

**厚生労働科学研究費補助金**

**医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス  
政策研究事業**

**機能性化粧品成分の個体差等に基づく  
安全性評価法の策定に関する研究**

**平成27年度 総括・分担研究報告書**

**(H27-医薬-指定-008)**

**研究代表者 最上 知子**

**平成28年3月**

## 目 次

・ 総括研究報告	
機能性化粧品成分の個体差等に基づく安全性評価法の 策定に関する研究	
	最上 知子 . . . . . 1
・ 分担研究報告	
1 . 臨床からの原因究明(I)	
	石川 治 . . . . . 7
2 . 臨床からの原因究明(II)	
	片山 一朗 . . . . . 9
3 . 臨床からの原因究明(III)	
	鈴木 民夫 . . . . . 13
4 . 基礎からの原因究明と安全性評価法の構築(I)	
	最上 知子 . . . . . 17
5 . 基礎からの原因究明と安全性評価法の構築(II)	
	秋山 卓美 . . . . . 23
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	. . . . . 33
・ 研究成果の刊行物・別刷	

## 機能性化粧品成分の個体差等に基づく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 部長

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症に関しては、白斑病変部での表皮メラノサイトの消失やロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性増強が報告され、代謝を介するメラノサイト傷害機序が提唱されている。本研究では、基礎・臨床からの発症機序の解明を進め、白斑発症や個体差に重大な因子を明らかにし、試験方法を検討することにより、新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざす。

ロドデノール誘発性白斑の病態・発症機序は未だ明らかでは無い。症例の多くは改善したが、拡大・難治性白斑が見いだされている。本研究において、患者および正常人皮膚の解析により、難治性白斑病変部でグルタチオン合成酵素の発現が有意に低下することが判明した。また、ロドデノールがメラノサイトのオートファジー経路に影響を及ぼすこと、患者皮膚組織の解析より形態的に尋常性白斑と異なるメラノサイト異常、患者末梢血中のリンパ球の異常を明らかにしており、これらは発症機序やロドデノールの個体による影響の違いを説明する一助となると考えられる。また、日本人モデルマウスを用いてロドデノール誘発性脱色素斑を再現し、紫外線の色素再生効果や発症機序解析への有用性を示した。

安全性評価については、ロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化を、システイン含有ペプチドとの結合により測定評価する方法、ならびにチロシナーゼ依存の細胞毒性として評価する方法について検討を行った。引き続き条件の至適化や、発症機序解明の成果を取り入れて試験系の改良を進め、化粧品成分・医薬部外品による新たな健康被害防止につなげる予定である。

### 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  
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

### 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  
岩月啓氏 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学教授

濱田利久 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚科学講師  
伊藤祥輔 藤田保健衛生大学医療化学部名誉教授

### A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症の原因に関しては、平成 25-26 年度の厚生労働科学研究「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」(研究代表者:川西 徹)のほか、複数の研究組織から、白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失が報告され、ロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性の増強やそれに由来するメラノサイト傷害の機序が提唱されている。しかし、白斑は使用

者の一部にのみ発生し、患者の多くは使用中止により症状の改善がみられるものの、使用中止後も白斑の拡大や新生がみられる難治性白斑を呈することがあり、病態形成機序は未だ不明である。免疫学的な発症機構も想定されている。

本研究では、基礎・臨床からの原因究明をさらに進める。患者から採取された病変部検体、難治性白斑を呈する患者の検体、尋常性白斑検体、正常人検体を用い、免疫組織学・細胞生物学的、分子機構について解析し、白斑症状の進行の個体差や病態、発症原因を明らかにすることを目的とする。また日本人皮膚モデルマウスによるロドデノール誘発性脱色素斑モデルを用い、発症機序の解明と有効な治療法の確立を行う。

白斑の発症にはロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化とメラノサイトの傷害/応答の関与が強く示唆される。しかしながら、様々な由来のメラノサイトはロドデノールに対する感受性に大きな差異があることが報告されている。本研究ではメラノサイト代替の細胞モデルを調製し、チロシナーゼ依存細胞毒性評価の方法を検討する。またチロシナーゼ代謝により生じるオルトキノン高反応性が高く、細胞内のチオール基と結合し、毒性や抗原性の発現に関わることが予想される。そこで代謝活性化とチオール基の修飾を、感作代替試験 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 用システイン含有ペプチドとの結合により測定する方法を検討する。ロドデノール類似化合物の白斑誘導能との関係を明らかにし、新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざす。

## B. 研究方法

### 1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症例ならびに尋常性白斑患者の病変部皮膚、健常人の正常皮膚を組織学的に比較解析した。また皮膚片より培養色素細胞と表皮角化細胞を調製・培養し、細胞生物学・分子生物学的に解析した。(倫理面への配慮)本研究は「世界医師会ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守する。

収集データに個人情報を含めず、試料と共に各研究実施機関で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、個人情報は送られない。

### 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]

培養メラノサイトへのロドデノールの分子学的な影響を測定すると同時に患者皮膚生検サンプルや血液を用いてメラノサイトやリンパ球サブセット、自己抗体を解析した。(倫理面への配慮)ロドデノール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 13421-2 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た。

### 3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

日本人モデルマウスは、國貞隆弘博士(岐阜大教授)との共同研究により作成した hk14-SCF Tg マウスで、体幹の色素沈着が日本人に近い系統を選択しヘアレス化した。皮膚色は日本人に近く、表皮基底層メラノサイト数はヒト表皮にとほぼ同様である。本マウスを使用してロドデノール誘発性脱色素斑の再現実験を行い、効率的に脱色素斑を発症する条件を確立し、続いて発症機序解明と治療法の開発を行った。(倫理面への配慮)本研究は山形大学医学部動物実験委員会により承認された。

### 4. 安全性評価:細胞評価法の構築[最上]

ロドデノールおよび類似物質のチロシナーゼ代謝による毒性増強と白斑誘導との関係検討のため B16 メラノーマ細胞のチロシナーゼを diBucAMP 処理で誘導、siRNA ノックダウン、阻害剤フェニルチオウレア処理により変え、あるいは HEK293 細胞にヒトチロシナーゼを強制発現し、ロドデノール類似化合物の細胞毒性に及ぼす影響を検討した。

### 5. 安全性評価:代謝活性化評価法の構築[秋

山]

ロドデノールはマッシュルームチロシナーゼと共に、ロドデノールおよび raspberry ketone のカテコール体は単独で、システイン含有ペプチドとインキュベーションし、生成する付加体を HPLC および LC/MS で分析した。ペプチドは OECD 感作性試験代替法 Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) で使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys)を用いた。別途、チロシナーゼ共存下でのロドデノールのペプチド付加反応を大スケールで行い、生成物を HPLC で生成し、標準品を作成した。

### C. 研究結果

#### 1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

これまでの研究で、ロドデノールによるメラノサイト傷害性にグルタチオンによる抗酸化作用が関与することが示唆されている。そこでグルタチオン合成酵素(GCLC)について免疫組織学的に解析した。難治性白斑病変部 5 例と正常皮膚 8 例に対し、抗 GCLC 抗体、抗 MART-1 抗体で染色し、MART-1あたりの GCLC シグナルを定量した。その結果、病変部 0.623、正常皮膚 1.17(P=0.018)で、病変部において有意に GCLC の発現が低下していた。

#### 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]

本研究ではロドデノールによりメラノサイトのオートファジー経路が活性化すること、逆にオートファジーが抑制された状態で細胞死を誘導しやすい事を明らかにした。さらに患者皮膚組織の解析より形態的なメラノサイト異常・メラニンの滴落を見いだした。また患者末梢血中のリンパ球の異常を見出した。

#### 3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

日本人皮膚モデルマウス背部にロドデノール溶液を外用すると、2 週間後には脱色素斑が生じた。脱色素斑はまだら様で、メラニンの消失、

表皮基底層のメラノサイトの減少・消失が認められ、患者所見とほぼ同様であった。メラノサイトの減少・消失はロドデノール塗布 7 日目には認められた。本モデルでチロシナーゼ活性がないアルビノマウスでは、表皮メラノサイトの減少は認められず、チロシナーゼ依存性の作用が in vivo の系で明らかにされた。治療法を検証し、タクロリムス軟膏をロドデノール脱色素斑部に外用したが、7 週間で対照のワセリン外用部位にも順調な色素再生が認められ、効果は確認できなかった。紫外線 UVB 照射により色素再生がより増強されていることが確認できた。

#### 4. 安全性評価:細胞評価法の構築[最上]

白斑誘導性フェノール類(ロドデノールやモノベンジルエーテルヒドロキノン、4-ter-ブチルフェノールなど)は共通してチロシナーゼにより代謝活性化される。メラノサイト/メラノーマ細胞特異的傷害による白斑誘導が推定され、その解明のため、チロシナーゼ依存的細胞毒性の評価方法を検討した。個体差の大きいヒトメラノサイトの代替として用いた B16 メラノーマ細胞では、チロシナーゼ発現量を cAMP で発現誘導、フェニルチオウレア阻害、siRNA ノックダウンし変化させたが、白斑誘導性フェノール類による細胞毒性にチロシナーゼ依存性は観察されなかった。そこで HEK293T 細胞にヒトチロシナーゼを高発現したが、内在性のチロシンが代謝され顕著な毒性を発現し、評価の支障となることが判明した。

#### 5. 安全性評価:代謝活性化評価法の構築[秋山]

ロドデノールがチロシナーゼにより代謝され、生じたオルトキノンが細胞内のチオール基と結合する反応と白斑誘導との関連が想定されている。ロドデノールの代謝活性化とチオールの修飾を、感作試験 Direct Peptide Reactivity Assay 用システイン含有ペプチドとの結合により測定する方法を検討した。ロドデノールおよび raspberry ketone の代謝物カテコール体は混合により、ロド

デノールはマッシュルームチロシナーゼとの反応によりペプチドのシステイン基と反応することをマススペクトルで確認し、HPLC で定量した。

## D. 考察

### 1. 患者由来組織/細胞を用いた原因究明[石川]

GCLC の発現低下は、グルタチオン合成能の低下を意味する。これがロドデノールによって生じた結果なのか、難治性白斑を生じる原因なのか現時点では不明である。今後さらに症例を蓄積し、その詳細を明らかにしていきたい。また、その他の因子についても検討を続ける予定である。

### 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]

ロドデノール誘発白斑では今まで知られている細胞毒性以外にメラノサイトのオートファジーの状態が関与する事が考えられた。また、通常の尋常性白斑と異なるメラノサイト異常や免疫学的な機構の関与が疑われた。

### 3. 日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究[鈴木]

ロドデノール誘発性脱色素斑のモデルマウスを作製した。ロドデノール外用により、表皮のメラノサイトが減少・消失しており、患者の皮膚で認められた変化と同様な所見を得ることができた。有効な治療法の開発については、今回はタクロリムス軟膏の外用と紫外線照射による色素再生効果を調べた。前者の効果は確認できなかったが、紫外線(UVB)の効果については確認できた。今後も、他の治療法の効果について検証することが可能である。

### 4. 安全性評価:細胞評価法の構築[最上]

白斑誘導性フェノール類に共通するメラノサイト傷害の機構として、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化と毒性発現が想定されている。新規美白剤の安全性評価には、個体差の大きいヒトメラノサイトに代替する細胞モデルが必要とされる。活性代謝物オルトキノン体の毒性発現には ROS

産生や SH プールの減少・タンパク修飾などが、毒性防御には細胞内のレドックス系やグルタチオンプール等が関わることが予測され、両システムのバランスが細胞による応答の違いをもたらすと推定される。引き続き、ヒトチロシナーゼ強制発現細胞に、防御系遺伝子を共発現するなど改良を試み、高感受性メラノサイトの代替となる細胞モデルの調製、細胞毒性以外のエンドポイントの選定を行う。

### 5. 安全性評価:代謝活性化評価法の構築[秋山]

ロドデノールがチロシナーゼ代謝され生じるオルトキノン体は反応性が高く、SH 基との結合は Ito により実証された。グルタチオンとの結合は保護的に働く一方、システインと RD フェオメラニンを生成し、またタンパク質システイン残基との結合はタンパク機能障害や抗原性発現の可能性がある。白斑誘導能との関係解明のため、チロシナーゼ、SH 基供与体、被検物質の 3 者による試験管内反応を検討した。SH 基供与体として OECD 感作性試験代替法 TG442C Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) において使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys)を用いた。物性・分析法が明確で供給体制が十分であるためである。引き続き試験条件を至適化し、ロドデノール類似化合物の白斑誘導能との関係を明らかにする。

## E. 結論

ロドデノール白斑の発症機序解明と美白成分の安全性評価法構築を目指し、実際の症例におけるグルタチオン合成酵素の低下、ロドデノールの個体による影響の違いに関与すると考えられる分子機構・免疫異常を明らかにし、治療法や発症機序解明に有用なロドデノール脱色素斑モデルマウスを作成した。また、白斑発症と関連が強く示唆されるロドデノールのチロシナーゼによる代謝活性化を、システイン含有ペプチドとの結合により測定、ならびにチロシナーゼ依存の細胞毒性として評価する方法を検討した。発症機序解明の成果を取り入れ改良を進め、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

最上(西巻)知子. 化学物質による白斑 - 職業性白斑の機序とロドデノール白斑 - . *Bull Natl Inst Health Sci.* 2015; 133, 13-20

Tanimura, K., Jin, H, Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier, L. L., Atsumi, T., Yamada, H. and Arase, H.: 2015.  $\beta$ 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood.* 125: 2835-2844.

Eleftheriadou V, Thomas K, van Geel N, Hamzavi I, Lim H, Suzuki T, Katayama I, et al.: Vitiligo Global Issues Consensus Group: Developing core outcome set for vitiligo clinical trials: international e-Delphi consensus. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015; 28(3): 363-9.

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I: 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: Insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci.* 2015; 77(3): 182-5.

Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I: An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients. *J Der-*

*matol Sci.* 2015; 77(3): 185-8.

Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I : Possible involvement of CCR4+CD8+ T cells and elevated serum CCL22 and CCL17 in Patients with Rhododendrol-induced Leukoderma. *J Dermatol Sci.* 2015; 77(3): 188-90.

Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kago-hashii Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K: Guide for medical professionals (i.e., dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol.* 2015; 42(2): 113-28.

Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang L, Yang F, Tsuruta D, Nakamura A, Matsumoto S, Hamasaki T, Tanemura A, Katayama I: Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberculous Sclerosis Complex. *JAMA Dermatol.* 2015; 151(7): 722-30.

Matsumura S, Terao M, Murota H, Katayama I : Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2015; 78(3): 215-23.

Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ : NUA2 Amplification Coupled with PTEN Deficiency Promotes Melanoma Development via CDK Activation. *Cancer Res.* 2015; 75(13): 2708-15.

Tanaka M, Yang L, Wataya-Kaneda M, Suzuki T, Okamura K, Hozumi Y, Yang F, Katayama I : Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 in a Japanese infant. *J Dermatol.* 2015; 42(9): 906-7.

ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会, 伊藤 明子, 青山 裕美, 鈴木 加余子, 鈴木 民夫, 種村 篤, 錦織 千佳子, 伊藤 雅章, 片山 一郎, 伊藤 祥輔, 大磯 直毅, 深井 和吉, 船坂 陽子, 山下 利春, 松永 佳世子: ロドデノール誘発性脱色素斑症例における三次全国疫学調査結果. *日本皮膚科学会雑誌* 2015; 125No. 13.

## 2. 学会発表

Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I. Silencing of tuberous sclerosis complex (TSC) 2 via siRNA causes reduction of autophagy and impairment of melanogenesis in cultured human skin epidermal melanocytes: implication for a potential mechanism of hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex: 2015 World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada (2015. 6.8-6.13)

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in hypopigmented macules in patients with tuberous sclerosis complex: The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (2015.12.11-13)

Yang F, Yang L, Tanemura A, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Katayama I : Dynamic visualization of dendritic cells in the skin from patients with vitiligo or rhododendrol-induced leukoderma: 14th International Workshop on Langerhans Cells (2015.11.7 京都)

Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, Suzuki T: Immunohistopathological analysis of frizzled-4-positive immature melanocytes from hair

follicles of patients with Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci* 80: 156-158, (2015).

Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T: Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci*. 81(1):35-43 (2016)

阿部優子、鈴木民夫 教育講演「白斑:ロドデノール誘発性脱色素斑 up to date!」病態解明その3 動物モデルからわかったこと第 114 回日本皮膚科学会総会 横浜 2015.5.29-31

Okamura K, Abe Y, Yoshizawa J, Ohe R, Yamakawa M, Hozumi Y, Suzuki T “Histopathological investigation on patients with Rhododendrol-induced leukoderma” The 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June8-13, 2015

T. Suzuki “Rhododendrol-induced leukoderma”The 23rd World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June8-13, 2015

阿部優子、岡村賢、穂積豊、田宮元、鈴木民夫”ロドデノール誘発性脱色素斑の病態:動物モデルと遺伝子解析”第 26 回日本色素細胞学会学術大会 札幌 2015.11.14-15

Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, Suzuki T “Immunohistopathological analysis immature melanocytes from hair follicles of patients with Rhododendrol-induced leukoderma” 第 40 回日本研究皮膚科学会 2015.12. 11-13

## 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



## 臨床からの原因究明(I)

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

### 研究要旨:

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑の多くは中止により改善がみられる。一方、中止後も拡大したり、新たに白斑を生じることがあるが、これらの難治性白斑の病態形成機序は未だ明らかでない。本研究では、その病態を明らかにするための第一段階として、患者および正常人皮膚におけるグルタチオン合成酵素について免疫組織学的ならびに細胞生物学的に解析した。グルタチオン合成酵素の発現は難治性白斑病変部で有意に低下しており、グルタチオンによる抗酸化作用がロドデノールによる白斑形成機序に関与していることが示唆された。

### 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

ポトシス誘導、メラノサイト環境、オートファジーに関連する各種因子を、また、細胞生物学・分子生物学的評価項目として、ロドデノール感受性、ロドデノール代謝能、酸化ストレス耐性、メラノサイト遊走能、免疫誘導能、ロドデノール暴露時の細胞応答を解析する。

### A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑の病態については基礎的データが積み上げられ、徐々に明らかになってきている。しかし、患者の多くは、使用中止により症状の改善がみられているものの、中には使用中止後も白斑の拡大や新生がみられる難治性白斑を呈することがあり、その病態は未だ不明である。本研究では、これまで患者から採取された病変部検体、ならびに難治性白斑を呈する患者の検体、尋常性白斑検体、正常人検体を免疫組織学的、細胞生物学的に解析することで、白斑症状の進行の個体差や病態を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の病変部皮膚と尋常性白斑患者の病変部皮膚ならびに健常人の正常皮膚を組織学的に比較解析し、さらには各々から確立した培養色素細胞ならびに表皮角化細胞を細胞生物学・分子生物学的に解析する。

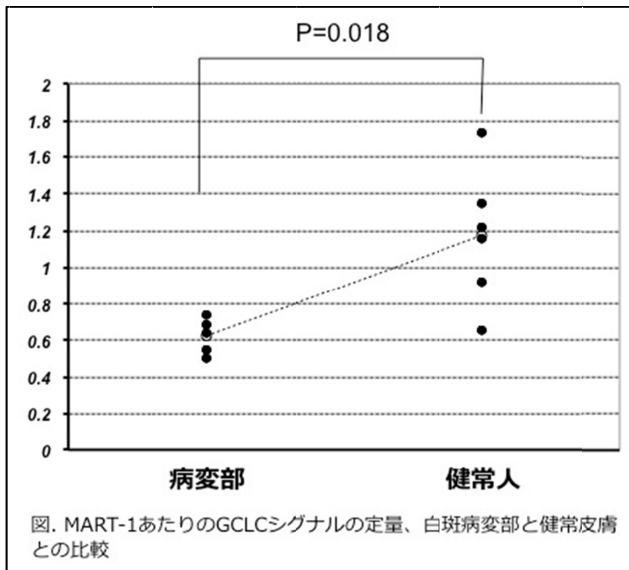
組織学的評価項目として、メラノサイト数、チロシナーゼ発現量、小胞体ストレス応答、抗酸化能、免疫反応、ア

### (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。

### C. 研究成果

これまでの研究でロドデノールによるメラノサイト傷害性にグルタチオンによる抗酸化作用が関与することが示唆されている。そこでグルタチオン合成酵素(GCLC)について免疫組織学的に解析した。難治性白斑病変部5例と正常皮膚8例に対し、抗GCLC抗体、抗MART-1抗体で染色し、MART-1あたりのGCLCシグナルを定量した。その結果、病変部0.623、正常皮膚1.17(P=0.018)で、病変部において有意にGCLCの発現が低下していた(図)。



2. 実用新案登録

なし

3. その他

D. 考察

GCLC の発現低下は、グルタチオン合成能の低下を意味する。これがロドデノールによって生じた結果なのか、難治性白斑を生じる原因なのか現時点では不明である。今後さらに症例を蓄積し、その詳細を明らかにしていきたい。また、その他の因子についても検討を続ける予定である。

E. 結論

実際の症例においても、ロドデノールによる白斑症状の病態にグルタチオンの抗酸化作用が関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

## 臨床からの原因究明(II)

### 機能性化粧品成分の個体差による影響因子の分子解析

研究分担者 片山一朗 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

#### 研究要旨:

ロドデノールによりメラノサイトのオートファジー経路に影響する事、患者皮膚組織の解析より形態的に尋常性白斑と異なるメラノサイト異常を見いだした。さらに患者末梢血中のリンパ球の異常を明らかにした。本研究はロドデノールの個体による影響の違いを説明する一助となると考えられる。

#### A. 研究目的

本研究ではロドデノール含有化粧品が白斑を使用者の一部にのみ発症した個体差を分子的に解析し発症原因を明らかにする事で化粧品成分の安全性評価法を一般化する事を目的とする。

#### B. 研究方法

培養メラノサイトへのロドデノールの分子学的な影響を測定すると同時に患者皮膚生検サンプルや血液を用いてメラノサイトやリンパ球サブセット、自己抗体を解析する。

(倫理面への配慮)

ロドデノール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13421-2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。

#### C. 研究結果

本研究ではロドデノールによりメラノサイトのオートファジー経路が活性化する事、逆にオートファジーが抑制された状態で細胞死を誘導しやすい事を明らかにした。さらに患者皮膚組織の解析より形態的なメラノサイト異常・メラニンの滴落を見いだした。さらに患者末梢血中のリンパ球の異常を見出した。

#### D. 考察

ロドデノール誘発白斑では今まで知られている細胞毒性以外にメラノサイトのオートファジーの状態が関与する事が考えられた。また、通常の尋常性白斑と異なるメラノサイト異常や免疫学的な機構の関与が疑われた。

#### E. 結論

本研究でロドデノールの個体による影響の違いに関与すると考えられる分子機構・免疫異常が明らかとなった。ロドデノール白斑発症機構は単一の要因では説明がつかない事からこれらの研究をさらに有機的に結びつける事により病因を明らかにできると考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表(本研究課題関連のみ記載)

##### 1. 論文発表

Arase, N., Arase, H. 2015. Cellular misfolded proteins rescued from degradation by MHC class II molecules are possible targets for autoimmune diseases. J. Biochem. 158:367-372.

Arase, N., Yang, L., Tanemura A., Yang, F., Suenaga, F., Arase, H., Katayama, I. : The effect of rhododendrol inhibition of NF- $\kappa$ B on melanocytes in the presence of tyrosinase (revised)

Tanimura, K., Jin, H, Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier. L. L., Atsumi, T., Yamada, H. and Arase, H.: 2015. 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 125: 2835-2844.

Eleftheriadou V, Thomas K, van Geel N, Hamzavi I, Lim H, Suzuki T, Katayama I, et al.: Vitiligo Global Issues Consensus Group: Developing core outcome set for vitiligo clinical trials: international e-Delphi consensus. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015; 28(3): 363-9.

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I.: 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: Insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci*. 2015; 77(3): 182-5.

Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I.: An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients. *J Dermatol Sci*. 2015; 77(3): 185-8.

Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I : Possible involvement of CCR4+CD8+ T cells and elevated serum CCL22 and CCL17 in Patients with Rhododendrol-induced Leukoderma. *J Dermatol Sci*. 2015; 77(3): 188-90.

Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K: Guide for medical professionals (i.e., dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol*. 2015; 42(2): 113-28.

Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang L, Yang F, Tsuruta D, Nakamura A, Matsumoto S, Hamasaki T, Tanemura A, Katayama I: Clinical and Histologic

Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex. *JAMA Dermatol*. 2015; 151(7): 722-30.

Matsumura S, Terao M, Murota H, Katayama I : Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2015; 78(3): 215-23.

Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ : NUA2 Amplification Coupled with PTEN Deficiency Promotes Melanoma Development via CDK Activation. *Cancer Res*. 2015; 75(13): 2708-15.

Tanaka M, Yang L, Wataya-Kaneda M, Suzuki T, Okamura K, Hozumi Y, Yang F, Katayama I : Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 in a Japanese infant. *J Dermatol*. 2015; 42(9): 906-7.

ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会,伊藤 明子, 青山 裕美, 鈴木 加余子, 鈴木 民夫, 種村 篤, 錦織 千佳子, 伊藤 雅章, 片山 一朗, 伊藤 祥輔, 大磯 直毅, 深井 和吉, 船坂 陽子, 山下 利春, 松永 佳世子: ロドデノール誘発性脱色素斑症例における三次全国疫学調査結果. *日本皮膚科学会雑誌*2015; 125 No. 13.

## 2. 学会発表

荒瀬規子:ミスフォールド蛋白質-MHC Class II複合体と自己免疫疾患: 第3回 ケラチノサイトと免疫を勉強する会(2015.3.28東京)

Yang L, Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang F, Tanemura A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M, Katayama I. Silencing of tuberous sclerosis complex (TSC) 2 via siRNA causes reduction of autophagy and impairment of melanogenesis in cultured human skin epidermal melanocytes: implication for a potential mechanism of hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex: 2015 World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada (2015. 6.8-6.13)

Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Katayama I: Disruption of the autophagy-lysosome pathway is involved in hypopigmented macules in patients with tuberous sclerosis complex: The 40th Annual Meeting

of the Japanese Society for Investigative Dermatology.  
(2015.12.11-13)

Yang F, Yang L, Tanemura A, Itoi S, Wataya-Kaneda  
M, Katayama I : Dynamic visualization of dendritic  
cells in the skin from patients with vitiligo or  
rhododendrol-induced leukoderma : 14th  
International Workshop on Langerhans Cells  
(2015.11.7 京都)

### 臨床からの原因究明(III)

日本人モデルマウスを使用したロドデノール誘発性脱色素斑に関する研究

研究分担者 鈴木民夫 山形大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授

#### 研究要旨:

日本人モデルマウス(hk14-SCF Tg+ HRM)を使用してRD誘発性脱色素斑を再現したモデルマウス作成に成功した。それを用いたRD脱色素斑発症機序を解析し、RD外用により表皮のメラノサイトが減少・消失していることを確認した。また、紫外線が色素再生には有効であることを明らかにした。このモデルマウスは今後のRD脱色素斑発症機序の解析に有用である。

#### A. 研究目的

ロドデノール誘発性脱色素斑(RD誘発性脱色素斑)の発症病態は未だ不明であり、現段階で21%の患者で脱色素斑部の色素再生が認められておらず、適切で効果的な治療法の確立が望まれている。そこで、我々は病態解明と治療法の確立の双方の観点より、我々が独自に開発した**日本人皮膚モデルマウス(hk14-SCF Tg+ HRM)**を使用して、RD誘発性脱色素斑を再現したモデル動物を作成し、それを用いた脱色素斑発症機序の解明と有効な治療法の確立を目的とする。モデルマウスの確立は、臨床サンプルでは難しい多くの研究的試みを可能にすることができる。

#### B. 研究方法

**日本人モデルマウス**は、國貞隆弘博士(岐阜大教授)との共同研究により、新たに作成したhk14-SCF Tgマウスで、体幹の色素沈着が日本人のそれに近い系統を選択し、さらにヘアレス化した。皮膚色は日本人のそれに近い。生検した表皮を抗melan-A抗体で染色すると、**表皮基底層にメラノサイトを認め、その数はヒト表皮におけるメラノサイトとほぼ同様である。**

まずは、日本人モデルマウスを使用してRD誘発性脱色素斑の再現実験を行い、効率的に脱色素斑を発症する条件を確立する。そのうえで、RD誘発性脱色素斑発症マウスを使用して発症機序解明と治療法の開発を行う。発症機序解析は、免疫組織学的手法や電子顕微鏡的観察に加え、生化学的な手法も用いる。

#### (倫理面への配慮)

本研究は本学の動物実験委員会により、承認され

ている。

#### C. 研究結果

日本人皮膚モデルマウスに30%RD溶液(溶媒:50%エタノール)を背部に3回/日、外用したところ、2週間後には同部位に脱色素斑が生じた(図1A-D参照)。脱色素斑はまだら様であり、RD脱色素斑患者の皮疹と極めて類似していた。次に、それぞれのマウスの脱色素斑部より皮膚生検を施行し、フォンタナ・マッソン染色をしたところ、メラニンがほぼ消失していた。また、抗メラニンA抗体による免疫組織染色では、表皮基底層のメラノサイトの減少・消失が認められた。

これらの所見はRD脱色素斑患者にみられた所見とほぼ同様であった。そこで、塗布日数別に皮膚生検し、メラノサイトの数を測定した。その結果、図2に示すようにRD溶液塗布7日目には、多くのメラノサイトが表皮から減少・消失していることが分かった。なお、同様に実験を日本人皮膚モデルマウスでチロシナーゼ活性がないアルビノマウスを用いて行なったところ、表皮メラノサイトの減少は認められなかった。以上の結果より、ロドデノールによる細胞毒性はチロシナーゼ依存性であることが、in vivoの系で明らかにできた。

治療法について検証した。まずは、タクロリムス軟膏をRD脱色素斑部に外用した。その結果、観察期間の7週間で、コントロールとして用いたワセリンを外用した部位に比べ、明らかな色素再生増強効果は認められなかった。つまり、今回用いたモデルマウス

では、ワセリン外用部位にも順調な色素再生が認められ、タクロリムス軟膏の効果は確認できなかった。次に紫外線照射による効果を調べた。その結果、UVB照射により色素再生がより増強されていることが確認できた。

#### D. 考察

RD 誘発性脱色素斑のモデルマウスを作製することができた。RD 外用により、表皮のメラノサイトが減少・消失しており、患者の皮膚で認められた変化と同様な所見を得ることができた。

有効な治療法の開発については、今回はタクロリムス軟膏の外用と紫外線照射による色素再生効果を調べた。前者の効果は確認できなかったが、紫外線(UVB)の効果については確認できた。今後も、他の治療法の効果について検証することが可能である。

#### E. 結論

RD脱色素斑モデルマウスを使用した本研究により、明らかになった。

1. ロドデノール外用により、表皮メラノサイトが減少・消失する。
2. ロドデノールの細胞毒性はメラノサイト特異的であり、チロシナーゼ依存性である。
3. 紫外線照射は脱色素斑部の色素再生増強効果が認められた。

#### F. 研究発表(平成 27 年度)

##### 論文発表

1. Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I: An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododenol-induced leukoderma patients. *J Dermatol Sci*. 77:185-188 (2015)
2. Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, Suzuki T: Immunohistopathological analysis of frizzled-4-positive immature melanocytes from hair follicles of patients with Rhododenol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci* 80: 156-158, (2015).
2. 実用新案登録  
無し
3. その他

3. Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, Suzuki T: Rhododenol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin. *J Dermatol Sci*. 81(1):35-43 (2016)

##### 学会発表

1. 第 114 回日本皮膚科学会総会 横浜 2015.5.29-31 教育講演「白斑:ロドデノール誘発性脱色素斑 up to date!」病態解明その3 動物モデルからわかったこと 阿部優子、鈴木民夫
2. The 23<sup>rd</sup> World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June8-13, 2015 “Histopathological investigation on patients with Rhododenol-induced leukoderma” Okamura K, Abe Y, Yoshizawa J, Ohe R, Yamakawa M, Hozumi Y, Suzuki T
3. The 23<sup>rd</sup> World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June8-13, 2015 “Rhododenol-induced leukoderma” T. Suzuki
4. 第 26 回日本色素細胞学会学術大会 札幌 2015.11.14-15 ”ロドデノール誘発性脱色素斑の病態:動物モデルと遺伝子解析”阿部優子、岡村賢、穂積豊、田宮元、鈴木民夫
5. 第 40 回日本研究皮膚科学会 2015.12. 11-13 “Immunohistopathological analysis immature melanocytes from hair follicles of patients with Rhododenol-induced leukoderma” Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, Suzuki T

#### H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
無し

無し

## 基礎からの原因究明と安全性評価法の構築(I)

研究分担者 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

### 研究要旨:

ロドデノールによる白斑発症機序の解明と新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざし、細胞を用いた評価方法の検討を行った。ロドデノールを含む白斑誘導性フェノール類に共通するメラノサイト傷害応答には、チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝活性化とそれによる毒性発現の関与が想定されている。ヒトメラノサイトは個体差が大きいことから代替としてメラノーマ細胞を利用し、チロシナーゼ発現誘導・siRNA ノックダウン・阻害によりチロシナーゼ依存性の細胞毒性を検討した。またヒトチロシナーゼ高発現 293T 細胞を調製し検討を進めた。有用な評価系の確立には、さらなる条件の至適化や、細胞毒性以外の評価指標の設定が必要と考えられる。

### A. 研究目的

ロドデノール配合薬用化粧品による白斑発症の原因に関しては、平成 25-26 年度の厚生労働科学研究(「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」(研究代表者:川西 徹)で検討がなされたほか、複数の研究組織から、白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失や、ロドデノールのチロシナーゼ代謝による毒性の増強が論文発表されている。白斑の誘導にはロドデノールの代謝とメラノサイトの傷害/応答の関与が強く示唆されるが、様々な由来のメラノサイトはロドデノールに対する感受性に大きな差異があることが報告されている。したがって、白斑発症にはさらなる因子の存在が示唆されるとともに、新規美白剤の安全性評価には、適切な細胞系と評価指標が必要と考えられる。本研究では、メラノーマ細胞や遺伝子導入細胞を利用し、ロドデノール類似構造の白斑誘導性化合物に共通の応答を検出することにより、安全性評価の方法を検討する。

### B. 研究方法

ロドデノールや白斑誘導性の類似化合物について、メラノーマ細胞における毒性発現とチロシナーゼの関与を検討した。マウス B16 メラノーマ細胞は理化学研究所 BRC セルバンクより入手した。細胞は播種 24 時間後に薬物処理を行い、48 時間、72 時間後に ATP 含量を測定し、細胞生存率を決定した。細胞内 ATP 含量は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega)を用い、化学発光の増加により測定した。

チロシナーゼの阻害には、薬物処理 20 時間前よりフェニルチオウレア(PTU)を 100  $\mu$ M 培地に添加した。チロシナーゼ発現誘導については、細胞播種 24 時間後に(薬物処理と同時に)diBi-cAMP 200  $\mu$ M で処理した。チロシナーゼ特異的 siRNA (Stealth<sup>TM</sup> Select RNAi, Invitrogen, #1~#3)はトランスフェクションの 24 時間後に薬物処理を開始した。チロシナーゼノックダウン効率および発現誘導は、細胞より総 RNA を抽出し、チロシナーゼ mRNA をリアルタイム PCR で測定し判定した。

ヒトチロシナーゼ遺伝子(NM\_000372)は cDNA ORF を CMV プロモーター誘導型発現ベクターに組み込み、HEK293T 細胞に一過性に発現させた。



薬物処理は遺伝子導入 24 時間後に行い、24 および 48 時間後の細胞生存率を測定した。

## C. 研究結果

### 1. B16 メラノーマ細胞を用いた細胞毒性評価

パラ位(4 位)に脂肪族/芳香族側鎖を持つフェノール/カテコール類は、ヒトや実験動物で白斑を誘導する化合物の代表例とされている (Cummings and Nordlund, 1995; Boissy and Manga, 2004)。このクラスに属する化合物である職業的白斑を起こす 4-tert ブチルフェノール (4-TBP) やヒドロキノンモノベンジルエーテル (MBEH)、抗メラノーマ薬候補 4S-システアミルフェノール (4S-CAP) やその誘導体 NAc-4SCAP や NPr-4-SCAP は、メラノーマ細胞や皮膚のメラノサイトに選択的毒性を発揮することが報告されている。ロドデノール(ロドデノール)の化学構造もこのクラスに含まれる。これらの白斑誘導性フェノール類は、共通してチロシナーゼにより代謝を受け、毒性の高いオルトキノン体を生じることが報告されている。

前期研究班では昨年度、ロドデノールに高感受性を示すメラノサイトの入手が困難なことから、メラノーマ細胞ヒト HMV-II、マウス B16 メラノーマ、B16 4A5 細胞の利用を試みた。ヒト HMV-II はロドデノールへの感受性は高くは無く、ロドデノールの細胞毒性においてチロシナーゼ依存性は、阻害剤・siRNA ノックダウンのどちらによっても認められなかった。

今年度はロドデノールに比較的感受性の高いマウス B16 メラノーマ細胞を用いて検討を行った。ロドデノール、MBEH、4-TBP による細胞毒性について、siRNA を用いたチロシナーゼノックダウンの影響を検討したところ、三種類の siRNA に共通した影響は認められず、これらの化合物による細胞毒性にチロシナーゼ依存性は無いと判断した (図 1)。一部の毒性の siRNA#2・#3 による抑制は、オフターゲット効果と推定される。

引き続き B16 細胞をチロシナーゼ阻害剤フェニルチオウレア(PTU)100  $\mu$ M で処理 (図 2A)、あるいは diBi-cAMP 200  $\mu$ M で処理しチロシナーゼ発現を誘導したが (図 2B)、チロシナーゼの増減はロドデノールの細胞毒性発現に影響しなかった。したがって、B16 メラノーマ細胞でのロドデノール、MBEH、4-TBP の細胞毒性には、チロシナーゼ依存性は認められないと結論される。

### 2. ヒトチロシナーゼ発現 HEK293T 細胞を用いた細胞毒性評価

チロシナーゼがより高レベルで発現する細胞を用いて白斑誘導性化合物の評価を試みるために、HEK293T 細胞にヒトチロシナーゼ遺伝子を一過性に発現させた。チロシナーゼタンパクの発現はウェスタンプロットにより (図 3A)、チロシナーゼ活性は DOPA oxidase 活性を測定して確認した (図 3B)。

ヒトチロシナーゼ遺伝子導入 24 時間後に 4-SCAP を細胞培地に添加したところ、4-SCAP の細胞毒性は濃度に応じ、さらにチロシナーゼ遺伝子量に応じて増強されることが確認された (図 3C)。しかしながら遺伝子導入後 72 時間には、コントロール細胞においても遺伝子量に応じた生細胞数の低下が認められた。

チロシナーゼを強制発現することにより、細胞の増殖や生存に必須のチロシンが欠乏した可能性が考えられることから、通常約 0.4mM のチロシンを含む DMEM 培地に 1mM のチロシンを追加した。すると、チロシン添加により、チロシナーゼ発現コントロール細胞においても 24 時間後には生細胞数が著しく低下し、48 時間後においても低下した生細胞数の回復は無かった。したがって、チロシナーゼの強制発現により、チロシンが毒性代謝物に転換されたと推定される。

## D. 考察

これまでの多くの報告から、ロドデノールをはじめとする 4-アルキル/アリルフェノール類による白斑

の発症には、チロシナーゼによる代謝活性化とそれによるメラノサイト特異的な傷害/応答の関与が強く示唆される。しかしながら様々な由来のメラノサイトはロドデノール感受性に大きな差異があることから、本研究では白斑誘導性化合物の評価に適切な細胞モデルを構築することを目的に検討を行った。

ヒトメラノサイトを代替し、かつ安定供給可能な細胞としてメラノーマ細胞に着目して検討を行った。B16メラノーマ細胞はロドデノール、MBEH、4-TBPに明確な感受性を示し、再現性良く細胞生存率が低下したものの、内在性のチロシナーゼ発現をcAMPで誘導、あるいは阻害剤処理やsiRNAを用いたチロシナーゼノックダウンを行っても、これら化合物の毒性発現は増強も抑制もされなかった。昨年度のHMV-IIおよびB16 4A5に引き続き、検討したメラノーマ細胞では、ロドデノールの細胞毒性発現の上でチロシナーゼによる代謝が決定的な段階では無いことが示唆される。チロシナーゼ代謝物オルトキノン体の毒性発現にはROS産生やSHプールの減少・タンパク修飾などが、毒性防御には細胞内のレドックス系やグルタチオンプール等に関わることが予測され、両システムのバランスが細胞による応答の違いをもたらすと推定される。

そこでヒトチロシナーゼを高レベルで発現する293T細胞を調製し、試験化合物の毒性発現におけるチロシナーゼの役割の検討を試みた。チロシナーゼ導入量に応じて4-SCAPの細胞毒性は増強されたが、チロシナーゼ発現72時間後にはコントロール細胞においても生細胞数が激減した。培地へのチロシン添加により24時間時点でも生細胞数が低下することから、チロシンがチロシナーゼでオルトキノン体であるDOPAキノンに代謝され、毒性を発現したことが推定される。

メラノサイトなどメラニン産生細胞では内因性チロシンの毒性は発現しない。そこで引き続きヒトチ

ロシナーゼ強制発現細胞に、メラニン合成下流遺伝子あるいは酸化ストレス防御系遺伝子の共発現を試みるなど改良を進め、高感受性メラノサイトの代替となる細胞モデルの調製を試みる予定である。また平行して細胞毒性以外のエンドポイントの選定、あるいは無細胞系での代謝物の追跡等の検討が必要と考えられる。

## E. 結論

白斑誘導性フェノール類の細胞毒性/応答を評価するために、メラノサイト代替細胞の検討を行った。B16メラノーマ細胞では毒性にチロシナーゼ依存性は認められず、ヒトチロシナーゼ高発現293T細胞を調製して解析を進めた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

最上(西巻)知子. 化学物質による白斑 - 職業性白斑の機序とロドデノール白斑 - . *Bull Natl Inst Health Sci.* 2015; 133, 13-20

### 2. 学会発表

なし

## H. 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

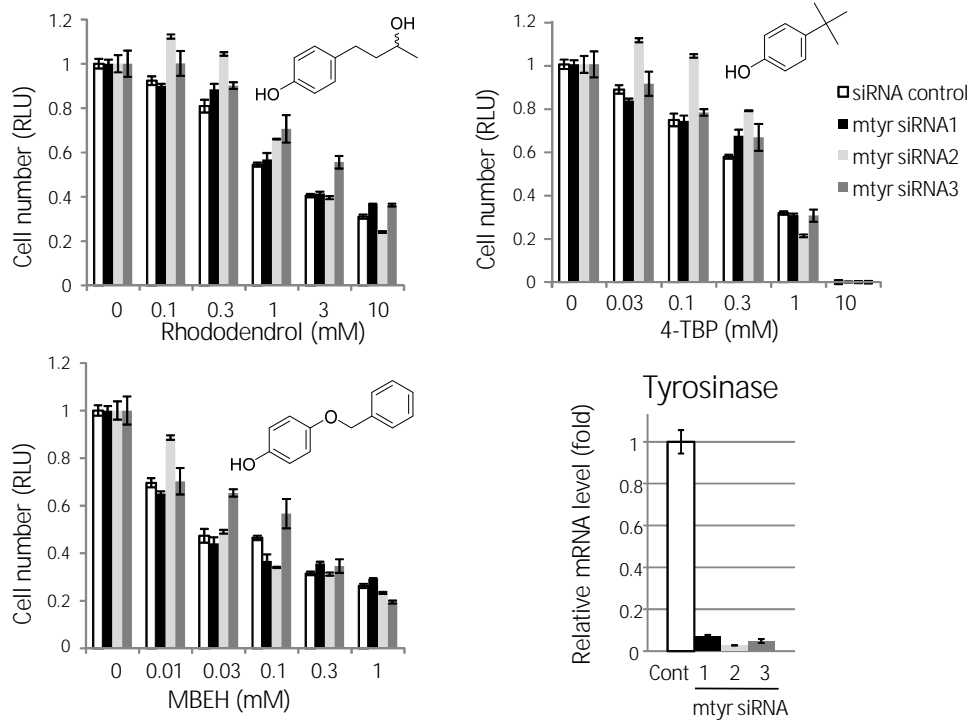


図1. RD, MBEH, 4-TBPのB16メラノーマ細胞における細胞毒性はチロシナーゼノックダウンに影響されない

siRNA処理24時間後に薬物処理を開始。さらに72時間後にATP含量測定により生存率を、チロシナーゼmRNAレベルを測定

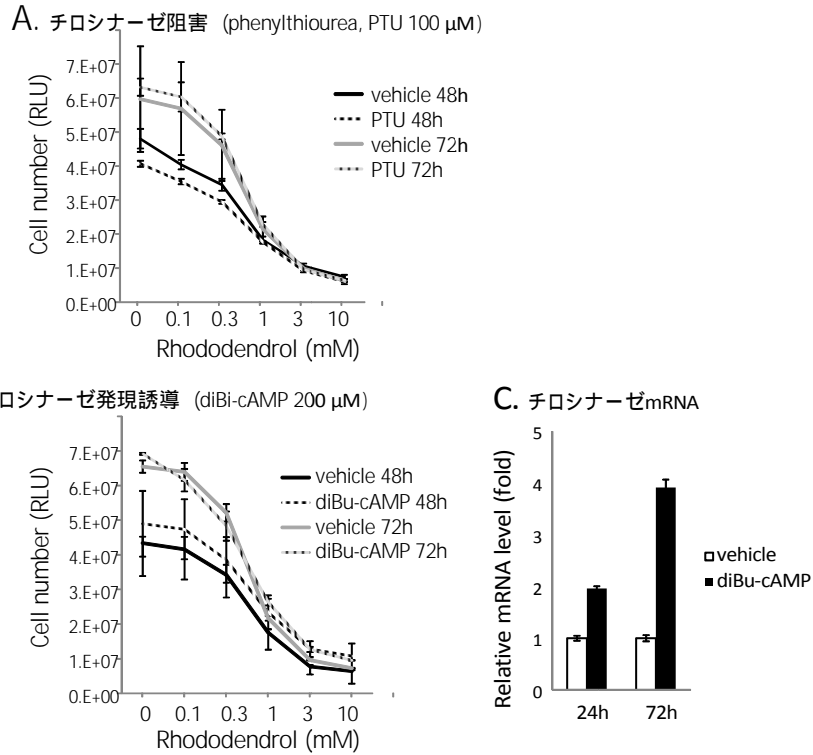


図2. チロシナーゼの阻害や発現誘導はロドデノール(RD)のB16メラノーマ細胞での毒性に影響しない

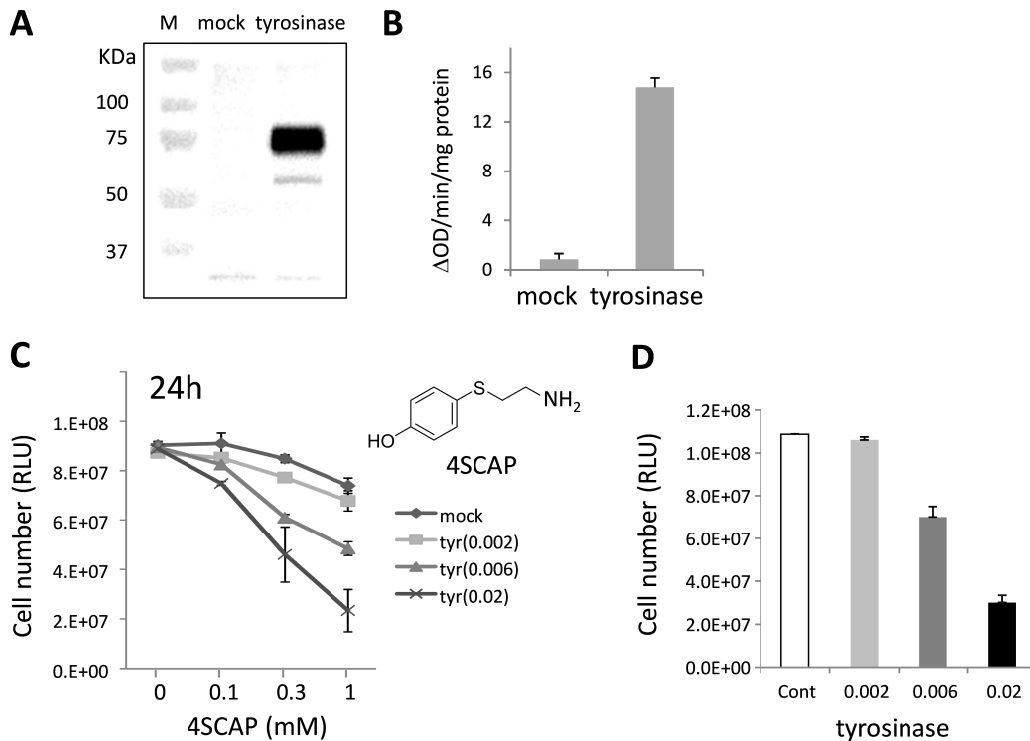


図3. HEK293T細胞へのヒトチロシナーゼ発現は4-S-CAPの毒性を増加する

A. ウェスタンブロット, B. チロシナーゼ活性測定によるチロシナーゼ発現の確認  
 C. チロシナーゼ導入の4SCAP細胞毒性への影響(薬物処理24h後) D. チロシナーゼ導入72h後の細胞生存率

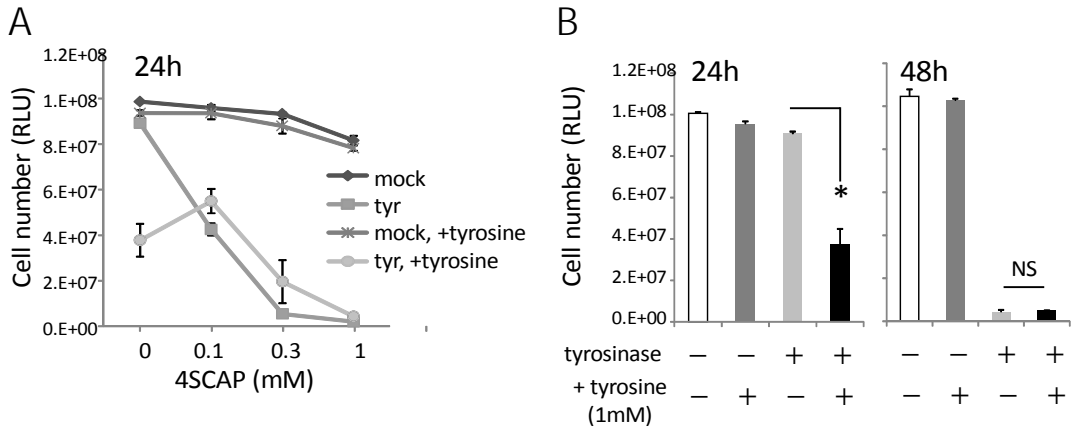


図4. ヒトチロシナーゼ導入によるHEK293T細胞の毒性は  
培地へのチロシン添加により増強される  
A. 4SCAP/チロシン添加24h後 B. チロシン添加24h, 48h後

## 基礎からの原因究明と安全性評価法の構築(II)

研究分担者 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

### 研究要旨:

メラノサイト中のチロシナーゼを阻害することによるメラニン生成抑制を唱って薬用化粧品に配合された rhododendrol により化粧品の使用者の皮膚に白斑が生じる事例が多数発生した。薬用化粧品の安全性確保のため、配合成分の白斑誘導能を評価する方法が望まれている。一方、rhododendrol による白斑誘導の過程で、チロシナーゼにより酸化されて生じた *o*-キノンが細胞内分子のチオール基と結合した可能性が報告されている。そこで、システイン含有ペプチドを用いてチロシナーゼ依存的なペプチドへの結合を検出する試験法の開発を検討した。

Direct Peptide Reactivity Assay 用システインペプチド(DPRA(Cys))を入手し、rhododendrol が酸化されて生じるカテコールと混合したところ、DPRA(Cys)のピークが消失し、新たなピークが検出された。マスペクトルから、カテコールがシステイン残基に結合したペプチドと考えられた。職業性白斑を引き起こすとの報告のある raspberry ketone が酸化されて生じるカテコールでも同様にカテコールが結合したペプチドが生成した。

DPRA(Cys)をリン酸緩衝液(pH6.5)中でマッシュルーム由来チロシナーゼおよび rhododendrol と混合して 25℃で反応させたところ、カテコールが結合したペプチドが生成し、チロシナーゼを除いた場合には見られなかった。反応を大スケールで行い、調製的 HPLC により生成物を精製して定量用標準物質として定量したところ、基質 rhododendrol の約 60%がペプチドと結合していた。

研究協力者 伊藤祥輔 藤田保健衛生大学  
医療科学部名誉教授

因究明が強く求められているのに加えて、薬用化粧品の安全性確保のため、配合成分の白斑誘導能を評価できる試験方法の開発が望まれている。

### A. 研究目的

カネボウ化粧品等が製造販売した rhododendrol(ロドデノール, 図1)を配合した薬用化粧品は、薬事・食品衛生審議会化粧品・医薬部外品部会における審議を踏まえ、平成20年1月に「メラニンの生成を抑え、しみ、そばかすを防ぐ等」の効能効果で承認されたものである。使用後に白斑(肌がまだらに白くなった状態)になったとの報告が寄せられ、平成25年7月4日から製造販売業者が自主回収を実施した。その後1万7千人以上の被害者が確認されていることから、原

一方、rhododendrol は、メラノサイトにおいて tyrosine の酸化を触媒するチロシナーゼを競合的に阻害してメラニン生合成を抑制するとされているが、tyrosine と同様の 4-置換フェノールの構造を持つ rhododendrol 自身もチロシナーゼによる酸化的代謝を受けることを、本研究に先だって行った厚生労働科学研究(「ロドデノール配合薬用化粧品による白斑症状の原因究明・再発防止に係る研究」)の分担研究「原因究明に関する調査研究」で明らかにした。試験管内反応とメラノサイトへの投与により rhododendrol からカテコールである

4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol への変換が確認された。チロシナーゼにより *o*-キノンに酸化され、還元によりカテコールが生成したと考えられた(図1)。さらに、白斑誘導の過程で、rhododendrol がチロシナーゼにより酸化されて生じた *o*-キノンが細胞内のタンパク質システイン残基等のチオール基と結合した可能性が高いことが伊藤らにより報告されている(Ito *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 27, 744 and 28, 295)。この反応を応用し、システイン含有ペプチドを用いてチロシナーゼ依存的なペプチドへの結合を検出する試験法の開発を検討した。システイン含有ペプチドとして、Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)法で用いられるペプチド DPRA(Cys)を用いた。また、同じく DPRA 法で用いられるリジン含有ペプチド DPRA(Lys)も用いた。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol ( rhododendrol , RD , HPBol ) , 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol ( DHPBol ) , 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanone ( DHPBol ) はカネボウより提供頂いた。4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanone (raspberry ketone , HPBone) 及び cinnamaldehyde (CA) は和光純薬工業より購入した。

マッシュルーム由来チロシナーゼは Sigma-Aldrich 社より購入した。

システインペプチド DPRA(Cys) (Ac-RFAACAA) および DPRA(Lys) (Ac-RFAAKAA) はスクラムより購入した。

### 2. ペプチドとの反応

100  $\mu$ L の DMSO-アセトニトリル混液(1 : 9)に 375  $\mu$ L の 0.667 mmol/L DPRA(Cys)を加え、さらに 25  $\mu$ L の 100 mmol/L 被検物質を加えて混和し、暗所 25 で 24 時間置いた。また、375  $\mu$ L の 0.667 mmol/L DPRA(Lys)に 125  $\mu$ L の 100 mmol/L 被検物質を加えて混和し、暗所 25 で

24 時間置いた。いずれも超純水で 5 倍に希釈し、0.2  $\mu$ m のフィルターでろ過して UPLC/MS に供した。

### 3. チロシナーゼを用いたペプチドとの反応

100  $\mu$ L の 50 mmol/L KPB (pH6.5)と酵素量に応じた超純水を混合し、22.5  $\mu$ L の 6.67 mmol/L DPRA(Cys)及び 100 mmol/L rhododendrol を加えた後、マッシュルームチロシナーゼ in 50 mmol/L KPB (pH6.5)を加えて 300  $\mu$ L とし、暗所 25 で 18 時間置いた。200  $\mu$ L の 62.5%アセトニトリルを加え、0.2  $\mu$ m のフィルターでろ過して UPLC/MS に供した。

### 4. 結合ペプチドの合成

Rhododendrol 3.3 mg (20 mmol) と DPRA(Cys) 16.5 mg (22 mmol) を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8) 20 mL に溶かし、37 で激しく攪拌した。ここにマッシュルームチロシナーゼ (1715 U/mg) 2.3 mg (4000 units)を 0.5 mL 緩衝液に溶かした液を加えた。10 分後に赤紫色になった溶液に NaBH<sub>4</sub> 20 mg と HCOOH 0.2 mL を加えて反応を停止した。

この無色の溶液を 40 で減圧乾固し、残渣を調製的 HPLC 溶離液 2 mL に溶かして条件 2 の調製的 HPLC に供し、主たる生成物を分取し、凍結乾燥した。

### 5. HPLC および LC/MS

#### (1) 条件 1 (UPLC/UV 及び UPLC/MS)

装置は ACQUITY UPLC H-Class/TQD system (Waters)を用いた。HPLC および MS 条件は以下のとおり。

カラム, ACQUITY UPLC CSH C18 (2.1 mm i.d.  $\times$  100 mm; particle size, 1.7  $\mu$ m; Waters); カラム温度, 30 ; 移動相 A, 0.02% TFA in water; 移動相 B, 0.02% TFA in acetonitrile; 流量, 0.35 mL/min . Gradient: 0-2min , 10%B ; 2-12min , 25%B ;

12-13min; , 90%B; 13-15min , 90%B; 15-15.5min , 10%B ; 15.5-20min , 10%B . イオン化 , ESI positive; キャピラリー電圧 , 3.0 kV; コーン電圧 , 30-70 V; ソース温度 , 150 ; 脱溶媒温度 , 400 ; 脱溶媒ガス流量 , 800 L/hr; コーンガス流量 , 50 L/hr; 検出 , SCAN mode ( $m/z$  50-2000).

## (2) 条件 2 (調製的 HPLC)

HPLC ポンプ , JASCO-2080 PLUS (日本分光); カラム , Capcell Pak C18 MG (20 mm i.d. × 250 mm; particle size, 5  $\mu$ m; 資生堂); UV 検出器 , JASCO-UV (280 nm); 溶離液 , 0.4 M HCOOH:メタノール (60:40, v/v); 流 , 7.0 mL/分; 温度 , 45 .

## C. 研究結果

### 1. カテコールと DPRA(Cys)ペプチドの反応

まず , カテコールとペプチドを反応させて結合が起こるかどうか検討した . 終濃度 5 mmol/L の DHPBol または DHPBone を終濃度 0.5 mmol/L の DPRA(Cys)と混合し , 暗所で 25 でインキュベートした . 混合モル比は DPRA 法の常法通り 10 : 1 であり , 反応時間も DPRA 法の常法通り 24 時間とした . 対照として rhododendrol および raspberry ketone についても同様に処理した . また , 陽性対照として cinnamaldehyde を用いた .

反応液を希釈し , UPLC/MS により分析した . 図 2 に 220 nm で検出した UV クロマトグラムを示す . 陽性対照の CA の反応液ではペプチドのみの陰性対照と比較して DPRA(Cys)のピーク面積が減少している . 一方 , DHPBol および DHPBone では , DPRA(Cys)のピークが消失している . これに対し , HPBol ではペプチドピークの減少はほとんど見られなかった .

UV 検出では DPRA(Cys)が HPBone と重なって観察できなかったため , MS で検出した . DPRA(Cys)の  $[M+H]^+$  である  $m/z$ 751 のマスキロマトグラムを図 3 に示す . HPBone の反応液に見られる DPRA(Cys)のピーク面積は陰性対照とほとんど変わらなかった .

DPRA(Cys) のピークが見られなかった

DHPBol の反応液では , UV クロマトグラムで保持時間 12.3 分に , 陰性対照には見られないピークが観察された (図 2) . DHPBone では 12.6 分と 12.9 分に観察された (図 2) .

これらのピークはトータルイオンクロマトグラム (TIC) でも確認された (図 4) . DHPBol に見られた 12.3 分のピークの UV スペクトルを図 5A に示す . 254 nm および 292 nm に極大吸収があり , システニルドーパと類似のスペクトルであった . また , 図 5B に示したマスペクトルで  $m/z$ 931 のマスピークが得られ , 分子量は 930 であることが示唆された . これらのことから , このピークは DPRA(Cys)のシステイン残基に DHPBol が結合した図 6A のような構造と考えられた . この結合ペプチドの生成機構として , DHPBol の自動酸化により生じた *o*-キノンと DPRA(Cys)の間での Michael 付加反応が考えられる .

DHPBone の 12.6 分のピークはこれより分子量が 2 小さく , UV スペクトルが類似していたことから , 図 6B のような構造と考えられた . 12.9 分のピークの構造は現在検討中である .

### 2. カテコールと DPRA(Lys)ペプチドの反応

DPRA(Lys)でも同様に検討した . DPRA 法の常法通りの混合比 50 : 1 となるよう , DHPBol または DHPBone の終濃度は 25 mmol/L , DPRA(Lys)の終濃度は 0.5 mmol/L とした . DPRA(Lys)で強く検出される  $[M+2H]^{2+}$  である  $m/z$ 389 のマスキロマトグラムでは , HPBol と HPBone の反応液で DPRA(Lys)のピーク面積が CA と同程度の減少を示した (図 7) が , 新たなピークは検出できなかった .

### 3. チロシナーゼとのカップリング反応

以上より , *o*-キノンは DPRA(Cys)との結合ペプチドを生成することがわかったため , チロシナーゼにより 4-置換フェノールから *o*-キノンを生成させて DPRA(Cys)と結合させるカップリング反応が可能と考えられた . そこで , マッシュルームチ



ロシナーゼを用いた反応を検討した。

マッシュルームチロシナーゼで HPBoI を酸化させるのに適した条件とするため、反応は 50 mmol/L KPB (pH6.5)中で行い、HPBoI の終濃度は 0.1 mmol/L とした。DPRA(Cys)の終濃度は DPRA 常法の 0.5 mmol/L とした。終濃度  $10^2$  units/mL マッシュルームチロシナーゼを加えて暗所 25 °C で 18 時間インキュベートした。HPBoI, チロシナーゼのいずれかまたは両方を除いた反応液を対照として用いた。

UPLC/MS で反応液を分析した。UV クロマトグラムを図 8 に示した。チロシナーゼを除いた反応液の DPRA(Cys)のピークの大きさはペプチドのみの反応液と変わらず、HPBoI のピークが確認できた。チロシナーゼのある反応液では、ペプチドと HPBoI のいずれのピークも検出されず、新たなピークが確認された。マスペクトルでは  $m/z$ 931 のマスピークが得られたことから、カテコールと DPRA(Cys)との反応で生成した結合ペプチドと考えられた。チロシナーゼの有無による差は HPBoI, DPRA(Cys)および結合ペプチドのベースピークであるそれぞれ  $m/z$ 107,  $m/z$ 751 および  $m/z$ 931 におけるマスキロマトグラムでも確認できた(図 9)。

#### 4. 標準試料の合成

結合ペプチドの生成量を定量するため、標準物質として用いる結合ペプチドの合成を行った。方法は RDQ と N-アセチルシステイン付加物の合成法(Ito *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 27, 744) に準拠した。rhododendrol (RD) 20 mmol と DPRA(Cys) 22 mmol を 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8) 20 mL に溶かし、37 °C で激しく攪拌した。ここにマッシュルームチロシナーゼ 4000 units を 0.5 mL 緩衝液に溶かした液を加えた。溶液は 10 分で赤紫色になったので、 $\text{NaBH}_4$  20 mg と  $\text{HCOOH}$  0.2 mL を加えて反応を停止した。この溶液を HPLC で分析すると、RD および DPRA(Cys)はほぼ消失し、2 つの生成物

のピークが出現した。この無色の溶液を 40 °C で減圧乾固し、残渣を下記の HPLC 溶離液 2 mL に溶かし、資生堂製 Capcell Pak C18 MG (20 x 250 mm, 粒子径 5 mm) カラムおよび溶離液 0.4 M  $\text{HCOOH}$ :メタノール(60:40, v/v)を用いた調製的 HPLC により RDQ-DPRA-Cys 付加体を単離した。主たる生成物を分取し、凍結乾燥して、11.1 mg (60%; 吸光度に基づく)の付加体を得た(HPLC による純度 91%)。本化合物は 5-S-システイニルドーパ(d'Ischia *et al.*, Pigment Cell Melanoma Res. 26, 616)と同様な UV 吸収スペクトル(吸収極大 254 nm および 292 nm)を示し、RD の 5 位に DPRA-Cys が結合していることが推定された。

#### 5. チロシナーゼ量の影響

結合ペプチド(RDQ-DPRA-Cys 付加体)による定量が可能となったため、チロシナーゼカップリング反応の生成物量に対するチロシナーゼ量の影響を検討した。反応液中のチロシナーゼ量を 0, 3.75, 7.5, 15 または 30 units として行い、rhododendrol, DPRA(Cys)および結合ペプチドの標準試料を用いた絶対検量線法で定量した。表 1 に示すように、rhododendrol の残存量はチロシナーゼを加えなかったもの以外は 0 であった。DPRA(Cys)の残存量はチロシナーゼが多いほど少なかったが、rhododendrol の消費量より多くの DPRA(Cys)が消費されていた。一方、結合ペプチド(product)の生成量はチロシナーゼが 3.75 units の反応液が最も多く、加えた rhododendrol の約 60%であった。

#### D. 考察

Rhododendrol がメラノサイト内でチロシナーゼにより酸化を受けた代謝物に変換されることが白斑の原因となったことには疑いがないと思われる。それに続く発症メカニズムは明らかになっていないが、Ito らにより実証されたキノンと SH 基との結合が関与している可能性が高い。グルタチオンと

の結合は保護的に働く可能性がある一方で、システインとの結合が発端となるロドデノールフェオメラニンの生成やタンパク質のシステイン残基との結合により自己免疫を引き起こす可能性が示唆されている。

すなわち、チロシナーゼにより酸化を受けること、その代謝物が SH 基と結合することの両条件が満たされる場合に白斑を誘導する可能性があると考えられる。そこで、チロシナーゼ、SH 基供与体、被検物質の 3 者を共存させる試験管内反応を白斑誘導能のスクリーニング法として利用することを検討した。

SH 基供与体として、OECD により感作性試験代替法 TG442C として認められている Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) で使用されるヘプタペプチド DPRA(Cys) を検討した。物性および分析法が明確なことから、供給体制が十分であることが理由である。

まず、カテコールと DPRA(Cys) との反応を検討したところ、結合ペプチドの生成が確認された。生成した結合ペプチドは、図 6 に示すように部分構造がカテコールそのものであり、1 段階酸化が進んだ構造である。生成するメカニズムは図 6 に示したようにキノンに酸化されてからの Michael 付加か、あるいは酸化カップリングと考えられる。反応液に三価の鉄イオンなど酸化力を持つ物質が混在していた可能性がある。

Rhododendrol の代謝物が DPRA(Cys) と結合することが確認されたため、チロシナーゼとのカップリング反応を検討した。同一の結合ペプチドが生成し、添加した rhododendrol の最大で約 60% が結合ペプチドとなったことが確認できた。しかし、チロシナーゼ量を増やすとむしろ結合ペプチド生成量が低下したことから、使用したマッシュルームチロシナーゼの作用によりペプチド部分の分解もしくはカテコール部分の変換が起きる可能性が示唆された。今後、反応時間や酵素量の最適化、阻害剤の使用などを検討し、試験条件の検討を進める。

## E. 結論

システイン含有ペプチド DPRA(Cys) を rhododendrol が酸化されて生じるカテコール DHPBoI と混合したところ、DPRA(Cys) のピークが消失し、DHPBoI がシステイン残基に結合したペプチドが生成した。Raspberry ketone が酸化されて生じるカテコール DHPBoI でも同様にカテコールが結合したペプチドが生成した。一方、rhododendrol および raspberry ketone では結合ペプチドは生成しなかった。

DPRA(Cys) をリン酸緩衝液 (pH6.5) 中でマッシュルーム由来チロシナーゼおよび rhododendrol と混合して反応させたところ、DHPBoI が結合したペプチドが生成し、チロシナーゼを除いた場合には見られなかった。反応を大スケールで行い、調製的 HPLC により生成物を精製して定量用標準物質として定量したところ、基質 rhododendrol の約 60% がペプチドと結合していた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## H. 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

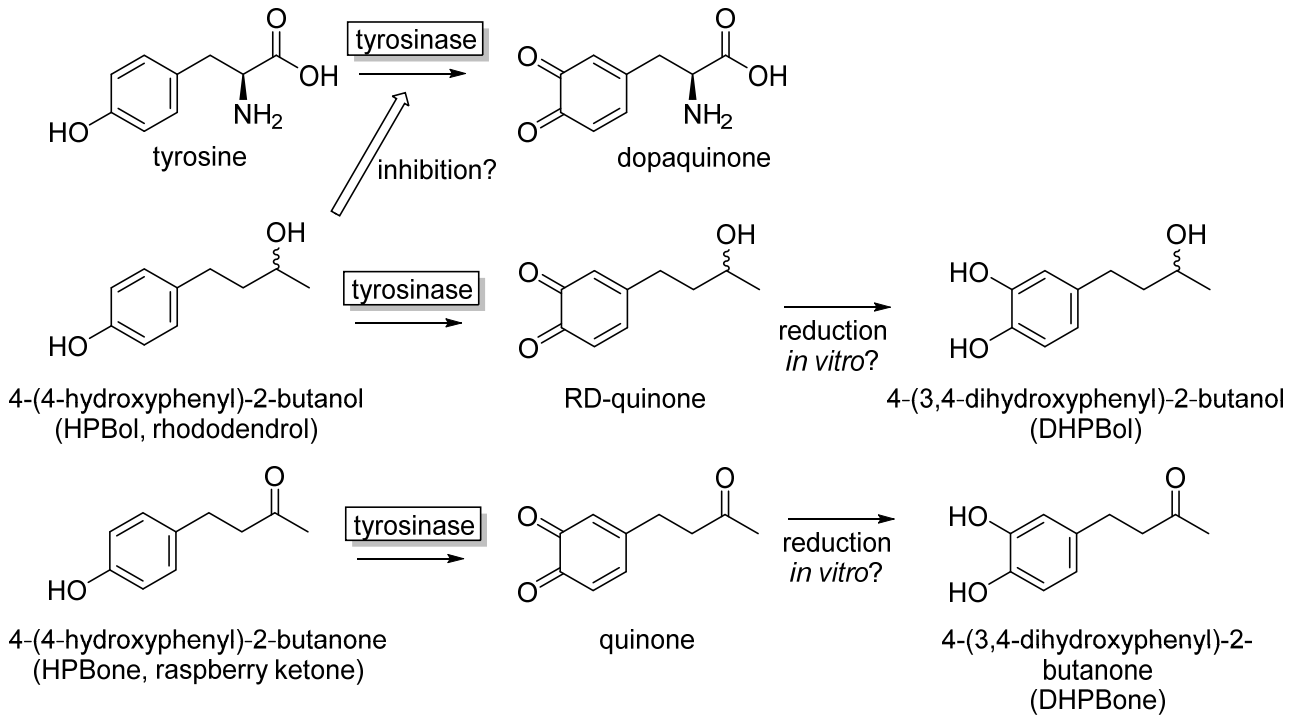


図 1 . Rhododendrol のチロシナーゼによる酸化 .

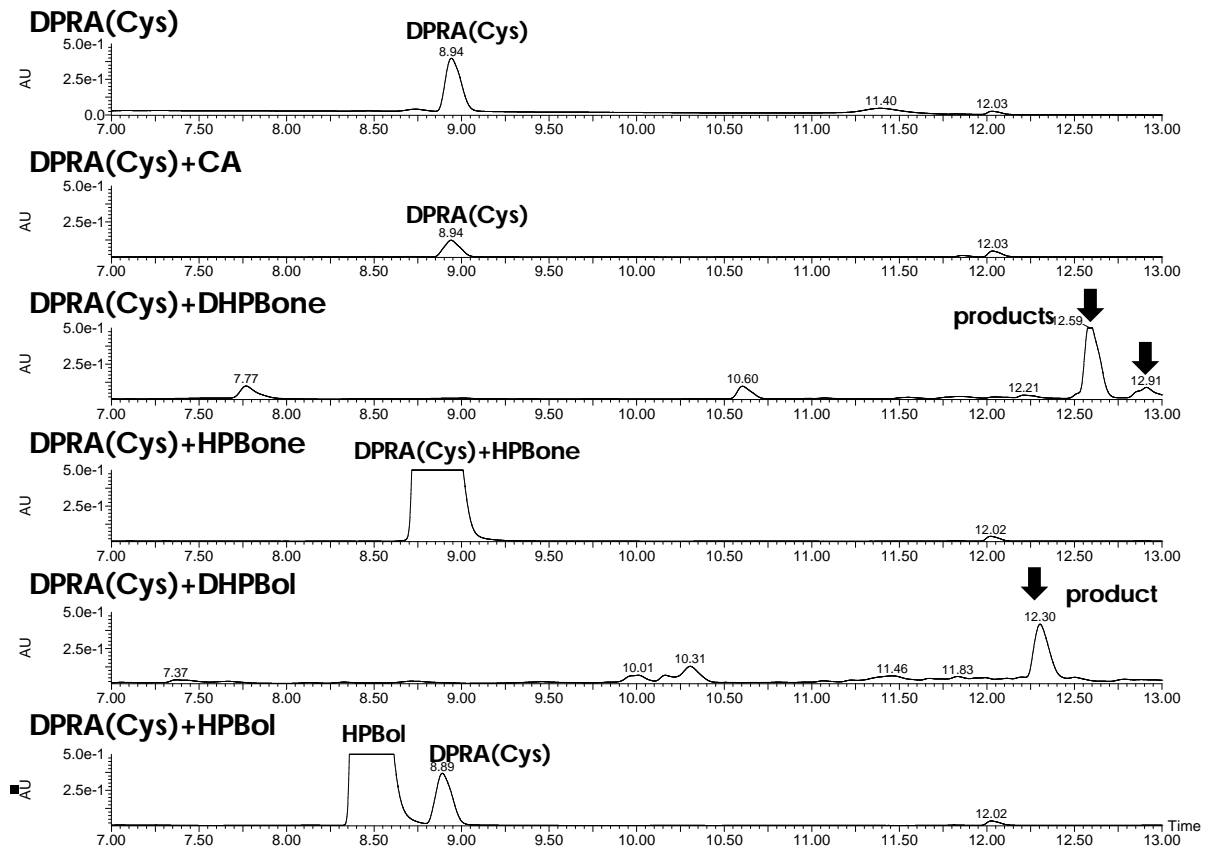


図 2 . チロシナーゼを用いない DPRA(Cys)反応液の UV クロマトグラム (検出波長: 220 nm) . DHPBol および DHPBone は 7 分より早く溶出する .



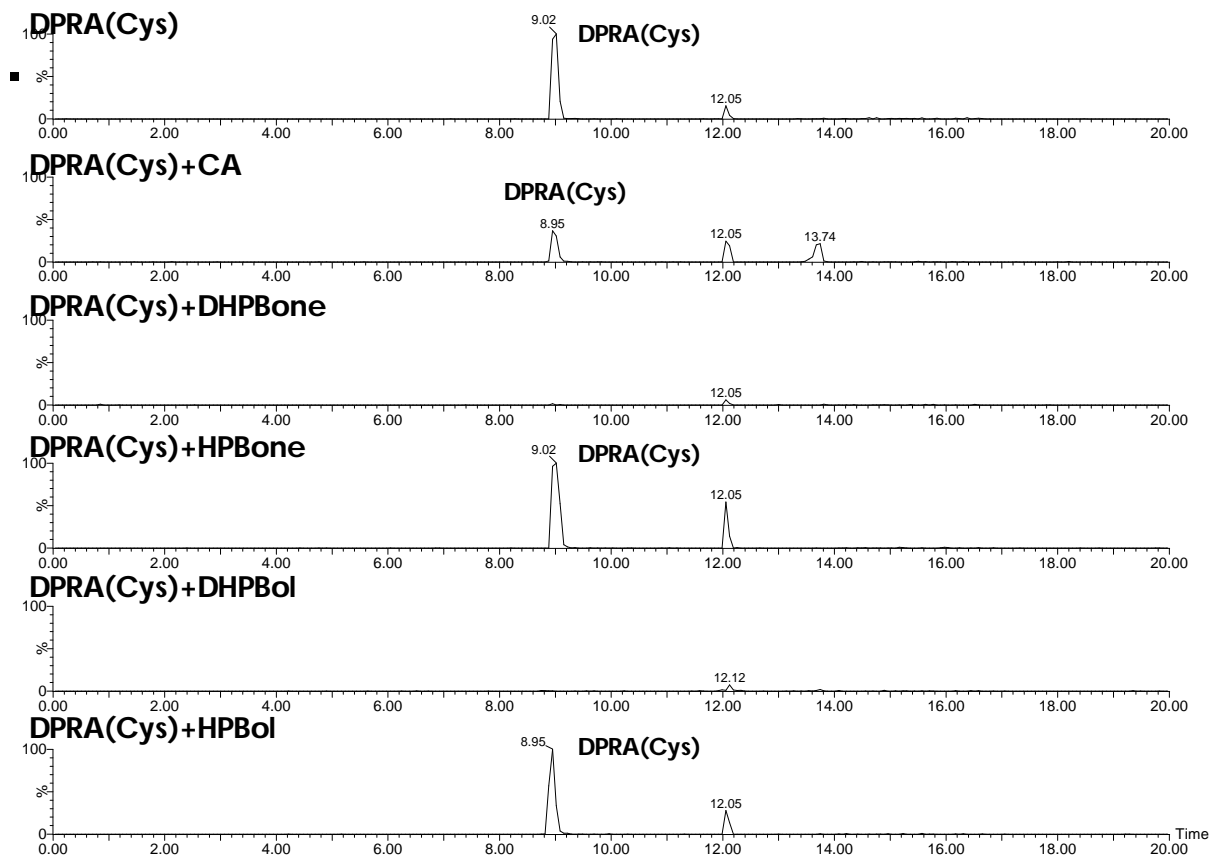


図 3. チロシナーゼを用いない DPRA(Cys) 反応液のマスクロマトグラム ( $m/z751$ ) .

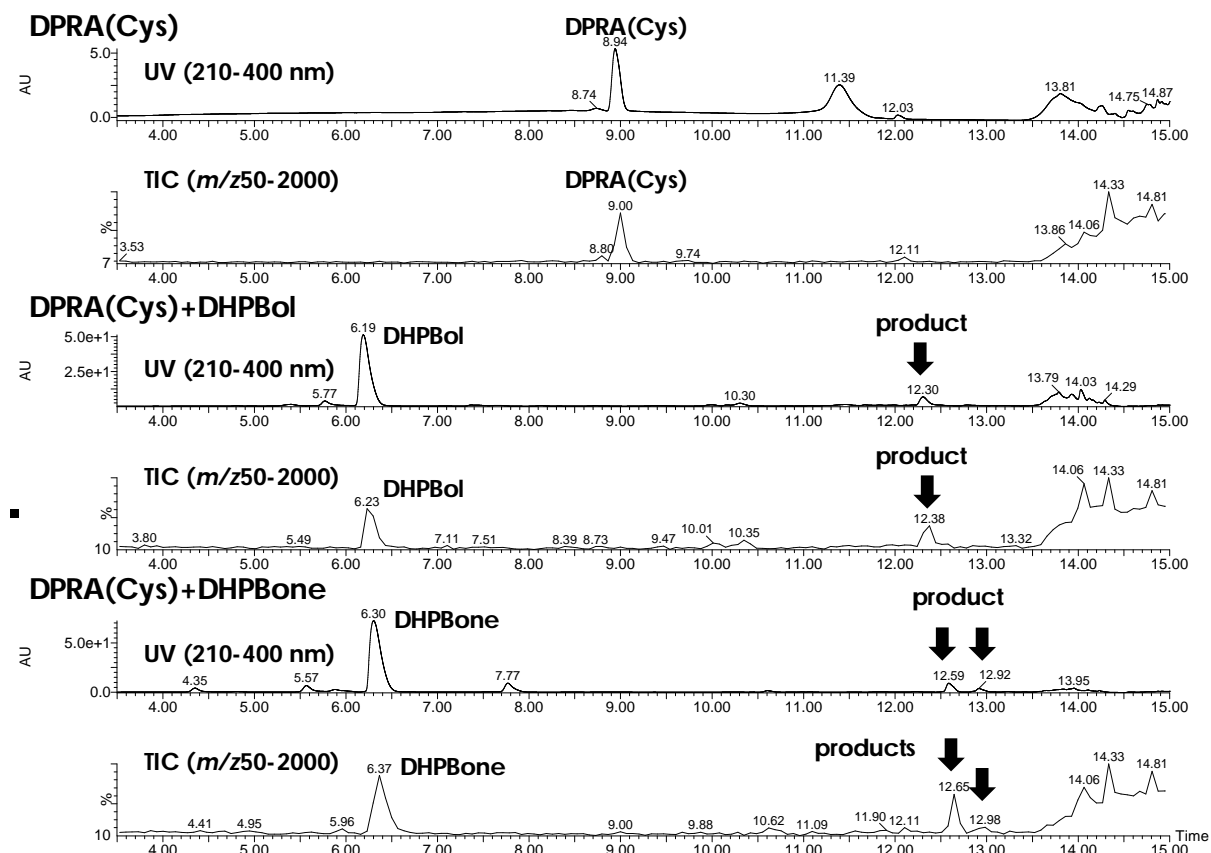


図 4. チロシナーゼを用いない DPRA(Cys)反応液の全波長クロマトグラムおよび TIC .

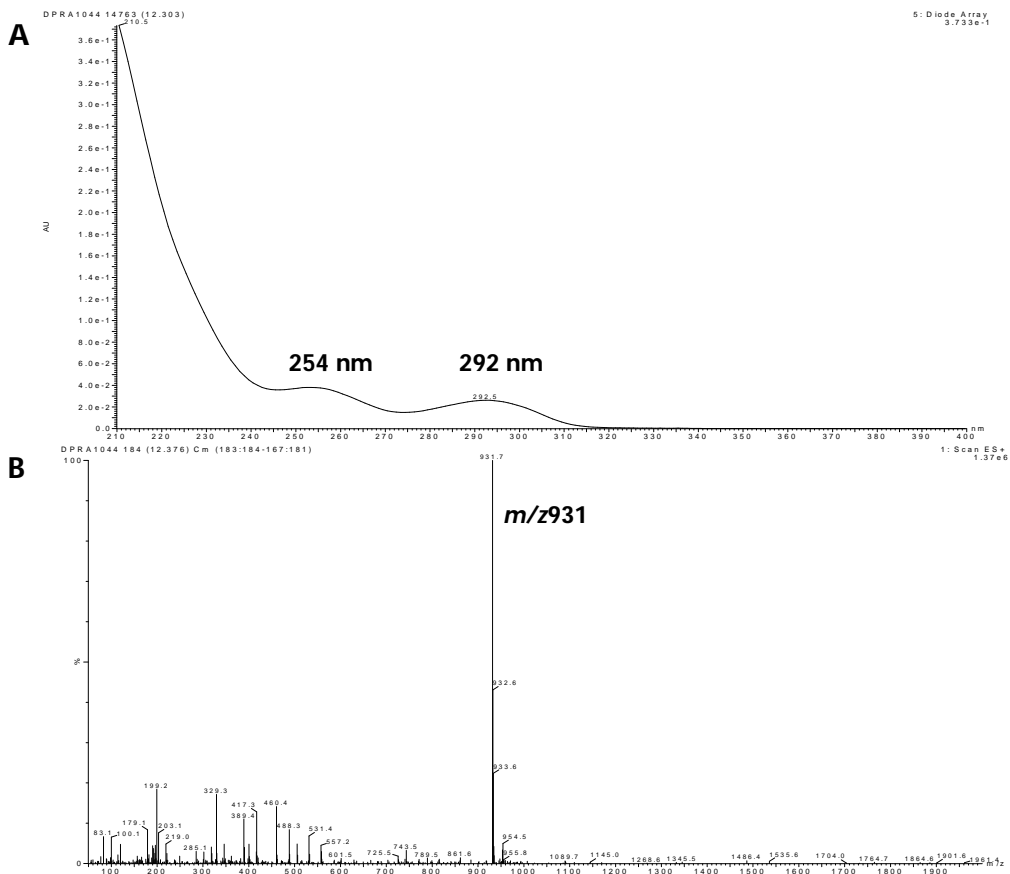


図 5. DHPBol 反応液に見られた 12.3 分のピークのスペクトル. A. UV スペクトル. B. マススペクトル.

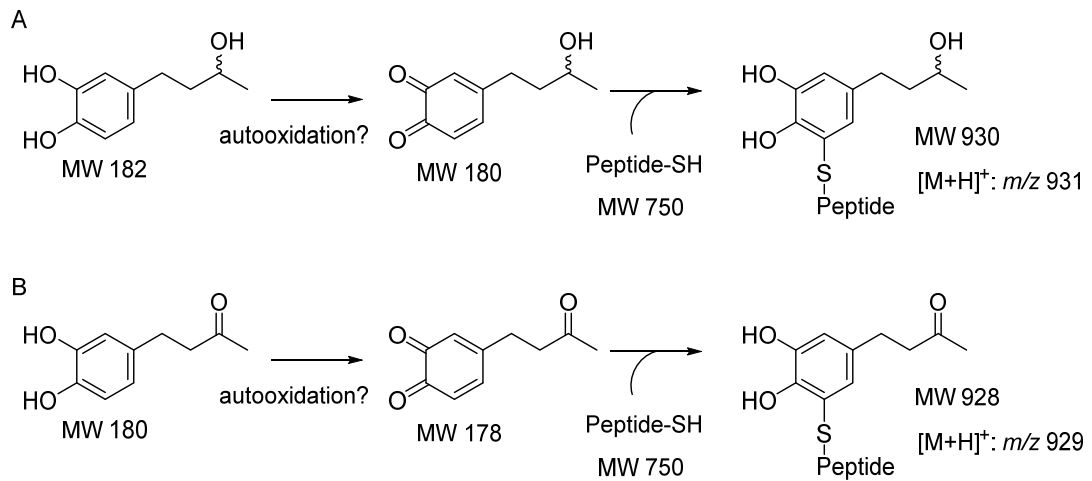


図 6. 結合ペプチドの構造とその生成機構. A. DHPBol 反応液. B. DHPBone 反応液.

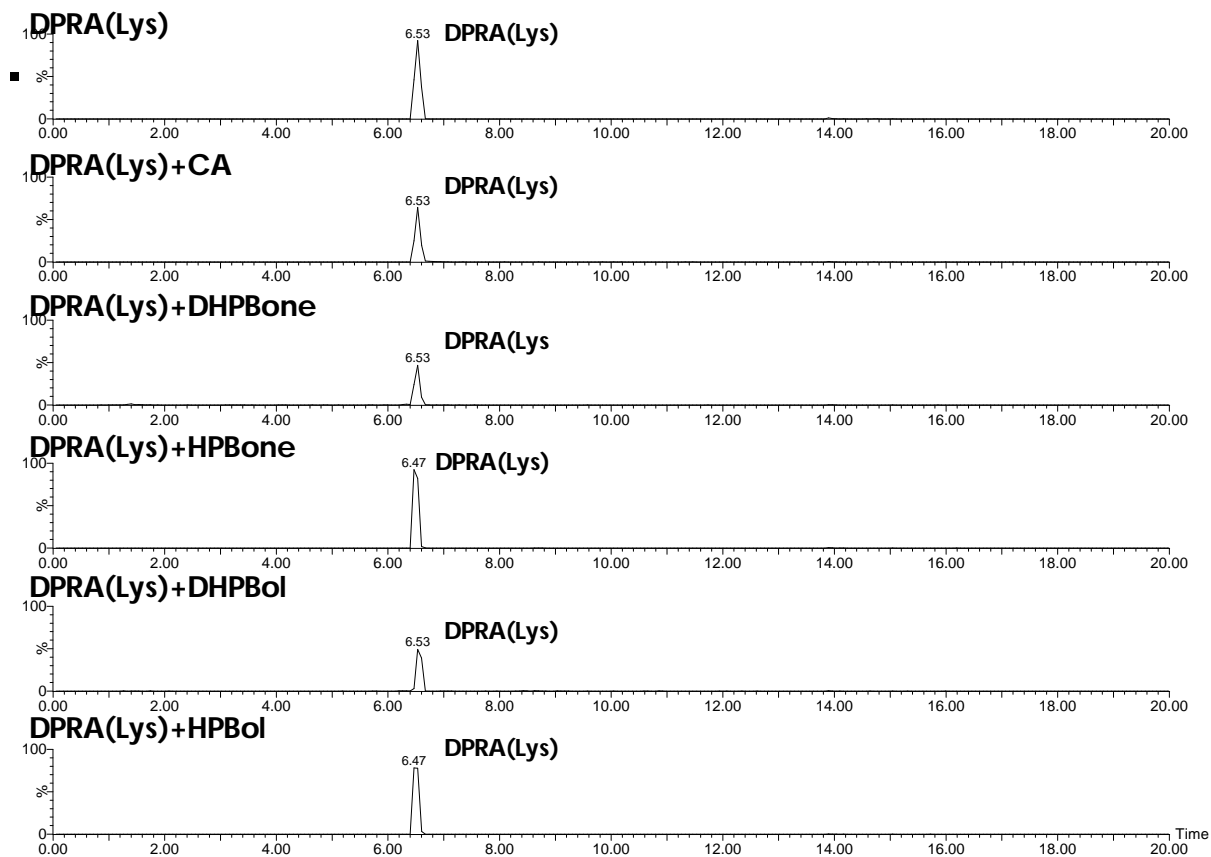


図 7. チロシナーゼを用いない DPRA(Lys)反応液のマスクロマトグラム ( $m/z$ 389) .

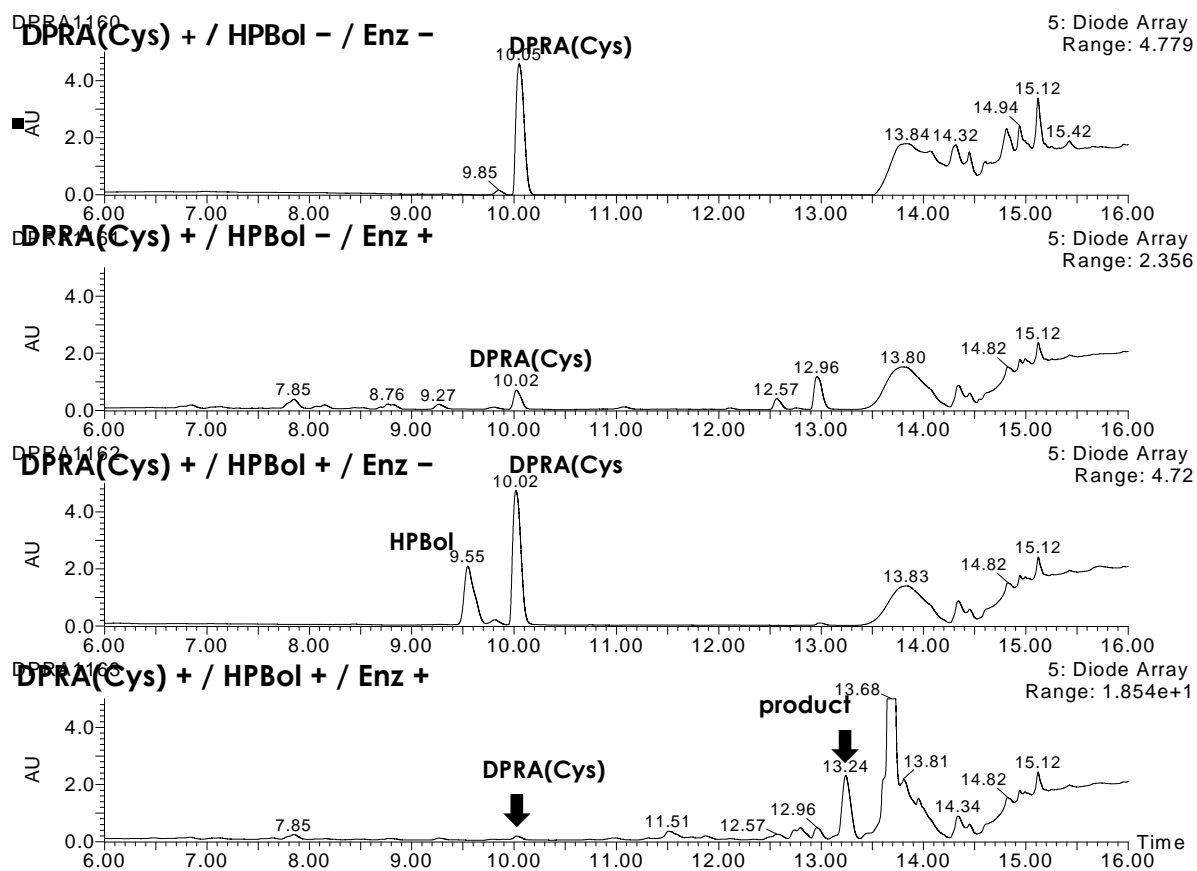


図 8. チロシナーゼカップリング反応の全波長クロマトグラム.

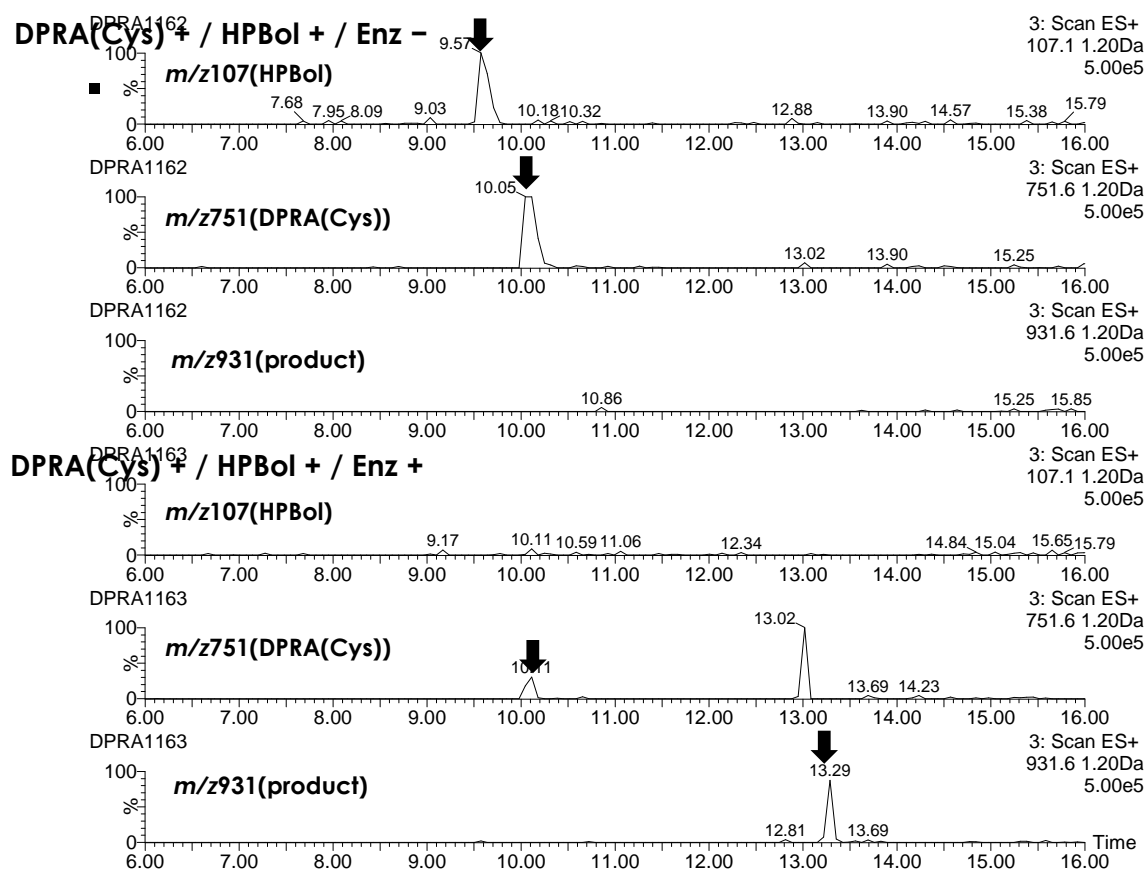


図 9. チロシナーゼカップリング反応のマスクロマトグラム.

表 1. チロシナーゼ量が基質残存量と結合ペプチド生成量に与える影響.

Tyrosinase (units)	HPBol ( $\mu$ M)	DPRACys ( $\mu$ M)	product ( $\mu$ M)
0	100	500	0.0
3.75	0	154	59.5
7.5	0	109	49.6
15	0	68	35.3
30	0	16	20.3



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
片山一朗 種村篤	尋常性白斑の診断と治療	伊藤祥輔 柴原茂樹 錦織千佳子	色素細胞	慶応義塾 大学出版 会	東京都港 区三田	2015	262-275

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
最上(西巻)知子	化学物質による白斑 - 職業性白斑の機序とロドデノール白斑 - .	<i>Bull Natl Inst Health Sci.</i>	133	13-20	2015
Tanimura, K., Jin, H, Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier, L. L., Atsumi, T., Yamada, H. and Arase, H.	$\beta$ 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome.	<i>Blood</i>	125	2835-2844	2015
Eleftheriadou V, Thomas K, van Geel N, Hamzavi I, Lim H, Suzuki T, Katayama I, et al.	Vitiligo Global Issues Consensus Group: Developing core outcome set for vitiligo clinical trials: international e-Delphi consensus.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	28(3)	363-369	2015
Yang L, Yang F, Wataya-Kaneda M, Tanemura A, Tsuruta D, Katayama I.	4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanol (rhododendrol) activates the autophagy-lysosome pathway in melanocytes: Insights into the mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma.	<i>J Dermatol Sci.</i>	77(3)	182-185	2015
Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukui K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, Suzuki T, Katayama I.	An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododendrol-induced leukoderma patients.	<i>J Dermatol Sci.</i>	77(3)	185-188	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I	Possible involvement of CC R4+CD8+ T cells and elevated serum CCL22 and CCL17 in Patients with Rhododendrol-induced Leukoderma.	<i>J Dermatol Sci.</i>	77(3)	188-190	2015
Nishigori C, Aoyama Y, Ito A, Suzuki K, Suzuki T, Tanemura A, Ito M, Katayama I, Oiso N, Kagohashi Y, Sugiura S, Fukai K, Funasaka Y, Yamashita T, Matsunaga K	Guide for medical professionals (i.e., dermatologists) for the management of Rhododendrol-induced leukoderma.	<i>J Dermatol.</i>	42(2)	113-128.	2015
Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Yang L, Yang F, Tsuruta D, Nakamura A, Matsumoto S, Hamasaki T, Tanemura A, Katayama I	Clinical and Histologic Analysis of the Efficacy of Topical Rapamycin Therapy Against Hypomelanotic Macules in Tuberous Sclerosis Complex.	<i>JAMA Dermatol.</i>	151(7)	722-730	2015
Matsumura S, Terao M, Murota H, Katayama I	Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes.				
Namiki T, Yaguchi T, Nakamura K, Valencia JC, Coelho SG, Yin L, Kawaguchi M, Vieira WD, Kaneko Y, Tanemura A, Katayama I, Yokozeki H, Kawakami Y, Hearing VJ	NUAK2 Amplification Coupled with PTEN Deficiency Promotes Melanoma Development via CDK Activation.	<i>Cancer Res.</i>	75(13)	2708-2715	2015
Tanaka M, Yang L, Wataya-Kaneda M, Suzuki T, Okamura K, Hozumi Y, Yang F, Katayama I	Case of Hermansky-Pudlak syndrome 1 in a Japanese infant.	<i>J Dermatol.</i>	42(9)	906-907	2015
ロドデノール含有化粧品の安全性に関する特別委員会, 伊藤 明子, 青山 裕美, 鈴木 加余子, 鈴木 民夫, 種村 篤, 錦織 千佳子, 伊藤 雅章, 片山 一朗, 伊藤 祥輔, 大磯 直毅, 深井 和吉, 船坂 陽子, 山下 利春, 松永 佳世子	ロドデノール誘発性脱色素斑症例における三次全国疫学調査結果.	日本皮膚科学会雑誌	125 No.13		2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanemura A, Yang L, Yang F, Nagata Y, Wataya-Kaneda M, Fukai K, Tsuruta D, Ohe R, Yamakawa M, <u>Suzuki T</u> , Katayama I	An immune pathological and ultrastructural skin analysis for rhododenol-induced leukoderma patients.	<i>J Dermatol Sci.</i>	77	185-188	2015
Okamura K, Ohe R, Abe Y, Ueki M, Hozumi Y, Tamiya G, Matsunaga K, Yamakawa M, <u>Suzuki T</u>	Immunohistopathological analysis of frizzled-4-positive immature melanocytes from hair follicles of patients with Rhododenol-induced leukoderma.	<i>J Dermatol Sci.</i>	80	156-158	2015
Abe Y, Okamura K, Kawaguchi M, Hozumi Y, Aoki H, Kunisada T, Ito S, Wakamatsu K, Matsunaga K, <u>Suzuki T</u>	Rhododenol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin.	<i>J Dermatol Sci.</i>	81	35-43	2016