

#### D. 考察

細胞実験は、条件検討を詳細にする必要がある。また、遺伝子抑制を定行的に行ってみる必要がある可能性がある。

#### E. 結論

現在までの実験ではADAM10の皮膚での影響の新規知見は得られなかった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kono M et al. Novel *ADAR1* mutations including single amino acid deletion in the deaminase domain underlying dyschromatosis symmetrica hereditaria in Japanese families. *Int J Dermatol* (in press)
2. Sawada M, Yokota K, Matsumoto T, Shibata S, Yasue S, Sakakibara A, Kono M, Akiyama M. Proposed classification of longitudinal melanonychia based on clinical and dermoscopic criteria. *Int J Dermatol* (in press)
3. Kono M et al. Dyschromatosis symmetrica hereditaria by ADAR1 mutations and viral encephalitis: a hidden link? *Int J Dermatol* 52:1582-4, 2013.
4. Kono M et al. Whole-exome sequencing

identifies ADAM10 mutations as a cause of reticulate acropigmentation of Kitamura, a clinical entity distinct from Dowling-Degos disease. *Hum Mol Genet* 22: 3524-33, 2013.

5. Mori M, Sugiura M, Kono M et al. Clinico-pathologic Analysis of 66 Japanese Thin Melanomas with Metastasis of Sentinel or Regional Lymph Node. *J Cutan Pathol* 40:1027-34, 2013.

##### 2. 学会発表（全国規模以上）

1. 河野通浩ら.網状肢端色素沈着症はADAM10 遺伝子変異によって発症する. 第25回日本色素細胞学会学術大会. 2013年11月16-17日.吹田市.
3. 著書
  1. Kono M, Akiyama M. Dyschromatosis symmetrica hereditaria and RNA editing enzyme. In: Naoki Oiso, eds. *Current Genetics in Dermatology*. Rijeka, Croatia: InTech, 2013: 105-20.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
発明の名称：フィラグリン遺伝子変異検出法及びその用途（出願番号：特願2013-222829、出願日：平成25年10月26日）
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 色素異常症に対する新規治療法の開発

研究分担者 川口雅一 山形大学医学部皮膚科 講師

研究要旨 チロシナーゼはメラニン合成にとって最も重要な酵素の一つである。この酵素の発現や活性を調節することで、色素異常の治療につながる可能性がある。我々は diacylglycerol (DAG) と phosphatidic acid (PA) の代謝に関与する diacylglycerol kinase (DGK) の阻害剤が MITF の発現を調整することを明らかにした。MITF はメラノサイトにおいて重要な働きがある転写因子であり、メラニン合成に関与する遺伝子や細胞増殖や生死に関わる蛋白の発現を調節する。また、ADAM (a disintegrin and metalloprotease) 阻害剤がヒトメラノサイトにおいてメラニン合成を抑制することを明らかにした。本研究を進めることにより、メラニン合成機構を理解するための基盤となる知見が得られ、将来的に治療につながることを期待される。

### A. 研究目的

Diacylglycerol (DAG)メラノサイトのメラニン合成を促進することが知られている。DAGの標的分子の一つである protein kinase C (PKC) $\beta$ はメラノサイトのチロシナーゼを活性化し、メラニン合成を促進させる。本研究では、DAGの代謝に関与する diacylglycerol kinase (DGK) に注目し、メラノサイトにおける DGK 阻害剤の効果を検討した。

ADAMs (a disintegrin and metalloprotease)は細胞膜上の増殖因子、受容体、接着分子のシェディングやインテグリンなどへの結合により、細胞の接着、運動、増殖に関与する多機能分子である。ADAM17は TNF- $\alpha$ 、TNF receptor、epidermal growth factor receptor ligands、KIT ligand (KITL)やその受容体 KIT のシェディングに関与する。ADAM17のノックアウトマウスでは毛の色素異常を呈し、また ADAM17は東アジア人の皮膚の色調を決定す

る遺伝子の一つである可能性が報告されている。ADAM10は CD44、E-cadherin、N-cadherin などのシェディングに関与しており、最近、網状肢端色素沈着症の原因遺伝子であると報告された。今回、ヒトメラノサイトにおける ADAM 阻害剤のメラニン合成に対する効果を検討した。

### B. 研究方法

培養正常ヒトメラノサイトやメラノーマ細胞株を用いて、メラニン量、チロシナーゼ活性、およびメラニン合成関連分子の発現に対する DGK 阻害剤、ADAM 阻害剤の効果を検討した。また RNA 干渉により同様の実験を行った。

### C. 研究結果

DGK 阻害剤は高濃度でメラノサイトの細胞増殖を抑制し、メラニン量、チロシナーゼ活

性を低下させた。またチロシナーゼタンパクの発現およびメラニン合成関連タンパク (TRP-1、DCT、pmel17、MITF)の発現を抑制した。

ADAM阻害剤はメラノサイトのメラニン量を低下させた。電子顕微鏡で観察したところ、阻害剤で処理した細胞では stage II、IIIのメラノソーム数が減少していた。このことからADAM阻害剤はメラノソーム形成に関与する可能性が示唆され、現在、siRNA による knockdown 実験や機能解析を行なっている。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kawaguchi M, Suzuki T. Gene expression and in situ localization of ADAM17 during skin wound healing. *Int J Dermatol*. 2013 Jul 8. doi: 10.1111/ijd.12119.
2. Kawaguchi M, Suzuki T. ADAM17 is involved in the regulation of chemokine expression in keratinocytes. *Int J Dermatol*. 2013 Jun 20. doi: 10.1111/ijd.12090.
3. 川口雅一、鈴木民夫. 遺伝性色素異常症のスキルアップ「診断のポイントと最新の知見」. *MB Derma* 203, 79-84, 2013

##### 2. 学会発表

1. Masakazu Kawaguchi, Yutaka Hozumi, Tamio Suzuki: ADAM protease inhibitor regulates chemokine expression in human keratinocytes, and modulates melanogenesis in human melanocytes. *International Investigative Dermatology*, Edinburgh, Scotland, 2013.5.8-11

2. 川口雅一: 色素沈着のメカニズム. 第112回日本皮膚科学会総会 教育講演, 横浜市, 2013.6.14
3. 川口雅一、穂積 豊、鈴木民夫: ADAMプロテアーゼ阻害剤はヒトメラノサイトの melanogenesis を調節する. 第25回日本色素細胞学会学術大会, 大阪市, 2013. 11.16

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 尋常性白斑における色素再生機構の解明

研究分担者 大磯直毅 近畿大学医学部皮膚科 准教授

研究要旨 先天性・後天性の白斑・白皮症には多種多様な疾患がある。先天性には全身型と限局型、後天性には限局型で不完全脱色素斑型と完全脱色素斑型に分類できる。それぞれの疾患において、色素再生機構を解明できれば、色素再生を誘導させ、治癒をめざすことができよう。われわれは、後天性完全脱色素斑を示す尋常性白斑において、速やかな色素再生とともに治癒したundetermined / unclassified vitiligoを組織学的に検討した。発症初期の病変部真皮へのマクロファージの著明な浸潤が、色素再生と免疫寛容を誘導に重要である可能性を示唆できた。色素再生機構解明は治療戦略開発のために重要である。

### A. 研究目的

先天性・後天性の白斑・白皮症には多種多様な疾患がある。先天性には全身型と限局型、後天性には限局型で不完全脱色素斑型と完全脱色素斑型に分類できる。それぞれの疾患において、色素再生機構を解明できれば、色素再生を誘導させ、治癒をめざすことができる。今回、後天性白斑・白皮症として「尋常性白斑」を解析した。われわれが経験した速やかな色素再生とともに治癒したundetermined / unclassified vitiligo症例の病変部を組織学的に検討した。

### B. 研究方法

免疫染色・蛍光染色による病理学的検討を実施した。

（倫理面への配慮）

近畿大学医学部で承認された臨床・組織写真を学術雑誌などで公表する同意書に記載を得た。

### C. 研究結果

undetermined/unclassified vitiligo症例  
19歳、男性。1年前に右手背に限局性の完全脱色素斑が生じた。初診（2010年5月）の38日前に屋外活動し、2週間前から白斑周囲に不完全脱色素斑が出現し、ターゲット状となってきたため、当科を受診した。完全脱色素斑部と不完全脱色素斑部境界部を含むようにして皮膚生検を実施した。酪酸プロピオン酸ヒドロコルチゾン軟膏外用で、2か月後にはかなり色素再生し、5か月後には完全に色素再生した。その後、外用は中止し、経過観察のみとしたが1年以上再色素脱失は観察されなかった。手背は難治になる確率が高く、通常の症例では酪酸プロピオン酸ヒドロコルチゾン軟膏外用で、速やかに完全に色素再生する症例は稀である。この症例は発症早期の皮膚病変を生検でき、速やかに軽快したことから、詳細な組織学的検討を行うこととした。

HMB-45を用いて染色したところ、真皮上層（表皮直下）にHMB-45陽性顆粒の沈着を認めた。また、真皮上層から下層にかけて、HMB-45を貪食した細胞を同定できた。HMB-45はシアル化されたPMEL17/GP100蛋白を認識する。シアル化されたPMEL17/GP100蛋白は第2期メラノファージに分布することから、第2期メラノファージもしくは第2期メラノファージの崩壊産物を真皮に浸潤している細胞が貪食していることを示す。蛍光抗体染色で真皮浸潤細胞はmelan-Aが陽性であり、早期メラノソームに発現する複数の蛋白の真皮内滴落と浸潤細胞による貪食が示された。浸潤細胞はおもにマクロファージであり、マクロファージが真皮内に滴落した幼弱なメラノソームもしくは崩壊産物を貪食していた。マクロファージによるクリアランス機能が著明に働いていることが色素再生に関連することを示した。

#### D. 健康危険情報

特記事項なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

(研究テーマ論文)

1. Oiso N\*, Tanemura A\* (\*co-first authors), Kotobuki Y, Kimura M, Katayama I, Kawada A. Role of macrophage infiltration in successful repigmentation in a new periphery-spreading vitiligo lesion in a male Japanese patient. *J Dermatol* 2013; 40(11):915-918. (査読有)  
(色素異常症関連論文)
1. Oiso N, Kawada A. Erythema dyschroicum perstans with both a macular lesion and a linear lesion following the line of Blaschko. *J Dermatol* 2013; 40(2): 127-128. (査読有)
2. Makino T, Yanagihara M, Oiso N, Mizawa M, Shimizu T. Repigmentation of the epidermis around the acrosyringium in piebald skin: an ultrastructural examination. *Br J Dermatol* 2013; 168(4):910-912. (査読有)
3. Oiso N, Fukai K, Kawada A, Suzuki T. Piebaldism. *J Dermatol* 2013; 40(5): 330-335. (査読有)
4. Oiso N, Suzuki T, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tanioka M, Fujimoto T, Fukai K, Kawakami T, Tsukamoto K, Yamaguchi Y, Sano S, Mitsuhashi Y, Nishigori C, Morita A, Nakagawa H, Mizoguchi M, Katayama I. Guidelines for the diagnosis and treatment of vitiligo in Japan. *J Dermatol* 2013; 40(5): 344-354. (査読有)
5. Oiso N, Matsuda H, Kawada A. Cutis tricolor of pure cutaneous trait as leukoderma and nevus spilus. *J Dermatol* 2013; 40(6): 490-491. (査読有)
6. Arase N, Wataya-Kaneda M, Oiso N, Arase H, Katayama I. CD1a-positive familial cutaneous mastocytosis without germ-line or somatic mutation in c-kit. *Br J Dermatol* 2013; 169(1): 201-204. (査読有)
7. Oiso N, Sato M, Kawada A. Vitiligo after combination therapy of pegylated interferon- $\alpha$ -2a, ribavirin and vitamin D in a patient with chronic hep-

- atitidis C. *J Dermatol* 2013; 40(9): 772-773. (査読有)
8. Oiso N, Kawada A. Idiopathic eruptive macular pigmentation following a Christmas tree pattern *J Dermatol* 2013; 40(11): 934-935. (査読有)
9. Oiso N, Matsuda H, Kawada A. Biopsy-proven pigmented poroma with no vascular structure in dermoscopy. *Int J Dermatol*, in press. (査読有)
10. Oiso N, Kawada A. Acral melanocytic nevus of the sole with the parallel ridge pattern. *Eur J Dermatol*, in press. (査読有)
2. 学会発表
1. 大磯直毅. 教育講演 臨床医にとっての研究 基礎研究の手技を用いた色素異常症の病態解析、第112回日本皮膚科学会総会 平成25年6月14 - 16日、横浜市
2. 大磯直毅. 教育講演 わかりやすい色素異常症 尋常性白斑研究と臨床的意義、第112回日本皮膚科学会総会 平成25年6月14 - 16日、横浜市
3. 大磯直毅. 尋常性白斑におけるQuality Indicator. 第64回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 平成25年11月2 - 3日 名古屋市
4. 大磯直毅, 種村 篤, 壽 順久, 木村雅友, 片山一朗, 川田 暁. 新規辺縁拡大病変部へのマクロファージ浸潤を認め、その後に完全に色素再生した尋常性白斑の1例. 第25回日本色素細胞学会学術大会 平成25年11月16 - 17日 吹田市
- F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

ヒト色素細胞を使用したメラニン色素産生関連因子の検討とヒトiPS細胞やエキシマライト照射ミニグラフト術を駆使した白斑・色素異常症に対する治療戦略

研究分担者 川上民裕 聖マリアンナ医科大学皮膚科 准教授

**研究要旨** 活性型ビタミンD3は白斑の治療外用薬として、レチノイン酸は肝斑など色素沈着症の治療外用薬として、使用されている。今回の実験で、ヒト色素細胞は、活性型ビタミンD3添加で濃度依存性にチロシナーゼ活性が亢進、レチノイン酸添加で濃度依存性にチロシナーゼ活性が低下した。この結果は、実臨床での活性型ビタミンD3外用薬とレチノイド外用薬の効果を裏付けると考えられる。メラノプラストでは、こうした現象は認められなかった。白斑と遺伝性対側性色素異常症では、エキシマライト照射併用ミニグラフト術が奏功した。今後、試みるべき有効な治療法と考える。iPS細胞から色素細胞への誘導が順調にすすみ、白斑・脱色素斑の再生医療への臨床応用をめざす。

#### A. 研究目的

白斑・脱色素斑、色素異常症の治療方法には、外用剤による治療法、紫外線療法、外科療法に大別される。最近、それぞれの分野で、注目されている治療法がある。それが、軟膏療法での活性型ビタミンD3軟膏、紫外線療法でのエキシマライト照射、外科療法でのミニグラフト術である。

活性型ビタミンD3軟膏は、白斑・脱色素斑に対する有効性に一定の評価がなされている。しかし、あくまでも臨床での結果であり、活性型ビタミンD3の白斑への作用機序は、まだ不明な点が多い。そこで、ヒト皮膚色素細胞とヒト皮膚メラノプラストを使用し、活性型ビタミンD3の作用を検討した。

紫外線療法では、かつてのPUVA療法、最近ではnarrow band UVB、そして最新の治療としてエキシマライト照射があげられる。また、外科療法では、かつては侵襲が多い分層植皮術が試行されたが、最新の治療としてミニグラフト術があげられる。そこで、現状の治療法をより改革する意味で、エキシマライト照射とミニグラフト術を組み合わせた治療法を用いて、治療効果を検討していく。

こうした治療でも難治な症例の治療として、ヒトiPS細胞を樹立し、色素細胞へ分化させ、白斑・脱色素斑に植皮する治療の確立をめざす。

#### B. 研究方法

世界で最も有名なIntrogenGibco社のヒト皮膚色素細胞と、譲渡されたヒト皮膚メラノプラストを使用し、活性型ビタミンD3(1, 25-dihydroxyvitamin D3)とレチノイン酸を各細胞に添加し、その変化を比較、検討した。また、Western blotting法でエンドセリンレセプターの発現 を検討した。

白斑と先天性に白斑をもつ色素異常症の遺伝性対側性色素異常症を対照疾患に、エキシマライト照射併用ミニグラフト術を行う。正常皮膚部をエキシマライト照射後、1mmトレパンパンチを用い採皮、1mmトレパンパンチで穴をあけた脱色素斑部に植皮、以降、植皮部を定期的にエキシマライト照射し、色素を回復させる。

iPS細胞を、マウス胎児線維芽細胞下での培養を行う。ついで、Matrigel（基底膜マトリックス）にiPS細胞をまき、分化への準備をすすめる。その後、色素細胞への培養条件設定を決め、分化を誘導していく。

#### （倫理面への配慮）

本試験では、患者のプライバシー保護のため、患者の全てのデータは症例登録番号、イニシャル、カルテ番号、生年月日で識別、同定、照会される。また、試験成績の公表などに関しても、患者のプライバシー保護に十分配慮する。データの二次利用は行わない。被

験者のデータ等を病院外に出す場合は、個人情報管理者を置く。

### C. 研究結果

ヒト色素細胞は、活性型ビタミンD3添加とレチノイン酸添加で細胞増殖が阻害された。一方、ヒトメラノブラストは、レチノイン酸添加で細胞増殖が阻害されたが、活性型ビタミンD3添加での影響はなかった。さらに、チロシナーゼ活性への影響を検討した。色素細胞は、活性型ビタミンD3添加で濃度依存性にチロシナーゼ活性が亢進した。対して、レチノイン酸添加で濃度依存性にチロシナーゼ活性が低下した。一方、メラノブラストは、活性型ビタミンD3、レチノイン酸ともチロシナーゼ活性での変化はなかった。

Western blotting法でエンドセリンレセプターの発現を検討したが、メラノブラストでは、活性型ビタミンD3上昇、レチノイン酸低下した。

遺伝性対側性色素異常症では、エキシマライト照射併用ミニグラフト術を、右手背で施行した。採皮は、下腹部の正常皮膚から行った。植皮術後、エキシマライト照射6か月で、植皮部とその周囲にまで色素の発現を確認した。白斑の効果を観察中である。

iPS細胞の培養は、マウス胎児線維芽細胞下で良好に培養された。そこで、Matrigel上にiPS細胞をまき、色素細胞誘導培養の条件にて分化を誘導したところ、形状的に色素細胞様の細胞誘導ができた。今後、色素細胞の特徴を兼ね備えているか、を検討していく。

### D. 考察

活性型ビタミンD3は白斑の治療外用薬として、レチノイン酸は肝斑など色素沈着症の治療外用薬として、使用されている。今回の実験で、色素細胞は、活性型ビタミンD3添加で濃度依存性にチロシナーゼ活性が亢進した。対して、レチノイン酸添加で濃度依存性にチロシナーゼ活性が低下した。この結果は、実臨床での活性型ビタミンD3外用薬とレチノイド外用薬の効果を裏付けると考えられる。メラノブラストでは、こうした現象は認められなかった。

白斑・脱色素斑に対する外科的治療におい

て、エキシマライト照射併用ミニグラフト術は、今後、試みるべき有効な治療法と考える。

iPS細胞から色素細胞をいかに効率よく、かつ大量に誘導できるか、その条件設定を今後、吟味していく。そして、色素細胞の再生医療を軌道にのせるための十分な研究が今後必要である。

### E. 結論

本研究の結果は、活性型ビタミンD3が白斑治療外用薬、レチノイン酸が肝斑など色素沈着症の治療外用薬として作用するメカニズムを示したデータとして有用と考える。

白斑と遺伝性対側性色素異常症には、エキシマライト照射併用1mmミニグラフト術は、積極的に施行されるべき治療と考えた。

iPS細胞からの色素細胞誘導は、白斑・脱色素斑の再生医療への先駆けとなる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Oiso N, Suzuki T, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tanioka M, Fujimoto T, Fukai K, Kawakami T, Tsukamoto K, Sano S, Mitsunashi Y, Nishigori C, Morita A, Nakagawa H, Mizoguchi M, Katayama I, Yamaguchi Y. Guidelines for the diagnosis and treatment of vitiligo in Japan. *J Dermatol.* 2013; 40(5): 344-354.
2. Kawakami T, Otaguchi R, Kyoya M, Soma Y, Suzuki T. A patient with dyschromatosis asymmetrica hereditaria treated with mini punch grafting, followed by excimer light therapy. *J Dermatol.* 2013 Sep;40(9):771-2
3. Fumimori T, Tsuruta D, Kawakami T, Ohata C, Furumura M, Hashimoto T. The effect of monochromatic excimer light on palmoplantar pustulosis: A clinical study performed in a private clinic by a dermatological specialist. *J Dermatol.* 2013 in press

#### 2. 学会発表

1. Kawakami T, Ohgushi A, Soma Y, Hirobe T. Effects of 1,



25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid in human epidermal melanocyte and melanoblast. The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research (JSPCR meeting 2013), 2013, Osaka (Pigm. Cell Res. (Pigm. Cell Melanoma R.), 26 (E): E6, 2013.) 11月17日 大阪

2. Otaguchi R, Kyoya M, Kawakami T, Soma Y, Suzuki T. A patient with dyschromatosis symmetrica hereditaria treated with mini punch grafting, followed by excimer light therapy. The 25th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research (JSPCR meeting 2013), 2013, Osaka (Pigm. Cell Res. (Pigm. Cell Melanoma R.), 26 (E): E7, 2013.) 11月17日 大阪

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

発明の名称: iPS細胞を使用した色素細胞 (メラノサイト) の分化誘導

発明者: 川上 民裕

出願番号または公開番号: 出願にむけて準備中 (聖マリアンナ医科大学発明委員会の承認は終了)

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

現在のところなし。

## アミノグリコシドによるナンセンス変異リードスルー効果による白皮症治療にむけての基礎実験

研究分担者 深井和吉 大阪市立大学准教授

研究要旨 白皮症についての研究は病態解析のみで、治療にむけての取り組みはなされていない。今回、白皮症の治療にむけ基礎的な実験を行うこととした。白皮症の治療戦略としては、①酵素補充、②ケミカルシャペロン、③リードスルー治療の3つが考えられる。今回はリードスルー治療にむけて検討することとした。日本人 OCA1 のチロシナーゼ変異として一番頻度が高いものは P310incC の 54%であり、次に R77Q で 20%、その次が R278X ナンセンス変異であり 9%となっている。この R278 については幸いこのコドンのミスセンス変異の報告がなく、違うアミノ酸が置換されたとしても酵素としての機能は保たれる可能性が高い。リードスルー効果の高い薬剤としてすでに、アミノグリコシドは翻訳を止めないように働くことが知られている。今回、日本人 OCA1 にもっとも頻度が高い R278X 変異について、アミノグリコシドによる治療が可能かどうかについての基礎実験を行うこととした。チロシナーゼの wild type tyrosinase cDNA と R278X 変異導入 tyrosinase cDNA をレンチウイルスベクターで HepG3 または NIH 3T3 細胞に感染させた。ベクターにヒグロマイシン耐性遺伝子を導入し、感染した細胞のみヒグロマイシンにてセクションし、野生型および R278X チロシナーゼを定常的に発現する、HepG3 と NIH 3T3 細胞株を作成した。この細胞株にゲンタシン 800 $\mu$ g/ml および 200 $\mu$ g/ml の濃度にて 24 時間培養し、抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。いずれの細胞株においてもゲンタシン、G418 とともに、R278X のナンセンス変異リードスルー効果は認められなかった。今回の実験では、アミノグリコシドによるチロシナーゼ遺伝子 R278X ナンセンス変異のリードスルー効果は認められなかった。今後他の薬剤について検討するとともに、リポーターアッセイのシステムを構築し、リードスルー効果を簡易に定量し、薬剤のスクリーニングを行える方向で検討していきたい。

### A.研究目的

これまでに、白皮症に対する治療にむけての実験ないし取り組みはなされてこなかった。白皮症の治療にむけての戦略としては、①酵素補充、②ケミカルシャペロン、③リードスルー治療の3つが考えられる。酵素補充治療は、血液脳関門により視力回復が見込めない。またケミカルシャペロンについては、適当な化学物質の候補の絞り込みが困難である。したがって、今回はリードスルー治療にむけて検討することとした。日本人 OCA1 のチロシナーゼ変異として一番頻度が高いものは

P310incC の 54%であり、次に R77Q で 20%、その次が R278X ナンセンス変異であり 9%となっている。この R278 については幸いこのコドンのミスセンス変異の報告がなく、違うアミノ酸が置換されたとしても酵素としての機能は保たれる可能性が高い。リードスルー効果の高い薬剤としてすでに、アミノグリコシドは翻訳を止めないように働くことが知られている。今回、日本人 OCA1 にもっとも頻度が高い R278X 変異について、アミノグリコシドによる治療が可能かどうかについての基礎実験を行うこととした。

## B. 研究方法・結果

チロシナーゼの wild type tyrosinase cDNA と R278X 変異導入 tyrosinase cDNA をレンチウイルスベクターで、melan-c 細胞に定常的に一定に発現させず感染させたところ、melan-c 細胞は残念ながら、レンチウイルスベクターの毒性によりすべて死亡してしまい、この実験系では使えないことがわかった。そこで、HepG3、NIH3T3、293T 細胞にチロシナーゼ野生型 cDNA を組み込んだウイルスを感染させ、L-DOPA 添加させたところ、HepG3 と NIH3T3 細胞では、肉眼的に明らかにメラニンの合成が行われていた。一方 293T 細胞では、まったく黒くならなかった。したがって、HepG3 または NIH 3T3 細胞を使用することとした。ベクターにヒグロマイシン耐性遺伝子を導入し、感染した細胞のみヒグロマイシンにてセレクションし、野生型および R278X チロシナーゼを定常的に発現する、HepG3 と NIH 3T3 細胞株を作成した。この細胞株にゲンタシン 800µg/ml および 200µg/ml の濃度にて 2 4 時間培養し、抗 FLAG 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。いずれの細胞株においてもゲンタシン、G418 とともに、R278X のナンセンス変異リードスルー効果は認められなかった。

(倫理面への配慮)  
該当しない

## C. 健康危険情報

該当なし

## D. 研究発表 (平成 24 年度)

### 1. 論文発表

1. Pediatric case report: Clinical profile of a patient with PCWH with p.Q377X nonsense mutation in the SOX10 gene. Oshimo T, Fukai K, Abe Y, Hozumi Y, Yokoi T, Tanaka A, Yamanishi K, Ishii M, Suzuki T. *J Dermatol.* 2012 Sep 11. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01671.x. [Epub ahead of print]
2. Piebaldism. Oiso N, Fukai K, Kawada A, Suzuki T. *J Dermatol.* 2012 Jun 1.

doi: 10.1111/j.1346-8138.2012. 01583.x.  
[Epub ahead of print]

3. Eleven novel mutations of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. Kawaguchi M, Hayashi M, Murata I, Hozumi Y, Suzuki N, Ishii Y, Wataya-Kaneda M, Funasaka Y, Kawakami T, Fukai K, Ochiai T, Nishigori C, Mitsunashi Y, Suzuki T. *J Dermatol Sci.* 2012 Jun;66(3):244-5. Epub 2012 Jan 28.
4. Nonsegmental vitiligo and autoimmune mechanism. Oiso N, Suzuki T, Fukai K, Katayama I, Kawada A. *Dermatol Res Pract.* 2011;2011:518090. Epub 2011 Jul 26.
5. Generalized vitiligo and associated autoimmune diseases in Japanese patients and their families. Narita T, Oiso N, Fukai K, Kabashima K, Kawada A, Suzuki T. *Allergol Int.* 2011 Dec;60(4):505-8. Epub 2011 Jul 25.
6. Two cases of infantile linear immunoglobulin A/immunoglobulin G bullous dermatosis. Kanayama Y, Tsuruta D, Tateishi C, Hasegawa Y, Amo K, Fukai K, Kobayashi H, Ishii M. *J Dermatol.* 2012 Feb;39(2):176-8. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01239.x. Epub 2011 Jul 18.
7. 日本皮膚科学会ガイドライン 尋常性白斑診療ガイドライン鈴木 民夫, 金田 眞理, 種村 篤, 谷岡 未樹, 藤本 智子, 深井 和吉, 大磯 直毅, 川上 民裕, 塚本 克彦, 山口 裕史, 佐野 栄紀, 三橋 善比古, 錦織 千佳子, 森田 明理, 中川 秀巳, 溝口 昌子, 片山 一朗 日本皮膚科学会雑誌 122(7) :1725-1740(2012.06)
8. 目で見ると小児科 点状軟骨異形成症の 1 例 鶴原 昭史, 齊藤 三佳, 新宅 治夫,

深井 和吉 小児科

53(3):273-274(2012.03)

9. 自己免疫疾患と白斑 深井和吉 皮膚科  
臨床アセット 11 シミと白斑最新診療  
ガイド 古江増隆総編集、初版、東京、  
中山書店 p.197-199(2012.8月)
2. 学会発表
  1. Livedo reticularis の 1 例 清水奈美、深  
井和吉、安水真規子、堀口悠衣、石井正  
光、橋本 祐介、中村博亮 第 431 回日  
本皮膚科学会大阪地方会 5 月 19 日 (大  
阪市)
  2. リドカインによる接触皮膚炎症候群と漸  
新世接触皮膚炎が合併した一例 青木麻  
子、深井和吉、大迫順子、森本真規子、  
小林裕美、石井 正光 第 42 回日本アレ  
ルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 7  
月 13 日～7 月 15 日 (軽井沢)
  3. アミノグリコシドによるナンセンス変異  
リードスルー効果による白皮症治療にむ  
けての基礎実験 深井和吉、國本浩之、  
中嶋弘一、鈴木民夫、石井正光 第 24 回  
日本色素細胞学会学術大会 11 月 24～  
25 日 (長浜市)

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
なし
- 2.実用新案登録  
なし
- 3.その他  
なし

## 結節性硬化症の白斑

研究分担者 金田眞理 大阪大学大学院医学研究科皮膚科学 講師

研究分担者 片山一朗 大阪大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 結節性硬化症（TSC）は原因蛋白ハマルチン、チュベリンの異常の結果、その下流のmTORの活性化がおこり、全身に過誤腫を生じる遺伝性疾患で、全身の腫瘍以外に、精神発達遅滞、てんかん、自閉症などの神経症状や白斑を特徴とする。TSCの白斑は遺伝性の白斑の中では最も多いといわれているが、本症における白斑の病態に関しては、不明である。我々はすでにmTOR阻害剤のラパマイシンがTSCの白斑改善に有効であり、TSCの白斑においてもmTORが関与する事を示した。さらに本症白斑部の組織を電顕、光顕を用いて組織学的に検討し、TSCの白斑ではメラニン合成の異常が起こっていることも示した。今回は、免疫組織染色で、TSCの白斑部ではTH4陽性細胞、TH17細胞の浸潤が認められると同時に、正常メラノサイトにTh17関連サイトカインを投与する事により、TSC白斑部で認められると同様の変化を正常メラノサイトに誘導することができることを示し、TSC白斑形成のメカニズムの一つとしてTh17関連サイトカインによる細胞環境も関与していることを示した。

### A. 研究目的

結節性硬化症(TSC)はmTORの活性化の結果、全身に過誤腫を生じる遺伝性疾患で、白斑以外に、精神発達遅滞、てんかん、自閉症などの神経症状と全身の腫瘍を特徴とする。TSCの腫瘍性病変の病態に関しては、最近よく解析が進んできているが、白斑の病態に関しては、いまだに不明である。本症の白斑に関しては、1975年にJimbowらがTSCの白斑においては、メラノサイトの数は正常で、メラノゾームの発達が悪いと報告している。また、2012年に我々が、mTOR阻害剤であるラパマイシンにより、本症の白斑が改善治癒することを報告した。さらに、2011年2012年の報告

で、TSCの白斑ではメラノサイトは存在するがメラノサイト内のメラノソームの形成異常、すなわちメラノサイト間でのメラノソームの不均一性が認められることを報告した。しかしながら、この不均一性を引き起こす原因は不明であった。本報告ではこのメラノソームの不均一性の原因を解明するために、TSCの白斑においても尋常性白斑におけると同様のサイトカインの異常の関係の有無を検討した。

### B. 研究方法

日本皮膚科学会のTSCの診断基準でTSCと確定診断できた種々の臨床症状のTSC患者の白斑部の生検標本を、hematoxylin.eosin、及び、melanA、CD4、CD8、CD1a、IL-17、FoxP3

などで染色し尋常性白斑の所見と比較検討した。同時に電子顕微鏡的にTSC白斑部のメラノサイト内のメラノソームの状態を検討した。さらに、正常メラノサイトに上記サイトカインを作用させメラノサイト内のメラノソームの変化を確認した。

**1) TSC患者白斑部の組織標本をTh17関連サイトカインに対する抗体で染色し、免疫組織科学的に尋常性白斑と比較検討をおこなった。** ;

TSC患者白斑部、尋常性白斑、及びTSC患者顔面の血管線維腫の組織を、melanA、CD4、CD8、CD1a、IL-17、FoxP3に対する抗体で染色し、染色結果を比較検討した

**2) TSC患者白斑部の電子顕微鏡を用いた組織学的検討 ;**

TSC患者白斑部と、対象として尋常性白斑の白斑部と正常コントロール部について、メラノサイト内のメラノソームの形態、数およびケラチノサイトにおけるメラノソームの形態、数について検討した。

メラノサイトとケラチノサイト間の転送障害は認められなかったため、8例のTSC白斑、3例の尋常性白斑について、それぞれの同一白斑部における10個のケラチノサイトのメラノソーム数を測定した。

**3) コントロールの培養メラノサイトに対するTh17関連サイトカインの影響の検討 ;**

コントロールのメラノサイトに、1 ng/mlのTNF- $\alpha$ 、10 ng/ml のIL-18、IL-6、IL-17A、TNF- $\alpha$ 及びそれぞれ1 ng/mlの全てのサイトカインを添加して5日間培養し、メラノソームの変化を観察した。

**(倫理面への配慮)**

検査に使用した患者組織は、診断目的で生検した皮膚組織を利用した。皮膚生検にあたっては被験者に対して、研究の目的と意義、利益と不利益、個人情報保護の保護、研究に同意しない場合でも被験者が治療上の不利益を被らないこと、医療者側の守秘義務、同意が得られた後でもいつでも撤回が可能であること等を含む項目について、あらかじめ十分に説明し、原則的に直接本人から（未成年者など同意能力のないものについては代理人から）同意書による承諾を得た。さらに、検体は研究の期間中、本学皮膚科にて保存し、被験者よりの破棄の要請があれば破棄することにした。検体は個人名が特定できないようにするため、連結可能匿名化を行った。

## C. 研究結果

**1) TSC患者白斑部の光学顕微鏡を用いた組織学的検討**

TSC、尋常性白斑の白斑部組織を、H.E.及びmelanA、CD4、CD8、CD1a、IL17、FoxP3に対する抗体で染色した。TSCではmelanAの染色は陽性であったが、尋常性白斑においてはmelanAの染色が認められなかった（平成21-23年報告書 図1）。一方TSCの顔面の血管線維腫ではMelanAの染色像が認められた。以上より尋常性白斑ではメラノサイトそのものが消失しており、TSCではメラノサイトにおけるメラニン顆粒の形成異常が示唆された。

**TSC患者白斑部のCD4、CD8、CD1a、IL-17、FoxP3の免疫組織学的検討**

TSC、尋常性白斑の白斑部及び、TSCの顔面血管線維腫部の組織を

CD4,CD8,CD1a,IL-17, FoxP3に対する抗体で染色し、それぞれを比較検討した。その結果TSCの白斑では尋常性白斑と同様に、CD4, CD1a,IL-17による染色像は増強しており、FoxP3の染色像は減少していた。しかしながら、CD8の染色像は尋常性白斑とは異なり増強は認められなかった。一方TSCの顔面血管線維腫ではCD1aの染色像の増強は認められたが、IL-17の染色は認められなかった(表1)。

## 2) TSC患者白斑部の電子顕微鏡を用いた組織学的検討

尋常性白斑の白斑部ではメラノサイトが消失していた。それに対して、TSCの白斑部ではメラノサイトは正常部と同等に認められた。しかしながらメラノサイト内のメラノソームに関しては、同一患者の同一白斑部においても、殆ど認められないものから正常と同等に認められるものまで種々の状態のものが混在していた。しかも存在するメラノソームの大部分がⅢ、Ⅳ期のものであった。ケラチノサイト内のメラノソームは、近傍のメラノサイト内のメラノソームを反映しており、メラノサイトからケラチノサイトへの転送障害は認められなかった(平成21-23年報告書図2)。

そこで、各患者の同一白斑部より、ランダムに10個のケラチノサイトを選出し1ケラチノサイトあたりのメラノソームの数を測定した。その結果TSCの白斑では1患者を除く7例でメラノソームの数が0から70の間でばらばらであったが、尋常性白斑では3例全例でほぼ0のところ集束していた。また、コントロールの組織では、35から50の間にピークが認められた(表1)。

## 3) コントロールの培養メラノサイトに対す

## るTh17関連サイトカインの影響の検討；

コントロールのメラノサイトに、1 ng/mlのTNF- $\alpha$ ,10 ng/mlのIL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$ 及びそれぞれ1 ng/mlの全てのサイトカインを添加して5日間培養し、メラノソームの変化を観察した。その結果IL-6のみを添加した群以外の全ての群でメラノソームの数の不均一性や、メラノソームの凝集像など、TSCの白斑で認められるのと同様の所見が認められた(表2)。

## D. 考察・結論

以上の結果より、メラノサイトそのものが消失している尋常性白斑と違い、TSCの白斑ではメラノサイトは存在するがメラノサイト内のメラノソームの形成異常が認められ、これらの異常を引き起こす原因のひとつとして、尋常性白斑と同様にTH17関連サイトカインにより引き起こされる細胞環境がTSCの白斑形成にも関与している可能性が示唆された。

## 参考文献

1. Jimbow K, Fitzpatrick TB, Szabo G *et al*. Congenital circumscribed hypomelanosis: a characterization based on electron microscopic study of tuberous sclerosis, nevus depigmentosus, and piebaldism. *J Invest Dermatol* 1975; 64: 50-62.
2. Wataya-Kaneda M, Tanaka M. Nakamura A, et al: A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTOR, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex. *Arch Dermatol*. vol

- 148(1):138-9 (2012)
3. Kotobuki Y, Tanemura A, You R, Wataya-Kaneda M, et al.:  
Dysregulation of Melanocyte Function by Th17-related Cytokines: Significance of Th17 Cell Infiltration in Autoimmune Vitiligo Vulgaris. *Pigment Cell & Melanoma Research*.vol 25(2):219-30 (2012)
- F. 研究発表 (平成 24 年度)
- 1.論文発表
    1. Hope Northrup MD, Darcy A Kruger MD PhD on behalf of the International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group Mari Wataya-Kaneda et al. Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference *Pediatric Neurology* 49, 243-254, 2013
    2. Darcy A. Krueger MD PhD, Hope Northrup MD, on behalf of the International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group Mari Wataya-Kaneda et al. Tuberous Sclerosis Complex Surveillance and Management:Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference *Pediatric Neurology* 49, 255-265, 2013,
    3. Mari Wataya-Kaneda,Mari Tanaka,Toshimitsu Hamasaki, Ichiro KatayamaTrends in the Prevalence of Tuberous Sclerosis Complex Manifestations: An Epidemiological Study of 166 Japanese Patients *PLOS ONE* Vol.8 issue5 e63910, 2013
    4. Naoki Oiso, Tamio Suzuki, Mari Wataya-Kaneda, Atsusi Tanemura, Miki Tanioa Ichiro Katayama Guidelines for the diagnosis and treatment of vitiligo in Japan *Journal of Dermatology*:40: 344-35 2013
    5. Tanaka M, Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I. First left-right comparative study of topical rapamycin versus vehicle for facial angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex. *Br J Dermatol* Aug 5. doi: 10.1111/bjd.12567, 2013
    6. Saori Itoi, M.D. Atsushi Tanemura,M.D.,Ph.D.,Yorihisa Kotobuki, M.D., Ph.D.,Mari W Kaneda, M.D. Ph.D., Daisuke Tsuruta, M.D.Ph.D., Masamitsu Ishii, M.D.Ph.D., Ichiro Katayama, M.D.Ph.D. Coexistence of Langerhans cells activation and immune cells infiltration in progressive nonsegmental vitiligo *Journal of Dermatological Science* 2013 Sep 13. doi:pii: S0923-1811(13)00311-3. 10.1016/j.jdermsci.2013.09.004
    7. N. ARASE, M. WATAYA-KANEDA. N. OI SO, H. ARAS E, I KATAYAM CD1a-positive familial cutaneous mastocytosis without germ-line or somatic mutations in c-kit *Br J Dermatol* 2013 Jul;169(1):201-4. doi:



- 10.1111/bjd.12265.
8. Okita M, Nakanishi G, Fujimoto N, Shiomi M, Yamada T, Wataya-Kaneda M, Takijiri C, Yokoyama Y, Sunohara A, Tanaka TNEMO gene rearrangement (exon 4-10 deletion) and genotype-phenotype relationship in Japanese patients with incontinentia pigmenti and review of published work in Japanese patients. *J Dermatol.* 2013 Apr;40(4):272-6
  9. Yukako MURAKAMI, Mari WATAYA-KANEDA, Mari TANAKA, Ichiro KATAYAMA A case of tuberous sclerosis complex complicated by segmental neurofibromatosis type 1 *Journal of Dermatology* 2013: 413-414
- 2.学会発表
1. Lingli Yang, Mari Wataya-Kaneda, Mari Tanaka, Fei Tang, Atsushi Tanemura, Chiharu Tateishi, Daisuke Tsuruta, Masamitsu Ishii, Ichiro Katayama Reduction of Autophagy: A potential Mechanism of Hypopigmented Macules in Tuberous Sclerosis Complex. 日本色素細胞学会学術大会 国際シンポジウム.大阪 2013/11.16-17
  2. M.Tanaka,, M.Wataya-Kaneda, A.Tanemura, Y Kotobuki, S Itoi, A.Nakamura, S.Matsumoto, and I.Katayama Topical rapamycin therapy is effective against hypomelanotic macules arising in tuberous sclerosis complex A prospective, self-controlled study. International Pigmented Cell Development Worksho Edinbergh 2013.5
  3. Toshirou Nishida, T Takahashi Mari Wataya-Kaneda et al. Gastrointestinal Stromal Tumor Associated with Neurofibromatosis Type I 2013 annual meeting of American Society of Clinical Oncology Chicago 2013.6
  4. Y Kotobuki, L Yang, M Wataya-Kaneda, D Turuta, Atanemur, M Tanaka, H Murota, M Ishii and I Katayamaa Hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex is linked to Th17 cell infiltration with possible impairment of cytoplasmic autophagy via mTOR pathway International Pigmented Cell Development Workshop Edinbergh 2013.5
  5. M.Tanaka,, M.Wataya-Kaneda, A.Tanemura, Y Kotobuki, S Itoi, A.Nakamura, S.Matsumoto, and I.Katayama Topical rapamycin therapy is effective against hypomelanotic macules arising in tuberous sclerosis complex A prospective, self-controlled study. 2013 International Investigative Dermatology Meeting Edinbergh 2013.5
  6. Y Kotobuki, L Yang, M Wataya-Kaneda, D Turuta, Atanemur, M Tanaka, H Murota, M Ishii and I Katayamaa Hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex is linked to Th17 cell infiltration with possible impairment of cytoplasmic autophagy via mTOR

pathway2013 International  
Investigative Dermatology Meeting  
Edinbergh 2013.5

7. Mari Wataya-Kaneda Dermatological  
manifestations of TSC Second annual  
TSC days 2013 Geneva 2013.3.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。) 出願中

1.特許出願中

2.実用新案登録

3.その他

表 1

TSC白斑と尋常性白斑の特徴の比較

	TSC 白斑	尋常性白斑	比較
メラノサイト	正常～(減少)	減少～無	different
メラノソーム数	正常～減少	減少	partially similar
メラノソームサイズ	正常～小さい	小さい	similar
メラニン顆粒の凝集	+	—	different
Fontana Masson	+	—	different
メランA染色	+	—	different
CD1a陽性細胞数	増加	増加	similar
Th17 細胞浸潤	+	+	similar
CD8陽性細胞浸潤	±	+	different
CD4陽性細胞浸潤	+	+	similar
FoXp3	—	—	similar
ケラチノサイト内のメラノソームの数	0～70	0	different

表 2 正常メラノサイトのサイトカイン刺激によるメラノソームの変化

サイトカインの種類	メラノソームの数の不均一	メラノソームの縮小	メラノソームの凝集	TSC白斑部のメラノサイトの所見との相違
IL-1 $\beta$	+	+	+	similar
IL-6	—	+	—	partially similar
IL-17A	++	+	++	similar
TNF- $\alpha$	+	+	+	similar
all	++	+	++	similar
No treatment	—	—	—	different
TSC白斑部のメラノサイト内のメラノソームの所見	+	+	+	