

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-置換フェノール類は色素細胞内でチロシナーゼにより「オルトキノン体への代謝活性化」を受け、白斑発症をもたらす機序が提唱されている。本研究はこの「代謝活性化」に着目し、代謝物解析あるいは細胞毒性の発現を検出する方法の構築を目的とする。「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」の出現は白斑誘導性フェノール類の一部に限定されたことから、今年度はオルトキノン代謝物への細胞感受性の増強をめざして一連の抗酸化遺伝子発現を制御する転写因子 Nrf2 を B16BL6 細胞においてノックダウンし、白斑誘導性フェノール類 5 化合物の細胞毒性を増強することに成功した。チロシナーゼの基質とならない位置異性体での増強は認められず、細胞毒性の増強効果がオルトキノン体の産生に関連することが示唆された。一方、毒性増強効果の認められない化合物も存在しており、白斑誘導性フェノール化合物のチロシナーゼによる代謝活性化の評価には代謝物解析が優れることが判明した。

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連し、再発防止のため医薬部外品成分等化合物の白斑誘導能の評価が必要とされている。RD およびその類似構造(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への代謝を受ける。オルトキノン体は SH 基との反応性が高く、細胞内 SH プールの枯渇やタンパク修飾を介して色素細胞を傷害し、あるいは免疫応答を介して白斑発症をもたらす機序が提唱されている。本研究では決定的過程である「チロシナーゼによる代謝活性化」に着目し、その評価法を構築することを目的とする。

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する手法を確立した。本法により、白斑誘導性の

RD、4-S-システアミニルフェノール(4SCAP)、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) の 7 化合物について、オルトキノン体のグルタチオン・システイン付加体が濃度依存的に産生され、細胞・培地より検出されることを示した。一方、白斑発症報告の無いルシノール(RUC)および 4SCAP の構造異性体 2SCAP では検出されない。

オルトキノン体は毒性が高く、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化は細胞生存率の低下をもたらすことが予想される。昨年度はメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」を評価する手法を検討したが、毒性発現は白斑誘導性フェノール類の一部に限定された。そこで今年度は抗酸化遺伝子のマスターレギュレーターである Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝

物産生に対する細胞の感受性増強を試みた。

B. 研究方法

B16BL6 細胞に Nrf2 の特異的 siRNA をトランスフェクションしてノックダウンした。24 時間後に各種フェノール類を暴露し、24 および 48 時間後の細胞生存率を ATP 含量の測定により決定した。Nrf2 のノックダウン効率は、mRNA をリアルタイム PCR で測定し判定した。

C. 研究結果

1. B16BL6 細胞の白斑誘導性フェノール類に対する感受性の Nrf2 ノックダウンによる増強

白斑誘導性フェノール化合物代謝物に対する B16BL6 細胞の感受性増強を目的に、抗酸化因子 Nrf2 のノックダウンを試みた。Nrf2 の特異的 siRNA をトランスフェクションすると、24 時間後の Nrf2 mRNA レベルはコントロール siRNA 処理細胞の $9.2 \pm 0.4\%$ に低下した。

細胞に 4SCAP を暴露すると、24 時間後の細胞生存率は濃度依存的に低下し、Nrf2 ノックダウンによりさらに顕著に低下した。一方、4SCAP の位置異性体 2SCAP を 24 時間、48 時間処理した場合には生存率は全く低下せず、Nrf2 ノックダウンの影響も認められなかった。

MBEH を暴露すると、24 時間後の細胞生存率の低下は Nrf2 ノックダウンにより増強された。Nrf2 ノックダウンによる低下は 48 時間後にはさらに拡大した。CRE の場合には、Nrf2 ノックダウンによる生存率低下は 24 時間で顕著に認められた。

RD ならびに RK 処理の場合には、24 時間後の細胞生存率に Nrf2 ノックダウンは有意な影響を与えなかった。処理を 48 時間に延長すると、Nrf2 ノックダウンにより顕著に低下した。

一方、TBP については、24 時間、48 時間処理において Nrf2 ノックダウンの影響は認められなかった。

[令和 4 年度分担報告書の訂正

p.14 C.2 14～16 行目を以下に変更：

(100 μM) の共存は、RK (0.3～1.0 mM)、MB (0.01～0.3 mM) の 24 時間処理による細胞生存率低下に影響を]

[p.14 C.2 18～20 行目を以下に変更：

ES936 (500 μM) は RD (0.1～0.6 mM)、RK (0.1～0.6 mM) による細胞生存率低下を増強しなかった。]

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オルトキノン体への代謝活性化」は、白斑発症に決定的な段階と考えられている。昨年度はメラノーマ B16BL6 細胞を用い、「チロシナーゼ依存的な細胞毒性」が代謝活性化の評価指標となり得るか検討を行ったが、毒性の検出は白斑誘導性フェノール類の一部に限定された。そこで今年度は、B16BL6 細胞の Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝物に対する細胞感受性の増強を図った。転写因子 Nrf2 は細胞の抗酸化作用に関わる一連の遺伝子転写を制御し、酸化ストレスの防御に機能する。実際、Nrf2 がメラノサイトでの MBEH の毒性を防ぐ役割が報告されている。

B16BL6 細胞の Nrf2 を siRNA 処理によりノックダウンすることにより、白斑誘導性フェノール類 5 化合物の細胞毒性が顕著に増強されることが判明した。一方、チロシナーゼの基質とならずオルトキノン体に代謝されない 2SCAP では影響が無く、毒性増強がオルトキノン体産生に関連することが示唆された。4SCAP、MB、CRE の増強は速やかであり、RD、RK の毒性も処理時間の延長により劇的に増強され、チロシナーゼ依存の細胞毒性評価が困難であった化合物の評価に有用と期待される。しかしながら TBP については Nrf2 ノックダウンによる毒性増強は認められなかった。TBP は代表的な白斑誘導性フェノールであり、ヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた代謝物解析ではオルトキノン代謝が検出されている。したがって、チロシナーゼによ

る代謝活性化の評価には代謝物解析が優れており、ヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を用いる手法は、細胞毒性による評価より感度と特異性に優れることが判明した。

E. 結論

白斑誘導性フェノール類の「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝」を効率良く検出するために、B16BL6 細胞の抗酸化転写因子 Nrf2 をノックダウンし、オルトキノン代謝物による細胞毒性を増強することに成功した。

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

1) 最上(西巻) 知子, 伊藤祥輔, 崔紅艶, 秋山卓美, 為廣紀正, 安達玲子, 柴田識人, 若松一雅, 五十嵐良明, 近藤一成. 白斑誘発性フェノール類のヒトチロシナーゼによる代謝活性化の評価. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20, 横浜)

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