

安全性評価法(細胞系)の構築 II

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 客員研究員

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:

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」は、白斑発症の鍵となる段階と考えられている。ヒトチロシナーゼを用いる評価法として、293T細胞に高発現してオルトキノン代謝物のグルタチオン・システイン付加体の産生を解析する方法の有用性を示した。さらにオルトキノン代謝物の産生が細胞内グルタチオン低下をもたらすことを確認した。

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、再発防止のためには医薬部外品成分などの化合物の白斑誘導能の評価が必要とされる。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の多くに、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝が報告されている。オルトキノン体はSH基との反応性が高く、細胞内SHプールの枯渇・タンパク修飾により、色素細胞特異的な毒性発現・免疫応答の誘導により白斑発症に強く関与することが示唆されている。そこで本研究においては、「チロシナーゼによる代謝活性化」に着目し、その評価系を構築することを目的とした。

従来、ほとんどの研究では市販のマッシュルームチロシナーゼが使用されてきたが、ヒトチロシナーゼとはタンパク構造ならびに有効な阻害剤の化学構造に大きな違いが報告され、ヒトチロシナーゼを用いた安全性評価が必要となる。そこで前研究班において、ヒトチロシナーゼを293T細胞に高発現させ、白斑誘導性フェノール類のオルトキノンへの代謝活性化を代謝物分析し評価する手法の検討を進めた(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」、令和元-2年厚生労働行政推進調査事業費補助金「医薬部外品成分の白斑誘導能の評価体系に関する研究」)。RDならびに4-S-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、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、白斑誘導性化合物であるラズベリーケトン(RK)、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)、および4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)についても可能であること、一方、4SCAPの構造異性体2SCAPでは検出されないことを示した。

今年度は、1) 白斑関連p-クレゾール(CRE)および発症報告の無いルシノール(RUC)についてチロシナーゼによる代謝を受けるか、2) これまで調べた各種フェノール類について、オルトキノン代謝物産生が細胞内グルタチオン量の低下をもたらすか検証した。

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 時間後に細胞および培地を回収した。オルトキノ代謝産物の HPLC 解析は協力研究者伊藤が担当した。細胞生存率は ATP 含量の測定により決定し、細胞内グルタチオンはグルタチオン-S-トランスフェラーゼの基質となる含量を測定した。

C. 研究結果

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

ヒトチロシナーゼを 293T 細胞にヒトチロシナーゼを一過性に高発現させた細胞に、CRE (0.1, 0.3, 0.6 mM) を 2 時間暴露すると、オルトキノ代謝物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された。一方、RUC (0.1, 0.3, 0.6 mM) を暴露した場合においては、同様の代謝物は検出されなかった。

2. フェノール類の代謝活性化による細胞内グルタチオン量への影響

チロシナーゼによるオルトキノへの代謝活性化が細胞内グルタチオンの低下をもたらすかどうか、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞にフェノール類を 2 時間暴露し、空ベクター導入 (mock) 細胞の場合とグルタチオン量を比較して調べた。各種フェノール類は、代謝活性化の検討と同じ 3 段階の濃度を用いた。4SCAP や 4-TBC を暴露すると、グルタチオン量はチロシナーゼ発現細胞のみ著しく低下し、中・高濃度ではほぼ消失した。RK 処理の場合は濃度依存的に、CRE も中・高濃度で顕著なチロシナーゼ依存の低下を示した。RD, および TBP と MBEH では一部の濃度において、チロシナーゼ発現細胞のグルタチオンは mock 細胞に比較し有意に低下した。一方、2SCAP ならびに RUC の場合には、どの濃度においても、チロシナーゼ発現と mock 細胞間での差異は認められなかった。

D. 考察

RD や類似構造の白斑誘導性 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」は、白斑発症に決定的な段階と考えられている。この代謝活性化を、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いて代謝物解析により評価する方法を確立した。今年度までに、白斑誘導の知られる 7 種のフェノール/カテコール誘導体についてオルトキノ体への代謝活性化が検出可能であること、一方、白斑誘導の報告の無い RUC や 2SCAP については、相当する代謝物は検出されないことが判明し、本法が有用な評価法であることが示された。

オルトキノ代謝物は SH 基との反応性が高い。タンパクへの付加体は機能・抗原性を変化させ白斑誘導をもたらす機序が提唱されている。システインあるいはグルタチオン付加体は、タンパク付加体より分析が容易であり、タンパク修飾のサロゲートマーカーとなることが期待される。

オルトキノ体産生はまた、細胞内グルタチオン量の低下を引き起こし、メラノサイト選択的毒性を発揮して白斑発症に関わる可能性も提唱されている。今年度は各種フェノール類のチロシナーゼ代謝とグルタチオン低下の関わりを解析し、オルトキノへと代謝された 7 化合物について、チロシナーゼに依存した細胞内グルタチオン低下が検出されること、一方オルトキノ代謝物が検出されない 2 化合物については、グルタチオン量低下は認められないことを明らかにした。グルタチオン低下も白斑誘導能の指標となる可能性が示された。

E. 結論

化学白斑発症の鍵と想定される「チロシナーゼによる代謝活性化」をヒトチロシナーゼ高発現細胞の代謝物分析により評価する方法を確立した。オルトキノ代謝物産生が細胞内グルタチオン低下をもたらすことが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka H, Ito S, Ojika M, Nishimaki-Mogami T, Kondo K, Wakamatsu K. The oxidation of equol by tyrosinase produces a unique di-*ortho*-quinone: possible implications for melanocyte toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 22, 9145, 2021.
- 2) Nishimaki-Mogami T, Ito S, Cui H, Akiyama T, Tamehiro N, Adachi R, Wakamatsu

K, Ikarashi Y, Kondo K. A cell-based evaluation of human tyrosinase-mediated metabolic activation of leukoderma-inducing phenolic compounds. *Submitted*

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