

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22885

研究課題名(和文)美白成分による自己免疫性白斑誘発の作用機序の解明とその予測法の開発

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism whereby cosmetic skin-whitening ingredients induce leukoderma

研究代表者

片平 泰弘 (Katahira, Yasuhiro)

東京医科大学・医学部・助教(特任)

研究者番号：80881458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：2013年に美白化粧品の有効成分、ロドデノール(RD)が白斑症の原因物質として問題視されたが、その毒性を検出するin vitro実験系が未だ確率されておらず、白斑症の発症メカニズムもその詳細は明らかでない。

我々は、RDに対する感受性が高いメラノサイトの細胞死が皮膚下層の樹状細胞を活性化し自己免疫を誘導する事で発症すると仮説を立て、h-CLATにメラノーマ細胞層を追加した新しい実験系を確立した。これにより下層のTHP-1細胞から感作の指標であるCD86分子の発現上昇という形でRDの免疫毒性の評価が可能となった。また、この系を用いて樹状細胞の活性化に活性酸素種と細胞外ATPが関与する事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したin vitro実験系によって、事前の安全性試験でその毒性を知る事ができなかった化粧品成分のリスクを評価できた。ヒトの皮下の反応を模したこの実験系を用いる事で、ロドデノールによる白斑症発症までの詳細なメカニズムを解明できることが期待される。

また、h-CLATに追加する細胞層を別種の細胞に変えることで、特定の体組織の細胞との反応を介して間接的に免疫細胞を感作するような薬物毒性のスクリーニングも可能となる。

本成果は、これまで検知できなかった薬品の毒性評価を可能にした事で、化粧品、製薬業界において有用な新規成分の研究開発を促す事が期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：In 2013, the active ingredient of whitening cosmetics, rhododenol (RD), was regarded as a causative agent of vitiligo, but an in vitro experiment to detect its toxicity has not yet been established, and the mechanism of vitiligo is also not elusive.

We hypothesized that cell death of melanocytes, which are highly sensitive to RD, is caused by activating dendritic cells in the subskin layer and inducing autoimmunity, and established a new experimental system in which a melanoma cell layer was added to h-CLAT. This made it possible to evaluate the immunotoxicity of RD in the form of increased expression of the CD86 molecule, which is an index of sensitization, from the THP-1 cells in the lower layer. We also found that reactive oxygen species and extracellular ATP are involved in the activation of dendritic cells using this system.

研究分野：免疫学

キーワード：白斑症 感作 ロドデノール h-CLAT h-CLATw/M メラノサイト 樹状細胞 共培養

### 1. 研究開始当初の背景

(1)これまで、いくつもの薬用美白化粧品の有効成分が開発されてきたが、その中のロドデノール(RD)と呼ばれる成分が、2013年に白斑症の発症者が増加しその原因物質として社会問題となった。RDはメラニンの生成に重要なチロシナーゼ活性を抑制するタイプの成分の一つで、開発の段階で人体へのリスクは発見されず実用化に至っている。本研究開始当時においても、動物を用いない動物実験代替法による研究が推奨されている中、RDの毒性を評価できる*in vitro*実験系は開発されておらず、政府による新規美白成分の承認にも影響が出ており、新しいリスク評価系の開発が化粧品会社をはじめ関連業界からも渴望されていた。この毒性を検出できる実験系が構築されれば、発症機序の詳細な研究に応用できる事が期待され、疾患の詳細が明らかになれば効果的な治療法・予防法の開発が可能となるため、RDの毒性評価ができる実験系の開発は喫緊の課題となっていた。

(2)RDによる白斑症の発症機序として、RDはチロシナーゼによる代謝を受けてRDキノンとなる過程でROSを発生させ、細胞死を誘導すると考えられている。白斑症患者からはメラノサイト特異的なCTLの誘導が報告されていることから、RDを介したメラノサイトの細胞死が自己免疫を誘導すると予想されるが、その詳細は明らかでない。この予想される免疫毒性を検出できる実験系を構築できれば、RDにより白斑発症に至る免疫細胞の反応機序の詳細を解明する事ができると期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、白斑症を予測する新しい*in vitro*評価系の開発を目指し、その系を用いてRDが自己免疫性白斑症を誘発する作用機序の全貌を分子レベルで解明する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)評価法(h-CLATw/M)の構築

感作性評価法として、ヒト単球細胞株 THP-1 上の接着分子 CD54 と共刺激分子 CD86 発現増強を FACS で測定する h-CLAT 法 (Ashikaga et al. AATEX 2008) などの方法などが報告されている。ところが、この方法で RD を調べても陰性であった (図 1 中央)。そこで、メラノサイトでの代謝も考慮するため、当研究室で以前に開発した 3 次元 DC 共培養系 (図 2 A) を改良し、メラノサイトの代替細胞としてメラノーマ細胞 (SK-MEL-37) を Scaffold で 3 次元共培養し、その下に 2 次元培養の未成熟 DC の代替細胞である THP-1 からなる共培養系を構築した (図 2 B: h-CLATw/M)。メラノサイトを介さない時と比べて THP-1 上の共刺激分子の発現上昇が検出できるかフローサイトメトリーによって解析して評価を行った。白斑誘発成分のポジコンとして RD とラズベリーケトン、ネガコンの美白成分としてアスコルビン酸やトラネキサム酸を用いた。

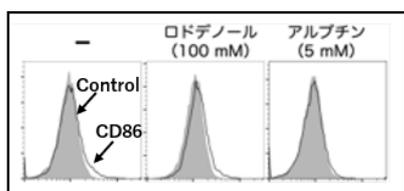


図1:h-CLATによるRDのTHP-1への作用の検討

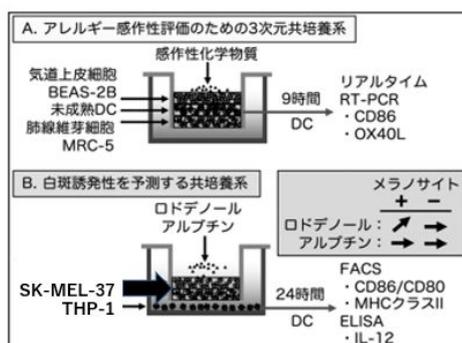


図2: 白斑誘発性を予測するための共培養系の構築と期待する結果

#### (2)樹状細胞を活性化する分子機構の解析

メラノーマを介して RD 処理した溶液中の何が THP-1 上の共刺激分子の発現を増加させるのか調べるために、感作性物質として知られている DAMPS と活性酸素種の効果を解析した。

活性酸素種の効果を解析するために、RD 処理済 h-CLATw/M の培養上清中の活性酸素種の定量を市販のキットを用いて行い、N-acetyl-L-cysteine (NAC)にて活性酸素種をブロッックした際の CD86 の発現を評価した。

RD による白斑発症に報告のある HMGB-1 が CD86 の発現を上昇させるのか調べるために、

h-CLATw/M の系を用いて RD 処理した培養液を回収して抗 HMGB-1 抗体処理した後に THP-1 を培養して、フローサイトメトリーで CD86 の発現が抑えられているか評価した。

### (3) 樹状細胞を活性化する分子機構の解析 2

RD 処理した h-CLATw/M から回収した上清中のどのような分子が THP-1 を活性化させるのか調べるために、95 15分で加熱して冷ました上清、10kDa 以上のタンパク質の分画を含む上清と 10kDa 以下の分子を含む分画に分けた上清、凍結融解によって傷害したメラノーマ上清を用いて h-CLAT を行った。また、上清の銀染色によって含有分子を解析した。

### (4) Th1 型免疫の誘導機構の解析

活性化した樹状細胞が CTL を活性化するためには、Th1 型免疫を誘導するメカニズムが考えられる。メラノーマを介した RD 処理が Th1 型の免疫を誘導するのか調べるために、IL-12 の発現を検討した。

h-CLATw/M の上清を回収して ELISA 法によって IL-12p35 および IL-12p40 の検出評価を試みた。

THP-1 の CD86 の発現上昇に関与すると考えられる物質が IL-12 の発現を誘導するか検討するために、リアルタイム q-PCR 法による解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 構築した評価法 (h-CLATw/M) の試験結果

h-CLATw/M を用いて、THP-1 上の CD86 と CD54 の発現をフローサイトメトリーによって解析したところ、メラノーマを介して RD 刺激した時に THP-1 の CD86 と CD54 の発現量が有意に上昇する事がわかった (図 3 ABC)。この結果は RD だけでなく、RD と同様に白斑症状が報告されているラズベリーケトン (RK) を用いて刺激しても同様の感作を誘発する事を示す結果が得られた (図 3 DE)。一方、非白斑物質として知られるアスコルビン酸 (AA) とトラネキサム酸 (TXA) について解析したところ、h-CLAT と有意な違いは検出されず (図 4 AB)、構築した h-CLATw/M が白斑物質と非白斑物質を見分けられる事が実験的に示された。

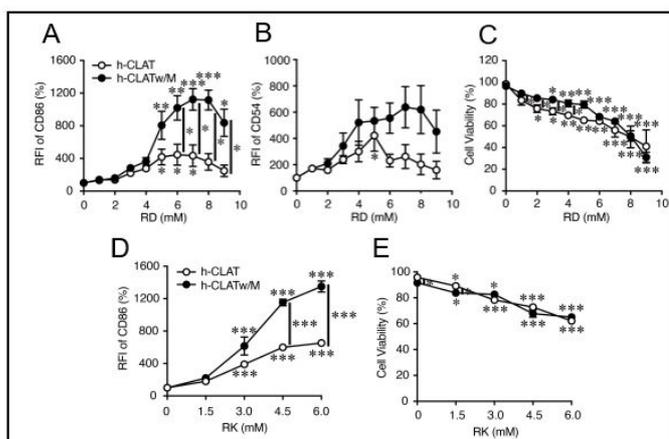


図3:h-CLATw/MによるRDとRKの感作性評価結果

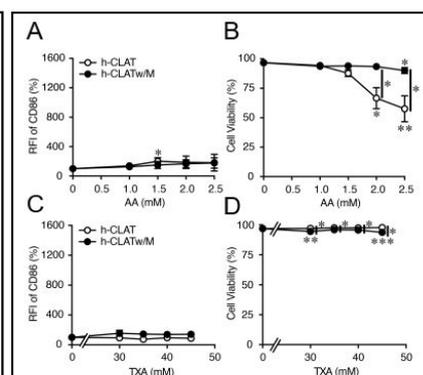


図4:h-CLATw/MによるAAとTXAの感作性評価結果

### (2) 樹状細胞を活性化する分子機構の解析経過

#### 活性酸素種の評価

メラノサイトは RD に対して高い感受性を持つことが知られており、その代替として使っているメラノーマ細胞 (SK-MEL-37) も高い感受性を持つ (図 5 A)。この感受性がチロシナーゼを介して発生する活性酸素種によるものと考えられ、RD によって発生した活性酸素種が THP-1 の刺激に関与するのか評価を行った。メラノーマを介して RD 処理を行った培養上清中には、高い濃度の活性酸素種が検出され (図 5 B)、N-acetyl-cystein (NAC) により活性酸素種を抑制すると THP-1 の CD86 発現上昇が NAC の濃度依存的に抑制された (図 5 CD)。この結果から、RD によって傷害を受けたメラノサイトから発生した活性酸素種は下層の樹状細胞を活性化する事が示唆された。

これまで、DAMPs、特に HMGB-1 が白斑症の発症に関与する報告があるため、その関連も評価した。RD 処理した h-CLATw/M 培養上清を HMGB-1 抗体で処理して THP-1 を培養後に CD86 の発現を解析したところ、コントロール抗体処理した上清と同等の高い CD86 発現結果が示された (図 5 - 2)。RD 処理によって発生する DAMPs のうち、少なくとも HMGB-1 は下層の樹状細胞の活性化

に大きな影響を与えていないとする結果が得られた。

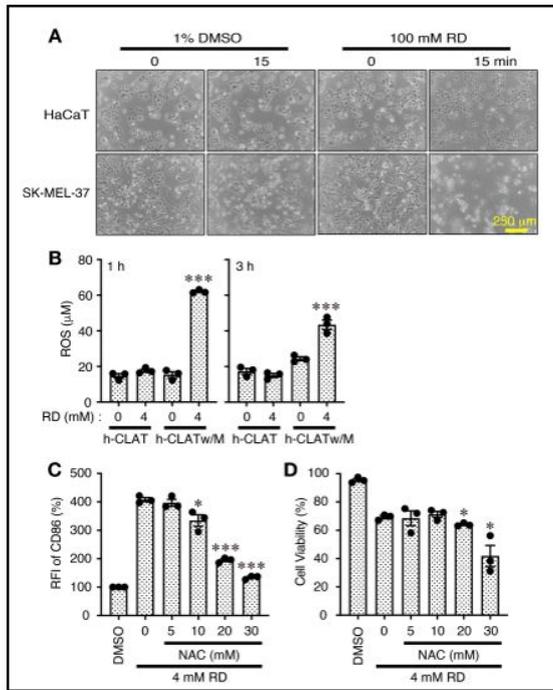


図5:h-CLATw/Mを用いてRD処理によって発生した活性酸素種の評価結果

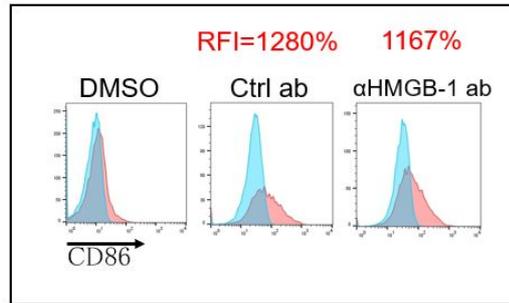


図5-2:h-CLATw/Mを用いてRD処理によって発生したHMGB-1の評価結果

### (3) 樹状細胞を活性化する分子機構の解析経過 2

熱処理した上清を用いて h-CLAT を行ったところ、THP-1 の CD86 の発現が抑制されなかったことから、タンパクは不活化していると考えられるため、低分子が関与する事が示唆された(図6 A)。これは、10kDa 以下の分子のみを含むフィルター分画上清の h-CLAT で CD86 の発現上昇が見られた事からも考えられた。上清の銀染色からは、低分子タンパクの分画に明確なバンドが見られない事から(図6 B)、タンパク以外の低分子が関与することが考えられた。これまで、RD によってメラノサイトの小胞体ストレス(ER ストレス)が誘発される事が報告されている。そこで ER ストレス由来の細胞外 ATP が THP-1 の活性化に関与するのではないかと考え、ATP 受容体の拮抗分子 Brilliant Blue G(BBG)で THP-1 上の ATP 受容体をブロックしたところ、CD86 の発現が抑制され(図6 C)、遊離した ATP が下層の樹状細胞の活性化に関与する事が示唆された。

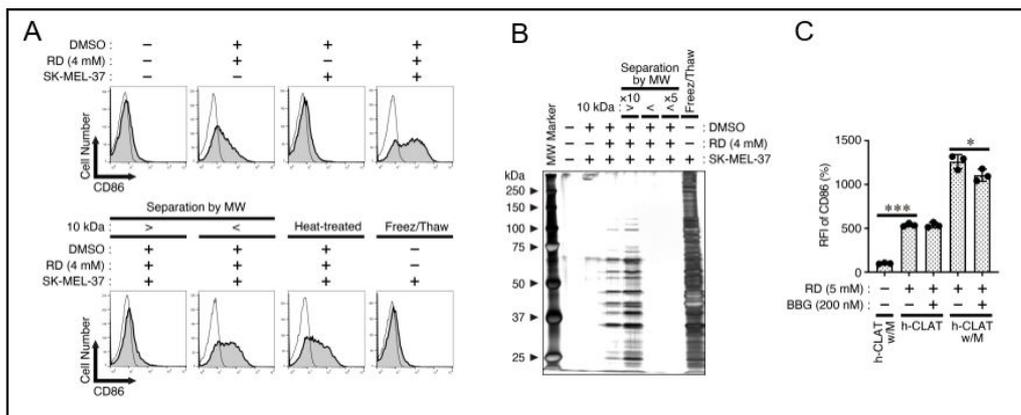


図6:THP-1の活性化に機能する分子の解析結果

### (4) Th1 型免疫の誘導機構の解析経過

ELISA 解析の結果、IL-12 の発現は認められなかった。

ELISA では IL-12 が検出されなかったが、リアルタイム q-PCR 法にて解析すると発現の変化を検出できた。本解析では樹状細胞の代替細胞を用いているため、IL-12 の発現が弱く検出に不向きであることが考えられた。

活性酸素種と ATP による刺激によって THP-1 が IL-12 の発現を増加するか調べたところ、両因

子を添加した h-CLAT によって THP-1 内の IL-12 の発現が上昇している事がわかった(図 7 AB)。この活性酸素種と ATP を NAC と BBG でそれぞれ抑制すると、IL-12 の発現も有意に抑制された(図 7 CD)ことから、RD によって傷害を受けたメラノサイトが放出した活性酸素種と細胞外 ATP が少なくとも下層の樹状細胞を活性化させ、IL-12 の産生を促す事で Th1 型免疫を誘導してメラノサイト特異的な CTL が誘導され、メラノサイトを傷害する自己免疫性白斑症の発症につながるのではないかと考えられる(図 8 AB)。

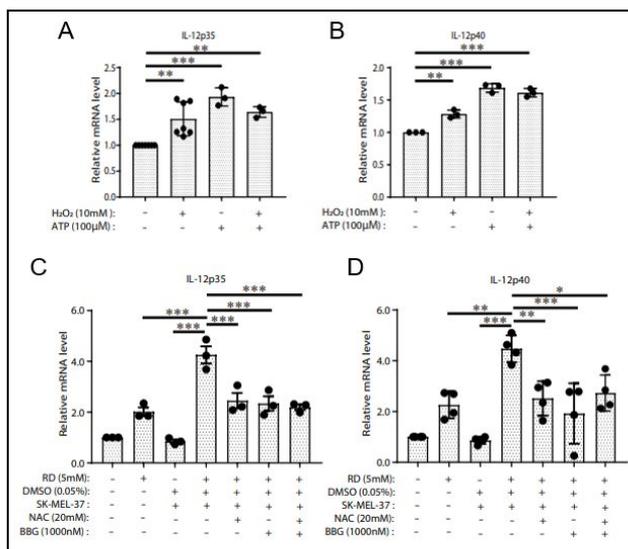


図7: IL12の発現解析結果

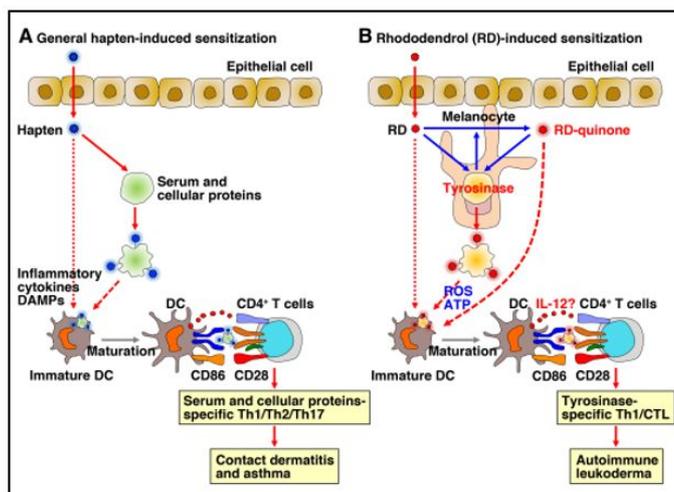


図8: 発症モデル

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hasegawa H, Mizoguchi I, Orii N, Inoue S, Katahira Y, Yoneto T, Mingli X, Miyazaki T, Yoshimoto T	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 IL-23p19 and CD5 antigen-like form a possible heterodimeric cytokine and contribute to experimental autoimmune encephalomyelitis development.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 5266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84624-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Onaka AT, Su J, Katahira Y, Tang C, Zafar F, Aoki K, Kagaw W, Niki H, Iwasaki H, Nakagawa T	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 Replication machinery prevents Rad52-dependent single-strand annealing that leads to gross chromosomal rearrangements at centromeres.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0934-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 片平泰弘、井上楨也、溝口 出、善本隆之	4. 巻 別冊
2. 論文標題 IL-12ヘテロダイマーサイトカインファミリーIL-12、IL-23、IL-35	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ「サイトカインのすべて」	6. 最初と最後の頁 53-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 井上楨也、古阪悠馬、渡邊有麻、坂本恵梨、長谷川英哲、村上史浩、米戸敏彦、徐 明利、片平泰弘、溝口 出、善本隆之	4. 巻 75(6)
2. 論文標題 骨髄由来抑制細胞の分子機序	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izuru Mizoguchi, Yasuhiro Katahira, Shinya Inoue, Eri Sakamoto, Aruma Watanabe, Yuma Furusaka, Atsushi Irie, Satoru Senju, Yasuharu Nishimura, Shusaku Mizukami, Kenji Hirayama, Sou Nakamura, Koji Eto, Hideaki Hasegawa, Takayuki Yoshimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel coculture system for assessing respiratory sensitizing potential by IL-4 in T cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ALTEX	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14573/altex.2111181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aruma Watanabe, Izuru Mizoguchi, Hideaki Hasegawa, Yasuhiro Katahira, Shinya Inoue, Eri Sakamoto, Yuma Furusaka, Ami Sekine, Satomi Miyakawa, Fumihiro Murakami, Mingli Xu, Toshihiko Yoneto, Takayuki Yoshimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 A Chaperone-Like Role for EBI3 in Collaboration With Calnexin Under Inflammatory Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers Immunology	6. 最初と最後の頁 757669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.757669.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 片平泰弘、樋口 廣士、山本雄一郎、安藤 潔、幸谷 愛、松下 弘道、八幡 崇、小池 亮、佐藤 克明、今留 謙一、善本隆之
2. 発表標題 Increased Granulopoiesis in the Bone Marrow following Epstein-Barr Virus Infection
3. 学会等名 第185回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本恵梨、片平泰弘、溝口 出、井上楨也、長谷川英哲、善本隆之美白成分による自己免疫性白斑症誘発の作用機序の解明
2. 発表標題 美白成分による自己免疫性白斑症誘発の作用機序の解明
3. 学会等名 第186回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本恵梨、片平泰弘、井上楨也、古阪悠馬、渡邊有麻、長谷川英哲、米戸敏彦、徐 明利、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 化粧品美白成分による白斑症誘発の作用機序の解明とそのin vitro評価法の開発
3. 学会等名 第33回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片平泰弘、坂本恵梨、井上楨也、古阪悠馬、渡邊有麻、長谷川英哲、米戸敏彦、徐 明利、溝口 出、善本隆之
2. 発表標題 化粧品美白成分による白斑症誘発の作用機序の解析
3. 学会等名 第34回日本動物実験代替法学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 被検物質の感作性検出方法、感作抑制物質のスクリーニング方法、および生体投与用組成物の製造方法	発明者 善本隆之、片平泰弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020-179860	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------