

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

医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究

令和元年度～2年度 総合研究報告書
(19KC2005)

研究代表者 秋山 卓美

令和3(2021)年3月

目 次

I. 総合研究報告

医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究	1
秋山 卓美	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	6
--------------------	---

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。SH ペプチド濃度を高くすることにより、分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物が著しく減少し、生成物が単純化された。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)、ラズベリーケトン (RK)、および 4-tert ブチルカテコール (4-TBC) など 4-置換フェノール/カテコール類で顕著に産生されるのに対し、2-置換の 2-S-システアミルフェノール (2SCAP) では認められないことを示した。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、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、またプロオキダント活性をもつことが示された。293T 細胞においても EQ はオルトキノン体を経て、グルタチオン・システイン二付加体を形成した。また、白斑形成能を持つ RK の活性代謝物である DBL-カテコールの代謝を調べ、Diels-Alder 型反応による二量体、三量体の生成を証明した。

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 藤田医科大学医療科学部名誉教授

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を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。

フェノール類をチロシナーゼで酸化した後に共存させた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、基質の反応性及び生成物の単純化が実現できる反応条件を検討する。

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]細胞を用いた代謝物(オルトキノンのシステイン/グルタチオン付加体)産生の解析、[2]細胞の薬物感受性増強により評価する方法について検討を行った。

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、またラズベリーケトン(RK)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(I)

[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。4位がアルコキシ基に置換されたフェノール類は2種類のSHペプチド濃度の反応を行った。

2. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

細胞での代謝物解析による評価については、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。細胞の薬物感受性増強については、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たのち、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(II)

[伊藤]

EQをチロシナーゼにより酸化し、必要に応じてアスコルビン酸あるいはN-アセチルシステインを加え、反応をUV-VisスペクトルあるいはHPLCで追跡した。

ヒトチロシナーゼを強制発現させた293T細胞にEQを作用させ、細胞中および培地中の代謝物をHPLC-電気化学検出法により解析した。

DBL-キノンの代謝物は、LC-MSにより解析した。

C. 研究結果

1. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(I)

[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、分子量が大きく、かつ SH ペプチドが低い場合はこれらそれぞれより分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物が生成した。4 位が第二級アルキル基、第三級アルキル基又はアリール基の場合、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]細胞を用いた代謝物解析において、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」で生じるオルトキノン体について、細胞内 SH であるシステイン・グルタチオンへの付加体を分析する方法を検討し、化合物構造との関係を解析した。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞に白斑誘導性の 4-置換フェノール類を暴露すると、前期研究で検討したロドデノール (RD)、4-S-システアミニルフェノール (4SCAP) と同様に、モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH)、4-tert ブチルフェノール (4-TBP)、ラズベリーケトン (RK) あるいは 4-tert ブチルカテコール (4-TBC) 暴露によりオルトキノン体グルタチオン/システイン付加体が顕著に産生された。一方、2-置換である 2-S-システアミニルフェノール (2SCAP) の場合には検出されないことを確認した。[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-システアミニルフェノール (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 (II)

[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、スペクトル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、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 オリゴマーはグルタチオン (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。

EQ の細胞内代謝については、システインおよびグルタチオンの二付加体 DiCys-EQ-ジカテコール(diC)および DiGS-EQ-ジカテコールが EQ 濃度依存的に細胞中で生成し、培地に放出されることが示された。付加体形成の代謝率は約 4%であり、他の白斑形成フェノール体に比べてやや高値であった。

ラズベリーケトンの活性代謝物である DBL-キノンは試験管内で代謝され、二量体、三量体の生成が示された。

D. 考察

1. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築 (I)

[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やすく、第二級アルキル基、第三級アルキル基又はアリール基では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。アルコキシ基では SH ペプチドの濃度を高くすることで、SH 基付加体より分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物が著しく減少した。SH ペプチドの濃度が高いと生成物が単純化される利点があると言える。

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代謝活性化の細胞を用いた評価方法を確立するために、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用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を解析する

方法について検討した。化合物構造と代謝物生成の関係を解析し、本方法の有用性を支持する結果を得た。今後さらに対象を広げ、白斑誘導能との関連を明らかにする予定である。細胞毒性増強検出の試みについては、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。

3. 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（II）

[伊藤]

EQ の持つ 2 個のフェノール性 OH 基がいずれもチロシナーゼにより酸化され、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。EQ 由来オルトキノン試験管内反応においても細胞内においても非タンパク性 SH 化合物と反応し、付加体を形成する。2 個の OH 基がいずれも酸化されて di-キノン体を経て二付加体が生成することは、EQ オルトキノンの高い反応性を示している。

DBL-キノンからの二量体、三量体の形成は、オルトキノンと共役二重結合との間のイオン型 Diels-Alder 反応によるものと考えられる。

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。SH ペプチド濃度を高くすることにより、分子量が 2 だけ小さいイオンとして検出される生成物が著しく減少し、生成物の単純化ができたと考えられた。

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てのチオール付加体解析の有用性を支持する結果を得た。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の薬物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た。EQ-di-キノンがチオール類と結合することが示され、EQ は細胞内タンパクと結合して細胞傷害性を惹起する可能性が示唆された。EQ-オリゴマー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。RK のチロシナーゼによる活性代謝物である DBL-キノンは速やか二量体、三量体を形成することから、RK による白斑形成の原因物質であ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.

Ito S, Sugumaran M, Wakamatsu K. Chemical reactivities of *ortho*-quinones produced in living organisms: fate of quinoid products formed by tyrosinase and phenoloxidase action on phenols and catechols. *Int J Mol Sci.* 21: E6080 (36 pages), 2020.

Sugumaran M, Umit K, Evans J, Muriph R, Ito S, Wakamatsu K. Oxidative oligomerization of DBL catechol, a potential cytotoxic compound for melanocytes, reveals the occurrence of novel ionic Diels-Alder type additions. *Int J Mol Sci* 21: E6774 (11 pages), 2020.

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

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

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, 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 Research	32	766-776	2019
Ito S, Sugumaran M, Wakamatsu K.	Chemical reactivities of <i>ortho</i> -quinones produced in living organisms: fate of quinoid products formed by tyrosinase and phenoloxidase action on phenols and catechols.	International Journal of Molecular Science	21	6080 (36 pages)	2020
Sugumaran M, Umit K, Evans J, Muriph R, Ito S, Wakamatsu K.	Oxidative oligomerization of DBL catechol, a potential cytotoxic compound for melanocytes, reveals the occurrence of novel ionic Diels-Alder type additions.	International Journal of Molecular Science	21	6774 (11 pages)	2020