

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:

白斑発症と強く相関する細胞応答の評価系確立をめざし、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オルトキノン体への代謝活性化」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た。[1]代謝物解析:ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を用いると、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。[2]細胞毒性評価:B16BLメラノーマ細胞の細胞感受性増強をめざしチロシナーゼ下流遺伝子発現低下を試みたが、TYRP1ノックダウンは4-S-システアミルフェノール(4SCAP)の毒性発現に全く影響を与えないことが判明した。

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事象に関し、本研究においては、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ことを目的とする。

RDならびに類似構造(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、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。そこで前期研究班(平成29-30年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「美白成分の安全性評価法の策定に関する研究」)においては、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化を[1]代謝物産生 [2]細胞毒性により評価する手法について検討を行った。[2]チロシナーゼ依存の細胞毒性については、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ヒトチロシナーゼ発現293T細胞を構築し、あるいはメラノーマ細胞のチロシナーゼ発現量を変化させて評価する

方法を検討した。しかしながら、化合物により毒性の発現が大きく異なり、RD等はむしろ内因性チロシン(代謝物ドーパキノン)由来の細胞毒性を抑制する効果が示唆された。一方、[1]代謝物解析によりチロシナーゼ代謝活性化を直接測定する方法については、ヒトチロシナーゼ発現293T細胞を用い、RDオルトキノン体のグルタチオン・システイン付加体を細胞・培地より測定する手法の有用性が示された。

今年度は、[1]ヒトチロシナーゼ発現293細胞を用いての代謝活性化の解析を、対象を広げて各種白斑誘導性フェノール類について進める。[2]細胞毒性評価については、メラノーマ細胞のメラニン合成系遺伝子発現を変化させ、白斑誘導性フェノール類および代謝物に対する感受性の増強を図る。

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、2時間後の細

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 含量の測定により決定した。

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。

C. 研究結果

1. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた白斑誘導性フェノール類の代謝活性化の評価

昨年度の研究において、ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に一過性に高発現させた細胞に RD (0.1, 0.3, 1 mM) を 2 時間暴露すると、RD キノンのグルタチオンおよびシステイン付加体の濃度依存的な産生が培地および細胞で確認可能であること、4-S-システアミニルフェノール (4SCAP) についても同様であることを示した。

今年度は構造類似フェノール類についてさらに検討を行った。白斑誘導が知られるモノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH) (0.1, 0.2, 0.3 mM) を本細胞に曝露すると 2 時間後に MBEH オルトキノンのシステイン付加体が培地・細胞で、グルタチオン付加体は細胞でのみ検出された。また、職業性白斑の原因として知られる 4-tert ブチルフェノール (4-TBP) (0.1, 0.3, 0.6 mM) の場合には、グルタチオン付加体が培地・細胞に検出された。システイン付加体の検出はごく低レベルであった。MBEH、4-TBP のいずれもチロシナーゼ依存的な細胞毒性増強は認められなかった。

2. メラノーマ細胞 B16BL のメラニン合成系改変による細胞毒性評価

前期の研究において、高いレベルのチロシナーゼを発現するメラノーマ細胞 B16BL を阻害剤あるいは siRNA 処理し検討したが、チロシナーゼ依存の細胞毒性は 4SCAP のみ認められ、RD や MBEH、4-TBP については認められなかった。

今年度はメラニン合成系のチロシナーゼ下流遺伝子である TYRP1 をノックダウンし、チロシナーゼ代謝産物蓄積による細胞毒感受性の増強を試みた。

配列の異なる三種類の TYRP1 の siRNA で B16BL 細胞を処理したところ、いずれの場合にも 84-97% の効率的なノックダウンが達成された。4SCAP の細胞毒性に及ぼす影響は各 siRNA により異なっていた。siRNA#3 では中程度の毒性軽減 (45%) が観察されたが、TYR (チロシナーゼ)、TYRP2 発現もそれぞれ 70%、80% 低下していた。一方、siRNA#1 は TYR ならびに TYRP2 に影響せず、4SCAP の細胞毒性には全く影響を与えなかった。したがって、TYR の場合とは異なり、TYRP1 ノックダウンは 4SCAP の細胞毒性に影響しないと結論した。

D. 考察

今年度は、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」化を細胞で評価する方法として、[1]代謝物解析、[2]細胞毒性の評価に着目し、検討を進めた。

[1]代謝物解析: 白斑誘導性 4-置換フェノール類がチロシナーゼにより代謝され生じるオルトキノンは、細胞内 SH 基と反応性が高い。タンパク修飾は機能変化や抗原性付与により白斑との関連が予想されるが、分析は困難である。そこで代替マーカーとして非タンパク性のシステイン、グルタチオン付加体の分析を検討してきた。チロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いる方法について、昨年度は RD および 4SCAP で条件を確立し、今年度は白斑誘導性フェノール類 MBEH ならびに 4-TBP の検討を進め、オルトキノン代謝物のチオール付加体が検出可能であることを確認した。今後はさらに対象を広げ、化合物構造と白斑誘導能との相関を検討する予定である。

[2]細胞毒性評価については、オルトキノン体蓄積による細胞感受性の増強を期待し、メラノーマ細胞のチロシナーゼ下流遺伝子 TYRP1 のノックダウ

ンを試みた。しかしながら TYRP1 ノックダウンは 4SCAP の毒性発現に何の影響も与えないことが判明した。今後は TYRP2 や酸化ストレス関連遺伝子のノックダウンにより、細胞感受性の増強を試みる予定である。

E. 結論

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。

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