

医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究

研究代表者 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

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品(医薬部外品)による白斑の発症に関しては、チロシンと共通の4-置換フェノールの構造を持ち、チロシナーゼの阻害活性を期待されたRDがチロシナーゼにより代謝され、オルトキノン体に変換されることが判明しており、この代謝と白斑発症との関連が示唆されている。本研究では、*in vitro*でのチロシナーゼとの反応性、チロシナーゼを発現させた細胞での代謝物の解析、医薬部外品に使用される可能性のある物質のチロシナーゼによる代謝物の構造と性質の解析を行って評価法の確立を目指す。

25種類の4-置換フェノールについてSHペプチドを共存させてチロシナーゼによる酸化を行わせたとき、4位の置換基の構造により反応性及び生成物の構造に明らかな違いが見られた。ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を用いた代謝物解析において、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生解析が、白斑誘導性モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)および4-tertブチルフェノール(4-TBP)につき可能であることを示した。エクオール(EQ)はチロシナーゼの良好な基質となり、オルトキノン体を生成した。オルトキノン体はSH化合物と反応して、一付加体、二付加体を形成した。EQオリゴマーはGSHをGSSGに酸化し、またH₂O₂を産生する、プロオキダント活性をもつことが示された。

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

伊藤祥輔 藤田保健衛生大学医療化学部名誉教授

研究協力者

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(平成25年7月)に関しては、過去三期の厚生労働科学研究において再発防止策の検討と臨床・基礎からの原因究明の研究が行われた。その中で、RDや白斑誘導性の4-置換フェノール

類はチロシナーゼにより代謝され、オルトキノン体に変換されることが判明しており、この代謝と白斑発症との関連が示唆されている。チロシナーゼによる代謝の詳細な解析により、RDユーメラニンやその前駆体など、多くの代謝物の構造と性質を明らかにした。また、感受性の増強を図った各種細胞の代謝物による細胞応答を指標とする方法を検討し、白斑誘導性化合物の代謝は必ずしも細胞毒性の増強をもたらさないことが判明した一方で、ヒトチロシナーゼ強制発現細胞を用いて代謝物の解析を検討し、細胞レベルにおいてヒトチロシナーゼによるRDの代謝とグルタチオン付加体の産生を追跡することができた。更に、各種4-置換フェノール類の代謝物を、生成するオルトキノンとSH含有ペプチドを共存させて、*in*

vitro でペプチドと結合したカテコール体として検出することができた。

本研究ではこれらの性質を利用した医薬部外品成分の白斑誘導能の評価法を構築し、更に他の生物学的あるいは物理化学的性質を指標に加えた評価体系を検討する。

本年度は、フェノール類をチロシナーゼで酸化した後共存させた SH ペプチドと結合させ、ペプチド付加物として生成物を検出する方法について、様々な置換基を持つ 4-置換フェノール類を基質として用い、LC-MS により反応生成物を検出して同定することにより、基質の反応性と基質による反応機構の違いの有無を検討する。

白斑発症と強く相関する細胞応答に着目し、その評価系を構築する。ロドデノール(RD)や構造類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通して認められる「チロシナーゼによる代謝活性化」を、[1]代謝物解析、[2]細胞毒性増強により評価する方法の検討を進める。

RD と同様に 4-置換フェノール構造を有する物質で、医薬部外品の有効成分として配合される可能性のあるものについて、チロシナーゼの基質となってオルトキノンを産生するかどうか検討している。サプリメントとして広範に摂取され、皮膚適用時のシミに対する効果が期待されているエクオール(EQ)について検討する。

B. 研究方法

1. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築()

[秋山]

25 種類の 4-置換フェノール類をマッシュルーム由来チロシナーゼ、及び Direct Peptide Reactivity Assay で用いる SH ペプチドと反応させ、酢酸酸性にして反応を止めた後、LC-MS で分析を行った。

2. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

代謝物解析による評価は、ヒトチロシナーゼを

一過性に発現させた 293T 細胞に、薬物を 2 時間暴露し、細胞・培地の代謝物を解析した。メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 を、siRNA を用いてノックダウンし、薬物の細胞毒性に及ぼす影響を解析した。

3. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築()

[伊藤]

EQ100 μ M を pH 6.8 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)など SH 化合物を加えた。

C. 研究結果

1. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築()

[秋山]

4 位にメチル基又は第一級アルキル基を持つ基質の場合、基質量が大きく減少し、SH ペプチドが 1 個付加したカテコールが生成した。4 位に酸素を介してアルキル基が結合した基質、すなわちアルコキシ基を持つ基質の場合、SH ペプチドが 1 個付加したカテコールの他、2 個付加したカテコールが生成した。4 位が第二級アルキル基、第三級アルキル基又はアリアル基の場合、生成物は非常に少ないか、あるいは基質と SH ペプチドのみが検出された。

2. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

[1]代謝物解析については、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いると、MBEH ならびに 4-TBP のオルトキノンのグルタチオンあるいはシステイン付加体の検出が可能であることを示した。[2]メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 のノックダウンにより細胞感受性増強を試みたが、TYRP1 低下は 4-S-システアミルフェノール(4SCAP)の細胞毒性発現に全く影響を与えないことが判明した。

3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（ ）

[伊藤]

EQ はチロシナーゼにより酸化されてオルトキノンになることが、400 nm に吸収極大を持つスペクトルが得られたこと及び還元したときに2種類のモノカテコールと1種類のジカテコールが精製したことから判明した。さらに、N-アセチルシステイン(NAC)あるいはグルタチオン(GSH)と反応して5位又は5'位にSH化合物が付加した一付加体及び二付加体が生成した。更に、酸化により生成させたEQオリゴマーはGSHをGSSGに酸化させるプロオキシダント活性を持つことが判明した。

D. 考察

1. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（ ）

[秋山]

4位の置換基の構造により基質の減少と生成物の有無に明らかな差が見られた。メチル基、第一級アルキル基又はアルコキシ基が結合した基質ではチロシナーゼによる酸化が起きてオルトキノンが生成したが、第二級アルキル基、第三級アルキル基又はアリアル基では酸化反応が起きにくいと考えられる。アルコキシ基の場合にはSHペプチドが2個付加したカテコールも見られたが、オルトキノンの生成とSH基の結合というメカニズムは共通している。

2. 安全性評価法（細胞系）の構築 [最上]

白斑誘導性フェノール類の評価方法として、ヒトチロシナーゼ発現293T細胞を用いた代謝活性化の解析について有用性が示された。今後さらに対象を広げ、構造と白斑誘導能との関連を解明する。細胞毒性増強の試みについては、メラノーマ細胞のメラニン合成系下流遺伝子TYRP1は4SCAPの細胞毒性に関与しないことが判明した。今後は他遺伝子を標的に細胞感受性増強を検討する。

3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（ ）

[伊藤]

EQ はチロシナーゼにより酸化されて極めて反応性の高いオルトキノンを産生する。EQ の持つ2個のフェノール性OH基がいずれも酸化され、2種類のモノカテコール体及びジカテコール体が生成したことは興味深い。モノカテコール体の一つ6-hydroxy-EQがRDの酸化により生成するRD-環状カテコールと同じクロマン骨格を持つことから、同様に細胞毒性をもたらす可能性が示唆される。EQオリゴマーは、先行研究で検討したRESオリゴマーよりも高いプロオキシダント活性をもつことも興味深い。

E. 結論

SHペプチドを共存させて4-置換フェノールのチロシナーゼによる酸化を行わせたとき、4位の置換基の構造により反応性及び生成物の構造に明らかな違いが見られた。

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方法として、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた代謝物解析の有用性を示した。メラノーマ細胞のチロシナーゼ下流遺伝子発現を低下させての細胞感受性増強を試みた。

EQのチロシナーゼ酸化はEQキノン、次いでEQオリゴマーを産生し、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)することにより細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 32: 766-776, 2019. DOI:
10.1111/pcmr.12808.

2. 学会発表

秋山卓美, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: 薬用化粧品成分のチロシナーゼ反応性評価法の検討. 第

56 回全国衛生化学技術協議会年会. 広島. 2019
年 12 月 6 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