

安全性評価法の構築(III)

研究分担者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

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と、チロシナーゼ代謝による細胞傷害仮説の検証を行った。ロドデノールを含む白斑誘導性フェノール類は共通してオルトキノン体に代謝活性化される。ロドデノールの場合にはチロシナーゼ依存の細胞毒性増強が報告されていることから、代謝活性化をチロシナーゼ依存的細胞毒性として検出する方法を検討した。293T細胞にヒトチロシナーゼを高発現させると、4-SCAPの毒性が増強されたが、ロドデノールを含めた他化合物の毒性増強は認められなかった。この系では経時的に内因性チロシン代謝による毒性が発現しており、チロシナーゼ阻害剤であるロドデノールや4-TBPはむしろ内因性毒性を強力に抑制する効果が観察された。代謝物によるメラノサイト傷害仮説の見直し、あるいはチロシナーゼ下流のメラニン合成経路やメラノソームの役割解明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。

白斑誘導性類似化合物は共通してチロシナーゼにより代謝されることが報告されていることから、白斑発症には、化合物のチロシナーゼによる代謝活性化とメラノサイトの傷害/応答の関与が強く示唆される。

本研究では、個体差の大きなメラノサイトを代替するモデル細胞を構築し、チロシナーゼ代謝活性化によるメラノサイト傷害仮説の検証を行う。また代謝活性化による細胞毒性/応答の増強が一定して認められる細胞モデルを作成できれば、新規美白剤の安全性評価に有用と考えられる。今年度は、ヒトチロシナーゼ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が共通

して毒性増強されるか検討を行った。

B. 研究方法

ロドデノールや白斑誘導性の類似化合物について、細胞毒性へのチロシナーゼ依存性を解析した。ヒトチロシナーゼ遺伝子(NM_000372)をHEK293T細胞に一過性に発現させ、24時間後に薬物処理を開始し、24および48時間後の細胞生存率をATP含量の測定により決定した。チロシナーゼ発現量はリアルタイムPCRでmRNAを測定し判定した。

可溶性ヒトチロシナーゼは、htyr(1-456)のC末端型にHis-Tagを導入した発現ベクターを293T細胞に一過性に発現させ、培地に分泌される酵素をアフィニティカラムで精製し調製した。チロシナーゼ活性はDopaを基質としDopa quinoneへの転換をMBTH法で測定して決定した。

C. 研究結果

1. ヒトチロシナーゼ発現 293T細胞を用いた細

胞毒性評価

ロドデノール(RD)および白斑誘導性類似化合物がチロシナーゼにより代謝され、毒性が増強される応答を検出できる細胞系の確立を試みた。293T細胞にチロシナーゼを発現し、24時間後に薬物処理を開始した。薬物処理24時間後においてコントロール(薬物非処理群)では全く細胞生存率に変化はなかったが、4-SCAP(0.1~1 mM)で処理すると、チロシナーゼ発現細胞においてのみ4-SCAPの毒性が観察され、細胞生存率は0.1 mM 4-SCAPにおいて約50%まで低下した(図1)。

薬物処理48時間後(遺伝子導入72時間後)には薬物非存在下においても生細胞数が3%まで低下した。この低下は培地にチロシンを補給すると24時間の時点で観察されたことから、内在性のチロシンが代謝されて顕著な毒性を発現したことが考えられる。このような内因性毒性(48時間後に観察)ならびに4-SCAP代謝物の毒性(24時間後に観察)はいずれも、SH化合物であるN-アセチルシステイン(NAC)を5 mM共存させるとほぼ完全に抑制された。

一方、ロドデノール(0.1~3 mM)処理では、チロシナーゼ発現細胞でも毒性増強は全く認められず、むしろチロシナーゼ発現による内因性チロシン毒性(48時間後に薬物非処理下で生存率3%)をほぼ完全に抑制し、細胞生存率は非処理レベルまで回復させることが判明した。ロドデノールと同様に4-TBPは0.1 mMから強力な抑制が、MBEHは0.01~0.3 mMの範囲で濃度依存的に内因性の毒性発現を抑制する効果が認められた。

細胞グルタチオン枯渇剤として知られるBSO(buthionine sulfoximine, 100 μ M)はロドデノール毒性を増強することが報告されている。しかしながらBSO存在下においても、ロドデノール(0.1~3 mM)は内因性チロシン代謝による毒性を顕著に抑制することが判明した。

ヒトチロシナーゼは活性化に触媒量のDopaを

必要とすることが知られている。そこで10 μ Mあるいは40 μ MのDopaを共存させて活性化を図ったところ、ヒトチロシナーゼ発現細胞では薬物非処理の毒性が増加し、チロシンとDopa代謝物が強い毒性を有すること、ロドデノールは毒性をむしろ抑制することがあらためて示された。

2. 可溶性ヒトチロシナーゼの調製

白斑誘導性化合物のチロシナーゼによる代謝研究には、入手の容易なマッシュルームチロシナーゼが主に使用されている。ヒトでの安全性評価のために、ヒトチロシナーゼの利用を検討した。

ヒトチロシナーゼはメラニン顆粒に局在する膜貫通型のタンパクであるが、膜貫通ドメインを切断しても、活性を維持した可溶性タンパクとして動物細胞に発現できることがCordesらにより報告されている(Biol Chem 2013; 394:685-693)。この報告に基づき、アミノ酸残基1-438のcDNAとHisタグをベクターに組み込み293T細胞に発現させたところ、相当する分子量のタンパクが培地に検出された。しかしながら回収・濃縮しても全く活性は認められなかった(図2B)。そこでより膜貫通領域に近い領域までのアミノ酸残基1-456をGSリンカーでHisタグと結合させた発現ベクターを構築した(図2A)。293T細胞に発現させたところ、高いチロシナーゼ活性が検出され、その96%が培地に検出されることが判明した(図2B)。

培地には、遺伝子導入24時間後から96時間まで、高いチロシナーゼ活性が検出されたことから(図2C)、培地からチロシナーゼの精製を行った。培地の遠心上清をHis Trap FFカラムに吸着させ、洗浄後、500 mMイミダゾール緩衝液で溶出し、活性画分をAmicon Ultra-0.5 30Kを用いて濃縮した。引き続き、PD-10カラムで脱塩とPBS緩衝液への交換を行った。図2Dに示されるように、高い比活性のチロシナーゼが培地より回収されることが判明し、SDS-PAGEで約60K

のバンドを確認した。

D. 考察

過去の文献を精査すると、ロドデノールをはじめとする白斑誘導性の 4-アルキル/アリルフェノール類は、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝される。ロドデノールの場合には、代謝によるメラノサイト毒性増強が報告され、白斑発症との関連が示唆されている。そこで「チロシナーゼ代謝によるメラノサイト毒性増強」が白斑誘導性の 4-アルキル/アリルフェノール類に広く共通して認められる応答であるのか解明が望まれる。

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が報告されている。そこで本研究ではメラノサイトに代替する細胞モデルを構築し、「代謝活性化によるメラノサイト傷害仮説」の検証を試みた。

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に高発現すると、4-SCAP ならびに経時的には内因性チロシンの毒性が増強され、この毒性は SH 化合物 NAC の共存により抑制された。したがって、4-SCAP のオルトキノン体や DOPA キノンへの代謝がグルタチオン・システイン等の細胞内 SH 基との反応を引き起こすこと(タンパクの修飾あるいは細胞内 SH プールの枯渇)、あるいは代謝物のユーマニン経路への流入が毒性増強をもたらすことが示唆される。

一方ロドデノールの場合には、4-SCAP と異なり、チロシナーゼ代謝による自身の毒性増強が認められず、むしろ薬物無処理細胞での内因性毒性発現を強力に抑制した。ロドデノールはチロシナーゼ阻害剤として開発された美白剤であり、この阻害効果により内因性チロシンの代謝による毒性発現を抑制したことが推定される。4-TBP や MBEH においても同様の内因性(チロシン代謝物)毒性の抑制が観察された。したがって、化合物のチロシナーゼの基質になりやすさ/阻害剤作用のバランスの違いが、4-SCAP の場合には毒性増強、ロドデノールや 4-TBP、MBEH の場合には内因性チロシン毒性抑制の異なる作用をもたらしたと推定される。

ロドデノールによる表皮メラノサイト消失には、チロシナーゼ代謝による毒性増強がメラノサイト特異的傷害をもたらす機序が想定されてきた。しかしながら本研究の結果は、ロドデノール代謝物の毒性に比べ、内因性チロシン代謝物の毒性/ロドデノールによる抑制効果が勝ることを示している。過去の文献情報を精査すると、4-SCAP はチロシナーゼによる毒性増強が報告されているが、4-TBP、MBEH については細胞毒性へのチロシナーゼ依存性は否定されており、本研究の結果と一致している。ロドデノール代謝物によるメラノサイト傷害仮説の検証には、今後、メラノサイトあるいはメラノーマ細胞において、チロシナーゼ下流の代謝経路の意義、あるいはメラノソーム内での代謝反応の compartmentalization の役割を明らかにすること、あるいは細胞毒性以外のエンドポイントを見いだすことが必要であると考えている。

E. 結論

白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ依存的な細胞毒性/応答を評価するために、ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に発現させ解析を進めた。ロドデノールは自身の毒性増強ではなく、むしろ内因性チロシンの代謝による毒性発現を抑制する効果が観察された。

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 2. 実用新案登録 3. その他

なし

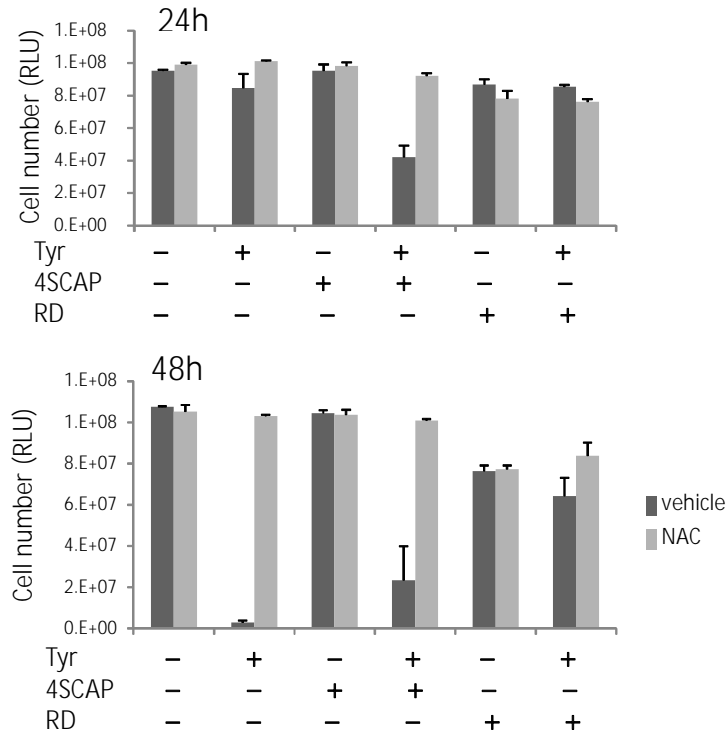


図1. 293T細胞へのヒトチロシナーゼ発現による細胞毒性はNACあるいはロドデノール(RD)添加により抑制される
4-SCP, 0.1mM; RD, 1mM; NAC (N-acetylcysteine), 5 mM

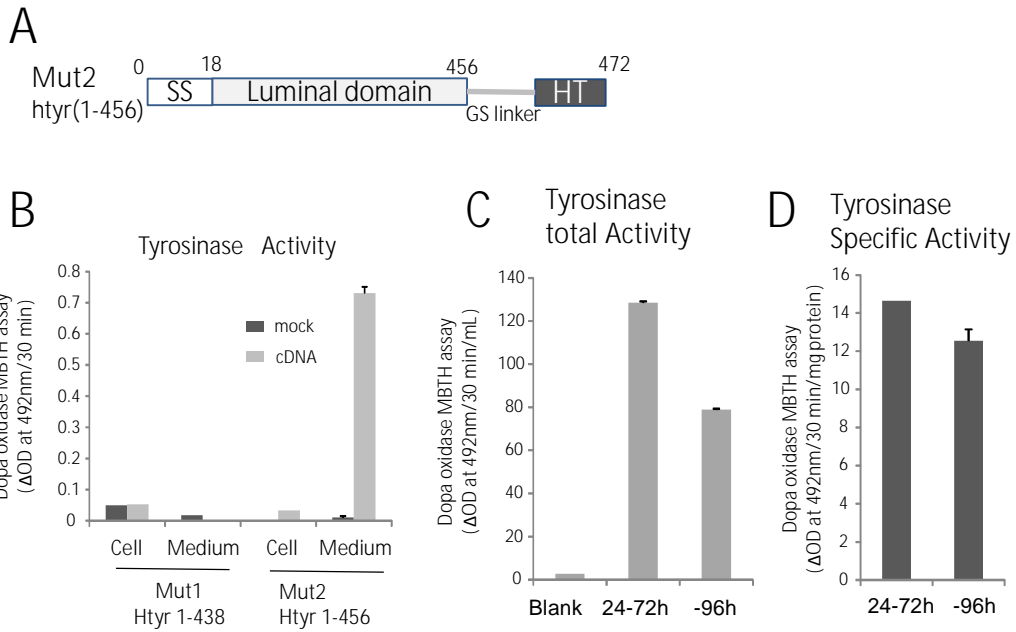


図2. 可溶性ヒトチロシナーゼの調製

A. 発現ベクターの構造、B. 発現細胞・培地での酵素活性の分布
C, D. 経時的に培地に放出された酵素活性