

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。

4 位がアルコキシ基に置換されたフェノール類を用いたチロシナーゼによる酸化反応において、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、白斑誘導性ラズベリーケトン (RK) および 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るのに対し、置換基を 2 位に有する 2-S-システアミニルフェノール (2SCAP) では認められないことを示した。293T 細胞において、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、白斑形成能を持つラズベリーケトンについて、そ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活衛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

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

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。

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の条件検討を行う。昨年度の検討で複数の生成物が得られた 4 位にアルコキシを持つ基質について、反応条件を調整することで生成物の単純化ができるかどうか検討する。

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。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、細胞を用いて代謝物(オルトキノンのシステイン/グルタチオン付加体)の解析により評価する方法の検討を引き続き進める。

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。昨年度に引き続きエクオール (EQ) について、また新たにラズベリーケトンについて検討する。

B. 研究方法

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (I)

[秋山]

4 位がアルコキシ基に置換された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においては、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。

3. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (II)

[伊藤]

ヒトチロシナーゼを強制発現させた 293T 細胞に EQ50, 100, 200 μ M を 2 時間作用させ、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]

ブトキシ基以上の分子量を持つ置換基を持つ基質の場合、SH ペプチド濃度が低い場合はペプチドが 1 個付加したカテコール、2 個付加したカテコールの他、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の 4 種の生成物が検出されたが、SH ペプチド濃度が低い場合は 1 個付加したカテコール、2 個付加したカテコールの 2 種のみが検出された。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築 [最上]

細胞を用いた代謝物解析において化合物構造との関係を検討した。ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞に白斑誘導性の 4-置換フェノールであるラズベリーケトン (RK) および 4-tert ブチルカテコール (4-TBC) を暴露すると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が顕著に産生されたが、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かった。

3. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 (II)

[伊藤]

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。100 μ M EQ のうち 30 μ M が消費され、0.60 μ M の DiCys-EQ-diC と 0.66 μ M の DiGS-EQ-diC が培地中に検出されたことから、約 4% が代謝されて付加体を形成したことになる。この代謝率は他の白斑形成フェノール体に比べてやや高値であった。

DBL-キノンの試験管内での代謝については、反応は極めて速く進行するが、LC-MS により解析し、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]

SH ペプチドの濃度を高くすることで、1 個付加したカテコールが減少して 2 個付加したカテコールが増加すると予測したが、実際には SO+Pe-2H 及び SO+2Pe-2H が著しく減少した。仮説として、これらのピークは分子量がそれぞれ SO+Pe 及び SO+2Pe と等しいそれぞれ MW+16+748 及び MW+16+748 \times 2 であるが rearrangement が起きやすい構造であり、SH ペプチドの濃度が高い場合にこれらの分子ができにくいことが考えられる。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を細胞で評価する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、化合物の構造との関係を解析した。白斑誘導性 4-置換フェノール・カテコールでのオルトキノン体チオール付加代謝物の顕著な産生に比較し、2-置換フェノールでは代謝物産生は認められず、本方法の有用性を支持する結果が得られた。今後さらに対象を広げ、白

斑誘導能との関連を解明し、本法の有用性を明らかにする。

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、グルタチオンなどの非タンパク性 SH 化合物と反応し、付加体を形成する。EQ の2個の OH 基がいずれも酸化され、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。また、生成したカテコール基のうちの1つが、RD の酸化により生成するクロマン骨格 (RD-環状カテコール) を持つことから、RD と同様に細胞毒性をもたらす可能性が示唆される。

DBL-キノンの二量体、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た。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について、細胞を用いた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代謝物生成の関係を解析し、本法の有用性を示した。

EQ が細胞内でチロシナーゼにより酸化され、EQ-di-キノンを生成し、チオール類と結合することが示された。これにより 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。

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, 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
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