

しない徴候（臨床検査値の異常変動も含む）、症状、または病気のことであり、必ずしも当該試験との因果関係の有無は問わない。自主臨床試験実施中に既存の疾患、症状、徴候（併存症などを指し、原病は含まない）が増悪した場合も含む。

有害事象を認めるときは、直ちに適切な処置、治療を行うとともに、カルテに記録し、症例報告書により報告を行う。

重篤な有害事象の定義

重篤な有害事象とは、有害事象のうち、死亡に至るもの、生命を脅かすもの、治療のため入院若しくは入院・加療期間の延長が必要なもの、永続的若しくは重大な障害・機能不全に陥るもの、先天異常を来すものを言う。ただし、病勢の進行または新病変の出現による場合は重篤な有害事象として取り扱わない。明確に判断出来ない場合はこの限りではない。

以下のいずれかの要件を満たす入院、又は入院期間の延長は重篤な有害事象とはみなさない。

1 2時間未満の病院滞在（入院とはみなさない）

- ・ 事前に予定されていた入院（試験開始前に予定されていた手術によるものなど）
有害事象とは関連のない入院（例：一時療養目的入院 など） 等

ただし、入院中に行われる侵襲的治療は、医学的に重大とみなされることがあり重篤な有害事象として報告すべきかを臨床的根拠に基づいて判断する。

【重症度の判定】

個々の有害事象について、次の基準により重症度を判定する。ただし、当該事象の臨床的な重要性を考慮する。

- ・軽度 : 日常活動に支障を生じない
- ・中等度 : 日常活動に支障はあるが可能
- ・高度 : 日常活動が困難である

【重篤度判定】

個々の有害事象について「重篤な有害事象の定義」に従い、重篤度を判定する。

- ・重篤
- ・非重篤

有害事象に関するその他調査事項

- ・発生日または発生を認めた日
- ・消失日または消失を認めた日
- ・転帰（消失、残存）
- ・因果関係（関係あり、なし）

5.2 有害事象の報告

- ・有害事象を認めたときは、直ちに適切な処置、治療を行うとともに、カルテに記録し、症例報告書により報告を行う。
- ・重篤な有害事象を認めたときは、適切な処置、治療を行うとともに、直ちに「重篤な有害事象に関する報告書」に所定事項を記入し、病院長に報告する。

5.2.1 重篤な有害事象の報告手順

試験責任者は、重篤な有害事象の発生を知った場合は速やかに、病院長および関連部門に口頭または電話で報告し、その時点までに把握できている情報を記載して、直接またはFAX または電子メールで提出する。(一次報告) また重篤な有害事象の発生を知った時点から7日以内に「重篤な有害事象に関する報告書」を作成し、病院長および関連部門に提出する

5.3 新たな安全性情報の報告

試験責任者は、研究対象者の安全又は当該試験の実施に悪影響を及ぼす可能性のある重大な新たな安全性に関する情報を入手した場合は、文書により病院長へ報告する。新たな安全性情報等には製薬会社からの情報、医学論文等からの情報、緊急安全性情報等を含む。

また、現在試験治療中の研究対象者へ新たな安全性情報を知らせ、試験治療の継続について確認する

6 試験実施期間

倫理審査委員会承認後～2015年5月31日 (症例登録期間は2015年3月31日まで)

7 症例数及び設定根拠

目標症例数 3例 (最高5例)

種々の治療で効果が得られず、本治療を希望する左右対称性の病変を持つ原発性多汗症の患者の数と本臨床試験にかかる費用、及び期間とパイロットスタディーとして安全性と効果の評価に絶えうる数として上記を算定。

8 評価項目

8.1 主要評価項目 (Primary endpoint)

1) 安全性評価項目

- 外用部の紅斑、丘疹、水疱、糜爛、鱗屑付着等の異常臨床所見
- 血液データや尿検査などの検査値
- 血中へのラパマイシンの移行の程度 (血中濃度)
- 重篤な有害事象の有無を調べる。

2) 有効性評価項目

- 対象発汗量の測定: 試験開始時に決めた対象部位の発汗量を換気カプセル法で測定し、被験薬とプラセボ外用部を比較し、その効果を評価する。

- b. 同時に写真を撮り記録する

8.2 副次的評価項目 (Secondary endpoint)

1) 有効性評価項目

- a. 皮膚生検が施行された症例については組織的に検討し、汗腺の性状、数、血管の量、浸潤細胞の有無、などを評価し効果判定の資料とする。
- b. 自覚症状の改善度, 患者の満足度を評価する
- c. 対象発汗部の範囲の測定: 試験開始時に決めた対象部位の発汗量、発汗異常部の範囲をヨードデンプン紙法で測定し、被験薬とプラセボ外用部を比較し、その効果を評価する。

9 統計学的事項

パイロット試験であり、対象患者数が5例までであり、統計学的な解析に絶え得る人数ではない。

9.1 解析対象集団

9.1.1 有効性解析対象集団

対象として適格と判定し登録され、少なくとも1回治療を受けたすべての被験者を最大解析対象集団と定める。

9.1.2 安全性解析対象集団

登録後、少なくとも1回治療を受け、かつその後何らかの安全性データが収集された被験者を安全性解析集団と定める。

9.2 症例・データの取扱い基準

9.2.1 安全性

有害事象については、治療開始から最終治療終了後2週間までに生じたものを解析する。治療開始3週間前～当日開始前までのデータを治療開始前値として取り扱う。ただし複数回検査されている場合は、最も開始日に近いデータを開始前値として扱う。

9.2.2 欠測値

各観察時期の値の欠測値は補完しない。

9.2.3 試験計画違反の取扱い

9.3 解析方法

9.3.1 背景因子

被験者の背景因子に関して各被験者について纏める

9.3.2 有効性評価

9.3.2.1 主要評価解析

被検部位の発汗量を換気カプセル法により実測し、被験薬とプラセボ外用部の発汗量を比較し、効果を評価する。

副次的解析

- 1) 組織生検に同意を得られた場合は、生検組織の光学顕微鏡検査での病理所見でもって発汗に対する効果を検討する。
- 2) 対象発汗部の範囲の測定：試験開始時に定めた対象部位の発汗量、発汗異常部の範囲をヨードデンプン紙法で測定し、被験薬とプラセボ外用部を比較し、その効果を評価する。

9.3.3 安全性評価

すべての有害事象を表示し、重篤な有害事象は別途集計する。なお、因果関係にかかわらず、すべての有害事象についての解析も行う。

10 記録の収集および管理

本試験で用いる記録用紙と提出期限は以下のとおりである。

- 1) 症例登録票
- 2) 症例報告書（観察期間終了後3ヶ月以内）

11 倫理的事項

本試験に関与するすべての者は、「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」に従って、本試験を実施する。

- ・ヘルシンキ宣言（2013年修正版）
- ・臨床研究に関する倫理指針（平成20年改正）

11.1 インフォームド・コンセント

本試験実施に先立ち、担当医師は倫理審査委員会の承認が得られた説明文書を対象患者に渡し、下記事項を説明したうえで、本試験の参加について自由意思による同意を文書で得る。

- ① 試験への参加は任意であること
- ② 試験への参加に同意しなくても不利益な対応を受けないこと
- ③ 試験への参加に同意した後でも、不利益を受けることなく撤回することができること
- ④ 対象患者として選定された理由
- ⑤ 試験の意義、目的、方法及び期間
- ⑥ 研究者等の氏名及び職名
- ⑦ 試験への参加により期待される利益、起こり得る危険、不快な状態、試験終了後の対応
- ⑧ 試験に関する資料の入手または閲覧
- ⑨ 個人情報の取り扱い、試験結果を他の医療機関へ提供する可能性
- ⑩ 知的財産権の帰属

- ⑪ 試験成果の公表
- ⑫ 試験の資金源、起こり得る利害の衝突
- ⑬ 試料等の利用と保存
- ⑭ 試験に関する問い合わせ、連絡先
- ⑮ 補償の有無

11.2 個人情報保護

本試験に関するデータを取り扱う際は、患者の個人情報保護に最大限の努力を払う。

症例報告書を作成する際には、個人を識別する情報の全部または一部を取り除き、代わりに識別コードを付し、連結可能匿名化を行なう。対応表は、個人情報管理者（試験責任者）が、施錠された書庫にて厳重に保管する。

本試験で得られたデータを当該医療機関外へ提供する際には、対応表は提供せず、連結不可能匿名化されたデータのみを提供する。

学会や論文等で研究成果を発表する場合も、個人を特定できる情報を明らかにすることは決して行なわない。

12 研究費用

12.1 資金源および利益の衝突

本研試験にかかる費用は厚生労働科学研究費と文部科学研究費でまかなわれており、起こり得る利害の衝突や開示すべき利益相反はない。

12.2 研究に関する費用

本試験期間中の通常の治療にかかる医療費は、観察・検査も含めて通常の診療の範囲内であり、健康保険制度でまかなわれる。ただし、ラパマイシンの外用薬の費用、試験目的の生検と電顕検査にかかる費用、血中ラパマイシン濃度の測定などの試験目的の血液検査にかかる費用などこの試験のために必要な余分な費用については、研究費負担とする。また、試験に協力に対する謝礼や交通費などの支給はない。

13 健康被害に対する補償

本研究の実施に伴い、健康被害が生じた場合、研究担当医師は速やかに適切な治療、その他必要な措置を講じ、提供される治療には健康保険を適用する。また本研究に起因する重度な健康被害に備え、臨床研究保険に加入する。

14 試料等の利用と保存

試験で得られた組織、血液検体は、大阪大学皮膚科にて厳重に保管する。試験終了後の取り扱い

について、患者には将来他の研究に利用する可能性を告げ、その場合の使用について同意を得られるか確認し、皮膚科外来で採用中の倫理委員会承認済みの包括同意書(10193)を用いて書面で同意を確認したうえで、保存する。

15 研究成果の公表

本試験の結果は、しかるべき学会に発表し、論文として報告する。学会発表および論文投稿に関しては、患者の個人情報保護する。

16 研究組織

16.1 試験責任者

大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科 講師 金田眞理
〒565-0871 吹田市山田丘 2-2
TEL:06-6879-3031 FAX:06-6879-3039

16.2 試験事務局

大阪大学大学院医学系研究科 皮膚科
事務局責任者：金田眞理
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
TEL:06-6879-3031 FAX:06-6879-3039

16.3 協力施設

大阪大学医学部附属病院薬剤部：外用剤の調剤（院内製剤）、ラパマイシンの血中濃度測定

16.4 独立効果安全性評価委員会

16.4.1 独立効果安全性評価委員の主な業務

研究実施者から独立した組織であり、有害事象が生じた場合に、安全性データ及び有効性のデータを評価し、研究実施者に対し、試験の中止、継続、計画の変更を勧告する。

16.4.2 独立効果安全性評価委員の所属、氏名、連絡先 学外委員

大阪市立大学 皮膚科 鶴田大輔
〒545-8585 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3
TEL 06-6645-2121
近畿大学 皮膚科 大磯直毅
〒598-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

TEL 072-366-0221

学内委員

大阪大学 再生誘導医学 玉井克人

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

TEL 06-6879-8395

17 文献

- 1 Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I *A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex: A pilot study of 9 Japanese TSC patients with different disease severity* Br J Dermatol 2011; 165(4) : 912-6
- 2 Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Nakamura A, Matsumoto S, Katayama I *A novel application of topical rapamycin formulation, an inhibitor of mTORC1, for patients with hypomelanotic macules in tuberous sclerosis complex* Archives of Dermatology 2012;148(1) :138-9
- 3 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 2013 169,1314-1318.

序 期 限 (一)
当 所 期 限 (4 / 2 7)
くご希望の場合のみ>

回 答 要

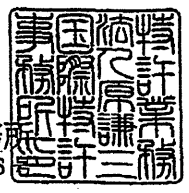
国際出願完了報告



2012年2月3日

○ 国立大学法人大阪大学
産学連携課 知的財産事務グループ
御担当 江口 修一 様

株式会社リクルート
テクノロジー・マネジメント開発室
特許ご担当者様



特許業務法人 原謙三国際特許事務所
〒530-0041 大阪市北区天神橋2丁目北2番6号
大和南森町ビル

TEL (06)6351-4384 (代) FAX (06)6351-5664 (代)
[特許技術主担当: 博士(医学) 川淵 真大]
[外国秘書管理部担当: 松廣]

大阪大学様整理番号: G20110047
当所整理番号: G20110047/PCT
国名: PCT (PCT-インターネット出願)
国際出願番号: PCT/JP2012/052047
日本国自己指定: あり
基礎出願番号: 特願 2011-018273
発明の名称: 皮膚疾患を処置するための外用薬およびその製造方法

謹啓 時下ますますご清祥のこととお喜び申し上げます。平素は格別のご高配を賜り厚くお礼申し上げます。

先般ご依頼のありました首記の国際出願に関する出願手続を完了いたしました。本件につき、原謙三国際特許事務所にご依頼いただき、誠に有り難うございました。当事務所では、本件の主担当者を中心とし、その他のスタッフが力を併せて、お客様の知的財産権保護のために最善を尽くしましたこと、所員一同、ここに謹んで報告させていただきます。

同封の出願書類控を宜しくご査収ください。
尚、JST 吉田様へは別途メールにて出願明細書データを送付しております。 謹白

[同封書類] (各 1 通)

- 受領書 (国際出願日: 2012年1月30日 国際出願番号: PCT/JP2012/052047)
- 願書
- 出願用書類 (明細書、 請求の範囲、 要約書、 図面)
- 優先権書類送付請求書および優先権証明願の写し
- 出願データを格納した CD (1 枚) —江口様のみ—
- 請求書 (正 1 通) —江口様のみ—
- 見積書 (1 通) —江口様のみ—

[特記事項]

1) 指定国の中に米国が含まれておりますが、国際出願が英語以外で公開される場合(本願に相当)、英語翻訳文を USPTO へ提出すれば、米国出願における公開の仮保護の権利を享受することが可能です。仮保護の権利を享受することをご希望の場合は、2012年4月27日までに当所までご連絡ください。

当所ホームページ URL: <http://www.harakenzo.com> 最新の IP 情報を更新しております。
一般事項または新規のご依頼に関しましては、「所長 弁理士 原 謙三」宛に、郵便、FAX、E-mail または電話にてお願い申し上げます。(電話でのご依頼の場合、原の不在時には、「副所長 弁理士 福井 清」が代わりに承ります。)ご依頼いただきました内容を考慮の上、最適な主担当者を当事務所にて決定させていただきます

受領書平成24年 1月30日
特許庁長官識別番号
氏名 (名称)110000338
特許業務法人原謙三国際特許
事務所 様

以下の書類を受領しました。

項番	書類名	整理番号	受付番号	提出日	出願番号通知 (事件の表示)
1	国際出願	G20110047	51200207544	平24. 1.30	PCT/JP2012/ 52047 以上

平成26年7月9日

医学系研究科長 殿

産学連携本部長

馬場 章 夫

特許出願に係る出願手続（等）の完了について（通知）

標記のことについて、別添（写）のとおり通知がありましたのでお知らせします。
また、本通知の写しを発明者（本学担当者）へ速やかに送付されるよう、よろしくお取り計らい願います。

記

届出受付番号	K20130305
発明の名称（届出時）	ラパマイシンおよびその誘導体を含有する発汗抑制剤
発明の名称（出願時）	発汗抑制剤
出願国	日本
出願番号	2014-131788
発明者（本学担当者）	金田 真理（医学系研究科・講師） ※職名については、発明届出書に記載のもの



IV. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「薬事申請を目指した、治療法の無い難治性多汗症に対する新規ラパマイシン外用薬の有効性を検討する医師主導治験」
 機関名 国立大学法人大阪大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma.	Yang L, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Yang F, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I	Singapore (22 th IPCC 2014)	2014. 9. 4-7	国外
Topical application of Rapamycin Ointment Inhibits Dermato Phagonoidesu Farinae Body (Dfb) Extract Antigen-Induced Dermatitis inNC/Nga Mice. Annual meeting of American Academy of Allergy, Asthma and Immunology	Yang F, Yang L, Tanaka M, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Nakamura A, Matumoto S, Atitia M, Murota H, Katayama I	San Diego Convention Center (2014 AAAAI ANNUAL MEETING)	2014. 2. 28-3. 4	国外
皮膚アレルギーの汗対策	室田浩之	日本皮膚科学会総会	2014. 5. 30	国内
皮膚の生理機能	室田浩之	日本皮膚科学会中部支部学術大会	2014. 10. 25	国内
Sweat, the unsung hero behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms.	Hiroyuki Murota	日本研究皮膚科学会	2014. 12. 13	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma.	Yang L, Yang F, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I	J Dermatol Sci	In press	国外
Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex.	<u>Wataya-Kaneda M</u> , Tnaka M, Yang L, Yang F, Tsuruta D, Nakamura A, Matsumoto S, Hamasaki T, Tanemura A, Katayama I	JAMA Dermatol	In press	国外
Atopic diathesis in hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia.	Koguchi-Yoshioka H, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Yutani M, Murota H, Nakano H, Sawamura D, Katayama I	Acta Derm Venereol	In press	国外

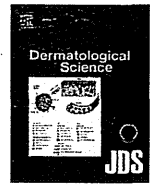
Coexistence of Langerhans cells activation and immune cells infiltration in progressive nonsegmental vitiligo.	Itoi S, Tanemura A, Kotobuki Y, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Tsuruta D, Ishii M, Katayama I	J Dermatol Sci	In press	国外
Partial anhidrosis demonstrated by Q-SART in a patient with a novel mutation in the EDARADD gene.	Koguchi-Yoshioka H, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Yutani M, Nakano H, Sawamura D, Katayama I	J Eur Acad Dermatol Venereol.	In press	国外
Severe scoliosis associated with the WNT10A mutation.	Koguchi-Yoshioka H, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Yutani M, Nakano H, Tamemura A, Akasaka E, Sawamura D, Katayama I	Journal of Dermatology.	In press	国外
Two Japanese Cases of Birt-Hogg-Dube syndrome with Pulmonary Cysts, Fibrofolliculomas and Renal Cell Carcinoma.	Murakami Y, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Tnaka M, Takahashi A, Tsujimura A, Inoue K, Nonomura N, Katayama I	Case Reports in Dermatolog	2014 Feb	国外
Dermatologic and Dental Aspects of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Statement.	Teng JM, Cowen EW, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Gosnell ES, Witman PM, Herbert AA, Mlynarczyk G, Soltani K, Darling TN	JAMA Dermatologyl	2014 Oct	国外
Topical application of rapamycin ointment ameliorates Dermatophagoides farina body extract-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice.	Yang F, Tanaka M, <u>Wataya-Kaneda M</u> , Yang L, Nakamura A, Matsumoto S, Attia M, Murota H, Katayama I	Exp Dermatol	2014 Aug	国外
Idiopathic Pure Sudomotor Failure Responding to Oral Antihistamine with Sweating Activities.	Suma A, Murota H, Kitaba S, Yamaoka T, Kato K, Matsui S, Takahashi A, Yokomi A, <u>Katayama I</u>	Acta Derm Venereol	2014 Nov	国外
Olopatadine hydrochloride restores histamine-induced impaired sweating	Matsui S, Murota H, Ono E, Kikuta J, Ishii M, <u>Katayama I</u>	J Dermatol Sci	2014 Jun	国外
Dynamic analysis of histamine-mediated attenuation of acetylcholine-induced sweating via GSK3 β activation.	Matsui S, Murota H, Takahashi A, Yang L, Lee JB, Omiya K, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, <u>Katayama I</u>	J Invest Dermatol	2014 Feb	国外
Oligonol Supplementation Modulates Plasma Volume and Osmolality and Sweating After Heat Load in Humans.	Lee J, Shin Y, <u>Murota H</u>	J Med Food	2015 Jan	国外
Sweat, the driving force behind normal skin: An emerging perspective on functional biology and regulatory mechanisms.	<u>Murota H</u> , Matsui S, Ono E, Kijima A, Kikuta J, Ishii M, Katayama I	J Dermatol Sci	2015 Jan	国外

Isolation and characterization of sweat gland myoepithelial cells from human skin.	Kurata R, Futaki S, Nakano I, Tanemura A, Murota H , Katayama I, Sekiguchi K	Cell Struct Funct.	2014 Sep	国外
Olopatadine hydrochloride restores histamine-induced impaired sweating.	Matsui S, Murota H , Ono E, Kikuta J, Ishii M, Katayama I	J Dermatol Sci	2014 Jun	国外
Idiopathic pure sudomotor failure responding to oral antihistamine with sweating activities.	Suma A, Murota H , Kitaba S, Yamaoka T, Kato K, Matsui S, Takahashi A, Yokomi A, Katayama I	Acta Derm Venereol	2014 Nov	国外

研究成果の刊行物・別刷



ELSEVIER



Letter to the Editor

4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: Insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma

Keywords:

Autophagy; Rhododendrol; Leukoderma

Rhododendrol [4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol, Rhododendrol[®]] was first developed 5 years ago as a skin-whitening cosmetic that contained a 2% (w/w) formulation. It is also a natural ingredient present in many plants, such as the Nikko maple tree [1]. It competes with tyrosine for hydroxylation by tyrosinase and effectively inhibits melanin biosynthesis [2,3]. However, these cosmetics were withdrawn from the market in 2013 after rhododendrol reportedly caused a depigmentation disorder. It was reported that partial depigmentation appeared on the neck, the hands, and the face at sites of repeated application of these cosmetics, and the symptoms in 79% of affected patients disappear or begin to improve within 6 months after ceasing product use [The Japanese Dermatological Association Special Committee on the Safety of Cosmetics Containing Rhododendrol, 2014 (in Japanese)]. A previous report suggested that the melanocyte toxicity of rhododendrol is caused by its tyrosinase-catalyzed oxidation and production of cytotoxic reactive oxygen species (ROS) [4]. Another previous study reported that no ROS were detected in rhododendrol-treated melanocytes, but a tyrosinase-dependent accumulation of endoplasmic reticulum (ER) stress and/or activation of the apoptotic pathway appeared to contribute to cytotoxicity [5]. However, contradictorily, it was also recently reported that one melanocyte line with higher tyrosinase activity is resistant to rhododendrol cytotoxicity [6]. Furthermore, depigmentation symptoms have only been confirmed in $\approx 16,000$ (2%) of 800,000 estimated users of cosmetic products containing rhododendrol. Interestingly, not all consumers and not all treated skin areas developed white blotching. It is still unclear why only some people suffer from these skin problems and why a spectrum of symptoms occurs. It appears likely that rhododendrol causes irritation and depigmentation disorders only under certain conditions, suggesting that its mechanisms might be more complicated than previously reported.

In this report, normal human epidermal melanocytes from moderately pigmented neonatal foreskin (HEMn-MP) cells were incubated with rhododendrol (300–3000 μM). Rhododendrol treatment at 300–900 μM did not affect melanocyte viability. However, the number of viable melanocytes strikingly decreased

in response to rhododendrol treatment at 1500 and 3000 μM (Fig. 1A). These results demonstrated concentration-dependent rhododendrol-induced cytotoxicity in melanocytes. After rhododendrol treatment, cultured melanocytes were washed with cold PBS buffer, adherent cells were lysed for western blotting analysis (Fig. S1A) or were fixed for immunofluorescence staining (Fig. S1B). Treatment with higher concentrations (1500–3000 μM) of rhododendrol induced caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavages in melanocytes (Fig. S1A). The cleaved caspase-3 positive melanocytes were also observed after treatment with high concentration of rhododendrol (Fig. S1B). All of these results together suggest that rhododendrol induces apoptotic cell death in HEMn-MPs.

Cultured HEMn-MPs were treated with non-cytotoxic rhododendrol concentrations (300–900 μM) for 120 h. Rhododendrol-treated cells were markedly less pigmented than untreated control melanocytes (Fig. 1B(a–c)). By western blotting, identical treatment with rhododendrol markedly down-regulated expression of the melanogenic factors tyrosinase, Pmel17 and Melan-A, while slightly increasing MITF expression (Fig. 1B(d)). By western blotting, expression of the autophagosome marker LC3II and lysosome marker LAMP1 were both markedly up-regulated in melanocytes by rhododendrol treatment at non-toxic concentrations (Fig. 1C). Furthermore, by immunofluorescence staining, increased LAMP1 and LC3II expression and decreased Pmel17 expression was also observed in 900 μM rhododendrol-treated melanocytes (Fig. 1D). Together, these results demonstrate that exposure of melanocytes to rhododendrol inhibits melanin production and also enhances the autophagy-lysosome pathway.

By electron microscopy examinations, the number of stage IV melanosomes in the cells' cytoplasm markedly decreased, lysosome numbers also increased dramatically after rhododendrol treatment, and double-membrane enclosed autophagic vacuoles were observed to contain materials resembling stage II–III melanosomes (Fig. 2A). These results suggest that rhododendrol inhibits melanogenesis and induces subsequent autophagy-lysosome activation and autophagic melanosome degradation. To investigate the exact role of autophagy-lysosome activation in rhododendrol-treated melanocytes, we examined the effect of rhododendrol on autophagy-deficient melanocytes and autophagy-enhanced melanocytes. Cultured human melanocytes were pretreated with bafilomycin A1 or rapamycin for 3 h to inhibit or induce autophagy, respectively. Autophagy deficiency (bafilomycin A1 pretreated) significantly exacerbated rhododendrol cytotoxicity in cultured melanocytes, and this cytotoxicity was clearly abolished in melanocytes that were pretreated with rapamycin (Fig. 2B). These results suggest that autophagy induction significantly attenuates rhododendrol-induced melanocyte death. Protein expression levels of p62 and BiP were observed strikingly up-regulated by

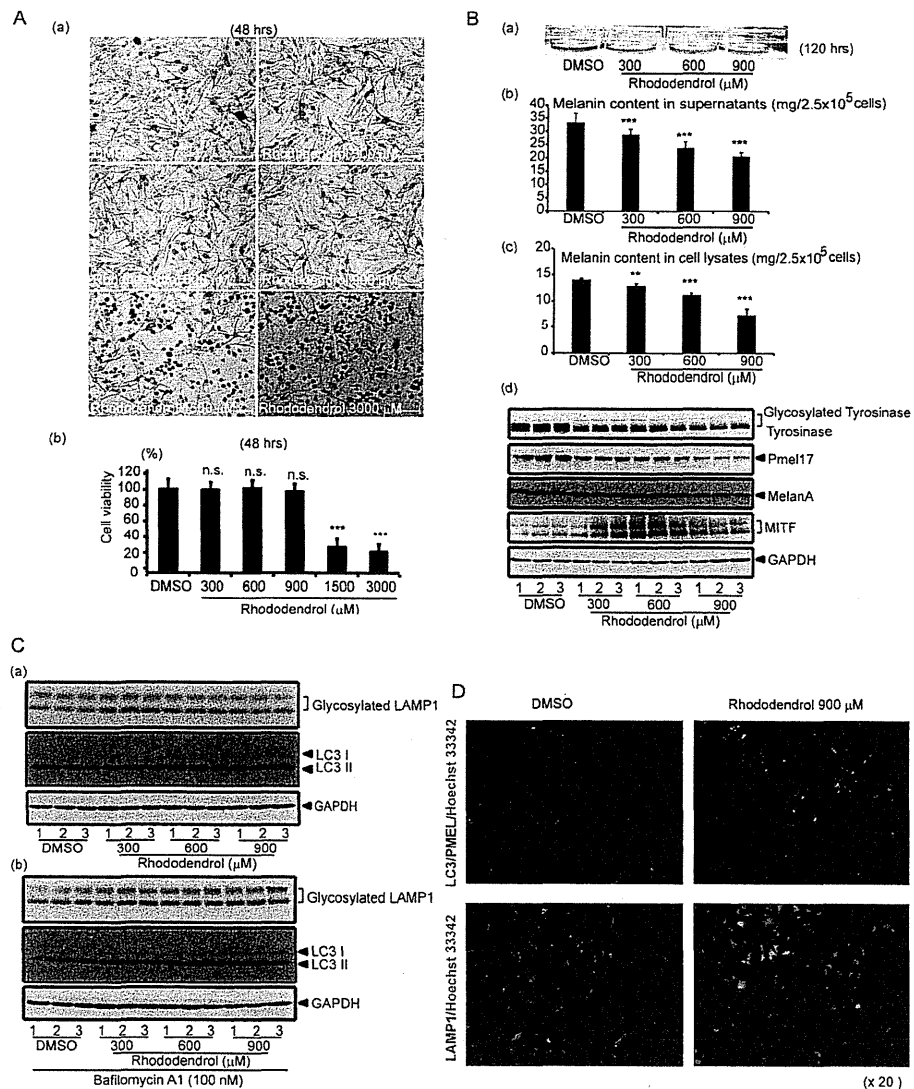


Fig. 1. Cultured human epidermal melanocytes were observed under phase contrast microscopy (A (a)), assessed by MTT assay (A (b)), cultured cells with medium were photographed (B (a)), melanin content both in culture medium (B (b)) and cell lysates (B (c)) were quantified with a Melanin Content Assay. Three days after rhododendrol treatment at the indicated concentrations, protein expressions in cell lysates were analyzed by western blotting ((B (d), C (a, b)). Melanocytes exposed to 900 μ M rhododendrol were stained with the indicated antibodies and observed by confocal fluorescence microscopy (D).

rhododendrol treatment (Fig. S2). The p62 protein is known to mediate degradation of ubiquitinated proteins via the autophagosome-lysosome pathway [7], and BiP, a member of the HSP70 family found in the ER, is a marker of ER stress [8]. These results suggest that rhododendrol induced ubiquitin accumulation and ER stress in melanocytes. These findings also suggest that rhododendrol-induced ER stress might be one cause of reduced cell viability in rhododendrol-treated melanocytes.

Our results indicate that the mechanisms of rhododendrol cytotoxicity in melanocytes is more complicated than its merely acting as a tyrosinase analog that competitively inhibits normal tyrosinase activity, the rate-limiting enzyme for melanogenesis. A possible tyrosinase-mediated mechanism is that rhododendrol reaction with tyrosinase generates reactive semi-quinone free radicals that induce cellular stress and cytotoxicity [9,10], and subsequently activates the autophagy-lysosomal pathway.

Simultaneously, rhododendrol inhibits cellular melanogenesis by binding tyrosinase and by inducing autophagic melanosome degradation. However, cytotoxicity was only induced at higher rhododendrol concentrations or in autophagy-defective cells, as the autophagy-lysosome system becomes overloaded and cellular stress results from rhododendrol-originating quinones (Fig. 2C). This mechanism appeared to be specific as no cytotoxicity and no activation of autophagy-lysosome pathway were observed in cultured human primary keratinocytes or fibroblasts (data not shown). These data suggest that an impaired or dysfunctional autophagy-lysosome pathway in patients' melanocytes might be one explanation of why all consumers and all treated skin areas do not develop white blotching. Our findings suggest a possible role of autophagy-lysosome pathway in rhododendrol-induced depigmentation disorder, and individual variation in autophagic function may determine rhododendrol-application outcomes. These results expand our

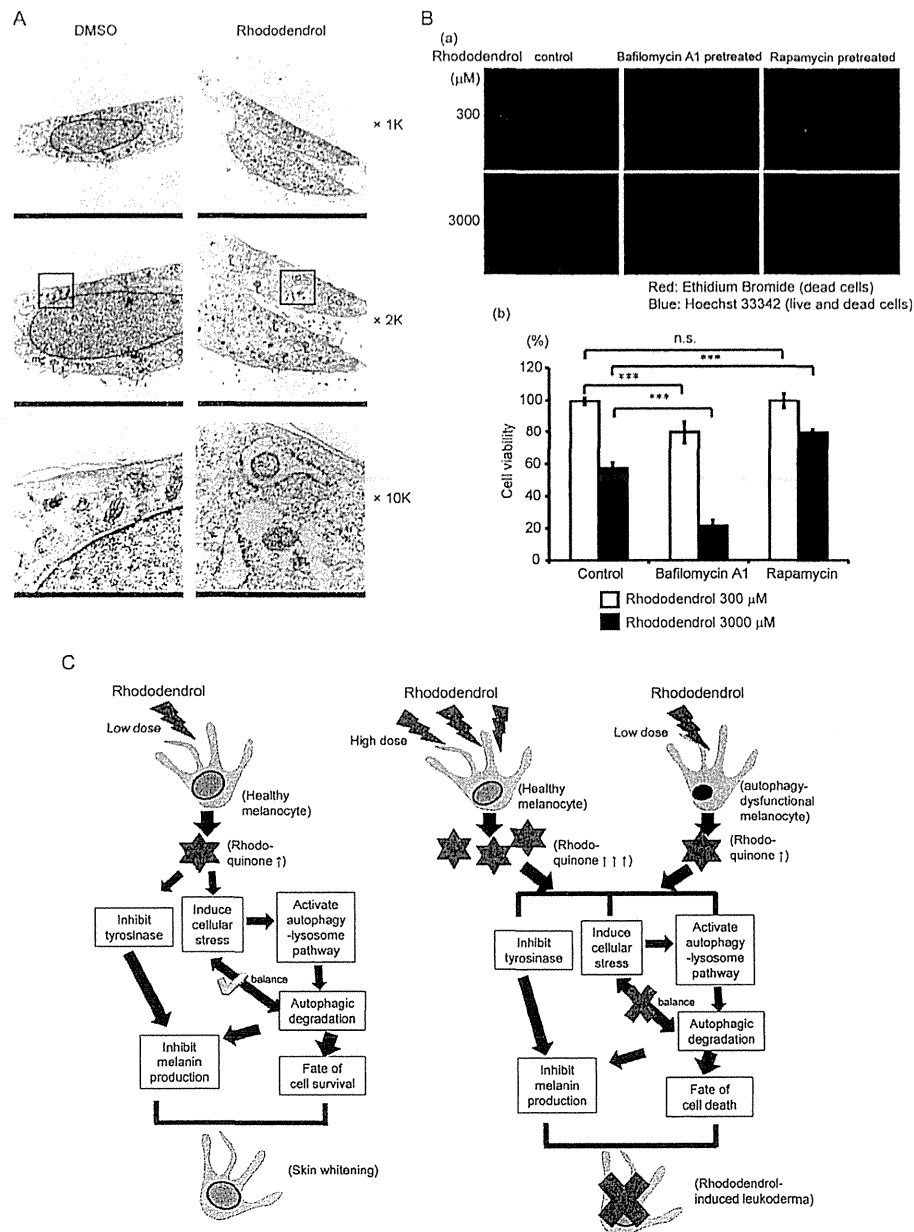


Fig. 2. Cultured human epidermal melanocytes exposed to 900 μM rhododendrol or DMSO for 72 h followed by bafilomycin A1 treatment for an additional 3 h, and then observed by electron microscopy (A). m: melanosome; L: Lysosome. Cultured human epidermal melanocytes were pretreated with 100 nM bafilomycin A1 or 100 nM rapamycin for 3 h, followed by rhododendrol treatment for 72 h at the indicated concentrations. Cell staining with ethidium bromide (red) and Hoechst 33342 (blue) was observed using confocal fluorescence microscope (B (a)). After these treatments, cell viability was also evaluated by MTT assay (B). Schematic illustration of the possible mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma (C).

understanding of the mechanisms underlying the rhododendrol-induced leukoderma.

Acknowledgements

The authors acknowledge Kanebo Cosmetics Inc. for providing rhododendrol (4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol). This study was funded by the grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. We thank Lanting Teng, Liping Yang for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.01.006>.

References

- [1] Inoue T, Ishidate Y, Fujita M, Kubo M, Fukushima M, Nagai M. Studies on the constituents of *Aceraceae* plants. I. Constituents in the leaves and the stem bark of *Acer nikoense* Maxim (author's transl). *Yakugaku Zasshi* 1978;98: 41–6.

- [2] McGuire J, Hende J. Biochemical basis for depigmentation of skin by phenolic germicides. *J Invest Dermatol* 1971;57:256–61.
- [3] Jimbow K, Obata H, Pathak MA, Fitzpatrick TB. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *J Invest Dermatol* 1974;62:436–49.
- [4] Ito S, Ojika M, Yamashita T, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces 2-methylchromane-6,7-dione, the putative ultimate toxic metabolite: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014.
- [5] Sasaki M, Kondo M, Sato K, Umeda M, Kawabata K, Takahashi Y, et al. Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell Melanoma Res* 2014.
- [6] Kasamatsu S, Hachiya A, Nakamura S, Yasuda Y, Fujimori T, Takano K, et al. Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhododendrol, is related to tyrosinase activity at a certain threshold. *J Dermatol Sci* 2014.
- [7] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007;282:24131–45.
- [8] Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005;35:373–81.
- [9] Boissy RE, Manga P. On the etiology of contact/occupational vitiligo. *Pigment Cell Res* 2004;17:208–14.
- [10] Westerhof W, d'Ischia M. Vitiligo puzzle: the pieces fall in place. *Pigment Cell Res* 2007;20:345–59.

Lingli Yang^{a,1}, Fei Yang^{a,1}, Mari Wataya-Kaneda^{a,*},
Atsuhiko Tanemura^a, Daisuke Tsuruta^b, Ichiro Katayama^a
^aDepartment of Dermatology, Course of Integrated Medicine,
Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan;
^bDepartment of Dermatology, Graduate School of Medicine,
Osaka City University, Osaka, Japan

*Corresponding author at: Department of Dermatology,
Course of Integrated Medicine, Graduate School of Medicine,
Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871,
Japan. Tel.: +81 668 79 3031; fax: +81 668 79 3039

E-mail address: mkaneda@derma.med.osaka-u.ac.jp
(M. Wataya-Kaneda).

¹These authors contributed equally to this study.

Received 1 December 2014