

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 客員研究員

ロドデノール配合薬用化粧品（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ロドデノール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。

チロシナーゼによる酸化に続いてSHペプチドと結合させる試験系において、DMSO濃度20%で水溶性の低いアピゲニンの反応が認められ、SHペプチド付加体として検出された。本条件により水溶性の低いフェノールのチロシナーゼ反応性が評価できると考えられる。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。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、4-置換フェノール類に広範囲に応用でき、感度、特異性ともに優れた方法と言える。

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
伊藤祥輔 藤田医科大学医療科学部名誉教授

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、過去四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。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、色素細胞の

直接傷害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。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

ノンと SH 含有ペプチドが結合したカテコール体として検出することができた。

RD ならびに 4-*S*-システアミニルフェノール (4SCAP) のオルトキノンのグルタチオン・システイン付加体を細胞・培地より 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 2-*S*-システアミニルフェノール (2SCAP) では検出されないことを示した。

本研究は、「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により検出する方法の構築を目的とする。

今年度は、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について、水溶性の低い物質に適用できる方法への改良を検討するために有機溶媒ジメチルスルホキシド (DMSO) の酵素活性への影響を検討し、また、定量分析を行うための手法を検討した。

また、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、オルトキノングルタチオン付加体に対する細胞の感受性増強を試みた。

更に、PTS のチロシナーゼによる代謝活性化について、RES との比較検討を行った。最後に、チロシナーゼ依存性の代謝が明確でないヒドロキノン (HQ) について、同様に解析を行った。

B. 研究方法

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

アピゲニン、SH ペプチド DPRA(Cys) (Ac-RFAACAA) 及びマッシュルームチロシナーゼを、濃度の異なる DMSO を含んだリン酸バッファー (pH6.5) 中で反応させ、生成物を LCMS で分析した。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(I) [最上]

B16BL6 細胞の Nrf2 を特異的 siRNA のトランスフェクションによりノックダウンし、24 時間後に各種フェノール類を暴露し、24 および 48 時間の細胞生存率を ATP 含量の測定により決定した。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。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(II) [伊藤]

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. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

水溶性が低く、DMSO 濃度が 5% (90 μ L 中 4.5 μ L) である条件では反応生成物が検出されないアピゲニンを最終濃度 20% の DMSO を含む反応液中で反応させたところ、DPRA(Cys) のピークが減少し、apigenin や DPRA(Cys) と異なるピークが検出された。マススペクトルではいずれにも m/z 510 のマスピークが観察された。アピゲニンの分子量は 270 であるから、(MW+749)/2 であり、プロトンが 2 個付加した 2 価陽イオンと考えられる。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(I) [最上]

抗酸化転写因子 Nrf2 のノックダウンにより、オルトキノングルタチオン付加体に対する細胞の感受性増強を試みた。B16BL6 細胞の Nrf2 mRNA レベルを 90%

低下させると、白斑誘導性フェノール類 4-S-システアミニルフェノール (4SCAP)、モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH) および p-クレゾール(CRE)による細胞生存率低下が顕著に増強された。ロドデノール (RD)、ラズベリーケトン (RK) については処理時間の 48 時間への延長により細胞毒性が劇的に増強された。一方、2SCAP および白斑誘導性 4-tert-ブチルフェノール (4-TBP) の毒性増強は認められなかった。

3. 安全性評価法 (細胞系) の構築(II) [伊藤]

PTS が RES と同様の代謝を受ける可能性について比較検討を行った。その結果、PTS はチロシナーゼ酸化によりオルトキノン体を形成し、N-アセチルシステインなどのチオール類と反応して付加体を形成した。また、ヒトチロシナーゼ発現細胞において、細胞内には PTS が RES よりも 8 倍多く取り込まれ、システインおよびグルタチオン付加体が 3 倍多く産生されることを確認した。加えて、B16BL6 細胞において、チロシナーゼ依存性の細胞毒性を示した。この結果は親油性基である PTS の二つのメチル基により膜透過性が向上して細胞内タンパクと結合しやすくなり、メラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性を示唆している。

D. 考察

1. 安全性評価法 (代謝物分析系) の構築 [秋山]

昨年度までの調査と研究により、酸化を受けた被験物質のペプチドとの結合に関しては水と混和する溶媒であれば影響は与えないと考えられ、また、チロシナーゼの活性に与える影響については、DMSO 濃度 20% までは酵素活性に影響はなく、50% でもある程度の活性があることが判明した。

そこで、水溶性の低い 4 置換フェノールとしてアピゲニンを用いて検討した。その結果、結合ペプチドの生成が確認された。

20% DMSO の反応では m/z510 のマスピークを持つクロマトピークが 2 本観察された。

昨年度の研究により 50% DMSO ではチロシナ

ーゼの活性がやや小さくなることが確認されており、50% DMSO 中で生成物のピークが小さくなった理由と考えられた。

2. 安全性評価法 (細胞系) の構築(I) [最上]

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活性化」は細胞毒性をもたらすことが期待される。細胞のオルトキノン感受性を増大させるために、一連の抗酸化遺伝子発現を制御する転写因子 Nrf2 のノックダウンを B16BL6 細胞において試み、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 2SCAP の増強は認められず、細胞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。一方、4-TBP は代表的な白斑誘導性フェノールであり、ヒトチロシナーゼによるオルトキノン体への代謝を検出しているが、Nrf2 ノックダウンによる毒性増強は認められなかった。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。

3. 安全性評価法 (細胞系) の構築(II) [伊藤]

PTS の in vitro でのチロシナーゼによる代謝活性化について、ヒトチロシナーゼ強制発現 293 細胞を用いて、チオール付加体への代謝活性化を確認した。

さらに、HQ について、これまで明確でなかったチロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。

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。本法は細胞生存率を用いる細胞毒性評価法に比べ、感度および特異性において優れている。

E. 結論

チロシナーゼによる酸化に続いて SH ペプチドと結合させる試験系を水溶性の低い被験物質にも適用したところ、20% DMSO 存在下においてアピゲニンの結合ペプチドが生成することが確認できた。

次のような条件による試験を提案する。

0.3 mol/L substrate

0.5 mol/L DPRA (Cys)

167,000 U/L mushroom tyrosinase

in 50 mmol/L KPB pH6.5, 20% DMSO

25°C, 30 min

final 0.2% acetic acid

白斑誘導性フェノール類の「チロシナーゼにより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への細胞感受性を増強することに成功した。

白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する代謝活性化の細胞での評価法の確立を受け、同様な4-置換フェノール構造を有し、RES のジメチル体である PTS についてチロシナーゼによる代謝活性化を調べた。その結果、RES 同様に PTS についてもメラノサイトに対して細胞毒性を示す可能性が示唆された。

HQ は色素沈着症の治療に汎用されている化合物であるが、まれに色素過形成（外因性

ochronosis) を起こすことが知られている。しかし、その機序は明らかではない。今回、チロシナーゼ依存性の代謝経路を明らかにすることができた。Ochronosis 機序解明につながることを期待したい。

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