

論文内容の要旨

NAD(P)H dehydrogenase, quinone1 (NQO1) protects melanin-producing cells from cytotoxicity of rhododendrol

(Rhododendrol のメラニン産生細胞毒性はNQO1 発現により軽減される)

(大久保絢香, 安平進士, 柴崎晶彦, 高橋和宏, 赤坂俊英, 増田友之, 前沢千早)

(Pigment Cell & Melanoma Research 29 巻, 3 号 平成 28 年 5 月掲載)

I. 研究目的

Rhododendrol [4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (RD)] は、ツツジ属植物由来のフェノール化合物である。チロシナーゼ拮抗阻害による高いメラニン生成抑制効果を持つため化粧品として開発販売されたが、細胞毒性による誘発性白斑が問題となり 2013 年にリコールされた。近年、その細胞毒性の原因として RD 代謝物、あるいはその誘導体によるキノンラジカル生成の関与が示唆されており、我々は解毒因子として NAD(P)H dehydrogenase, quinone1 (NQO1) に注目した。NQO1 は KEAP1/NRF2 経路の制御下にあり植物化学物質のカルノシン酸 [Carnosic acid (CA)] より発現が誘導される。

本研究はメラニン産生細胞に対する RD の細胞毒性機構を解明するとともに、CA による NQO1 の発現誘導が、この細胞毒性を軽減できるかを *in vitro* および皮膚 3 次元モデルを用いて検証した。

II. 研究対象ならび方法

ヒト正常メラノサイト細胞 1 種類 (NHEM)、ヒト不死化メラノサイト細胞 1 種類 (HEMn-LP/hTERT1)、マウスメラノーマ細胞 1 種類 (B16BL6)、皮膚 3 次元モデル (Kurabo Industries Ltd, Osaka, Japan) を使用した。RD の細胞毒性および CA による細胞毒性軽減効果を WST アッセイ法で測定し、培養細胞における NRF2, NQO-1 の発現量を Western blotting 法で解析した。NQO1 阻害剤 (ES936)、または B16BL6 を親株として樹立した NQO1 条件発現株 (pA01) を用いて RD の細胞毒性に対する NQO1 の関与を解析した。B16BL6 細胞の抽出物および皮膚 3 次元モデルを用いて、RD のメラニン定量、肉眼的観察、顕微鏡的観察を行い、メラニン合成阻害効果を解析した。

### III. 研究結果

1. マウスメラノーマ細胞, ヒト正常メラノサイト, ヒト不死化メラノサイトのいずれにおいても, RD 単剤で半数の細胞が約 100  $\mu$ M で死滅したが, CA を添加するとその細胞毒性は 10 倍程度軽減された.
2. Western blotting により CA 投与時の NRF2 安定化と NQO1 発現の上昇を認めた.
3. NQO1 阻害剤(ES936)と CA を同時投与すると, CA による RD 細胞毒性軽減効果はほぼ完全に抑制された.
4. NQO1 条件発現細胞株は CA を添加しない場合でも, 親株に比べて 10 倍以上 RD に耐性であったが, NQO1 発現を人為的に抑制した条件では, その細胞毒性軽減効果は消失し, 親株と同程度の感受性に戻った.
5. CA 添加した B16BL6 の肉眼的観察および, 分光学的メラニン定量を行ったが, RD 単剤と比べ顕著なメラニン量の差を認めなかった.
6. CA 添加した皮膚 3 次元モデルの肉眼的観察で, RD 単剤と比べ顕著な黒化度の差を認めなかった.
7. 皮膚 3 次元モデルの顕微鏡的観察で, RD 単剤でほぼ全てのメラノサイトが死滅していたが, CA を添加するとメラノサイトの生存率の上昇が認められた.

### IV. 結 語

CA 添加により RD の細胞毒性は軽減された. この効果は NQO1 の発現上昇によることが阻害剤および遺伝子工学的な手法を用いた実験で確認された. CA は RD のメラニン合成阻害を抑制しないことがわかった. 以上から, 今後 CA と RD 組み合わせによる美白化粧品への応用有用性が示唆される.

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 古山 和道 (生化学講座：分子医化学分野)

副査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座：細胞生物学分野)

副査 教授 櫻庭 実 (形成外科学講座)

Rhododendrol (以下 RD) はチロシナーゼ拮抗阻害によるメラニン生成抑制作用を有するが、化粧品として使用された際には白斑を誘発したことから、細胞毒性も有する事が明らかになった。本研究論文では、RD の細胞毒性の発現機序を明らかにし、更にはメラニン抑制作用を減ずる事無く細胞毒性を軽減する薬剤の同定を試みた。以前より RD の代謝物あるいはその誘導体であるキノンラジカルが細胞毒性の原因となる可能性が指摘されていたが、申請者はキノンラジカルを分解する機能を持つ NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1) に着目し、内因性 NQO1 の誘導物質であるカルノシン酸(CA)が RD の細胞毒性を軽減する事や、NQO1 の過剰発現が RD の細胞毒性を軽減する事を明らかにした。更には皮膚 3 次元モデルを用いて、RD に CA を添加する事により、細胞毒性を減らしながらメラニン生成を抑制できる事を明らかにした。

本論文は、CA が内因性 NQO1 の発現誘導を介して RD のメラニン産生抑制効果を維持したまま細胞毒性を減弱させうる事を初めて示したものであり、学位に値する論文である。

### 試験・試問の結果の要旨

CA による NQO1 の発現誘導機序、白斑の発生しやすい部位、悪性黒色腫の治療薬となる可能性、日本人に白斑の発生が多い理由、 などについて試問を行ない、いずれも適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無い事を確認した。

### 参考論文

- 1) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 expression sensitizes malignant melanoma cells to the HSP90 inhibitor 17-AAG (NAD(P)H キノンオキシドレダクターゼ 1 の発現はメラノーマ細胞において HSP90 阻害剤である 17-AAG への感受性を上げる) (加西秋宅 他 8 名と共著) PLoS One, 11 巻, 4 号 (2016)
- 2) Four cases of Morbihan disease for successfully treated with doxycycline [ドキシサイクリンが奏功した 4 例の Morbihan 病] (大久保絢香 他 2 名と共著) Journal of Dermatology, 印刷中, (2017)
- 3) 家族性大腸腺腫症を合併した線状 IgA 水疱性皮膚症の 1 例 (大久保絢香 他 6 名と共著) 皮膚科の臨床, 57 巻, 7 号 (2015) : p1171-1174.
- 4) 尋常性痤瘡に合併した Solid Facial Edema 病の 1 例 (大久保絢香 他 2 名と共著) 皮膚科の臨床, 57 巻, 7 号 (2015) : p1201-1205.