

安全性評価法(細胞系)の構築

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 主任研究官

研究要旨:

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を検討した。ロドデノールを含む白斑誘導性4-置換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ことが報告されている。白斑誘導性の四化合物(ロドデノール、4SCAP、MBEH、4TBP)について、チロシナーゼ依存性の細胞毒性増強が認められるか、チロシナーゼ発現の高いメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、チロシナーゼを阻害、siRNA ノックダウン、cAMP 誘導で検討した。予想通りのチロシナーゼ依存性は4SCAPのみ認められ、ロドデノールを含む三化合物には認められなかった。これは昨期のヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた結果や、MBEH・4TBP については過去の文献報告に一致している。したがって、ロドデノールを含め白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化は必ずしも細胞毒性にはつながらず、白斑発症に関連する他の細胞応答を明らかにする必要性が示唆される。

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に関しては、これまで白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失、ロドデノールのチロシナーゼによる代謝、チロシナーゼ依存性のメラノサイト毒性などが報告されている。類似の4-アルキル/アリル置換フェノール構造を有する白斑誘導性化合物については、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ことが報告されており、白斑発症において、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傷害の関与が強く示唆される。

そこで前期研究班(平成27-28年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の策定に関する研究」)の分担研究「安全性評価法の構築(III)」において、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化がメラノサイト傷害をもたらす可能性を検証した。個体差の大きいヒトメラノサイトに代替する細胞モデルとして、メラノーマ細胞 B16 のチロシナーゼ

発現を変化させ、ヒトチロシナーゼ強制発現 293T 細胞を用い検討した。しかしながら、ともにロドデノールの細胞毒性にチロシナーゼ依存性は認められず、では、チロシナーゼ発現による細胞毒性増強が4S-システアミニルフェノール(4SCAP)とともに、内因性チロシンに対しても顕著に観察された。ロドデノールなど外来のフェノール類はオルトキノン体に代謝され毒性を発揮すると予測していたが、内因性チロシン代謝物ドーパキノンの毒性も同様に顕著であることが示唆される。

本研究においては、引き続きメラニン合成系、白斑発症関連因子の改変により細胞感受性の増強を図り、白斑発症と強く相関する細胞応答を明らかにし、評価に有用な細胞モデルを構築することを目的とする。今年度は、チロシナーゼの発現量が高い B16BL メラノーマ細胞の利用、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞へのメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 の共発現により、細胞毒性感受性の増強を試みた。

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や関連タンパクの役割を解析した。マウス B16BL6 メラノーマ細胞は播種 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。フェニルチオウレア(PTU) 100 μ M 前処理によりチロシナーゼを阻害し、diBi-cAMP 200 μ M 前処理によりチロシナーゼ発現誘導を行った。またチロシナーゼ特異的 siRNA (StealthTM Select RNAi, Invitrogen, #1 ~ #3) トランスフェクションによりチロシナーゼをノックダウンした。チロシナーゼノックダウン効率および発現誘導は、mRNA をリアルタイム PCR で測定し判定した。

また HEK293T 細胞にヒトチロシナーゼ遺伝子 (NM_000372) をチロシナーゼ関連タンパク 1 (TYRP1) 遺伝子 (NM_000550) の共存下/非共存下一過性に発現させ、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、あるいはウェスタンブロットング、ならびに酵素活性の測定により判定した。

C. 研究結果

1. B16BL 細胞のチロシナーゼ発現量変化による細胞毒性評価

ロドデノール (RD) および白斑誘導性類似化合物 (モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH)、4-ter-ブチルフェノール (4-TBP)、4SCAP など) はチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝活性されることが報告されている。チロシナーゼによる代謝活性化が細胞毒性増強をもたらす可能性を検証するために、前期研究班では B16 メラノーマ細胞を用い検討を行ったが、ロドデノール毒性にチロシナーゼ依存性は認められなかった (平成 27 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「機能性化粧品成分の個体差

等に基づく安全性評価法の策定に関する研究」分担研究報告書「安全性評価法の構築 (III)」)。今年度はチロシナーゼ発現量の高いメラノーマ細胞 B16BL6 を用いて再度検討を行った。

B16BL6 細胞のチロシナーゼ mRNA 発現レベルは B16 細胞の約 60 倍高かった。ロドデノール (0.1 ~ 3mM)、4SCAP (0.003 ~ 0.3mM)、MBEH (0.01 ~ 1mM)、4-TBP (0.03 ~ 3mM) 処理により細胞生存率は 24 時間後でそれぞれ最大 50%、0%、30%、0%まで低下した。チロシナーゼ阻害剤フェニルチオウレア (100 μ M) で処理した場合には、細胞生存率は 4SCAP 0.1mM では 10%が 70%に (図 A)、0.3mM では 0%が 55%に上昇し、4SCAP 添加による低下が抑制された。しかしながら、ロドデノール、MBEH、4-TBP の場合には影響は認められなかった。

引き続き 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。細胞生存率は 24 時間の 4SCAP 0.3mM 処理細胞では 0%であったが、三種類の siRNA 前処理により 90%、85%、95%に上昇し、4SCAP による低下がほぼ完全に抑制されることが判明した。一方、ロドデノール、MBEH、4-TBP の場合には、三種類の siRNA による共通の影響は認められなかった (図 C)。したがって、4SCAP はチロシナーゼに依存した細胞毒性が明確に認められる一方、他三種類の化合物による細胞毒性にチロシナーゼ依存性は観察されなかった。

さらに細胞を diBu-cAMP (200 μ M) で前処理することにより、チロシナーゼを誘導した。チロシナーゼ mRNA レベルは 1.2 倍に増加し、4SCAP 0.03mM 処理細胞の生存率は 90%から 25%に低下し (図 B)、チロシナーゼ発現の増加は 4SACP の毒性を増強することが示された。

2. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞へのメラニン合成系下流遺伝子共発現

白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ代謝による細胞毒性増強を検出する細胞モデルの

構築をめざし、前期研究班においては 293T 細胞にヒトチロシナーゼを発現させ検討した。4SCAP では顕著な細胞毒性増強が観察されたが、ロドデノール、MBEH、4-TBP の場合には影響は認められなかった。この系では内因性チロシン代謝による毒性が経時的に発現したことから、メラニン合成系におけるチロシナーゼ下流遺伝子を共発現することにより、内因性毒性の抑制を試みた。

今年度はチロシナーゼ関連タンパク 1 (TYRP1) を対象にヒトチロシナーゼとの共発現条件の検討を行い、チロシナーゼ活性に大きく影響せずに TYRP1 が共発現される条件を見いだした。タグ抗体のウェスタンブロットにより、チロシナーゼとほぼ同等の TYRP1 発現を確認した。この条件下で細胞の生存率は、チロシナーゼ発現により 24 時間後に約 30% に低下したが、TYRP1 の共発現により約 70% まで回復しており、内因性チロシン由来の毒性抑制が可能であることが示唆された。

D. 考察

ロドデノールや類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類は、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、特定のメラノサイトにおいて代謝によるメラノサイト毒性増強が見いだされ、白斑発症との関連が示唆されている。しかしながらメラノサイトの個体差も同時に報告され、「チロシナーゼ代謝によるメラノサイト毒性増強」がロドデノールを含め白斑誘導性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。

本研究では昨期に引き続き、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。今年度はチロシナーゼの発現量の高いメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、チロシナーゼ活性/発現量を阻害剤、siRNA ノックダウン、cAMP による発現誘導の三つの手段で変化させ、白斑誘導性フェノール類の細

胞毒性への影響を検討した。4-SCAP の場合はチロシナーゼに依存した細胞毒性の増強が認められたが、ロドデノール、MBEH、4-TBP による細胞毒性には認められなかった。この結果は、昨期において、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞で得られた結果と同様である。また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。

ロドデノールや類似構造の 4-置換フェノール類がチロシナーゼにより代謝されて生成するオルトキノン体は、付加反応性が極めて高い。細胞内 SH 基との反応を引き起こし、グルタチオン・システイン等の細胞内 SH プールの枯渇をもたらす。またオルトキノン体やさらなる代謝産物が ROS を産生し、毒性を発揮すると推定されている。

しかしながらヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた検討により、内因性チロシンもチロシナーゼにより毒性が増強されることが判明した。生成する DOPA キノンも 4-置換フェノール類のオルトキノン代謝物と同様の反応性・毒性を有しており、メラノサイト/メラノーマ細胞には内因性チロシン代謝による毒性発現を防止するシステムが備わっていることが推定される。このために、ロドデノールや白斑誘導性フェノール類の代謝は必ずしも細胞毒性をもたらさないと推定される。

ロドデノールをはじめとする白斑誘導性の 4-置換フェノール類がチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されることは、これまで複数の研究機関から報告されており、白斑発症との強い関連が推定される。白斑発症をもたらす細胞応答は、オルトキノン体生成以降、細胞死以前に存在する可能性が推定されるが、解明にはさらなる研究の進展を待つ必要がある。オルトキノンと細胞内 SH 基との反応は、酸化ストレス亢進に加え、タンパク修飾により機能不全や抗原提示を促進する可能性が推定される。次年度においては、初発段階である「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝」の評価

に焦点を絞った検討を進める予定である。

E. 結論

ロドデノールや白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ代謝は必ずしも細胞毒性をもたらさないことを、複数の細胞モデルで示した。ヒトチロシナーゼとTYRP1の共発現により内因性チロシン代謝による毒性抑制の可能性が示された。

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

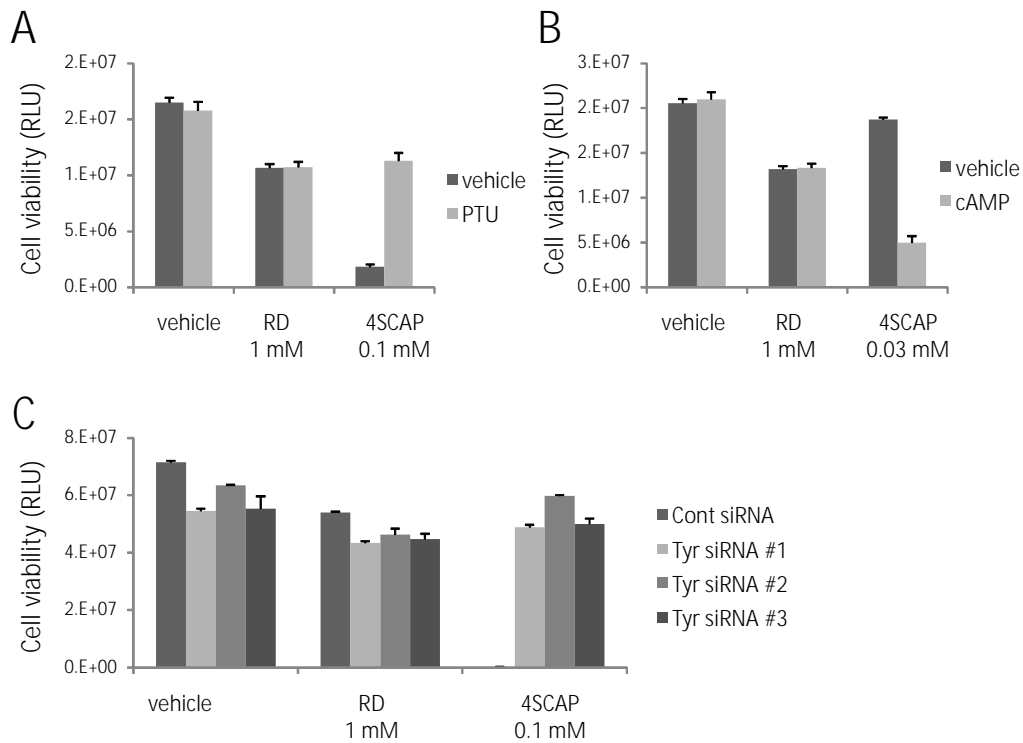


図1. メラノーマ細胞B16BL6におけるロドデノール(RD)および4SCAPの細胞毒性
(A)チロシナーゼ阻害剤PTU, (B)diBucAMP処理, (C)チロシナーゼsiRNAノックダウンによる影響