

原因究明に関する調査研究

I. ロドデノールおよび類似化学物質によるメラノサイト傷害に関する調査研究

研究分担者 最上(西巻)知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

研究要旨

ロドデノールの皮膚メラノサイト傷害の機序について、チロシナーゼによる代謝と毒性増強に着目し、文献調査ならびに検証を行った。ロドデノールは培養メラノサイトに対しチロシナーゼ活性に依存する毒性を発揮すること、白斑誘導性の類似化合物と同様に、ロドデノールはチロシナーゼにより反応性の高いオルトキノン体へと代謝され、グルタチオン等のSH基と反応するとともにタンパクを修飾することが報告されている。加えて本研究班では、アスコルビン酸の添加によりオルトキノン体の生成を防ぐと細胞毒性が低減される結果を得ており、オルトキノン体が細胞毒性に関与することが間接的に示唆された。一方、メラノサイトやメラノーマ細胞のロドデノール感受性は細胞により大きく異なっており、毒性発現機序の解明と新規美白剤の安全性評価には、適切な細胞試験系の構築が必要と考えられる。

A. 研究目的

ロドデノールの皮膚メラノサイト傷害の機序について、チロシナーゼによる代謝と、チロシナーゼ活性に依存した毒性発現が報告されている。白斑発症との関連について、白斑誘導性 4-置換フェノール類の文献調査を行った。また、メラノーマ細胞を用いて毒性発現について検証した。

B. 研究方法

ロドデノールや白斑誘導性の類似化合物によるメラノサイト選択的毒性とその機序について、文献調査を行った。マウスやヒトのメラノーマ細胞、正常ヒトメラノサイト等を用い、毒性発現とチロシナーゼの関与を検討した。

ヒトメラノーマ細胞 HMV-II、マウス B16 melanoma, B16melanoma 4A5 細胞は、理化学研究所 BRC セルバンクより入手した。細胞は播種 24 時間後に薬物処理を行い、48 時間後に ATP 含量を測定し、細胞生存率を決定した。細胞内 ATP 含量は CellTiter-Glo

Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)を用い、化学発光の増加により測定した。

チロシナーゼの阻害には、フェニルチオウレア (PTU)を 100 μ M 添加した。あるいはチロシナーゼを特異的 siRNA (Stealth™ Select RNAi, Invitrogen, #1~#3)を用いてノックダウンした。ノックダウン効率は、細胞より総 RNA を抽出し、チロシナーゼ mRNA をリアルタイム PCR で測定し、判定した。

C. 研究結果

1. ロドデノールならびに白斑誘導性 4-置換フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化

パラ位に脂肪族/芳香族側鎖を持つフェノール/カテコール類は、ヒトや実験動物で白斑を誘導する代表的な化学物質として分類され (Cummings and Nordlund, 1995; Boissy and Manga, 2004)、職業的白斑を起こす 4-tert ブチルフェノール(4-TBP)やヒドロキノンモノベンジルエーテル(MBEH)、抗メラノーマ薬候補 4S-システアミルフェノール(4S-CAP)や

その誘導体 NAc-4SCAP や NPr-4-SCAP は、メラノーマ細胞や皮膚のメラノサイトに選択的毒性を發揮することが報告されている(表 1)。これらは抗メラノーマ薬候補として研究が進められ、黒色マウスに、4-SCAP は 3 週、NPr-4-SCAP は 10 日皮下注射すると、毛包メラノサイトの消失と毛色の脱色が生じることが報告されている(Ito & Jimbow 1987; Tandon et al, 1998)。また、黒色モルモットに 5%4-SCAP エマルジョンを 4 週間塗布すると皮膚メラノサイトの減少が観察されている(Ito et al, 1987)。

ロドデノールの代謝に関しては、昨年度カネボウ化粧品より提供された非臨床試験に関する報告書に引き続き、同グループより(Sasaki et al, 2014)、ならびに別グループより(Ito et al, 2014)、それぞれ論文が刊行された。ロドデノールはこれらの白斑誘導性 4-置換フェノール類と同様に、チロシナーゼにより代謝されてオルトキノン体に活性化され、システインやグルタチオンなどの SH 化合物に付加反応すること(図 1)(Ito et al, 2014a)、オルトキノンへの代謝活性化はヒトチロシナーゼを用いても効率的に進行し(Ito et al, 2014b)、タンパクを修飾することが報告されている(Ito et al, 2015)。4SCAP やその誘導体 NAc-4SCAP や NPr-4SCAP もオルトキノン体に代謝されて SH 基に付加する(Hasegawa et al, 1997; Ito S et al, 2012)。生成するオルトキノン体は活性酸素種 ROS 産生を介して毒性発現に関わる可能性が推定されている(Ito et al, 2014a)。

オルトキノン体は極めて不安定であるが、本研究班において協力研究者秋山は、アスコルビン酸共存下でチロシナーゼ反応を行うとロドデノールカテコール体まで還元されること、アスコルビン酸添加でオルトキノン体への酸化を防ぐと、細胞毒性が減弱することを見いだした(分担研究報告書 II)。

2. ロドデノールならびに白斑誘導性 4-置換フェノール類によるメラノサイト傷害 - チロシナーゼによる代謝の役割

ロドデノールは、メラノサイトやメラノーマ細胞に対してチロシナーゼ活性に依存する毒性を示すことが報告され(表 1)、「チロシナーゼによる細胞毒性の増

強」がメラノサイト選択的傷害性を介して白斑発症と強く関わる可能性が推定される。抗メラノーマ作用を示す 4-SCAP やその誘導体 NAc-4-SCAP や NPr-4-SCAP は、メラニン生合成の活発なメラノーマ細胞に、より強い毒性を示す(Prezioso et al, 1992; Yamada et al, 1991; Ishii-Osai et al, 2012)。最も強力な毒性を示す 4-SCAP ではチロシナーゼ依存性が認められず、毒性発現には monoamine oxidase による代謝や選択的取り込みが重要と考えられていた(Ito S et al, 1990)。一方、前述したように 4-SCAP の皮下注射で C57BL マウスの毛包メラノサイトは減少するが、チロシナーゼ活性を欠くアルビノマウスのメラノサイトやケラチノサイトは影響されず、in vivo ではメラノサイト毒性の発現にチロシナーゼが必要であることが示唆されている(Ito & Jimbow, 1987)。4-SCAP の殺傷作用は catalase 添加で抑制され(Yamada et al, 1989)、NPr-4-SCAP の毒性は ROS 産生を伴うことから(Ishii-Osai et al, 2012)、酸化ストレスを介する機序が示唆される。

一方、4-TBP や MBEH については、チロシナーゼ依存性は認められていない(表 1)。ヒトメラノサイトは細胞ロットによりロドデノール感受性に大きな差があることが報告されている(Kasamatsu et al, 2014)。

本研究班で検証を試みたが、高感受性メラノサイトは入手できなかった。そこでメラノーマ細胞の利用を検討したが、ヒトHMV-II、マウスB16 メラノーマ、B16 4A5 細胞の感受性は高くは無く(図 2)、HMV-II ではチロシナーゼ依存性は阻害剤・siRNA ノックダウンのどちらによっても認められなかった(図 3)。したがって、適切な細胞系を用いての化合物間の比較検討が必要と考えられる。

4-TBP や MBEH では、メラノサイトへの直接作用に加えて、免疫応答の誘導も白斑形成に寄与すると考えられている。MBEH 塗布部では細胞傷害性 T 細胞の浸潤(Becher and Sharama, 2011)、ランゲルハンス細胞の浸潤(Hariharan et al, 2011)、MBEH 暴露メラノーマ細胞による T 細胞応答の活性化が in vitro で示されており(van den Boorn et al, 2011)、メラノサ

イトが特異的に攻撃される自己免疫応答が示唆されている。また、メラノーマ細胞を移植したマウスを NPr-4-SCAP で治療すると、メラノーマを再移植しても増殖が抑制された。増殖抑制は細胞傷害性 T 細胞を介しており、また同時に尋常性白斑様の脱色素が生じたことから、メラノーマ/メラノサイトへの自己免疫誘導が支持されている (Ishii-Osai *et al*, 2012)。

ロドデノールの場合も 4-TBP や MBEH と同様にチロシナーゼ代謝によりタンパク結合能を獲得しており、ハプテン抗原形成の可能性が示された (Ito *et al*, 2015)。また、4-TBP や MBEH と同様に免疫増強につながる小胞体ストレス応答誘導が報告されている (Sasaki *et al*, 2014) (表 1)。

D. 考察

1. チロシナーゼによる代謝活性化の役割

ロドデノール、ならびに職業的白斑を起こす 4-TBP や MBEH、抗メラノーマ薬候補 4-SCAP 誘導体などの 4-(アルキル/アリル)置換フェノール類は、チロシンに類似した構造を有し、チロシンと同様にチロシナーゼにより代謝されてオルトキノンを生じることが報告されている (表 1)。生成するオルトキノンは、活性酸素種 ROS の産生に関わり、グルタチオンとの反応等による細胞内レドックスバランスの変化、タンパク修飾により、直接または間接的に毒性発現に関わる可能性が示唆されている。本研究班では実際に、アスコルビン酸の共存下ではロドデノールカテコール体の毒性が減弱する知見を得ている (分担研究報告書 II)。アスコルビン酸はオルトキノンをカテコール体に還元していることから、細胞毒性はオルトキノンを引き起こしていることが間接的に示唆された。またアスコルビン酸添加法は、オルトキノンのように化学的に不安定な代謝酸化物の細胞活性への寄与を調べるためには有用な方法と考えられた。

2. メラノサイト傷害と免疫誘導の可能性

活性代謝物オルトキノンの生成は、細胞毒性の

直接の増強、あるいは免疫応答を介して、白斑発症に強く関与することが推定される。そのメカニズムの解明には、感受性が高く、入手の容易な細胞系が必要となる。ヒトメラノサイトはロット間の差 (個人差) が大きいことから、その代替かつ安定に供給される細胞として、メラノーマ細胞が注目される。今後、ロドデノールや 4-置換フェノール類に対する感受性、チロシナーゼによる代謝活性化等の能力を比較検討し、適切な細胞系を選択する必要がある。白斑発症に強く関連する因子を明らかにし、その評価系が確立できれば、チロシナーゼによる代謝活性化測定法の確立とともに、美白剤の安全性評価法の策定に貢献できると考えられる。

4-TBP や MBEH、NPr-4SCAP はメラノサイトへの直接作用に加えて、免疫応答の誘導も白斑形成に寄与することが知られている。ロドデノールは動物の皮膚感作性試験では概ね陰性と報告されたが、チロシナーゼ代謝によりタンパクとの結合能を獲得することが報告され (Ito *et al*, 2015)、ハプテン抗原形成の可能性が示された。傷害メラノサイトに対する自己免疫を含め、ロドデノールによる免疫誘導について、今後の解明が必要と考えられる。

E. 結論

ロドデノールのメラノサイトへの毒性はチロシナーゼ活性に依存し、白斑誘導性の 4-置換フェノール類と同様に、チロシナーゼにより代謝されて SH 付加反応性のオルトキノンを転換されることが毒性の要因と推定されていた。本研究班では、アスコルビン酸の添加によりオルトキノンの生成を防ぐと細胞毒性が低減される知見を得た。一方、メラノサイトの感受性には細胞間で大きな差が見られた。

[引用文献]

- Cummings MP, Nordlund JJ. *Am J of Contact Dermatitis* 1995; 6: 122-7
Becker JC, Schrama D. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1185-7.

- Boissy RE, Manga P. *Pigment Cell Res.* 2004 ; 17: 208-14
- Hariharan V, Toole T, Klarquist J, Mosenson J, Longley BJ, Le Poole IC. *Melanoma Res* 2011; 21: 115-26.
- Hasegawa K, Ito S, Inoue S, Wakamatsu K, Ozeki H, Ishiguro I. *Biochem Pharmacol.* 1997 ; 53: 1435-44
- Inoue S, Ito S, Wakamatsu K, Jimbow K, Fujita K. *Biochem Pharmacol.* 1990 ;39:1077-83
- Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K. *J Dermatol Sci.* 2012; 67: 51-60.
- Ito S, Nishigaki A, Ishii-Osai Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Nakayama E, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:646-53
- Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:744-53.
- Ito S, Gerwat W, Kolbe L, Yamashita T, Ojika M, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:1149-53.
- Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015
- Ito Y, Jimbow K. *Cancer Res.* 1987;47:3278-84.
- Ito Y, Jimbow K, Ito S. *J Invest Dermatol.* 1987; 88: 77-82.
- Ito Y, Jimbow K, Ito S. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 77-82
- Prezioso JA, Epperly MW, Wang N, Bloomer WD. *Cancer Lett.* 1992;63:73-9.
- Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K, Inoue S. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:754-63.
- Tandon M, Thomas PD, Shokravi M, Singh S, Samra S, Chang D, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55: 2023-9
- van den Boorn JG, Picavet DI, van Swieten PF, van Veen HA, Konijnenberg D, van Veelen PA, van Capel T, Jong EC, Reits EA, Drijfhout JW, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *J Invest Dermatol.* 2011; 131:1240-51
- Yamada I, Seki S, Ito S, Suzuki S, Matsubara O, Kasuga T. *Br J Cancer.* 1991 ;63:187-90.
- Yamada K, Jimbow K, Engelhardt R, Ito S. *Biochem Pharmacol.* 1989 ;38:2217-21.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

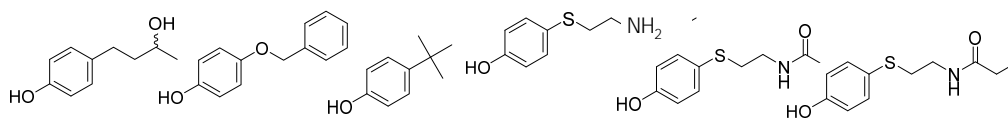
2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

表1. 白斑誘導性4-置換フェノール類の細胞毒性・代謝・細胞応答 (文献情報)



	RD	MBEH	4-TBP	4-SCAP	NAC-4-SCAP	NPr-4-SCAP
細胞毒性						
メラノサイト/メラノーマ 選択性	Ref 1,2	Ref 8,9	Ref 8,9	Ref 15,-17		Ref 20
メラニン合成系と関連		× Ref 9	Ref 9,13	Ref 16	Ref 15	Ref 20
チロシナーゼ依存性	Ref 3,4	× Ref 11	× Ref 8	× Ref 18,		
チロシナーゼによる代謝	Ref 4-6	Ref 10,11	Ref14	Ref 19		Ref 21
SH付加体形成	Ref 5-7	Ref 10,11	Ref14	Ref 19		Ref 21
ROS産生	× Ref 3	Ref 11	Ref13			Ref 20
メラノサイト抗原放出		Ref 11				
小胞体ストレス	Ref 3	Ref 12	Ref 12			
IL6産生		Ref 12	Ref 12			
IL8産生	Ref 3	Ref 12	Ref 12			

References

- 1 報告書：ロドデノール配合化粧品の使用による白斑様症状の病態形成メカニズムに関する研究（カネボウ株式会社 平成 26 年 3 月）
- 2 Kuroda Y, Takahashi Y, Sakaguchi H, Matsunaga K, Suzuki T. *J Toxicol Sci.* 2014; 39: 615-23.
- 3 Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, Suzuki T, Matsunaga K, Inoue S. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:754-63.
- 4 Kasamatsu S, Hachiya A, Nakamura S, Yasuda Y, Fujimori T, Takano K, Moriwaki S, Hase T, Suzuki T, Matsunaga K. *J Dermatol Sci.* 2014; 76: 16-24
- 5 Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27: 744-53.
- 6 Ito S, Gerwat W, Kolbe L, Yamashita T, Ojika M, Wakamatsu K. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27:1149-53.
- 7 Ito S, Okura M, Nakanishi Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 in press
- 8 Yang F, Sarangarajan R, Le Poole IC, Medrano EE, Boissy RE. *J Invest Dermatol.* 2000; 114:157-64
- 9 Hariharan V, Klarquist J, Reust MJ, Koshoffer A, McKee MD, Boissy RE, Le Poole IC. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 211-20
- 10 Manini P, Napolitano A, Westerhof W, Riley PA, d'Ischia M. *Chem Res Toxicol.* 2009; 22:1398-405
- 11 van den Boorn JG, Picavet DI, van Swieten PF, van Veen HA, Konijnenberg D, van Veelen PA, van Capel T, Jong EC, Reits EA, Drijfhout JW, Bos JD, Melief CJ, Luiten RM. *J Invest Dermatol.* 2011; 131:1240-51
- 12 Toosi S, Orlov SJ, Manga P. *J Invest Dermatol* 2012 ; 132:2601-9
- 13 Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. *Am J Pathol.* 2006;169:1652-62
- 14 Thörneby-Andersson K, Sterner O, Hansson C. *Pigment Cell Res* 2000 ; 13:33-8.
- 15 Prezioso JA, Epperly MW, Wang N, Bloomer WD. *Cancer Lett.* 1992;63:73-9.
- 16 Yamada I, Seki S, Ito S, Suzuki S, Matsubara O, Kasuga T. *Br J Cancer.* 1991 ;63:187-90.
- 17 Yamada K, Jimbow K, Engelhardt R, Ito S. *Biochem Pharmacol.* 1989 ;38:2217-21
- 18 Inoue S, Ito S, Wakamatsu K, Jimbow K, Fujita K. *Biochem Pharmacol.* 1990;39: 1077-83
- 19 Hasegawa K, Ito S, Inoue S, Wakamatsu K, Ozeki H, Ishiguro I. *Biochem Pharmacol.* 1997 ; 53: 1435- 44;
- 20 Ito S, Nishigaki A, Ishii-Osai Y, Ojika M, Wakamatsu K, Yamashita T, Tamura Y, Ito A, Honda H, Nakayama E, Jimbow K. *Biochem Pharmacol.* 2012;84:646-53
- 21 Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, Sato N, Ito A, Honda H, Wakamatsu K, Ito S, Nakayama E, Okura M, Jimbow K. *J Dermatol Sci.* 2012;67:51-60

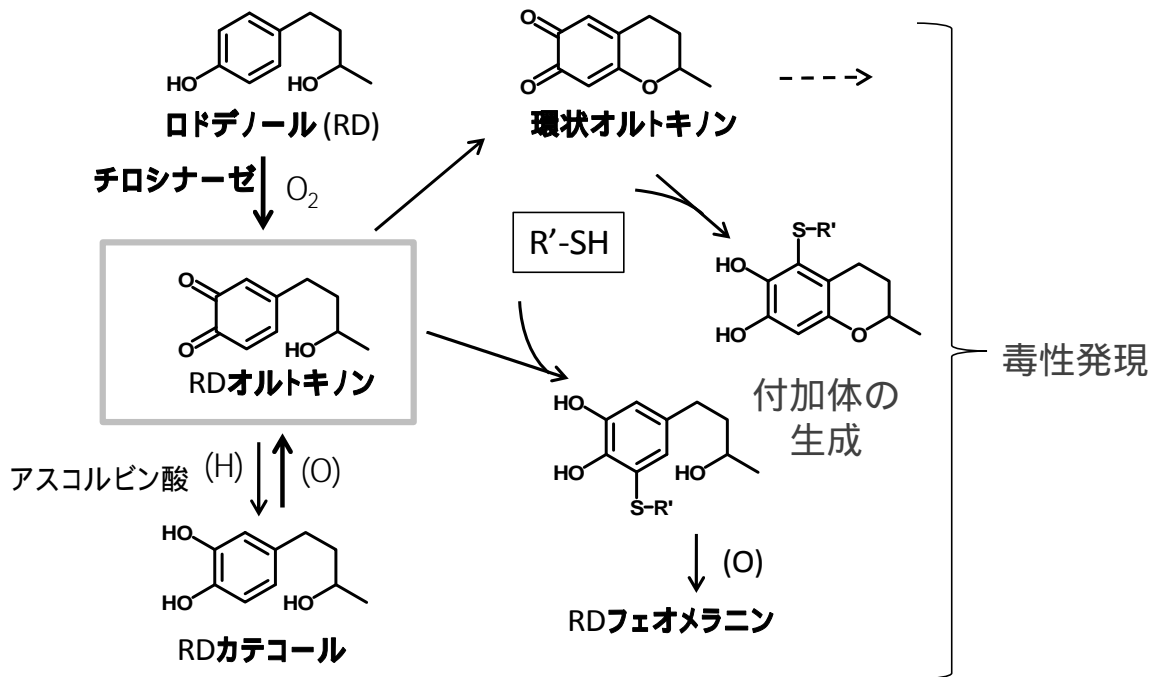


図1. ロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化

ロドデノールはチロシナーゼにより、オルトキノン体に代謝される。オルトキノン体は反応性が高く、環化、 H_2O 付加するほか、システイン・グルタチオンやタンパクのSH基に付加反応する。システインが付加すると、フェオメラニン様の色素が生成することになる。これらの代謝物は活性酸素種の生成を介して、毒性を発揮すると推定される。(Ito et al, Pigment cell Mel Res, 2014a; Ito et al, ibid 2014b; Ito et al, ibid 2015)

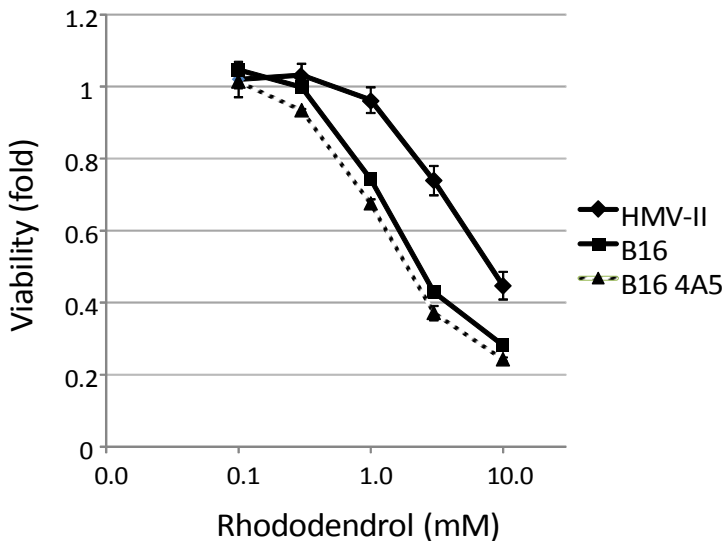


図2. 各種メラノーマ細胞の生存率に及ぼすロドデノールの影響

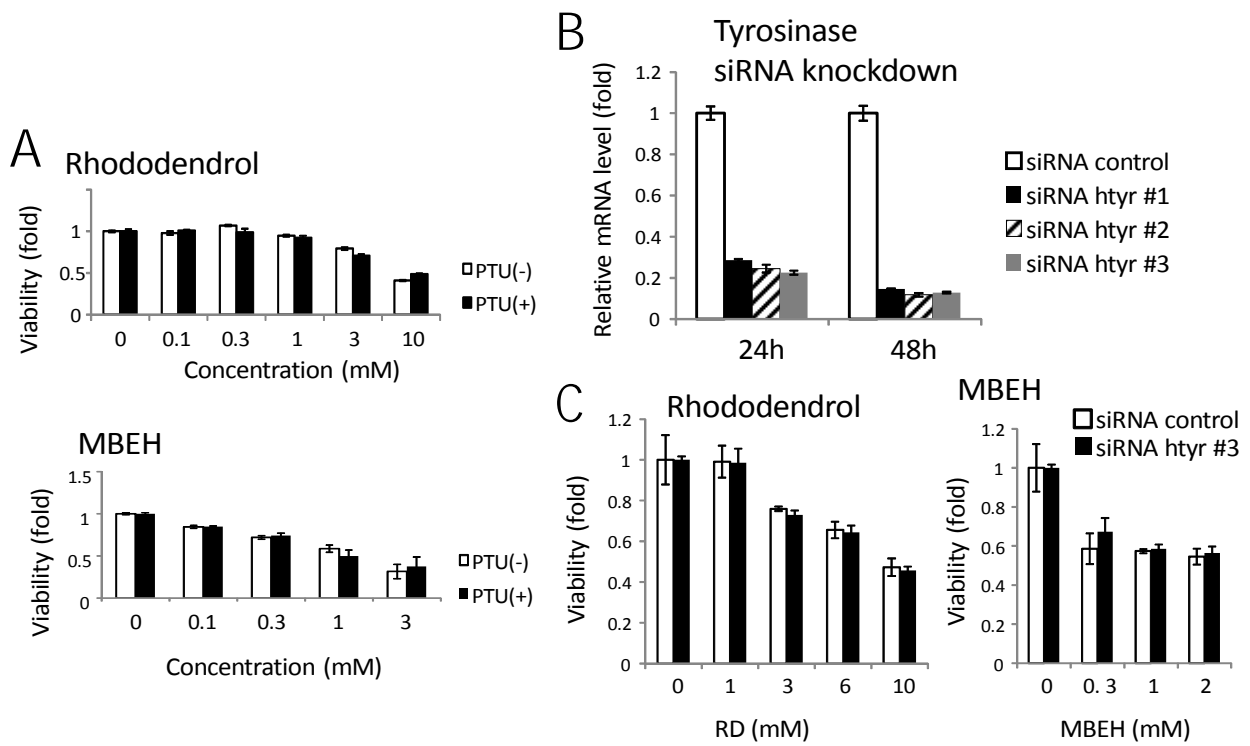


図3.メラノーマHMV-II細胞におけるロドデノールおよびMBEH細胞毒性に及ぼすチロシナーゼ阻害剤・siRNAノックダウンの影響

A.ロドデノール・MBEH 48時間処理の細胞生存率、チロシナーゼ阻害剤PTU(100 μ M), B. siRNAによるチロシナーゼのノックダウン効果。C. ロドデノール・MBEH48時間処理の細胞生存率 24時間前にチロシナーゼsiRNA#3処理