

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6656946号
(P6656946)

(45) 発行日 令和2年3月4日 (2020. 3. 4)

(24) 登録日 令和2年2月7日 (2020. 2. 7)

(51) Int. Cl.

F 1

GO 1 N 33/50 (2006. 01)

GO 1 N 33/50 Q

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 D

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

請求項の数 4 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2016-30948 (P2016-30948)
 (22) 出願日 平成28年2月22日 (2016. 2. 22)
 (65) 公開番号 特開2017-150835 (P2017-150835A)
 (43) 公開日 平成29年8月31日 (2017. 8. 31)
 審査請求日 平成31年2月1日 (2019. 2. 1)

(73) 特許権者 000001959
 株式会社 資生堂
 東京都中央区銀座 7-5-5
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一
 (74) 代理人 100141977
 弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角層抽出タンパク量の補正方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の皮膚角層における測定目的のタンパク質の発現量を補正するための方法であって、

被験体から採取した皮膚角層から角層抽出試料を調製する工程、
 角層抽出試料中の測定目的のタンパクの発現量を測定する工程、
 角層抽出試料中のシスタチン A の発現量を測定する工程、及び
 前記測定目的のタンパク質の発現量を前記シスタチン A の発現量を用いて補正する工程

を含む方法。

【請求項 2】

被験体から採取した皮膚角層が、テープストリッピング法により採取されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

角層抽出試料中の測定目的のタンパクの発現量の測定、及び / 又は前記角層抽出試料中のシスタチン A の発現量の測定が、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法、イムノクロマト法、無標識免疫センサを用いた定量的免疫アッセイにより行われる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

皮膚角層中の測定目的のタンパク質の発現に起因する肌状態又は皮膚疾患の評価におい

て用いられる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、測定目的のタンパク質の発現量をシスタチン A の発現量で補正することを含む、被験体の皮膚角層における測定目的のタンパク質の発現量を補正するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生体因子量の多寡を論ずるには、一定単位あたりでの比較もしくは適切な内部標準での割り付けが必要である。例えば、血液・尿などに含まれる生体因子量は、液量あたりの因子量により表すことができる。臓器などの組織中の生体因子量は、組織重量あたりの因子量により表すことができる。また、抽出工程を経る場合には、抽出された総タンパク量あたりの因子量、又は抽出された内部標準量あたりの因子量により表すことができる。一方で、皮膚角層中の生体因子量測定における補正に関しては、角層重量により補正する場合には、角層採取時にメトラーでの重量測定が必要となるが、角層は微量であるため、測定が極めて困難である。また、角層抽出試料中の総タンパク量で補正する場合には、別途総タンパク質量を測定する必要がある（BCA法、ブラッドフォード法、Lowry法など）、測定のための機器（例えば、恒温槽、吸光度計など）が必要となる。一方、何らかのタンパク質を内部標準として使用して補正する場合には、測定目的因子がタンパク質の場合には、測定目的タンパク質と同じ方法で測定することにより、追加での機器を必要とせず、補正を行うことが可能である。角層中の因子を内部標準として使用する際の条件として、検出が可能であること（発現量がある程度多いこと）、比較対象内で発現量のばらつきが少ないこと、及び分解などのプロセッシングを受けていないことなどが挙げられる。

【0003】

生細胞において一般に用いられる内部標準としては、チューブリン、GAPDH、 β -アクチンなどが知られている。これらの因子は、多くの組織において一定量発現しているハウスキーピング因子として知られており、内部標準としてよく使用されている。しかしながら、角層形成過程において、皮膚表皮細胞は分化の過程で核を消失し、タンパク質もまた加水分解などの生体内プロセッシングを受けながら角層へと分化するため、生細胞で内部標準として使用されている因子が角層での内部標準として使用できるとは限らない。実際に、チューブリンやGAPDH、 β -アクチンの角層抽出試料中の因子測定における内部標準としての可能性を検討したが、発現量のばらつきや、角層中で分解されている可能性も高いため、角層試料中のタンパク質を定量する場合には、内部標準として活用することはできない。

【0004】

皮膚角層において発現量が一定であるタンパク質としては、ケラチン 2 e やケラチン 3 が知られている（特許文献 1）。しかしながら、皮膚角層中のケラチン 2 e やケラチン 3 の発現量と総タンパク質量との相関性は十分とはいえない。また、皮膚角層から抽出したケラチン 2 e やケラチン 3 は、ウェスタンブロット法などでは検出できないため、検出感度にも課題を有している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】特開 2011-185811 号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Vasilopoulos Y et al., "Association analysis of the skin barrier gene cystatin A at the PSORS5 locus in psoriatic patients: evidence for interac

10

20

30

40

50

tion between PSORS1 and PSORS5.", European Journal of Human Genetics, 2008;16(8):1002-9

【非特許文献2】Blaydon DC et al., "Mutations in CSTA, encoding Cystatin A, underlie exfoliative ichthyosis and reveal a role for this protease inhibitor in cell-cell adhesion.", The American Journal of Human Genetics, 2011;89(4):564-71

【非特許文献3】Vasilopoulos Y et al., "A nonsynonymous substitution of cystatin A, a cysteine protease inhibitor of house dust mite protease, leads to decreased mRNA stability and shows a significant association with atopic dermatitis.", Allergy. 2007;62(5):514-9

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、角層抽出試料中のタンパク質を簡便かつ正確に定量するための新規な方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、鋭意検討した結果、驚くべきことに、角層抽出試料中のシスタチンAが、皮膚角層において加水分解などのプロセッシングを受けておらず、個人差や肌状態による発現量のばらつきも少なく、また検出感度も高いことから、角層抽出試料中のタンパク質の定量に用いられる内部標準として極めて有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

【0009】

本発明は以下の発明を包含する。

[1] 被験体の皮膚角層における測定目的のタンパク質の発現量を補正するための方法であって、

被験体から採取した皮膚角層から角層抽出試料を調製する工程、

角層抽出試料中の測定目的のタンパクの発現量を測定する工程、

角層抽出試料中のシスタチンAの発現量を測定する工程、及び

前記測定目的のタンパク質の発現量を前記シスタチンAの発現量を用いて補正する工程

30

を含む方法。

[2] 被験体から採取した皮膚角層が、テープストリッピングにより採取されたものである、[1]に記載の方法。

[3] 角層抽出試料中の測定目的のタンパクの発現量の測定、及び/又は前記角層抽出試料中のシスタチンAの発現量の測定が、酵素免疫測定法(ELISA法、EIA法を含む)、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法、イムノクロマト法、無標識免疫センサ(表面プラズモン共鳴、弾性表面波、水晶振動子マイクロバランスなどに基づいたバイオセンサー)を用いた定量的免疫アッセイなどにより行われる、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 皮膚角層中の測定目的のタンパク質の発現に起因する肌状態又は皮膚疾患の評価において用いられる、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

40

【発明の効果】

【0010】

本発明により、皮膚角層中の測定目的のタンパク質を簡便かつ正確に補正することが可能となる。これにより、採取された角層量や抽出効率のばらつきにかかわらず、皮膚角層中の測定目的のタンパク質に起因する肌状態を評価することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】角層抽出試料のウェスタンブロット分析結果を示す写真である。

【図2】角層抽出試料中の全タンパク質量とシスタチンAの発現量との相関性(N=34

50

）を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、測定目的のタンパク質の発現量をシスタチンAの発現量で補正することを含む、被験体の皮膚角層における測定目的のタンパク質を定量するための方法を供する。

本発明の方法において内部標準として用いられるシスタチンAは、表皮細胞、消化管粘膜上皮、白血球に存在するシステインプロテアーゼインヒビターであり、表皮ではコーニファイドエンベロープを形成することが知られている。シスタチンAは、乾癬、剥離性魚鱗癬、アトピー性皮膚炎と関連性があることや（非特許文献1-3）シスタチンAの不存在下では、培養したケラチノサイトの物理刺激に対する細胞間接着不全が確認されることが報告されている（非特許文献2）。しかしながら、皮膚角層中のシスタチンAの発現量とタンパク質の発現量との間に相関性を有することについてはこれまでに知られていない。

【0013】

皮膚角層の採取方法は特に限定されるものではないが、簡便であり、非侵襲的であることを鑑みると、テープストリッピング法が好ましい。テープストリッピングとは、皮膚表層に粘着テープ片を貼付し、剥がし、皮膚角層をその剥がした粘着テープに付着させることで角層試料を採取する方法である。テープストリッピングの好ましい方法は、まず皮膚の表層を例えばエタノールや水などで浄化して皮脂、汚れ等を取り除き、適当なサイズ（例えば、約2×約6cm）に切った粘着テープ片を皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付け、その後均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることで行われる。粘着テープは市販のセロファンテープなどであってよく、例えばScotch Super strength Mailing Tape（3M社製）、セロファンテープ（セロテープ（登録商標）；ニチバン株式会社）等が使用できる。繰り返しは2回、3回、4回、5回又はそれ以上であってよいが、採取した皮膚角層が顆粒層にまで至っていないことが好ましい。

【0014】

採取した皮膚角層からの角層抽出試料の調製には、非イオン性の界面活性剤を含む、中性～弱アルカリ性のバッファー、例えば、以下の抽出バッファー[0.1M Tris-HCl(pH8.0), 0.14M NaCl, 0.1% Tween20]を用いることができるが、これに限定されるものではない。皮膚角層が付着したテープをはさみ等で細切し遠心チューブなどの容器に移し、少量の上記バッファーに浸漬し、転倒攪拌や超音波処理を行うことにより、効率よく可溶性成分を抽出できる。調製された角層抽出試料中の測定目的のタンパク質の発現量及びシスタチンAの発現量が測定される。このような測定は、特に制限されることなく、当業界において慣習的な方法によって行うことができるが、典型的には、酵素免疫測定法（ELISA法、EIA法を含む）、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法、イムノクロマト法、無標識免疫センサ（表面プラズモン共鳴、弾性表面波、水晶振動子マイクロバランスなどに基づいたバイオセンサー）を用いた定量的免疫アッセイを利用することができる。

【0015】

このようにして測定された角層抽出試料中の測定目的のタンパク質の発現量を角層抽出試料中のシスタチンAの発現量を用いて補正することにより、皮膚角層における特定のタンパク質量を容易かつ正確に測定することが可能となる。このような補正は、典型的には、角層抽出試料中の測定目的のタンパク質の発現量を角層抽出試料中のシスタチンAの発現量で除することにより行われる。あるいは、角層抽出試料中の総タンパク質量と角層抽出試料中のシスタチンAの発現量を測定して、これらの測定量の相関関数を予め作製しておき、当該相関関数を用いることにより、角層抽出試料中のシスタチンAの発現量から角層抽出試料中の総タンパク質量を算出することができる。したがって、角層抽出試料中の測定目的のタンパク質の発現量を算出した角層抽出試料中の総タンパク質量で除することにより、角層抽出試料中の総タンパク質量あたりの相対量として角層抽出試料中の測定目

的のタンパク質の発現量を補正することもできる。

【0016】

本願明細書でいう「測定目的のタンパク質」とは、皮膚角層に存在する定量すべきタンパク質であって、典型的には、肌状態や皮膚疾患に関連し得るタンパク質を意味する。このようなタンパク質としては、例えば、SCCA1やブレオマイシンヒドロラーゼ、カスパーゼ、IL-1 α 、IL-1RAなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0017】

本発明の方法により、被験者の個人差や肌状態にかかわらず、皮膚角層中の測定目的のタンパク質量を簡便かつ正確に補正することが可能となる。したがって、本発明の方法は、皮膚角層中の測定目的のタンパク質の発現に起因する肌状態又は皮膚疾患の評価において用いることができる。

【0018】

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

【実施例】

【0019】

(1) 角層抽出試料の調製

テープストリッピング法により、被験者の前腕部から皮膚角層を採取した。具体的には、適当なサイズ(約2×約6cm)に切ったセロファンテープ(ニチバン株式会社)片を被験者の前腕部の皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付けた後、均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることにより、セロファンテープに皮膚角層を付着させた。

その後、皮膚角層が付着したセロファンテープを裁断し、抽出バッファー[0.1M Tris-HCl(pH8.0), 0.14M NaCl, 0.1% Tween20, 1ml]に浸漬させ、超音波処理(30秒×4)を行い、角層抽出試料を作製した。当該角層抽出試料を下記のウェスタンブロット分析、ELISA分析及び総タンパク量測定に供した。

【0020】

(2) ウェスタンブロット分析

抗 β -アクチン抗体(Sigma Aldrich Japan社)、抗GAPDH抗体(Sigma Aldrich Japan社)、抗 β -ミクログロブリン抗体(Sigma Aldrich Japan社)、抗シスタチン抗体(Sigma Aldrich Japan社)、抗チューブリン抗体(Santa Cruz Biotechnology社)、抗HPR T抗体(Abcam社)、抗ケラチン2e抗体(Progen社)、抗リボソームタンパク抗体(aviva社)を用いて、ウェスタンブロット分析を行った。具体的には、上記で得られた角層抽出試料(n=11)をSDS電気泳動後、iBlot Dry Blotting system(Invitrogen社)を用いてメンブレンに転写し、この転写されたメンブレンを洗浄・ブロッキングを行った後、各種抗体と4で一晩反応させた。さらに洗浄により抗体を除去したのち、HRP結合二次抗体を反応させた。洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection Kit(GE Healthcare社)により発光させた各タンパクバンドをX線フィルムに焼付け、バンドの有無により、上記抗体に対応する候補因子を検出した。

その結果、シスタチンA及びGAPDH以外の候補因子のシグナルは検出できなかった。シグナルが検出されたタンパク質のうち、GAPDHについては、約37kDaの単一のバンドが確認できたが、発現量が一定でないことから、内部標準としては活用できないことが判明した(データは示していない)。一方、シスタチンAについては、全ての試料において、約11kDaの分子量の単一のバンドが見られ、発現量のバラつきが少ないため、内部標準として有用であることが確認された(図1)。各候補因子についての結果を以下の表に示す。

【表 1】

測定因子名	メーカー	角層における 標的タンパク質の検出可否	角層における 検出量の一定性
β -アクチン	Sigma Aldrich	×	
GAPDH	Sigma Aldrich	○	×
チューブリン	SantaCruz	×	
ケラチン-2e	Progen	×	
HPRT	Abcam	×	
リボソームタンパク	aviva	×	
β -マイクログロブリン	Sigma Aldrich	×	
シスタチン A	Sigma Aldrich	○	○

10

【0021】

(3) ELISA 分析

Human Cystatin - A (CSTA / STF1 / STF A) ELISA Kit (Cusabio Biotech 社) を用いて、推奨プロトコールに従い、上記で得られた角層抽出試料中のシスタチン A の発現量を測定した。

20

【0022】

(4) 総タンパク量測定

RCDC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories 社) を用いて、推奨プロトコールに従い、上記で得られた角層抽出試料中の総タンパク量を測定した。

【0023】

(5) シスタチン A の発現量と総タンパク量との相関性

上記で得られた角層抽出試料 (N = 34) 中の総タンパク量 (y : mg / ml) とシスタチン A (x : ng / ml) の発現量から、以下の式：

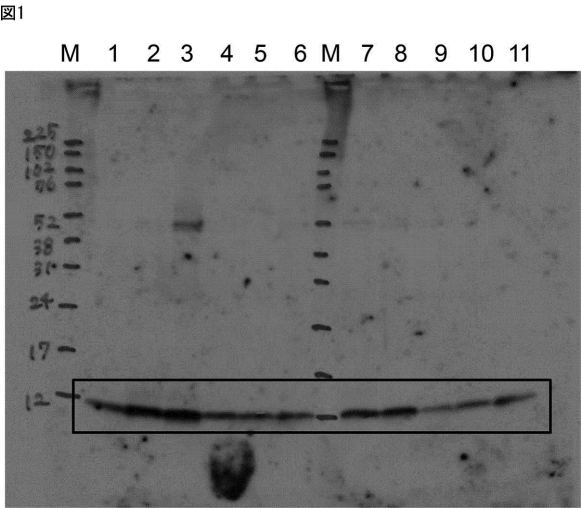
$$y = 0.002x + 0.00212$$

30

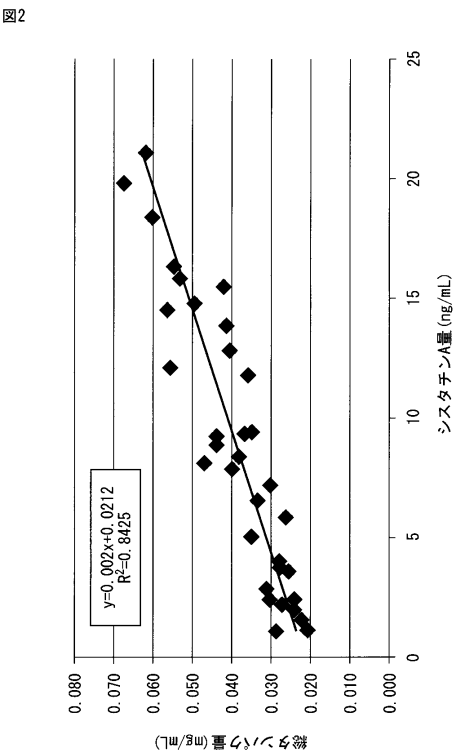
で表される相関関数を得た (図 2)。

角層抽出試料中のシスタチン A の発現量と総タンパク量との相関係数は 0.9178 ($R^2 = 0.8425$) であった。したがって、皮膚角層中のシスタチン A の発現量はタンパク質量と極めて高い相関性を有することが確認された。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ▲高▼木 雅哉

神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(新横浜)内

(72)発明者 田中 千華

神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(新横浜)内

審査官 北条 弥作子

(56)参考文献 特開2009-174867(JP,A)

特開2012-193136(JP,A)

特開2014-101309(JP,A)

STEVEN, Alasdair C., Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes, Journal of Cell Science, 英国, The Company of Biologists Ltd, 1994年, 107, 693-700

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/50

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	如何校正角质层提取蛋白的量		
公开(公告)号	JP6656946B2	公开(公告)日	2020-03-04
申请号	JP2016030948	申请日	2016-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	资生堂公司，有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	资生堂公司，有限公司		
[标]发明人	高木雅哉 田中千華		
发明人	▲高▼木 雅哉 田中 千華		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/50.Q G01N33/53.D G01N33/543.521		
F-TERM分类号	2G045/CB09		
代理人(译)	青木 篤 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 池田 达则		
审查员(译)	北条Yasakuko		
其他公开文献	JP2017150835A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种新颖的方法，用于简单而准确地定量角质层提取样品中测量目的蛋白的重量。解决方案：提供一种校正皮肤角质中测量目的蛋白表达水平的方法。主题的一层。该方法包括以下步骤：制备从受试者采样的皮肤角质层中提取的角质层样品；测量角质层提取样品中的目的蛋白质的表达水平；测量角质层提取样品中胱抑素A的表达水平；并通过使用胱抑素A的表达水平来校正测量目的蛋白的表达水平。

图2

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 特 許 公 報 (B2)		(11) 特許番号	
				特許第6656946号 (P6656946)	
(45) 発行日 令和2年3月4日 (2020. 3. 4)		(24) 登録日 令和2年2月7日 (2020. 2. 7)			
(51) Int. Cl.		F 1			
G O 1 N 33/50 (2006. 01)		G O 1 N 33/50		Q	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)		G O 1 N 33/53		D	
G O 1 N 33/543 (2006. 01)		G O 1 N 33/543		5 2 1	
請求項の数 4 (全 8 頁)					
(21) 出願番号	特願2016-30948 (P2016-30948)	(73) 特許権者	000001959		
(22) 出願日	平成28年2月22日 (2016. 2. 22)	株式会社 資生堂			
(65) 公開番号	特開2017-150835 (P2017-150835A)	東京都中央区銀座7-5-5			
(43) 公開日	平成29年8月31日 (2017. 8. 31)	(74) 代理人	100098759		
審査請求日	平成31年2月1日 (2019. 2. 1)	(74) 代理人	弁理士 青木 篤		
		(74) 代理人	100077517		
		(74) 代理人	弁理士 石田 敬		
		(74) 代理人	100087871		
		(74) 代理人	弁理士 福本 慎		
		(74) 代理人	100087413		
		(74) 代理人	弁理士 古賀 哲次		
		(74) 代理人	100117019		
		(74) 代理人	弁理士 渡辺 陽一		
		(74) 代理人	100141977		
		(74) 代理人	弁理士 中島 勝		
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 角層抽出タンパク量の補正方法					