

## 進行性尋常性白斑に対するステロイドミニパルス療法の治療効果

研究分担者 種村 篤 大阪大学医学部皮膚科 助教

**研究要旨** 病変が拡大する進行性尋常性白斑症例に対して全身性のステロイド投与の有用性を検討した。

### A．研究目的

尋常性白斑は境界明瞭な脱色素斑を特徴とする後天性色素脱失症である。尋常性白斑診療ガイドラインで提示されている治療法は、外用療法・紫外線療法・皮膚移植術などに限られており、難治である。その中で、ステロイドの全身投与の有効性に関する報告が少なく、その位置付けが確立していないため、進行する症例に対する有効性を検討した。

### B．研究方法

治療抵抗性の進行性汎発型白斑の6症例に対し、ステロイドミニパルス療法を行い、その治療効果を白斑の縮小を観察および色彩計を用いた色調変化を定量した。なお、ミニパルス療法は、重篤な合併症を有しない成人症例を対象とし、1日メチルプレドニゾロン500mgを3日間点滴投与、1 - 1.5ヶ月の間隔で3クール施行するプロトコールとした。Lab値を色調変化のパラメータとし、極力季節による紫外線暴露の影響が少ない病変を選択し、研究期間中固定し治療前後で測定・比較した。

### C．研究結果

1) 平成24年度に計画していた、尋常性白斑皮膚に於けるランゲルハンス細胞の活性化及び免疫担当細胞の形態学的観察の研究成果として、今年度学術誌に発表し受理された。（E論文発表参照）

2) - 1: 6例全ての症例が治療を完遂した。6例中4例に病状の進行停止がみられた一方、2例では進行した。進行が停止した症例で病変の再発は出現していない。

- 2: 進行が停止した症例では、白斑の境界が不明瞭化し、スコア化していないものの治療に対して十分な満足が得られた。

- 3: 色素再生率を定量することは出来なかったが、紫外線療法後に得られる毛孔型より辺縁型色素再生が大部分であった。

- 4: 分光測色計でのデルタL値（L値は白さを意味し、デルタL値は“白斑部L値-健常部L値”を表す）が、進行停止例で縮小傾向がみられた。

## D . 考察

ステロイドの全身療法の投与方法として経静脈的と経口的に分かれるが、今回短期間の経静脈投与により重篤な有害事象は生じておらず、比較的安全に施行できる治療法と考える。分光測色計値はその測定部位により大きく変化するため、非露光部位での計測が重要である。

## E . 結論

今回の研究で、進行性の汎発型白斑に対し早期の全身ステロイドが進行停止に有効で安全に施行できることが示された。今後、尋常性白斑の治療アルゴリズムで早期の介入を裏付ける結果が得られた。

## D . 健康危険情報

特になし

## E . 研究発表

1. 論文発表
1. Hashimoto N, Tanemura A, Yamada M, Itoi S, Katayama I. Hepatitis C-related mix type vitiligo in a patient with Ivemark syndrome. J Dermatol 2014, Epub ahead of print (co-1<sup>st</sup> author).

2. Itoi S, Tanemura A, Kotobuki Y, W ataya-Kaneda M, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I. Coexistence of Langerhans cells activation and immune cells infiltration in progressive nonsegmental vitiligo. J Dermatol Sci, 73 (1):83-85, 2014. (co-1<sup>st</sup> author).
3. Oiso N, Tanemura A, 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, Epub ahead of print.

## 2 . 学会発表

1. 種村 篤、楊 伶俐、金田眞理、深井和吉、鶴田大輔、片山一朗 . ロドデノール含有化粧品使用後白斑における炎症性変化からの病態検討 . 第25回日本色素細胞学会学術大会 , 大阪 , 2013.11.16-17

## F . 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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

## 網状肢端色素沈着症の原因遺伝子同定と病態解析

研究分担者 河野通浩 名古屋大学大学院医学系研究科皮膚科学分野 講師

研究要旨 網状肢端色素沈着症（reticulate acropigmentation of Kitamura、RAK）は四肢末梢にわずかに陥凹した点状もしくは網目状の色素斑が出現する非常に特異な臨床像を示す常染色体優性遺伝性の遺伝性色素異常症である。これまで原因不明であったが、次世代シーケンスにより原因遺伝子を*ADAM10*と同定した。*ADAM10*は様々なタンパクの細胞外ドメインを切断する酵素で、それによって修飾を受けた基質タンパクは様々な働きをする。本疾患の病態に*ADAM10*がどのように関わっているかを検討する。

### A．研究目的

網状肢端色素沈着症（reticulate acropigmentation of Kitamura、RAK）は原因不明の遺伝性色素異常症の1つである。本疾患家系の患者および家族の協力を得て、次世代シーケンスにより原因遺伝子を*ADAM10*と同定した。そこで、*ADAM10*が本疾患の特徴的な皮疹の形成にどのように関わっているかを明らかにするため、培養細胞および遺伝子改変マウスを用いて、皮膚における*ADAM10*の働きを検討する。

### B．研究方法

*ADAM10*が皮膚を構成する細胞の色素細胞、角化細胞、線維芽細胞のそれぞれにどのように働いているかを検討する。ARK患者から明らかになった*ADAM10*遺伝子変異からは*ADAM10*の機能低下が発症に関与していると考えられるため、*ADAM10*のsiRNAを用いて細胞内の*ADAM10*の発現抑制を行い、細胞形態やそれぞれの細胞機能に関与する遺伝

子発現の変化を検討する。また、*ADAM10*ノックアウトマウスは胎生致死であることが報告されている。Cre-loxシステムを用いたコンディショナルノックアウトマウスを用いて、皮疹の出現が再現できるかどうか、また、マウス皮膚における*ADAM10*の働きを検討する。

### （倫理面への配慮）

ARK患者の遺伝子診断および遺伝子改変マウスを用いた研究については名古屋大学医学部よりそれぞれ承認を受けている。本研究を進めるうえでも、承認を受けた研究計画に沿って行っている。

### C．研究結果

ヒト角化細胞にsiRNAを導入して形態学的変化の検討を試みた。siRNAによる遺伝子抑制効果が乏しく、条件検討中である。また、マウスの実験は遺伝子改変マウスを入手し、交配の段階である。

## 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なった。

### 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 Ⅰ、Ⅱ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關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期メラノフェージに分布することから、第2期メラノフェージもしくは第2期メラノフェ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ェージであり、マクロフェ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。マクロフェ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 dyschromicum 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 acrosyngium 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 mutations in c-kit. *BrJ 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 hepatitis 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 I

- 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 , 片山一郎 , 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、ヒトメラノプラストは、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、メラノプラストは、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、メラノプラストでは、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。メラノプラストでは、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も必要である。

### 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、酵素補充、ケミカルシャペロン、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、酵素補充、ケミカルシャペロン、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

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、m

elan-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800 µg/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, Mitsuhashi 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 一郎 日本皮膚科学会雑誌 122(7) :1725-1740(2012.06)

8. 目で見る小児科 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月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の活性化が起こり、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の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Jimbrow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-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。

## **(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（未成年者など動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、初期のものであった。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)
  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:pui: 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: Manifestations: An Epidemiological Study of 166 Japanese Patients PLOS ONE Vol.8 issue5 e63910, 2013
- 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 Katayama Trends in the Prevalence of Tuberous Sclerosis Complex

- 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 pathway 2013 International  
Investigative Dermatology Meeting  
Edinburgh 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
メラニン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-1β	+	+	+	similar
IL-6	—	+	—	partially similar
IL-17A	++	+	++	similar
TNF-α	+	+	+	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	+	+	+	

## 白斑・白皮症患者における紫外線防御に関する研究

分担研究者 錦織千佳子 神戸大学大学院医学研究科皮膚科学 教授

研究要旨 白皮症患者への診療ガイドライン作成にあたり、エビデンスに基づいた生活指導指針を策定することをめざすための研究を行なった。具体的には、紫外線防御の必要性と適切な方法を検討するために、白皮症患者において遮光による血中のビタミンD<sub>3</sub>濃度等への影響を検証した。さらに適切な遮光がどの程度かを知る目的で白皮症患者における皮膚がん発症の文献検索を行ない、診療ガイドラインの策定に資することとする。

### A. 研究目的

(1) ビタミンD<sub>3</sub>の欠乏が骨・筋疾患の発症のみでなく、自己免疫疾患やある種の癌の発症のリスクファクターとなるという報告があることから、小児期の白皮症患者の骨代謝への影響、また、長期的にはその他の疾病との関連性を知る目的で、まず、基礎データとして遮光による血中のビタミンD<sub>3</sub>等への影響を検証し、エビデンスに基づいた生活指導指針を策定することをめざす。

(2) 白皮症患者への診療ガイドライン作成にあたり、適切な紫外線防御のレベルを知る目的で、日本人の白皮症患者における皮膚がん発症のデータをサーベイする。

### B. 研究方法

材料：白皮膚症患者4名（小児男児3名、成人女性1名）ならびにその親に対して研究についての概要を説明し、患者あるいはその代諾者より文書による同意を取得した。

方法：白皮症患者血清を用いて25OHビタミンD<sub>3</sub>と血中のintact PTHの濃度を測定した。

測定方法はDiaSorin社製全自動化学発光免疫測定装置LIAISON®を用いた25OH Vitamin D TOTAL assay および LIAISON® N-TACT® PTH a

ssayにより測定した。採血時に通常の生化学検査としてCaとPも測定した。

ビタミンD<sub>3</sub>量は食餌の影響も受けるので、患者の食事内容を記録し、栄養士によって食餌中のビタミンD<sub>3</sub>量を推定し、紫外線によって皮膚において合成されるビタミンD<sub>3</sub>量を推測した。一方、遮光の程度について病歴聴取を行ない、血清中のビタミンD<sub>3</sub>値との整合性も検討した。

（倫理面への配慮）

遮光が必要とされる皮膚疾患患者におけるビタミンD<sub>3</sub>レベルを測定する事を目的として「色素性乾皮症患者ならびに白皮症患者におけるビタミンD栄養状態に関する研究」を倫理委員会に申請し、承認された。小児の患者には小児用の説明文書で説明を行なった。

### C. 研究結果

(1) 白皮症患者4名から検体を採取した。現時点で測定が終了しているのは1名（白皮症の遺伝子診断は未実施のnon-syndromic 眼皮膚白皮症の小児例）である。

検査結果：25Vit D<sub>3</sub> 16.4 ng/ml, intact PTH57pg/ml, 血清のCa、PIは正常範囲内。

ただし、食餌中のビタミンD<sub>3</sub>量も1日量が

2マイクログラムとかなり低値であった。

#### D. 考察

25OHD<sub>3</sub>が20 ng/ml以下であるとビタミンD<sub>3</sub>不足、10ng/ml以下は欠損とされているので、今回測定した白皮症患者では血中のビタミンD<sub>3</sub>レベルは推奨値より低い事が明らかとなった。今後、残りの3名については近日中に測定結果が出るので、これが一般的な傾向としていえるかどうかを検討し、さらに今後症例を増やして疾患内でのばらつき、食餌の影響等も解析する。ビタミンD<sub>3</sub>の解析などを実施して行く予定である。今後は、毛髪メラニン量の測定により皮膚色を数値化し、皮膚の紫外線防御能を推測する。それとビタミンD<sub>3</sub>値との関連性をみていく。

一方、文献考察に眼皮膚白皮症において皮膚がん発生率が統計学的に有意に高い事が示されたので、紫外線曝露の影響を減らす事が重要である。

#### E. 結論

短期的には、白皮症患者でビタミンD<sub>3</sub>が不足している傾向があれば、サプリメント等で補充する事も検討課題と思われる。

一方で、メラノーマ発生とビタミンD<sub>3</sub>の不足との正の相関を示すデータもある事から、VDRのSNP等の個人差等の関与も考えられ、今後症例数を増やして、紫外線曝露、皮膚がん発症、ビタミンD<sub>3</sub>量、との関連性を長期にわたり解析する必要がある。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takeuchi S, Abe Y, Yamada T, Kawano S, Hozumi Y, Ito S, Suzuki T, Nishigori C : Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1

patient with milder symptoms in Japanese. J Dermatol. in press

2. Fujiwara S, Nagai H, Shimoura N, Oniki S, Yoshimoto T, Nishigori C : Intratumoral CD4<sup>+</sup> T lymphodepletion sensitizes poorly immunogenic melanomas to immunotherapy with an OX40 agonist. J Invest Dermatol. in press
3. 錦織千佳子 : 遺伝子修復機構とその異常. 図説分子病態学改訂5版. 一瀬白帝、鈴木宏治編. 中外医学社. 東京. 印刷中
4. 中野英司、錦織千佳子 : 光老化のモデルとしての色素性乾皮症. 医学のあゆみ. 印刷中
5. 竹内聖二、中野英司、山下大介、井川健、森田明理、苅田典生、錦織千佳子 : 軽症型A群色素性乾皮症の1例. 小児皮膚科. 印刷中
6. Chiba Y, Mizoguchi I, Mitobe K, Higuchi K, Nagai H, Nishigori C, Mizoguchi J, Yoshimoto T : IL-27 enhances the expression of TRAIL and TLR3 in human melanomas and inhibits their tumor growth in cooperation with a TLR3 agonist poly(I:C) partly in a TRAIL-dependent manner. PLoS One : 8(10) : e76159, 2013.
7. Tian H, Matsuo Y, Fukunaga A, Ono R, Nishigori C, Yodoi J : Thioredoxin ameliorates cutaneous inflammation by regulating the epithelial production and release of pro-inflammatory cytokines. Front Immunol : 4 : Article269, 2013.
8. Ono R, Fukunaga A, Masaki T, Yu X, Yodoi J, Nishigori C : Suppressive effect of administration of recombinant human thioredoxin on cutaneous inflammation caused by UV. Bioengineered : 4(4) : 254-257

- (Addenda), 2013.
9. Ono R, Masaki T, Takeuchi S, Shimizu A, Tanioka M, Kambe N, Matsue H, Kamide R, Nishigori C : Three school-age cases of xeroderma pigmentosum variant type. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* : 29(3) : 132-139, 2013.
  10. 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* : 40(5) : 344-354, 2013.
  11. Kunisada M, Masaki T, Ono R, Morinaga H, Nakano E, Yogianti F, Okunishi K, Sugiyama H, Nishigori C : Hydrochlorothiazide enhances UVA-induced DNA damage. *Photochem Photobiol* : 89(3) : 649-654, 2013.
  12. Taguchi K, Fukunaga A, Ogura K, Nishigori C : The Role of Epidermal Langerhans Cells in NB-UVB-Induced Immunosuppression. *Kobe J Med Sci* : 59(1) : E1-9, 2013.
  13. Imoto K, Nadem C, Moriwaki S, Nishigori C, Oh KS, Khan SG, Goldstein AM, Kraemer KH : Ancient origin of a Japanese xeroderma pigmentosum founder mutation. *J Dermatol Sci* : 69(2) : 175-176, 2013.
  14. 錦織千佳子 : 物理・化学的皮膚障害. 標準皮膚科学第10版. 富田靖監修、橋本隆、岩月啓氏、照井正編集. 医学書院. 東京. 124-146, 2013.
  15. 錦織千佳子 : .有棘細胞癌(日光角化症・Bowen病)有棘細胞癌の危険因子 生活習慣と環境因子. 日本臨牀 皮膚悪性腫瘍 基礎と臨床の最新研究動向. 71増刊号4 : 436-440, 2013.
  16. 錦織千佳子 : V.基底細胞癌 危険因子 : 生活習慣と環境因子・宿主因子. 日本臨牀 皮膚悪性腫瘍 基礎と臨床の最新研究動向. 71増刊号4 : 582-586, 2013.
  17. 錦織千佳子 : 紫外線と美容・老化. *Visual Dermatology* : 12(6) : 623-627, 2013.
2. 学会発表
    1. 竹内聖二、小野竜輔、正木太朗、錦織千佳子、清水彩子、神戸直智、松江弘之、上出良一 : 小児の色素性乾皮症バリアント型の3例 診断後3年から9年の経過観察. 第436回日本皮膚科学会大阪地方会. 2013. 3.23
    2. Takeuchi S, Nishigori C, Declercq L, Yarosh DB, Saito N : Live imaging analysis of melanosome transfer using lipophilic tracer. *International Investigative Dermatology*. 2013. 5.8-11
    3. Yogianti F, Kunisada M, Ono R, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C : The inhibitory effect of *Spirulina platensis* on UVB-induced skin carcinogenesis: anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *International Investigative Dermatology*. 2013. 5.8-11
    4. Makino-Okamura C, Niki Y, Takeuchi S, Declercq L, Yarosh DB, Nishigori C, Saito N : Serine protease inhibitor attenuates PAR-2 triggered inflammatory response and keratin 1 expression in human primary keratinocytes. *International Investigative Dermatology*. 2013. 5.8-11
    5. Niki Y, Fukata M, Fukata Y, Okamura C, Takeuchi S, Wakamatsu K, Ito S,

- Nishigori C, Declercq L, Yarosh DB, Saito N : Regulation of tyrosinase degradation by S-palmitoylation. International Investigative Dermatology. 2013. 5.8-11
6. Nishigori C : Ultraviolet light and oxidative stress response. 3rd annual meeting of Korean Society of Pigment Cell Research. 2013.6.9
7. 藤原進、黄欣鋒、永井宏、西川伸一、錦織千佳子 : Genome-wide analysis for methylation status and gene expression of melanomas and melanocytes from the same individual. 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2013. 8.29-31
8. 錦織千佳子 : The role of ultraviolet light on the development of Melanoma. 第 25 回日本色素細胞学会年次学術大会. 2013. 11.16-17
9. 永井宏、藤原進、下浦典子、善本隆之\*、錦織千佳子 : メラノーマ組織内 CD4+T 細胞除去による抗腫瘍免疫反応機序の解析. 第 25 回日本色素細胞学会年次学術大会. 2013. 11.16-17
10. 仁木洋子、深田正紀、深田優子、奥慎一郎、岡村千絵子、竹内聖二、若松一雅、伊藤祥輔、錦織千佳子、Declercq L、Yaroshi DB、齋藤尚亮 : チロシナーゼの『S』-パルミトイル化はその分解を制御しメラニン生成を調整する. 第 25 回日本色素細胞学会年次学術大会. 2013. 11.16-17
- H .知的財産権の出願・登録状況( 予定を含む )**
- 1 . 特許取得  
該当なし
- 2 . 実用新案登録  
該当なし
- 3 . その他  
該当なし

## 白斑を呈する先天性色素異常症の遺伝子診断と病態解明の研究

研究分担者 鈴木民夫 山形大学医学部皮膚科 教授  
山下英俊 山形大学医学部眼科 教授

**研究要旨** 以下4つのプロジェクトを実施した。

**1. 遺伝性対側性色素異常症 (DSH) の病態解析:** DSHの発症病態にウイルスが関与しているのではないかとの仮説に基づき、*ADAR1* stable knockdown ヒトメラノーマ細胞 (MNT-1) の各種ウイルス (17種類) に対する感受性の変化を調べた。その結果、*ADAR1*発現抑制率に一致してパラインフルエンザ・ウイルスに対して感受性が亢進することが明らかとなった。

**2. 日本人の皮膚色に近く日焼けするヘアレスマウスの開発:** *hk14-SCF*を遺伝子導入したマウスを作成後にヘアレスマウスと掛け合わせて、*hk14-SCF*ヘアレスマウスを作成し、表皮に色素細胞を確認した。

**3. 蒙古斑関連遺伝子の同定と機能解析:** モンゴル人の蒙古斑有無に関する分離家系は3家系、25人のサンプリングに成功した。

**4. 健常日本人の皮膚色決定遺伝子の検索:** 1,000人以上の皮膚色を測定した。現在、genome-wide association study (GWAS)で得られた遺伝子型との関連性を解析中である。

### A. 研究目的

#### 1. 遺伝性対側性色素異常症 (DSH) の病態解析

DSHは手背・足背に脱色素斑と色素斑が混在する常染色体優性遺伝性疾患であり、原因遺伝子は*ADAR1*であることが2003年に明らかにされたが、その病態についてはいまだ不明である。そこで、DSHの発症病態にウイルスが関与しているのではないかとの仮説に基づき、その関与について解析を行う。

#### 2. 日本人の皮膚色に近く日焼けするヘアレスマウスの開発

マウスの皮膚には、毛根には色素細胞が存在するが、表皮には色素細胞が存在しない。そのため多くの色素異常症でマウスは適切なモデルになりえず、研究を推進する上で大きな障害となっている。そこで、色素異常症の研究に使用可能なマウス、つまり、表皮に色素細胞が存在し、日本人と同程度のメラニン沈着が認められる体毛のないヘアレスマウスを開発する。

#### 3. 蒙古斑関連遺伝子の同定と機能解析

蒙古斑の有無は人種によってその頻度が大きく異なり、遺伝子によって決定されている。そこで、蒙古斑形成・維持に関連する遺伝子を明らかにする。

#### 4. 健常日本人の皮膚色決定遺伝子の検索

これまで一部明らかにしてきた日本人皮膚色決定に関わる遺伝子をgenome-wide association study (GWAS)にてさらに明らかにする。

### B. 方法

**1. DSH: *ADAR1* stable knockdown** ヒトメラノーマ細胞を作成し、knockdown率が異なる株を4種類樹立した。これらの樹立株のウイルス感受性を調べた。

**2. 日本人モデルマウス開発:** *hk14-SCF*を遺伝子導入したマウスを作成し、表皮内に色素細胞が存在することを確かめた後、ヘアレスマウスと掛け合わせて、*hk14-SCF*ヘアレスマウスを作成した。

**3. 蒙古斑関連遺伝子：**同一家族内で蒙古斑の有無が分かれる分離家系を見つけ、サンプリングするためにモンゴルのタリアラン村に行って、サンプリングした。

**4. 皮膚色決定遺伝子検索：**山形大学グローバルCOEの一環で既に血液をサンプリングして遺伝型を決めている住民のうち、1000人以上の皮膚色を測定し、遺伝子型との相関関係を解析する。

(倫理面への配慮)

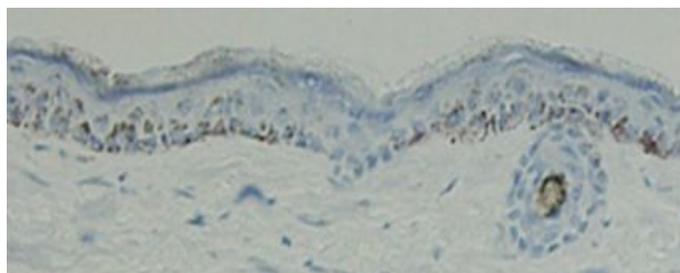
本研究におけるヒト由来血液、あるいは唾液の提供者の人権及び利益の保護の取扱いについて十分配慮した。本研究は、山形大学医学部倫理委員会に既に承認されている。

### C. 結果・考察

**1. DSH：**昨年、*ADAR1* stable knock down ヒトメラノーマ細胞 (MNT-1) の各種ウイルス (17種類) に対する感受性の変化を調べた。その結果、パラインフルエンザ・ウイルスに対してノックダウン細胞では感受性が亢進することも認められた。そこで、細胞に感染させるウイルスの量を変化させてさらに詳細に定量実験を行った。その結果、パラインフルエンザ・ウイルスにのみ感受性の亢進を認め、エンテロウイルス等には感受性に変化を認めなかった。そこで、次にknockdown率と感受性の関係を調べたところ、*ADAR1* knockdown率の高い細胞ほど、パラインフルエンザ・ウイルスに対して高い感受性を示した。以上のことより、DSHモデル細胞と言える我々が樹立した*ADAR1* stable knockdown ヒトメラノーマ細胞においては、*ADAR1* の発現が低下するとパラインフルエンザ・ウイルスに対して感受性が亢進する事が明らかとなり、DSH発症にパラインフルエン

ザ・ウイルス感染が関与している可能性が示唆された。今後は、その感受性亢進の作用機序、およびパラインフルエンザ・ウイルスの疫学を明らかにする必要がある。

**2. 日本人モデルマウス開発：**少なくとも4系統の表皮色素細胞局在ヘアレスマウスを作成できた。下記にそのうちの1系統の写真と背中よりの皮膚生検像 (抗melan-a抗体染色) を示す。日本人よりもやや濃い体色を呈し、皮膚生検の結果、表皮基底層にケラチノサイト5~10個に1個程度の色素細胞が確認できた。



今後、このマウスを使用して、種々の後天性色素異常症モデルマウスを作成し、その病態について解析すると共に新規治療法の開発予定である。

**3. 蒙古斑関連遺伝子：**モンゴル北東部のウブス県タリアラン村のPhotonと呼ばれる少数民族を対象にした現地調査を行い、モンゴル人の蒙古斑有無に関する分離家系は3家系、25人のサンプリングに成功した。また、既に日本人1家系16人分のサンプルも採取しており、これらのサンプルを使用して今後、解析を進める。

**4. 皮膚色決定遺伝子検索：**山形大学グローバルCOEの一環で既にGWASのデータのある健康住民を対象に1000人以上の皮膚色を測定した。そのデータを使用して現在、遺伝子型との相関関係を解析中であ

る。

#### D . 健康危険情報

該当なし

#### E . 研究発表 (平成25年度)

##### 1. 論文発表

1. Abe Y, Suzuki T ( 5 人中 5 番目 ) : Association of melanogenesis genes with skin color variation among Japanese females. J Dermatol Sci 69:167-172 (2013)
2. Saito A, Suzuki T ( 13 人中 5 番目 ) : An association study of the Hermansky-Pudlak syndrome type 4 gene in schizophrenia patients. Psychiatric Genetics 234: 163-173 (2013)
3. Kono M, Suzuki T ( 9 人中 6 番目 ) : 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)
4. Nikaido M, Suzuki T ( 6 人中 6 番目 ) : Agminated pigmented matricoma: a case of a unique tumor with a multifocal appearance composed of neoplastic matrical cells with a significant component of melanocyte. J Cutan Pathol 40:823-828 (2013)
5. Kawakami T, Suzuki T ( 5 人中 5 番目 ) : Patient with dyschromatosis symmetrica hereditaria treated with miniature punch grafting, followed by excimer light therapy. J Dermatol 40: 771-772 (2013)
6. Hayashi M, Suzuki T ( 2 人中 2 番目 ) : Dyschromatosis symmetrica hereditaria. (review article) J Dermatol 40:336-343 (2013)
7. Oiso N, Suzuki T ( 4 人中 4 番目 ) : Piebaldism. (review article) J Dermatol 40:330-335 (2013)
8. Oiso N, Suzuki T ( 17 人中 2 番目 ) : Guidelines for the diagnosis and treatment of vitiligo in Japan. J Dermatol 40:344-354 (2013)
9. Montoliu L, Suzuki T ( 12 人中 9 番目 ) : Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. Pigment Cell Melanoma Res (in press)
10. Kawaguchi M, Suzuki T ( 2 人中 2 番目 ) : Gene expression and in situ localization of ADAM17 during skin wound healing. Int J Dermatol (in press)
11. Kawaguchi M, Suzuki T ( 2 人中 2 番目 ) : ADAM17 is involved in the regulation of chemokine expression in keratinocytes. Int J Dermatol (in press)
12. Araki Y, Suzuki T ( 7 人中 7 番目 ) : Hermansky-Pudlak Syndrome Type 4 with a novel mutation. J Dermatol (in press)
13. Takeuchi S, Suzuki T ( 8 人中 7 番目 ) : A case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 (HPS1) patient with milder symptoms in Japanese. J Dermatol (in press)

##### 2. 学会発表

1. Genetic studies in Japanese patients with oculocutaneous albinism (OCA): T. Suzuki, J. Yoshizawa, Y. Abe, Y. Hozumi, M. Hayashi, International Investigative Dermatology 2013 (Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, UK) 2013, 5,8-11

2. ADAM protease inhibitor regulates chemokine expression in human keratinocytes, and modulates melanogenesis in human melanocytes: M. Kawaguchi, Y. Hozumi, T. Suzuki, International Investigative Dermatology 2013 (Edinburgh International Conference Center, Edinburgh, UK) 2013, 5,8-11
  3. Association of melanogenesis genes with skin color variation and risk factor for skin cancers among Japanese population: T. Suzuki, Y. Abe, J. Yoshizawa, M. Shimanuki, Y. Hozumi, G. Tamiya, 第 25 回日本色素細胞学会、大阪市、2013 年 11 月 16 日
  4. OCA2 polymorphisms are associated with skin color and risk of skin cancer in Japanese population: Yoshizawa J, Abe Y, Hozumi Y, Oiso N, Narita T, Kawada A, Fukai K, Motokawa T, Nakamura T, Tamiya G, Suzuki T, 第 37 回日本研究皮膚科学会学術大会, 那覇; 2012 年 12 月
  5. Diacylglycerol kinase regulates tyrosinase expression and function in human melanocytes. Kawaguchi M, Valencia JC, Namiki T, Suzuki T, Hearing VJ, 第 37 回日本研究皮膚科学会学術大会, 那覇; 2012 年 12 月
  6. Hermansky-Pudlak 症候群 4 型 (HPS4) の 1 例: 鈴木民夫、穂積豊、阿部優子、吉澤順子、石井良征、岡本史樹、第 81 回日本皮膚科学会茨木地方会 大塚藤男教授退任記念、つくば市、2013 年 3 月 9・10 日
  7. 正常日本人の皮膚色決定因子: 鈴木民夫、阿部優子、穂積豊、第 112 回日本皮膚科学会総会 教育講演: わかりやすい色素異常症、パシフィコ横浜、横浜市、2013 年 6 月 14 日
- 3. 著書・その他**
1. 山口 徹ら編、今日の治療指針 2013 私はこう治療している、P1067、尋常性白斑: 鈴木民夫、医学書院、2013
  2. 滝川雅浩ら編、皮膚疾患最新の治療 2013 2014、P234 - 235、尋常性白斑: 鈴木民夫、南江堂、2013
  3. 専門編集土田哲也, 総編集古江増隆、皮膚科臨床アセット 20 忘れてはならない皮膚科症候群, 第 20 巻, P169-173、Hermansky-Pudlak 症候群、大磯直毅、鈴木民夫、中山書店, 2013
- 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

## フラクショナルレーザー照射を併用した光線治療の有効性の検討

研究分担者 佐野栄紀 高知大学医学部皮膚科 教授

研究要旨 フラクショナルレーザーの事前照射は紫外線治療における色素再生効果を増強させる可能性があるが、メラノサイトの生存や機能保持に関わる因子(melanogenic mediators)への影響は明らかではない。我々は2つの波長での照射が可能なフラクショナルレーザーを用い、レーザー事前照射の有効性について検討を行った。現在までの検討では、真皮乳頭層までを照射深達度とする1927nmでの照射はレーザー単独およびNB-UVB併用ともに色素再生は誘導できず、RT-PCRを用いたmelanogenic mediatorsの解析でも有意な変化は認めなかった。1550nmでの照射について今後も検討を継続する。

### A. 研究目的

#### 難治性尋常性白斑に対する紫外線療法におけるフラクショナルレーザー（FL）照射併用の有用性の検討および機序解析。

2012年ShinらはNB-UVB照射中の白斑患者にFractional-CO<sub>2</sub> laser照射を併用し、より効率的な色素再生を誘導しえた事を報告した (British J Dermatol 166; 2012:658-661)。レーザー照射併用の利点は明らかではないが、wound healingに関わる線維芽細胞や血管内皮細胞からのシグナルが色素細胞の遊走・増殖・活性化に寄与すると推測されている。同様に、以前よりYAG laserや5-fluorouracilを用いたdermabrasionが白斑の色素再生に有効と報告されているが、これらの治療の問題点として癬痕形成やケプネル現象の誘導があり、真皮へのdamageは必要最小限にとどめることが望ましい。

我々はYAGやFractional-CO<sub>2</sub> laser と比べ、真皮へのdamageがより少ないFractional laser

(FL)を用いて、紫外線治療で改善がみられない白斑患者に照射を行い、紫外線治療単独 FL単独 両者併用の3群で色素再生の違いにつき検討を行った。またFL照射後の表皮-真皮におけるmelanogenic mediatorsの発現につき経時的に検討を行った。

### B. 研究方法

1) 紫外線治療 (NB-UVBおよびエキシマランプ)で改善がみられない白斑患者の病変の一部にFL照射 (フラクセル3:1927 nmおよび1550nm) を行い、紫外線治療単独 FL単独 両者併用 (FL照射後に紫外線照射) の3群間で色素再生の違いを検討した。

2) 健常人皮膚にFLを種々の条件で照射。24時間後、48時間後および1週間後にmelanogenic mediatorsの発現をRT-PCRで検討した。

### C. 研究結果

1927nmのFL照射では4週間の観察期間の間

に、明らかな色素再生はみられなかった。また RT-PCRを用いたmelanogenic mediatorsの解析においても、1927nmの照射ではstem cell factor, Prostaglandin E2,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormoneなどの発現はコントロールとの違いは見られなかった。1550nmでのFL照射については現在効果判定中である。

#### **D. 考察**

FLの事前照射は紫外線療法における色素再生効果を増強させる可能性があるが、必要照射量などの条件については未だ不明であり今後の検討課題である。またFL照射後のmelanogenic mediatorsの変動についても種々の条件下での検討を引き続き行っていく。

#### **E. 結論**

難治性尋常性白斑に対する紫外線療法にフラクショナルレーザーを併用したが、治療効果の増強は認められなかった。また、健常人皮膚におけるmelanogenic mediator遺伝子発現の増強もなかった。

#### **F. 健康危険情報**

なし。

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

1. Takata T, Tarutani M, Sano S. A failure in endothelin-1 production from vitiligo keratinocytes in response to ultraviolet B irradiation. J Dermatol Sci, 71: 210-212, 2013.
2. 高田智也、佐野栄紀. 白斑に対する1mm ミニグラウト：採皮部への術前紫外線照射の有効性について. MB Derma, 203:

85-88, 2013

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし。

## 掌蹠の汗腺における色素芽細胞の同定

研究分担者 西村栄美 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨 悪性黒色腫（メラノーマ）は、本邦も含め全世界的に増加傾向にあり、化学療法や放射線療法に抵抗性で治療に苦渋する癌の代表である。メラノーマのオリジンとなる細胞集団やメラノーマ起始細胞を同定できれば、メラノーマの診断や治療法の開発へと繋がることが期待できる。われわれは、マウス掌蹠皮膚にヒトの汗腺に類似する汗腺を認め、免疫組織染色にて色素細胞系譜のマーカーの発現は確認できないものの、Dct-H2B・GFPマウスを使用することにより未知の細胞集団が存在する可能性を示唆できた。今後、色素幹細胞として機能しているのかどうか、メラノーマのオリジンとなりうるのかどうかの検討が必要である。

### A．研究目的

ヒト掌蹠に色素幹細胞が存在するのかどうか、メラノーマのもとになりうるのかどうかについてはこれまで検討されていない。われわれは、2002年にマウスの毛包内に黒髪のもととなる色素幹細胞を世界に先駆けて発見し（Nishimura EK et al. Nature 2002）、この細胞が枯渇すると白髪を発症することを明らかにしてきた。毛包の存在しない掌蹠は、メラノーマの好発部位であり、掌蹠以外の皮膚の16倍の高頻度でメラノーマを発生する。また、近年のダーモスコピーと呼ばれる拡大鏡による診断技術の発展により、汗腺が分布する皮丘に沿った異常色素沈着に特徴づけられる皮丘平行パターンをとる場合には、99%の特異性でメラノーマと診断されることが斎田らによって明らかにされている。このようなメラノーマ細胞が示す特異的な皮丘親和性は、その発生オリジンと関連する可能性を考え、皮丘に並ぶ汗腺

内に色素幹細胞または前駆細胞に相当する細胞が存在する可能性についてマウスのfootpadの汗腺を用いて検証する。

### B．研究方法

様々な週齢のC57BL/6Jマウスのfootpadにおいて色素細胞系譜の未分化細胞の検出を試みるため、色素細胞系譜マーカーを用いた免疫染色・蛍光染色、さらにフォンタナマッソン染色を行った。さらに、これらのマーカーの発現を失った色素芽細胞をも検出するため、Dct-H2B・GFPトランスジェニックマウスを作成し、解析した。

### C．研究結果

様々な週齢のマウスfootpadをフォンタナマッソン染色にて解析したところ、若齢マウス（7週齢）皮膚においては陽性細胞を認めず、老齢マウス（2年など）皮膚において陽性細胞を汗

腺内に認められた。次に皮膚色素細胞系譜マーカーの発現について免疫染色・蛍光染色を行った。毛母の色素細胞を陽性コントロールとし、若齢マウスのfootpad皮膚をMITF, MART1, KIT, DCT, PMEL17, TYR, TYRP1などの色素細胞系譜マーカーを用いて解析したが、footpadの汗腺内に陽性細胞を認めなかった。老齢マウス汗腺内に色素細胞が存在することから、若齢マウスの汗腺内に未分化な色素芽細胞が存在することを想定し、Dct-H2B・GFPトランスジェニックマウスを作成し、解析した。汗腺分泌部にDct-H2B・GFP陽性でメラニン色素を持たない色素芽細胞を検出することに成功した。色素幹細胞に相当するのかどうか検討が必要である。

#### D．健康危険情報

特記事項なし

#### E．研究発表 (平成25年度)

1. 論文発表
1. 西村栄美 がんの不均一性とメラノーマ幹細胞：皮膚悪性腫瘍 日本臨床 2013;116-121(増)
2. 西村栄美 毛包幹細胞による色素幹細胞の維持制御 加齢皮膚医学セミナー 2013;第8巻: 7-10
3. 西村栄美 色素幹細胞とそのニッチ：毛包幹細胞の新しい役割: 細胞工学 2013; 32(10): 1038-1041
2. 学会発表
1. 西村栄美 毛包の老化と幹細胞制御 第18回日本臨床毛髪学会 平成25年11月23日東京
2. Emi K.Nishimura Hair Follicle aging and stem cell regulation. The 23<sup>rd</sup> Hot Spring Harbor International Symposium jointly with The 3<sup>rd</sup>“Grants for Excellent Graduate Schools”International Symposium 平成25年11月5日福岡市
3. 西村栄美 組織の老化と幹細胞制御：黒髪が生える仕組みとその破綻について第22回東京臨床血液研究会 平成25年10月31日 東京
4. 西村栄美 組織の老化と幹細胞制御 第86回日本生化学会大会 平成25年9月13日 横浜市
5. 西村栄美 色素幹細胞の制御とメラノーマの発生 第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 平成25年8月8日甲府市
6. 西村栄美 上皮の老化と幹細胞制御 第13回抗加齢医学会総会 平成25年6月28日 横浜市
7. 西村栄美、松村寛行 The mechanisms of hair follicle aging and stem cell regulation 第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム 平成25年6月27-28日 京都市
8. 西村栄美 毛包における幹細胞の再生と老化 第112回日本皮膚科学会総会 平成25年6月14日 横浜市
9. 西村栄美 なぜ老いるのか？：白髪と脱毛のメカニズム 第13回学習院大学生命科学シンポジウム 平成25年5月25日 東京
10. Yasuaki Mohri, Nguyen Thanh Binh, Hiroyuki Matsumura, Yuko Tadokoro, Mayumi Ito, Jan Hoeijmakers and Emi K. Nishimura: The fate switch of hair follicle stem cells to the epidermis underlies baldness due to hair follicle

aging The 11<sup>th</sup> Stem Cell Research  
Symposium 平成 25 年 5 月 17 日 東京

11. Emi K. Nishimura: Melanocyte Stem  
Cells Maintenance, Survival and  
Differentiation Interntional Pigment  
Cell Development Workshop May 7<sup>th</sup>,  
2013, Edinburgh, UK

12. Emi K. Nishimura: Mechanisms of Hair  
Follicle Aging and Stem Cell Regulation  
7<sup>th</sup> world Congress for Hair Research  
May 5<sup>th</sup>, 2013, Edinburgh, UK

### 3 . 著書

1. 西村栄美 細胞工学 毛髪 of メディカル  
サイエンス 秀潤社 東京 2013  
Vol.32 No.10

## 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

## 白皮症における眼科的評価

研究分担者 佐藤美保 浜松医科大学眼科 准教授

研究要旨 白皮症に関するガイドライン作成にあたり、眼科的評価を行った。特徴的な眼所見ならびに低視力者への生活指導を調査した。

### A．研究目的

白皮症にみられる眼科的所見に関する文献検索ならびに低視力児に対するケア方法の検討を行った。

### B．研究方法

Pub Med, 医学中央雑誌を利用した文献検索を行う。講演ならびに出版物から視覚障害児へのケアの調査をおこなった。

（倫理面への配慮）

視覚支援校への取材に関して、個人情報流出がおこらないよう配慮した。

### C．研究結果

眼・皮膚白皮症に関する文献検索を行い、ガイドラインを作成した（別に報告）  
視覚支援に関しては早期から眼科医が関与し、医学的のみならず、適切な学習支援、生活支援への橋渡しが必要であることがあきらかとなった。

### D．考察

眼科と皮膚科が共同してガイドラインを作成したことにより、総合的な患者ケアにつながる事が期待できる。

### E．研究発表

論文発表

1. 佐藤美保 斜視と弱視 [木下茂、中澤満、天野史郎 編 標準眼科学 309-322], 医学書院、東京(2013)
2. 佐藤美保 (2012) 眼球運動、斜視、弱視 [坪田一男、大鹿哲郎編 TEXT 眼科学 115-126], 南山堂、東京.
3. 佐藤美保 (2012) 弱視治療に関する多施設研究 [仁科幸子編 専門医のための眼科診療クオリファイ 9 62-66], 中山書店、東京
4. 佐藤美保 (2012) 小児眼科検査法 [遠藤文夫編 小児科診断・治療指針 972-974], 中山書店、東京
5. 野村隆仁、佐藤美保、細野克博、彦谷明子、根岸貴志、澤田麻友、堀田喜裕 眼白子症が疑われた姉妹例.眼臨紀 5(4) 367-372. (2012)