

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

研究協力者 伊藤祥輔 藤田医科大学 医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)や4SCAP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活性化されることが報告されている。ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を用いた評価方法を検討し、RDあるいは4SCAP曝露により2時間後には、オルトキノン体のグルタチオン・システイン付加体が細胞・培地において検出されることが判明した。オルトキノン産生は毒性をもたらすと予想されている。実際に4SCAPは速やかに、内因性チロシンもドーパキノンに転換され、やや遅れてグルタチオン・細胞生存率低下を引き起こしたのに対し、RDは内因性チロシン代謝物産生を阻害し、グルタチオン・細胞生存率低下をむしろ抑制する効果を示した。したがって、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の評価には、細胞毒性ではなく、SH付加体産生の評価が有用と考えられる。

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に関して、本研究の目的は、白斑発症と強く相関する細胞応答を明らかにし、その評価系を構築することである。RD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の関与が強く示唆される。

RDについては、チロシナーゼ依存性のメラノサイト毒性が報告されている。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」)ならびに昨年度の研究において、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てきた。

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、①メラノーマ細胞 B16 あるいは

B16BL のチロシナーゼ発現を変化させ、②293T細胞にヒトチロシナーゼを強制発現し検討したが、①②ともにRDの細胞毒性にチロシナーゼ依存性は認められず、②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。RD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ことが予測されたが、内因性チロシン代謝物ドーパキノンも同様の顕著な毒性が示唆され、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を、細胞毒性を指標として評価することは困難と判断した。

そこで本年度は、②のヒトチロシナーゼ強制発現293T細胞を用い、チロシナーゼによる代謝活性化を代謝物解析により直接測定する方法について検討を行った。

B. 研究方法

293T細胞にヒトチロシナーゼを一過性に発現さ

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、代謝産物を既報 (Ito et al., *Pigment Cell Melanoma Res.*, 28, 295-306, 2015) に従い、HPLC で解析した。細胞生存率は ATP 含量の測定により、細胞内グルタチオン量は酵素・化学発光法により決定した。

C. 研究結果

1. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞におけるロドデノール (RD) の代謝活性化

これまでの伊藤らによる *in vitro* およびメラノーマ細胞での研究から、RD のチロシナーゼ代謝で RD キノンが生じ、システインやグルタチオン、さらにはタンパクの SH 基と反応して付加体を生成することが判明している。293T 細胞にヒトチロシナーゼを一過性に高発現させ検討したところ、本細胞においても、RD 曝露により、RD キノンのグルタチオンおよびシステイン付加体が顕著に産生され、ほとんどが培地に検出されることが判明した。細胞タンパクのシステインへの付加体も検出された。培地のグルタチオン付加体、システイン付加体、細胞タンパクシステイン付加体の比率はほぼ 6:1:3 であった。RD キノンのシステイン付加体がさらに環化した RD フェオメラニンも培地において検出された。

チロシナーゼ発現により、内因性チロシンから生じるドーパキノンのグルタチオン付加体、細胞タンパクシステインへの付加体も検出された。RD 非処理のコントロール細胞では、ドーパキノンならびにシステイン付加体の環化重合で生じるユーメラニン・フェオメラニンが大量に生成し、培地にも放出されていた。RD 曝露により、内因性チロシン由来のシステイン・グルタチオン付加体やメラニンの生成が強力に抑制されることが判明した。

2. RD の代謝活性化の経時変化

RD 代謝物産生の経時変化を検討したところ、RD 曝露後 2 時間で、RD キノンのグルタチオン

付加体・システイン付加体が主に培地に検出され、5 時間後に倍増していた。細胞内での検出量は 5 時間後には低下しており、付加体は産生後に速やかに放出されることが推定された。また 2 時間曝露において、RD キノンのグルタチオン付加体・システイン付加体産生の RD 濃度依存性を確認した。

3. 4SCAP の代謝活性化

白斑誘導性フェノールである 4SCAP についても、本細胞に曝露すると 2 時間後に 4SCAP オルトキノンのグルタチオン付加体 2 種類が培地および細胞で検出され、濃度依存的な増加が認められた。グルタチオン付加体の産生量は RD とほぼ同程度であったが、4SCAP の場合には、オルトキノン体自体が細胞内ならびに大量に培地に検出され、母化合物である 4SCAP も RD の 10 ~ 30 倍の高量が細胞内に存在した。

4. チロシナーゼ代謝に伴う細胞内グルタチオン量への影響と細胞毒性

RD を各濃度範囲で 2、5、24 時間処理したところ、細胞生存率への影響はほとんど認められず、むしろ未処理細胞での 24 時間後の生存率低下を防ぐ効果が認められた。細胞内グルタチオン量も同様に推移した。

4SCAP も各濃度範囲で 2、4、6、24 時間処理したところ、高濃度では 2 時間の時点で顕著な細胞毒性と細胞内グルタチオン低下が認められた。

D. 考察

RD や類似の白斑誘導性 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」化の細胞を用いた評価法を検討した。生成するオルトキノン体は、付加反応性が極めて高く、細胞内 SH 基との反応を引き起こす。タンパク中のシステイン残基への付加は、タンパク・細胞機能を変化させ、あるいは抗原性を生じて白斑発症メカニズムと深く関連

することが予想される。本細胞モデルにおいても、RD オルトキノンのタンパクシステインへの付加を確認した。しかしながら、タンパク付加体の分析は煩雑であることから、非タンパク性のシステイン、グルタチオン付加体を代替マーカーとし、評価する方法を検討した。

本研究では2時間の曝露によりRDと4SCAPで付加体産生を確認できた。より長時間の結果から、RD システイン付加体のRD フェオメラニンへの転換など、二次的な反応の進展が示唆されることから、今後2時間曝露の条件での検討を予定している。

オルトキノンの高い反応性は、細胞内SHプールの枯渇をもたらし、またオルトキノンの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。4SCAPは大量のオルトキノンの転換され、短時間に細胞毒性を発現した。内因性チロシン代謝により生じるドーパキノンも細胞内SHと反応し、やや遅れてグルタチオン・細胞生存率が低下した。RDについても、RDキノンのSH付加体が効率的に産生された。一方で、RDは内因性チロシン代謝物の生成を阻害し、むしろSH低下と細胞生存率低下を抑制する効果を発揮することが判明した。したがって、代謝物解析により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、付加体測定の実用性が示された。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

ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用い、RDや白斑誘導性4-置換フェノール類に共通する代謝活性化の評価を検討し、細胞内でのグルタチオン・システイン付加体生成と培地への放出を観察した。毒性評価に比較して有用性が示された。

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