-はグリコシド結合を、nは0~9の整数を示す。)



(式(2)中、GlcAはグルクロン酸残基を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、-はグリコシド結合を、nは0~9の整数を示す。)



(式(3)中、GlcAはグルクロン酸残基を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、-はグリコシド結合を、nは0~9の整数を示す。)



(式(4)中、GlcAはグルクロン酸残基を、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン残基を、-はグリコシド結合を、nは0~9の整数を示す。)

ルグルコサミン残基を、 $-$ はグリコシド結合を、 n は0～9の整数を示す。
)

なお、上記式中の $GlcA-GlcNAc$ におけるグリコシド結合は $\beta 1 \rightarrow 3$ 結合であることが好ましく、 $GlcNAc-GlcA$ におけるグリコシド結合は $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合であることが好ましい。

[0015] 本発明で使用するヒアルロン酸フラグメントは、上記基本構造を有すればよく、その糖部分が修飾されていることに、特に制限はない。例えば、糖の水酸基の一部またはすべては、エステル化、エーテル化等を受けていてもよい。グルクロン酸のカルボキシル基の一部またはすべては、エステル化、アミド化等を受けていてもよい。非還元末端に位置する糖は、飽和糖（単糖中の炭素・炭素間の結合に二重結合を含まないもの）でも不飽和糖（単糖中の炭素・炭素間の結合に二重結合を含むもの）でもよい。

[0016] 上記ヒアルロン酸フラグメントは、そのサイズが2糖以上20糖以下であるので、組織・細胞内に浸透しやすい。また、低粘度のため効率よく塗布するのにも適している。そのサイズは、3糖以上10糖以下であることがより好ましい。これによれば、組織・細胞内に更により浸透しやすい。また、低粘度のため効率よく塗布するのにも更により適している。そのサイズは3糖又は4糖であることが最も好ましい。これによれば、前記効果とともに、組織・細胞に対する効果が、他のサイズのものに比べ顕著に優れている。

[0017] 本発明においては、ヒアルロン酸フラグメントの薬学的に許容される塩を用いることもできる。その塩としては、アルカリ金属塩であるナトリウム塩やカリウム塩などが挙げられる。また、無水塩のみならず含水塩が含まれてもよい。その塩は、原料に由来するものであったり、また、ヒアルロン酸フラグメントの調製時に持ち込まれたりする場合もある。これらの塩は、例えば、溶液内や生体内などで電離してヒアルロン酸フラグメントと同様に機能する。

[0018] 本発明においては、ヒアルロン酸フラグメントの薬学的に許容される溶媒和物を用いることもできる。溶媒和物としては、水和物が挙げられる。例え

ば、大気中に放置したり、再結晶することにより、水分を吸収したり、吸着水が付いたりして、水和物となる場合がある。また、ヒアルロン酸フラグメントの調製時に持ち込まれる場合もある。これらの溶媒和物は、例えば、溶液内や生体内などで電離してヒアルロン酸フラグメントと同様に機能する。

[0019] 上記ヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物は、その1種類のみを用いてもよく、その2種以上の複数をを用いてもよい。すなわち、ヒアルロン酸フラグメントのサイズや分子構造が単一であってもよく、それらの異なるヒアルロン酸フラグメントを併用し、又はそれらの異なるヒアルロン酸フラグメントの複数を含有する複合物を用いてもよい。更に、塩や溶媒和物についても、単一種であってもよく、それらの異なる複数種を併用し、又はそれらの異なる複数種を含有する複合物を用いてもよい。

[0020] (ヒアルロン酸フラグメントの製造方法)

本発明で使用するヒアルロン酸フラグメントは、動物等の天然物から抽出されたもの、微生物を培養して得られたものであってよく、また、化学的もしくは酵素的に合成されたものを使用してもよい。好ましくは、例えば鶏冠、臍体、皮膚、関節液などの生体組織から公知の抽出法によって得ることができるヒアルロン酸を酵素分解、酸分解、塩基分解、加熱処理、超音波処理などの分解処理した後、公知の精製法によってヒアルロン酸フラグメントを精製することにより製造することができる。また、乳酸菌やストレプトコッカス属の細菌等を用いた発酵法によって生成されるヒアルロン酸を出発原料として同様に製造することができる。更には、市販の高分子量のヒアルロン酸を出発原料としてもよい。

[0021] 酵素分解の方法によりヒアルロン酸フラグメントを製造する場合、国際公開第2002/4471号パンフレットや、*Glycobiology*、2002年、第12巻、第7号、第421-426頁に開示される方法に準じて製造することができる。高分子量ヒアルロン酸塩を、溶液のpHが5付近になるように緩衝液（例えば、0.1Mリン酸緩衝液）に溶解し、ヒアルロ

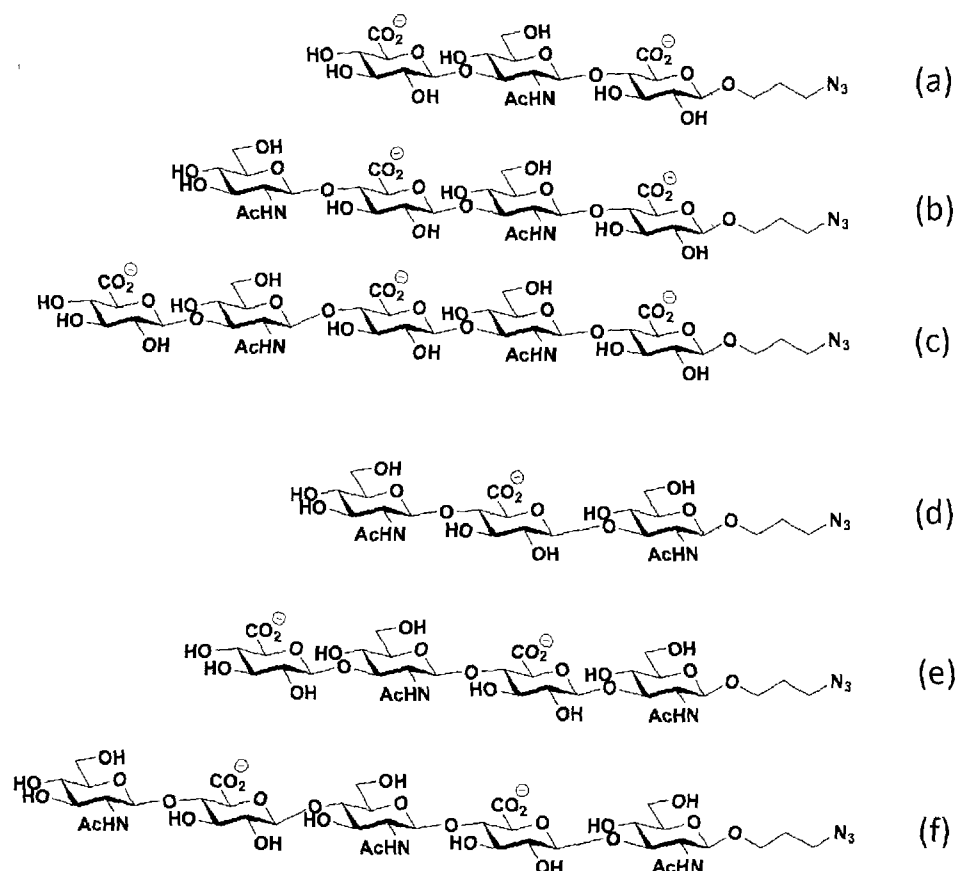
ニダーゼを添加して加水分解を行う。加水分解の温度は、37℃付近が好ましく、1～24時間程度反応させる。反応後、10,000rpm程度で遠心分離して上清を回収し、この上清をイオン交換カラムなどにより分画することにより特定のサイズのヒアルロン酸フラグメントを得ることができる。

[0022] 酸加水分解によりヒアルロン酸フラグメントを製造する場合、高分子量ヒアルロン酸塩を、濃塩酸の50%水溶液中において、40℃～還流温度で1～5時間程度反応させる。反応後、イオン交換カラムなどにより分画することにより特定のサイズのヒアルロン酸フラグメントを得ることができる。また、DMSOの溶媒中に0.05～1M程度の塩酸を用いて加熱することにより、より緩和な条件下で加水分解を行うこともできる。

[0023] 一方、Walvoort MT, Volbeda AG, Reintjens NR, van den Elst H, Plante OJ, Overkleeft HS, van der Marel GA, Codee JD「Automated Solid-Phase Synthesis of Hyaluronan Oligosaccharides.」Org. Lett., 2012, 14 (14), p3776-3779には、固相合成法によって、下記のようなヒアルロン酸フラグメントを、その糖サイズごとに効率よく製造する方法が開示されているので、そのような方法によって製造することもできる。

[0024]

[化1]



[0025] なお、上記のうち (a)、(b)、(c)、(d) 及び (f) の基本的糖構成を有するヒアルロン酸フラグメントは、ヒアルロン酸を出発原料にしてそれを分解処理することによっては、ほとんど得られないか、あるいは非常に収率の悪いヒアルロン酸フラグメントである。

[0026] (剤形等)

本発明に係るサーチェイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又は TLR4 作用剤は、上記に説明したヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物（以下、単に「ヒアルロン酸フラグメント」という。）を、その有効成分として含有するものである。

[0027] ヒアルロン酸フラグメントの含有量は、本発明の効果を発揮すれば特に限

定されるものではないが、サーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又はTLR4作用剤の総質量に対して、0.0001質量%以上100質量%以下であることが好ましく、0.01質量%以上20質量%以下であることがより好ましく、0.5質量%以上5質量%以下であることが最も好ましい。

[0028] 本発明に係るサーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又はTLR4作用剤は、例えば、医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いることができる。

[0029] 医薬品の形態としては、例えば、錠剤、液剤、乾燥粉末剤、注射剤、点滴剤、外用剤、貼付剤、気化投与用の液剤、挿入剤などが挙げられる。この場合、1種又は2種以上の薬学的に許容される成分又は担体と組み合わせて調製してもよい。例えば、添加剤、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、界面活性剤、アルコール、水、水溶性高分子、甘味料、矯味剤、酸味料などを加えることができる。また、外用の形態で用いる場合には、例えば、ステアリン酸カルシウムや乳化剤といった滑沢剤、イオン交換水などの角質層へ水分を供給するための精製水、グリセリン、PEGといった角質層の保湿のための保湿剤、エステル油、植物油といった保湿性や使用感の向上のためのエモリエント剤（水分が蒸発することを防ぐ油成分）、原料成分を可溶化するための可溶化剤、pHを調整するための緩衝剤、微生物を抑制し、腐敗を防止するための防腐剤、着色するための着色剤、紫外線吸収剤といった退色や変色を防止するための退色防止剤、収れん剤、殺菌剤、賦活剤、消炎剤などを加えることができる。

[0030] 機能性食品の形態としては、例えば、液状食品、錠剤食品、粉末状食品、顆粒状食品などが挙げられる。この場合、食用として許容される1種又は2種以上の成分又は担体と組み合わせて調製してもよい。例えば、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ビタミンB₆、ビタミンB₁₂、葉酸、ナイアシン、ビタミンEといったビタミン類、油脂類、増粘剤、防腐剤、着色料、並びに酸化防止剤、調味料、酸味料、甘味料などを加えることができる。

[0031] 化粧料の形態としては、例えば、点眼剤、ゲル、クリーム、スプレー液剤、噴霧液剤、泡状エアゾール製剤、ゲル状やシート状のフェイスマスクなどが挙げられる。この場合、1種又は2種以上の化粧料製剤的に許容される成分又は担体と組み合わせて調製してもよい。例えば、ステアリン酸カルシウムや乳化剤といった滑沢剤、イオン交換水などの角質層へ水分を供給するための精製水、グリセリン、PEGといった角質層の保湿のための保湿剤、エステル油、植物油といった保湿性や使用感の向上のためのエモリエント剤（水分が蒸発することを防ぐ油成分）、原料成分を可溶化するための可溶化剤、pHを調整するための緩衝剤、微生物を抑制し、腐敗を防止するための防腐剤、着色するための着色剤、紫外線吸収剤といった退色や変色を防止するための退色防止剤、収れん剤、殺菌剤、賦活剤、消炎剤などを加えることができる。

[0032] 本発明に係るサーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又はTLR4作用剤を、医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いる場合、ヒアルロン酸フラグメントの含有量は、その医薬品、機能性食品、又は化粧料の総質量に対して、0.0001質量%以上100質量%以下であることが好ましく、0.01質量%以上20質量%以下であることがより好ましく、0.5質量%以上5質量%以下であることが最も好ましい。

[0033] 本発明に係るサーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又はTLR4作用剤の投与形態としては、経口的に摂取したり、注射剤や点滴剤の形態にて静脈注射や灌流することにより投与したりすることができる。あるいは皮膚に塗布したり、呼吸器系から吸引したりして吸収させてもよく、それらの局所に適用してもよい。点眼投与であってもよい。いずれにしてもこれらの投与形態に特に制限されるものではない。また、ヒトだけでなく動物にも適用できる。

[0034] ヒアルロン酸フラグメントの1回あたりの投与量、投与間隔等は、投与形態、使用目的、患者の具体的症状、年齢、性別、体重等に応じて個別に決定

されるべき事項であり、特に限定されないが、経口摂取する場合には、成人 1 人 1 回当たり 1 m g ～ 7 5 0 0 m g が例示される。また、皮膚に塗布する場合には、単位面積あたり一回およそ 0. 0 1 μ g ～ 1 0 0 0 μ g / c m² の量が例示される。また、点眼投与する場合には、1 回当たり 0. 0 1 μ g ～ 1 0 0 0 μ g の適用量が例示される。

[0035] なお、ヒアルロン酸フラグメントは毒性や抗原性がほとんどないことから、副作用のおそれの極めて少ない、サーチュイン誘導剤、組織修復剤、肝細胞増殖因子誘導剤、組織恒常性維持剤、又は T L R 4 作用剤として有効に作用する。

[0036] (サーチュイン誘導剤)

サーチュイン蛋白質は、S I R T 1 遺伝子の翻訳産物であり、ヒストンを脱アセチル化する酵素である。サーチュイン蛋白質が発現した細胞では、ヒストンからアセチル基が外れ、DNA がヒストンに巻き付く力が強くなる。DNA がヒストンに強く巻き付いた結果、その領域の遺伝子の発現は低下し、これにより特定の遺伝子や転写因子の発現が調節される。また、DNA の損傷も減少する。サーチュイン蛋白質は、また、ストレス抵抗性、脂肪・グルコース代謝、神経細胞の分化など、さまざまな細胞機能の調節作用を担うことで細胞、組織又は生物個体の寿命の決定に関与している。

[0037] よって、本発明に係るサーチュイン誘導剤は、サーチュイン蛋白質の発現を促進することによって、細胞、組織、生物個体等の老化を抑制することができる。そして、生物個体を健康にたもち、その寿命を長くすることができる。また、細胞、生体組織レベルにおいても、その老化を抑制して、例えば、その活性維持や生存期間の延長を図ることができる。

[0038] 更に、例えば、遺伝子操作でサーチュイン発現を高めてやると癌形成が抑制され、逆にサーチュイン遺伝子 (S I R T 1 遺伝子) をノックダウンすると癌形成が促進されることが報告されている (Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J 「SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer.」 J Biol. Chem

. 2009 Jul 3;284(27):18210-7.)。

- [0039] また、サーチュイン誘導により心筋梗塞を治療できるという報告もある (Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, Paul D, Maulik N 「Akt/FoxO3a/SIRT1-mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat in vivo model of myocardial infarction: switching gears toward survival and longevity.」 J Agric Food Chem. 2008 Oct 22;56(20):9692-8.)。
- [0040] また、サーチュイン誘導により、血管内皮細胞の老化を抑制して、動脈硬化を防ぐという報告もある (Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y 「SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis.」 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis Vol. 17 (2010) No. 5 p431-435.)。
- [0041] また、サーチュイン誘導により、動脈狭窄・動脈硬化をもたらす因子であるレジスチン (resistin) が抑制されるという報告もある (Carter S, Miard S, Roy-Bellavance C, Boivin L, Li Z, Pibarot P, Mathieu P, Picard F 「Sirt1 inhibits resistin expression in aortic stenosis.」 PLoS One. 2012;7(4):e35110.)。
- [0042] また、サーチュイン誘導により、骨破壊をもたらす破骨細胞におけるNF- κ B活性化を抑制して、骨粗鬆症を防ぐという報告もある (Shakibaei M, Burhmann C, Mobasher A 「Resveratrol-mediated SIRT-1 interactions with p300 modulate receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activation of NF- κ B signaling and inhibit osteoclastogenesis in bone-derived cells.」 J Biol Chem. 2011 Apr 1;286(13):11492-505.)。
- [0043] また、サーチュイン誘導により、炎症を増悪させる因子NF- κ Bの抑止し、炎症性腸炎の症状を軽減できるという報告もある (Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS 「Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor- κ

ppaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis.] J Pharmacol Exp Ther. 2010 Mar;332(3):829-39.)。

- [0044] また、サーチュイン蛋白質は、認知症（アルツハイマー病）の原因となっているアミロイド β 産生を抑制するという報告もある（Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L 「SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10.」 Cell 2010 Jul 23;142(2):320-32.）。
- [0045] また、種々のアルツハイマー病動物モデルにおいて、サーチュイン誘導により、治療効果が認められたという報告もある（Donmez G 「The Effects of SIRT1 on Alzheimer's Disease Models.」 Int J Alzheimers Dis. 2012;2012:509529.）。
- [0046] また、脳卒中（脳虚血）モデルにおいて、ニコチンアミドリボースリン酸転移酵素（Nicotinamide phosphoribosyltransferase）による脳障害の抑制作用には、サーチュイン蛋白質が関与しているという報告もある（Wang P, Xu TY, Guan YF, Tian WW, Viollet B, Rui YC, Zhai QW, Su DF, Miao CY 「Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway.」 Ann Neurol. 2011 Feb;69(2):360-74.）。
- [0047] また、サーチュイン蛋白質高発現モデル（遺伝子操作による）において、通常の動物に比べて、メタボリックシンドロームによる障害とそれに関連するがん化が抑制されたという報告もある（Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M 「Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer.」 Nat Commun. 2010 Apr 12;1:3.）。
- [0048] また、遺伝子操作でサーチュイン蛋白質発現を高めると癌形成が抑制され、逆にサーチュイン蛋白質発現を弱めると癌形成が促進されたという報告もある（Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J 「SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formati

on in colon cancer.」 J Biol Chem. 2009 Jul 3;284(27):18210-7.)。

[0049] また、大気微粒子に起因する肺の炎症や血栓に関し、サーチュイン蛋白質がその作用の抑制性因子であるという報告もある (Wu Z, Liu MC, Liang M, Fu J 「Sirt1 protects against thrombomodulin down-regulation and lung coagulation after particulate matter exposure.」 Blood. 2012 Mar 8;119(10):2422-9.)。

[0050] また、喫煙は、サーチュイン蛋白質を介した作用により肺の細胞にオートファジーをもたらし、これがCOPD (慢性閉塞性肺疾患) の要因であり、サーチュイン誘導により、そのオートファジーが抑制されたという報告もある (Hwang JW, Chung S, Sundar IK, Yao H, Arunachalam G, McBurney MW, Rahman I 「Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD.」 Arch Biochem Biophys. 2010 Aug 15;500(2):203-9.)。

[0051] また、腎臓の虚血再還流障害モデルにサーチュイン活性化剤を投与すると、腎臓における細胞死が抑制されて、腎障害が低減化されたという報告もある (Fan H, Yang HC, You L, Wang YY, He WJ, Hao CM 「The histone deacetylase, SIRT1, contributes to the resistance of young mice to ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury.」 Kidney Int. 2013 Jan 9.)。

[0052] また、サーチュイン誘導により、シスプラチンが誘導する腎臓の尿細管に対する毒性およびNF- κ B活性化が低減化されたという報告もある (Jung Y J, Lee JE, Lee AS, Kang KP, Lee S, Park SK, Lee SY, Han MK, Kim DH, Kim W 「SIRT1 overexpression decreases cisplatin-induced acetylation of NF- κ B p65 subunit and cytotoxicity in renal proximal tubule cells.」 Biochem Biophys Res Commun. 2012 Mar 9;419(2):206-10.)。

[0053] また、インスリン抵抗性の発生機序には、サーチュイン蛋白質が関与するという報告もある (Chen YR, Lai YL, Lin SD, Li XT, Fu YC, Xu WC 「SIRT1 interacts with metabolic transcriptional factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats.」 Mol Biol Rep. 2013 Ja

n 6.)。

[0054] また、降圧薬テルミサルタンによる、インスリン感受性の向上の作用機序には、サーチュイン蛋白質が関与するという報告もある (Shiota A, Shimabukuro M, Fukuda D, Soeki T, Sato H, Uematsu E, Hirata Y, Kurobe H, Maeda N, Sakaue H, Masuzaki H, Shimomura I, Sata M 「Telmisartan ameliorates insulin sensitivity by activating the AMPK/SIRT1 pathway in skeletal muscle of obese db/db mice.」 *Cardiovasc Diabetol*. 2012 Nov 8;11:139.)。

[0055] また、サーチュイン蛋白質は、ヒト軟骨細胞において $\text{TNF } \alpha$ が誘導する炎症を制御するという報告もある (Moon MH, Jeong JK, Lee YJ, Seol JW, Jackson CJ, Park SY 「SIRT1, a class III histone deacetylase, regulates $\text{TNF-}\alpha$ -induced inflammation in human chondrocytes.」 *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Mar;21(3):470-80.)。

[0056] また、ヒトの軟骨細胞では、サーチュイン蛋白質を過剰発現させると、 $\text{IL-1}\beta$ 処理しても変形性関節因子の発現が抑制されるという報告もある (Matsushita T, Sasaki H, Takayama K, Ishida K, Matsumoto T, Kubo S, Matsuzaki T, Nishida K, Kurosaka M, Kuroda R 「The overexpression of SIRT1 inhibited osteoarthritic gene expression changes induced by interleukin-1 β in human chondrocytes.」 *J Orthop Res*. 2012 Nov 9.)。

[0057] また、サーチュイン蛋白質は、リウマチの増悪因子の作用に関与しているという報告もある。(Kok SH, Lin LD, Hou KL, Hong CY, Chang CC, Hsiao M, Wang JH, Lai EH, Lin SK 「Simvastatin inhibits Cyr61 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the regulation of SIRT1/FoxO3a signaling.」 *Arthritis Rheum*. 2012 Dec 12.)。

[0058] また、サーチュイン活性化剤により、プロジェリア (Progeria) モデル動物の疾患改善効果が示されたという報告もある。(Liu B, Ghosh S, Yang X, Zheng H, Liu X, Wang Z, Jin G, Zheng B, Kennedy BK, Suh Y, Kaeberlein M, Tryggvason K, Zhou Z 「Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult

stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria.] Cell Metab. 2012 Dec 5;16(6):738-50.).

[0059] また、放射線障害は、GAPDHの細胞質から核への移行により細胞死が誘導されることによりもたらされ、サーチュイン蛋白質はそのGAPDHの核移行を抑制し、細胞死を抑制したという報告もある。(Joo HY, Woo SR, Shen YN, Yun MY, Shin HJ, Park ER, Kim SH, Park JE, Ju YJ, Hong SH, Hwang SG, Cho MH, Kim J, Lee KH 「SIRT1 interacts with and protects glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from nuclear translocation: implications for cell survival after irradiation.» Biochem Biophys Res Commun . 2012 Aug 10;424(4):681-6.).

[0060] また、サーチュイン蛋白質には、筋線維を強化するだけでなく、筋肉を種々の疾患から保護する作用があるという報告もある。(Tonkin J, Villarroay a F, Puri PL, Vinciguerra M 「SIRT1 signaling as potential modulator of skeletal muscle diseases.» Curr Opin Pharmacol. 2012 Jun;12(3):372-6.).

[0061] また、サーチュイン蛋白質を高発現させると海馬神経細胞の樹状突起形成が促進され、逆にサーチュイン阻害剤を作用させると、樹状突起は萎縮し、更に、サーチュイン蛋白質を高発現させると、アミロイド β 処理による樹状突起萎縮も抑制するので、これは、サーチュイン蛋白質が海馬などの脳神経組織の発達および維持をもたらしていることを意味するという報告もある。

(Codocedo JF, Allard C, Godoy JA, Varela-Nallar L, Inestrosa NC 「SIRT1 regulates dendritic development in hippocampal neurons.» PLoS One. 2012;7(10):e47073.).

[0062] また、サーチュイン蛋白質は、高血圧を誘導する因子であるアンジオテンシンII (angiotensinII) を抑制するという報告もある(Li L, Gao P, Zhang H, Chen H, Zheng W, Lv X, Xu T, Wei Y, Liu D, Liang C 「SIRT1 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy.» Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2011 Feb;43(2):103-9.).

[0063] また、サーチュイン誘導により、インシュリン抵抗性や肥満が抑制されるという報告もある (Li H, Xu M, Lee J, He C, Xie Z 「Leucine supplementation increases SIRT1 expression and prevents mitochondrial dysfunction and metabolic disorders in high-fat diet-induced obese mice.」 Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 Nov 15;303(10):E1234-44.)。

[0064] よって、本発明に係るサーチュイン誘導剤は、特に、心臓疾患、動脈硬化、骨粗鬆症、炎症性腸炎、認知症、脳卒中、メタボリックシンドローム、癌、肺疾患、腎疾患、糖尿病、変形性関節症、リウマチ、プロジェリア、放射線障害、筋疾患、脳発達障害、神経疾患、高血圧、又は肥満の治療及び／又は予防、又は老化抑制のために、好ましく用いられる。

[0065] (組織修復剤)

本発明に係る組織修復剤は、生体組織の創傷部位や、欠損部位の組織の修復を促進するものである。より具体的には、生体組織の創傷部位や欠損部位の細胞増殖を促進し、又は細胞の分化を誘導することで、生体組織の創傷部位や、欠損部位の組織の修復を促進することができる。

[0066] 例えば、褥瘡傷（床ずれ）、栄養性潰瘍、火傷、無痛性潰瘍、外傷後潰瘍、静脈および静脈炎後の静脈血腫による潰瘍、皮膚病巣、皮膚移植および単純ヘルペスに由来する皮膚病変を含む種々の傷の処置に有用である。また、例えば、角膜、皮膚、上皮組織、神経組織、又は心筋組織の修復に、好ましく用いられる。

[0067] (肝細胞増殖因子誘導剤)

肝細胞増殖因子（HGF）は、分子量約6万の重鎖と約3.5万の軽鎖がジスルフィド結合したヘテロダイマーの構造を有するタンパク質である。肝細胞増殖因子は生体内において合成された後、N末端シグナルペプチドの除去、細胞外への分泌を経て、HGFアクチベーター又はウロキナーゼ（uPA）などにより2本鎖に切断され活性型となる。

[0068] 肝細胞増殖因子は、肝細胞の増殖を促進するだけでなく、主臓器由来の上皮細胞を中心に、血管内皮細胞、造血系細胞及び神経系細胞に働き、様々な

細胞を活性化し、増殖を促す。また、皮膚等の賦活化にも関与している。例えば、肝細胞増殖因子は、上皮細胞である角化細胞、毛母、毛包細胞及び直下の血管内皮細胞に作用し、細胞を活性化する。更に、肝細胞増殖因子は、細胞運動性亢進作用、管腔形成などの形態形成誘導作用、抗アポトーシス作用、血管新生作用および免疫応答調節作用なども有する。このように、肝細胞増殖因子は、生体内において重要な役割を担っている。

[0069] よって、本発明に係る肝細胞増殖因子誘導剤は、肝細胞増殖因子の発現を促進することにより、肝臓、心臓、胃腸、血管、皮膚を含む各種の臓器や組織の細胞を活性化し、又はその活性を維持し、それらを炎症、細菌、ウイルス等の疾病因子や、経時的あるいは外的な損傷から保護することができる。特に、肝臓障害の治療及び／又は予防、又は臓器保存のために、好ましく用いられる。

[0070] 本発明に係る肝細胞増殖因子誘導剤の他の側面は、HGFの形態形成誘導作用や血管新生作用である。例えば、血管、皮膚や胃腸などの創傷治癒の効果を期待できる。また、肝炎などの肝障害、腎炎などの腎障害、肺炎などの肺障害などの各種炎症に対して著しい防止作用の効果を期待できる。

[0071] 本発明に係る肝細胞増殖因子誘導剤の更に他の側面は、化粧料の形態で用いることに関する。本発明に係る化粧料は、ヒアルロン酸フラグメントを有することで、肝細胞増殖因子の発現を促進する効果を有する。このため、例えば皮膚の炎症を抑えることができる。また、生体表面の細胞を活性化することで、生体表面の細胞増殖を促進し、抗老化作用発揮できる。例えば、特開平5-213733号公報には、肝細胞増殖因子(HGF)を有効成分とする日焼けによる肌荒れを改善し、皮膚の小ジワを改善する美肌効果に優れた皮膚化粧料が開示されている。本発明に係る化粧料も、この公報に開示された化粧料と同様、日焼けによる肌荒れを改善し、皮膚の小ジワを改善する美肌効果に優れた皮膚化粧料としても機能する。

[0072] (組織恒常性維持剤)

組織老化は、組織幹細胞の枯渇によることが報告されている(Nishimura EK

, Granter SR, Fisher DE 「Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche.」 Science, 2005 Feb 4;307(5710):720-4)。すなわち、組織老化は、組織において細胞が新生増殖しないことと、構成細胞が機能不全になることにより起こる。したがって、組織老化を防ぐには、＜1＞組織幹細胞の維持・増殖と＜2＞機能する細胞である成熟・分化した細胞の誘導ならびに＜3＞成熟・分化した細胞をなるべく機能するように保つことが必要である。

[0073] 後述する実施例のヒト角化細胞とヒトneurosphereの例により、ヒアルロン酸フラグメントは、組織幹細胞の維持と分化誘導の両方をもたらすことが判明した。

[0074] よって、本発明に係る組織恒常性維持剤によれば、特に、組織中の細胞の幹細胞性を維持しかつ分化を誘導することにより、生体組織レベルにおいて、その老化を抑制して、例えば、その活性維持や生存期間の延長を図ることができる。

[0075] (TLR4作用剤)

後述する実施例により、ヒアルロン酸フラグメントは、サーチュイン蛋白質の発現を促進し、その発現誘導はTLR4 (toll様レセプター4) を介する作用によりもたらされることが判明した。また、ヒアルロン酸フラグメントは、TNF- α 処理によって引き起こされるNF- κ Bの発現量の増加を抑制し、その抑制もTLR4を介する作用によりもたらされることが判明した。更に、ヒアルロン酸フラグメントは、種々の原因に起因する細胞老化を抑制する作用効果を有し、その抑制もTLR4を介する作用によりもたらされることが判明した。更にまた、ヒアルロン酸フラグメントは、組織保存液に保存した後の組織の障害を軽減する作用効果を有し、その軽減もTLR4を介する作用によりもたらされることが判明した。更にまた、ヒアルロン酸フラグメントは、細胞分化を誘導し、その誘導もTLR4を介する作用によりもたらされることが判明した。

[0076] TLR4 (toll様レセプター4) は、グラム陰性菌のリポ多糖 (LP

S) を認識する受容体として見出され、例えば、炎症をもたらすNF- κ Bを活性化させる受容体であることが知られている。また、NF- κ Bの活性化以外にも、TLR4は、以下の文献に示すように、角膜、皮膚、肝臓、神経組織、腎臓、肺、心臓、骨格筋、脾臓、血管など各臓器・細胞に発現し、様々な生理機能に関与していることが知られている。よって、そのTLR4を利用して、下記記載の種々の疾患の治療・予防に応用できる。

[0077] ・角膜（角膜上皮、ケラトサイト）

角膜疾患：ドライアイ、角膜上皮障害、角膜上皮剥離、炎症による角膜組織破壊など

Johnson AC, Heinzl FP, Diaconu E, Sun Y, Hise AG, Golenbock D, Lass JH, Pearlman E 「Activation of toll-like receptor (TLR)2, TLR4, and TLR9 in the mammalian cornea induces MyD88-dependent corneal inflammation.」 Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 Feb;46(2):589-95.

[0078] ・皮膚（keratinocytes、ラングハンス細胞、線維芽細胞）

皮膚疾患：褥瘡、皮膚潰瘍、感染・炎症による皮膚組織破壊など

1. Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MI, Amato VS 「The expression of TLR2, TLR4 and TLR9 in the epidermis of patients with cutaneous leishmaniasis.」 J Dermatol Sci. 2010 Jul;59(1):55-7.

2. Yuan ZQ, Bennett L, Campo MS, Nasir L 「Bovine papillomavirus type 1 E2 and E7 proteins down-regulate Toll Like Receptor 4 (TLR4) expression in equine fibroblasts.」 Virus Res. 2010 Apr;149(1):124-7.

3. Wang X, Bi Z, Wang Y, Wang Y 「Increased MAPK and NF- κ B expression of Langerhans cells is dependent on TLR2 and TLR4, and increased IRF-3 expression is partially dependent on TLR4 following UV exposure.」 Mol Med Report. 2011 May-Jun;4(3):541-6.

[0079] ・肝臓（肝実質細胞、クッパー細胞）

急性肝炎、慢性肝炎、肝移植障害など

1. Sahin H, Borkham-Kamphorst E, do O NT, Berres ML, Kaldenbach M, Schmitz P, Weiskirchen R, Liedtke C, Streetz KL, Maedler K, Trautwein C, Wasmuth HE 「Proapoptotic effects of the chemokine, CXCL 10 are mediated by the noncognate receptor TLR4 in hepatocytes.」 *Hepatology*. 2012 Sep 19. doi: 10.1002/hep.26069.
2. Bai T, Lian LH, Wu YL, Wan Y, Nan JX 「Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells.」 *Int Immunopharmacol*. 2013 Jan 12;15(2):275-281.

[0080] ・神経組織（神経細胞、マイクログリア細胞）

神経障害：認知症、神経発達障害、神経組織変性、神経分化阻害など

1. Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P 「Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade.」 *J Neurochem*. 2012 Feb;120(3):461-72.
2. Okun E, Barak B, Saada-Madar R, Rothman SM, Griffioen KJ, Roberts N, Castro K, Mughal MR, Pita MA, Stranahan AM, Arumugam TV, Mattson MP 「Evidence for a developmental role for TLR4 in learning and memory.」 *PLoS One*. 2012;7(10):e47522.
3. Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shridhar M, Sholar PW, Patel SJ, Crysdale NY, Harrison JA, Maier SF, Rice KC, Watkins LR 「Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4).」 *Eur J Neurosci*. 2008 Jul;28(1):20-9.

[0081] ・腎臓（メザンギウム細胞、腎上皮細胞）

腎炎、腎症など

1. Lee IT, Shih RH, Lin CC, Chen JT, Yang CM 「Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells.」 *Cell Commun Signal*. 2012 Nov

15;10(1):33.

2. Good DW, George T, Watts BA 3rd 「Lipopolysaccharide directly alters renal tubule transport through distinct TLR4-dependent pathways in basolateral and apical membranes.」 *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 Oct;297(4):F866-74.

[0082] ・肺（上皮細胞、stromal cell、平滑筋）

肺炎、COPD、虚血再環流障害など

1. Perros F, Lambrecht BN, Hammad H 「TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways.」 *Respir Res*. 2011 Sep 24;12:125.

2. Su HY, Mo BW, Wei JH, Huang JW, Wang CM, Zeng JR, Xu Q, Lin Y 「Effect of TLR4 on the migration of asthmatic airway smooth muscle cells induced by airway epithelial cells.」 *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2012 Mar;28(2):103-6.

[0083] ・心臓（心筋）

心筋梗塞、狭心症など

Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA 「Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium.」 *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(3):271-80.

[0084] ・骨格筋（骨格筋細胞）

筋萎縮、多発筋炎、重症筋無力症、筋ジストロフィーなど

Zbinden-Foncea H, Raymackers JM, Deldicque L, Renard P, Francaux M 「TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle.」 *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Aug;44(8):1463-72.

[0085] ・膵臓

膵炎

1. Akbarshahi H, Axelsson JB, Said K, Malmstrom A, Fischer H, Andersson R 「TLR4 dependent heparan sulphate-induced pancreatic inflammatory

response is IRF3-mediated.] J Transl Med. 2011 Dec 21;9:219.

2. Awla D, Abdulla A, Regner S, Thorlacius H 「TLR4 but not TLR2 regulates inflammation and tissue damage in acute pancreatitis induced by retrograde infusion of taurocholate.» Inflamm Res. 2011 Dec;60(12):1093-8.

[0086] ・動脈（平滑筋）

動脈硬化など

Li H, Xu H, Sun B 「Lipopolysaccharide regulates MMP-9 expression through TLR4/NF- κ B signaling in human arterial smooth muscle cells.» Mol Med Report. 2012 Oct;6(4):774-8.

[0087] よって、本発明に係る T L R 4 作用剤によれば、その T L R 4 を介する作用によって、各種の疾患を治療及び／又は予防することができる。例えば、ドライアイ、角膜上皮障害、角膜上皮剥離、炎症による角膜組織破壊などの角膜疾患；褥瘡、皮膚潰瘍、感染・炎症による皮膚組織破壊などの皮膚疾患；急性肝炎、慢性肝炎、肝移植障害などの肝臓疾患；認知症、神経発達障害、神経組織変性、神経分化阻害などの神経組織疾患；腎炎、腎症などの腎臓疾患；肺炎、C O P D、虚血再環流障害などの肺疾患；心筋梗塞、狭心症などの心臓疾患；筋萎縮、多発筋炎、重症筋無力症、筋ジストロフィーなどの骨格筋疾患；膵炎などの膵臓疾患；動脈硬化などの血管疾患などにおける疾患の治療及び／又は予防のために、好適に用いられる。

実施例

[0088] 以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

[0089] 下記に試験例において用いたヒアルロン酸フラグメントをまとめて示す。

[0090] (1) 4 m e r

・「H Y A - O L I G O 4 E F - 5」（商品名、H y a l o s e 社製）

これは、G l c A (- G l c N A c - G l c A)₁ - G l c N A c の構造を有する、ヒアルロン酸を酵素分解して精製して得られた 4 糖サイズのヒアル

ロン酸フラグメントである。

[0091] (2) 6mer

・「HYA-OLIGO6EF-1」(商品名、Hyalose社製)

これは、 $\text{GlcA}(-\text{GlcNAc}-\text{GlcA})_2-\text{GlcNAc}$ の構造を有する、ヒアルロン酸を酵素分解して精製して得られた6糖サイズのヒアルロン酸フラグメントである。

[0092] (3) 8mer

・「HYA-OLIGO8EF-1」(商品名、Hyalose社製)

これは、 $\text{GlcA}(-\text{GlcNAc}-\text{GlcA})_3-\text{GlcNAc}$ の構造を有する、ヒアルロン酸を酵素分解して精製して得られた8糖サイズのヒアルロン酸フラグメントである。

[0093] (4) 10mer

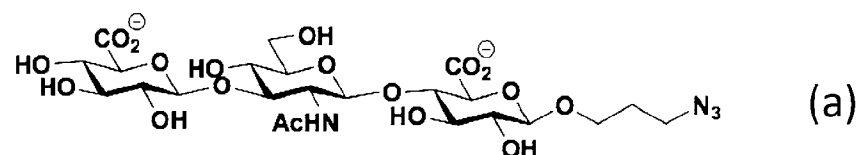
・「HYA-OLIGO10EF-1」(商品名、Hyalose社製)

これは、 $\text{GlcA}(-\text{GlcNAc}-\text{GlcA})_4-\text{GlcNAc}$ の構造を有する、ヒアルロン酸を酵素分解して精製して得られた8糖サイズのヒアルロン酸フラグメントである。

[0094] (5) L3mer

・下記(a)の構造を有するヒアルロン酸フラグメント

[0095] [化2]

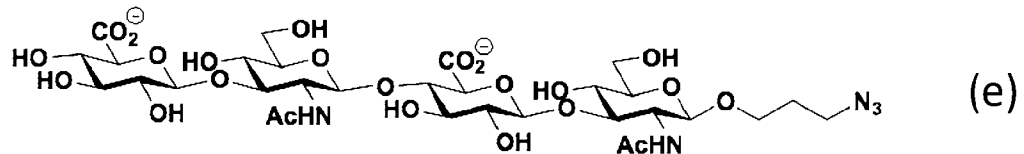


これは、固相合成法 (Walvoort MT, Volbeda AG, Reintjens NR, van den Elst H, Plante OJ, Overkleeft HS, van der Marel GA, Codee JD「Automated Solid-Phase Synthesis of Hyaluronan Oligosaccharides.」Org. Lett., 2012, 14 (14), p3776-3779) により化学合成して精製して得られた3糖サイズのヒアルロン酸フラグメントである。

[0096] (6) L 4 m e r

・下記 (e) の構造を有するヒアルロン酸フラグメント

[0097] [化3]



これは、固相合成法 (Walvoort MT, Volbeda AG, Reintjens NR, van den Elst H, Plante OJ, Overkleeft HS, van der Marel GA, Codee JD 「Automated Solid-Phase Synthesis of Hyaluronan Oligosaccharides.」 Org. Lett., 2012, 14 (14), p3776-3779) により化学合成して精製して得られた4糖サイズのヒアルロン酸フラグメントである。

[0098] <試験例1> (ヒト表皮角化細胞におけるサーチュイン誘導 その1)

ヒト表皮角化細胞 (正常ヒト角化細胞 (keratinocyte、アジア人女性 (27歳) 由来)) を培養し、準備した。ヒト表皮角化細胞は、長期培養用増殖培地 (Epilife-KG2) を用いて37℃、5%CO₂下で培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。その後、細胞を96wellプレートに1well当たり100μLずつ播種し、一晚培養した。培養終了後、各wellの培養液を、ヒアルロン酸フラグメントを添加していない培地 (Gibco社製「keratinocyte SFM」)、又はこれにヒアルロン酸フラグメント (4mer) を最終濃度0.01ng/ml、0.1ng/ml、1.0ng/ml、10ng/mlとなるように添加した各濃度の同培地に替え、24時間培養した。

[0099] 24時間経過後に、各wellの細胞を抗ヒトSIRT1抗体で染色した。抗ヒトSIRT1抗体は、ヒトのサーチュイン蛋白質を認識し、染色する抗体である。染色した細胞を、ニコン社製の顕微鏡を用いて観察し、細胞の形状及び細胞の染色像を撮影した。

[0100] 図1にはその染色像の写真を示す。図1(a)は、ヒアルロン酸フラグメ

ントを加えていない培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。図1 (b) は、 0.01 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4mer) を含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。図1 (c) は、 0.1 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4mer) を含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。図1 (d) は、 1.0 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4mer) を含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。図1 (e) は、 10 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4mer) を含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。

[0101] 図1 (a) に示されるように、ヒアルロン酸フラグメントを加えていない培養液で培養したヒト表皮角化細胞では、抗ヒトSIRT1抗体で染色された細胞の数は少なく、染色された細胞では、細胞全体が薄く染色された。

[0102] 一方、図1 (b) ~ (e) に示されるように、ヒアルロン酸フラグメントを含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞では、抗ヒトSIRT1抗体で染色された細胞の数が増加し、細胞の核が特に濃く染色された。これらの結果から、ヒト表皮角化細胞でのサーチュイン蛋白質の発現が、ヒアルロン酸フラグメントにより促進されていることがわかる。

[0103] 上記の染色像を、画像解析ソフト (フリーソフト「Image J」) を用いて解析した結果を表1示す。また、図2には、表1の結果をグラフで示す。なお、この結果の染色強度は、抗ヒトSIRT1抗体による染色の程度を示しており、その値が高いほど、サーチュイン蛋白質の発現量が多いといえる。

[0104]

[表1]

	染色強度平均	標準偏差
陰性対照(None)	5.99	0.13
4mer 0.01ng/ml	6.33	0.20
4mer 0.1ng/ml	6.35	0.18
4mer 1.0ng/ml	6.52	0.26
4mer 10ng/ml	6.54	0.11

[0105] 表1又は図2に示されるように、0.01ng/ml～10ng/mlの濃度のヒアルロン酸フラグメントを含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞では、サーチュイン蛋白質の発現量が、ヒアルロン酸フラグメントを含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞の発現量に比べて有意に増加していることがわかる。

[0106] <試験例2> (ヒト表皮角化細胞におけるサーチュイン誘導 その2)

ヒアルロン酸フラグメントの最終濃度を10ng/mlとし、そのサイズを4糖(4mer)、6糖(6mer)、10糖(10mer)と替えて行なった以外は、試験例1と同様にしてヒト表皮角化細胞を処理し、その細胞溶解液におけるサーチュイン酵素活性(sirt1酵素活性)を測定した。比較のため、10kDa又は900kDaのヒアルロン酸や、サーチュイン活性化剤であることが知られているレスベラトロール(resveratrol)についても、同じく10ng/mlの最終濃度で試験した。また、遺伝子組み換え手法により作成されたヒトサーチュイン組み換え蛋白質(recombinant human sirt1)を測定系を検証する物質として用いた。なお、サーチュイン酵素活性は、細胞の粗抽出液を「CycLex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit」(商品名、サイクレックス社)に供し、キットのプロトコルに従い測定した。その結果を図3に示す。

[0107] 図3に示されるように、4糖サイズのヒアルロン酸フラグメント(4mer)では、その測定値が陰性対照に比べ約3倍となった。サーチュイン活性化剤として知られているレスベラトロールは同じ量を添加しても変化を示さ

なかったことから、4糖サイズのヒアルロン酸フラグメント（4mer）によるサーチュイン酵素活性の誘導効果が顕著であることが分かる。

[0108] <試験例3>（ヒト表皮角化細胞におけるサーチュイン誘導 その3）

試験例1と同様にして、ヒト表皮角化細胞のサーチュイン誘導試験を行った。

[0109] 図4には、抗ヒトSIRT1抗体で染色された細胞の染色像の写真を示す。図4（a）は、ヒアルロン酸フラグメントを加えていない培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。図4（b）は、10ng/mlのヒアルロン酸フラグメント（4mer）を含有した培養液で培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。

[0110] 図4に示されるように、図4（a）の陰性対照においては、主として丸く小さな細胞にサーチュイン蛋白質の発現が見られた（図中、矢印をもってその細胞を示す。）。また、細胞体が比較的小さな未熟細胞が多かった。一方、図4（b）に示すように、ヒアルロン酸フラグメントの処理により、より大きなサイズの細胞すなわち成熟した細胞が多く出現し、その細胞にサーチュイン蛋白質の発現が見られた（図中、矢印をもってその細胞を示す。）。

[0111] 細胞の大きさの変化について、画像解析ソフト（「Image J」）を用いて解析した。その結果を表2示す。また、図5には、表2の結果をグラフで示す。なお、この結果のピクセル数は、1つ細胞の画像上での面積を示しており、その値が高いほど、細胞が大きいといえる。

[0112] [表2]

	ピクセル数平均	標準偏差
陰性対照(None)	64663.2667	35496.7006
4mer 0.01ng/ml	124515.9333	51093.044

[0113] 表2又は図5に示されるように、ヒアルロン酸フラグメントによる24時間の処理で、より大きな細胞が出現したことがわかる。別途、Alcian blue染色により細胞外基質分泌が通常どおりであることが確認されたことから、細胞の活性（viability）は衰えておらず、このような形態変化は細胞の老化を

示す肥大ではなく、分化によるものと考えられた。なお、ここには最終濃度 0.01 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4 mer) で処理したときの結果を示したが、4糖サイズ (4 mer)、6糖サイズ (6 mer)、8糖サイズ (8 mer) のいずれのヒアルロン酸フラグメントを使用した場合も、また最終濃度 0.01 ng/ml 、 0.1 ng/ml 、 1.0 ng/ml 、 10 ng/ml のいずれの処理においても、同様の形態変化が認められた。

[0114] <試験例4> (ヒト表皮角化細胞におけるサーチュイン誘導 その4)

試験例1と同様にして、ヒト表皮角化細胞のサーチュイン誘導試験を行った。

[0115] 図6には、抗ヒトSIRT1抗体で染色された細胞の染色像の写真を示す。この図6は、 10 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4 mer) を含有した培養液で24時間培養したヒト表皮角化細胞の様子を示したものである。

[0116] 図6に矢印で示した分裂中の細胞は、他に比べて小さく、そのような細胞においてサーチュイン蛋白質が高発現していた。一般的に、組織幹細胞は成熟した細胞に比べ高い増殖能(分裂能)を有しており、その形態上も、成熟した細胞に比べて小さいことが知られている。また、サーチュイン蛋白質は幹細胞において高発現していることが報告されている。よって、図6に矢印で示した、サーチュイン蛋白質が高発現している分裂中の細胞は、ヒト表皮角化細胞の幹細胞であることがわかる。

[0117] 図7には、図6に矢印で示した細胞と同様な、分裂中の細胞であって、その形態が他の細胞より小さく、且つサーチュイン蛋白質が高発現している細胞の細胞数についてまとめた結果を示す。結果は、観察した画像視野中での平均数で示す。

[0118] 図7に示されるように、最終濃度 0.01 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4 mer)、又は最終濃度 10 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント (4 mer) で処理したときのいずれの場合も、陰性対照に比べて、

ヒト表皮角化細胞の幹細胞におけるサーチュイン蛋白質の発現が顕著に促進されていた。

[0119] <試験例5> (ヒト表皮角化細胞におけるサーチュイン誘導 その5)

試験例4と同様にして、分裂中の細胞であって、その形態が他の細胞より小さく、且つサーチュイン蛋白質が高発現している細胞を観察した。また、その際、 10 ng/ml のヒアルロン酸フラグメント(4mer)に加えて $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ のTLR4/MD2(遺伝子組み換え手法により作成されたTLR4(toll様レセプター4)蛋白質、R&D system社製)を加えた培養液で培養したヒト表皮角化細胞についても、同様に観察した。図8にその結果を示す。

[0120] 図8に示されるように、ヒト表皮角化細胞の幹細胞でのヒアルロン酸フラグメント(4mer)によるサーチュイン誘導は、TLR4/MD2の添加によって完全に阻害された。このことは、ヒアルロン酸フラグメント(4mer)は、細胞表面のTLR4受容体に結合することによって、サーチュイン誘導を引き起こしていることを意味していた。よって、TLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、ヒアルロン酸フラグメントは、TLR4を介する作用により、ヒト表皮角化細胞の幹細胞のサーチュイン誘導が起こし、ひいては幹細胞の増殖を引き起こすことが明らかとなった。

[0121] <試験例6> (ヒト表皮角化細胞におけるサーチュイン誘導 その6)

ヒアルロン酸フラグメント(4mer)に替えて、化学合成品である3糖サイズのヒアルロン酸フラグメント(L3mer)を用いて、試験例5と同様の試験を行なった。その結果を図9に示す。

[0122] 図9に示されるように、化学合成品である3糖サイズのヒアルロン酸フラグメント(L3mer)によっても、ヒト表皮角化細胞の幹細胞でのヒサーチュイン誘導がもたらされた。そして、それが、TLR4/MD2の添加によってほぼ完全に阻害された。このことは、ヒアルロン酸フラグメント(L3mer)は、細胞表面のTLR4受容体に結合することによって、サーチュイン誘導を引き起こしていることを意味している。よって、ヒト表皮角化

細胞の幹細胞のTLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、その受容体を介する作用により、サーチュイン誘導が起こり、ひいては幹細胞の増殖が引き起こされることが、更に確認できた。

[0123] <試験例7> (ヒト神経幹細胞に対するL3merの作用)

ヒト神経幹細胞 (Neurospher) (商品名「Gibco Human Neural Stem Cells (H9-Derived)」Gibco社製) を、培地「Neurobasal Media」(商品名、Gibco社製) を用いて37℃、5%CO₂下で培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。その後、細胞を96wellプレートに1well当たり100μLずつ播種し、一晚培養した。培養終了後、各wellの培養液を、ヒアルロン酸フラグメントを添加していない培地「Neurobasal Media」(商品名、Gibco社製)、又はヒアルロン酸フラグメント (L3mer) を最終濃度10ng/mlとなるように添加した同培地に替え、12日間培養した。

[0124] 12日間経過後に、各wellの細胞を抗ヒトNestin抗体及び抗ヒトチューブリン抗体で二重染色した。なお、Nestinは、神経幹細胞に特異的に発現している蛋白質であり、神経幹細胞マーカーである。染色した細胞を、ニコン社製の顕微鏡を用いて観察し、細胞の形状及び細胞の染色像を撮影した。

[0125] 図10にはその染色像の写真を示す。図10(a)は、ヒアルロン酸フラグメントを加えていない培養液で培養したヒト神経幹細胞 (Neurospher) の抗ヒトNestin抗体による染色像を示したものである。図10(b)は、ヒアルロン酸フラグメントを加えていない培養液で培養したヒト神経幹細胞 (Neurospher) の抗ヒトチューブリン抗体による染色像を示したものである。図10(c)は、10ng/mlのヒアルロン酸フラグメント (L3mer) を含有した培養液で培養したヒト神経幹細胞 (Neurospher) の抗ヒトNestin抗体による染色像を示したものである。図10(d)は、10ng/mlのヒアルロン酸フラグメント (

L 3 m e r) を含有した培養液で培養したヒト神経幹細胞 (N e u r o s p h e r) の抗ヒトチューブリン抗体による染色像を示したものである。

[0126] 図 10 (a)、(b) に示されるように、ヒアルロン酸フラグメントを加えていない培養液で培養したヒト神経幹細胞 (N e u r o s p h e r) では、神経幹細胞マーカーである N e s t i n の発現が確認できたが、細胞分化の指標であるチューブリンの発現が弱く、その形態上、突起形成も認められなかった。

[0127] 一方、図 10 (c)、(d) に示されるように、ヒアルロン酸フラグメント (L 3 m e r) を含有した培養液で培養したヒト神経幹細胞 (N e u r o s p h e r) では、N e s t i n とチューブリンの発現がともに確認でき、その形態上の突起形成も認められた。これらの結果から、ヒアルロン酸フラグメントは、ヒト神経幹細胞 (N e u r o s p h e r) の幹細胞性を維持 (N e s t i n 発現) しながら、神経細胞分化 (突起形成およびチューブリン発現) を誘導していることがわかる。

[0128] <試験例 8> (ヒト大腸上皮細胞におけるサーチュイン誘導)

ヒト大腸上皮細胞 (H T 2 9 細胞) を常法に従い D M E M 培地 (和光純薬社製) を用いて、37℃、5%CO₂ 下で培養した。培養液を、ヒアルロン酸フラグメントを添加していない D M E M 培地、ヒアルロン酸フラグメント (4 m e r) を最終濃度 100 ng/ml となるように添加した D M E M 培地、又はそのヒアルロン酸フラグメント (4 m e r) に加えて更に T L R 4 / M D 2 を最終濃度 10 μg/ml となるように添加した D M E M 培地に替え、24 時間培養した。

[0129] 24 時間経過後に、各 w e l l の細胞を抗ヒト S I R T 1 抗体で染色し、その免疫染色の強度を、読み取り装置「A r r a y S c a n」(T h e r m o S c i e n t i f i c 社製) により測定した。その結果を図 11 に示す。

[0130] 図 11 に示されるように、ヒト大腸上皮細胞 (H T 2 9 細胞) においても、ヒアルロン酸フラグメントの処理によりサーチュイン誘導がもたらされた。そして、それが、T L R 4 / M D 2 の添加によってほぼ完全に阻害された

。よって、ヒト大腸上皮細胞（HT29細胞）においても、TLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、その受容体を介する作用により、サーチュイン誘導が引き起こされることが明らかとなった。

[0131] <試験例9>（ヒト大腸上皮細胞におけるNF- κ B発現に対する作用 その1）

ヒト大腸上皮細胞（HT29細胞）をTNF- α 処理したときのNF- κ Bの発現が、ヒアルロン酸フラグメントの処理により影響を受けるかどうか調べた。なお、NF- κ Bは、炎症、組織破壊などに関与する転写因子である。

[0132] TNF- α にヒアルロン酸フラグメントを添加したDMEM培地（和光純薬社製）と添加しないDMEM培地を用意し、この培地でヒト大腸上皮細胞を24時間処理した。その後、活性化した（リン酸化した）NF- κ Bを認識する抗体で染色した。

[0133] 図12は、NF- κ Bを蛍光染色したヒト大腸上皮細胞の様子を撮影したものである。図12（a）は、ヒアルロン酸フラグメント及びTNF- α を添加していない培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。図12（b）は、TNF- α 処理のみをし、ヒアルロン酸フラグメントを添加していない培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。図12（c）は、TNF- α および10 ng/mlの4糖ヒアルロン酸フラグメント（4mer）を添加した培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。図12（d）は、TNF- α および10 ng/mlの4糖及び6糖のヒアルロン酸フラグメント（4merと6merを各5 ng/ml）を添加した培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。図12（e）は、TNF- α および10 ng/mlの6糖のヒアルロン酸フラグメント（6mer）を添加した培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。図12（f）は、TNF- α および10 ng/mlの8糖のヒアルロン酸フラグメント（8mer）を添加した培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。図

12 (g) は、 $\text{TNF-}\alpha$ 処理をし、 10 ng/ml の 900 kDa のヒアルロン酸を添加した培養液で培養したヒト大腸上皮細胞の様子を示したものである。

[0134] 図12 (a) 及び図12 (b) を比較すると、ヒト大腸上皮細胞を $\text{TNF-}\alpha$ 処理すると、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の発現量が増加しているのがわかる。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ は老化により発現量が増えるタンパク質であるため、老化の指標タンパク質となるものであ (Salminen A, Kaarniranta K. Genetics vs. entropy: longevity factors suppress the NF-kappaB-driven entropic aging process. Ageing Res Rev. 2010 Jul; 9(3): 298-314) 。つまり、図12 (b) では、 $\text{TNF-}\alpha$ 処理によって、細胞の老化が進行していることがわかる。一方、図12 (c) ～図12 (f) では、ヒアルロン酸フラグメントを添加することにより、 $\text{TNF-}\alpha$ 処理をしたにも関わらず、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の発現が抑えられていることがわかる。図12 (g) では、 900 kDa の高分子量のヒアルロン酸を添加した。図12 (g) においても、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の発現量の減少は見られるが、ヒアルロン酸フラグメントを添加した場合ほどの減少は見られなかった。これらの結果から、ヒアルロン酸フラグメントを含有した培養液で培養したヒト大腸上皮細胞では、 $\text{TNF-}\alpha$ 処理によって引き起こされる $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の発現量の増加を抑制することがわかった。

[0135] 図13 は、蛍光染色した $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の蛍光強度をグラフで示したものである。グラフの縦軸は、蛍光強度を示す。4～8糖のヒアルロン酸フラグメントを添加した細胞では、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の発現量が有意に減少していることがわかる。さらに、ヒアルロン酸フラグメントは4糖のものが、最も $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の発現量の増加を抑制することができることがわかった。

[0136] 以上の結果より、ヒアルロン酸フラグメントを添加した細胞培養液で細胞を培養した場合、細胞の老化を抑制することがわかった。

[0137] <試験例10> (ヒト大腸上皮細胞における $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 発現に対

する作用 その2)

ヒト大腸上皮細胞 (HT29細胞) を常法に従いDMEM培地 (和光純薬社製) を用いて、37℃、5%CO₂下で培養した。培養液を、ヒアルロン酸フラグメントを添加していないDMEM培地、TNF- α を最終濃度100 ng/mlとなるように添加したDMEM培地、そのTNF- α に加えて更にヒアルロン酸フラグメント (4mer) を最終濃度100 ng/mlとなるように添加したDMEM培地、又はそのTNF- α とヒアルロン酸フラグメント (4mer) に加えて更にTLR4/MD2を最終濃度10 μ g/mlとなるように添加したDMEM培地に替え、24時間培養した。

[0138] 24時間経過後に、各wellの細胞を抗リン酸化NF- κ B抗体で染色し、その免疫染色の強度を、読み取り装置「ArrayScan」(Thermo Scientific社製) により測定した。その結果を図14に示す。

[0139] 図14に示されるように、この試験例においても、TNF- α 処理によるヒト大腸上皮細胞 (HT29細胞) のNF- κ Bの発現が、ヒアルロン酸フラグメントの処理により抑制された。そして、それが、TLR4/MD2の添加によって完全に阻害された。よって、ヒト大腸上皮細胞 (HT29細胞) のTLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、その受容体を介する作用により、NF- κ B発現の抑制が引き起こされることが明らかとなった。

[0140] <試験例11> (角膜損傷に対する作用効果 その1)

角膜損傷に対するヒアルロン酸フラグメントの作用効果を調べた。被検点眼液としては以下のものを準備した。

[0141] (被検点眼液)

- ・ヒアルロン酸フラグメント (L3merと4merを同濃度で混合したもの) を最終濃度が0.1 w/v%となるように生理食塩水に溶解したもの
- ・平均分子量50万~120万のヒアルロン酸を有効成分として0.1 w/v%含有する点眼液

[0142] ・生理食塩水

試験には22～24ヶ月齢のウサギ（体重3～4kg）を6頭使用した。6頭のウサギの両眼にn-ヘプタノール0.05mlを浸したろ紙（直径1cmの円）を置き、ウサギ眼に角膜に創傷を与えた。その後、2時間、6時間、24時間、27時間、30時間後に、ウサギの1眼に被検点眼液を0.05ml滴下した。これと同時に、ウサギの他の1眼には、生理食塩水を0.05ml滴下し、これをコントロールとした。

[0143] 角膜に損傷を与えてから24時間後及び48時間後に、ニコン社製のカメラを用いて、ウサギの眼の角膜を撮影した。蛍光剤（FITC）は創傷部位に接着することを利用して、ウサギにこれを点眼し、角膜の創傷部位面積を、画像解析ソフト（「NIHイメージ」）にて測定した。

[0144] 図15は、角膜に損傷を与えてから24時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を撮影したものである。ウサギの眼の角膜の創傷部位は、破線で示している。図15（a）には、生理食塩水を滴下した場合の、24時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を示した。創傷部位は、ウサギの黒目部分よりも大きく、全体に広がっていた。図15（b）には、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合の、24時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を示した。創傷部位は、ウサギの黒目部分よりも小さい範囲に収まっていた。よって、24時間経過後のウサギの眼の角膜の創傷部位は、生理食塩水を滴下した場合に比べ、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合の方が小さくなっていることがわかる。一方、図15（c）には、平均分子量50万～120万のヒアルロン酸を含有する点眼液を滴下した場合の、24時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を示した。創傷部位は、生理食塩水を滴下した場合に比べて若干小さくなったが、その縮小はあまり顕著ではなかった。

[0145] 図16は、角膜に損傷を与えてから24時間経過後の創傷部位の面積をグラフで示したものである。生理食塩水を滴下した場合の創傷部位の面積の平均が、14000ピクセルであるのに対し、ヒアルロン酸フラグメントを含有

有する点眼液を滴下した場合の創傷部位の面積の平均は、11000ピクセルと値が小さくなっているのがわかる。一方、平均分子量50万～120万のヒアルロン酸を含有する点眼液を滴下した場合の面積の平均は13500ピクセルとなり、その値の減少は有意ではないことがわかる。

[0146] 図17は、角膜に損傷を与えてから48時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を撮影したものである。ウサギの眼の角膜の創傷部位は、破線で示している。図17(a)には、生理食塩水を滴下した場合の、48時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を示した。創傷部位の面積は、24時間経過後と比較して小さくなっているが、創傷部位は、残ったままであった。図17(b)には、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合の、48時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を示した。ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合は、48時間経過後には、創傷部位は完全に消失していた。よって、生理食塩水を滴下した場合は、48時間経過後でも創傷部位が残ったままであるが、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合は、創傷部位が完全に治癒していることがわかる。一方、図17(c)には、平均分子量50万～120万のヒアルロン酸を含有する点眼液を滴下した場合の、48時間経過後のウサギの眼の角膜の様子を示した。生理食塩水を滴下した場合に比べて面積は小さいが、創傷部位が残存していた。

[0147] 図18は、角膜に損傷を与えてから48時間経過後の創傷部位の面積をグラフで示したものである。生理食塩水を滴下した場合の創傷部位の面積の平均が、950ピクセルであるのに対し、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合の創傷部位の面積の平均は、0ピクセルと創傷部位が消失していることがわかる。一方、平均分子量50万～120万のヒアルロン酸を含有する点眼液を滴下した場合の面積の平均は520ピクセルとなり、その値の減少があまり顕著ではないことがわかる。

[0148] 以上の結果より、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合、傷つけられた眼の角膜に治癒時間が短縮されるということがわかった

。つまり、ヒアルロン酸フラグメントは組織を修復させるということがわかった。

[0149] <試験例 1 2> (角膜損傷に対する作用効果 その 2)

試験例 1 1 と同様に、ウサギ角膜に損傷を与えて、損傷後に被検液を点眼し、その損傷を与えてから 3 3 時間後に、ウサギの眼の角膜組織を採取した。角膜組織をパラホルムアルデヒドで固定した後、パラフィン包埋した標本及び凍結包埋した標本を作製した。このパラフィン包埋した標本から薄切切片を作製し、薄切切片にヘマトキシリン・エオシン染色を施した。染色した、角膜組織を、オリンパス社製の顕微鏡によって観察し、角膜組織の角膜上皮の様子を記録した。

[0150] 図 1 9 は、ウサギの眼の角膜組織をヘマトキシリン・エオシン染色したものである。図 1 9 (a) には、生理食塩水を滴下した場合の、3 3 時間経過後のウサギの眼の角膜組織をヘマトキシリン・エオシン染色した様子を示す。色が濃い部分が角膜上皮を示しており、角膜上皮が非常に薄い状態であることがわかった。図 1 9 (b) には、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合の、3 3 時間経過後のウサギの眼の角膜組織をヘマトキシリン・エオシン染色した様子を示す。この場合、広範囲に渡り、角膜上皮が厚く形成されていることがわかった。また、角膜上皮に複数の細胞の層が形成されていることがわかった。

[0151] 一方、図 1 9 (c) には、平均分子量 5 0 万～1 2 0 万のヒアルロン酸を含有する点眼液を滴下した場合の、3 3 時間経過後のウサギの眼の角膜組織をヘマトキシリン・エオシン染色した様子を示す。この場合、角膜上皮において空胞 (図中、矢印で示す。)、ならび角膜実質細胞 (keratocytes) の活性化 (通常は扁平であるが紡錘形を呈した) が認められた (図中、他の矢印で示す。)。この結果は、高分子量のヒアルロン酸が、組織に対するなんらかのダメージを与えていることを示していた。ヒアルロン酸フラグメントでは、このような組織のダメージは観察されず、角膜損傷を治療するための組織修復剤として、より優れていることが明らかとなった。

[0152] 以上の結果より、ヒアルロン酸フラグメントは、創傷部位やその周辺部位の細胞増殖を促進させることがわかった。また、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合においては、角膜上皮の形成が進み、複数の細胞層が形成されることがわかった。これにより、ヒアルロン酸フラグメントを含有する点眼液を滴下した場合には、創傷部位で、細胞の分化が誘導されていることがわかった。つまり、ヒアルロン酸フラグメントは、細胞増殖を促進することに加え、細胞分化の誘導及び組織修復も行うことができることがわかった。

[0153] <試験例 1 3> (ヒト表皮角化細胞における肝細胞増殖因子誘導)

ヒト表皮角化細胞 (正常ヒト角化細胞 (keratinocyte、アジア人女性 (27 歳) 由来)) を、それぞれ、4 糖のヒアルロン酸フラグメント (4mer) 10 ng/ml を含んだ培地と含まない培地 (無処置) で 24 時間培養した。培地は、DS ファーマバイオメディカル社の正常ヒト表皮角化細胞用無血清培地を用いた。培養後に細胞を回収し、これを DNA マイクロアレイ (DNA チップ) で解析した。

[0154] 表 3 は、ヒアルロン酸フラグメントを添加した細胞培養液又はヒアルロン酸フラグメントを添加していない細胞培養液で培養した正常ヒト角化細胞の蛍光 (Cy 5) の強度を示している。

[0155] [表3]

角質細胞における肝細胞増殖因子発現(mRNA)		
	無処置	4mer 10ng/ml
蛍光強度	95.89	200.40

[0156] 表 3 の結果より、ヒアルロン酸フラグメントを添加した細胞培養液で細胞を培養した場合、肝細胞増殖因子の発現量が 2 倍に増加することがわかった。

[0157] <試験例 1 4> (老齢ラット肝臓に対する作用効果 その 1)

老齢ラット肝臓に対するヒアルロン酸フラグメントの作用効果を調べた。試験液としては以下のものを準備した。

[0158] (試験液)

- ・臓器保存液 (University of Wisconsin液: 臓器保存に使用されているスタンダードな液)
- ・ヒアルロン酸フラグメント (4mer) を最終濃度が 100 ng/ml となるように上記臓器保存液に溶解したもの
- ・ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) を最終濃度が 100 ng/ml となるように上記臓器保存液に溶解したもの
- ・ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) を最終濃度が 100 ng/ml となるように上記臓器保存液に溶解し、且つ TLR4/MD2 を最終濃度が $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように上記臓器保存液に溶解したもの

[0159] SD系ラット24ヶ月齢(老齢)の肝門脈から各試験液を注入し、7.5 mlを灌流させた後、同じ液で37℃で6時間保存した。肝臓をOCTコンパウンドに包埋し凍結して作製したブロックから切片を作製し、これを顕微鏡観察に供した。

[0160] 図20にはその顕微鏡像の写真を示す。図20(a)は、保存前の無処置の肝臓の組織切片の様子を示したものである。保存前では類洞が明確に観察できた。図20(b)は、臓器保存液に何も添加しないで保存した後の肝臓の組織切片の様子を示したものである。臓器保存液で保存すると、類洞が不明確になり(類洞狭窄)、bleb(泡沫)が多数出現した(細胞障害)。なお、虚血肝臓組織に出現するbleb(泡沫)は、虚血によるATPレベルの低下→ミトコンドリアから細胞質へのCaイオンの流出→Caイオン依存性蛋白分解酵素の活性化と細胞骨格系の障害の結果惹起される。この変化を経て肝細胞は細胞死にいたる。また、このような変化は、薬物傷害や老化などの様々の病態、Concanavalin A誘導肝障害においても認められる。

[0161] 図20(c)は、臓器保存液にヒアルロン酸フラグメント(4mer)を添加して保存した後の肝臓の組織切片の様子を示したものである。ヒアルロン酸フラグメント(4mer)を含有する臓器保存液で保存すると、類洞狭窄

と b l e b 出現が抑制された。図 20 (d) は、臓器保存液にヒアルロン酸フラグメント (L 3 m e r) を添加して保存した後の肝臓の織切片の様子を示したものである。ヒアルロン酸フラグメント (L 3 m e r) を含有する臓器保存液で保存すると、類同狭窄と B l e b 出現が抑制された。図 20 (e) は、臓器保存液にヒアルロン酸フラグメント (L 3 m e r) と T L R 4 / M D 2 とを添加して保存した後の肝臓の織切片の様子を示したものである。この場合には、類洞が不明確になり (類同狭窄)、b l e b (泡沫) が多数出現した。

[0162] 図 21 は、単に面積当りの b l e b (泡沫) の数をまとめたものである。図 21 に示されるように、4 m e r 処理より L 3 m e r 処理の方が b l e b 出現を抑制する効果が高かった。これは、分子量が小さい L 3 m e r の方が 4 m e r より組織浸透性に優れているため、より効果的に b l e b 出現を抑制できたことによると考えられた。また、L 3 m e r による b l e b 出現抑制の効果は T L R 4 / M D 2 の添加により減じた。これにより、肝臓の保存時の障害の抑制作用においても、アルロン酸フラグメントは T L R 4 を介して作用していることが明らかとなった。

[0163] <試験例 15> (老齢ラット肝臓に対する作用効果 その2)

老齢ラット肝臓に対するヒアルロン酸フラグメントの作用効果を調べた。具体的には、20ヶ月齢(老齢)の雌性 B a l b / c マウスに C o n c a n a v a l i n A (20mg/kg 体重)を尾静脈より1回静注して、肝障害モデルとし、その C o n c a n a v a l i n A の投与直後にヒアルロン酸フラグメント (4 m e r あるいは L 3 m e r) を経口投与し、その効果を調べた。肝機能障害は、24時間後に血液を採取し、血中 G O T および G P T 値を測定することにより評価した。図 22 には血中 G O T 値の結果を示す。

[0164] 図 22 に示されるように、ヒアルロン酸フラグメントの投与により C o n c a n a v a l i n A 投与による肝機能障害が改善された。その効果は、4 m e r より L 3 m e r の方が顕著に優れていた。これは、分子量が小さい L 3 m e r の方が 4 m e r より組織浸透性に優れているため、より効果的に C

oncanavalin A投与による肝機能障害を抑制できたことによると考えられた。なお、GPT値についても同様の傾向の結果であった。

[0165] <試験例16> (老化誘導したヒト大腸上皮細胞に対する作用 その1)

ヒト大腸上皮細胞 (HT29細胞) を過酸化水素処理したときの過酸化水素刺激による細胞老化 (傷害によってミトコンドリア活性が下がる、あるいは細胞死がおきるとMTSの値は下がる) が、ヒアルロン酸フラグメントの処理により影響を受けるかどうか調べた。具体的には以下のように試験を行った。

[0166] ヒト大腸上皮細胞 (HT29細胞) を常法に従いDMEM培地 (和光純薬社製) を用いて、37℃、5%CO₂下で培養した。培地に終濃度10μMの過酸化水素を添加して15分間刺激し、次いで、ヒアルロン酸フラグメントを添加していないDMEM培地、ヒアルロン酸フラグメント (4mer) を最終濃度100ng/mlとなるように添加したDMEM培地、又はそのヒアルロン酸フラグメント (4mer) に加えて更にTLR4/MD2を最終濃度10μg/mlとなるように添加したDMEM培地に替え、3時間培養した。

[0167] 3時間経過後に、MTSアッセイに供した。なお、MTSは、細胞内のミトコンドリアにある脱水素によってホルマザン (Formazan) に変化する作用に基づき、OD490nmを測定することによりミトコンドリア機能を測定するものである。

[0168] 図23に示されるように、ヒアルロン酸フラグメント (4mer) は、過酸化水素刺激による細胞老化 (傷害によってミトコンドリア活性が下がる、あるいは細胞死がおきるとMTSの値は下がる) を抑制した。この作用は、培地にTLR4/MD2を添加することにより阻害されたことから、ヒアルロン酸フラグメントが細胞表面のTLR4に結合することによってもたらされることが判明した。よって、ヒト大腸上皮細胞 (HT29細胞) のTLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、その受容体を介する作用により、細胞老化の抑制効果がもたらされることが明らかとなった。

[0169] <試験例 17> (老化誘導したヒト大腸上皮細胞に対する作用 その2)

被検物質をヒアルロン酸フラグメント (4mer)、ヒアルロン酸フラグメント (L4mer)、ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) とし、被検物質を含む培地に交換してからの培養時間を1時間にした以外は、試験例16と同様の試験を行なった。その結果を図24に示す。

[0170] 図24に示されるように、化学合成品であるL4merやL3merでも、4mer同様に、細胞老化に対する抑制効果を示した。

[0171] <試験例 18> (老化誘導したヒト大腸上皮細胞に対する作用 その3)

被検物質をヒアルロン酸フラグメント (L4mer)、ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) とした以外は、試験例16と同様の試験を行なった。その結果を図25に示す。

[0172] 図25に示されるように、化学合成品であるL4merやL3merでも、4mer同様に、細胞老化に対する抑制効果を示した。この作用は、培地にTLR4/MD2を添加することにより阻害されたことから、L4merやL3merによる老化抑制効果も、TLR4を介してもたらされることが判明した。

[0173] <試験例 19> (老化誘導したヒト口腔由来上皮細胞に対する作用)

ヒト口腔由来上皮細胞 (Ca9-22細胞) を過酸化水素処理したときのミトコンドリア機能が、ヒアルロン酸フラグメントの処理により影響を受けるかどうか調べた。具体的には以下のように試験を行なった。

[0174] ヒト口腔由来上皮細胞 (Ca9-22細胞) を常法に従いDMEM培地 (和光純薬社製) を用いて、37℃、5%CO₂下で培養した。培地に終濃度1μMの過酸化水素を添加して15分間刺激し、次いで、ヒアルロン酸フラグメントを添加していないDMEM培地、ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) を最終濃度100ng/mlとなるように添加したDMEM培地、ヒアルロン酸フラグメント (4mer) を最終濃度100ng/mlとなるように添加したDMEM培地、又は900kDaヒアルロン酸を最終濃度100ng/mlとなるように添加したDMEM培地に替え、3時間培養した。

[0175] 3時間経過後に、MTSアッセイに供した。なお、MTSは、細胞内のミトコンドリアにある脱水素によってホルマザン (Formazan) に変化する作用に基づき、OD490nmを測定することによりミトコンドリア機能を測定するものである。

[0176] 図26に示されるように、ヒト口腔由来上皮細胞でも、過酸化水素刺激による細胞老化がヒアルロン酸フラグメント (L3merあるいは4mer) により抑制されることが明らかとなった。一方、900kDaヒアルロン酸では、その老化抑制の効果は得られなかった。

[0177] <試験例20> (老化誘導したヒト神経幹細胞に対する作用)

ヒト神経幹細胞 (Neurospher) を過酸化水素処理したときの細胞老化 (空胞変性および肥大化) が、ヒアルロン酸フラグメントの処理により影響を受けるかどうか調べた。具体的には以下のように試験を行なった。

[0178] ヒト神経幹細胞 (Neurospher) (商品名「Gibco Human Neural Stem Cells (H9-Derived)」Gibco社製) を、培地「Neurobasal Media」(商品名、Gibco社製) を用いて37℃、5%CO₂下で培養した。培地に終濃度10μMの過酸化水素を添加して15分間刺激し、次いで、ヒアルロン酸フラグメントを添加していない培地「Neurobasal Media」(商品名、Gibco社製)、ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) を最終濃度100ng/mlとなるように添加した同培地、又はそのヒアルロン酸フラグメント (L3mer) に加えて更にTLR4/MD2を最終濃度10μg/mlとなるように添加した同培地に替え、24時間培養した。

[0179] 24時間経過後に、倒立顕微鏡により細胞を観察した。図27にその顕微鏡像の写真を示す。

[0180] 図27に示されるように、ヒアルロン酸フラグメント (L3mer) は、過酸化水素による細胞老化 (空胞変性および肥大化) を抑制した。この作用は、培地にTLR4/MD2を添加することにより阻害されたことから、ヒアルロン酸フラグメントが細胞表面のTLR4に結合することによってもた

らされることが判明した。よって、ヒト神経幹細胞（Neurospher）でもTLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、その受容体を介する作用により、細胞老化の抑制効果がもたらされることが明らかとなった。

[0181] <試験例21>（老化誘導したラット骨髄由来間葉系幹細胞に対する作用）

ラット骨髄由来間葉系幹細胞を過酸化水素処理したときの細胞老化（死細胞の増加）が、ヒアルロン酸フラグメントの処理により影響を受けるかどうか調べた。具体的には以下のように試験を行なった。

[0182] ラット骨髄由来間葉系幹細胞を常法に従い常法に従いDMEM培地（和光純薬社製）を用いて、37℃、5%CO₂下で培養した。培地に終濃度1μMの過酸化水素を添加して15分間刺激し、次いで、ヒアルロン酸フラグメントを添加していないDMEM培地、ヒアルロン酸フラグメント（L3mer）を最終濃度100ng/mlとなるように添加したDMEM培地、又はそのヒアルロン酸フラグメント（L3mer）に加えて更にTLR4/MD2を最終濃度10μg/mlとなるように添加したDMEM培地に替え、2時間培養した。

[0183] 2時間経過後に、死細胞に取り込まれて赤い蛍光を発するPI（propidium iodide）を終濃度5μg/mlで培地に加えて15分インキュベートし、死細胞の出現の様子を蛍光顕微鏡にて観察した。図28には単位視野内の死細胞の平均数を示す。

[0184] 図28に示されるように、ヒアルロン酸フラグメント（L3mer）は、過酸化水素による細胞老化（死細胞の増加）を抑制した。この作用は、培地にTLR4/MD2を添加することにより阻害されたことから、ヒアルロン酸フラグメントが細胞表面のTLR4に結合することによってもたらされることが判明した。よって、ラット骨髄由来間葉系幹細胞でもTLR4がヒアルロン酸フラグメントの受容体であり、その受容体を介する作用により、細胞老化の抑制効果がもたらされることが明らかとなった。

[0185] <試験例 2 2> (ヒト表皮角化細胞における角化細胞マーカーの検出 その 1)

ヒアルロン酸フラグメントとして 4 m e r 又は L 3 m e r を用い、更にそれに最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の T L R 4 / M D 2 を添加した試験群を加えた以外は、試験例 1 と同様に、ヒト表皮角化細胞を刺激した。

[0186] 各 w e l l の細胞を抗 K e r a t i n K 1 4 抗体で染色し、その免疫染色の強度を、読み取り装置「A r r a y S c a n」(T h e r m o S c i e n t i f i c 社製)により測定した。なお、K e r a t i n K 1 4 は基底層角化細胞のマーカーである。その結果を図 2 9 に示す。

[0187] 図 2 9 に示されるように、ヒアルロン酸フラグメント (4 m e r あるいは L 3 m e r) の処理により、K e r a t i n K 1 4 の高発現細胞が増加した。これは、4 m e r や L 3 m e r が細胞分化を誘導したことを示している。この作用も、培地に T L R 4 / M D 2 を添加することにより阻害されたことから、4 m e r や L 3 m e r による角化細胞誘導効果も、T L R 4 を介してもたらされることが判明した。

[0188] <試験例 2 3> (ヒト表皮角化細胞における角化細胞マーカーの検出 その 2)

ヒアルロン酸フラグメントとして 4 m e r 又は L 3 m e r を用い、更にそれに最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の T L R 4 / M D 2 を添加した試験群を加えた以外は、試験例 1 と同様に、ヒト表皮角化細胞を刺激した。

[0189] 各 w e l l の細胞を抗 F i l a g g r i n 抗体で染色し、その免疫染色の強度を、読み取り装置「A r r a y S c a n」(T h e r m o S c i e n t i f i c 社製)により測定した。なお、顆粒層角化細胞が産生する F i l a g g r i n は成熟した角化細胞のマーカーである。その結果を図 3 0 に示す。

[0190] 図 3 0 に示されるように、ヒアルロン酸フラグメント (4 m e r あるいは L 3 m e r) の処理により、F i l a g g r i n 高発現細胞が増加した。これは、4 m e r や L 3 m e r が細胞分化を誘導したことを示している。この

作用も、培地に T L R 4 / M D 2 を添加することにより阻害されたことから、4 m e r や L 3 m e r による角化細胞誘導効果も、T L R 4 を介してもたらされることが、更に確認された。

請求の範囲

- [請求項1] 2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とするサーチチェーン誘導剤。
- [請求項2] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖以上10糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、請求項1記載のサーチチェーン誘導剤。
- [請求項3] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖又は4糖のヒアルロン酸フラグメントである、請求項1記載のサーチチェーン誘導剤。
- [請求項4] 心臓疾患、動脈硬化、骨粗鬆症、炎症性腸炎、認知症、脳卒中、メタボリックシンドローム、癌、肺疾患、腎疾患、糖尿病、変形性関節症、リウマチ、プロジェリア、放射線障害、筋疾患、脳発達障害、神経疾患、高血圧、又は肥満の治療及び／又は予防、又は老化抑制のために用いられる、請求項1～3のいずれか1つに記載のサーチチェーン誘導剤。
- [請求項5] 医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、請求項1～3のいずれか1つに記載のサーチチェーン誘導剤。
- [請求項6] 2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とする組織修復剤。
- [請求項7] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖以上10糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、請求項6記載の組織修復剤。
- [請求項8] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖又は4糖のヒアルロン酸フラグメントである、請求項6記載の組織修復剤。
- [請求項9] 角膜、皮膚、上皮組織、神経組織、又は心筋組織の修復に用いられる、請求項6～8のいずれか1つに記載の組織修復剤。
- [請求項10] 医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、請求項6～

8のいずれか1つに記載の組織修復剤。

- [請求項11] 2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とする肝細胞増殖因子誘導剤。
- [請求項12] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖以上10糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、請求項11記載の肝細胞増殖因子誘導剤。
- [請求項13] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖又は4糖のヒアルロン酸フラグメントである、請求項11記載の肝細胞増殖因子誘導剤。
- [請求項14] 肝臓障害の治療及び／又は予防、又は臓器保存のために用いられる、請求項11～13のいずれか1つに記載の肝細胞増殖因子誘導剤。
- [請求項15] 医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、請求項11～13のいずれか1つに記載の肝細胞増殖因子誘導剤。
- [請求項16] 2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和物を有効成分として含有することを特徴とする組織恒常性維持剤。
- [請求項17] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖以上10糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメントである、請求項16記載の組織恒常性維持剤。
- [請求項18] 前記ヒアルロン酸フラグメントが3糖又は4糖のヒアルロン酸フラグメントである、請求項16記載の組織恒常性維持剤。
- [請求項19] 組織中の細胞の幹細胞性を維持しかつ分化を誘導するために用いられる、請求項16～18のいずれか1つに記載の組織恒常性維持剤。
- [請求項20] 医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、請求項16～18のいずれか1つに記載の組織恒常性維持剤。
- [請求項21] 2糖以上20糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸フラグメント、その薬学的に許容される塩又はその薬学的に許容される溶媒和

- 物を有効成分として含有することを特徴とする T L R 4 作用剤。
- [請求項22] 前記ヒアルロン酸ラゲメントが3糖以上10糖以下のサイズから選択されるヒアルロン酸ラゲメントである、請求項21記載の T L R 4 作用剤。
- [請求項23] 前記ヒアルロン酸ラゲメントが3糖又は4糖のヒアルロン酸ラゲメントである、請求項21記載の T L R 4 作用剤。
- [請求項24] 角膜、皮膚、肝臓、神経組織、腎臓、肺、心臓、骨格筋、脾臓、又は血管における疾患の治療及び／又は予防のために用いられる、請求項21～23のいずれか1つに記載の T L R 4 作用剤。
- [請求項25] 医薬品、機能性食品、又は化粧料の形態で用いられる、請求項21～23のいずれか1つに記載の T L R 4 作用剤。