

基礎からの原因究明と安全性評価法の構築(I)

研究分担者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

研究要旨:

ロドデノールによる白斑発症機序の解明と新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざし、細胞を用いた評価方法の検討を行った。ロドデノールを含む白斑誘導性フェノール類に共通するメラノサイト傷害応答には、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化とそれによる毒性発現の関与が想定されている。ヒトメラノサイトは個体差が大きいことから代替としてメラノーマ細胞を利用し、チロシナーゼ発現誘導・siRNA ノックダウン・阻害によりチロシナーゼ依存性の細胞毒性を検討した。またヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を調製し検討を進めた。有用な評価系の確立には、さらなる条件の至適化や、細胞毒性以外の評価指標の設定が必要と考えられる。

A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症の原因に関しては、平成 25-26 年度の厚生労働科学研究(「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」(研究代表者:川西 徹)で検討がなされたほか、複数の研究組織から、白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失や、ロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性の増強が論文発表されている。白斑の誘導にはロドデノールの代謝とメラノサイトの傷害/応答の関与が強く示唆されるが、様々な由来のメラノサイトはロドデノールに対する感受性に大きな差異があることが報告されている。したがって、白斑発症にはさらなる因子の存在が示唆されるとともに、新規美白剤の安全性評価には、適切な細胞系と評価指標が必要と考えられる。本研究では、メラノーマ細胞や遺伝子導入細胞を利用し、ロドデノール類似構造の白斑誘導性化合物に共通の応答を検出することにより、安全性評価の方法を検討する。

B. 研究方法

ロドデノールや白斑誘導性の類似化合物について、メラノーマ細胞における毒性発現とチロシナーゼの関与を検討した。マウス B16 メラノーマ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、72 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、薬物処理 20 時間前よりフェニルチオウレア(PTU)を 100 μ M 培地に添加した。チロシナーゼ発現誘導については、細胞播種 24 時間後に(薬物処理と同時に)diBi-cAMP 200 μ M で処理した。チロシナーゼ特異的 siRNA (Stealth™ Select RNAi, Invitrogen, #1 ~ #3)はトランスフェクションの 24 時間後に薬物処理を開始した。チロシナーゼノックダウン効率および発現誘導は、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。

ヒトチロシナーゼ遺伝子(NM_000372)は cDNA ORF を CMV プロモーター誘導型発現ベクターに組み込み、HEK293T 細胞に一過性に発現させた。

薬物処理は遺伝子導入 24 時間後に行い、24 および 48 時間後の細胞生存率を測定した。

C. 研究結果

1. B16 メラノーマ細胞を用いた細胞毒性評価

パラ位(4 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化合物の代表例とされている (Cummings and Nordlund, 1995; Boissy and Manga, 2004)。このクラスに属する化合物である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発揮することが報告されている。ロドデノール(ロドデノール)の化学構造もこのクラスに含まれる。これらの白斑誘導性フェノール類は、共通してチロシナーゼにより代謝を受け、毒性の高いオルトキノン体を生じることが報告されている。

前期研究班では昨年度、ロドデノールに高感受性を示すメラノサイトの入手が困難なことから、メラノーマ細胞ヒト HMV-II、マウス B16 メラノーマ、B16 4A5 細胞の利用を試みた。ヒト HMV-II はロドデノールへの感受性は高くは無く、ロドデノールの細胞毒性において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。

今年度はロドデノールに比較的感受性の高いマウス B16 メラノーマ細胞を用いて検討を行った。ロドデノール、MBEH、4-TBP による細胞毒性について、siRNA を用いたチロシナーゼノックダウンの影響を検討したところ、三種類の siRNA に共通した影響は認められず、これらの化合物による細胞毒性にチロシナーゼ依存性は無いと判断した (図 1)。一部の毒性の siRNA#2・#3 による抑制は、オフターゲット効果と推定される。

引き続き B16 細胞をチロシナーゼ阻害剤フェニルチオウレア(PTU)100 μ M で処理 (図 2A)、あるいは diBi-cAMP 200 μ M で処理しチロシナーゼ発現を誘導したが (図 2B)、チロシナーゼの増減はロドデノールの細胞毒性発現に影響しなかった。したがって、B16 メラノーマ細胞でのロドデノール、MBEH、4-TBP の細胞毒性には、チロシナーゼ依存性は認められないと結論される。

2. ヒトチロシナーゼ発現 HEK293T 細胞を用いた細胞毒性評価

チロシナーゼがより高レベルで発現する細胞を用いて白斑誘導性化合物の評価を試みるために、HEK293T 細胞にヒトチロシナーゼ遺伝子を一過性に発現させた。チロシナーゼタンパクの発現はウェスタンプロットにより (図 3A)、チロシナーゼ活性は DOPA oxidase 活性を測定して確認した (図 3B)。

ヒトチロシナーゼ遺伝子導入 24 時間後に 4-SCAP を細胞培地に添加したところ、4-SCAP の細胞毒性は濃度に応じ、さらにチロシナーゼ遺伝子量に応じて増強されることが確認された (図 3C)。しかしながら遺伝子導入後 72 時間には、コントロール細胞においても遺伝子量に応じた生細胞数の低下が認められた。

チロシナーゼを強制発現することにより、細胞の増殖や生存に必須のチロシンが欠乏した可能性が考えられることから、通常約 0.4mM のチロシンを含む DMEM 培地に 1mM のチロシンを追加した。すると、チロシン添加により、チロシナーゼ発現コントロール細胞においても 24 時間後には生細胞数が著しく低下し、48 時間後においても低下した生細胞数の回復は無かった。したがって、チロシナーゼの強制発現により、チロシンが毒性代謝物に転換されたと推定される。

D. 考察

これまでの多くの報告から、ロドデノールをはじめとする 4-アルキル/アリルフェノール類による白斑

の発症には、チロシナーゼによる代謝活性化とそれによるメラノサイト特異的な傷害/応答の関与が強く示唆される。しかしながら様々な由来のメラノサイトはロドデノール感受性に大きな差異があることから、本研究では白斑誘導性化合物の評価に適切な細胞モデルを構築することを目的に検討を行った。

ヒトメラノサイトを代替し、かつ安定供給可能な細胞としてメラノーマ細胞に着目して検討を行った。B16メラノーマ細胞はロドデノール、MBEH、4-TBPに明確な感受性を示し、再現性良く細胞生存率が低下したものの、内在性のチロシナーゼ発現をcAMPで誘導、あるいは阻害剤処理やsiRNAを用いたチロシナーゼノックダウンを行っても、これら化合物の毒性発現は増強も抑制もされなかった。昨年度のHMV-IIおよびB16 4A5に引き続き、検討したメラノーマ細胞では、ロドデノールの細胞毒性発現の上でチロシナーゼによる代謝が決定的な段階では無いことが示唆される。チロシナーゼ代謝物オルトキノン体の毒性発現にはROS産生やSHプールの減少・タンパク修飾などが、毒性防御には細胞内のレドックス系やグルタチオンプール等に関わることが予測され、両システムのバランスが細胞による応答の違いをもたらすと推定される。

そこでヒトチロシナーゼを高レベルで発現する293T細胞を調製し、試験化合物の毒性発現におけるチロシナーゼの役割の検討を試みた。チロシナーゼ導入量に応じて4-SCAPの細胞毒性は増強されたが、チロシナーゼ発現72時間後にはコントロール細胞においても生細胞数が激減した。培地へのチロシン添加により24時間時点でも生細胞数が低下することから、チロシンがチロシナーゼでオルトキノン体であるDOPAキノンに代謝され、毒性を発現したことが推定される。

メラノサイトなどメラニン産生細胞では内因性チロシンの毒性は発現しない。そこで引き続きヒトチ

ロシナーゼ強制発現細胞に、メラニン合成下流遺伝子あるいは酸化ストレス防御系遺伝子の共発現を試みるなど改良を進め、高感受性メラノサイトの代替となる細胞モデルの調製を試みる予定である。また平行して細胞毒性以外のエンドポイントの選定、あるいは無細胞系での代謝物の追跡等の検討が必要と考えられる。

E. 結論

白斑誘導性フェノール類の細胞毒性/応答を評価するために、メラノサイト代替細胞の検討を行った。B16メラノーマ細胞では毒性にチロシナーゼ依存性は認められず、ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を調製して解析を進めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

最上(西巻)知子. 化学物質による白斑 - 職業性白斑の機序とロドデノール白斑 - . *Bull Natl Inst Health Sci.* 2015; 133, 13-20

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

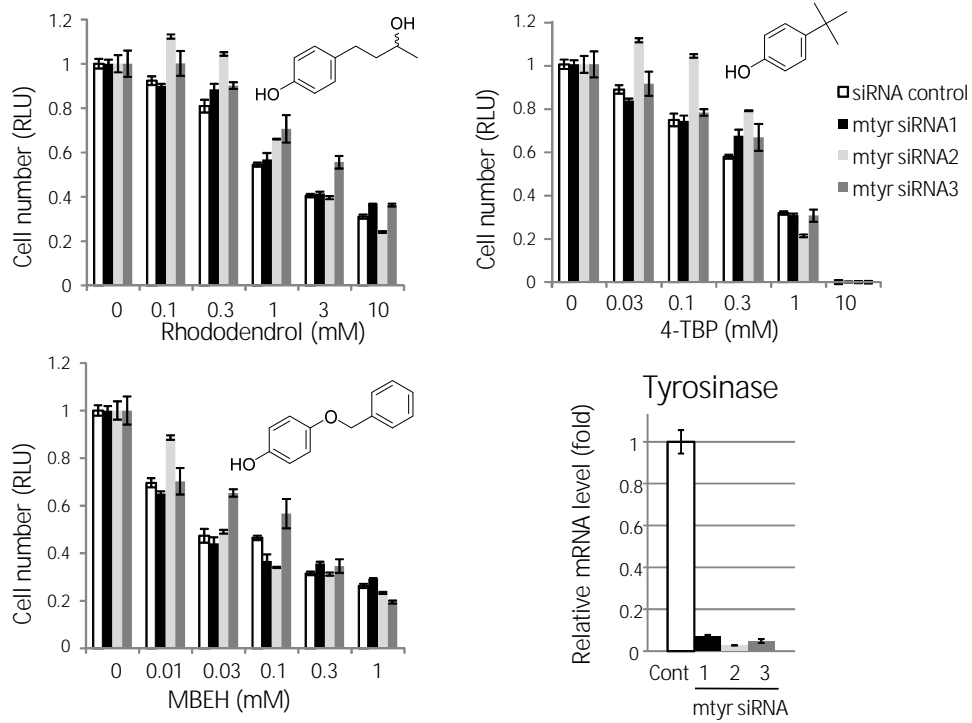


図1. RD, MBEH, 4-TBPのB16メラノーマ細胞における細胞毒性はチロシナーゼノックダウンに影響されない

siRNA処理24時間後に薬物処理を開始。さらに72時間後にATP含量測定により生存率を、チロシナーゼmRNAレベルを測定

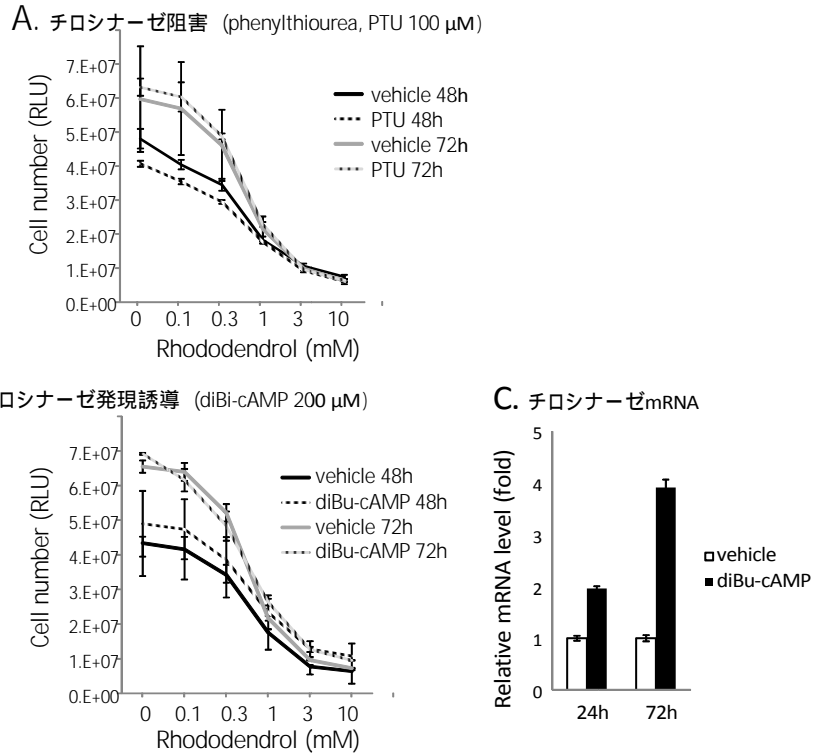


図2. チロシナーゼの阻害や発現誘導はロドデノール(RD)のB16メラノーマ細胞での毒性に影響しない

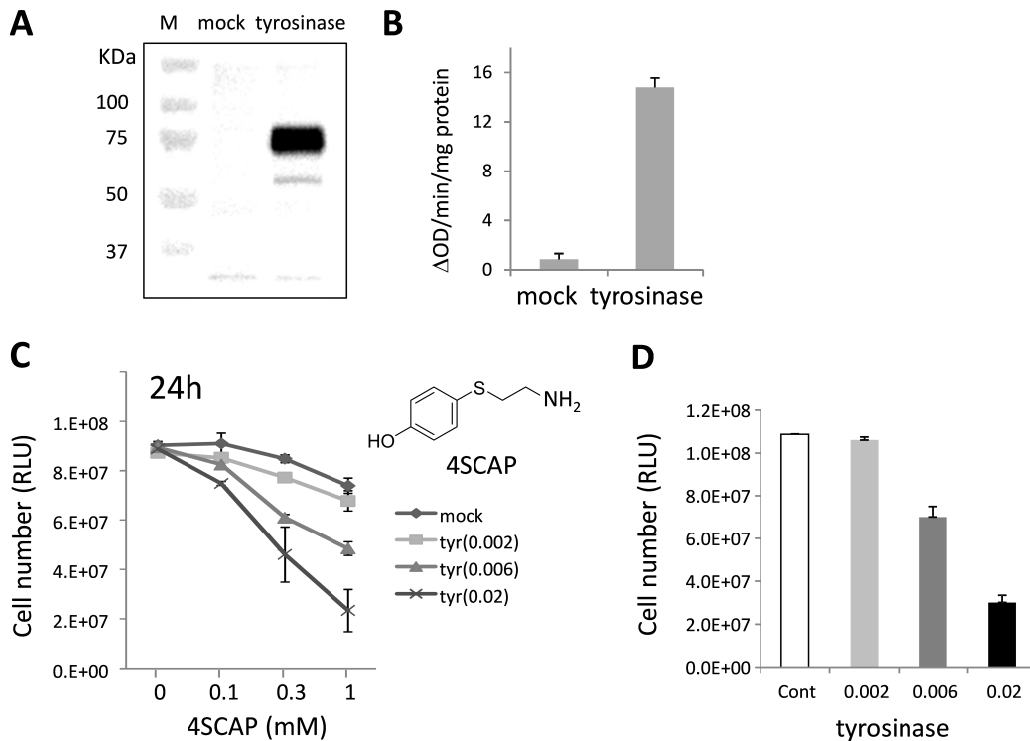


図3. HEK293T細胞へのヒトチロシナーゼ発現は4-S-CAPの毒性を増加する

A. ウェスタンブロット, B. チロシナーゼ活性測定によるチロシナーゼ発現の確認
 C. チロシナーゼ導入の4SCAP細胞毒性への影響(薬物処理24h後) D. チロシナーゼ導入72h後の細胞生存率

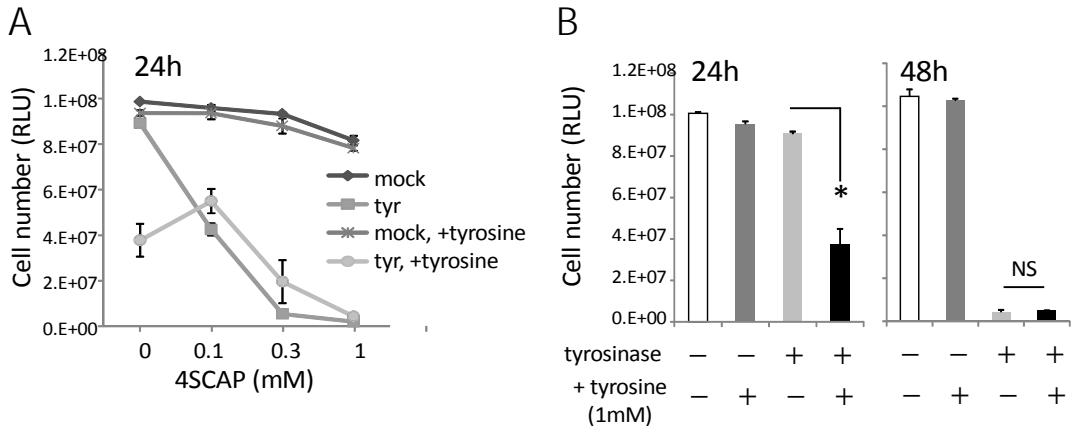


図4. ヒトチロシナーゼ導入によるHEK293T細胞の毒性は
培地へのチロシン添加により増強される
A. 4SCAP/チロシン添加24h後 B. チロシン添加24h, 48h後