

厚生労働行政推進調査事業費補助金

**医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
政策研究事業**

**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**

平成28年度 総括研究報告書

(H27-医薬-指定-008)

研究代表者 最上 知子

平成29年3月

目 次

・ 総括研究報告	
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	
	最上 知子 1
・ 分担研究報告	
1 . 臨床からの原因究明(I)	
	石川 治 8
2 . 臨床からの原因究明(II) : 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 一朗 10
3 . 臨床からの原因究明(III) : ~日本人モデルマウスを使用した病態原因究明~	
	鈴木 民夫 12
4 . 安全性評価法の構築(I)	
	秋山 卓美 14
5 . 安全性評価法の構築(II)	
	伊藤 祥輔 22
4 . 安全性評価法の構築(III)	
	最上 知子 25
・ 研究成果の刊行に関する一覧表 29

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

研究代表者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症に関して、ロドデノールの代謝とメラノサイト傷害の可能性を示唆する報告がなされているが、病態や発症機序は未だ不明な点が多い。症例の多くは改善したが、拡大・難治性白斑も見いだされている。本研究では、基礎・臨床からの発症機序の解明を進め、白斑発症や個体差に重大な因子を明らかにし、試験方法を検討することにより、新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざす。

ロドデノール白斑患者および健常人検体の解析により、改善例、難治例に関わらず病変辺縁部においてグルタチオン合成酵素の有意な発現低下が認められた。また、尋常性白斑症例との自己抗体の違い、HLA-DA とチロシナーゼの直接会合によるメラニン産生抑制とロドデノールによる増強、皮膚炎や紫外線の影響、ロドデノール白斑モデルマウス病態への細胞接着分子の関連の可能性などの知見を得た。これらは発症機序やロドデノールの感受性の違いに関わることが考えられる。

安全性評価に関し、ロドデノールや白斑誘導性類似化合物はチロシナーゼによる代謝活性化が報告されている。化合物の代謝活性化をシステイン含有ペプチドとの結合により測定する方法について反応条件の検討を進めた。またロドデノール代謝物重合体(メラニン)を合成し細胞内での強い酸化促進作用を明らかにした。代謝活性化による細胞傷害仮説の検証を試みたが、チロシナーゼ高発現により 4-SCAP は毒性増強される一方、ロドデノールなどチロシナーゼ阻害剤はむしろ内因性チロシン代謝による細胞毒性を抑制する結果を得た。引き続き条件の至適化や、発症機序解明の成果を取り入れた試験系の改良を進め、化粧品成分・医薬部外品による新たな健康被害防止につなげる予定である。

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
片山一朗	大阪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
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	藤田保健衛生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
岩月啓氏	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学教授
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

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症問題に関しては、平成 25-26 年度の厚生労働科学研究「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑

症状の原因究明・再発防止に係る研究」(研究代表者:川西 徹)のほか、複数の研究組織から、白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失が報告され、ロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性の増強やそれに由来するメラノサイト傷害の機序が提唱されている。白斑患者の多くは使用中により症状の改善がみられるものの、塗布部以外にも白斑が波及する難治性白斑も報告されており、病態形成機序は未だ不明である。

本研究では、原因究明をさらに進め、患者および正常人検体を免疫組織学的に解析し、白斑症状の進行の個体差や病態を明らかにする。また独自開発したロドデノール白斑モデルマウスを使用して病態解明を行う。

ロドデノールをはじめとする白斑誘導性類似化合物は共通してチロシナーゼによる代謝活性化を受けることが報告されている。本研究では、代謝活性化とメラノサイトの傷害との関わりについて、[I] 個体差の大きいメラノサイトに代替する細胞モデルを構築、[II]代謝物重合体(メラニン)を合成し、解析を行う。また代謝産物オルトキノンは反応性が高く極めて不安定であり、直接の測定は困難である。本研究では[III]代謝産物オルトキノンをSH基を持つ化合物と反応させて測定する方法の確立を試みた。代謝活性化によるチオール基の修飾反応は、毒性や抗原性の発現への関わりが予想される。そこで感作代替試験 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)用システイン含有ペプチドとの結合により測定する方法を検討する。

B. 研究方法

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

これまでの研究でロドデノールによるメラノサイト傷害性にグルタチオンによる抗酸化作用が関与することが示唆されている。そこで本研究では、ロドデノール配合薬用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、グルタチオン合成酵素(GCLC)の発現を免疫組織学的に比較解析する。(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は含めず、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]

培養メラノサイトへのロドデノールの分子学的な影響を測定すると同時に患者皮膚生検サンプルや血液を用いてメラノサイトやリンパ球サブセット、自己抗体を解析する。また紫外線がメラノサイトの機能、メラニン産生へ与える影響を検討した。(倫理面への配慮)ロドデノール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13421-2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. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

脱色素斑を発症した患者、および健常人より皮膚片を採取し、その皮膚片からメラノサイトとケラチノサイトをそれぞれ培養し、この培養細胞を使用して感受性や免疫応答に関わる分子の発現等を解析する。また、日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布して作成したロドデノール白斑モデルマウスの白斑解析を行い、病態解明を行う。(倫理面への配慮)患者の試料を集めるために倫理委員会に研究計画を申請して、承認を得ている。また、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[III]:代謝活性化評価法 [秋山]

4-置換フェノール類のチロシナーゼによる代謝とシステイン含有ペプチドとの反応について、測定

条件を検討した。OECD 感作性試験代替法 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) で使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys)はマッシュルーム由来チロシナーゼと混合してインキュベートし、酢酸酸性にして反応を止めた試験溶液を、ODS カラムを用い、トリフルオロ酢酸含有アセトニトリル溶液を移動相とした LC/MS によって分析した。

5. 安全性評価[III]:代謝物の解析 [伊藤]

ロドデノール (RD) に由来するメラニンによる細胞内抗酸化剤の酸化的枯渇を通常のメラニンと比較検討した。RD-ユーメラニン (RD-EM) および Dopa-ユーメラニン (Dopa-EM) は RD あるいは Dopa をチロシナーゼで 4 時間酸化し、RD-フェオメラニン (RD-PM) および Dopa-フェオメラニン (Dopa-PM) の場合はシステイン共存下で反応し調製した。引き続きグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいは NADH と反応させ、抗酸化物質の残存量は HPLC 法にて定量した。また、酸化により生成した酸化型グルタチオンおよびシスチンも合わせて定量した。

6. 安全性評価[II]:細胞評価法 [最上]

ロドデノールおよび白斑誘導性類似化合物の細胞毒性発現におけるチロシナーゼ代謝の役割を、293T 細胞にヒトチロシナーゼを強制発現し解析した。ヒトチロシナーゼを用いた代謝試験に利用するために、膜貫通領域を欠く可溶性ヒトチロシナーゼの発現・精製法を検討した。

C. 研究結果

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川・安田]

ロドデノールによる白斑を生じた症例のうち、改善 23 例、難治 17 例の白斑病変辺縁部と尋常性白斑 2 例、正常皮膚 10 例に対し、抗 GCLC 抗体、抗 MART-1 抗体で染色し、MART-1 あたりの GCLC シグナルを定量した。その結果、改善例病変辺縁部 0.602、難治例 0.646 に対し正常

皮膚 1.16 ($P < 0.01$) で、改善例、難治例に関わらず病変辺縁部において有意に GCLC の発現が低下していた。

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]

尋常性白斑で甲状腺抗体、MCHR-1、TYRP2 に対する自己抗体を認めた。ロドデノール白斑では上記自己抗体は認めなかった。HLA-DR とチロシナーゼの直接会合がメラニン産生を抑制する機序を見出した。ロドデノールはさらにその効果を増強した。皮膚炎や紫外線の影響でロドデノールがメラノサイト毒性以下の濃度でメラノサイトに負の影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの影響にはロドデノールの NF- κ B 抑制経路が関与する可能性が考えられた。

3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

患者およびボランティアからの生検標本を使用して免疫組織化学的な解析を行い、ストレス応答に関する分子の発現を解析した。その結果、患者群では、グルタチオン合成系の遺伝子発現誘導が健常人に比べ、低下している結果が得られた。

モデルマウスの解析では、白斑形成、ならびに色素再生に細胞接着分子がかかわっていること、また、紫外線と VitD3 軟膏は色素再生増強作用があること、色素再生が認められた部位にも認められない白斑部もメラノサイトの遊走は認められた。

4. 安全性評価:代謝活性化評価法 [秋山]

ロドデノールを含め白斑誘導性類似化合物はチロシナーゼによる代謝活性化が知られている。Raspberry ketone (RK)、hydroquinone monobenzyl ether (MBEH) 及び 4-tert-butylphenol (4-TBP) は、マッシュルームチロシナーゼ及び DPRA(Cys) との反応後、いずれもロドデノール

(RD)と同様に減少し、ペプチドと結合したカテコール又はそのフラグメントが検出された。終濃度 0.1–0.5 mmol/L の RD を基質とした反応において、RDの減少速度は初期 RD 濃度に比例し、また DPRA(Cys)の減少速度もほぼ同じであることから、この濃度範囲でチロシナーゼによる酸化を評価できると考えられた。基質濃度を 0.3 mmol/Lとした反応において RD 及び RK はいずれも反応開始後 30 分まで経時的に減少した。

5. 安全性評価:代謝物の解析[伊藤]

チロシナーゼ代謝物の重合により生じるロドデノール(RD)-EM は Dopa-PM とほぼ同速度でグルタチオンおよびシステインを酸化した。生成物の大半は酸化型グルタチオンおよびシステインであった。また、同時に H₂O₂ の産生が確認された。RD-PM および Dopa-EM の酸化活性は、RD-EM、Dopa-PM の 2 分の 1 程度であった(図 1)。RD-EM は、アスコルビン酸および NADH についても効率よく酸化した。

6. 安全性評価:細胞評価法 [最上]

白斑誘導性 4-置換フェノール類(ロドデノールや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)、4-SCAP など)はチロシナーゼにより代謝活性化される。代謝産物によるメラノサイト傷害仮説を検証するために、293T 細胞にヒトチロシナーゼを発現すると、4-SCAP の細胞毒性が顕著に増強された。しかし、ロドデノールや 4-TBP、MBEH などチロシナーゼ阻害作用を有する化合物は内在性チロシン代謝による毒性発現をむしろ抑制する効果を示すことが判明した。

代謝活性化試験において、マッシュルームチロシナーゼに替えてヒトチロシナーゼを用いるために、その可溶性型の調製を検討した。ヒトチロシナーゼの膜貫通領域を欠きシグナルペプチドを含むアミノ酸残基 1-456 を GS リンカーで His タグと結合し、293T 細胞に発現させた。分泌さ

れる活性を維持した可溶性ヒトチロシナーゼを簡易に精製する方法を確立した。

D. 考察

1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

グルタチオン合成酵素(GCLC)の発現低下は、グルタチオン合成能の低下を意味する。ロドデノールによる白斑を生じた症例では改善例、難治例に限らず、GCLC 発現が低下しており、また、発症後 1 年以上経った検体でも低下していることから、患者は元々 GCLC の発現が低いために、抗酸化作用が弱く、ロドデノールによるメラノサイト傷害を受けやすい個体であったことが推測される。今後さらに検体数を増やし、解析を進める予定である。

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]

ロドデノール誘発白斑では今まで知られている細胞毒性以外にメラノサイトのオートファジーの状態が関与する事が考えられた。また、通常の尋常性白斑と異なるメラノサイト異常や免疫学的な機構の関与が疑われた。さらにメラノサイトに対するロドデノールの毒性が紫外線で増強する可能性が明らかとなり、紫外線ストレスへの反応性の個人差が、発症率に影響している可能性が考えられた。

3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

ロドデノール感受性は、グルタチオン合成系の遺伝子発現が関わっていることが示唆された。

ロドデノール脱色素斑モデルマウスを使用した本研究により紫外線や VitD3 軟膏は、ロドデノール白斑に対して有効な治療法になりうることが示された。

4. 安全性評価:代謝活性化評価法[秋山]

白斑症例の原因物質として報告がある 4-置換フェノールはいずれもチロシナーゼ共存下システイン含有ペプチドと結合し、RD を基質とした反応で

RD 及び DPRA(Cys)の減少速度が RD の初期濃度及び時間に依存していたことから、チロシナーゼによる代謝活性化を評価する検出法としての条件の一部が満たされた。

5. 安全性評価:代謝物の解析 [伊藤]

ロドデノール(RD)はチロシナーゼにより酸化されて、細胞傷害性の高いオルトキノンを産生する。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、付加体を形成する。これが RD によるメラノサイト傷害性の主要な機序と考えられる。しかし、B16 メラノームを用いた実験では、上記の代謝に加え、RD 由来のメラニンが産生することが確認されている。一方、天然のフェオメラニンは強い酸化促進作用を持つことが近年明らかにされた。そこで今回、RD-EM および RD-PM を調製し、その酸化促進作用を調べた。その結果、RD-EM の酸化促進作用は、フェオメラニンに匹敵することが分かった。

6. 安全性評価:細胞評価 [最上]

白斑誘導性フェノール類に共通するメラノサイト傷害の機構として、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化と毒性増強が想定されている。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強制発現細胞を検討したが、予想通りチロシナーゼによる細胞毒性増強が観察されたのは 4-SCAP のみで、ロドデノール、4-TBP、MBEH ではむしろ内因性チロシン代謝による毒性を抑制する「チロシナーゼ阻害作用」が観察された。各化合物のチロシナーゼへの基質/阻害作用のバランスの違いが異なる結果をもたらしたと推定している。メラノサイトでは、チロシナーゼは下流のメラニン合成酵素とともにメラノソームに局在する。今後、白斑誘導性化合物の毒性発現におけるメラノソームや下流経路が役割を有する可能性、あるいは細胞毒性以外のエンドポイントが白斑と相関する可能性など、今後検討の必要がある

と考えられる。

E. 結論

ロドデノール白斑の発症機序解明のため、患者検体とモデルマウスからの試料を使い、多面的に病態解明を行った。症例におけるグルタチオン合成酵素の低下、ロドデノールの個体による影響の違いに關与すると考えられる分子機構・免疫異常が明らかになった。白斑発症機構は単一の要因では説明がつかないことから、各研究のさらなる展開が望まれる。

安全性評価法の確立に向け、白斑誘導性化合物のチロシナーゼによる代謝活性化と細胞毒性との関係、代謝物の酸化促進作用を解析するとともに、代謝活性化をシステイン含有ペプチドとの結合反応により測定する方法を検討した。改良を進め、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

Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H: Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol.* 2016;1(6):16054.

Terao M, Itoi S, Matsumura S, Yang L, Murota H, Katayama I:Local Glucocorticoid Activation by 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 in Keratinocytes: The Role in Hapten-Induced Dermatitis. *Am J Pathol.* 2016;186(6):1499-510.

Shindo S, Murota H, Katayama I:Possible association of pigmentary demarcation line with cervical conization and contraceptives. *J Dermatol.* 2016;43(12):1444-5.

Arase N, Yang L, Tanemura A, Yang F, Suenaga T, Arase H, Katayama I:The effect of rhododendrol inhibition of NF- κ B on melanocytes in the presence

of tyrosinase. *J Dermatol Sci.* 2016;83(2):157-9.

Itoi-Ochi S, Terao M, Murota H, Katayama I: Local corticosterone activation by 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in keratinocytes: the role in narrow-band UVB-induced dermatitis. *Dermatoendocrinol.* 2016;8(1):e1119958.

Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S: Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(28):E4061-8.

Terao M, Katayama I: Local cortisol / corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci.* 2016;84(1):11-6.

Tanaka A, Ikinaga K, Kiyohara E, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Fujimura R, Mizui M, Isaka Y, Katayama I: Critical renal adverse event induced by nivolumab therapy in a stage IV melanoma patient. *J Dermatol.* 2016

Abe Y, et al: Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci.* 81(1): 35-43 (2016)

Hayashi M, et al: A novel three dimensional imaging method for the measurement of area in vitiligo and chemical leukoderma. *J Dermatol Sci.* 84(2):219-221 (2016)

Okamura K, et al: Microsatellite polymorphism located immediately upstream of the phosphatidylinositol glycan, class K gene (PIGK) affects its expression, which correlates with tyrosinase activity in human melanocytes. *J Dermatol Sci.* 85(2):131-134 (2017)

Gan EY, et al: Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30(1):28-40 (2017)

Ito S., Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30, 63-67, 2016.

Ito S., Hinoshita M, Suzuki E, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing raspberry ketone produces

(E)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 859-868, 2017.

2. 学会発表

Katayama I, Yang L, Yang F, Kotobuki Y, Murota H, Tanemura A, Wataya-Kaneda M: Breakdown of skin homeostasis in the pathogenesis of autoimmune vitiligo. The 7th Annual Meeting of Korean Society of Vitiligo The 1st Meeting of East Asia Vitiligo Association. Korea (2016.4.16)

楊飛、金田眞理、室田浩之、小野慧美、楊伶俐、片山一朗: The mechanism of diminishing sweating in patients with tuberous sclerosis. 第43回皮膚かたち研究会 東京 (2016.6.19)

荒瀬規子 種村篤 楊伶俐 楊飛 西岡めぐみ 高橋彩 片山一朗: ロドデノール白斑発症機構の解析 第27回日本色素細胞学会シンポジウム 岐阜 (2016.11.12-13)

Tanemura A, Tanaka A, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I, Oiso N. Leukoderma lesion in extra-mammary paget's disease. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Yang F, Yang L, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Katayama I. Patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Katayama I, Takahashi A, Yang F, Yang L, Arase N, Tanemura A, Kaneda M. Mast cell activation promotes possible transient hypermelanosis of the perilesional skin in rhododendrol-induced-leukoderma. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Arase N, Tanemura A, Yang L, Jin H, Nishioka M, Yang F, Aoyama Y, Suenaga T, Arase H, Katayama I. Immunological analysis of the patients with vitiligo vulgaris and rhododendrol-induced leukoderma. 第41回日本研究皮膚科学会総会 仙台 (2016.12.9-11)

谷田佳世、その他: 眼皮膚白皮症2型(OCA2)の1例、宮城地方会第373回例会、宮城県建設産業会館、2016年3月5日

鈴木民夫: 日本人の皮膚色決定にかかわる遺伝子、北海道地方会第405回例会、ホテルロイトン札

幌、2016年3月19日

Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Masakazu Kawaguchi, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu, Kayoko Matsunaga, Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin: 1st meeting of the East-Asia Vitiligo Association. Severance Hospital, Seoul, Korea, April 16, 2016

Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu: Rhododendrol-induced leukoderma analyzed with a model mouse: VITILIGO INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2016, the hotel NH Vittorio Veneto, Roma, Dec. 2-3, 2016

秋山卓美, 清水久美子, 伊藤祥輔, 内野正, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol のシステ

イン含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年7月)

秋山卓美, 清水久美子, 富田由花, 伊藤祥輔, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol 及び構造類似化合物の Cys 含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 日本薬学会第137年会(2017年3月)

伊藤祥輔, 黄倉真恵, 若松一雅, 山下利春. ロドデノールユーメラニンは強い酸化促進作用をもつ. 第27回日本色素細胞学会. 平成28年11月12日. 岐阜

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

臨床からの原因究明 (I)

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

研究協力者 安田正人 群馬大学医学部附属病院皮膚科 講師

研究要旨:

これまでの研究において、ロドデノールによるメラノサイト傷害性にグルタチオンによる抗酸化作用が関与することが示唆されている。本研究では、グルタチオン合成酵素(GCLC)に着目し、患者から採取された病変部検体と正常人検体における GCLC について免疫組織学的に解析した。GCLC の発現は正常皮膚検体と比べ、改善例、難治例に関わらず白斑辺縁部の皮膚のメラノサイトで有意に低下しており、発症から 1 年以上経ってから採取された検体でも低いいため、ロドデノールによる白斑症状を生じる個体は、元々メラノサイトの GCLC の発現が低い可能性が示唆された。

A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑の病態は徐々に明らかになってきているが、ロドデノールを使用しても全例が白斑を生じるわけではないことや、通常中止後は改善する白斑が中止後も拡大する症例や新たに白斑を生じる難治例があり、未だ不明な点も多い。本研究では、これまで患者から採取された病変部検体、ならびに難治性白斑を呈する患者の検体、正常人検体を免疫組織学的に解析することで、白斑症状の進行の個体差や病態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

これまでの研究でロドデノールによるメラノサイト傷害性にグルタチオンによる抗酸化作用が関与することが示唆されている。そこで本研究では、ロドデノール配合薬用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、グルタチオン合成酵素(GCLC)の発現を免疫組

織学的に比較解析する。

(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。

C. 研究結果

ロドデノールによる白斑を生じた症例のうち、改善23例、難治17例の白斑病変辺縁部と尋常性白斑2例、正常皮膚10例に対し、抗GCLC抗体、抗MART-1抗体で染色し、MART-1あたりのGCLCシグナルを定量した。その結果、改善例病変辺縁部0.602、難治例0.646に対し正常皮膚1.16 ($P<0.01$)で、改善例、難治例に関わら

ず病変辺縁部において有意に GCLC の発現が低下していた。

D. 考察

GCLC の発現低下は、グルタチオン合成能の低下を意味する。ロドデノールによる白斑を生じた症例では改善例、難治例に限らず、GCLC 発現が低下しており、また、発症後 1 年以上経った検体でも低下していることから、患者は元々 GCLC の発現が低いために、抗酸化作用が弱く、ロドデノールによるメラノサイト傷害を受けやすい個体であったことが推測される。今後さらに検体数を増やし、解析を進める予定である。

E. 結論

GCLC の発現の個体差が、ロドデノールによる白斑を生じる一因となっている可能性がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

臨床からの原因究明 (II):
機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析

研究分担者 片山 一郎 大阪大学教授

研究要旨: 尋常性白斑で甲状腺抗体、MCHR-1、TYRP2 に対する自己抗体を認めた。ロドデノール白斑では上記自己抗体は認めなかった。HLA-DR とチロシナーゼの直接会合がメラニン産生を抑制する機序を見出した。ロドデノールはさらにその効果を増強した。皮膚炎や紫外線の影響でロドデノールがメラノサイト毒性以下の濃度でメラノサイトに負の影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの影響にはロドデノールの NF- κ B 抑制経路が関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

本研究ではロドデノール含有化粧品が白斑を使用者の一部にのみ発症した個体差を分子的に解析し発症原因を明らかにする事で化粧品成分の安全性評価法を一般化する事を目的とする。

B. 研究方法

培養メラノサイトへのロドデノールの分子学的な影響を測定すると同時に患者皮膚生検サンプルや血液を用いてメラノサイトやリンパ球サブセット、自己抗体を解析する。

また紫外線がメラノサイトの機能、メラニン産生へ与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

ロドデノール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 13421-2 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。

C. 研究結果

尋常性白斑で甲状腺抗体、MCHR-1、

TYRP2 に対する自己抗体を認めた。ロドデノール白斑では上記自己抗体は認めなかった。HLA-DR とチロシナーゼの直接会合がメラニン産生を抑制する機序を見出した。ロドデノールはさらにその効果を増強した。皮膚炎や紫外線の影響でロドデノールがメラノサイト毒性以下の濃度でメラノサイトに負の影響を及ぼす可能性が考えられた。これらの影響にはロドデノールの NF- κ B 抑制経路が関与する可能性が考えられた。

D. 考察

ロドデノール誘発白斑では今まで知られている細胞毒性以外にメラノサイトのオートファジーの状態が関与する事が考えられた。また、通常の尋常性白斑と異なるメラノサイト異常や免疫学的な機構の関与が疑われた。さらにメラノサイトに対するロドデノールの毒性が紫外線で増強する可能性が明らかとなり、紫外線ストレスへの反応性の個人差が、発症率に影響している可能性が考えられた。

E. 結論

本研究でロドデノールの個体による影響の違いに関与すると考えられる分子機構・免疫異常が明

らかとなった。ロドデノール白斑発症機構は単一の要因では説明がつかない事からこれらの研究をさらに有機的に結びつける事により病因を明らかにできると考える。今後、これらの成果が患者の症状改善に繋がる事を期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H: Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol.* 2016;1(6):16054.

Terao M, Itoi S, Matsumura S, Yang L, Murota H, Katayama I: Local Glucocorticoid Activation by 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 in Keratinocytes: The Role in Hapten-Induced Dermatitis. *Am J Pathol.* 2016;186(6):1499-510.

Shindo S, Murota H, Katayama I: Possible association of pigmentary demarcation line with cervical conization and contraceptives. *J Dermatol.* 2016;43(12):1444-5.

Arase N, Yang L, Tanemura A, Yang F, Suenaga T, Arase H, Katayama I: The effect of rhododendrol inhibition of NF- κ B on melanocytes in the presence of tyrosinase. *J Dermatol Sci.* 2016;83(2):157-9.

Itoi-Ochi S, Terao M, Murota H, Katayama I: Local corticosterone activation by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in keratinocytes: the role in narrow-band UVB-induced dermatitis. *Dermatoendocrinol.* 2016;8(1):e1119958.

Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S: Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(28):E4061-8.

Terao M, Katayama I: Local cortisol / corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci.* 2016;84(1):11-6.

Tanaka A, Ikinaga K, Kiyohara E, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Fujimura R, Mizui M, Isaka Y, Katayama I: Critical renal adverse event induced by nivolumab therapy in a stage IV melanoma patient. *J Dermatol.* 2016

2. 学会発表

Katayama I, Yang L, Yang F, Kotobuki Y, Murota H, Tanemura A, Wataya-Kaneda M: Breakdown of skin homeostasis in the pathogenesis of autoimmune vitiligo. The 7th Annual Meeting of Korean Society of Vitiligo The 1st Meeting of East Asia Vitiligo Association. Korea (2016.4.16)

楊飛、金田眞理、室田浩之、小野慧美、楊伶俐、片山一郎: The mechanism of diminishing sweating in patients with tuberous sclerosis. 第43回皮膚かたち研究会 東京 (2016.6.19)

荒瀬規子 種村篤 楊伶俐 楊飛 西岡めぐみ 高橋彩 片山一郎: ロドデノール白斑発症機構の解析 第27回日本色素細胞学会シンポジウム 岐阜 (2016.11.12-13)

Tanemura A, Tanaka A, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I, Oiso N. Leukoderma lesion in extra-mammary paget's disease. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Yang F, Yang L, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Katayama I. Patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Katayama I, Takahashi A, Yang F, Yang L, Arase N, Tanemura A, Kaneda M. Mast cell activation promotes possible transient hypermelanosis of the perilesional skin in rhododendrol-induced-leukoderma. Vitiligo International Symposium, Rome (2016.12.2-3)

Arase N, Tanemura A, Yang L, Jin H, Nishioka M, Yang F, Aoyama Y, Suenaga T, Arase H, Katayama I. Immunological analysis of the patients with vitiligo vulgaris and rhododendrol-induced leukoderma. 第41回日本研究皮膚科学会総会 仙台 (2016.12.9-11)

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

臨床からの原因究明 (III)
～日本人モデルマウスを使用した病態原因究明～

研究分担者 鈴木民夫 山形大学医学部皮膚科学講座 教授

研究要旨:

ロドデノールに対する感受性の違いを決定している因子を明らかにする目的で患者試料を収集して現在解析している。また、ロドデノール白斑モデルマウスを使って病態解明を行い、細胞接着分子の関連性が疑われる結果が得られ、現在さらに解析中である。

A. 研究目的

これまでの研究の報告により、ロドデノールに対する感受性が患者によって異なっていることが明らかとなっている。そこで、この感受性の違いをもたらす原因を明らかにする。また、我々が独自に開発した日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布して作成したロドデノール白斑モデルマウスを使用して病態解明を行う。

B. 研究方法

脱色素斑を発症した患者、および健常人より皮膚片を採取し、その皮膚片からメラノサイトとケラチノサイトをそれぞれ培養し、この培養細胞を使用して感受性や免疫応答に関わる分子の発現等を解析する。

また、日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布して作成したロドデノール白斑モデルマウスの白斑解析を行い、病態解明を行う。

(倫理面への配慮)

患者の試料を集めるために倫理委員会に研究計画を申請して、承認を得ている。

また、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。

C. 研究結果

患者およびボランティアからの生検標本を使用して免疫組織化学的な解析を行い、ストレス応答に関する分子の発現を解析した。その結果、患者群では、グルタチオン合成系の遺伝子発現誘導が健常人に比べ、低下している結果が得られた。

モデルマウスの解析では、白斑形成、ならびに色素再生に細胞接着分子がかかわっていること、また、紫外線と VitD3 軟膏は色素再生増強作用があること、色素再生が認められた部位にも認められない白斑部もメラノサイトの遊走は認められた。

D. 考察

ロドデノール感受性は、グルタチオン合成系の遺伝子発現が関わっていることが示唆された。

RD 脱色素斑モデルマウスを使用した本研究により紫外線や VitD3 軟膏は、ロドデノール白斑に対して有効な治療法になりうることが示された。

E. 結論

患者からの試料とモデルマウスからの試料を使

って、多面的に病態解明を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe Y, et al: Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci.* 81(1): 35-43 (2016)

Hayashi M, et al: A novel three dimensional imaging method for the measurement of area in vitiligo and chemical leukoderma. *J Dermatol Sci.* 84(2):219-221 (2016)

Okamura K, et al: Microsatellite polymorphism located immediately upstream of the phosphatidylinositol glycan, class K gene (PIGK) affects its expression, which correlates with tyrosinase activity in human melanocytes. *J Dermatol Sci.* 85(2):131-134 (2017)

Gan EY, et al: Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30(1):28-40 (2017)

2. 学会発表

谷田佳世、その他: 眼皮膚白皮症 2 型(OCA2)の 1

例、宮城地方会第 373 回例会、宮城県建設産業会館、2016 年 3 月 5 日

鈴木民夫: 日本人の皮膚色決定にかかわる遺伝子、北海道地方会第 405 回例会、ホテルロイトン札幌、2016 年 3 月 19 日

Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Masa-kazu Kawaguchi, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu, Kayoko Matsunaga, Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin: 1st meeting of the East-Asia Vitiligo Association. Severance Hospital, Seoul, Korea, April 16, 2016

Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu: Rhododendrol-induced leukoderma analyzed with a model mouse: VITILIGO INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2016, the hotel NH Vittorio Veneto, Roma, Dec. 2-3, 2016

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

安全性評価法の構築(I)

研究分担者 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

研究要旨:

メラノサイト中のチロシナーゼを阻害することによるメラニン生成抑制を唱って薬用化粧品に配合された rhododendrol (RD) により化粧品の使用者の皮膚に白斑が生じる事例が多数発生した。RD をはじめとする白斑誘導性 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼにより酸化されて *o*-キノンを生じることが報告されている。チロシナーゼによる酸化をペプチドへの結合を利用して検出する試験法の開発を検討した。

4 置換フェノールを基質として Direct Peptide Reactivity Assay 用システイン含有ペプチド (DPRA(Cys)) 及びマッシュルーム由来チロシナーゼと混合しインキュベートしたところ, raspberry ketone (RK), hydroquinone monobenzyl ether (BzP) 及び 4-*tert*-butylphenol (TBP) はいずれも RD と同様に減少し, ペプチドと結合したカテコール又はそのフラグメントが検出された。

終濃度 0.1–0.5 mmol/L の RD を基質とした反応において, RD の減少速度は初期 RD 濃度に比例し, また DPRA(Cys) の減少速度もほぼ同じであることから, この濃度範囲でチロシナーゼによる酸化を評価できると考えられた。基質濃度を 0.3 mmol/L とした反応において RD 及び RK はいずれも反応開始後 30 分まで経時的に減少した。

白斑症例の原因物質として報告がある 4-置換フェノールはいずれもチロシナーゼ共存下システイン含有ペプチドと結合し, RD と DPRA(Cys) の減少に濃度依存性と時間依存性が見られたことから, チロシナーゼによる代謝活性化を検出する試験法としての条件の一部が満たされた。

研究協力者 伊藤祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部名誉教授

A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売した rhododendrol (ロドデノール, RD, 図 1) を配合した薬用化粧品は, 薬事・食品衛生審議会化粧品・医薬部外品部会における審議を踏まえ, 平成 20 年 1 月に「メラニンの生成を抑え, しみ, そばかすを防ぐ等」の効能効果で承認されたものである。使用後に白斑(肌がまだらに白くなった状態)になったとの報告が寄せられ, 平成 25 年 7 月 4 日から製造販売業者が自主回収を実施した。その後 1

万 7 千人以上の被害者が確認されていることから, 原因究明が強く求められているのに加えて, 薬用化粧品の安全性確保のため, 配合成分の白斑誘導能を評価できる試験方法の開発が望まれている。

一方, RD は, メラノサイトにおいて tyrosine の酸化を触媒するチロシナーゼを競合的に阻害してメラニン生合成を抑制するとされているが, tyrosine と同様の 4-置換フェノールの構造を持つ RD 自身もチロシナーゼによる酸化的代謝を受けることを, 本研究に先だって行った厚生労働科学研究(「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」)の分担研究「原因

究明に関する調査研究¹⁾で明らかにした。試験管内反応とメラノサイトへの投与によりRDからカテコールである 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (RD catechol) への変換が確認された。チロシナーゼにより *o*-キノンに酸化され、還元によりカテコールが生成したと考えられた。このチロシナーゼによる酸化を検出する試験法の開発を検討した。不安定な *o*-キノンにシステイン含有ペプチドを結合させて安定化する方法を検討した。ペプチドとして、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)法で用いられるペプチド DPRA(Cys)を用いた。

B. 研究方法

1. 試料および試薬

rhododendrol (RD) はカネボウより提供頂いた。raspberry ketone (RK) は和光純薬工業より、hydroquinone monobenzyl ether (BzP) は Fluka より、4-*tert*-butylphenol (TBP) 及びマッシュルーム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 社より購入した。

システインペプチド DPRA(Cys) (Ac-RFAACAA) はスクラムより購入した。

2. 反応生成物の検出

112 μL の 50 mmol/L KPB (pH6.5) と 166.5 μL の超純水を加え、1.0 μL の 30 mmol/L 基質溶液を加えた後、22.5 μL の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。3.0 μL の 2.0×10^3 units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5) を加えて 25 で 0–360 分間インキュベートした。200 μL の 0.5% 酢酸を加えて 0.2 μm のフィルターでろ過した。

3. 基質濃度依存性の検討

109 μL の 50 mmol/L KPB (pH6.5) に基質溶液との合計が 167.5 μL となる量の超純水を加え、5.0, 10.0, 15.0, 20.0 又は 25.0 μL の 6 mmol/L 基質溶液を加えた後、22.5 μL の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。1.0 μL の 1.0×10^4

units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5) を加えて 25 で 30 分間インキュベートした。200 μL の 0.5% 酢酸を加えて 0.2 μm のフィルターでろ過した。

4. 時間依存性の検討

300 μL の 50 mmol/L KPB (pH6.5) と 484.5 μL の超純水を混合し、45 μL の 6 mmol/L 基質溶液及び 67.5 μL の 6.67 mmol/L DPRA(Cys) を加えて混合した。179 μL を採取し、0.6 μL の 50 mmol/L KPB (pH6.5) と 120 μL の 0.5% 酢酸を加えて 0.2 μm のフィルターでろ過した。残った反応液に 2.4 μL の 1.0×10^4 units/mL マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5) を加えて 25 でインキュベートした。10, 20, 及び 30 分後に 180 μL を採取し、120 μL の 0.5% 酢酸を加えて 0.2 μm のフィルターでろ過した。

4. LC/MS

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters) を用いた。LC/MS 条件は以下の通り。

(1) 条件 1

カラム, ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 mm i.d. \times 100 mm; particle size, 1.7 μm ; Waters); カラム温度, 30 ; 移動相 A, 0.02% TFA in water; 移動相 B, 0.02% TFA in acetonitrile; 流量, 0.35 mL/min. Gradient: 0–2 min, 10%B; 2–12 min, 10–25%B; 12–13 min, 25–90%B; 13–15 min, 90%B; 15–15.5 min, 90–10%B; 15.5–20 min, 10%B. イオン化, ESI positive; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 10 又は 30 V; ソース温度, 150 ; 脱溶媒温度, 400 ; 脱溶媒ガス流量, 800 L/hr; コーンガス流量, 50 L/hr; 検出, SCAN mode (m/z 50–2000) 又は SIR (m/z 751.5 for DPRA(Cys), 857.5 for BzP product, 915.0 for TBP product, 929.6 for RK product, 931.6 for RD product) .

(2) 条件 2

カラム, ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm i.d. \times

50 mm; particle size, 1.7 μm ; Waters); カラム温度, 40 ; 移動相 A, 0.02% TFA in water; 移動相 B, 0.02% TFA in acetonitrile; 流量, 0.35 mL/min. Gradient: 0–2 min, 10%B; 2–42 min, 10–70%B; 42–43 min, 70–90%B; 43–45 min, 90%B; 45–45.5 min, 90–10%B; 45.5–50 min, 10%B. イオン化, ESI positive; キャピラリー電圧, 3.0 kV; コーン電圧, 10 又は 30 V; ソース温度, 150 ; 脱溶媒温度, 400 ; 脱溶媒ガス流量, 800 L/hr; コーンガス流量, 50 L/hr; 検出, SIR (m/z 751.5 for DPRA(Cys), 929.6 for RK product, 931.6 for RD product).

C. 研究結果

1. 反応生成物の検出

RD, RK, BzP 及び TBP を DPRA(Cys) 及びチロシナーゼと混合して 30 で 360 分間インキュベートした. 酢酸を加えて反応を止め, LC/MS により分析した. PDA クロマトグラムにおいていずれの反応についても基質及び DPRA(Cys) のピーク面積が減少した. また, PDA クロマトグラム, SCAN 分析における TIC, SIR 分析における TIC のいずれかにおいて新たなピークの出現が確認された. SCAN 分析の結果から, これらの新たなピークのマススペクトルのベースピークは, RD, RK, BzP, TBP の反応液について, それぞれ m/z 931, 929, 857, 915 であると判明した.

RD, RK 及び TBP について検出されたイオンは対応するカテコールが結合したペプチドの $[M + H]^+$ と考えられた (図 1A, B, D). BzP は図 1C に示すようなフラグメントと考えられる.

2. Rhododendrol の反応条件

DPRA 法と同様に単一の基質濃度で行うことが望ましいため, 適切な基質濃度の設定を目的として, 反応に与える基質濃度の影響を検討した.

DPRA 用システイン含有ペプチド (DPRA(Cys)) は終濃度 0.5 mmol/L (150 nmol), 終濃度 0.1–0.5 mmol/L (30–150 nmol) の RD と

混合し, 終濃度 33 units/mL マッシュルーム由来チロシナーゼを加えて反応液量を 0.3 mL として 25 で 30 分間インキュベートし, 0.2 mL の 0.5% 酢酸を加えて反応を止め, ろ過して検液とした.

検液を HPLC で分析して RD と DPRA(Cys) の残存濃度を求め, 図 2A に示した. 初期濃度から残存濃度を引いた値から減少速度 ($\text{mol/L}\cdot\text{s}$) を求め, 図 2B に示した. RD の減少速度は RD 初期濃度に比例していることから, 基質濃度は酵素濃度に対して十分低いと言える. また, DPRA(Cys) の減少速度もほぼ同じであることから, 生成した *o*-キノンが速やかにペプチドと結合していることがわかる.

以上より, 終濃度 0.1–0.5 mmol/L の範囲であればチロシナーゼによる酸化とペプチドへの結合を評価できると考えられた. この範囲の中央の基質濃度 0.3 mmol/L, DPRA(Cys) 濃度 0.5 mmol/L, チロシナーゼ量 33 units/mL を反応条件と設定した.

2. Rhododendrol の反応性及び時間依存性

次に rhododendrol の反応性を検討した. rhododendrol を DPRA 用システイン含有ペプチド (DPRA(Cys)) およびマッシュルーム由来チロシナーゼと混合してインキュベートし, チロシナーゼ添加前 (0 分), 添加後 10, 20, 30 分に一部を取り, ODS カラムを用いた LC/MS により分析した.

0 分と 30 分の PDA クロマトグラムを図 3A に示す. 30 分では 0 分と比較して RD 及び DPRA(Cys) のピークの減少が見られ, 結合ペプチドの生成が見られている.

0, 10, 20, 30 分の反応液を分析し, RD 及び DPRA(Cys) の残存率と反応時間の関係を図 3B のグラフに示した. 時間依存的に減少していることがわかる.

3. Raspberry ketone の反応性

raspberry ketone について同様の検討を行っ

た。DPRA(Cys)を用いない場合、30分のPDAクロマトグラムでは、0分のものと比較してRK及びDPRA(Cys)のピークの減少が見られ、新たなピークの生成が見られている(図4A)。

0, 10, 20, 30分の反応液を分析し、RK及びDPRA(Cys)の残存率と反応時間の関係を図4Bのグラフに示した。時間依存的に減少していることがわかる。

D. 考察

Rhododendrol (RD) がメラノサイト内でチロシナーゼにより酸化を受けた代謝物に変換されることが白斑の原因となったことには疑いがないと思われる。それに続く発症メカニズムは明らかになっていないが、チロシナーゼにより酸化を受けることを検出可能な試験法は白斑誘導能のスクリーニング法として利用できる可能性がある。しかし、チロシナーゼ酸化により生じる *o*-キノン是不安定である。

昨年度の検討において、OECDにより感作性試験代替法TG442Cとして認められているDirect Peptide Reactivity Assay (DPRA)で使用するヘプタペプチドDPRA(Cys)を共存させてRDのチロシナーゼによる酸化反応を行うと、RDが酸化されたカテコールがCys残基に結合したペプチドの生成が確認された。このペプチドを、*o*-キノンの安定化と反応系からの除去に利用できると考えた。

raspberry ketone (RK), hydroquinone monobenzyl ether (BzP) 及び 4-*tert*-butylphenol (TBP) はRDの場合と同様にカテコールが結合したペプチドが検出され、DPRA(Cys)がRD以外の *o*-キノンの安定化に利用できると示唆された。

次に反応に与える基質濃度の影響を検討した。終濃度0.1–0.5 mmol/Lの範囲ではRDの減少速度は初期濃度に比例していることから、基質濃度は酵素濃度に対して十分低いと言え、また、DPRA(Cys)が同様の速度で減少していることは、*o*-キノンの安定化が効率良く進んでいることを意味している。

RDの終濃度を0.3 mmol/Lとして30分間に渡り反応を行い、その減少を観察したところ、時間依存的に減少していることが判明した。RKも同様であった。

以上のように濃度依存性と時間依存性が見られた。今後、チロシナーゼによる代謝活性化を評価する検出法として確立させるため、再現性の検討を行う。

E. 結論

白斑症例の原因物質として報告がある4-置換フェノールはいずれもチロシナーゼ共存下システイン含有ペプチドと結合し、RDを基質とした反応でRD及びDPRA(Cys)の減少速度がRDの初期濃度及び時間に依存していたことから、チロシナーゼによる代謝活性化を評価する検出法としての条件の一部が満たされた。

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

秋山卓美, 清水久美子, 伊藤祥輔, 内野正, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol のシステイン含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年7月)

秋山卓美, 清水久美子, 富田由花, 伊藤祥輔, 最上(西巻)知子, 五十嵐良明: Rhododendrol 及び構造類似化合物のCys含有ペプチドへのチロシナーゼ依存的な結合. 日本薬学会第137年会(2017年3月)

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

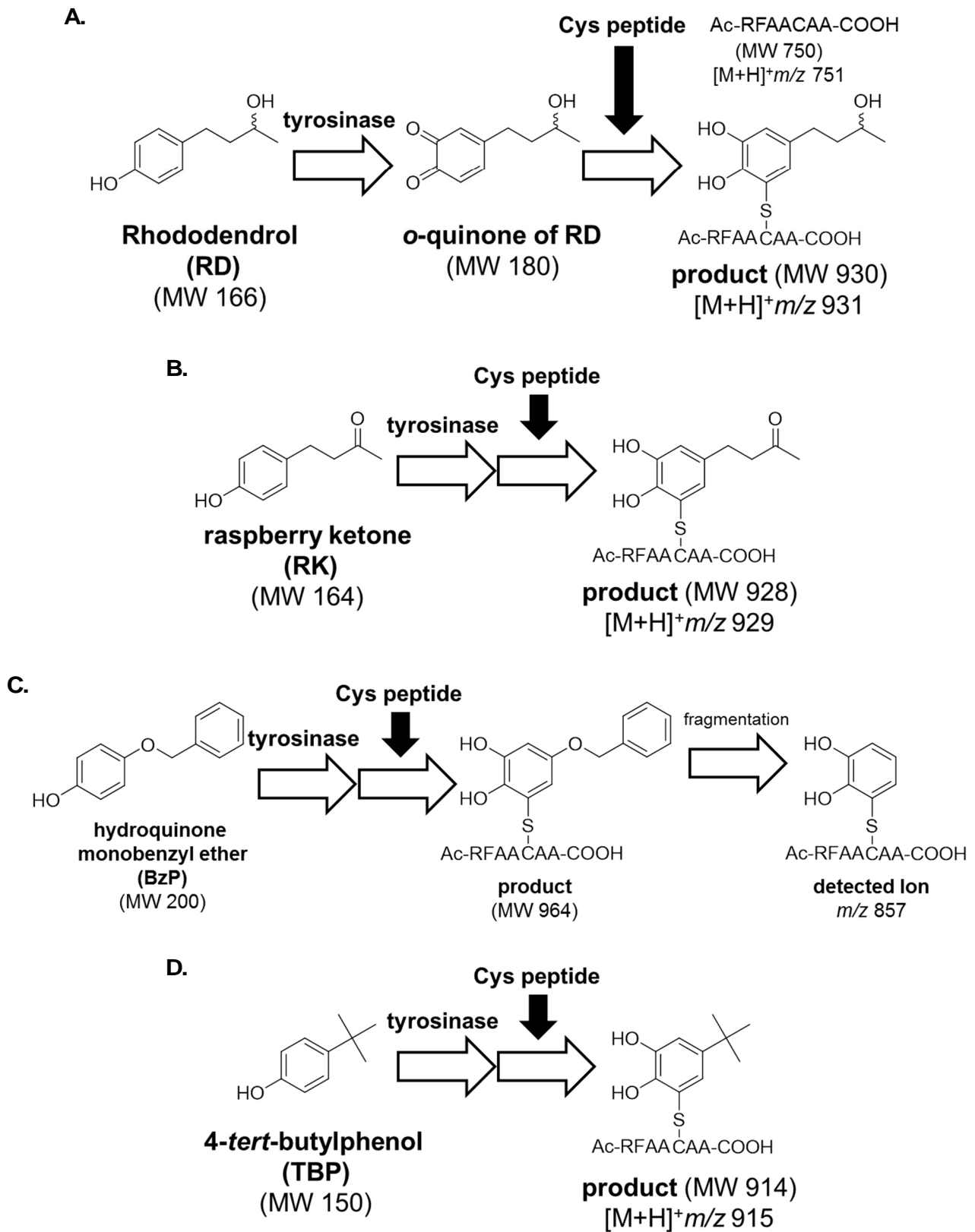


図 1. チロシナーゼによる酸化とペプチドとの結合. **A:** rhododendrol を基質とした反応. **B:** raspberry ketone を基質とした反応. **C:** hydroquinone monobenzyl ether を基質とした反応. **D:** 4-tert-butylphenol を基質とした反応.

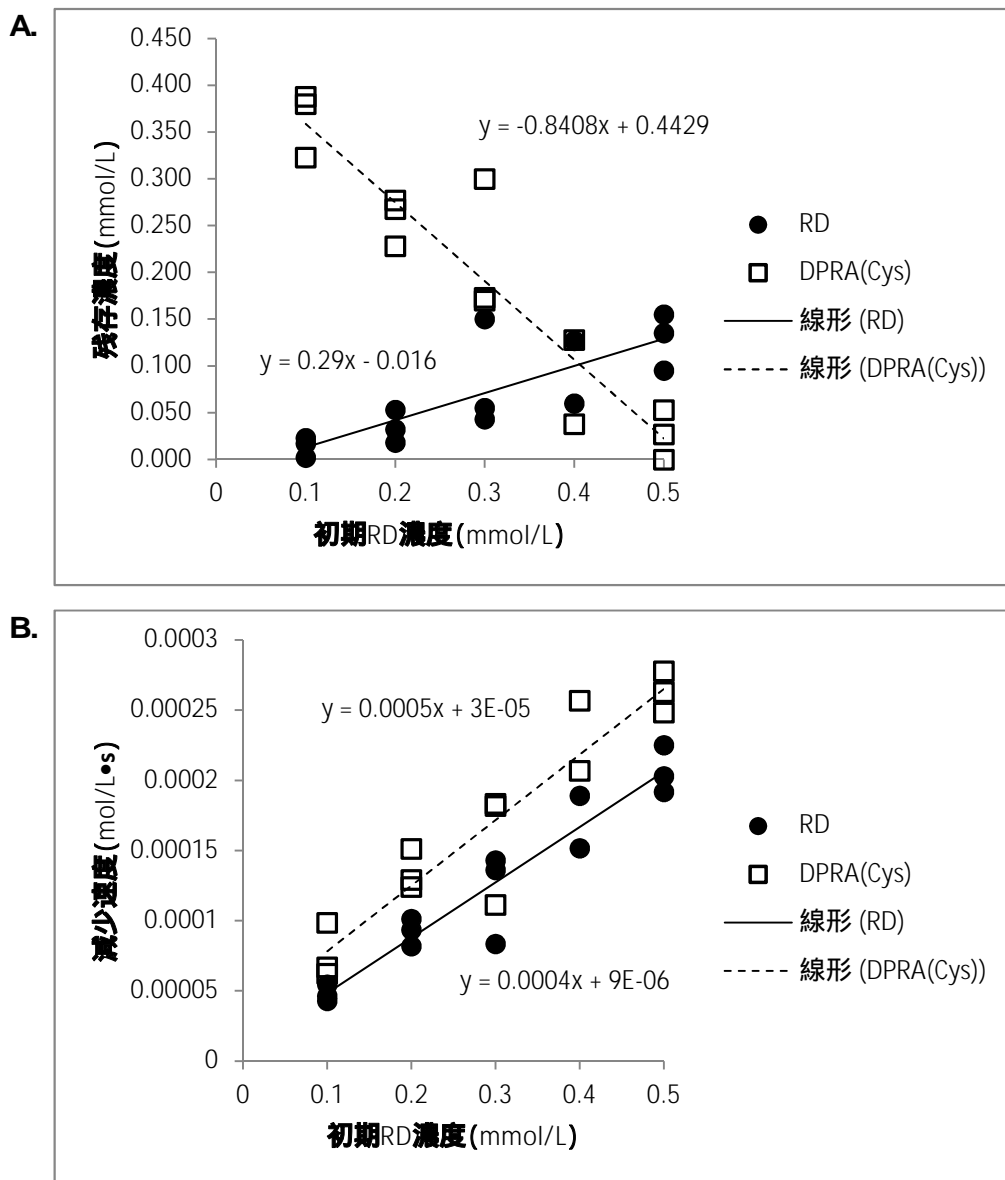


図 2. Rhododendrol を基質とした反応に対する基質濃度の影響 . A: 残存濃度に対する影響 . B: 減少速度に対する影響 .

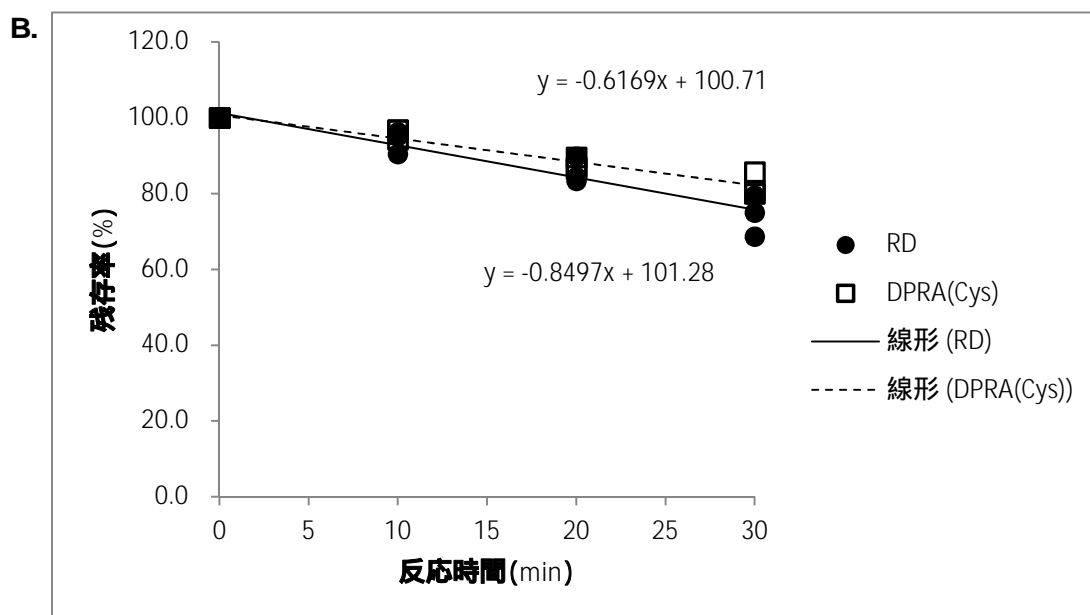
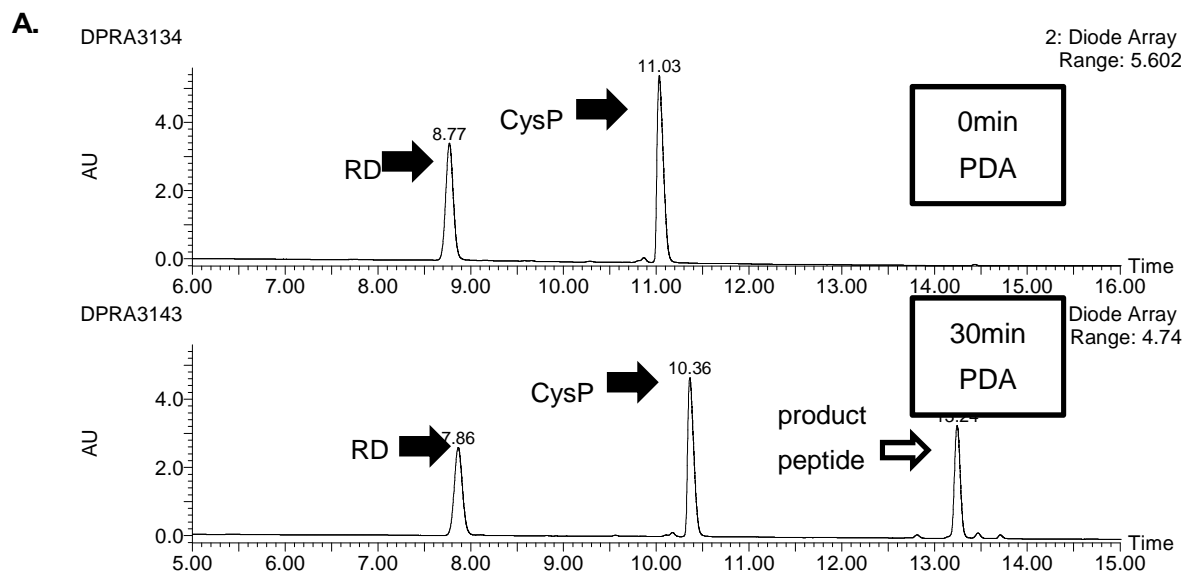
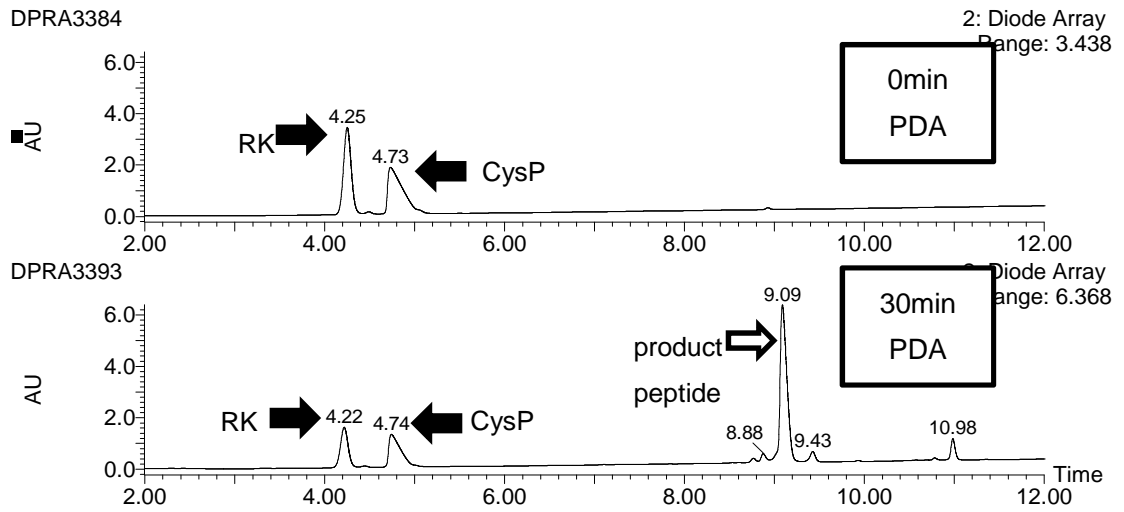


図 3. rhododendrol を基質とした反応 . A: PDA クロマトグラム . B: 残存率の変化 .

A.



B.

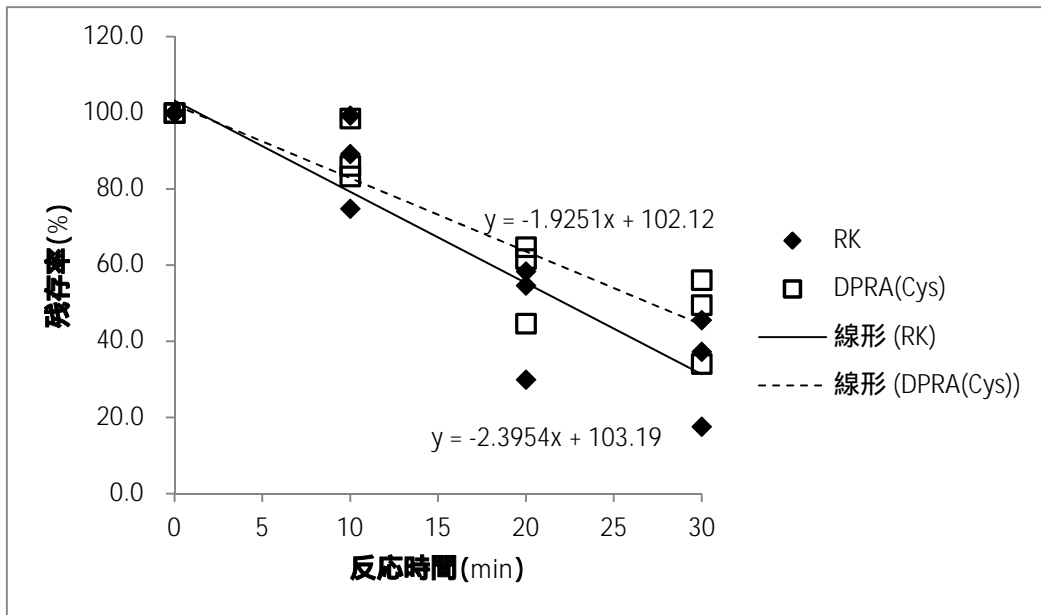


図 4. Raspberry ketone を基質とした反応 . A: PDA クロマトグラム . B: 残存率の変化 .

安全性評価法の構築 (II)

研究分担者 伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部 名誉教授

研究要旨:

ロドデノール(RD)はチロシナーゼの基質となり毒性代謝物オルトキノンを生産するが、その後のオルトキノン酸化物(メラニン)の代謝は不明であった。今年度は、RD-ユーマラニンおよび RD-フェオメラニンを合成し、細胞内抗酸化物質の酸化促進作用を通常のメラニンと比較検討した。その結果、RD-ユーマラニンはフェオメラニンに匹敵する強い酸化促進作用を示すことを明らかにした。グルタチオン、システイン、アスコルビン酸、およびNADHはRD-ユーマラニンにより酸化され、同時にH₂O₂を産生した。これがRDによるメラノサイトに対する細胞傷害の機序の一つと考えられる。

A. 研究目的

ロドデノール(RD)はチロシナーゼ活性に依存して細胞傷害性を示すが、その機序の全貌は未だ解明されていない。そこで今年度は、RDに由来するメラニンによる細胞内抗酸化剤の酸化的枯渇を通常のメラニンと比較検討した。

B. 研究方法

RD-ユーマラニン(RD-EM)、RD-フェオメラニン(RD-PM)、Dopa-ユーマラニン(Dopa-EM)、Dopa-フェオメラニン(Dopa-PM)は、1 mMのRDあるいはDopaにフェオメラニンの場合は1 mMのシステインを添加し、チロシナーゼで4時間酸化して調製した。これに1 mMのグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいはNADHを加え、1時間反応した。抗酸化物質の残存量はHPLC法にて定量した。また、酸化により生成した酸化型グルタチオンおよびシスチンも合わせて定量した。

C. 研究結果

RD-EMはDopa-PMとほぼ同速度でグルタチ

オンおよびシステインを酸化した。生成物の大半は酸化型グルタチオンおよびシスチンであった。また、同時にH₂O₂の産生が確認された。RD-PMおよびDopa-EMの酸化活性は、RD-EM、Dopa-PMの2分の1程度であった(図1)。RD-EMは、アスコルビン酸およびNADHについても効率よく酸化した。

D. 考察

RDはチロシナーゼにより酸化されて、細胞傷害性の高いオルトキノンを生産する。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、付加体を形成する。これがRDによるメラノサイト傷害性の主要な機序と考えられる。しかし、B16メラノーマを用いた実験では、上記の代謝に加え、RD由来のメラニンが産生することが確認されている。一方、天然のフェオメラニンは強い酸化促進作用を持つことが近年明らかにされた。そこで今回、RD-EMおよびRD-PMを調製し、その酸化促進作用を調べた。そ

の結果、RD-EM の酸化促進作用は、フェオメラニンに匹敵することが分かった。

E. 結論

RDのチロシナーゼ酸化はRD-キノンおよびRD-メラニンを産生し、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して同時に活性酸素を産生することにより細胞傷害性を惹起しているものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito S., Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30, 63-67, 2016.

Ito S., Hinoshita M, Suzuki E, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing raspberry ketone produces (E)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 859-868, 2017.

2. 学会発表

伊藤祥輔, 黄倉真恵, 若松一雅, 山下利春. ロドデノールユーメラニンは強い酸化促進作用をもつ. 第27回日本色素細胞学会. 平成28年11月12日. 岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

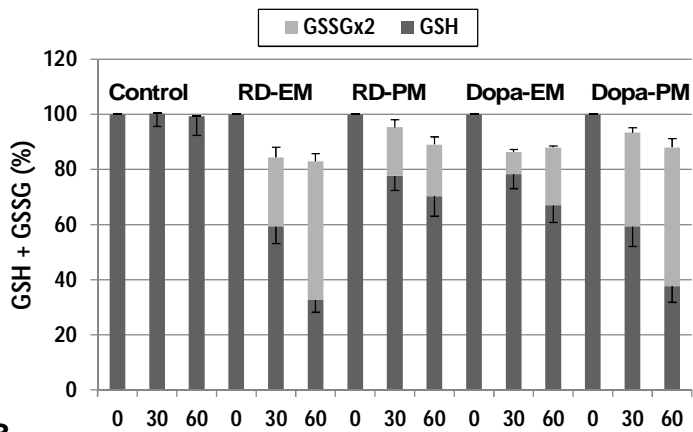
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

A



B

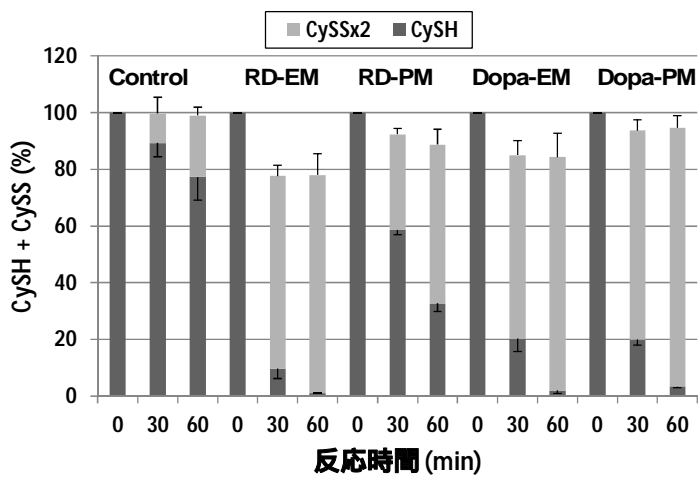


図1. 合成メラニンによるグルタチオン (GSH)およびシステイン(CySH)の酸化。(A) 1モル等量のGSHからのGSHおよびGSSG量の変化。(B) 1モル等量のCySHからのCySHおよびCySS量の変化。コントロールはチロシナーゼのみを含む緩衝液。データは3回の実験の平均値 ± SEM。

安全性評価法の構築(III)

研究分担者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨:

ロドデノールによる白斑発症機序の解明と新規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の検討と、チロシナーゼ代謝による細胞傷害仮説の検証を行った。ロドデノールを含む白斑誘導性フェノール類は共通してオルトキノン体に代謝活性化される。ロドデノールの場合にはチロシナーゼ依存の細胞毒性増強が報告されていることから、代謝活性化をチロシナーゼ依存的細胞毒性として検出する方法を検討した。293T細胞にヒトチロシナーゼを高発現させると、4-SCAPの毒性が増強されたが、ロドデノールを含めた他化合物の毒性増強は認められなかった。この系では経時的に内因性チロシン代謝による毒性が発現しており、チロシナーゼ阻害剤であるロドデノールや4-TBPはむしろ内因性毒性を強力に抑制する効果が観察された。代謝物によるメラノサイト傷害仮説の見直し、あるいはチロシナーゼ下流のメラニン合成経路やメラノソームの役割解明が必要と考えられる。

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の原因に関しては、平成25-26年度の厚生労働科学研究で検討がなされたほか、複数の研究組織から、白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失や、ロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性の増強が論文発表されている。

白斑誘導性類似化合物は共通してチロシナーゼにより代謝されることが報告されていることから、白斑発症には、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の傷害/応答の関与が強く示唆される。

本研究では、個体差の大きなメラノサイトを代替するモデル細胞を構築し、チロシナーゼ代謝活性化によるメラノサイト傷害仮説の検証を行う。また代謝活性化による細胞毒性/応答の増強が一定して認められる細胞モデルを作成できれば、新規美白剤の安全性評価に有用と考えられる。今年度は、ヒトチロシナーゼ遺伝子導入細胞を利用し、ロドデノール類似構造の白斑誘導性化合物が共通

して毒性増強されるか検討を行った。

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依存性を解析した。ヒトチロシナーゼ遺伝子(NM_000372)をHEK293T細胞に一過性に発現させ、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を測定し判定した。

可溶性ヒトチロシナーゼは、htyr(1-456)のC末端型にHis-Tagを導入した発現ベクターを293T細胞に一過性に発現させ、培地に分泌される酵素をアフィニティカラムで精製し調製した。チロシナーゼ活性はDopaを基質としDopa quinoneへの転換をMBTH法で測定して決定した。

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がチロシナーゼにより代謝され、毒性が増強される応答を検出できる細胞系の確立を試みた。293T細胞にチロシナーゼを発現し、24時間後に薬物処理を開始した。薬物処理24時間後においてコントロール(薬物非処理群)では全く細胞生存率に変化はなかったが、4-SCAP(0.1~1 mM)で処理すると、チロシナーゼ発現細胞においてのみ4-SCAPの毒性が観察され、細胞生存率は0.1 mM 4-SCAPにおいて約50%まで低下した(図1)。

薬物処理48時間後(遺伝子導入72時間後)には薬物非存在下においても生細胞数が3%まで低下した。この低下は培地にチロシンを補給すると24時間の時点で観察されたことから、内在性のチロシンが代謝されて顕著な毒性を発現したことが考えられる。このような内因性毒性(48時間後に観察)ならびに4-SCAP代謝物の毒性(24時間後に観察)はいずれも、SH化合物であるN-アセチルシステイン(NAC)を5 mM共存させるとほぼ完全に抑制された。

一方、ロドデノール(0.1~3 mM)処理では、チロシナーゼ発現細胞でも毒性増強は全く認められず、むしろチロシナーゼ発現による内因性チロシン毒性(48時間後に薬物非処理下で生存率3%)をほぼ完全に抑制し、細胞生存率は非処理レベルまで回復させることが判明した。ロドデノールと同様に4-TBPは0.1 mMから強力な抑制が、MBEHは0.01~0.3 mMの範囲で濃度依存的に内因性の毒性発現を抑制する効果が認められた。

細胞グルタチオン枯渇剤として知られるBSO(buthionine sulfoximine, 100 μM)はロドデノール毒性を増強することが報告されている。しかしながらBSO存在下においても、ロドデノール(0.1~3 mM)は内因性チロシン代謝による毒性を顕著に抑制することが判明した。

ヒトチロシナーゼは活性化に触媒量のDopaを

必要とすることが知られている。そこで10 μMあるいは40 μMのDopaを共存させて活性化を図ったところ、ヒトチロシナーゼ発現細胞では薬物非処理の毒性が増加し、チロシンとDopa代謝物が強い毒性を有すること、ロドデノールは毒性をむしろ抑制することがあらためて示された。

2. 可溶性ヒトチロシナーゼの調製

白斑誘導性化合物のチロシナーゼによる代謝研究には、入手の容易なマッシュルームチロシナーゼが主に使用されている。ヒトでの安全性評価のために、ヒトチロシナーゼの利用を検討した。

ヒトチロシナーゼはメラニン顆粒に局在する膜貫通型のタンパクであるが、膜貫通ドメインを切断しても、活性を維持した可溶性タンパクとして動物細胞に発現できることがCordesらにより報告されている(Biol Chem 2013; 394:685-693)。この報告に基づき、アミノ酸残基1-438のcDNAとHisタグをベクターに組み込み293T細胞に発現させたところ、相当する分子量のタンパクが培地に検出された。しかしながら回収・濃縮しても全く活性は認められなかった(図2B)。そこでより膜貫通領域に近い領域までのアミノ酸残基1-456をGSリンカーでHisタグと結合させた発現ベクターを構築した(図2A)。293T細胞に発現させたところ、高いチロシナーゼ活性が検出され、その96%が培地に検出されることが判明した(図2B)。

培地には、遺伝子導入24時間後から96時間まで、高いチロシナーゼ活性が検出されたことから(図2C)、培地からチロシナーゼの精製を行った。培地の遠心上清をHis Trap FFカラムに吸着させ、洗浄後、500 mM イミダゾール緩衝液で溶出し、活性画分をAmicon Ultra-0.5 30Kを用いて濃縮した。引き続き、PD-10カラムで脱塩とPBS緩衝液への交換を行った。図2Dに示されるように、高い比活性のチロシナーゼが培地より回収されることが判明し、SDS-PAGEで約60K

のバンドを確認した。

D. 考察

過去の文献を精査すると、ロドデノールをはじめとする白斑誘導性の 4-アルキル/アリルフェノール類は、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、代謝によるメラノサイト毒性増強が報告され、白斑発症との関連が示唆されている。そこで「チロシナーゼ代謝によるメラノサイト毒性増強」が白斑誘導性の 4-アルキル/アリル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。

しかしながら、様々な由来のメラノサイトはロドデノール感受性に大きな差異があることが報告されている。そこで本研究では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。

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に高発現すると、4-SCAP ならびに経時的には内因性チロシンの毒性が増強され、この毒性は SH 化合物 NAC の共存により抑制された。したがって、4-SCAP のオルトキノン体や DOPA キノンへの代謝がグルタチオン・システイン等の細胞内 SH 基との反応を引き起こすこと(タンパクの修飾あるいは細胞内 SH プールの枯渇)、あるいは代謝物のユーマニン経路への流入が毒性増強をもたらすことが示唆される。

一方ロドデノールの場合、4-SCAP と異なり、チロシナーゼ代謝による自身の毒性増強が認められず、むしろ薬物無処理細胞での内因性毒性発現を強力に抑制した。ロドデノールはチロシナーゼ阻害剤として開発された美白剤であり、この阻害効果により内因性チロシンの代謝による毒性発現を抑制したことが推定される。4-TBP や MBEH においても同様の内因性(チロシン代謝物)毒性の抑制が観察された。したがって、化合物のチロシナーゼの基質になりやすさ/阻害剤作用のバランスの違いが、4-SCAP の場合には毒性増強、ロドデノールや 4-TBP、MBEH の場合には内因性チロシン毒性抑制の異なる作用をもたらしたと推定される。

ロドデノールによる表皮メラノサイト消失には、チロシナーゼ代謝による毒性増強がメラノサイト特異的傷害をもたらす機序が想定されてきた。しかしながら本研究の結果は、ロドデノール代謝物の毒性に比べ、内因性チロシン代謝物の毒性/ロドデノールによる抑制効果が勝ることを示している。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。ロドデノール代謝物によるメラノサイト傷害仮説の検証には、今後、メラノサイトあるいはメラノーマ細胞において、チロシナーゼ下流の代謝経路の意義、あるいはメラノソーム内での代謝反応の compartmentalization の役割を明らかにすること、あるいは細胞毒性以外のエンドポイントを見いだすことが必要であると考えている。

E. 結論

白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ依存的な細胞毒性/応答を評価するために、ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に発現させ解析を進めた。ロドデノールは自身の毒性増強ではなく、むしろ内因性チロシンの代謝による毒性発現を抑制する効果が観察された。

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

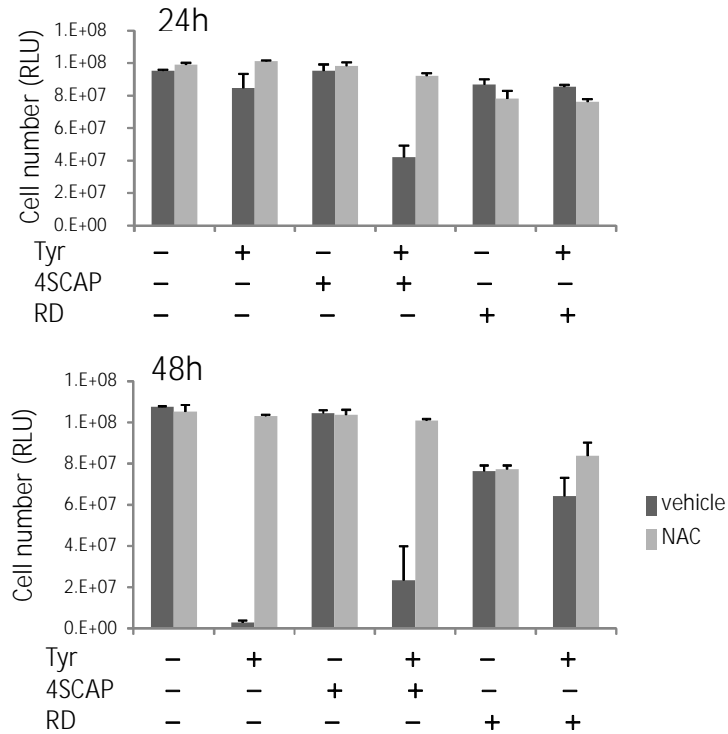


図1. 293T細胞へのヒトチロシナーゼ発現による細胞毒性はNACあるいはロドデノール(RD)添加により抑制される
4-SCP, 0.1mM; RD, 1mM; NAC (N-acetylcysteine), 5 mM

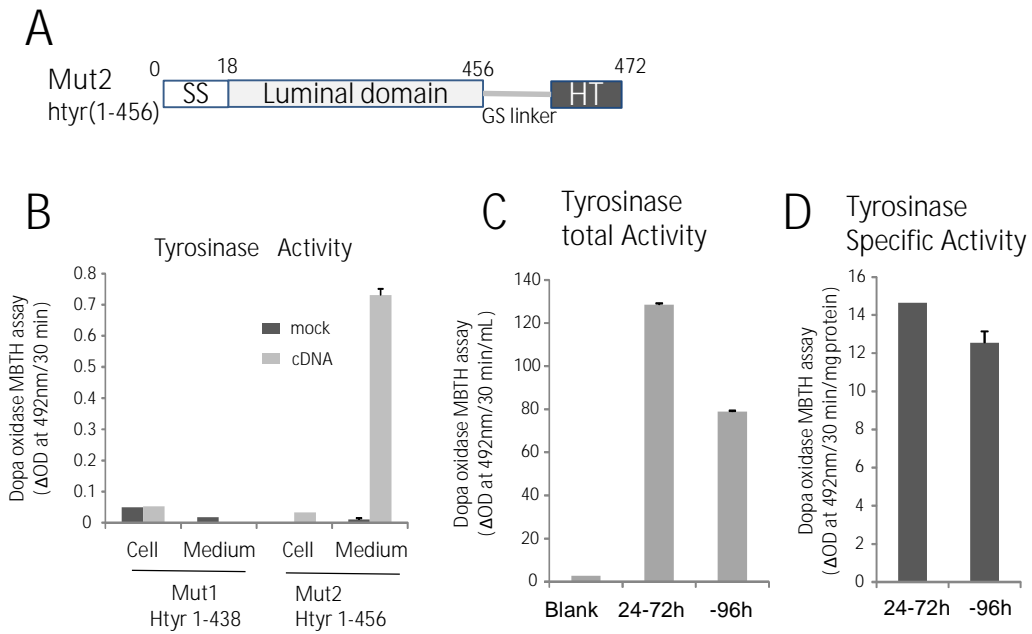


図2. 可溶性ヒトチロシナーゼの調製

A. 発現ベクターの構造、B. 発現細胞・培地での酵素活性の分布
C,D. 経時的に培地に放出された酵素活性

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
鈴木民夫	尋常性白斑	福井次矢ら	今日の治療指針2017私はこう治療している	医学書院	東京	2017	1226
鈴木民夫	母斑細胞母斑	渡辺晋一ら	皮膚疾患最新の治療2017-2018	南江堂	東京	2017	241-242

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ito S., Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T.	The potent pro-oxidant activity of rhododen-drol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	30,	63-67	2016
Ito S., Hinoshita M, Suzuki E, Ojika M, Wakamatsu K.	Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoder-ma-inducing raspberry ketone produces (E)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity.	<i>Chem. Res. Toxicol.</i>	30	859-868	2017
片山 一郎	6色素性白斑 尋常性白斑 皮膚疾患ペディア	日本医師会雑誌	145特別号(2)	167-8	2016
片山 一郎	COLUMN 尋常性白斑診療ガイドライン 皮膚疾患ペディア	日本医師会雑誌	145特別号(2)	16+B5	2016
片山 一郎	尋常性白斑の治療ガイドライン	<i>MB Derma</i>	239	1-9	2016
片山 一郎	編集企画 白斑治療の最前線	<i>MB Derma</i>		229	2016
楊 伶俐、金田眞理、種村篤、片山 一郎	白斑の新しい病因論	<i>MB Derma</i>		239	2016
Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T	Rhododenol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin.	<i>J Dermatol Sci.</i>	8	35-43	2016

Okamura K, Araki Y, Abe Y, Shigyou A, Fujiyama T, Baba A, Kanekura T, Chinen Y, Kono M, Niizeki H, Tsubota A, Konno T, Hozumi Y, Suzuki T	Genetic analyses of oculocutaneous albinism types 2 and 4 with eight novel mutations.	<i>J Dermatol Sci.</i>	8	140-142	2016
Okamura K, Abe Y, Araki Y, Hozumi Y, Kawaguchi M, Suzuki T	Behavior of melanocytes and keratinocytes in reticulate acropigmentation of Kitamura.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	29	243-246	2016
Okamura K, Hayashi M, Abe Y, Araki Y, Hozumi Y, Suzuki T	Microsatellite polymorphism located immediately upstream of the phosphatidylinositol glycan, class K gene (PIGK) affects its expression, which correlates with tyrosinase activity in human melanocytes.	<i>J Dermatol Sci.</i>	In press		2017