

## 美白成分の安全性評価法の策定に関する研究

研究代表者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

ロドデノール(RD)配合薬用化粧品による白斑発症に関しては、症例の多くは改善したが、一部患者に使用中止後も難治性白斑が見いだされ、病態や発症機序には未だ不明の点が残されている。本研究では、患者由来組織やモデル動物を用いさらなる解明を進める。また白斑誘導性類似化合物に共通するチロシナーゼによる代謝活性化に注目して測定方法を検討し、美白成分の安全性評価法策定に貢献する。

患者および健常人検体の解析を行い、①皮膚の免疫組織学的検討ではメラノサイトの $\gamma$ グルタミルシステイン合成酵素が改善例では高く、E カドヘリンは改善例・難治例ともに低く、メラノサイトのグルタチオン・遊走性の低下と難治化との関連が推定された。②肥満細胞の脱顆粒率は難治例病変部において有意に上昇することが判明した。③RD白斑病変部皮膚角化細胞において接着に関わるgpNMBの低下が見出され、白斑発症との関連が示唆された。④尋常性白斑患者で認められる抗甲状腺抗体や抗メラノサイト抗体がRD白斑患者では有意に認めないことが判明し異なる発症機構が示唆された。⑤モデルマウスでRD白斑部色素再生への活性型ビタミンD3と紫外線照射の効果を明らかにし、色素再生の機序に関わる候補遺伝子を見出した。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、RDや白斑誘導性類似化合物に共通するチロシナーゼによる代謝活性化について、*in vitro*あるいは細胞での評価手法を検討した。[I] *In vitro*では①23種の4置換フェノールのチロシナーゼ依存的なSHペプチドとの結合を解析し、側鎖構造と反応性との関係を明らかにした。②4-置換フェノール構造を有するレスペラトロールRESのチロシナーゼによる代謝、SHとの反応性、代謝産物のプロオキシダント活性、③代謝物RDユーメラニンの酸化促進作用のUVAによる増強を明らかにした。④従来のマッシュルームチロシナーゼに代え、ヒトチロシナーゼの可溶ドメインを調製し、11種の4-置換フェノール類の代謝を測定することに成功した。[II]細胞を用いた評価方法については、①チロシナーゼ代謝による細胞毒性増強をB16BL6メラノーマ細胞のチロシナーゼ発現量・活性の改変により検証したが、ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞の場合と同様に、RDを含め白斑誘導能との相関は認められなかった。②グルタチオン・システイン付加体生成のヒトチロシナーゼ高発現細胞を用いた評価手法を構築し、代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、付加体測定が有用であることを示した。

### 研究分担者

石川 治 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学教授  
片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学教授  
荒瀬規子 大阪大学大学院医学系研究科助教

鈴木民夫 山形大学大学院医学系研究科皮膚科学教授  
秋山卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部室長  
伊藤祥輔 藤田医科大学医療科学部名誉教授

## 研究協力者

安田正人 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学助教  
五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部長

## A. 研究目的

ロドデノール (RD) 配合薬用化粧品による白斑発症問題に関しては、平成 25 年度より二期にわたる厚生労働科学研究において、再発防止策の検討と原因究明研究が行われた。班内外の研究により、RD 白斑病変部でのメラノサイト異常、リンパ球の異常、メラノサイトのオートファジーへの影響、RD のチロシナーゼによる代謝、代謝物の強い酸化促進作用など、病態形成の手がかりとなる知見が得られている。しかし一部患者では、塗布部以外にも白斑が波及する難治性白斑も報告され、未だ不明な点が多い。

本研究では、上記の厚生労働科学研究の結果を踏まえ、患者由来組織やモデルマウスを用いた病態解明を継続し、白斑発症や病態形成の機序、進行に関わる因子等を明らかにする。

また美白成分の安全性評価法の確立に向けた検討を行う。RD および類似構造の白斑誘導性 4-置換フェノール類は共通してチロシナーゼにより代謝活性化される。本研究では、*in vitro* および細胞を用いた評価方法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

本研究ではロドデノール (RD) 誘発性脱色素斑における肥満細胞の役割を明らかにするために、RD 含有化粧品による白斑病変辺縁部皮膚と健常人の正常皮膚について、 $\gamma$  グルタミルシステイン酵素 (GCLC) と E カドヘリンの発現、肥満細胞の局在、脱顆粒の有無について免疫組織学的に比較解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「世界医師会ヘルシンキ宣言 (2013

年 10 月改訂)」、「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年 7 月 31 日全部改正)」を遵守して行う。収集するデータに個人情報を含めず、試料とともに各研究実施機関で適切に連結可能匿名化を行う。外部分析協力機関へは検体と被験者コード番号 (検体認識番号) のみ送付され、個人情報が送られることはない。

### 2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

RD 白斑患者とコントロールの皮膚検体で gpNMB の発現を比較した。また、RD 白斑患者、尋常性白斑患者、コントロール群の血清検体で抗甲状腺抗体、抗メラノサイト抗体の発現を比較した。

(倫理面への配慮)

RD 誘発性脱色素斑または尋常性白斑患者に於ける HLA・末梢血リンパ球・皮膚局所の免疫解析 (大阪大学医学部附属病院・研究倫理審査委員会 13421 承認済み) に基づき患者より同意書を取得の上研究を進めている。

### 3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析[鈴木]

日本人皮膚モデルマウスに RD を塗布して RD 白斑モデルマウス作成した。そして、その白斑に活性型ビタミン D3 (VitD3) 軟膏を塗布した。その白斑解析にタクロリムス軟膏、VitD3 軟膏を塗布して色素再生促進効果の有無を観察した。コントロールはワセリンとした。RD 白斑モデルマウスに RD 外用を中止し、色素再生を観察し、まだら状になった部位の白斑部を生検して、組織学的、分子生物学的に解析した。その後 VitD3 を塗布したマウス皮膚から RNA を採取し、マウス・マイクロアレーを用いて発現遺伝子を網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては本学の動物実験委員会により、承認されている。

#### 4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

4-アルキル/アリル置換フェノール類 11 種のヒトチロシナーゼによる酸化を測定した。ヒトチロシナーゼは膜貫通ドメインを欠く可溶性ドメインを 293T 細胞に発現し精製して用いた。各種フェノール類との反応後、HPLC でフェノールおよびカテコールを定量した。

また、4-アルキル/アリル置換フェノール類 23 種について、マッシュルームチロシナーゼ酸化により生成するオルトキノンを、Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(DPRA(Cys))と結合させ、HPLC で分析した。

#### 5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

RD ユーメラニン(RD-EM)は RD をチロシナーゼで2時間酸化して調製した。これにグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいは NADH を加え、UVA 照射下で反応させ、非照射群と比較した。抗酸化物質の残存量は HPLC 法にて定量した。また、酸化により副生した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>も合わせて定量した。

レスベラトロール(RES) 100  $\mu$  M を pH 6.8 あるいは 5.3 でチロシナーゼにより酸化し、反応を UV-Vis スペクトルあるいは HPLC で追跡した。必要に応じてアスコルビン酸(AA)あるいは N-アセチルシステイン(NAC)を加えた。

#### 6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

RD および白斑誘導性類似化合物の細胞毒性発現におけるチロシナーゼ代謝の役割を、メラノーマ細胞 B16BL6 のチロシナーゼを siRNA ノックダウン、阻害剤処理、diBucAMP 処理による発現誘導により変化させ、4-置換フェノール類の細胞毒性に及ぼす影響を解析した。また、ヒトチロシナーゼを 293T 細胞に一過性に発現させ、24 時間後に薬物処理を開始し、細胞および培地を回収し、代謝産物を HPLC で解析した。細胞生存率および細胞

内グルタチオン量を測定した。

### C. 研究結果

#### 1. 患者由来組織を用いた原因究明 [石川・安田]

RD による白斑を生じた症例のうち、改善 18 例、難治 8 例の白斑病変辺縁部と正常皮膚 51 例に対し、抗 GCLC 抗体、抗 E カドヘリン抗体、MART-1 抗体で染色し、メラノサイト 1 個の MART-1 あたりの GCLC ならびに E カドヘリンシグナルを定量した。その結果、GCLC は改善例病変辺縁部 0.600 に対し、正常皮膚 0.413 (P=0.0018)と有意に発現が上昇していたが、難治例は 0.458 であり、正常皮膚と差が見られなかった。また、E カドヘリンは正常皮膚 0.678 に比べ、改善例 0.887 (P=0.016)、難治例 1.03 (P=0.03)ともに発現が上昇していた。

また、改善 29 例、難治 15 例の白斑病変と正常皮膚 58 例に対し、抗トリプターゼ抗体で染色し、200 倍視野での真皮内肥満細胞数を計測、そのうち形態的に脱顆粒している肥満細胞数を計測した。その結果、総肥満細胞数は改善例病変部 7.74、難治例病変部 7.77 に対し、正常皮膚 8.59 と差はみられなかった。しかし、脱顆粒率は改善例病変部 65.6%、正常部 61.0%に対し、難治例病変部で 73.4% (P=0.021)と、難治例病変部において有意に脱顆粒が増えていた。

#### 2. 機能的化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析 [片山]

白斑発症機構にメラノサイトとケラチノサイトの接着が重要であることが知られるが、RDRD 白斑病変部の表皮角化細胞で gpNMB の発現が低下していることが明らかとなった。

RD 誘発白斑と尋常性白斑は臨床的な類似性を有する。尋常性白斑患者で認められる自己抗体が RD 白斑患者血清中では有意に認められないことが判明した。

### 3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析 [鈴木]

RD 白斑モデルマウスを使用して、RD 白斑部に対して有効な治療法を探索した。また色素再生時、まだら部位における白斑部に色素再生が起こらない理由を明らかにすることとした。

RD 白斑モデルマウスに RD 外用を中止したところ、無処置の状態でおおよそ 3 か月間で色素が再生した。このマウスにタクロリムス軟膏を外用したところ、色素再生増強効果は認められなかった。次に、活性型ビタミン D3 (VitD3) 軟膏を外用したところ、コントロールに比べ、明らかに VitD3 軟膏外用部に色素再生が早期に認められた。さらに、この色素再生促進作用は、UVB 照射により相乗効果が認められた。また、この時にメラニン合成酵素の遺伝子発現が増強していた。

次に、色素再生部に認められたまだら状態の白斑部を生検し、組織学的に確認した。メラノサイトは色素再生部と同様に存在しており、十分にメラノサイトの遊走は生じていることが明らかとなった。さらに白斑部のチロシナーゼの発現は、色素再生部位よりも増強して起こっていることが明らかとなり、逆説的な結果が得られた。

RD 白斑に色素再生を促進する効果が確認された活性型ビタミン D3 について、その作用機序を解析した。VitD3 を塗布したモデルマウスの皮膚 RNA の発現遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析した結果、いくつかの遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。我々はその中である遺伝子(遺伝子 A)に着目した。培養色素細胞を使った実験では、確かに VitD3 添加条件下で、遺伝子 A の発現が亢進していることを確認した。さらに、その遺伝子をノックダウンするとメラニン合成が亢進しなくなることが明らかとなった。

### 4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋

山]

RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類は共通してチロシナーゼによりオルトキノンに代謝されることが報告されている。ヒトチロシナーゼの可溶性ドメインを調製し、RD を含む 11 種の 4-アルキル/アリル置換フェノール類と反応させたところ、RD (RD), モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH), 4-tert-ブチルフェノール (4-TBP), 4-S-cysteaminyphenol (4SCAP), raspberry ketone、4-methylphenol (*p*-cresol), resveratrol, 4-methoxyphenol, 及び 4-chlorophenol について酸化が起きたことが確認された。Rucinol (4-butylresorcinol) 及び methyl 4-hydroxybenzoate (methylparaben) は酸化が確認されなかった。マッシュルームチロシナーゼの基質となるフェノール体は、いずれもヒトチロシナーゼによっても酸化された。

チロシナーゼにより生じるオルトキノンは SH 基との高い反応性を有する。不安定なオルトキノンを SH 付加体として測定する方法を検討した。4-アルキル/アリル置換フェノール類 23 種について、*in vitro* でチロシナーゼ酸化し DPRA(Cys)ペプチドと反応させ、検液を HPLC で分析し、DPRA(Cys)単独で分析した結果と比較した。基質の保持時間は基質溶液を単独で分析することにより求めた。

その結果、4-methylphenol (*p*-cresol)、4-ethylphenol、4-propylphenol、4-butylphenol、4-amylphenol、4-hexylphenol、4-heptylphenol、4-benzylphenol、rhododendrol、raspberry ketone、4-propoxyphenol、4-butoxyphenol、4-amyloxyphenol、4-hexyloxyphenol、および 4-benzyloxyphenol (monobenzene, MBEH) では DPRA(Cys) 及び基質のピークが減少または消失し、結合ペプチドと考えられるピークが生成した。一方、4-isopropylphenol、4-*sec*-butylphenol、4-cyclohexylphenol、4-*tert*-amylphenol、4-phenylphenol、4-methylthiophenol、4-methoxyphenol、及び 4-ethoxyphenol では

DPPA(Cys)及び基質のピークの減少が見られなかった。

## 5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

前期の研究において、RD のチロシナーゼ代謝物である RD ユーメラニン(RD-EM)が強い酸化促進作用を示すことを報告した(PCMR, 2017)。そこで今年度は、RD-EM による作用がUVA 照射により増強されるか否かを調べた。細胞内抗酸化剤であるグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいはNADHのRD-EMによる酸化は、UVA 照射により2~4倍に増強されることがわかった(Itoら、PCMR, 2018)。反応は酸素に依存し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生もUVAにより増強された。

レスベラトロール(RES)はRDと同様の4-置換フェノール構造を有する。In vitro で代謝を調べたところ、RESはチロシナーゼの良好な基質となることが分かった。生成物はpH 6.8では極めて不安定であるが、pH 5.3においては485 nmに吸収極大をもつオルトキノンの生成が確認された。オルトキノンは反応性が高く、NACと二付加体および三付加体を生成した。システイン、グルタチオン(GSH)も二付加体を生成した。またRESキノンは、牛血清アルブミン(BSA)およびSH基を保護したNEM-BSAに付加体を形成した。BSAではチオール基がNEM-BSAではアミノ基が反応に寄与したものと推測される。

RESのチロシナーゼによる酸化体がプロオキシダント活性をもつかどうかを調べた。RESオリゴマーは、GSHを60分で50%減少し、GSSGに酸化させた。RDオリゴマーはGSHを90%減少させた。

## 6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

RDを含めた白斑誘導性4-置換フェノール類に共通するチロシナーゼによる代謝活性化を細胞で評価する方法を検討した。代謝で生成する

オルトキノンは高い毒性が予想されることから、チロシナーゼによる細胞毒性増強の評価を検討した。白斑誘導性4-置換フェノール類(RDやモノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)、4-terp-ブチルフェノール(4-TBP)、4SCAPなど)について、チロシナーゼ発現の高いメラノーマ細胞B16BL6をメラノサイトの代替として検証した。4SCAPの細胞毒性はチロシナーゼを阻害剤チオウレア処理、あるいはsiRNAノックダウンで顕著に抑制され、チロシナーゼ誘導剤diBcAMP処理で増強された。しかしながら、RDや4-TBP、MBEHではチロシナーゼによる細胞毒性増強は認められなかった。この結果は、ヒトチロシナーゼ発現293T細胞の場合と一致する。

そこで、チロシナーゼによる代謝活性化を代謝物の直接測定により評価した。ヒトチロシナーゼを一過性に発現した283T細胞を用いると、RDおよび4SCAPどちらの場合にも2時間曝露により、グルタチオン・システイン付加体の濃度依存的な産生と培地への放出が観察された。

一方、チロシナーゼ発現により、内因性のチロシンも効率良くドーパキノンに転換され、タンパク・非タンパク性SH付加体・メラニンが大量に産生されることが判明した。48時間後にはグルタチオン・細胞生存率が低下していた。4SCAPでは2時間で細胞生存率低下が認められるのに対し、RDは内因性チロシン由来代謝物の産生を抑制しており、むしろ細胞生存率低下・グルタチオン低下を抑制する効果を示すことが判明した。

## D. 考察

### 1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

RDの添加によりメラノサイトにおけるGCLCの発現が上昇することはこれまでに報告されている。難治例ではGCLCが十分に産生されず、グルタチオンが十分に供給されないこと、また、Eカドヘリンの増加によりメラノサイトの遊走性が低下することが難治化の一因と考えた。

RD誘発性脱色素斑難治例において、肥満細

胞の脱顆粒が増えていることを明らかにした。肥満細胞から脱顆粒により分泌されるヒスタミンは通常メラノサイトにおけるメラニン合成を促進することが報告されている。脱顆粒率の高さが RD 誘発性脱色素斑の難治化における原因なのか、結果なのかはさらなる検討が必要である。

## 2. 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析[片山]

RD 誘発白斑では今まで知られている細胞毒性やメラノサイトの機能異常以外に表皮角化細胞の異常が関与する可能性が示唆された。

RD 誘発白斑患者では尋常性白斑患者に認められる自己免疫性甲状腺炎などの背景因子は薄いことが考えられた。また白斑発症に自己抗体が関与する可能性が尋常性白斑より低い可能性が考えられた。

## 3. ロドデノール誘発性脱色素斑における色素再生を促す活性型ビタミン D3 の作用機序の解析 [鈴木]

RD 白斑の色素再生が十分に起こっていない患者においては、VitD3 軟膏外用と紫外線照射の併用療法が有効である可能性が示された。しかしながら、その軟膏塗布量や紫外線照射量については今後の検討課題である。

RD 白斑患者における色素再生部位のまだら状態の白斑部については、メラノサイトは遊走しており、チロシナーゼの発現も認められたことから、酵素を活性化することができれば、治療に応用できる可能性がある。

VitD3 が RD 白斑部における色素再生を更新させることを明らかにし、さらにその分子機序を解析した。その結果、VitD3 によって誘導される遺伝子 A は、メラニン合成を更新しているキー遺伝子の 1 つであることが示唆された。今後はさらにその詳細な機序を明らかにしていく。

## 4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋

山]

白斑症例の原因物質として報告がある 4-置換フェノール類のチロシナーゼによる代謝を、ヒトチロシナーゼを用いて *in vitro* で評価することに成功した。ヒトチロシナーゼと従来用いられたマッシュルームチロシナーゼとの間には、阻害剤の特異性に違いがあることが最近報告されており、安全性評価にもヒトチロシナーゼの利用が必要と考えられる。

チロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化は RD や白斑誘導性 4-置換フェノール類に共通する応答である。23 種の 4 置換フェノールを基質としてチロシナーゼ依存的にシステインペプチドと結合するか *in vitro* での検討を行った。水酸基のパラ位に結合する炭素が 1 級または 2 級の化合物は全て結合ペプチドを生成した。ベンゼン環に結合する炭素が 3 級、4 級またはベンゼン環である化合物は、検討した条件ではチロシナーゼによる酸化が起こらなかった。水酸基のパラ位に結合する元素が酸素又はイオウの場合、その元素に結合する炭素鎖の長さが 1 又は 2 の化合物は酸化が起きず、3 以上の化合物は結合ペプチドを生成した。以上の結果から、置換基全体の大きさとベンゼン環に結合した原子に属する電子の状態がチロシナーゼの活性部位と複雑に相互作用していることが示唆された。

## 5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

RD はチロシナーゼにより酸化されて、細胞傷害性の高いオルトキノンを産生する。オルトキノンは極めて高い反応性を持ち、グルタチオン、システインなどの非タンパク性 SH 化合物のみならず、タンパク中のシステイン残基とも反応し、付加体を形成する。これが RD によるメラノサイト傷害性の主要な機序と考えられる。しかし、RD の酸化により生成する RD-EM にも強い酸化促進作用があり、これが UVA により増強されることを明らかにすることができた。これは、RD による白斑発症が塗布部に多いこと、夏季に顕著である臨床所見に一致する。

RESは4-置換フェノール構造を有しており、チロシナーゼにより酸化されてオルトキノンを生産した。オルトキンは極めて高い反応性を持ち、グルタチオン、システインなどの非タンパク性SH化合物のみならず、タンパク中のシステイン残基とも反応し、付加体を形成した。RESがメラニン産生細胞に対して細胞障害性をもつか否かは明確には示されていないが、我々の先行研究(Okuraら、J Dermatol Sci, 2015)では、B16メラノーマ細胞およびヒトメラノサイトに対してIC50値が30 $\mu$ M程度の強い増殖抑制を示している。また、RESオリゴマーはRDオリゴマーほどではないが、プロオキシダント活性をもつことも興味深い。

## 6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

白斑誘導性フェノール類に共通して認められるチロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化は、毒性の増強をもたらすと予想される。B16BL6メラノーマ細胞では、チロシナーゼ依存の細胞毒性増強が予想通り観察されたのは4SCAPのみで、RD、4-TBP、MBEHでは認められなかった。これは、昨期のヒトメラノサイト発現293T細胞等での結果と一致しており、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化は必ずしも細胞毒性をもたらさず、細胞毒性を評価指標にできないことを示している。

そこでチロシナーゼによるオルトキノンへの代謝活性化を代謝物解析により測定する方法を検討した。ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞では、オルトキノン、システイン・グルタチオン付加体の検出は、RDや4SCAPの2時間曝露により可能であった。

オルトキノン体は細胞内SHプールの枯渇、自身や代謝物のROS産生による毒性発現が予想されてきた。実際、4SCAPや内因性チロシンのオルトキノン体生成はグルタチオン・細胞生存率を低下させた。しかしながら、RDは自身のSH付加体を産生する一方で、内因性チロシン代謝を阻害し、グルタチオン・細胞生存率低下をむしろ抑制した。したがって、RDがチロシナーゼに依存した毒性を発現しない原因が明らかになり、毒性評価ではなく、

付加体測定の有用性が示された。最近、各種フェノール類の白斑誘導能は細胞毒性ではなく、SH枯渇能および免疫原性と関連することが報告されている。

細胞を用いた代謝解析法では、*in vitro*で評価可能な化合物のチロシナーゼへの親和性に加え、内因性基質(チロシン)との競合、化合物の細胞への取り込み速度の差を示唆する結果が得られた。今後、多様な4-置換フェノール類につき白斑誘導能との相関を検討予定である。

## E. 結論

RD白斑において、脱色素斑の難治化にメラノサイトのグルタミルシステイン合成酵素発現の個体差、肥満細胞の脱顆粒が関わる可能性が示された。白斑病変部表皮角化細胞の接着に関わるgpNMBの低下が白斑に関与する可能性、RD誘発白斑では患者の自己免疫的背景は尋常性白斑より少なく、白斑発症にも自己免疫の関与がやや薄い可能性が示された。またモデルマウスで白斑部色素再生へのVitD3と紫外線照射の効果が明らかになり、機序に関わる候補遺伝子を見出した。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、各種4-置換フェノール類の構造とチロシナーゼによる代謝活性化との関係、RESやRDメラニンの酸化促進作用を*in vitro*で解明した。またヒトチロシナーゼの*in vitro*および細胞モデルでの利用を可能にした。代謝活性化の評価には、細胞毒性ではなく、細胞を用いたSH付加体産生の評価が有用であることを示した。さらなる解析を進め、新たな健康被害防止につなげる予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takeuchi Y, Tanemura A, Tada Y, Katayama I, Kumanogoh A, Nishikawa H. Clinical response to PD-1 blockade correlates with a sub-fraction of pe-

- ripheral central memory CD4<sup>+</sup> T cells in patients with malignant melanoma. *Int Immunol*. 2017, in press
- Yamaga K, Murota H, Tamura A, Miyata H, Ohmi M, Kikuta J, Ishii M, Tsukita S, Katayama I. Claudin-3 loss causes leakage of sweat from the sweat gland to contribute to the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2017, in press
- Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Hasegawa J, Yoshimori T, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I. Dysregulation of autophagy in melanocytes contributes to hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex. *J Dermatol Sci*. 2017, in press
- Yang F, Yang L, Wataya-Kaneda M, Yoshimura T, Tanemura A, Katayama I. Uncoupling of ER/mitochondrial oxidative stress in mTORC1 hyperactivation-associated skin hypopigmentation. *J Invest Dermatol*. 2017, in press
- Murota H, Lingli Y, Katayama I. Periostin in the pathogenesis of skin diseases. *Cell Mol Life Sci*. 74:4321-4328, 2017
- Murota H, Azukizawa H, Katayama I. Impact of Jumihaidokuto (Shi-Wei-Bai-Du-Tang) on treatment of chronic spontaneous urticaria: A randomized controlled study. *Chin J Integr Med*. 2017, in press
- Kurata R, Futaki S, Nakano I, Fujita F, Tanemura A, Murota H, Katayama I, Okada F, Sekiguchi K. Three-dimensional cell shapes and arrangements in human sweat glands as revealed by whole-mount immunostaining. *PLoS One*. 12:e0178709, 2017
- Nakagami H, Yamaoka T, Hayashi M, Tanemura A, Takeya Y, Kurinami H, Sugimoto K, Nakamura A, Tomono K, Tamai K, Katayama I, Rakugi H, Kaneda Y. Physician-initiated first-in-human clinical study using a novel angiogenic
- Itoi-Ochi S, Hayashi M, Yamaoka T, Kobayashi Y, Isei T, Shirasaka T, Katayama I. Occult HIV infection in Japanese rupioid psoriasis. *J Dermatol*. 44:e172-e173, 2017
- Arase N, Tanimura K, Jin H, Yamaoka T, Kishibe M, Nishioka M, Kiyohara E, Tani M, Matsuoka S, Ohmura K, Takasugi K, Yamamoto T, Murota H, Arase H, Katayama I. Novel autoantibody against the  $\beta$ 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers. *Br J Dermatol*. 178:272-275, 2018
- Kato K, Kawase A, Azukizawa H, Hanafusa T, Nakagawa Y, Murota H, Sakaguchi S, Asada H, Katayama I. Novel interferon- $\gamma$  enzyme-linked immunoSpot assay using activated cells for identifying hypersensitivity-inducing drug culprits. *J Dermatol Sci*. 86:222-229, 2017
- Kamei R, Yamaoka T, Ikinaga K, Murota H, Shimizu K, Katayama I. Successful treatment of a refractory dysbiotic intestinal pseudo-obstruction in a patient with systemic sclerosis-polymyositis overlap syndrome by intravenous immunoglobulin administration possibly related to gut flora normalisation. *Clin Exp Rheumatol*. 35 Suppl 106:214-215, 2017
- Kaneko S, Murota H, Murata S, Katayama I, Morita E. Usefulness of Sweat Management for Patients with Adult Atopic Dermatitis, regardless of Sweat Allergy: A Pilot Study. *Biomed Res Int*. 2017:8746745, 2017
- Katayama I, Aihara M, Ohya Y, Saeki H, Shimojo N, Shoji S, Taniguchi M, Yamada H; Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for atopic dermatitis 2017. *Allergol Int*. 66:230-247, 2017
- Katayama I, Izuhara K. Itch: Its perception and involvement in allergy. *Allergol Int*. 66:1-2, 2017
- Yamaoka T, Hayashi M, Tani M, Katayama I. Value of ultrasonography findings for nail psoriasis before and after adalimumab administration. *Clin Exp Dermatol*. 42:201-203, 2017
- Gan EY, Eleftheriadou V, Esmat S, Hamzavi I, Passeron T, Böhm M, Anbar T, Goh BK, Lan CE, Lui H, Ramam M, Raboobee N, Katayama I, Suzuki T, Parsad D, Seth V, Lim HW, van Geel N, Mulekar S, Harris J, Wittal R, Benzekri L, Gauthier Y, Kumarasinghe P, Thng ST, Silva de Castro CC, Abdallah M, Vrijman C, Bekkenk M, Seneschal J, Pandya AG, Ezzedine K, Picardo M, Taïeb A. VGICC Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res*. 30:28-40, 2017
- Murota H, Katayama I. Exacerbating factors of itch in atopic dermatitis. *Allergol Int*. 66:8-13, 2017



- Wataya-Kaneda M, Nakamura A, Tanaka M, Hayashi M, Matsumoto S, Yamamoto K, Katayama I. Efficacy and Safety of Topical Sirolimus Therapy for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 153:39-48, 2017
- Deguchi A, Yamaoka T, Komurasaki Y, Hayashi M, Kiyohara E, Murota H, Katayama I. Anti-RNA polymerase III antibody positive limited cutaneous systemic sclerosis with cryoglobulin-induced digital gangrene. *Clin Exp Dermatol.* 42:200-201, 2017
- Katayama I. Abberant Sudomotor Functions in Sjögren's Syndrome: Comparable Study with Atopic Dermatitis on Dry Skin Manifestation. *Curr Probl Dermatol.* 51:62-74, 2016
- Takahashi A, Tani S, Murota H, Katayama I. Histamine Modulates Sweating and Affects Clinical Manifestations of Atopic Dermatitis. *Curr Probl Dermatol.* 51:50-6, 2016
- Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat Microbiol.* 1:16054, 2016
- Tanaka A, Ikinaga K, Kiyohara E, Tanemura A, Wataya-Kaneda M, Fujimura R, Mizui M, Isaka Y, Katayama I. Critical renal adverse event induced by nivolumab therapy in a stage IV melanoma patient. *J Dermatol.* 44:727-728, 2017
- Hemmi A, et al.: Waardenburg syndrome type IIE in a Japanese patient caused by a novel non-frame-shift duplication mutation in the SOX10 gene. *J Dermatol* on line published, 2017, doi: 10.1111/1346-8138.14151.
- Omura R, et al: Ultrastructural study of dyschromatosis symmetrica hereditaria with widespread pigmentary eruption. *J Dermatol* 44:150-151, 2017
- Okamura K, et al: Microsatellite polymorphism located immediately upstream of the phosphatidylinositol glycan, class K gene (PIGK) affects its expression, which correlates with tyrosinase activity in human melanocytes. *J Dermatol Sci.* 85(2):131-134, 2017
- Gan EY, et al: Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30(1):28-40, 2017
- Hayashi M, et al: Spectrophotometer is useful for assessing vitiligo and chemical leukoderma severity by quantifying color difference with surrounding normally pigmented skin. *Skin Res Technol.* on line published, 2017, doi: 10.1111/srt.12410.
- Ozaki S, et al: Melanotic Malignant Melanoma in Oculocutaneous Albinism Type 4. *Acta Derm Venereol.* 97: 287-288, 2017
- Ito S, Okura M, Wakamatsu K, Yamatshita T. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 30, 63-67, 2017.
- Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 552, 2018. DOI: 10.3390/ijms19020532.
- Shimizu Y, Kohyama M, Yorifuji H, Jin H, Arase N, Suenaga T, Arase H. FcγRIIIA-mediated activation of NK cells by IgG heavy chain complexed with MHC class II molecules. *Int Immunol.* 2019, in press
- Yorifuji H, Arase N, Kohyama M, Hirano T, Suenaga T, Kumanogoh A, Arase H. Transport of cellular misfolded proteins to the cell surface by HLA-B27 free heavy chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019, 511(4):862-868, 2019
- Arase N, Tanemura A, Jin H, Nishioka M, Aoyama Y, Oiso N, Matsunaga K, Suzuki T, Nishigori C, Kawamura T, Shimizu T, Ito A, Fukai K, Abe Y, Yang L, Tsuruta D, Takeoka K, Iwatani Y, Hidaka Y, Nishida M, Yamauchi-Takahara K, Arase H, Fujimoto M, Katayama I. Autoantibodies detected in patients with vitiligo vulgaris but not in those with rhododendrol-induced leukoderma. Submitted.
- Masaki T, Nakano E, Okamura K, Ono R, Sugawara K, Lee MH, Suzuki T, Nishigori C.: A case of xeroderma pigmentosum complementation group C with diverse clinical features. *Br J Dermatol.* 2018 Jan 12. (2018)

- Okamura K, Hayashi M, Nakajima O, Kono M, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T.: A 4-bp deletion promoter variant (rs984225803) is associated with mild OCA4 among Japanese patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(1):79-84. (2018)
- Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.: Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target lesion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(2):315-319. (2018)
- Tsutsumi R, Sugita K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O: Leukoderma induced by rhododendrol is different from leukoderma of vitiligo in pathogenesis: A novel comparative morphological study. *J Cutan Pathol.* 46(2):123-129. (2019)
- Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K. The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31, 523-528, 2018. Doi: 10.1111/pcmr.12969.
- Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int J Mol Sci.* 19, E552, 2018. Doi: 10.3390/ijms19020532.
- Goto N, Tsujimoto M, Nagai H, Masaki T, Ito S, Wakamatsu K, Nishigori C. 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol)-induced melanocyte cytotoxicity is enhanced by UVB exposure through generation of oxidative stress. *Exp Dermatol.* 27, 754-762, 2018. Doi: 10.1111/exd.13555.
- Ito S, Fujiki Y, Matsui N, Ojika M, Wakamatsu K. Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive ortho-quinone: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell Melanoma Res.*, in revision.
2. 学会発表
- Yasuda M, Kishi C, Toki S, et al. A comparison of the immunohistochemical analyses of rhododendrol-induced leukoderma between improved and aggravated case. The 1st meeting of Japanese Society for Vitiligo, March 9th 2018, Osaka.
- Takahashi A, Yang F, Yang L, Arase N, Tanemura A, Kaneda M, Arunasiri Iddamalgoda, Inoue S, Katayama I: Absent Glycoprotein Non-metastatic B / Osteoactivin (GPNMB) expression by the lesional basal keratinocytes in vitiligo. The 42st Annual Meeting of the JSID in Kochi (2017.12.15-17)
- Hayashi M, et al.: Application of melanin index and L\*a\*b\* color space for the evaluation of vitiligo and chemical leukoderma. The 23rd International Pigment Cell and melanoma research conference, Denver August 2017
- Abe Y, et al.: Analysis of repigmentation in vitiligo using the mouse model with Rhododendrol-induced leukoderma (RIL). The 23rd International Pigment Cell and melanoma research conference, Denver August 2017
- Okamura K, et al.: Melanin analysis for hair samples from Japanese patients with Herman-sky-Pudlak Syndrome type 1, 4, 6, and 9. The 23rd International Pigment Cell and melanoma research conference, Denver August 2017
- Hemmi A, et al.: Waardenburg Syndrom Type II E in a Japanese Patient Caused by a Novel Non-frameshift Duplication Mutation in the SOX10 Gene. The 23rd International Pigment Cell Conference, Denver August 2017
- Abe Y, Hozumi Y, Okamura K, Suzuki T: Analysis of repigmentation in the mouse model of Rhododendrol-induced leukoderma (RIL). 第42回日本研究皮膚科学会, 高知; 2017年12月
- 鈴木民夫: シンポジウム3 白斑の治療 白斑の治療について: 白斑モデルマウスでの結果を含めて. 第33回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会, 神戸; 2017年4月
- 鈴木民夫, 阿部優子, 穂積豊: 教育講演31 白斑の病態と治療 up to date ロドデノール誘発性脱色素斑の解析: 白斑の動物モデル. 第116回日本皮膚科学会総会, 仙台; 2017年6月.
- 伊藤祥輔, 若松一雅. ロドデノールユーメラニンの強い酸化促進作用は紫外線 A 照射により増強される. 第1回日本白斑学会. 平成30年3月9日. 大阪.
- 荒瀬規子 金田真理 室田浩之 中川幸延 山岡

俊文 平安恒幸 荒瀬 尚  
片山 一朗:大阪大学皮膚科における皮膚肥満細胞増多症16症例の解析. 第117回日本皮膚科学会総会 広島 (2018.5.31-6.3)

前川 亜耶 荒瀬 規子 清原 英司 玉井 克人 片山 一朗 金田 眞理:壮年期に肺機能障害を伴い皮疹が悪化した表皮融解性魚鱗癬に関する考察. 旭川 (2018.10.6-2018.10.7)

Hideki Tsuji, Koichiro Ohmura, Shuhei Sakakibara, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Hitoshi Kikutani, Tsuneyo Mimori, Hisashi Arase. Recognition of DNA/HLA-class II complex by anti-DNA antibodies from SLE patients. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Hui Hin, Noriko Arase, Masako Kohyama, Tadahiro Suenaga, Takehiko Sasazuki, Hisashi Arase. TSHR-stimulating autoantibody production by TSHR/MHC class II complexes. 第47回日本免疫学会学術集会 (2018.12.10-12.12)

Multiple MC1R variants associated with extensive freckles and red hair found in a Mongolian family.

Tamio Suzuki , et al. : International Investigative Dermatology 2018, Rosen Shingle Creek Resort, Orlando, Florida, May 16-19, 2018

Hereditary hypopigmentary disorders: a better understanding from a genetic view. Tamio Suzuki: 5th Eastern Asia Dermatology Congress, Dianchi International Convention & Exhibition Center, Kunming, China. June 20-23, 2018

Chemical vitiligo: instructive evidence that we have learned from Rhododenol-induced leukoderma. Tamio Suzuki: The 70th KDA Annual Autumn Meeting Seoul COEX Intercontinental Hotel, Seoul. Korea, October 20-21, 2018

鈴木 民夫:第 117 回日本皮膚科学会総会学術大会 EL2:白斑の up to date「日本白斑学会設立の経緯と目指すところ」、リーガロイヤルホテル広島、広島市、2018 年 5 月 31 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得、2. 実用新案登録、3. その他  
なし