

明 細 書

発明の名称：

LTBP-1 発現促進用組成物及びLTBP-1 発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、LTBP (Latent TGF β binding protein; 潜在型TGF- β 結合タンパク質) -1 発現促進用組成物、LTBP-1 発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法及びLTBP-1 の発現を促進する方法等に関する。

背景技術

[0002] 皮膚、血管、肺、靱帯等の組織では、引き伸ばしても元に戻る性質、すなわち弾性とその機能に必須である。このような組織における弾性は、細胞及び細胞外マトリックスを合わせた組織によって維持されている。細胞外マトリックスには、コラーゲン線維、グリコサミノグリカン（ヒアルロン酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸など）、弾性線維などがある。コラーゲン線維及びグリコサミノグリカンは、強度は大きいものの、外部強度に対して伸び縮みできない。一方、弾性線維は弾性を有している。従って、伸縮機能が必須である上記の皮膚等の組織において、弾性線維は弾性を担う重要な因子である。

[0003] 弾性線維は、マイクロフィブリルという線維の周りにエラスチンが沈着し、架橋されてできると言われている。弾性線維のターンオーバーは非常に遅く、加齢や紫外線曝露等によって弾性線維が分解又は変性すると、動脈硬化、肺気腫、皮膚のたるみなどが生じる。

[0004] 近年、弾性線維形成を促進するフィブリンタンパク質と、LTBP（潜在型TGF- β 結合タンパク質）との分子間相互作用が注目されている。LTBPは、フィブリリンと同じスーパーファミリーに属するタンパク質である。LTBPには、LTBP-1～4の4つのファミリーメンバーが知られてお

り、 $TGF-\beta$ binding 8-Cys domainをもつことを特徴としている。LTBP-2は潜在型の $TGF-\beta$ と結合せずに存在しているが、LTBP-1とLTBP-3は、不活性な潜在型 $TGF-\beta$ と結合することにより、 $TGF-\beta$ を不活性なまま貯蔵し、必要なときに $TGF-\beta$ を動員できるようにする役割がある。LTBP-4については、フィブリン-5と相互作用し弾性線維の形成に関与していることが報告されている（特許文献1及び非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6050573号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Noda k et al., Proc Natl Acad Sci USA., 110, 2852-7, 2013

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] LTBPファミリーは弾性線維形成に関与していることが示唆されるものの、LTBP-1の弾性線維形成への作用についてはあまり知られていない。そこで本発明者は、LTBP-1に焦点をあて、弾性線維形成に対する影響を検討した。その結果、後記の実施例に示されるように、LTBP-1は、LTBP-4と異なり単独でも弾性線維形成促進作用を有した。従ってLTBP-1の発現を促進する物質は、弾性線維形成促進に有用であると考えられる。しかし、LTBP-1の発現を促進する物質については報告されていない。

[0008] 本発明は、LTBP-1の発現を促進する、LTBP-1発現促進用組成物を提供することを目的とする。また、本発明は、LTBP-1発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究したところ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラ等の特定の植物の抽出物が、LTBP-1発現促進作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち本発明は、以下のLTBP-1発現促進用組成物等を包含する。

〔1〕バラ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ及びスターフルーツからなる群より選択される1以上の植物の抽出物を含み、上記バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである、LTBP-1発現促進用組成物。

〔2〕上記植物の抽出物が、アマチャヅル、ヒメフウロ、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラからなる群より選択される1以上の植物の抽出物である上記〔1〕に記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔3〕皮膚におけるLTBP-1発現促進用である、上記〔1〕又は〔2〕に記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔4〕皮膚において、紫外線曝露により低下したLTBP-1の発現を促進するために使用される上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔5〕皮膚におけるLTBP-1の発現を促進することにより、紫外線曝露に起因する弾性線維減少の予防又は改善のために使用される、上記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔6〕皮膚外用剤である上記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔7〕化粧品である上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔8〕飲食品である上記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のLTBP-1発現促進用組成物。

〔9〕インビトロで、皮膚細胞に紫外線を照射する工程、紫外線を照射した

上記皮膚細胞を、被験物質を含む被験培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程、及び、上記被験培地で培養した被験皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量を比較する工程を含み、上記被験皮膚細胞におけるLTBP-1発現量が、上記コントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量より多い場合に、上記被験物質をLTBP-1発現促進作用を有する物質として選択する、LTBP-1発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法。

〔10〕バラ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ及びスターフーツからなる群より選択される1以上の植物の抽出物を対象に適用することを含み、上記バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである、LTBP-1の発現を促進する方法。

〔11〕LTBP-1の発現を促進するための、バラ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ及びスターフーツからなる群より選択される1以上の植物の抽出物の使用であって、上記バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである、使用。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、LTBP-1の発現を促進する、LTBP-1発現促進用組成物を提供することができる。本発明によれば、LTBP-1の発現を促進することができる。また、本発明によれば、LTBP-1発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法等を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、LTBP-1過剰発現皮膚線維芽細胞における弾性線維形成を蛍光免疫染色によって評価した結果を示す顕微鏡写真である（倍率：200倍）。

[図2]図2は、LTBP-1過剰発現皮膚線維芽細胞における弾性線維量を半定量した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] <LTBP-1発現促進用組成物>

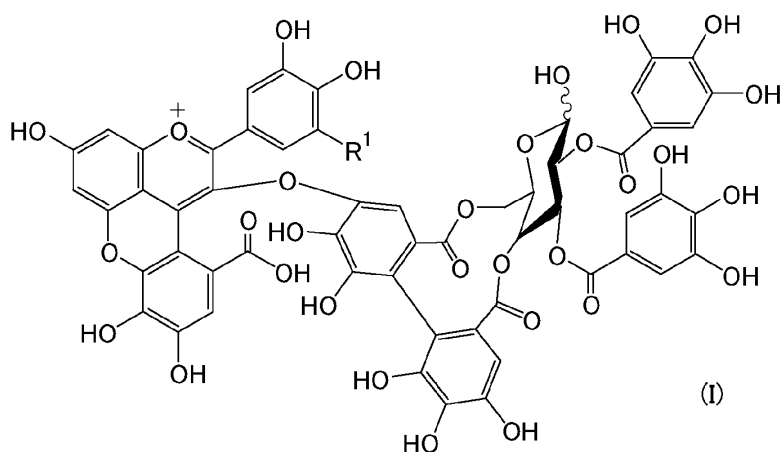
本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ、スターフフルーツ、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラからなる群より選択される1以上の植物の抽出物を含む。

本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、上記植物抽出物を有効成分として含むものである。本発明のLTBP-1発現促進用組成物の有効成分には、上記のいずれか1種の植物の抽出物を用いてもよく、2種以上の植物の抽出物を用いてもよい。

- [0014] 本発明において、アマチャヅルは、ウリ科アマチャヅル属の *Gynostemma pentaphyllum* (学名) を指す。ヒメフウロは、フウロソウ科フウロソウ属の *Geranium robertianum* L. (学名) を指す。ショウブは、ショウブ科ショウブ属の *Acorus calamus* (学名) を指す。シソは、シソ科シソ属の *Perilla frutescens* var. *crispa* (学名) を指す。セージは、シソ科アキギリ属の *Salvia officinalis* (学名) を指す。スターフフルーツは、カタバミ科ゴレンシ属の *Averrhoa carambola* (学名) を指す。バラは、バラ科 (*Rosaceae*) バラ属 (*Rosa*) の植物を指し、好ましくは *Rosa hybrida* (学名) に代表されるバラ科バラ属のバラである。
- [0015] 本発明におけるバラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである。バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物の1以上を含むバラであればよく、好ましくはロザシアニン化合物及びロザデルフィン化合物を含むバラである。
- [0016] ロザシアニン化合物は、ロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンBからなる群より選択される1以上の化合物である。ロザシアニン化合物を含むバラは、上記の化合物を1以上含むバラであればよいが、好ましくは、ロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンBを含むバラである。ロザシアニンA1は、下記一般式(1)において、R¹が水素原子であ

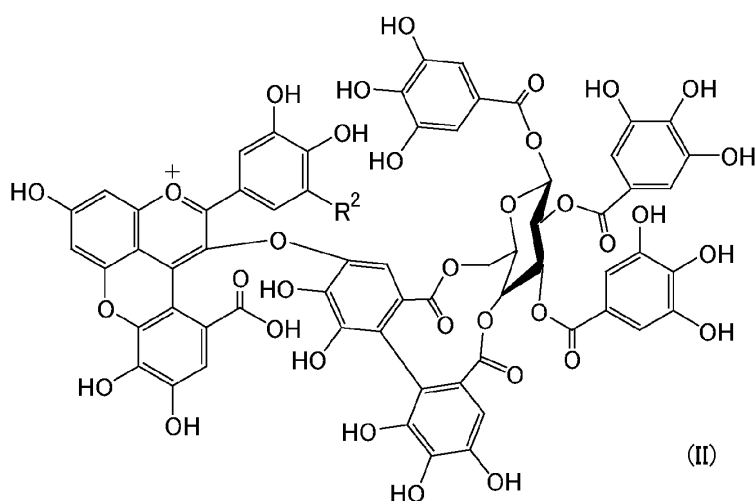
る化合物であり、ロザシアニン A 2 は、下記一般式 (I) において、 R^2 が水素原子である化合物であり、ロザシアニン B は、下記一般式 (II) において、 R^3 が水素原子である化合物である。

[0017] [化1]



[0018] (上記式中、グルコースの1位の水酸基の配位(波線)は α 体と β 体の互変異性であることを示す。 R^1 は、水素原子又は水酸基を表す。)

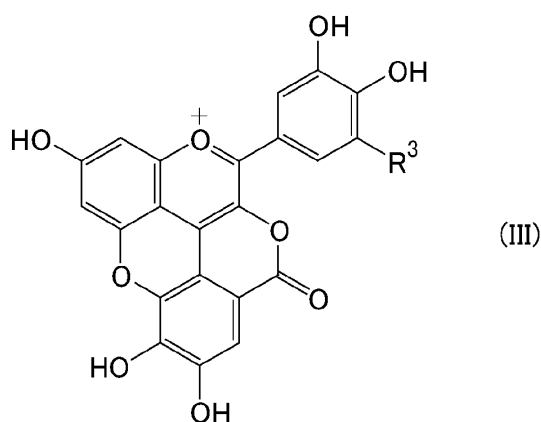
[0019] [化2]



[0020] (上記式中、 R^2 は、水素原子又は水酸基を表す。)

[0021]

[化3]



(III)

[0022] (上記式中、 R^3 は、水素原子又は水酸基を表す。)

[0023] ロザシアニン化合物を含むバラとして、青系又は藤色系の色調を呈するバラ、例えば、マダムビオレ、パープルレイン、ラバンデ、マンハッタンプール、シャンテリーレース、ブルームーン、タソガレ、シャルルドゴール、バイオレットドリー、ブルーリボン、アオゾラ、レディエックス、ブルーバユー、スターリングシルバー等の品種のバラが挙げられる。

[0024] ロザデルフィン化合物は、ロザデルフィンA 1、ロザデルフィンA 2及びロザデルフィンBからなる群より選択される1以上の化合物である。ロザデルフィン化合物を含むバラは、上記の化合物を1以上含むバラであればよいが、好ましくは、ロザデルフィンA 1、ロザデルフィンA 2及びロザデルフィンBを含むバラである。ロザデルフィンA 1は、上記一般式(Ⅰ)において、 R^1 が水酸基である化合物であり、ロザデルフィンA 2は、上記一般式(Ⅰ)において、 R^2 が水酸基である化合物であり、ロザデルフィンBは、上記一般式(Ⅰ)において、 R^3 が水酸基である化合物である。

[0025] 上記ロザデルフィン化合物は野生種のバラには存在せず、フラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子(以下、フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子ともいう)を遺伝子組換え等の手法で導入したバラや、遺伝子組換えバラを親として得られるフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を有するバラにおいて青色色素であるデルフィニジンが合成され、これ

にガレートやテリマグランジン類が結合して生成する化合物である。

[0026] 上記ロザデルフィン化合物を含むバラとして、フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を、遺伝子組換え等の手法で導入したバラ、及び、このような遺伝子組換えバラを親として得られるフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を有するバラを使用することができる。このようなバラとして、例えば、アプローズ（登録商標）等の品種のバラを使用することができる。アプローズ（登録商標）の花弁には、ロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンB並びにロザデルフィンA1、ロザデルフィンA2及びロザデルフィンBが含まれていることが知られている（例えば、WO2010/110382）。アプローズ（登録商標）は、サントリーブルーローズアプローズ（登録商標）と同じ品種を指し、サントリーフラワーズ株式会社（日本国、東京都）より入手することができる。フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を有するバラは、WO2010/110382等に記載の方法で作製することもできる。フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子としては、WO2004/020637に記載されている植物由来の遺伝子が挙げられ、例えばスミレ属パンジー（スミレ属ブラックパンジー（*Viola* spp. cv Black Pansy）等）由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子等が好ましい。なお、本明細書中に記載された学術文献及び特許文献の全ては、参照として本明細書に組み入れられる。

[0027] 本発明におけるロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラとして、花弁にロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラが好ましく、花弁にロザシアニン化合物及びロザデルフィン化合物を含むバラが好ましい。バラにロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物が含まれることは、例えば、WO2010/110382、WO2015/178385等に記載の方法で、HPLC-TOF-MSにより確認することができる。

[0028] 本発明における植物抽出物の調製には、上記植物の任意の部位、例えば、根、根茎、茎、葉、枝、樹皮、花、種子（種皮、胚芽、胚乳、胚軸、子葉等を

含む)、果実(果肉、果皮を含む)、又はこれらの複数の組み合わせを使用することができる。この植物の任意の部位を溶媒で抽出することにより植物抽出物を製造することができる。

植物抽出物を作製するのに好ましい部位として、例えば、以下の部位が挙げられる。本発明における植物抽出物としては、植物の下記部位の抽出物が好ましい。

アマチャヅル、シソ、セージ及びスターフルーツは、葉を用いることが好ましい。ヒメフウロは、全草を用いることが好ましい。ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラは、花卉を用いることが好ましい。ショウブは、根茎及び／又は根を用いることが好ましく、根茎がより好ましい。

上記植物の部位は、そのまま抽出工程に付されてもよく、粉碎、切断又は乾燥された後に抽出工程に付されてもよい。本発明において植物抽出物は、上記植物をそのまま抽出した抽出物であってよいが、該植物を粉碎、切断又は乾燥したものから抽出した抽出物であってよい。好ましくは、上記植物を粉碎、切断又は乾燥したもののからの抽出物である。

[0029] 本発明の一態様において、植物抽出物として、アマチャヅル、ヒメフウロ、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラからなる群より選択される1以上の植物の抽出物が好ましく、アマチャヅルの葉抽出物、ヒメフウロの全草抽出物、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラの花弁抽出物からなる群より選択される1以上がより好ましい。

[0030] 植物の抽出方法は特に限定されず、植物成分の抽出に用いられる通常の抽出方法により、植物から植物抽出物を得ることができる。抽出方法は適宜設定することができ、抽出条件も特に限定されない。例えば、上記植物の各部位を常温又は加温下にて溶媒で抽出することにより、植物抽出物を得ることが好ましい。抽出の際には、適宜攪拌等の操作を行ってもよい。

[0031] 植物の抽出に用いる溶媒(抽出溶媒)は適宜選択することができ、植物成分

の抽出に通常用いられるものを使用することができる。抽出溶媒として、例えば、水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール等の炭素数1～5の低級1価アルコール；エチレングリコール、プロピレングリコール、1, 2-ブチレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、1, 4-ブチレングリコール、2, 3-ブチレングリコール等の多価アルコール；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状及び環状エーテル；ポリエチレングリコール等のポリエーテル；スクワラン等が挙げられる。これらは単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせた混合溶媒を用いてもよい。低級1価アルコールは炭素数1～4の1価アルコールが好ましく、炭素数2～4のものがより好ましく、エタノール等がさらに好ましい。多価アルコールは、例えば、2価又は3価のアルコールが好ましく、2価のアルコールがより好ましい。また、多価アルコールは、例えば、炭素数2～4の多価アルコールが好ましく、1, 3-ブチレングリコール等がより好ましい。中でも、抽出溶媒として、水、低級1価アルコール、多価アルコール、スクワラン、これらの2種以上の混合溶媒が好ましく、水、低級1価アルコール、多価アルコール、これらの2種以上の混合溶媒がより好ましい。一実施形態においては、抽出溶媒として、例えば、水、低級1価アルコール又はその水溶液、多価アルコール又はその水溶液、スクワラン等がより好ましく、水、エタノール、エタノール水溶液、1, 3-ブチレングリコール、1, 3-ブチレングリコール水溶液、スクワラン等がさらに好ましい。本発明における植物抽出物として、上記の溶媒抽出物が好ましい。抽出に際して酸又はアルカリを添加し、抽出溶媒のpHを調整してもよい。抽出後には、植物残渣（抽出後の植物体又はその部分）を抽出液から除去することが好ましい。植物残渣を抽出液から除去する方法は特に限定されず、ろ過、遠心分離等の公知の分離手段が挙げられる。一態様において、アマチャヅル抽出物は、アマチャヅルの水抽出物が好ましい。ヒメフウロ抽出物、シソ抽出物及びスターフルーツ抽出物は、これらの

植物の 1, 3-ブチレングリコール抽出物又は 1, 3-ブチレングリコール水溶液抽出物が好ましい。ショウブ抽出物、セージ抽出物及びバラ抽出物は、これらの植物のエタノール抽出物又はエタノール水溶液抽出物が好ましい。

[0032] 植物の抽出方法の一例として、例えば以下の方法が使用できる。植物原体又は乾燥物を細碎し、抽出溶媒を質量で 5～20 倍量加え、常圧下、室温で好ましくは 10 分～15 日、より好ましくは 30 分～10 日、さらに好ましくは 1 時間～7 日抽出するか、又は、抽出溶媒の沸点付近で好ましくは 10 分～1 日（より好ましくは 10 分～2 時間）程抽出してからろ過してろ液を得る。抽出の際は、静置してもよく、適宜攪拌を行ってもよい。また、得られたろ液（植物抽出液）をそのまま植物の抽出物としてもよく、必要に応じ濃縮又は乾燥してもよい。

[0033] 本発明においては、抽出により得られた植物抽出液をそのまま植物抽出物として用いることができる。また、植物抽出液を適宜な溶媒で希釈して植物抽出物として用いてもよく、濃縮又は乾燥工程を行って、濃縮物や乾燥粉末としてもよく、ペースト状として用いてもよい。濃縮方法、乾燥方法も特に限定されず、凍結乾燥、噴霧乾燥等の公知の方法を使用できる。また、乾燥粉末を、溶媒に溶解させて又は懸濁させて用いることもできる。

さらに、上記の植物抽出液、その濃縮物や乾燥粉末について、本発明の効果を損なわない範囲で、必要に応じて、さらに脱臭、脱色等の精製を行ってもよい。このような精製方法は、通常の手段を任意に選択して行えばよく、例えば、ろ過；イオン交換樹脂、合成吸着樹脂、活性炭等の担体を用いるカラムクロマト等の各種クロマトグラフィー等を用いる方法が挙げられる。本発明における植物抽出物は、上記のような抽出方法で得られた各種溶媒抽出液、その希釈液、その濃縮物又はその乾燥粉末、これらの精製物を含む。また、上記植物抽出物として、市販品を使用することもできる。

[0034] 本発明において使用される上記の植物抽出物は、LTBP-1 発現促進作用を有する。本発明において、LTBP-1 発現促進は、LTBP-1 の mR

NAの発現促進及びタンパク質の発現促進を含む。発現促進は、生体内における発現促進であってもよく、培養系等の生体外における発現促進であってもよい。LTBP-1は、好ましくは皮膚細胞、より好ましくはヒト皮膚細胞に発現するLTBP-1である。本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、皮膚におけるLTBP-1発現促進用組成物として好ましく使用される。LTBP-1発現は、LTBP-1産生ということもできる。

後記の実施例に示されるように、紫外線曝露により皮膚細胞におけるLTBP-1の発現は低下するところ、上記植物抽出物を使用すると、使用しない場合と比較して、LTBP-1の発現が増加した。従って上記植物抽出物は、皮膚において、紫外線曝露により低下したLTBP-1の発現を促進する作用を有する。一態様において、本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、皮膚において、紫外線曝露により低下したLTBP-1の発現を促進するために使用され得る。低下したLTBP-1の発現促進は、LTBP-1の発現回復と捉えることもできる。また、LTBP-1の発現を促進することにより、紫外線曝露等の要因によるLTBP-1の発現低下を抑制することも可能となる。

[0035] 実施例に示されるように、LTBP-1は、単独で弾性線維形成促進作用を有した。従って、LTBP-1の発現を促進する作用を有する物質は、弾性線維形成促進作用を有する。

本発明において、弾性線維形成促進作用とは、マイクロフィブリルの周りにエラスチンが沈着及び架橋する工程を促進する作用をいい、その沈着及び架橋の程度は問わない。本発明においては、ある物質を使用した場合に、使用しない場合と比較して、マイクロフィブリルへのエラスチンの沈着がある程度でも促進されていれば、当該物質は弾性線維形成促進作用を有するといえる。

[0036] 本発明のLTBP-1発現促進用組成物に使用される上記の植物抽出物は、LTBP-1発現促進作用を有する。従って、本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、例えば、弾性線維の形成を促進するために使用することがで

きる。例えば皮膚におけるL T B P - 1 発現を促進することにより、皮膚における弾性線維の形成が促進される。本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、L T B P - 1 が関与する弾性線維の形成促進が所望される状態又は症状（例えば、加齢又は紫外線曝露による弾性線維の変性又は減少）の予防又は改善に有用である。一態様において、本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、皮膚におけるL T B P - 1 の発現を促進することにより、紫外線曝露に起因する弾性線維減少の予防又は改善のために使用され得る。本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、L T B P - 1 発現促進作用により、皮膚のたるみの予防又は改善、しわの予防又は改善などの美容目的などにも有用である。予防は、発症の防止、遅延、発症率の低下等を包含する。改善は、症状の軽快、症状の進行抑制、症状の治癒等を包含する。

また、本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、弾性線維の再生能を有する細胞の培養用試薬等としても使用できる。本発明の組成物は、人工弾性線維形成促進のためにも使用され得る。また、人工皮膚、皮膚モデル、人工血管等の人工組織の作製にも使用することができる。

[0037] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物の形態は特に限定されず、粉末状、顆粒状、ペースト状、固形状等であってもよく、液状であってもよく、適宜選択することができる。本発明の組成物には、本発明の効果を損なわない限り、上記植物抽出物に加えて、その他の成分を配合することができる。その他の成分としては、例えば、後述する化粧品（化粧品）、飲食品、医薬品、医薬部外品等に使用し得る成分が挙げられる。

本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、一例として、剤の形態で提供することができるが、本形態に限定されるものではない。当該剤をそのまま組成物として、又は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。一態様において、本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、L T B P - 1 発現促進剤ということもできる。

本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、治療的な用途（医療用途）又は非治療的な用途（非医療用途）のいずれにも適用することができる。非治療

的とは、医療行為、すなわち手術、治療又は診断を含まない概念である。

[0038] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、化粧品、飲食品、医薬品、医薬部外品など様々な用途に使用することができる。本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、それ自体が、L T B P - 1 発現促進のための化粧品、飲食品、医薬品又は医薬部外品であってもよく、又は、該化粧品、飲食品、医薬品又は医薬部外品等に配合して使用される素材又は製剤等であってもよい。

[0039] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、例えば、皮膚外用剤として好適に使用される。皮膚外用剤は、化粧品、医薬品、医薬部外品を含み、好ましくは化粧品である。一実施態様において、皮膚におけるL T B P - 1 発現促進のために使用する場合は、L T B P - 1 発現促進用組成物を、皮膚外用剤とすることが好ましく、化粧品がより好ましい。

本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物は、皮膚外用剤以外の医薬品又は医薬部外品として使用することもできる。

別の実施態様においては、L T B P - 1 発現促進用組成物を飲食品とすることも好ましい。本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物を化粧品、医薬品、医薬部外品等の皮膚外用剤、飲食品等とする場合について以下に説明する。

[0040] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物を皮膚外用剤（L T B P - 1 発現促進用皮膚外用剤）とする場合、剤形等は特に限定されず、例えば溶液、乳液、クリーム、ゲル、粉末、エアゾール、ミスト、カプセル及びシート等任意の形態とすることができる。皮膚外用剤は、好ましくは化粧品である。化粧品の製品形態も特に限定されず、例えば、洗顔料、メイク落とし、化粧水、美容液、パック、乳液、クリーム、日焼け止め等のスキンケア化粧品；ファンデーション、化粧下地、口紅、アイシャドー、アイライナー、マスカラ、アイブロー、頬紅、ネイルエナメル等のメイクアップ化粧品；ヘアシャンプー、ヘアリンス、整髪料、染毛料、育毛剤等の毛髪化粧品；石けん、ボディソープ等の洗浄料；入浴剤等が挙げられる。

[0041] 上記化粧品には、上記植物抽出物を単独で使用してもよい。また、このような化粧品には、本発明の効果を損なわない範囲で、化粧品に許容される担体

、添加剤等の成分、例えば、水、アルコール類、油剤、界面活性剤、増粘剤、金属セッケン、ゲル化剤、粉体、キレート剤、水溶性高分子、皮膜形成剤、樹脂、包接化合物、抗菌剤、消臭剤、塩類、pH調整剤、紫外線吸収剤、上記以外の動植物・微生物由来の抽出物、角質溶解剤、酵素、ホルモン類、他のビタミン類、保湿剤、殺菌剤、抗炎症剤、香料等の1又は2以上を適宜含有させることができる。化粧料は、一般的な製造法により製造することができる。例えば、上記植物抽出物と、上記の化粧料に使用し得る成分1又は2以上とを混合した後、所望の形態に加工することによって得ることができる。

[0042] 皮膚外用剤を医薬品又は医薬部外品とする場合、上記植物抽出物を単独で使用してもよく、該植物抽出物と、医薬品又は医薬部外品に許容される担体、添加剤等の成分と組み合わせて使用してもよい。そのような成分として、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤等の1又は2以上が挙げられ、これらは必要に応じて使用できる。

[0043] 本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、上述した皮膚外用剤以外の医薬品、医薬部外品とすることもできる。このような医薬品又は医薬部外品は、経口投与されてもよく、非経口投与されてもよい。医薬品又は医薬部外品は経口投与製剤（内服剤）又は非経口投与製剤の形態とすることができる。経口投与製剤の剤形としては、液剤、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、懸濁液、乳剤、チュアブル剤等が挙げられる。非経口投与製剤の剤形としては、注射剤、輸液剤等が挙げられる。このような医薬品又は医薬部外品には、上記植物抽出物を単独で使用してもよく、該植物抽出物と、医薬品又は医薬部外品に許容される担体、添加剤等の成分と組み合わせて使用してもよい。そのような成分として、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤等の1又は2以上が挙げられ、これらは必要に応じて使用できる。医薬品、医薬部外品は、一般的な製造法により製造することができる。例えば、上記植物抽出物と、医薬品又は医薬部外品において使用し得る成分の1又は2以上とを混合した後、所望の形態に加工す

ることによって得ることができる。

- [0044] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物を飲食品とする場合、飲食品は特に限定されず、例えば、一般的な飲食品、健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品等が挙げられる。飲食品の形態も特に限定されない。上記健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品は、例えば、液剤、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、懸濁液、乳剤、チュアブル剤、流動食等の各種製剤形態とすることもできる。
- [0045] 上記飲食品には、上記植物抽出物を単独で使用してもよく、飲食品に許容される成分、例えば、他の飲食品材料、飲食品に配合される添加剤等を配合して、L T B P - 1 発現促進用の飲食品（L T B P - 1 発現促進用飲食品組成物）としてもよい。このような飲食品は、一般的な製造法により製造することができる。例えば、飲食品の製造において、飲食品材料等に上記植物抽出物を配合すればよい。
- [0046] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物が、皮膚外用剤、皮膚外用剤以外の医薬品又は医薬部外品、飲食品等のいずれの形態の場合も、上記植物抽出物の含有量は、該組成物中に、例えば、該抽出物の乾燥物換算の質量として、0.0000001～100質量%が好ましく、0.000001～100質量%がより好ましく、0.000001～99.9質量%がさらに好ましく、0.00001～99.9質量%がさらにより好ましく、0.00001～10質量%が特に好ましい。上記含有量は、2種以上の植物抽出物を含む場合は、その合計の含有量である。
- [0047] 本発明のL T B P - 1 発現促進用組成物の使用量は、特に限定されず、対象者の状態、体重、性別、年齢又はその他の要因に従って適宜設定することができる。化粧料等の皮膚外用剤であれば、例えば、成人（60kg）1人当たり1日当たり、上記植物抽出物（乾燥物換算）として、例えば、0.01～500mgとするのが好ましい。医薬品又は医薬部外品を経口投与する場合の投与量は、例えば、成人（60kg）1人当たり1日当たり、植物抽出物（乾燥物換算）として、例えば、0.01～500mgとするのが好まし

い。飲食品であれば、その摂取量は、例えば、成人（60kg）1人当たり1日当たり、上記植物抽出物（乾燥物換算）として、例えば、0.01～500mgとするのが好ましい。上記量の植物抽出物を、単回又は複数回に分けて摂取又は投与することができる。上記植物抽出物を含む皮膚外用剤を皮膚に適用するタイミング、飲食品、医薬品又は医薬部外品を摂取又は投与するタイミングは特に限定されない。本発明のLTBP-1発現促進用組成物は、その形態、剤形等に応じて自体公知の種々の方法で 사용할 ことができる。

[0048] 本発明のLTBP-1発現促進用組成物の適用対象としては、特に限定されず、ヒト又は非ヒト哺乳動物等に適用することができるが、ヒト（人）が好ましい。適用対象としては、例えば、LTBP-1の発現が低下している対象者、LTBP-1の発現促進を希望する又は必要とする対象者が好ましい。

[0049] <LTBP-1発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法>

本発明は、インビトロで、皮膚細胞に紫外線を照射する工程、紫外線を照射した上記皮膚細胞を、被験物質を含む被験培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程、及び、上記被験培地で培養した被験皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量を比較する工程を含み、上記被験皮膚細胞におけるLTBP-1発現量が、上記コントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量より多い場合に、上記被験物質をLTBP-1発現促進作用を有する物質として選択する、LTBP-1発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法も包含する。

本発明のスクリーニング方法は、インビトロ（*in vitro*）で行われる方法（インビトロでのスクリーニング方法）である。

[0050] 本発明のスクリーニング方法で用いられる皮膚細胞として、LTBP-1を発現しているヒト又は非ヒト哺乳動物の皮膚細胞を用いることができる。本発明の方法で用いられる皮膚細胞として、例えば、ヒト真皮線維芽細胞等の培養皮膚細胞が挙げられる。細胞を増殖させる際の培養条件は特に限定され

ず、細胞に応じて公知の条件を採用すればよい。

[0051] 本発明のスクリーニング方法では、皮膚細胞に紫外線を照射する。紫外線照射は、例えば、紫外線B波（UVB）を照射することができる。一態様において、積算光量は、例えば $1 \sim 20 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ とすることができ、 $3 \sim 10 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ とすることが好ましい。

[0052] 本発明のスクリーニング方法では、紫外線を照射した皮膚細胞を、被験物質を含む培地（被験培地）又は上記被験物質を含まない培地（コントロール培地）で培養する工程を行う。

被験物質は特に限定されず、例えば、植物抽出液、細胞抽出液、発酵生産物、タンパク質、ペプチド、ビタミン類、合成化合物などが挙げられる。これらは既知物質であってもよく、新規物質であってもよい。被験培地は、培地に被験物質を添加して調製することができる。コントロール培地には、被験物質を含まない以外は、被験培地と同じ培地を使用すればよい。

培地、培養条件等は、細胞の種類等に応じて適宜設定することができる。培養時間は特に限定されず、培養条件等により適宜設定すればよい。例えば、紫外線照射後に、被験物質を添加した培地又はコントロール培地中で、皮膚細胞を好ましくは $5 \sim 72$ 時間、より好ましくは $12 \sim 48$ 時間培養すればよい。

培地の一例として、 α -MEM培地が挙げられる。培地には、市販の血清を添加してもよい。培地は、市販品を使用してもよい。

[0053] 本発明においては、紫外線照射後に、皮膚細胞を被験物質を含む被験培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する。この培養後に、上記被験培地で培養した被験皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量を比較する。被験皮膚細胞におけるLTBP-1発現量が、コントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量より多い場合に、上記被験物質を、LTBP-1発現促進作用を有する物質として選択する。

紫外線照射により、皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量は減少する。紫

外線を照射した皮膚細胞を、被験皮膚細胞については被験物質を含む被験培地で、コントロール皮膚細胞については該物質を含まないコントロール培地で培養し、これらの細胞におけるLTBP-1の発現量を比較することにより、例えば、紫外線曝露等の要因によりLTBP-1の発現が低下した皮膚においてLTBP-1発現促進作用を発揮できる物質をスクリーニングすることができる。

[0054] 皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量の測定は、LTBP-1をコードするmRNA量又はLTBP-1のタンパク質量を測定することにより行うことができる。mRNA又はタンパク質量の測定は、公知の方法で行うことができる。

例えば、LTBP-1のタンパク質量は、免疫化学アッセイ、質量分析等により測定することが可能である。免疫化学アッセイとして、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、ウエスタンブロットティング等が挙げられる。タンパク質量の測定には、市販のELISAキット(MyBioSource社製)等を使用することもできる。

LTBP-1をコードするmRNA量は、PCR、ノーザンブロットティング、マイクロアレイ、蛍光プローブを用いたライブイメージング等により測定することが可能である。

ヒトのLTBP-1の塩基配列やアミノ酸配列(ORF)は公知であり、塩基配列(mRNA)はAccession No. Q14766として、公共のデータベースであるGenbankに登録されている。当業者であれば、LTBP-1をコードするmRNA量を測定するためのプライマーの設計や合成、DNAの増幅等を容易に行うことができる。

[0055] 本発明のスクリーニング方法においては、紫外線を照射する工程の前に、皮膚細胞を培養する工程を行ってもよい。紫外線照射前の培養において、上記被験物質を含む被験培地を用いてもよい。一態様において、紫外線を照射する工程の前に、皮膚細胞を、上記被験物質を含む被験培地又は該被験物質を

含まないコントロール培地で培養する工程を行ってもよい。この場合は、紫外線照射工程後の培養において、紫外線照射前の培養で被験物質を含む被験培地で培養した皮膚細胞を、当該被験培地で、コントロール培地で培養した皮膚細胞を、当該コントロール培地で培養することが好ましい。紫外線照射前の培養に被験培地を用いた場合に、コントロール培地で培養した皮膚細胞と比較してLTBP-1発現量が多い、すなわち被験物質がLTBP-1発現促進作用を有すると、該被験物質により紫外線照射によるLTBP-1発現低下が抑制される。一態様において、紫外線曝露による皮膚細胞中のLTBP-1発現低下を抑制する被験物質を選択する観点から、紫外線照射前の培養において、上記被験物質を含む被験培地で培養する工程を行うことが好ましい。紫外線照射前の培養に使用する培地、培養条件等は、細胞の種類等に応じて適宜設定することができ、上述した培養条件等を使用することができる。

[0056] 本発明のスクリーニング方法の別の態様においては、皮膚細胞を、被験物質を含む被験培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程、上記被験培地で培養した被験皮膚細胞、及び、上記コントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞に、紫外線を照射する紫外線照射、及び、上記被験皮膚細胞及びコントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量を比較する工程を含み、上記被験皮膚細胞におけるLTBP-1発現量が、上記コントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量より多い場合に、上記被験物質を、LTBP-1発現促進作用を有する物質として選択する。培地、培養条件、紫外線照射の条件等は特に限定されず、上述したものを使用することができる。

[0057] <LTBP-1の発現促進方法等>

本発明は、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ、スターフルーツ、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラからなる群より選択される1以上の植物の抽出物を対象に適用することを含む、LTBP-1の発現を促進する方法も包含する。

本発明の方法の好ましい態様の一例は、皮膚におけるＬＴＢＰ－１の発現促進方法である。対象は、上述したＬＴＢＰ－１発現促進用組成物の適用対象と同じであり、ヒト又は非ヒト哺乳動物が好ましく、ヒトがより好ましい。上記植物抽出物を対象に適用（使用）する方法として、上記植物抽出物を経口投与する方法、非経口投与する方法が挙げられ、好ましくは非経口投与であり、皮膚に適用する方法がより好ましい。皮膚におけるＬＴＢＰ－１の発現を促進する場合、植物抽出物を皮膚に適用することが好ましい。上記方法は治療的な方法であってもよく、非治療的な方法であってもよい。一態様において、本発明の方法は、紫外線曝露後の対象に上記植物抽出物を適用することにより、皮膚において、紫外線曝露により低下したＬＴＢＰ－１の発現を促進する方法であってよい。

[0058] 本発明は、ＬＴＢＰ－１の発現を促進するための、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ、スターフルーツ、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラからなる群より選択される１以上の植物の抽出物の使用も包含する。

上記の使用は、好ましくは、皮膚におけるＬＴＢＰ－１の発現を促進するための使用である。また、好ましくは、ヒト又は非ヒト哺乳動物における使用である。一態様において、上記使用は、皮膚において、紫外線曝露により低下したＬＴＢＰ－１の発現を促進するための、上記植物抽出物の使用であることが好ましい。使用は、治療的使用であってもよく、非治療的使用であってもよい。

上記方法及び使用における植物抽出物及びその好ましい態様、好ましい使用量等は上述したＬＴＢＰ－１発現促進用組成物と同様である。植物抽出物は１種の植物の抽出物を用いてもよく、２種以上の植物抽出物を用いてもよい。植物抽出物は、そのまま使用してもよく、その他の成分と組み合わせて使用してもよい。植物抽出物は上述した皮膚外用剤、飲食品等の形態で使用する事ができる。

本発明は、ＬＴＢＰ－１発現促進用組成物を製造するための、上記植物抽出

物の使用も包含する。LTBP-1発現促進用組成物及び植物抽出物の好ましい態様等は、上述した通りである。

実施例

[0059] 以下、本発明をより具体的に説明する実施例を示す。なお、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

[0060] <試験例1>

(LTBP-1過剰発現皮膚線維芽細胞の作製)

培養したヒト皮膚線維芽細胞(NHDF-Neo:Lonza社より購入)からRNAzol(登録商標)RT(コスモ・バイオ(株))を用いて、mRNAを抽出した。抽出したmRNAを鋳型としてM-MLV逆転写酵素を用いて逆転写反応を行った。作製したcDNAを鋳型として、PrimeSTAR(登録商標)GXL DNA Polymerase(タカラバイオ(株))を用いてPCR反応を行った。

[0061] LTBP-1をコードするDNA断片(LTBP-1のcDNA)を増幅するために使用したプライマーは以下の通りである。

(LTBP-1用プライマーセット)

LTBP-1-Forward: 5' -TGAGCAGTGTGTGAATTCTCCTGGATCTTACCAGTGCG-3' (配列番号1)

LTBP-1-Reverse: 5' -GACTGCGCTCGAGCTCCAGGTCAGTGTCTTTCTC-3' (配列番号2)

[0062] (プラスミドの作製)

増幅した遺伝子をエチジウムブロマイド含有2%アガロースゲルで電気泳動し、シングルバンドをUV照射下観察し、バンド部分を切り出して、Wizard(登録商標)SV Gel and PCR Clean-UP System(プロメガ社)を用いてLTBP-1をコードするDNA断片を精製したのち、pMXs-Puro Retroviral VectorにDNA Ligation kit<Mighty Mix>(タカラバイオ(株))を用いて導入した。精製したpMXs-Puro Retro

viral Vector 100ngに対してLTBP-1のcDNAをモル比1:3で混合し、DNA Ligation kit<Mighty Mix> (タカラバイオ (株)) を加えて一晩反応させた。反応終了後、E. coli DH5 α コンピテントセル (タカラバイオ (株)) に得られた混合溶液を加えインキュベート後、SOC培地を加え攪拌した。反応液をアンピシリン含有LB寒天培地上に塗布し、37℃で一晩培養した。培養後、プレートにできたコロニーをチップの先端で掻き取りLB培地に加えて37℃で一晩振盪培養した。培養後、Fast Gene (登録商標) Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス社) を用いて精製し、プラスミドを得た。さらにこのプラスミドと、配列番号1及び2のプライマーセットで増幅したLTBP-1をコードするDNA断片をEcoRIとXhoIで切断し、ライゲーション、トランスフォーム、精製を行い、目的のプラスミドを得た。精製したプラスミドは、EcoRI及びXhoIで切断後、2%アガロースゲルで電気泳動を行い遺伝子が組み込まれていることを確認した。

[0063] (プラスミドの導入)

Opti-MEM 1培地にpMXs-Puro Retroviral Vector及び作製したLTBP-1のプラスミド、FuGENE HD Transfection Reagent (プロメガ社)、10%血清を添加したプラスミド含有培地中でPlat-A細胞を一晩培養した。培養後10%血清含有培地で培養し、レトロウイルス含有培地を作製した。作製したレトロウイルス含有培地で新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞を処理し、LTBP-1過剰発現皮膚線維芽細胞を作製した。また、コントロールとして、上記新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞に、LTBP-1のcDNAを組み込んでいないpMXs-Puro Retroviral Vector (空ベクター) を導入してコントロールの細胞を作製した。

得られたLTBP-1過剰発現皮膚線維芽細胞を以下ではL1L-NHDF、空ベクターを導入した皮膚線維芽細胞をコントロール細胞ともいう。

[0064] <試験例 2>

試験例 1 で作製した L T B P - 1 過剰発現皮膚線維芽細胞 (L 1 L - N H D F) 及びコントロール細胞を用いて、L T B P - 1 の弾性線維形成促進効果を評価した。

[0065] (1) 蛍光免疫染色

L 1 L - N H D F とコントロール細胞をそれぞれ、8 w e l l c h a m b e r に 4×10^4 c e l l / w e l l で播種し、10%血清含有培地で5日間培養した。パラホルムアルデヒドで固定後、特異的一次抗体および特異的二次抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。尚、一次抗体にはヒトエラスチンを認識する抗体を、二次抗体には蛍光標識した I g G 抗体を用いた。

[0066] (2) E L I S A による線維量の半定量

L 1 L - N H D F とコントロール細胞をそれぞれ、96 w e l l プレートに 1.8×10^4 c e l l / w e l l になるように播種し、10%血清含有培地で5日間培養した。パラホルムアルデヒドで固定後、一次抗体および二次抗体を添加し、TMB (3, 3', 5, 5' - t e t r a m e t h y l b e n z i d i n e) - s u b s t r a t e r e a g e n t) を添加し、各 w e l l の吸光度 (測定波長 450 nm、対照波長 600 nm) をマイクロプレートリーダーで測定した。尚、一次抗体にはヒトエラスチンを認識する抗体を、二次抗体には H R P 標識した I g G 抗体を用いた。

[0067] (結果)

(1) L T B P - 1 過剰発現皮膚線維芽細胞 (L 1 L - N H D F) における弾性線維形成

上記方法で、L 1 L - N H D F における弾性線維形成を、蛍光免疫染色により確認した。図 1 は、L 1 L - N H D F における弾性線維形成を蛍光免疫染色によって評価した結果を示す顕微鏡写真である。上段は弾性線維であるエラスチンを蛍光免疫染色したもの、下段は細胞核を蛍光免疫染色したものである。図 1 中、E m p t y V e c t o r (左列) はコントロール細胞、L

TBP-1（右列）は、LTBP-1 過剰発現皮膚線維芽細胞をそれぞれ示す。蛍光免疫染色の結果から、L1L-NHDFにおける弾性線維形成は、コントロール細胞と比較すると増加傾向が見られた（図1）。

[0068] (2) L1L-NHDFにおける弾性線維量の半定量

L1L-NHDFにおける弾性線維形成を、ELISAにより半定量を行った。結果を、図2に示す。図2の縦軸は、450nmの吸光度である。有意差検定は、Unpaired two-tailed Student's t-testにより行った (** $P < 0.01$ ($n=4$))。図2中、Empty Vectorはコントロール細胞、LTBP-1は、LTBP-1 過剰発現皮膚線維芽細胞をそれぞれ示す。図2から、L1L-NHDFにおける弾性線維形成は、コントロール細胞と比較すると有意に増加した。上記結果から、LTBP-1の過剰発現により弾性線維の形成が促進された。このことから、LTBP-1が単独で弾性線維形成を促進する作用を有することが分かった。

[0069] <試験例3>

紫外線曝露により、細胞におけるLTBP-1の発現量が変化するかを調べた。

新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF-NB：クラボウ株式会社より購入）を100mmの培養ディッシュに播種し、 α -MEM培地（Sigma-Aldrich社製）で、37℃、二酸化炭素濃度5vol%中にてコンフルエントになるまで培養した。その後、培養上清を除去し、コントロール培地（0.1質量%ジメチルスルホキシド（DMSO）を含む α -MEM培地）に交換して24時間培養した。次いで、細胞に紫外線B波（UVB）（積算光量約5.7mJ/cm²）を照射し、さらに24時間培養した。この培養後、細胞（UVBを照射した細胞：UVB(+)）を回収して検体とした。RNeasy Mini Kit（Qiagen社）を用いて、この細胞（検体）からmRNAを抽出し、RT-PCRによりLTBP-1遺伝子発現量の定量を行った。

比較のため、上記のUVB照射を行わない以外は、上記と同じ方法で新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF-NB）の培養を行い、同じ方法で細胞（UVを照射しなかった細胞：UVB（-））からmRNAを抽出し、cDNAを合成した後RT-PCRによりLTBP-1遺伝子発現量の定量を行った。

[0070] RT-PCRは、Applied Biosystems社のTaqMan Assayにより、市販のLTBP-1用プライマー（Applied Biosystems社）を用いて行った。PCR反応は、95℃で20秒間、60℃で20秒間、40サイクルの条件で行った。

上記試験を3回（試験No. 1～3）行った。各試験において、それぞれn = 6で検体を調製した。LTBP-1遺伝子の発現量の測定は、各検体につき2回ずつ行い、その平均値を測定値とした。この測定値（n = 6）の平均値をLTBP-1発現量の定量結果とした。

[0071] 結果を表1に示す。LTBP-1発現量（%）は、各試験において、UV照射しなかった細胞（UVB（-））のLTBP-1発現量（mRNA量）を100%としたときの、UV照射した細胞（UVB（+））のLTBP-1発現量（mRNA量）の相対値で示した。

[0072] [表1]

UV(+)	LTBP-1発現量(%)
試験No.1	76.34
試験No.2	74.08
試験No.3	71.16
平均	73.86

[0073] 表1より、UVBを照射した細胞におけるLTBP-1遺伝子の発現量は、UVBを照射しなかった細胞における発現量よりも平均で26.1%低かった。ヒト皮膚線維芽細胞にUVBを照射すると、LTBP-1の発現が低下することが示された。

[0074] <調製例1>

植物由来の抽出物の調製

様々な植物を対象とするスクリーニングにより選択した下記の7種類の植物

を溶媒で抽出し、抽出物を得た。抽出に用いた植物及びその部位は以下の通りである。

アマチャヅル (*Gynostemma pentaphyllum*) : 葉

ヒメフウロ (*Geranium robertianum*) : 全草

バラ (*Rosa hybrida*、品種「アプローズ」(登録商標)、サントリーフラワーズ(株)) : 花卉

シソ (*Perilla frutescens* var. *Crispa*) : 葉

ショウブ (*Acorus calamus*) : 根茎

セージ (*Salvia officinalis*) : 葉

スターフルーツ (*Averrhoa carambola*) : 葉

上記のバラ(品種「アプローズ」)は、花卉にロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンB並びにロザデルフィンA1、ロザデルフィンA2及びロザデルフィンBを含む青系のバラである。

[0075] 上記植物の破碎物を、溶媒に浸し抽出した。より詳細には、アマチャヅルについては、葉を水で抽出し、抽出液をろ過してろ液を得た。このろ液を濃縮し粉末にした後、1, 3-ブチレングリコール及び水に溶かし、ろ過してアマチャヅル抽出液を得た。ヒメフウロについては、全草を1, 3-ブチレングリコールで抽出して抽出液を得た。バラについては、花卉をエタノールで抽出して抽出液を得た。シソについては、葉を1, 3-ブチレングリコールで抽出して抽出液を得た。ショウブについては、根茎をエタノールで抽出して抽出液を得た。セージについては、葉をエタノールで抽出して抽出液を得た。スターフルーツについては、葉を1, 3-ブチレングリコールで抽出して抽出液を得た。得られた抽出液から、ろ過により植物残渣を除去し、ろ液を植物抽出液として得た。

得られた植物抽出液をエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥することにより各植物の抽出物を粉末として得た。当該粉末状の植物抽出物(アマチャヅル抽出物、ヒメフウロ抽出物、バラ抽出物、シソ抽出物、ショウブ抽出物、セー

ジ抽出物及びスターフルーツ抽出物)を以下の評価に用いた。

[0076] 以下の実施例1～3では、各サンプルについて、 $n=6$ で検体を調製した。

L T B P - 1 遺伝子の発現量の測定は、各検体につき2回ずつ行い、その平均値を測定値とした。この検体の測定値 ($n=6$) の平均値をL T B P - 1 発現量の定量結果とした。コントロールについても同様である。有意差検定は、s t u d e n t ' s t t e s t により行った。

[0077] <実施例1>

植物由来の抽出物のL T B P - 1 発現促進作用について、新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞を用いて、L T B P - 1 の発現量を指標として評価を行った。新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞 (N H D F - N B : クラボウ株式会社より購入) を100mmの培養ディッシュに播種し、 α -MEM培地 (S i g m a - A l d r i c h 社製) で、37℃、二酸化炭素濃度5vol%中にてコンフルエントになるまで培養した。その後、培養上清を除去し、サンプル含有培地に交換して24時間培養した。次いで、細胞に紫外線B波 (U V B) (積算光量約5.7mJ/cm²) を照射し、さらに24時間培養した。この培養後、細胞を回収し、検体とした。試験例3と同じ方法で細胞からmRNAを抽出し、R T - P C R によりL T B P - 1 遺伝子発現量の定量を行った。

[0078] 上記サンプル含有培地は、 α -MEM培地に、各植物抽出物を添加して調製した。表2に、使用した植物抽出物及びその培地中の濃度を示す。植物抽出物 (粉末) はDMSOに溶解し、培地中のDMSOの最終濃度が0.1質量%となるように添加した。

サンプル含有培地の代わりに、試験例3で使用したコントロール培地 (0.1質量%DMSOを含む α -MEM培地) を用いた以外は、上記と同じ方法でU V B 照射及び培養を行い、得られた細胞をコントロールとした。コントロールについても、上記と同じ方法でL T B P - 1 遺伝子発現量の定量を行った。

[0079] 結果を表2に示す。L T B P - 1 発現量は、コントロールのL T B P - 1 発現量 (mRNA量) を100%としたときの、各植物抽出物を使用した場合

のLTBP-1発現量(mRNA量)の相対値で示した。有意差は、コントロールに対する検定結果である。

[0080] [表2]

サンプル	LTBP-1発現量(%)	有意差
アマチャヅル抽出物 10 μ g/mL	132.53	<0.05
ヒメフウロ抽出物 20 μ g/mL	118.52	<0.05
バラ抽出物 10 μ g/mL	114.38	<0.05
バラ抽出物 20 μ g/mL	120.03	<0.01

[0081] アマチャヅル抽出物、ヒメフウロ抽出物及びバラ抽出物を含む培地で培養した場合、該抽出物を含まない培地で培養した場合(コントロール)と比較して、LTBP-1発現量が有意に高かった。これらの植物の抽出物は、LTBP-1発現促進作用を有することが示された。

[0082] <実施例2>

新生児由来ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF-NB:クラボウ株式会社より購入)を100mmの培養ディッシュに播種し、 α -MEM培地(Sigma-Aldrich社製)で、37℃、二酸化炭素濃度5vol%中にてコンフルエントになるまで培養した。その後、培養上清を除去し、新鮮な α -MEM培地に交換して24時間培養した。次いで、培地を除去し平衡塩溶液(HBSS)に交換後、細胞にUVB(積算光量約5.7mJ/cm²)を照射した。UV照射後、HBSSをサンプル含有培地へ交換し、さらに24時間培養した。この培養後、細胞を回収して検体とした。試験例3と同じ方法で細胞からmRNAを抽出し、RT-PCRによりLTBP-1遺伝子発現量の定量を行った。

[0083] サンプル含有培地は、 α -MEM培地に、各植物抽出物を添加して調製した。表3に、使用した植物抽出物及びその培地中の濃度を示す。植物抽出物はDMSOに溶解し、培地中のDMSOの最終濃度が0.1質量%となるように添加した。サンプル含有培地の代わりに、試験例3で使用したコントロール培地(0.1質量%DMSOを含む α -MEM培地)を用いた以外は、上記と同じ方法でUVB照射及び培養を行い、得られた細胞をコントロール(

+UV)とした。また、サンプル含有培地の代わりに、試験例3で使用したコントロール培地を用いて、UVB照射を行わない以外は、上記と同じ方法で培養を行い、得られた細胞をコントロール(-UV)とした。これらのコントロールについても、上記と同じ方法でLTBP-1遺伝子発現量の定量を行った。

[0084] 結果を表3に示す。表3中、「コントロール(-UV)」は、UVBを照射していないコントロールであり、「コントロール(+UV)」は、UVBを照射したコントロールである。表3において、UV照射の「-」は、UVBを照射しなかったことを意味し、「+」はUV照射したことを意味する。有意差は、「コントロール(+UV)」に対する各サンプルのLTBP-1発現量(%)の有意差である。

[0085] 各サンプルのLTBP-1発現量(%)は、UVB照射したコントロール(コントロール(+UV))のLTBP-1発現量(mRNA量)を100%としたときの、相対値(%)として示した。また、UVB照射によるLTBP-1発現量の低下に対して、植物抽出物がどれだけ回復作用を示すかを、「回復率(%)」として示した。回復率(%)は、UV照射なしのコントロール(-UV)のLTBP-1発現量(C0)、UV照射したコントロールのLTBP-1発現量(C1)及び各植物抽出物を添加した細胞のLTBP-1発現量(S)から、以下の計算により求めた。

$$\text{回復率}(\%) = 100 \times ((S) - (C1)) / ((C0) - (C1))$$

[0086] [表3]

サンプル	UV照射	LTBP-1発現量(%)	回復率(%)	有意差
コントロール (-UV)	-	242.96	-	-
コントロール (+UV)	+	100.00	0.00	-
アマチャヅル抽出物 10 μ g/mL	+	118.39	12.86	<0.01
アマチャヅル抽出物 20 μ g/mL	+	121.01	14.70	<0.01
ヒメフウロ抽出物 5 μ g/mL	+	120.72	14.49	<0.05
ヒメフウロ抽出物 20 μ g/mL	+	112.80	8.96	<0.05

[0087] アマチャヅル抽出物及びヒメフウロ抽出物は、UV曝露により低下したLTBP-1の発現を回復させた。

[0088] <実施例3>

植物抽出物として、表4に示す各植物抽出物を用いた以外は、実施例1と同じ方法でLTBP-1発現促進作用を評価した。表4に、サンプル含有培地中の植物抽出物の濃度及び評価結果を示す。LTBP-1発現量は、コントロールのLTBP-1発現量(mRNA量)を100%としたときの、各植物抽出物を使用した場合のLTBP-1発現量(mRNA量)の相対値で示した。有意差は、コントロールに対する検定結果である。表4より、シソ抽出物、ショウブ抽出物、セージ抽出物及びスターフルーツ抽出物は、LTBP-1発現促進作用を有することが示された。

[0089] [表4]

サンプル	LTBP-1発現量(%)	有意差
シソ抽出物 10 μ g/mL	117.17	<0.05
ショウブ抽出物 5 μ g/mL	123.96	<0.05
ショウブ抽出物 10 μ g/mL	123.06	<0.05
ショウブ抽出物 20 μ g/mL	138.59	<0.01
セージ抽出物 5 μ g/mL	114.12	<0.05
セージ抽出物 10 μ g/mL	113.88	<0.01
セージ抽出物 20 μ g/mL	115.41	<0.01
スターフルーツ抽出物 10 μ g/mL	120.83	<0.01
スターフルーツ抽出物 20 μ g/mL	115.96	<0.01

請求の範囲

- [請求項1] バラ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ及びスターフルーツからなる群より選択される1以上の植物の抽出物を含み、前記バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである、LTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項2] 前記植物の抽出物が、アマチャヅル、ヒメフウロ、並びに、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラからなる群より選択される1以上の植物の抽出物である請求項1に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項3] 皮膚におけるLTBP-1発現促進用である、請求項1又は2に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項4] 皮膚において、紫外線曝露により低下したLTBP-1の発現を促進するために使用される請求項1～3のいずれか一項に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項5] 皮膚におけるLTBP-1の発現を促進することにより、紫外線曝露に起因する弾性線維減少の予防又は改善のために使用される、請求項1～4のいずれか一項に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項6] 皮膚外用剤である請求項1～5のいずれか一項に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項7] 化粧品である請求項1～6のいずれか一項に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項8] 飲食品である請求項1～5のいずれか一項に記載のLTBP-1発現促進用組成物。
- [請求項9] インビトロで、皮膚細胞に紫外線を照射する工程、紫外線を照射した前記皮膚細胞を、被験物質を含む被験培地又は前記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程、及び、前記被験培地で培養した被験皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量を比較する工

程を含み、

前記被験皮膚細胞におけるLTBP-1発現量が、前記コントロール皮膚細胞におけるLTBP-1の発現量より多い場合に、前記被験物質をLTBP-1発現促進作用を有する物質として選択する、LTBP-1発現促進作用を有する物質のスクリーニング方法。

[請求項10] バラ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ及びスターフルーツからなる群より選択される1以上の植物の抽出物を対象に適用することを含み、前記バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである、LTBP-1の発現を促進する方法。

[請求項11] LTBP-1の発現を促進するための、バラ、アマチャヅル、ヒメフウロ、ショウブ、シソ、セージ及びスターフルーツからなる群より選択される1以上の植物の抽出物の使用であって、前記バラは、ロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物を含むバラである、使用。