

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、細胞での代謝物解析により評価する方法の検討を進めた。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用い、オルトキノン体グルタチオン・システイン付加体の産生とフェノール類の構造との関係を解析し、本手法の有用性を支持する知見を集積した。

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、本分担研究においては、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。そこで前期研究班(平成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、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化を代謝物産生により評価する手法について検討を開始した。293T 細胞にヒトチロシナーゼを高発現させ、RD ならびに 4S-システアミルフェノール(4SCAP)の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について条件を確立した。引き続き昨年度の研究において、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)についても可能であることを示した。

今年度は、本法を用いての代謝活性化解析の有用性を明らかにするために、対象をさらに広げて白斑誘導性フェノール類および報告の無いフェノール類について解析を進めた。

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、2 時間後の細胞および培地を回収した。細胞および培地の代謝産物は既報(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。

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

昨年度までの研究において、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、白斑誘導性の 4-S-システアミル

フェノール(4SCAP)、4-tert ブチルフェノール(4-TBP) (0.1, 0.3, 0.6 mM)、モノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH) (0.1, 0.2, 0.3 mM)についても同様のオルトキノン体チオール付加体の産生を認めた。

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ラズベリーケトン(RK) (0.1, 0.3, 1.0 mM)を本細胞に曝露すると2時間後にRK オルトキノンのシステイン付加体ならびにグルタチオン付加体が培地・細胞で検出された。また、4-tert ブチルカテコール(4-TBC) (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、システイン付加体が培地に検出された。4SCAP については、H30年度に大量のオルトキノン体ならびにグルタチオン付加体の産生を明らかにしている。その構造異性体である 2SCAP を同一濃度(0.1, 0.3, 1.0 mM) 曝露した場合においては、同様の代謝物は検出されないことを確認した。

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」化を細胞で評価する方法の確立に向け、これまで、ヒトチロシナーゼを高発現した細胞を用いて代謝物解析を行う方法について検討を行ってきた。今年度は化合物をさらに追加して検討を進めた。

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。タンパクと反応すると、機能変化、あるいは変成・修飾による抗原性の生成が白斑と関連する可能性が推定されるが、修飾タンパクの分析は困難である。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。これまでの研究において、ヒトチロシナーゼを高発現する 293T 細胞を用いる方法に

ついて条件検討を進め、RD ならびに白斑誘導性フェノール類 MBEH、4-TBP、4SCAP の曝露により、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ている。今年度はさらに対象を広げ、RD に構造が類似する白斑誘導性フェノール類 RK、ならびにすでにオルト・パラ位に水酸基を有するカテコール体 4-TBC において、オルトキノン体のチオール付加物の著しい産生が認められること、一方、4SCAP の構造異性体で 2-置換フェノール構造を有する 2SCAP を曝露すると、4SCAP の場合のような代謝物は検出され無いことを確認した。今後さらに化合物を追加し、チオール付加体への代謝と化合物構造、白斑誘導能との関係を検討する予定である。

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細胞での評価法の確立に向けて、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いて化合物構造とチオール付加体産生の関係を解析し、本法の有用性を示した。

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