

## 安全性評価法(細胞系)の構築(Ⅱ)

研究分担者 伊藤祥輔 藤田医科大学 医療科学部 名誉教授  
研究協力者 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

### 研究要旨

白斑発症と強く相関する細胞応答の評価系確立を目指し、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・培地での代謝物解析により評価する方法を確立した。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を HPLC 電気化学検出法により解析した。本法は、感度、特異性ともに優れた方法と言える。

### 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を探索し、その評価系を確立することを目的とした。

RD ならびに類似の 4-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てきた。そこで前期研究班において、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 4-S-システアミルフェノール(4SCAP)の代謝を調べた。その結果、細胞・培地中のオルトキノン体をグルタチオン・システイン付加体として HPLC を用いて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)、4-tert-ブチルカテコール(4-TBC)、および p-クレゾール(CRE)について

も可能であることを示した。一方、4-置換フェノール構造を持たない、ルシノール(RUC)および 2-S-システアミルフェノールは代謝を受けなかったことから、本法がチロシナーゼ依存性であることが証明された。

今年度は、本法を用いての代謝活性化解析の汎用性を明らかにするために、対象をさらに広げ、白斑誘導性について報告は無いが、4-置換フェノール類であり、サプリメントとして広範に使用されているレスベラトロール(RES)およびエクオール(EQ)について解析を進めた。なお、EQ の代謝活性化については、論文として発表済みである(Tanaka et al., 2021)。

### 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(研究協力者最上知子実施)。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 電気化学検出法により解析した。

### C. 研究結果

## 1. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた RES 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 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された。ついで、4SCAP, RK, MBEH, TBP, TBC および CRE 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、白斑誘導の報告はないが、RD 同様に 4-置換フェノール構造を持つ RES について検討を加えた。その結果、RES (0.03, 0.06, 0.1 mM) を本細胞に曝露すると 2 時間後に RES 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濃度依存的に培地・細胞で検出された。

## 2. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた EQ の代謝活性化の評価

RES 同様にサプリメントとして汎用されている EQ について、チロシナーゼによる代謝を多面的に検討した。EQ は 4-置換フェノール構造を 2 つ有し、その反応性に興味を持たれた。最初に、マッシュルームチロシナーゼを用いて代謝を調べ、2 種類のモノオルトキノン体、1 種類のジオルトキノン体、合わせて 3 種類の可能なオルトキノン体の産生を確認した。次に、*N*-アセチルシステイン、システイン、およびグルタチオン付加体についても、上記のオルトキノン体に対応する付加体の産生を認めた。オルトキノン体はタンパクであるウシ血清アルブミンとも結合できることを証明した。最後に、293T 細胞を用いた代謝を検討した。EQ (0.05, 0.1, 0.2 mM) を本細胞に曝露すると 2 時間後に EQ ジョ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濃度依存的に培地・細胞で検出された。ジオルトキノン付加体のみが検出されたことは、EQ がヒトチロシナーゼの良好な基質として作用していることを示唆し

ていると言える。

## 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」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。その結果、オルトキノン体のチオール付加体を HPLC 電気化学検出法により定量する分析法を確立した。本法は感度および特異性において優れている。今年度は化合物に暴露した細胞中の残存グルタチオン量との相関を調べた(最上分担)。

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、グルタチオンやシステインなどの細胞内 SH 基との反応性が高い。タンパク中の SH 基と反応すると、機能変化あるいは変成・修飾による抗原性の獲得が白斑誘導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 4SCAP, RK, MBEH, 4-TBP, 4SCAP, CRE の暴露により、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た。

今年度は、本法の適用対象を広げ、白斑誘導能の報告は無いが、RD 同様に 4-置換フェノール構造を持つ RES ならびに EQ について検討を行った。その結果、いずれの化合物からもオルトキノン体のチオール付加体の産生を確認することができた。

## 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を受け、本法を同様な 4-置換フェノール構造を有するが、白斑誘導の報告がない RES ならびに EQ に適用した。

その結果、両者から濃度依存的にオルトキノンのチオール付加体が産生することが確認され、皮膚への大量塗布の危険性が懸念された。

## 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*.

3) Matsunaga K, Suzuki K, Ito A, Tanemura A, Abe Y, Suzuki T, Yoshikawa M, Sumikawa Y, Yagami A, Masui Y, Inoue S, Ito S, Katayama I. Rhododendrol-induced leukoderma update I: clinical findings and treatment. Journal of Dermatology. 48, 961-968, 2021.

4) Inoue S, Katayama I, Suzuki T, Tanemura A, Ito S, Abe Y, Sumikawa Y, Yoshikawa Y,

Suzuki K, Yagami A, Masui Y, Ito A, Matsunaga K. Rhododendrol-induced leukoderma update II: pathophysiology, mechanisms, risk evaluation, and possible mechanism-based treatments in comparison with vitiligo. Journal of Dermatology 48, 969-978, 2021.

5) Ito S, Tanaka H, Ojika M, Wakamatsu K, Sugumaran M. Unique oxidative transformations of 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde generates potentially reactive intermediates as causative agents for its neurotoxicity. International Journal of Molecular Sciences. 22, 11751, 2021.

6) Bjerke DL, Wu S, Wakamatsu K, Ito S, Wang, J, Laughlin T, Hakozaiki T. A framework to mitigate the risk of chemical leukoderma: consumer products. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 131, 105157, 2022.

### 2. 学会発表

1) 田中ひとみ, 伊藤祥輔, 小鹿一, 近藤一成, 最上知子, 若松一雅。エクオールのチロシナーゼ酸化はメラノサイトに細胞毒性を示す新奇なジオルトキノンを生成する。第30回日本色素細胞学会学術大会, 2021年10月23日仙台。

## 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