

令和元年5月22日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10156

研究課題名(和文) 美白剤の色素細胞障害性における酸化ストレスの関与

研究課題名(英文) Role of oxidative stress in the cytotoxicity caused by skin whitening agents

研究代表者

錦織 千佳子 (Nishigori, Chikako)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：50198454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：発症機序を明らかにするために、培養色素細胞を用いて検討した。色素細胞に美白剤の一つロドデノール(RD)を処理後、紫外線(UV)を照射したところ、各単独処理では細胞障害を引き起こさない量で、有意に細胞障害性が増強した。この細胞死の発生機序として、RD+UVの両者が作用することにより酸化ストレスが増強し、ERストレスが誘導された結果、アポトーシスが增強されたためと示唆された。ERストレスが原因となって生じるアポトーシスに起因する色素細胞の細胞障害性はN-アセチルシステインの投与により改善したことから、同剤の白斑治療薬としての有用性を示すものと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

美白剤を含む化学物により白斑が引き起こされることがあり、化学白斑とか職業性白斑と呼ばれるが、その化学物質に曝露された全員が発症するわけではなく、一旦引き起こされると治療が難しい例もある。今回の結果から、化学物質単独では色素細胞の障害を起こさないような常用量であっても、紫外線炎症をはじめとする炎症が惹起されている条件下であれば、酸化ストレス誘導により白斑が引き起こされやすくなる可能性があること、また、そのような炎症を抑える薬物は白斑の治療薬と成り得ることを示唆しており、一般の日用品のユーザーにも有益な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Pathomechanisms of chemical leukoderma was investigated using a skin whitening agent, 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol, RD). We examined the effect of UV radiation (UVR) on RD-induced melanocyte cytotoxicity as an additional aggravating factor. UVR enhanced RD-induced cytotoxicity in normal human melanocytes via the induction of endoplasmic reticulum (ER) stress. Increased generation of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected. Pre-treatment with N-acetyl cysteine significantly attenuated ER stress-induced cytotoxicity in melanocytes treated with RD and UVR. Increase in cysteinyl-RD-catechol and RD-pheomelanin in melanocytes treated with RD and UVR suggested that, after UVR excitation, RD or RD metabolites are potent ROS-generating substances and that the tendency to produce RD-pheomelanin during melanogenesis amplifies ROS generation in melanocytes. Our results imply a possible usefulness of N-acetyl cysteine as a treatment drug for leukoderma.

研究分野：皮膚科

キーワード：メラノサイト 紫外線 美白剤 ERストレス 白斑 N-アセチルシステイン 酸化ストレス アポトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白斑はしばしば治療に難渋する皮膚疾患の1つで、患者のQOLを著しく低下させる。2013年本邦で美白剤として開発されたロドデノール(RD)含有化粧品の使用の一部に白斑が生じたことが報告され、社会問題にもなった。日本皮膚科学会が設立した当該化粧品の安全使用に関する特別委員会が中心になって、本疾患の特徴・経過などについて検討してきたが、その病態については未解明の部分も多い。RD誘発性脱色素斑は当該化粧品の使用者の1-2%にしか発症していないという事実は本製品が単独では細胞障害性を及ぼさないものの、使用環境や宿主の素因など、いくつかの要因が積み重なって発症することを窺わせると考えられ、そういう観点からの研究が必要だと考えられた。

2. 研究の目的

美白化粧品に含有されるロドデノール(RD)の培養ヒト表皮色素細胞における細胞障害性が紫外線照射により有意に増強され、アポトーシスを誘導を引き起こすことを見出したので、そのアポトーシスがいかなる機序で起こっているかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。普遍的な化学白斑の発症機序を明らかにし、尋常性白斑の病態との類似性と相違性を明らかにし、両者の病態解明をめざした。

3. 研究の方法

(1) 患者色素細胞と健常色素細胞でのチロシナーゼ活性抑制物質の色素細胞障害性の比較および酸化ストレスの検証

RDをヒト表皮色素細胞に処理してアポトーシス、小胞体ストレス、細胞内活性酸素の評価を行う。ルシフェラーゼ活性を用いたCaspase3/7活性の測定、リアルタイムPCR法を用いたCHOP mRNAの測定、さらにH2DCFDA法を用いた細胞内活性酸素の定量化、HPLCにて細胞内GSHとCySHの定量化を行う。また、酸化ストレスを誘導する因子として、紫外線照射あるいは過酸化水素添加がこれらの障害性に影響を与えるかどうかを検討した。

(2) 遺伝子発現解析のデータに基づいた多角的な検討

色素細胞にRD単独処理、UVR処理、RD=UVR処理の条件で、それぞれ経時的に遺伝子発現解析を行い、そのデータを基に多角的な検討を行う。特に酸化ストレス応答に関する分子としてKelch-like ECH-associated protein1(Keap1)やNF-E2 related factor2(Nrf2)、小胞体ストレスやオートファジー関連分子などに着目して検討を進める。さらに尋常性白斑の疾患感受性遺伝子であるNLRP1などに着目し、尋常性白斑とRD誘発性白斑の類似性と相違性を比較検討した。

4. 研究成果

ヒト表皮色素細胞を用いた実験系において、RD+UVR群ではRD単独群と比較し、細胞障害性が増強することが示された。その効果の機序として、UVB照射(以下、UVRと略)は細胞内酸化ストレスの増大を引き金にして、小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導の機序により、ロドデノール(以下、RDと略)の色素細胞障害性増強効果をもたらすことを示し、この効果の機序をさらに解明するべく研究を進めた(図1a,b)。

アポトーシスの誘導をflow cytometryにて評価した。RD+UVR群では、アポトーシスを生じている細胞群およびネクローシスを生じている細胞群の割合がRD単独群と比較し増加していた。また、Caspase経路の活性化が生じていることを確認した(図1c)。RD+UVR群ではRD単独群と比較しウエスタンブロッティング法にてcleaved caspase3, 8のタンパク発現レベルが増加し、caspase経路の活性化が生じていた(図2)。

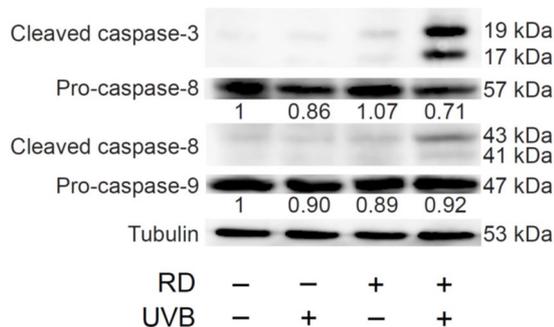


図2

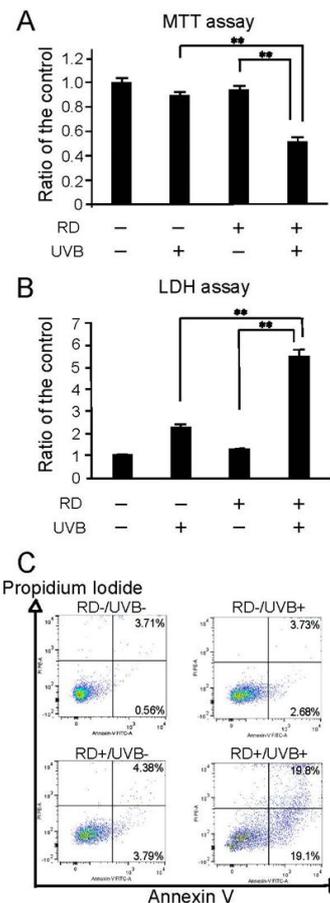


図1

続いて Caspase8 の活性化がどのデスレセプターを介しているかを評価した。RD+UVR 群ではデスレセプターである Fas、tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR-1)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor-1/death receptor 4 (TRAIL-R1/DR4)、TRAIL-R2/DR5 の mRNA 発現レベルが RD 単独群および UVR 単独群と比較し増加していた。ER ストレス誘導時に Fas、TNFR-1、TRAIL-R1/DR4、TRAIL-R2/DR5 の活性化が生じ、adaptor protein FADD の発現増加を介し caspase8 の活性化がみられる報告 (Iurlaro R *et al.* *FEBS J.* 2016) もあり、本研究においても ER ストレス誘導によるこれらのデスレセプターの活性化が生じている可能性があると考え、ER ストレス関連タンパクについて検討を進めたところ CHOP mRNA、ATF4、sXBP1 などの ERs トレス関連遺伝子の発現が、RD+UVR 群において有意に上昇していた (図 3)。また、TRAIL-R1/DR4 および TRAIL-R2/DR5 のリガンドである TRAIL の mRNA 発現は、色素細胞において無処理で発現が乏しく RD+UVR 処理にても発現増加は認めなかった。RD+UVR 処理はリガンドを介さずに直接デスレセプターを刺激し、caspase8 を活性化している可能性が示唆された。

Caspase の活性化がどの程度細胞死に寄与しているかを評価することを試みた。Z-VAD-fmk (pan caspase inhibitor) 投与下で、RD+UVR 処理による細胞死に与える影響を評価した。十分に caspase3/7 活性を阻害する濃度下で Z-VAD-fmk は RD+UVR 群の細胞死を抑制することができなかった。過去に同様の現象の報告例があり、Liu ら (*J. invest. Dermatol.* 2006) はヒト色素細胞に UVB 照射あるいは美白剤である 4-TBP を作用させた際に caspase 経路の活性化を認めるが、pan caspase inhibitor 投与下で細胞死を抑制できず、caspase 依存性アポトーシス単独ではなく、apoptosis-inducing factor (AIF) などのミトコンドリアの系等の caspase 非依存性アポトーシスを含むさまざまな系が複合的に細胞死に関与しているとした。RD+UVR のアポトーシスにおいても caspase 依存性アポトーシスや caspase 非依存性アポトーシスあるいはネクローシス等複数の経路の活性化が複合的に細胞死に寄与している可能性が示唆された。

RD の代謝産物が組織障害性を引き起こすという指摘もなされていたので、RD ならびにその紫外線曝露時の代謝産物の検討も並行して進めた。RD+UVR 群では RD 単独群と比較し RD 代謝物であり RD フェオメラニン及びその生成過程における前駆物質である non-protein-Cys-RD-catechol (以下、sxCys-RDC と略) の産生量の増加がみられることを明らかにした (図 4)。近年、フェオメラニンは UVA 照射等の刺激により free radical を産生したり (Wenczl *et al.* *J Invest Dermatol* 1998)、自家酸化の機序により (Napolitano *et al.* *Pigment Cell Melanoma Res* 2014)、細胞障害性を持つことが明らかとなっており、RD フェオメラニンもまたその benzothiazine 構造から酸化ストレス産生を促進することが示唆されている (Ito *et al.* *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015、Panzella *et al.* *Photochemistry and Photobiology* 2010)。本研究においても RD フェオメラニンが酸化ストレス産生を促進し、細胞障害に寄与していることが示唆された。

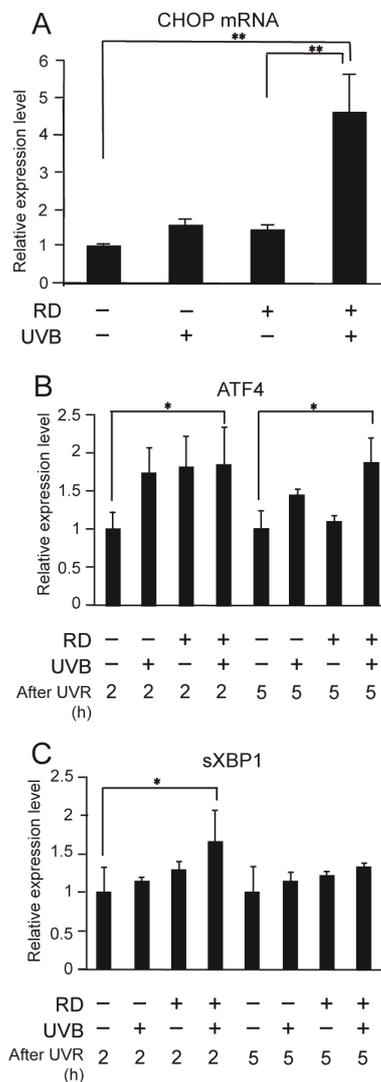
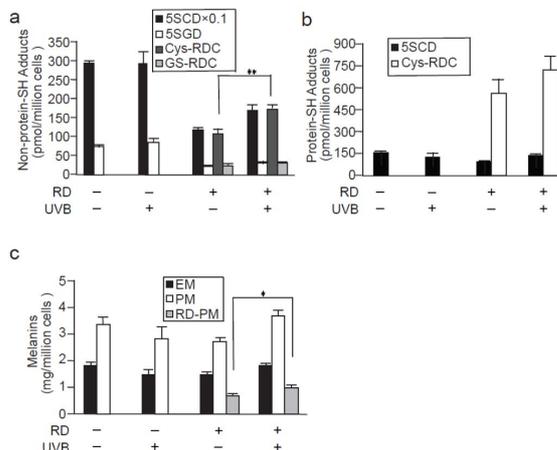


図 3

図 4



実際、RD+UVR 処理時に抗酸化剤である N-acetylcysteine (以下、NAC と略) 前投与による細胞内活性酸素、アポトーシスへの影響について検討したところ、NAC 投与により、細胞内活性酸素が有意に減少し、アポトーシスが有意に抑制された (図 5)

以上より、UVR は細胞内酸化ストレスの増大を引き金とし、小胞体ストレス誘導を介し RD の色素細胞障害性を増強することが示され、この細胞障害性は caspase 依存性アポトーシス単独ではなく、caspase 非依存性アポトーシスを含むさまざまな系が複合的に関与していること、それらの現象は抗酸化剤である NAC により軽減し、本剤の白斑への治療への適応の可能性も示唆されると考えた。

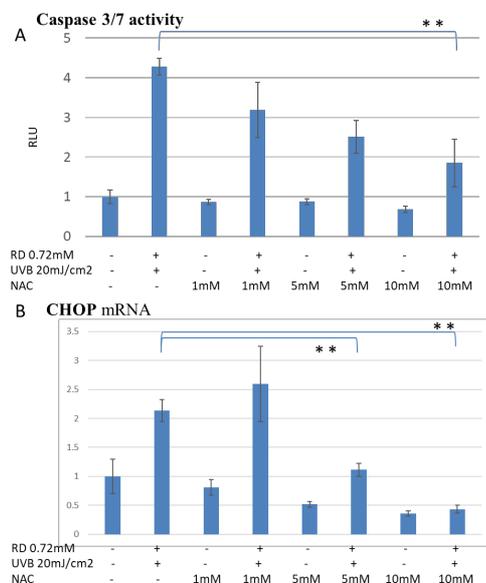


図 5

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C : 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp Dermatol* : 27(7) : 754-762, 2018. doi: 10.1111/exd.13555. 査読有
- Fukumoto T, Iwasaki T, Okada T, Hashimoto T, Moon Y, Sakaguchi M, Fukami Y, Nishigori C, Oka M : High expression of Mcl-1L via the MEK-ERK-phospho-STAT3 (Ser727) pathway protects melanocytes and melanoma from UVB-induced apoptosis. *Genes Cells* 21(2) : 185-199, 2016. doi: 10.1111/gtc.12330. 査読有
- 錦織千佳子 : 白斑治療の最前線 : 光線療法 . *MB Derma* 236 : 29-36, 2016. 査読無

[学会発表](計 1 件)

- 後藤典子、辻本昌理子、永井宏、正木太朗、伊藤祥輔、若松一雅、錦織千佳子 : N-acetylcysteine (NAC)は紫外線によるロドデノールの色素細胞障害性増強効果を軽減する . 第 27 回日本色素細胞学会年次学術大会、2016

[図書](計 1 件)

- 錦織千佳子 : 紫外線と美容・老化 . 最新美容皮膚科診療ナビゲーション、学研メディカル秀潤社、184 (35-39) , 2018.

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 永井 宏

ローマ字氏名 : NAGAI, Hiroshi

所属研究機関名 : 神戸大学

部局名 : 医学研究科

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 80335447

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。