

安全性評価法(代謝物分析系)の構築 (II)

研究分担者 伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)はチロシナーゼの基質となり毒性代謝物オルトキノンを生産するが、その後の代謝は不明であった。昨年度は RD-ユーメラニン(RD-EM)が強い酸化促進作用を示すことを示したので、今年度は、その作用が UVA 照射により増強されるか否かを調べた。RD-ユーメラニンを合成し、細胞内抗酸化物質の酸化促進作用を比較検討した。その結果、RD-ユーメラニンによるグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、および NADH の酸化は UVA 照射により2~4倍に増強された。同時に H₂O₂ を生じた。これは RD 白斑が塗布部に多く、夏季に顕著であるという知見と一致する。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)はチロシナーゼ活性に依存して細胞傷害性を示すが、その機序の全貌は未だ解明されていない。昨年度は RD-ユーメラニン(RD-EM)が強い酸化促進作用を示すことを報告した(PCMR, 2017)。そこで今年度は、RD-EM による作用が UVA 照射により増強されるか否かを調べた。

B. 研究方法

RD-ユーメラニン(RD-EM)は 0.1 mM RD をチロシナーゼで2時間酸化して調製した。これに 1 mM のグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいは NADH を加え、UVA 照射(3.5 mW/cm²)下で2時間反応させ、非照射群と比較した。抗酸化物質の残存量は HPLC 法にて定量した。また、酸化により副生した H₂O₂ も合わせて定量した。

C. 研究結果

細胞内抗酸化剤であるグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいは NADH の

RD-EM による酸化は、UVA 照射により2~4倍に増強されることがわかった(Ito ら、PCMR, 2018)。反応は酸素に依存し、H₂O₂ の産生も UVA により増強された。

D. 考察

RD はチロシナーゼにより酸化されて、細胞傷害性の高いオルトキノンを生産する。オルトキノンは極めて高い反応性を持ち、グルタチオン、システインなどの非タンパク性 SH 化合物のみならず、タンパク中のシステイン残基とも反応し、付加体を形成する。これが RD によるメラノサイト傷害性の主要な機序と考えられる。しかし、RD の酸化により生成する RD-EM にも強い酸化促進作用があり、これが UVA により増強されることを明らかにすることができた。これは、RD による白斑発症が塗布部に多いこと、夏季に顕著であるという臨床所見に一致する。

E. 結論

RDのチロシナーゼ酸化はRD-キノンおよびRD-ユーメラニンを産生し、前者は細胞内タンパクと結合す

ることにより、また後者は細胞内抗酸化物質を酸化(枯渇)して同時に活性酸素を産生することにより細胞傷害性を惹起しているものと考えられる。後者の機序はUVAにより増強される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S, Okura M, Wakamatsu K, Yamatshita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30, 63-67, 2017.

Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31, published online, 2018. DOI: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int. J. Mol. Sci.*

19, 552, 2018. DOI: 10.3390/ijms19020532.

Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp. Dermatol.*, accepted for publication, 2018.

2. 学会発表

伊藤祥輔, 若松一雅. ロドデノールユーメラニンの強い酸化促進作用は紫外線 A 照射により増強される. 第 1 回日本白斑学会. 平成 30 年 3 月 9 日. 大阪.

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