

美白成分の安全性評価法の策定に関する研究

研究代表者 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

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症に関しては、症例の多くは改善したが、一部患者に使用中止後も難治性白斑が見いだされ、病態や発症機序には未だ不明の点が残されている。本研究では、患者由来組織やモデル動物を用いさらなる解明を進める。また白斑誘導性類似化合物に共通するチロシナーゼによる代謝活性化に注目して測定方法を検討し、美白成分の安全性評価法策定に貢献する。

患者および健常人検体の解析を行い、①皮膚の免疫組織学的検討では、肥満細胞の脱顆粒率は難治例病変部において有意に上昇することが判明した。②尋常性白斑患者で認められる抗甲状腺抗体や抗メラノサイト抗体が RD 白斑患者では有意に認めないことが判明し、異なる発症機構が示唆された。③RD 白斑部での色素再生を促進する活性型ビタミン D3 の分子機序に関わる候補遺伝子を見出した。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、白斑誘導性 4-置換フェノール類の代謝活性化を、*in vitro* あるいは細胞で評価する方法を検討した。*In vitro* では①23 種の 4 置換フェノールのチロシナーゼ依存的な SH ペプチドとの結合を解析し、化学構造と反応性との関係を明らかにし、②4-置換フェノール構造を有するレスベラトロール(RES)チロシナーゼによる代謝、SH との反応性、代謝産物のプロオキシダント活性を明らかにした。③グルタチオン・システイン付加体産生のヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた評価手法を構築し、代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、付加体測定が有用であることを示した。

研究分担者

石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
鈴木民夫	山形大学大学院医学系研究科皮膚科学教授
荒瀬規子	大阪大学大学院医学系研究科助教
秋山卓美	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部室長
伊藤祥輔	藤田医科大学医療化学部名誉教授

研究協力者

安田正人	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教
五十嵐良明	国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部長

A. 研究目的

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症問題に関しては、平成 25 年度より二期にわたる厚生労働科学研究において、再発防止策の検討と原因究明研究が行われた。班内外の研究により、RD 白斑病変部でのメラノサイト異常、リンパ球の異常、メラノサイトのオートファジーへの影響、RD のチロシナーゼによる代謝、代謝物の強い酸化促進作用など、病態形成の手がかりとなる知見が得られている。しかし一部患者では、塗布部以外にも白斑が波及する難治性白斑も報告され、未だ不明な点が多い。

本研究では、上記の厚生労働科学研究の結果を踏まえ、患者由来組織やモデルマウスを用いた病態解明を継続し、白斑発症や病態形成の機序、進行に関わる因子等を明らかにする。

また美白成分の安全性評価法の確立に向けた

検討を行う。RD および類似構造の白斑誘導性 4-置換フェノール類は共通してチロシナーゼにより代謝活性化される。今年度は、*in vitro* および細胞を用いた評価方法を検討した。

B. 研究方法

1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

本研究では RD 誘発性脱色素斑における肥満細胞の役割を明らかにするために、RD 含有化粧品による白斑病変辺縁部皮膚と健常人の正常皮膚について、肥満細胞の局在、脱顆粒の有無について免疫組織学的に比較解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「世界医師会ヘルシンキ宣言(2013年10月改訂)」、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)」を遵守して行う。収集するデータに個人情報を含めず、試料とともに各研究実施機関で適切に連結可能匿名化を行う。外部分析協力機関へは検体と被験者コード番号(検体認識番号)のみ送付され、個人情報が送られることはない。

2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

RD 白斑患者、尋常性白斑患者、コントロール群の血清検体で抗甲状腺抗体、抗メラノサイト抗体の発現を比較した。

(倫理面への配慮)

RD 誘発性脱色素斑または尋常性白斑患者に於ける HLA・末梢血リンパ球・皮膚局所の免疫解析(大阪大学医学部附属病院・研究倫理審査委員会 13421 承認済み)に基づき患者より同意書を取得の上研究を進めている。

3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析[鈴木]

日本人皮膚モデルマウスに RD を塗布して RD 白斑モデルマウス作成した。そして、その白斑に

VitD3 軟膏を塗布した。その後に VitD3 を塗布したマウス皮膚から RNA を採取し、マウス・マイクロアレーを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては本学の動物実験委員会により、承認されている。

4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

4-アルキル/アリル置換フェノール類 23 種について、マッシュルームチロシナーゼ酸化により生成するオルトキノンを、Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(DPRA(Cys))と結合させ、HPLC で分析した。

5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

レスベラトロール(RES) 100 μ M を pH 6.8 あるいは 5.3 でチロシナーゼにより酸化し、反応を UV-Vis スペクトルあるいは HPLC で追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいは N-アセチルシステイン(NAC)を加えた。

6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に一過性に発現させ、24 時間後に薬物処理を開始し、細胞および培地を回収し、代謝産物を HPLC で解析した。細胞生存率および細胞内グルタチオン量を測定した。

C. 研究結果

1. 患者由来組織を用いた原因究明 [石川・安田]

RD による白斑を生じた症例のうち、改善 29 例、難治 15 例の白斑病変と正常皮膚 58 例に対し、抗トリプターゼ抗体で染色し、200 倍視野での真皮内肥満細胞数を計測、そのうち形態的に脱顆粒している肥満細胞数を計測した。その結果、総肥満細胞数は改善例病変部 7.74、難治例病変部 7.77 に対し、正常皮膚 8.59 と差はみられな

かった。しかし、脱顆粒率は改善例病変部 65.6%、正常部 61.0%に対し、難治例病変部で 73.4% (P=0.021)と、難治例病変部において有意に脱顆粒が増えていた。

2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析 [片山]

RD 誘発白斑と尋常性白斑は臨床的な類似性を有する。尋常性白斑患者で認められる自己抗体が RD 白斑患者血清中では有意に認められないことが判明した。

3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析 [鈴木]

RD 白斑に色素再生を促進する効果が確認された活性型ビタミン D3 について、その作用機序を解析した。VitD3 を塗布したモデルマウスの皮膚 RNA の発現遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、いくつかの遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。我々はその中である遺伝子(遺伝子 A)に着目した。培養色素細胞を使った実験では、確かに VitD3 添加条件下で、遺伝子 A の発現が亢進していることを確認した。さらに、その遺伝子をノックダウンするとメラニン合成が亢進しなくなることが明らかとなった。

4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類は共通してチロシナーゼにより代謝活性化を受ける。4-アルキル/アリル置換フェノール類 23 種について、*in vitro* でチロシナーゼ酸化し DPRA(Cys)ペプチドと反応させ、検液を HPLC で分析し、DPRA(Cys)単独で分析した結果と比較した。基質の保持時間は基質溶液を単独で分析することにより求めた。

その結果、4-methylphenol (*p*-cresol)、

4-ethylphenol、4-propylphenol、4-butylphenol、4-amyphenol、4-hexylphenol、4-heptylphenol、4-benzylphenol、rhododendrol、raspberry ketone、4-propoxyphenol、4-butoxyphenol、4-amyloxyphenol、4-hexyloxyphenol、および 4-benzyloxyphenol (monobenzone) では DPRA(Cys)及び基質のピークが減少または消失し、結合ペプチドと考えられるピークが生成した。一方、4-isopropylphenol、4-*sec*-butylphenol、4-cyclohexylphenol、4-*tert*-amyphenol、4-phenylphenol、4-methylthiophenol、4-methoxyphenol、及び 4-ethoxyphenol では DPRA(Cys)及び基質のピークの減少が見られなかった。

5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

レスベラトロール(RES)は RD と同様に 4-置換フェノール構造を有する。*In vitro* で代謝を調べたところ、RES はチロシナーゼの良好な基質となることが分かった。生成物は pH 6.8 では極めて不安定であるが、pH 5.3 においては 485 nm に吸収極大をもつオルトキノン体の生成が確認された。オルトキノン体は反応性が高く、NAC と二付加体および三付加体を生成した。システイン、グルタチオン(GSH)も二付加体を生成した。また RES キノンは、牛血清アルブミン(BSA)および SH 基を保護した NEM-BSA に付加体を形成した。BSA ではチオール基が NEM-BSA ではアミノ基が反応に寄与したものと推測される。

RES のチロシナーゼによる酸化体がプロオキシダント活性をもつかどうかを調べた。RES オリゴマーは、GSH を 60 分で 50%減少し、GSSG に酸化させた。RD オリゴマーは GSH を 90%減少させた。

6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通するチロシナーゼによる代謝活性化を、細胞で

の代謝物解析により評価する方法を検討した。ヒトチロシナーゼを一過性に発現した 283T 細胞を用いると、RD および 4SCAP どちらの場合にも 2 時間曝露により、グルタチオン・システイン付加体の濃度依存的な産生と培地への放出が観察された。

一方、チロシナーゼ発現により、内因性のチロシンも効率良くドーパキノンに転換され、タンパク・非タンパク性 SH 付加体・メラニンが大量に産生されることが判明した。48 時間後にはグルタチオン・細胞生存率が低下していた。4SCAP では 2 時間で細胞生存率低下が認められるのに対し、RD は内因性チロシン由来代謝物の産生を抑制しており、細胞生存率低下・グルタチオン低下を抑制することが判明した。

D. 考察

1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

RD 誘発性脱色素斑難治例において、肥満細胞の脱顆粒が増えていることを明らかにした。肥満細胞から脱顆粒により分泌されるヒスタミンは通常メラノサイトにおけるメラニン合成を促進することが報告されている。脱顆粒率の高さが RD 誘発性脱色素斑の難治化における原因なのか、結果なのかはさらなる検討が必要である。

2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

RD 誘発白斑患者では尋常性白斑患者に認められる自己免疫性甲状腺炎などの背景因子は薄いことが考えられた。また白斑発症に自己抗体が関与する可能性が尋常性白斑より低い可能性が考えられた。

3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析 [鈴木]

VitD3 が RD 白斑部における色素再生を更新させることを明らかにし、さらにその分子機序を解析

した。その結果、VitD3 によって誘導される遺伝子 A は、メラニン合成を更新しているキー遺伝子の 1 つであることが示唆された。今後はさらにその詳細な機序を明らかにしていく。

4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

チロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化は RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する応答である。23 種の 4 置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか *in vitro* での検討を行った。水酸基のパラ位に結合する炭素が 1 級または 2 級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が 3 級、4 級またはベンゼン環である化合物は、検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが 1 又は 2 の化合物は酸化が起きず、3 以上の化合物は結合ペプチドを生成した。以上の結果から、置換基全体の大きさとベンゼン環に結合した原子に属する電子の状態がチロシナーゼの活性部位と複雑に相互作用していることが示唆された。

5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 (II) [伊藤]

RES は 4-置換フェノール構造を有しており、チロシナーゼにより酸化されてオルトキノンを生じた。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、付加体を形成した。RES がメラニン産生細胞に対して細胞障害性をもつか否かは明確には示されていないが、我々の先行研究(Okura ら、J Dermatol Sci, 2015)では、B16メラノーマ細胞およびヒトメラノサイトに対して IC50 値が 30 μ M 程度の強い増殖抑制を示している。また、RES オリゴマーは RD オリゴマーほどではないが、プロオキシダント活性をも

つことも興味深い。

6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

チロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化を、ヒトチロシナーゼを高発現させた 293T 細胞で評価する方法を検討した。オルトキノン、システイン・グルタチオン付加体の検出は、RD や 4SCAP の 2 時間曝露により可能であった。

オルトキノン体は細胞内 SH プールの枯渇、自身や代謝物の ROS 産生による毒性発現が予想されてきた。実際、4SCAP や内因性チロシンのオルトキノン体生成はグルタチオン・細胞生存率を低下させた。しかしながら、RD は自身の SH 付加体を産生する一方で、内因性チロシン代謝を阻害し、グルタチオン・細胞生存率低下をむしろ抑制した。したがって、RD がチロシナーゼに依存した毒性を発現しない原因が明らかになり、毒性評価ではなく、付加体測定の有用性が示された。最近、各種フェノール類の白斑誘導能は細胞毒性ではなく、SH 枯渇能および免疫原性と関連することが報告されている。

細胞を用いた代謝解析法では、in vitro で評価可能な化合物のチロシナーゼへの親和性に加え、内因性基質(チロシン)との競合、化合物の細胞への取り込み速度の差を示唆する結果が得られた。今後、多様な 4-置換フェノール類につき白斑誘導能との相関を検討予定である。

E. 結論

RD 白斑において、RD 誘発性脱色素斑の難治化に、肥満細胞の脱顆粒が関わる可能性が示された。RD 誘発白斑では患者の自己免疫的背景は尋常性白斑より少なく、白斑発症にも自己免疫の関与がやや薄い可能性が示された。また活性型ビタミン D3 による白斑部色素再生機序に関わる候補遺伝子を見出した。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、in vitro で各種 4 置換フェノール類の側鎖構造とチロシナーゼによる代謝活性化との関係を解析すると

ともに、同じく 4-置換フェノール構造を有するレスベラトロール(RES)の代謝活性化と酸化促進作用を明らかにした。またヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた SH 付加体産生評価手法を構築し、代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、付加体産生の評価が有用であることを示した。さらなる解析を進め、新たな健康被害防止につなげる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Arase N, Tanimura K, Jin H, Yamaoka T, Kishibe M, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Matsuoka S, Ohmura K, Takasugi K, Yamamoto T, Murota H, Arase H, Katayama I. Novel autoantibody against the β 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers. *Br J Dermatol.* 178:272-275, 2018

Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H. Fc γ RIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules. *Int Immunol.* 2019, in press

Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H. Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019, 511(4):862-868, 2019

Arase N, Tanemura A, Jin H, Nishioka M, Aoyama Y, Oiso N, Matsunaga K, Suzuki T, Nishigori C, Kawamura T, Shimizu T, Ito A, Fukai K, Abe Y, Yang L, Tsuruta D, Takeoka K, Iwatani Y, Hidaka Y, Nishida M, Yamauchi-Takahara K, Arase H, Fujimoto M, Katayama I. Autoantibodies detected in patients with vitiligo vulgaris but not in those with rhododendrol-induced leukoderma. Submitted.

Masaki T, Nakano E, Okamura K, Ono R, Sugawara K, Lee MH, Suzuki T, Nishigori C.: A case of xeroderma pigmentosum complementation group C with diverse clinical features. *Br J Dermatol.* 2018 Jan 12. (2018)

Okamura K, Hayashi M, Nakajima O, Kono M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T.: A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(1):79-84. (2018)

Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.: Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target lesion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(2):315-319. (2018)

Tsutsumi R, Sugita K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O: Leukoderma induced by rhododendrol is different from leukoderma of vitiligo in pathogenesis: A novel comparative morphological study. *J Cutan Pathol.* 46(2):123-129. (2019)

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, 523-528, 2018. Doi: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int J Mol Sci.* 19, E552, 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.* 27, 754-762, 2018. Doi: 10.1111/exd.13555.

Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.*, in revision.

2. 学会発表

荒瀬規子 金田眞理 室田浩之 中川幸延 山岡俊文 平安恒幸 荒瀬 尚
片山一朗:大阪大学皮膚科における皮膚肥満細

胞増多症16症例の解析. 第117回日本皮膚科学会総会 広島 (2018.5.31-6.3)

前川亜耶 荒瀬規子 清原英司 玉井克人 片山一朗 金田眞理:壮年期に肺機能障害を伴い皮疹が悪化した表皮融解性魚鱗癬に関する考察. 旭川 (2018.10.6-2018.10.7)

Hideki Tsuji, Koichiro Ohmura, Shuhei Sakakibara, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hitoshi Kikutani, Tsuneyo Mimori, Hisashi Arase. Recognition of DNA/HLA-class II complex by anti-DNA antibodies from SLE patients. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Hui Hin, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki, Hisashi Arase. TSHR-stimulating autoantibody production by TSHR/MHC class II complexes. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Multiple MC1R variants associated with extensive freckles and red hair found in a Mongolian family. Tamio Suzuki, et al.: International Investigative Dermatology 2018, Rosen Shingle Creek Resort, Orlando, Florida, May 16-19, 2018

Hereditary hypopigmentary disorders: a better understanding from a genetic view. Tamio Suzuki: 5th Eastern Asia Dermatology Congress, Dianchi International Convention & Exhibition Center, Kunming, China. June 20-23, 2018

Chemical vitiligo: instructive evidence that we have learned from Rhododendrol-induced leukoderma. Tamio Suzuki: The 70th KDA Annual Autumn Meeting Seoul COEX Intercontinental Hotel, Seoul. Korea, October 20-21, 2018

鈴木民夫:第117回日本皮膚科学会総会学術大会 EL2:白斑の up to date「日本白斑学会設立の経緯と目指すところ」、リーガロイヤルホテル広島、広島市、2018年5月31日

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