

図 1. K166 の細胞障害性の評価

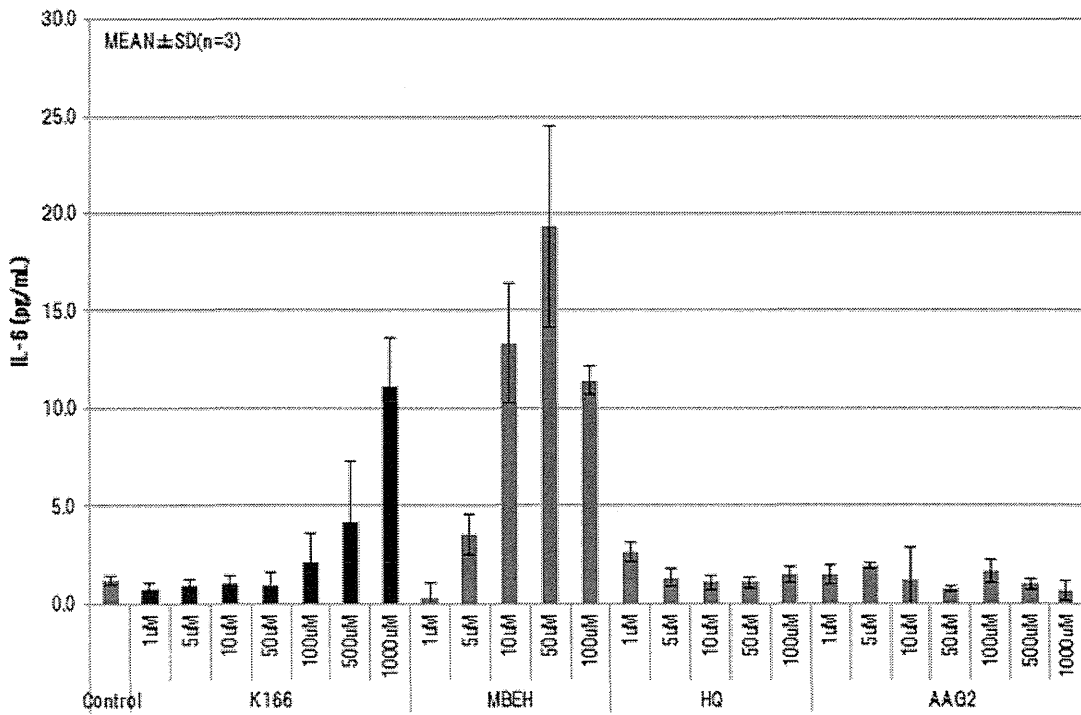


図 2. K166 の表皮角化細胞に対する IL-6 分泌誘導能の評価

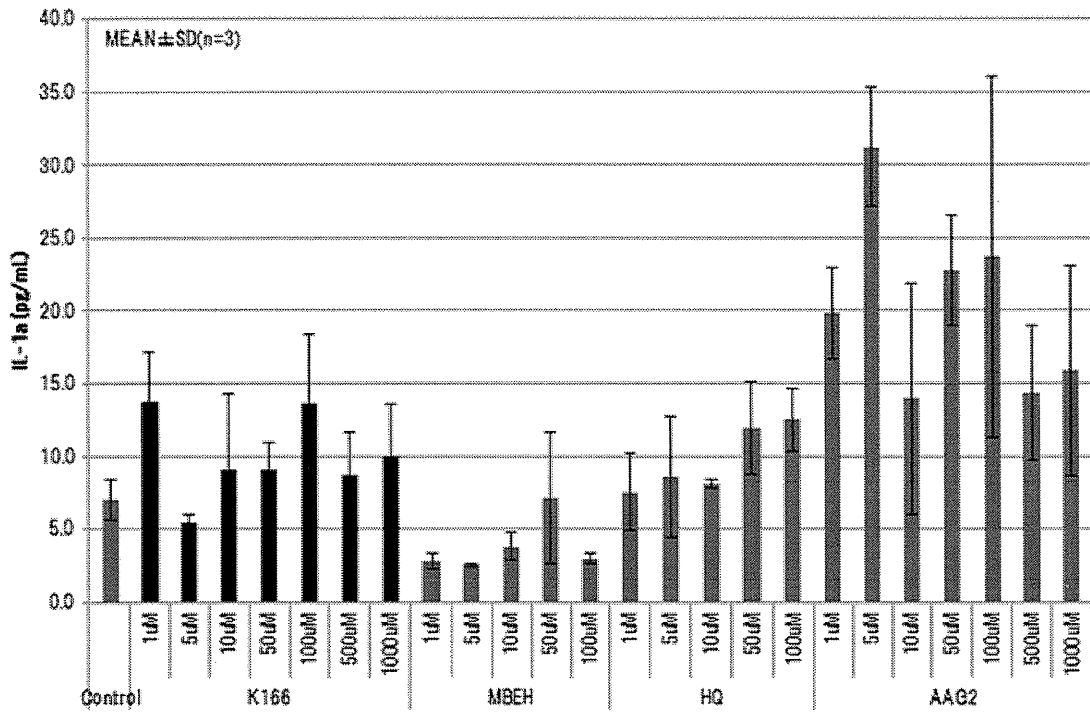


図 3. K166 の表皮角化細胞に対する IL-1 α 分泌誘導能の評価

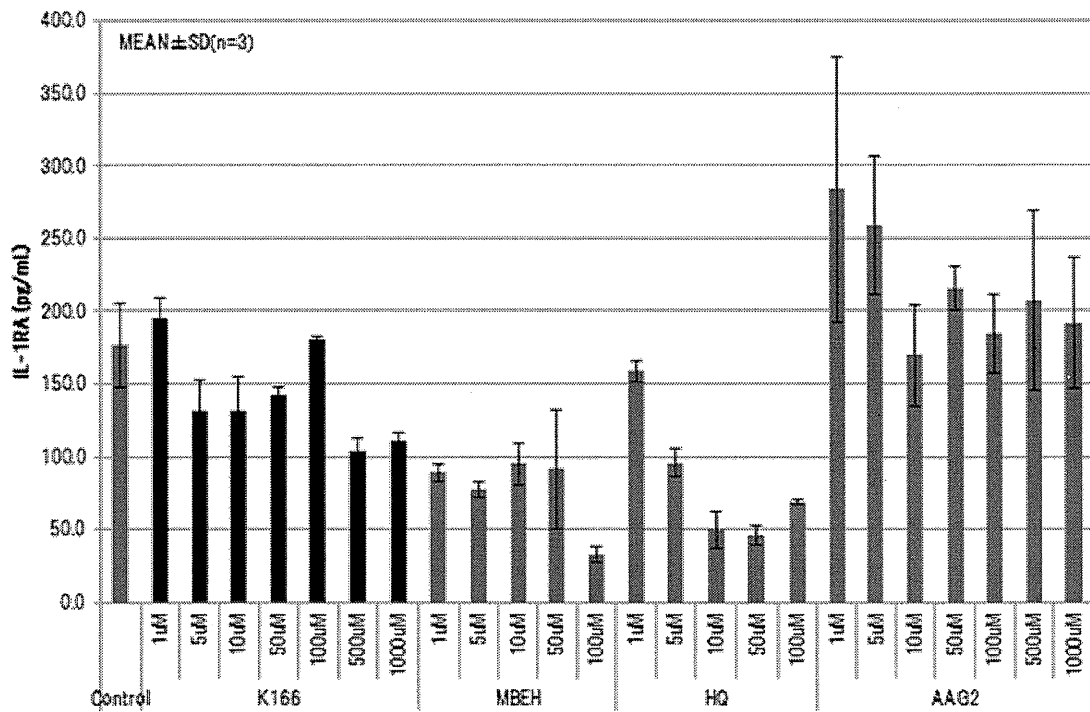


図 4. K166 の表皮角化細胞に対する IL-1RA 分泌誘導能の評価

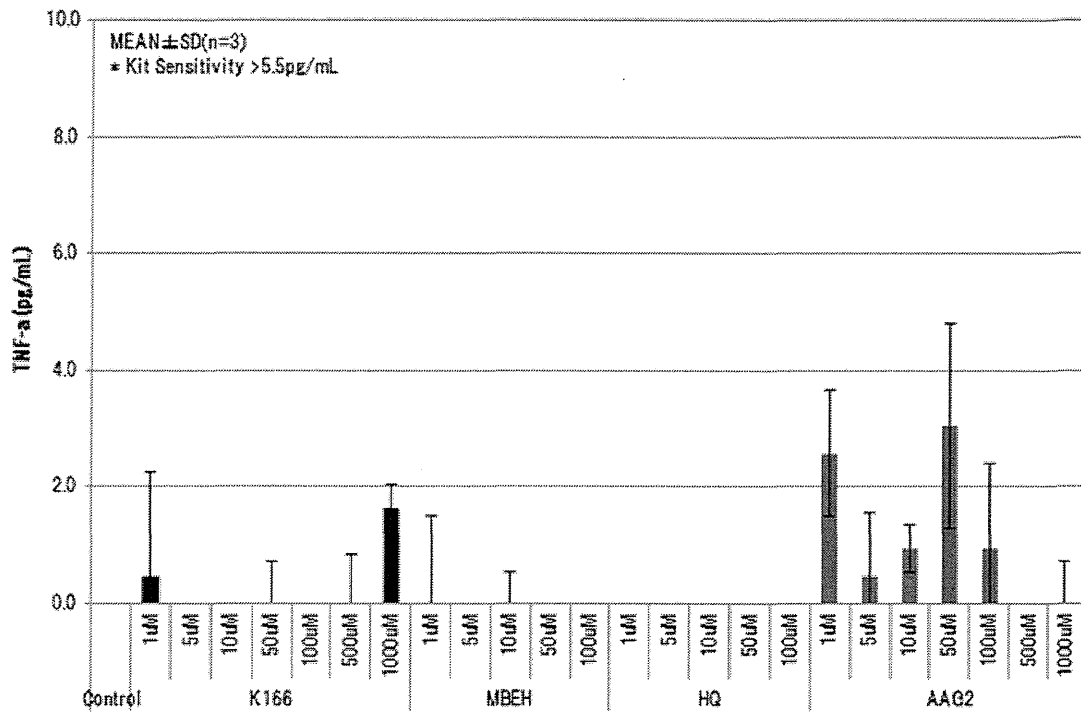


図 5. K166 の表皮角化細胞に対する TNF- α 分泌誘導能の評価

2-2-2 色素細胞チロシナーゼ依存的に生じる細胞障害性評価

2-2-2-1 チロシナーゼ活性と細胞障害性との関連性

○材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。Phenylthiourea (PTU)は、Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)製を用いた。

Stealth RNAi™ siRNA、およびトランスフェクション試薬 Lipofectamine RNAiMAX は、Life Technologies (USA) 製を用いた。

[細胞培養]

①PTUを用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイト播種し 1 % human melanocyte growth supplement (Invitrogen 製) を加えた MCDB153 培地中、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下にて培養した。翌日に PTU による前処理を開始し、1 日後、K166 を培地に添加した。K166 添加の 1 日培養後の生細胞数、タンパク量、および細胞内チロシナーゼ活性を測定した。

②RNA 干渉を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイトを播種し 1 % human melanocyte growth supplement (Invitrogen 製) を加えた MCDB153 培地中、37 °C、5 % CO₂ 雰囲気下にて培養した。翌日から 1 日間 siRNA による前処理をし、3 日後 K166 を培地に添加した。K166 添加の 1 日培養後の生細胞数および細胞内チロシナーゼ活性を測定した。

[細胞障害性測定]

細胞障害性は細胞増殖測定用試薬アラマーブルー (Alamar Bioscience, Inc 製) を用いて測定した。アラマーブルーを培地の 10 分の 1 量加え、37 °C にて 1 時間反応させた。反応後の溶液を蛍光プレートリーダーにて測定した。

[タンパク量測定]

細胞を HEPES 緩衝液で洗い、10 % トリクロロ酢酸 (TCA)、エタノール・エーテル 1:1 (体積比) で処理後、1 N NaOH/10%ジメチルスルホキシド中で 60 °C、15 分溶解させた。細胞溶解物のタンパク量を Coomassie Plus Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. 製) にて測定した。

[細胞内チロシナーゼ活性測定]

培養メラノサイトにおけるチロシナーゼ (Tyrosine hydroxylase) 活性は Oikawa の方法によって測定した⁹⁾。培養終了 24 時間前に培地に 1 μCi [³H]-チロシンを加えた。培地 500 μl に活性炭溶液を等量加えボルテックス後、遠心分離した。上清 750 μl を 500 μl の活性炭溶液に加えボルテックス後、遠心分離した。上清の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

○結果及び考察

[PTUを用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認]

チロシナーゼ活性を阻害する PTU を添加することにより、K166 による細胞障害に与える影響をみた。PTU 10 μM, 30 μM, 100 μM の処理により、濃度依存的に K166 による細胞障害を低減させた (図 1)。また PTU 10 μM, 30 μM, 100 μM の単独処理において細胞数への影響は与えない一方、濃度依存的にチロシナーゼ活性は阻害した (図 2)。

PTU 処理による K166 の細胞障害の低減はチロシナーゼ活性の阻害に伴う可能性が示された。

[RNA 干渉を用いたチロシナーゼ依存的細胞障害性の確認]

K166 による細胞障害がチロシナーゼ活性に依存的であることを明らかにするため、RNA 干渉によりチロシナーゼ遺伝子発現を抑制する実験により確かめた。Negative control siRNA 処理でみられた K166 の濃度依存的な細胞障害がチロシナーゼ siRNA 処理によりチロシナーゼ活性を抑制させることにより (図 3) K166 による細胞障害が低減された (図 4)。RNA 干渉を用いた実験において K166 による細胞障害がチロシナーゼ活性依存的であることが確認できた。

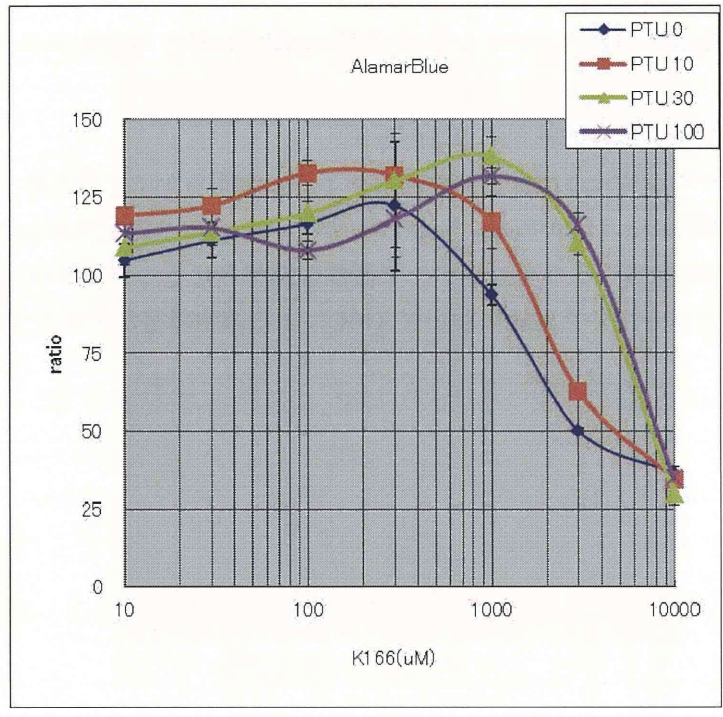


図 1 K166 の細胞障害に対する PTU の影響

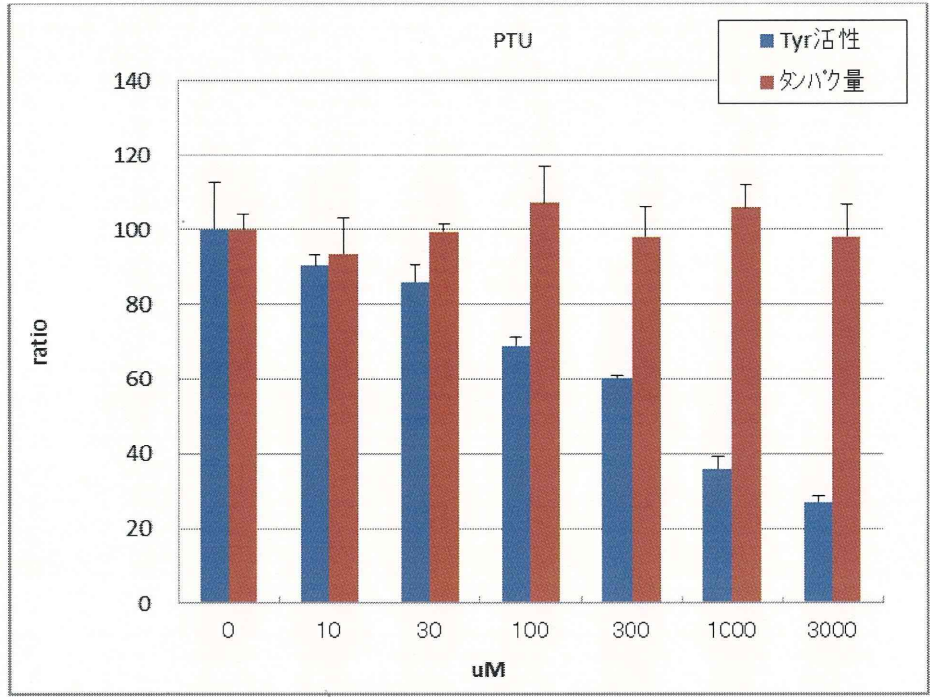


図 2 PTU のチロシナーゼ活性と細胞数への影響

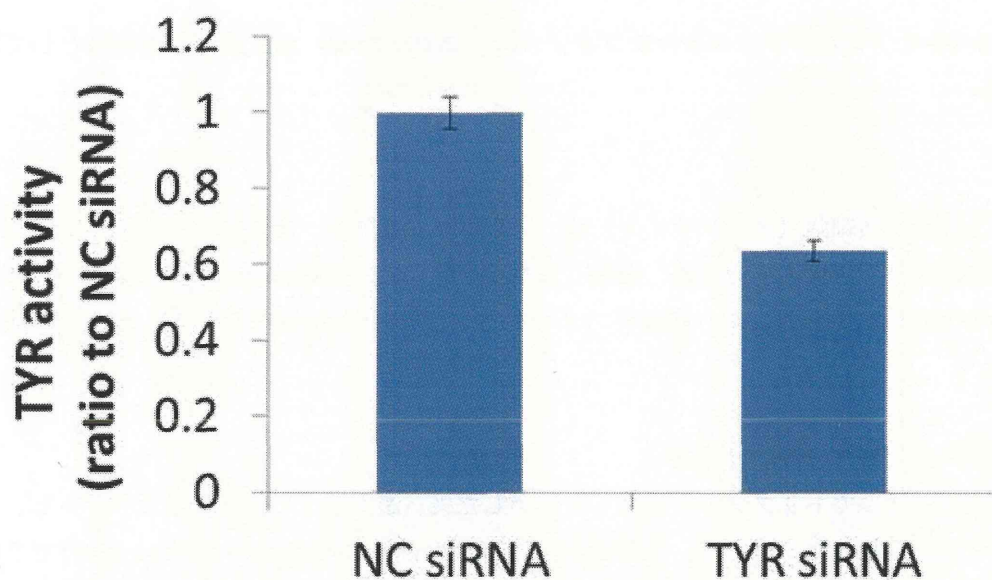


図3 RNA干渉によるチロシナーゼ活性低下の確認

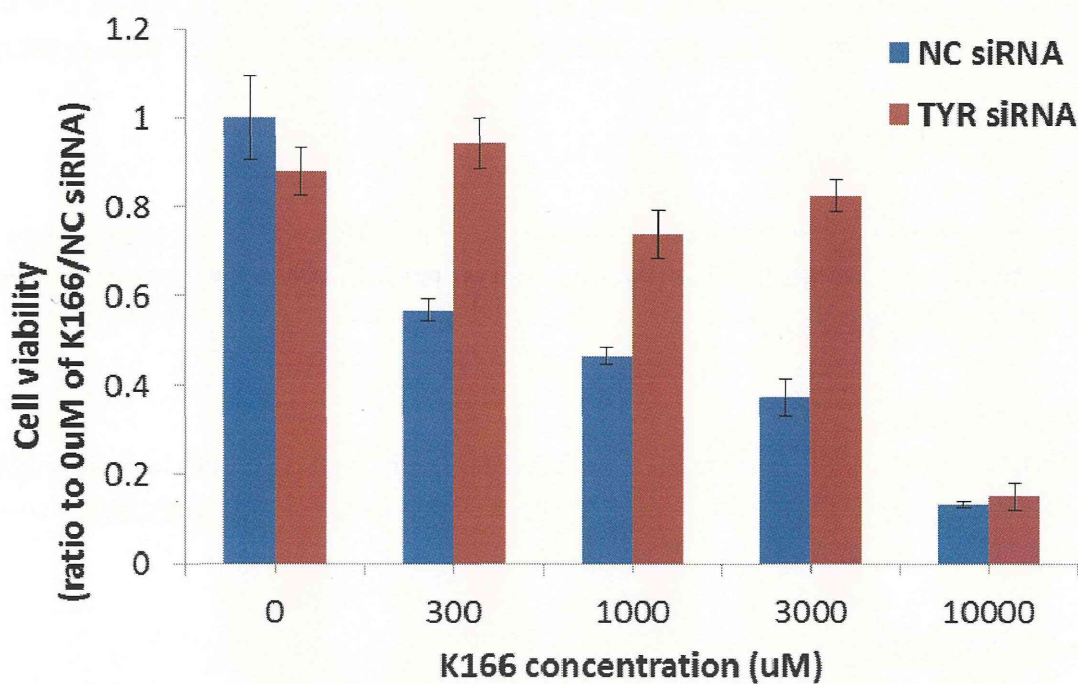


図4 RNA干渉によるチロシナーゼ活性低下の K166 チロシナーゼの細胞障害への影響

2-2-2-2 チロシナーゼ活性の個体差と細胞障害性の関連性

○材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[細胞培養]

包皮由来正常ヒト表皮色素細胞 (メラノサイト) は、クラボウより購入、あるいは、花王株式会社グループ内の研究所にて、定法に従って包皮より分離後、培養したものを用いた。細胞は Medium 254 (Life Technologies) に Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS) (クラボウ) を添加した培地中で 37°C、5% CO₂ の環境下で定法に従って培養した。

[チロシナーゼ (DOPA oxidase) 活性の計測]

メラノサイトを定法に従ってトリプシンを添加して剥がした後、顕微鏡下で細胞数をカウントし、 2×10^4 個の細胞を 1.5 mL チューブに回収した。遠心し、上清を除いた後、Phosphate Buffers Saline (PBS) で 2 度洗浄してから、再び遠心により上清を除いた細胞を準備した。あるいは、96-well plate に 1.2×10^4 個/well のメラノサイトを播種し、siRNA を添加して 2 日後の細胞について培地を除いた後、PBS で 2 度洗浄してから、再び上清を除いた細胞を準備した。それらに抽出 Buffer (0.1 M Tris-HCL (pH:7.2)、1% NP-40、0.01% SDS) を 20 μ L、Assay Buffer (4%ジメチルホルムアミド、100 mM Sodium phosphate-buffered (pH:7.1)) を 20 μ L 添加し、4°Cにて 2 時間かけて細胞を可溶化し、DOPA oxidase 活性の測定を行った。その DOPA oxidase 活性測定は、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノン ヒドラゾン (MBTH) 法を基本とした次に示す方法で行った。すなわち、可溶化した細胞溶液の各 well に、上記 Assay Buffer を 80 μ L、20.7 mM MBTH 溶液を 60 μ L、基質として 5 mM L-ジヒドロキシフェニルアラニン (L-DOPA) 溶液を 40 μ L 加え、37°Cにて 30~60 分間反応させた後に、505 nm の測定波長で吸光度を測定した。

[K166 の添加]

96-well plate にメラノサイトを 1×10^4 個/well の密度で、上述の培地から Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) を除いた培地 (PMA (-) 培地) を用いて播種し、翌日に PMA (-) 培地に希釈して K166 を添加した。4 日後、alamar blue 活性を計測した。

[Alamar blue 活性の計測]

K166 を添加して 4 日後のプレートから培地を除いた後、PMA (-) 培地で希釈した 10% alamar blue 溶液 (Bio-Rad) を 100 μ L/well 添加し、CO₂ インキュベーターにて 37°C でインキュベートした。90 分後に蛍光プレートリーダーにて励起波長 560 nm、検出波長 590 nm の蛍光を検出した。

[チロシナーゼの発現抑制]

96-well plate にメラノサイト (D6C0595) を 1.2×10^4 個/well の密度で、PMA (-) 培地を用いて播種し、翌日に siRNA 導入試薬である TransIT-TKO (Mirus Bio) を用いて添付のプロトコールに従って、25nM の Tyrosinase 特異的 siRNA (Life Technologies)、あるいは非特異的 (Control) siRNA (Life Technologies) を添加した。2 日後に DOPA oxidase 活性を計測、あるいは新たな PMA (-) 培地に希釈した K166 を添加し、その翌日に alamar blue 活性を計測した。

○結果及び考察

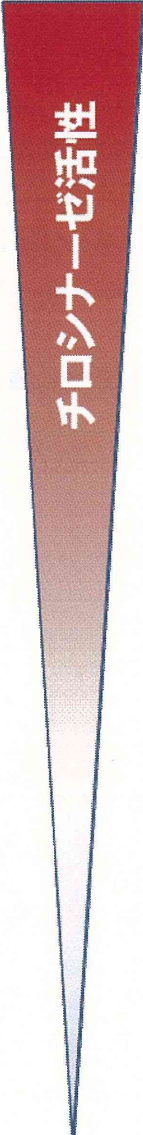
今回の実験で用いた 13 ラインのメラノサイトについて、チロシナーゼ活性の多様性を確認するため、それぞれ 1.5mL チューブに同じ細胞数のメラノサイトを準備し、DOPA oxidase 活性の計測を行った。その結果、メラノサイトのラインによってチロシナーゼ活性はさまざまであることが示された(図 1)。そこで、多様なチロシナーゼ活性を有するメラノサイトにおいて、K166 に対する細胞毒性が異なるかを明らかにするため、これら 13 ラインのメラノサイトにさまざまな濃度で K166 を添加した後、4 日後に alamar blue 活性を計測し、細胞毒性を評価した。K166 無添加の Control と比較して、alamar blue 活性の値が 50%低下する K166 の濃度(IC₅₀ 値)を算出し、その結果を表 1 に示した。この結果を基に、図 1 で示した各メラノサイトの DOPA oxidase 活性(チロシナーゼ活性)と K166 添加による alamar blue 活性の IC₅₀ 値の相関性を示したグラフを図 2 に示した。このグラフより、K166 によるメラノサイトへの細胞毒性とチロシナーゼ活性との関連性が示唆されると共に、K166 に対する毒性感受性が 2 群に分かれる可能性もまた示唆された。

次に、メラノサイトにおける K166 に対する細胞毒性がチロシナーゼ活性に依存している可能性を明確にするため、チロシナーゼ活性が高く、また K166 に対する細胞毒性が高い D6C0595 細胞を用いて、RNA 干渉によりチロシナーゼの遺伝子発現を抑制した際の K166 に対する細胞毒性の変化を検討した。細胞を播種した翌日に siRNA を添加し、さらに 2 日後に DOPA oxidase 活性を計測したところ、Control siRNA を添加した細胞と比較して、チロシナーゼ siRNA を添加した細胞で同活性が約 50%程度に低下していることを確認した(図 3)。また、これらの細胞にさまざまな濃度で K166 を添加し、その翌日 alamar blue 活性を計測した結果を図 4 に示した。チロシナーゼの発現抑制により、K166 に対する細胞毒性は顕著に低下し、K166 添加による alamar blue 活性の IC₅₀ 値は、Control siRNA 及びチロシナーゼ siRNA 添加細胞においてそれぞれ 0.052mM 及び 5.9mM であった。すなわち添加濃度で 100 倍以上の顕著な差が認められた。

これらの結果より、メラノサイトにおける K166 に対する細胞毒性はチロシナーゼ活性に強く依存することが明らかとなった。

表1 K166添加によるalamar blue活性IC50値

細胞ライン名の前に記載のD、M、Lはそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示している。細胞のDOPA oxidase活性(チロシナーゼ活性)が高い順にその値を示している。



	alamar blue 活性IC ₅₀ 値 (mM)
D 6C0595	0.405
D 5C0126	0.27
D D3C0782	0.54
L 5C0247	5.94
D AA4	0.135
M 5C0570	5.535
L CA4	6.21
L LMC P7	6.75
M 4C0760	6.48
L CA3	5.94
M 4C0465	6.21
L LC1C1022	6.345
L 1C1018	6.21

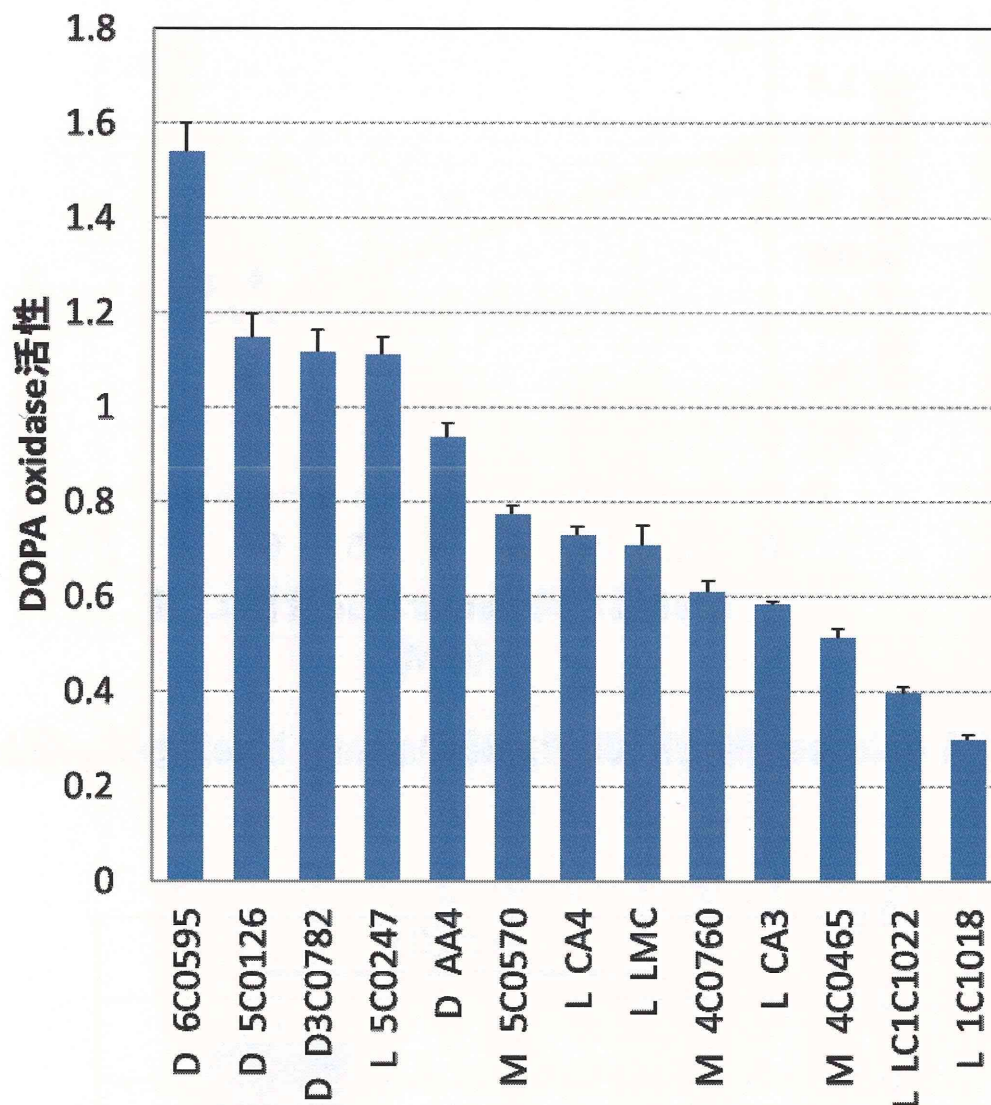


図 1 使用した 13 ラインのメラノサイトにおける DOPA oxidase 活性

細胞ライン名の前に記載の D、M、L はそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示している。

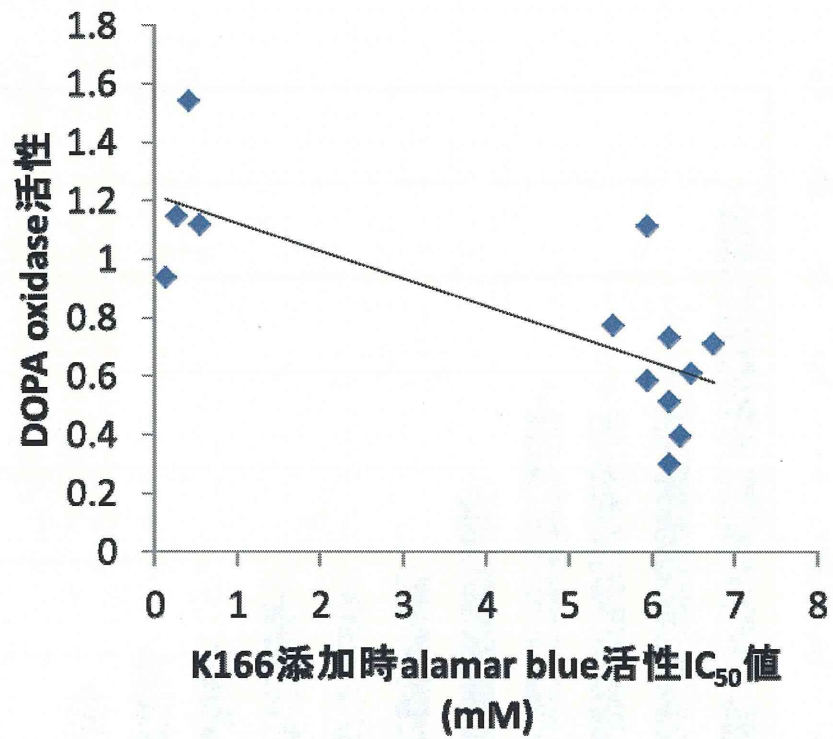


図 2 DOPA oxidase活性とK166添加時のalamar blue活性IC₅₀値との相関

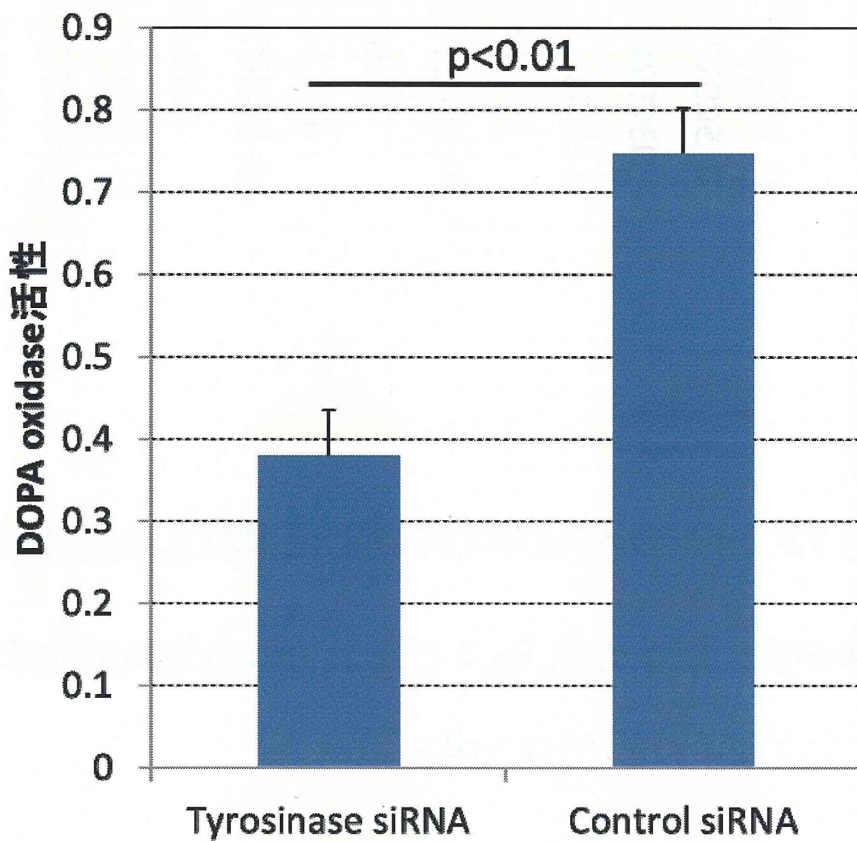


図 3 Tyrosinase発現抑制時のDOPA oxidase活性

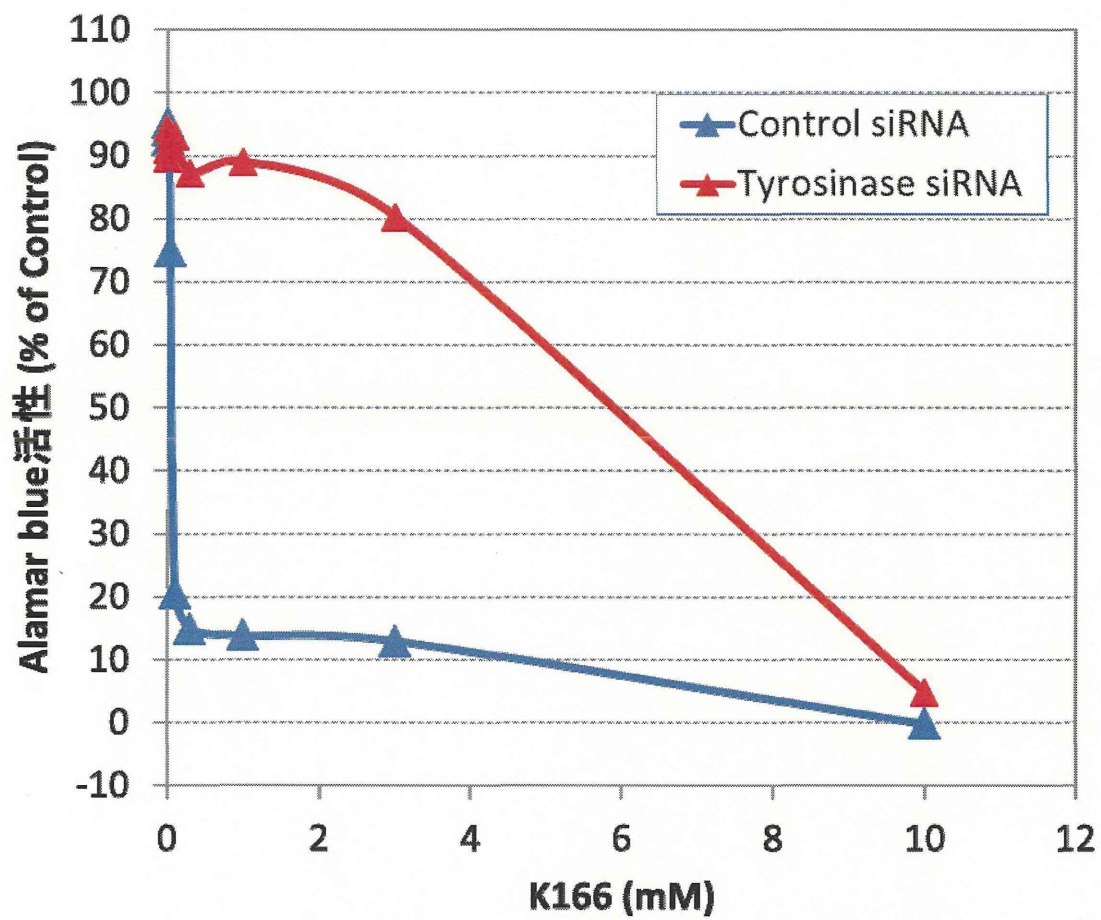


図4 Tyrosinase発現抑制時のK166添加による細胞毒性の変化

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3 ロドデノールによる細胞障害性発現メカニズムの解析

2-3-1 ロドデノール代謝物の細胞障害性の確認

○材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[細胞培養]

包皮由来正常ヒト表皮色素細胞 (メラノサイト) はクラボウより購入したものを用いた。細胞は Medium 254 (Life Technologies) に Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS) (クラボウ) を添加した培地中で 37°C、5% CO₂ の環境下で定法に従って培養した。

[K166 及び K166-OH の添加]

96-well plate にメラノサイトを 1×10^4 個/well の密度で、上述の培地から Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) を除いた培地 ((PMA (-) 培地) を用いて播種し、翌日に PMA (-) 培地に希釈して K166 または K166-OH を添加した。4 日後、amar blue 活性を計測した。

[Alamar blue 活性の計測]

化合物を添加して 4 日後のプレートから培地を除いた後、PMA (-) 培地で希釈した 10% amar blue 溶液 (Bio-Rad) を 100 μ L/well 添加し、CO₂ インキュベーターにて 37°C でインキュベートした。90 分後、蛍光プレートリーダーにて、励起波長 560 nm、検出波長 590 nm の蛍光を検出した。

○結果及び考察

K166 とチロシナーゼによる K166 の代謝物であると想定される K166-OH についてメラノサイトにおける細胞毒性を比較した。チロシナーゼ活性が比較的 low、K166 に対する細胞毒性が低い 2 ライン (L LC1C1022、M 4C0760) のメラノサイトを用い、さまざまな濃度で K166 及び K166-OH を添加した後、4 日後に amar blue 活性を計測し、それぞれの IC₅₀ 値を算出した (表 1)。いずれの細胞においても、K166 と比較して K166-OH を添加した場合に顕著な IC₅₀ 値の低下が認められた。このことから、K166 がチロシナーゼによって代謝され K166-OH が産生されることで、顕著にメラノサイトに対する細胞毒性が上昇することが示唆された。

表1 K166及びOH-K166添加によるAlamar blue活性IC₅₀値

細胞ライン名の前に記載のD、M、Lはそれぞれ由来皮膚色(D: Darkly、M: Moderately、L: Lightly)を示す。また、<0.1は0.1未満であることを示す。

	Alamar blue活性 IC ₅₀ 値	
	K166 (mM)	OH-K166 (mM)
L LC1C1022	6.6	0.19
M 4C0760	7.3	<0.1

2-3-2 活性酸素の関与の検討

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。

[材料及び方法]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称：K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。ヒト由来メラノサイトで生じる活性酸素種 (ROS) の検出には、Total ROS/Superoxide Detection kit (ENZ-51010: Enzo) を使用した。メラノサイトは 3.6×10^4 個ずつ 1% HMGS および ROS/Superoxide Detection Mix B (ENZ-51010: Enzo) を混合した modified-MCDB153HAA 培地中に播種した。培養には 15mL チューブを使用した。各チューブに K166 (30, 100, 300, 1000 μ M) を添加し、5% CO₂ 下、37°C 下で 3 時間培養した。無添加の陰性対照群、ピオシアニン (100, 500 μ M) 添加の陽性対照群も準備した。

0.1% BSA-PBS で 2 回洗浄した細胞を、フローサイトメトリー (BD FACSCalibur(TM): Becton, Dickinson and Company, CA) を用いた蛍光の測定に供した (Ex=488nm, Em=520nm)。

[結果及び考察]

ヒト由来メラノサイトを K166 処理することで生じる ROS について、フローサイトメトリーによる検出を試みた。結果を図 1 に示す。ROS 誘導試薬であるピオシアニンを添加した条件 (陽性対照) では、メラノサイトからは濃度依存的な ROS の発生が検出された。薬剤を添加しない条件 (陰性対照) では、ROS は検出されなかった。これらの結果から本実験系が成立していると判断した。K166 を添加した条件では、メラノサイトからは ROS の発生は検出されなかった。

本実験の K166 の添加濃度域において、細胞障害性の誘導を確認していることから、K166 によって誘導される細胞障害性には、ROS の関与が小さいと考えられたが、検出感度以下の ROS 寄与の可能性は除外できない。

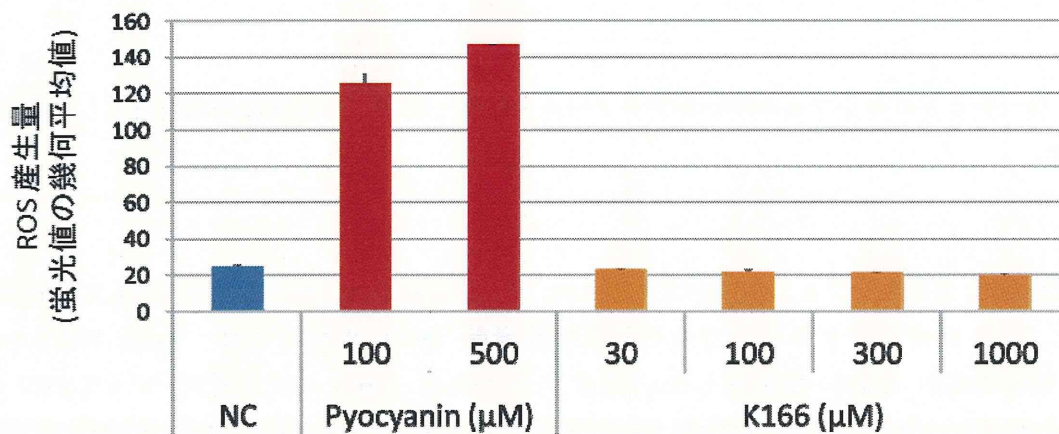


図1. K166 および K166-OH 添加培養メラノサイトにおける ROS の検出

メラノサイトは K166 または K166-OH 存在下で 3 時間培養した。細胞から発生する ROS の検出には Total ROS/Superoxide Detection kit を使用し、フローサイトメトリーで検出された細胞 10,000 個分の蛍光値の幾何平均値 (Geo-mean) を算出した。NC, 無添加陰性対照, PC, ピオシアニン添加陽性対照

2-3-3 小胞体ストレス応答の関与の検討

○材料及び方法

[試薬]

ロドデノール (4-(4-ヒドロキシフェニル)-2-ブタノール、略称: K166) は医薬部外品原料として流通されているものを用いた。Phenylthiourea (PTU)は、Sigma-Aldrich (USA)から購入した。

[細胞培養]

培養プレートに正常ヒト表皮メラノサイト (Kurabo, Japan) 播種し、翌日に PTU による前処理を開始し、1 日後、K166、および対照試薬を培地に添加した。K166 の添加の 3、および 6 時間後に回収した細胞溶解液を、それぞれタンパク質発現解析、および遺伝子発現解析に供した。

[タンパク質発現解析]

ウェスタンブロットにより、常法に従って行った。用いた抗体は、抗 p-eukaryotic Initiation Factor 2 α (eIF2 α) 抗体、抗 eIF2 α 抗体 (いずれも Cell Signaling Technology, USA) とし、いずれも 5000 倍に希釈して使用した。

[遺伝子発現解析]

Real-time PCR により、常法に従って行った。TaqMan[®] Gene Expression Assays (GAPDH, Hs99999905_m1; IL-8, Hs00174103_m1; Life Technologies, USA) をプローブとして用いた。

○結果及び考察

色素脱失を誘導する MBEH、4-tert-ブチルフェノール (4-TBP) が、酸化ストレスを介して、メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導し、その下流で Interleukin-6、および 8 の発現が促進される¹⁴⁾。今回、K166 が同様のメカニズムで色素脱失を生じる可能性があることを確認できた。

[eIF2 α タンパク質のリン酸化の K166 による誘導、およびそのチロシナーゼ活性依存性]

図 1 にウェスタンブロットにより検出した、リン酸化 eIF2 α の発現を示す。eIF2 α のリン酸化は、0.3 mM、および 1 mM の K166 処理により、濃度依存的に増加した。この結果から、K166 が培養メラノサイトにおいて小胞体ストレスを誘導していることが示された。小胞体内カルシウムを流出させることにより小胞体ストレスを誘導する Thapsigargin (TG)、および Toosi らの報告¹³⁾において小胞体ストレスを誘導することが示された Monobenzylether of hydroquinone (MBEH) によっても eIF2 α のリン酸化は誘導された。また、この eIF2 α のリン酸化誘導に与えるチロシナーゼ活性依存性を確認した。MBEH、および 0.3 mM、1 mM の K166 による eIF2 α のリン酸化は、PTU の前処理により抑制された。このことから、K166 による小胞体ストレスの誘導は、チロシナーゼ活性に依存していることが示された。チロシナーゼ非依存的に TG によって誘導された eIF2 α のリン酸化は、PTU 処理により抑制されなかった。

小胞体ストレス応答において、eIF2 α のリン酸化は、翻訳の停止により、小胞体のフォールディング機能負荷を軽減する他、転写因子 ATF4 の発現を介して、細胞の生死を左右する遺伝子発現を誘導することが知られている¹⁴⁾。従って、K166 によって誘導される小胞体ストレス応答と、メラノサイト細胞障害性との間に密接な関連があることが推察される。

[IL-8 mRNA 発現の K166 による誘導、およびそのチロシナーゼ活性依存性]

図 2 にリアルタイム PCR による IL-8 遺伝子発現解析の結果を示す。K166 は、3 mM 添加時に無添加対照と比較して 35 倍となるのを最大として、処理濃度依存的に IL-8 mRNA 発現を亢進した。10 mM の K166 による発現の亢進が、3 mM と比べて小さかったのは、強い細胞毒性のためであると考えられる。Toosi らの報告において、IL-8 の遺伝子発現は、小胞体ストレス応答の主なエフェクターの一つである転写因子 XBP1 により制御され、MBEH により誘導されることが示されている¹³⁾。この結果は、上記の eIF2 α のリン酸化に関する結果と合わせ、K166 が小胞体ストレスを誘導していることを強く示している。上記の発現誘導に与えるチロシナーゼ活性依存性を確認した。0.1 mM から 1 mM の K166 による発現誘導は、0.1 mM の PTU 前処理により抑制された。このことから、K166 により誘導される小胞体ストレス下流の応答もチロシナーゼ活性に依存していることが示された。3 mM 以上の K166 による発現は、PTU により抑制されなかったことから、チロシナーゼ活性に依存せずに誘導されたものであると考えられる。

以上は、in vivo において、K166 が局所的な免疫環境を変化させ、病態発現に関与する可能性を示す結果であると考えられる。

上記の結果から、K166 は、チロシナーゼに代謝されることにより小胞体ストレスを誘導し、メラノサイト特異的な細胞障害性に関与していることが示された。