

**厚生労働行政推進調査事業費補助金**

**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**

**美白成分の安全性評価法の策定に関する  
研究**

**平成29年度 総括研究報告書**

**(H29-医薬-指定-003)**

**研究代表者 最上 知子**

**平成30年3月**

## 目 次

・ 総括研究報告	
美白成分の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	
	石川 治 . . . . . 9
2 . 臨床からの原因究明：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 一朗 . . . . . 11
3 . 臨床からの原因究明：ロドデノール誘発性脱色素斑モデルマウスにおける色素再生過程の解析	
	鈴木 民夫 . . . . . 15
4 . 安全性評価法（代謝物分析系）の構築（I）	
	秋山 卓美 . . . . . 18
5 . 安全性評価法（代謝物分析系）の構築(II)	
	伊藤 祥輔 . . . . . 22
4 . 安全性評価法(細胞系)の構築	
	最上 知子 . . . . . 24
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	. . . . . 28

## 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ており、病態や発症機序に不明な点が残されている。本研究では、ロドデノール白斑患者由来組織を用いた病態解明を継続するとともに、発症因子を明らかにし、新規美白成分の安全性評価法策定への貢献をめざす。

皮膚の免疫組織学的解析により、メラノサイトの 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・難治例ともに低いことが判明し、メラノサイトのグルタチオンと遊走性の低下が難治化の一因と推定された。またロドデノール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。モデルマウスでロドデノール白斑部色素再生への VitD3 と紫外線照射の効果が明らかにされた。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、白斑誘導性 4-置換フェノール類の代謝を、マッシュルームチロシナーゼから可溶性ヒトチロシナーゼに代えて評価することに成功した。また代謝物ロドデノール-ユームラニンの酸化促進作用の UVA による増強を見いだした。また細胞モデルを構築しチロシナーゼ代謝と毒性発現との関係を解析する方法を検討した。改良を進め、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
伊藤祥輔	藤田保健衛生大学医療化学部名誉教授

### 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、ロドデノール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、ロドデノール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、進行の個体差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。ロドデノールのチロシナーゼによる代謝は、過去の報告から、類似構造の白斑誘導性4-置換フェノール類にも共通して認められる。今年度は、代謝測定へのヒトチロシナーゼの利用を検討するとともに、代謝物の酸化作用へのUVAの影響、細胞を用いた毒性評価を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

これまでの研究でロドデノール(RD)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。また、尋常性白斑において、その発症に接着因子であるEカドヘリンが関与していることが明らかとなっている。そこで本研究では、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、グルタミルシステイン酵素(GCLC)とEカドヘリンの発現を免疫組織学的に比較解析する。

(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. 機能的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。

(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。

### 3. ロドデノール誘発性脱色素斑モデルマウスにおける色素再生の解析[鈴木]

これまでの研究で確立した日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布してロドデノール白斑モデルマウス作成した。そして、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。ロドデノール白斑モデルマウスにロドデノール外用を中止し、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。

(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。

### 5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II)[伊藤]

ロドデノール-ユーメラニン(RD-EM)はロドデノールをチロシナーゼで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。

### 6. 安全性評価法(細胞系)の構築[最上]

ロドデノール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発現 293T 細胞にチロシナーゼ関連タンパク TYRP1 を共発現し同様に検討した。

## C. 研究結果

### 1. 患者由来組織を用いた原因究明 [石川・安田]

ロドデノール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。

### 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]

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、ロドデノールロドデノール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。

### 3. ロドデノール誘発性脱色素斑モデルマウスにおける色素再生の解析 [鈴木]

ロドデノール白斑モデルマウスを使用して、ロドデノール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。

ロドデノール白斑モデルマウスにロドデノール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、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。

### 4. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 [秋山]

ロドデノールを含む 11 種の 4-アルキル/アリル置換フェノール類をヒトチロシナーゼと反応させたところ、ロドデノール (RD), モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH, monobenzene, 4-benzyloxyphenol), 4-tert-ブチルフェノール (4-TBP), 4-S-cysteaminylphenol (4SCAP), raspberry ketone (RK), 4-methylphenol (MeP, p-cresol), resveratrol (RES), 4-methoxyphenol (MoP), 及び 4-chlorophenol (CIP)について酸化が起きたことが確認された。Rucinol (RUS, 4-butylresorcinol) 及び methyl 4-hydroxybenzoate (MOB, 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。

### 5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

昨年度はロドデノール-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。

#### 6. 安全性評価法(細胞系)の構築 [最上]

白斑誘導性 4-置換フェノール類(ロドデノールやモノベンジルエーテルヒドロキノン(MBEH)、4-ter-ブチルフェノール(4-TBP)、4SCAP など)はチロシナーゼによる代謝活性化が知られる。代謝産物によるメラノサイト傷害を、メラノサイトの個体差を考慮し、チロシナーゼを高発現するメラノーマ細胞 B16BL6 で検証した。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、ロドデノールや 4-TBP、MBEH は細胞毒性に影響せず、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞の場合と一致した結果を得た。

ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞の難点である内因性チロシン毒性の低減を、チロシナーゼ関連タンパク TYRP1 共発現により試みた。

### D. 考察

#### 1. 患者由来組織を用いた原因究明[石川]

ロドデノール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。

#### 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。

#### 3. ロドデノール誘発性脱色素斑モデルマウスにおける色素再生の解析 [鈴木]

ロドデノール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。

ロドデノール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。

#### 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。

#### 5. 安全性評価法(代謝物分析系)の構築(II) [伊藤]

ロドデノール(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ンを産生する。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、夏季に顕著であるという臨床所見に一致する。

## 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代謝活性化は毒性の増強をもたらすと考えられる。ヒトメラノサイトの個体差のため、代替モデルとして B16BL6 メラノーマ細胞の利用を検討したが、チロシナーゼの増加/低下による細胞毒性増強/減弱が予想通り観察されたのは 4SCAP のみで、ロドデノール、4-TBP、MBEH では認められなかった。これは、これまで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ないことを示している。今後は、細胞毒性以外の評価指標の探索、メラニン合成下流経路の役割解明、代謝物の直接測定などを検討する必要があると考えている。

## E. 結論

ロドデノール白斑において、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が脱色素斑の難治化に関わる可能性、白斑病変部表皮角化細胞の接着に関わる gpNMB の低下が白斑発症に関与する可能性が示唆された。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された。

美白成分の安全性評価法の確立に向け、ロドデノールと白斑誘導性類似化合物のヒトチロシナーゼを利用した代謝の測定に成功するとともに、代謝物ロドデノール-ユーマラニンの酸化促進作用の UVA による増強を見いだした。またチロシナーゼ代謝と細胞毒性の関係の解析方法を検討した。さらに改良を進め、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

Takeuchi Y, Tanemura A, Tada Y, Katayama I, Kumanogoh A, Nishikawa H. Clinical response to PD-1 blockade correlates with a sub-fraction of peripheral central memory CD4+ 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.

Okamura K, et al: Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31:267-276, 2018

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, 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, published online, 2018. DOI: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 552, 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.*, accepted for publication, 2018.

## 2. 学会発表

Yasuda M, Kishi C, Toki S, et al. A comparison of the immunohistochemical analyses of rhodo-

den-drol-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 Iddamaloda, 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 Hermansky-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 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。

#### **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

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

研究協力者 安田正人 群馬大学医学部附属病院皮膚科 講師

### 研究要旨:

ロドデノール(RD)誘発性脱色素斑は RD 含有化粧品の使用により、主にその使用部位に生じる脱色素斑である。多数例は化粧品の使用中止により色素再生を示すが、中止後も脱色素斑が拡大する症例、使用部位以外に脱色素斑が新生する症例もみられる。グルタチオンは RD の細胞毒性を緩和することが知られており、グルタミルシステイン合成酵素(GCLC)はグルタチオン合成を促進する。改善例と難治例の病態の違いを明らかにするため、GCLC と E カドヘリンについて免疫組織化学的に解析を行った。改善例の脱色素斑周囲のメラノサイトでは GCLC 発現が増加しているのに対し、難治例では増加がみられなかった。また、E カドヘリンは改善例、難治例ともに発現が増加しており、難治例で顕著であった。GCLC が少なくグルタチオンが十分に供給されないこと、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。

### A. 研究目的

ロドデノール(RD)誘発性脱色素斑の病態は徐々に明らかになってきているが、RD 含有化粧品を使用しても全例に白斑を生じるわけではないこと、通常中止後は改善する白斑が中止後も拡大する症例や新たに白斑を生じる難治例があり、未だ不明な点も多い。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した患者の検体、および対照として正常人検体を免疫組織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

これまでの研究で RD 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。また、尋常性白斑において、その発症に接着因子であるEカドヘリンが関

与していることが明らかとなっている。そこで本研究では、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、グルタチオン合成酵素(GCLC)とEカドヘリンの発現を免疫組織学的に比較解析する。

### (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. 研究結果

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。

#### **D. 考察**

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。

#### **E. 結論**

RD 含有化粧品の使用による GCLC の発現の個体差が、RD 誘発性脱色素斑の難治化の一因とな

っている可能性がある。

#### **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

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.

#### **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

**臨床からの原因究明：  
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 一郎 大阪大学 教授

**研究要旨：**

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、今回 gpNMB/osteactivin という細胞接着や種々の細胞機能に関わる新しい分子に着目し解析した。その結果ロドデノール白斑病変部皮膚ケラチノサイトにおいて gpNMB が低下していることを見出し、白斑発症との関連が示唆された。

**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**

ロドデノール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。

(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収得の上研究を進めている。

**C. 研究結果**

ロドデノール白斑患者の表皮角化細胞で gpNMB の発現が低下していることが明らかとなった。

**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。

**E. 結論**

本研究でロドデノールによる表皮角化細胞における個体への影響の違いがロドデノール白斑に関与する可能性が考えられた。今までの知見を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**

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 peripheral central memory CD4+ 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. Clau-

- din-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

## 2. 学会発表

Kiyohara E, Matusmura S, Katayama I: Analyzing ganglioside expression of cutaneous malignant lymphoma. JSID Kochi (2017.12.17)

Terao M, Matsumura S, Katayama I, Itami S. 10th World Congress of Hair Research, Kyoto Japan (2017. 10. 30)

Terao M, Matsumura S, Katayama I, Itami S. Local cortisol activation in keratinocytes influences on mouse hair cycle. 42nd JSID Kochi, Japan (2017. 12. 15-17)

Matsumura S, Terao M, Itami S, Katayama I. Topical Dexamethasone application increased IL-1a and IL-1 receptor expression in mouse skin. 42nd JSID Kochi, Japan (2017. 12. 15-17)

Takahashi A, Yang F, Yang L, Arase N, Tanemura

A, Kaneda M, Arunasiri Iddamalagoda, 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)

Kazuko KITAYAMA, Mari WATAYA-KANEDA, Ayumi NAKAMURA, Shinichiro MAEDA, Fei YANG and Ichiro KATAYAMA. Investigation of Sirolimus delivery to skin and blood in oral or topical administration. 42nd JSID. Kochi, Japan, (2017.12.15-17)

太田朝子 中川幸延 壽順久 種村篤 片山一郎: 多彩な皮膚症状を伴い IVIG が奏功した bullous rheumatoidneutrophilic dermatosis の一例. 第 40 回皮膚脈管・膠原病研究会 福島 (2017.1.20-21)

越智沙織、寺前彩子、進藤翔子、田原真由子、高橋 彩、深井和吉、鶴田大輔、片山一郎: 乾燥性皮膚疾患に対する肌着の検討. 第 33 回日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 神戸 (2017.04.22-23)

越智沙織、寺前彩子、進藤翔子、田原真由子、高橋 彩、深井和吉、鶴田大輔、片山一郎: 乾燥性皮膚病変に対する肌着の検討. 第 13 回加齢皮膚科研究会 福島 (2017.4.29)

神谷 智、金田眞理、片山一郎: 四肢の片側肥大をきたした結節性硬化症の 2 例. 第 5 回日本結節性硬化症学会学術総会 東京 (2017.11.11)

神谷 智、高藤円香、越智沙織、種村篤、片山一郎: eccrine angiomatous hamartoma の可能性を考えた 1 例. 第 223 回大阪皮膚科症例検討会 大阪 (2017.11.16)

島田菜津子、壽 順久、片山一郎: 経過中、外陰部癌を発症した強皮症の一例. 第 459 回大阪地方会 大阪 (2017.02.04)

島田菜津子、清原英司、亀井利沙、中川幸延、壽順久、片山一郎: 多彩な臨床像を呈した皮膚 T 細胞リンパ腫の一例. 第 81 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 福島 (2017.09.23 ~ 24)

高田洋子、清原英司、田原真由子、壽 順久、室

田浩之、片山一朗:大阪大学皮膚科における菌状  
息肉症患者の起痒因子の検討. 第 33 回日本皮  
膚悪性腫瘍学会学術大会 秋田(2017.06.30 ~  
07.01)

中川幸延、田中麻理、林 美沙、壽 順久、片山  
一朗:HBV の関与が考えられた DRESS/DIHS の 1  
例. 第 47 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学  
会総会学術大会 (2017. 12.08-10)

中西雄也、清原英司、片山一朗:妊娠期間中にイ  
ンターフェロン 治療を継続し、出産後に  
Lymphomatoid papulosis が出現した菌状息肉症の  
一例. 第 464 回大阪地方会(2017.12.02)

松本 晃:表皮における HSD11 1 の欠損は皮膚  
の痒み過敏を誘導する. 第 4 回関西若手皮膚科  
医の集い 神戸(2017.11.04)

松本 晃, 室田浩之、寺尾美香、片山一朗:  
Attenuated activation of endogenous glucocorti-  
coids in keratinocytes induces alopecia in atopic  
dermatitis via aberrant artemin production. 第 27 回  
国際痒みシンポジウム 東京(2017.11.11)

神谷 智, 金田真理、片山一朗:四肢の片側肥大  
をきたした結節性硬化症の 2 例. 第 68 回日本皮  
膚科学会中部支部学術大会 大阪  
(2017.10.07-08)

Noriko Arase, Hui Jin, Ichiro Katayama, Hisashi  
Arase:Recognition of SS-A/IgG/HLA-DR complex  
by autoantibodies in Sjögren's syndrome. The 46th  
Annual Meeting of The Japanese Society for Im-  
munology, Sendai Japan (2017,12,14)

Noriko Arase, Hui Jin, Yutaro Hayashi, Hiroyuki  
Murota, Hisashi Arase, Ichiro Kataya-  
ma:Recognition of SS-A/IgG/HLA-DR complex by  
autoantibodies in Sjögren's syndrome. The 42nd  
Annual Meeting of The Japanese Society for Inves-  
tigative Dermatology, Kochi Japan (2017, 12,15)

片山一朗、楊 伶俐、山岡俊文、林 美沙、荒瀬  
規子、室田浩之、仲 哲司:膠原病の寒冷過敏に  
関する新しい考え方.第 460 回日本皮膚科学会大  
阪地方会 和歌山(2017.3.11-12)

高藤円香、高田洋子、壽 順久、種村 篤、片山  
一朗、田中啓之、恵谷悠紀:減張切開による緊急  
手術が必要となったコンパートメント症候群の 1 例.  
第 461 回日本皮膚科学会大阪地方会 大阪  
(2017.5.27)

青山礼華、高橋円香、壽 順久、田中 文、種村  
篤、片山一朗、竹中 聡:トラベクテジン(ヨンデリス  
®)の漏出により大胸筋まで壊死が波及した症例.  
第 463 回日本皮膚科学会大阪地方会 大阪  
(2017.9.30)

中西雄也、清原英司、片山一朗:妊娠期間中にイ  
ンターフェロン 治療を継続し、出産後に CD30 陽  
性異型リンパ球が出現した菌状息肉症の 1 例.第  
464 回日本皮膚科学会大阪地方会 大阪  
(2017.12.4)

青山礼華、太田朝子、壽順久、種村篤、片山一朗、  
角田溪太、辻本孝平、田中敏郎:重症筋無力症、  
関節リウマチ、SLE を併存する外陰部悪性黒色腫  
に対し PD-1 抗体および放射線療法を施行した 1  
例.第 110 回近畿皮膚科集談会 大阪(2017.7.9)

## 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



## 臨床からの原因究明

### ロドデノール誘発性脱色素斑モデルマウスにおける色素再生過程の解析

研究分担者 鈴木民夫 山形大学医学部皮膚科学講座 教授

#### 研究要旨:

ロドデノール白斑モデルマウスを使って、白斑部に色素再生を促進する治療について探索した。また、色素再生が起これば状態になっている病変部のうち、白斑部についてメラニン合成が起これない理由について解析した。

#### A. 研究目的

これまでの研究の報告により、ロドデノールの細胞毒性により白斑が生じるおおよその病態メカニズムが明らかになってきた。しかし、その一方で未だロドデノール含有化粧品の使用を中止したにもかかわらず、白斑が完全に消失せず悩んでいる患者さんも数多い。そこで、我々はロドデノール白斑モデルマウスを使用して、ロドデノール白斑部に対して有効な治療法を探索することとした。また、白斑部に色素再生が起これる時、白斑部に一様に色素再生が起これるわけではないため、その結果としてまだらになる。そこで、まだら部位における白斑部に色素再生が起これない理由を明らかにすることとした。

#### B. 研究方法

まずは、これまでの研究で確立した日本人皮膚モデルマウスにロドデノールを塗布してロドデノール白斑モデルマウス作成した。そして、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。ロドデノール白斑モデルマウスにロドデノール外用を中止し、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。

(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。

#### C. 研究結果

ロドデノール白斑モデルマウスにロドデノール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、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れていることが

明らかとなり、逆説的な結果が得られた。

#### D. 考察

ロドデノール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。

ロドデノール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。

#### E. 結論

VitD3 外用 + 紫外線照射療法は、ロドデノール白斑患者への治療として有効性が期待できる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

Okamura K, et al: Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9. *Pigment Cell Melanoma Res.* 31:267-276, 2018

Ozaki S, et al: Melanotic Malignant Melanoma in Oculocutaneous Albinism Type 4. *Acta Derm Venereol.* 97: 287-288, 2017

##### 2. 学会発表

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 Hermansky-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 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.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

## 安全性評価法(代謝物分析系)の構築

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

研究協力者 伊藤祥輔 藤田保健衛生大学 医療科学部 名誉教授

研究協力者 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

### 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 (RD) 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。RD をはじめとする白斑誘導性 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼにより酸化されて *o*-キノンを生じることが報告されている。チロシナーゼによる酸化を検出する試験法の開発を検討した。

ヒトチロシナーゼを用いて RD 等の 4 置換フェノールの *in vitro* 酸化が起こるか検討した。rhododendrol (RD), raspberry ketone (RK), 4-benzyloxyphenol (BzP, monobenzene), 4-methylphenol (MeP, *p*-cresol), resveratrol (RES), 4-methoxyphenol (MoP), 4-*tert*-butylphenol (TBP), 4-*S*-cysteaminyphenol (CAP) 及び 4-chlorophenol (CIP) について酸化が起きたことが確認された。rucinol (RUS, 4-butylresorcinol) 及び methyl 4-hydroxybenzoate (MOB, 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。

### 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, RD, 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。

RD 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 RD 自身もチロシナーゼによる酸化的代謝を受けることを、平成 25 年から開始した厚生労働科学研究費補助金「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。RD はマッシュルーム由来チロシナーゼに酸化されて *o*-キノンになり、さらに還元反応により生じた 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (RD catechol) カテコールとして検出された。一方、Raspberry ketone (RK) 等の 4 置換フェノールでも同様に酸化されるものがあった。

白斑誘導が知られる 4 置換フェノールは共通してチロシナーゼで酸化され、白斑発症との関連が強く示唆される。薬用化粧品の安全性確保のため、

試験方法の開発が望まれることから、協力研究者伊藤は厚生労働行政推進調査事業費補助金「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」の分担研究「安全性評価法の構築(II)」において、チロシナーゼによる酸化を検出する試験法の開発を検討した。マッシュルームチロシナーゼによるRDの酸化をRDの減少とRD catecholの検出により確認し、また、フェノールの構造による酸化の有無を判別できる方法を開発した(Ito and Wakamatsu, J Dermatol Sci 2015; 80:18-24)。さらに、不安定な*o*-キノンにシステイン含有ペプチドを結合させて安定化する方法を検討した。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)を用いたところ、ペプチドと結合したRD catecholがLC/MSにより検出された。

これまでの白斑誘導性フェノール類の研究には入手の容易なマッシュルームチロシナーゼが主に使用されてきた。しかし、ヒトの安全性評価の目的にはヒトチロシナーゼを用いる方法が望ましい。

ヒトチロシナーゼは膜貫通型のタンパクであるが、膜貫通ドメインを切断しても活性を維持した可能性タンパクとして動物細胞に発現できることがCordesらにより報告されている(Biol Chem 2013; 394:685-693)ため、「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」分担研究「安全性評価法の構築(III)」(最上知子)において、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞におけるヒトチロシナーゼの一過性発現を検討した。

本研究では、このヒトチロシナーゼを用いてRD等の4置換フェノールの*in vitro*酸化が起こるか検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料および試薬

フェノールとして rhododendrol (RD), raspberry ketone (RK), 4-benzyloxyphenol (BzP, monobenzone), 4-methoxyphenol (MoP), 4-*tert*-butylphenol (TBP), 4-*S*-cysteaminyphenol (CAP),

4-methylphenol (MeP, *p*-cresol), 4-chlorophenol (CIP), resveratrol (RES), rucinol (RUS, 4-butylresorcinol), methyl 4-hydroxybenzoate (MOB, methylparaben)及びapigeninを用いた(Fig. 1)。

RD-catechol, RK-catechol, benzyloxycatechol, methoxycatechol, *tert*-butylcatechol, Me-catechol及びCl-catecholは市販品あるいはマッシュルームチロシナーゼで酸化して調製した。

ヒトチロシナーゼは、膜貫通ドメインを欠くアミノ酸残基 1-438 に相当するcDNAとHisタグをベクターに組み込み、293T細胞に一過性に発現させ調製した。培地に分泌された可溶性ヒトチロシナーゼを回収・精製・脱塩を行った。詳細は平成28年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「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」分担研究報告書「安全性評価法の構築(III)」(最上知子)に記載した。

### 2. ヒトチロシナーゼによる酸化

フェノール体 100  $\mu$ M をL-ドーパ 10  $\mu$ M の存在下、pH 7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液 100  $\mu$ L 中でヒトチロシナーゼ 10  $\mu$ L 又は 20  $\mu$ L により 37  $^{\circ}$ C で酸化した。反応は、30分後に反応液 20  $\mu$ L に、5 mM アスコルビン酸 5  $\mu$ L、ついで 0.8M HClO<sub>4</sub> 25  $\mu$ L を加えて停止した。この 25  $\mu$ L を HPLC に注入し、分析した。HPLC 条件は、Ito and Wakamatsu の方法に準拠しフェノール及びカテコールを定量した。

## C. 研究結果

11 種のフェノールをヒトチロシナーゼと 30 分間反応させた。RD, RK, BzP, MeP, RES, MoP, TBP, CAP 及び CIP についてはフェノールの減少が見られた。このうち、RD, RK, BzP, MoP, MeP, TBP 及び CIP については同時に対応するカテコールである RD-catechol, RK-catechol, benzyloxycatechol, methoxycatechol, *tert*-butylcatechol, Me-catechol 及び Cl-catechol が検出された。CAP からはベンゾキノン体が検

出され、RES については2つの生成物が見られた。RUS はフェノールの減少が見られず、MOB はわずかに減少したものの生成物が検出されなかった。

難溶性の apigenin は5% DMSO の存在下では溶解するが、マッシュルームチロシナーゼによっても酸化されないことから本実験の基質としては用いなかった。

Fig. 2 に30分間に消費されたフェノールと生成したカテコールの量を3回の実験の平均値±SEMとして示した。反応性が高いのは、RD, RK, BzP, MeP, RES であり、MoP, TBP, CAP, CIP はやや低かった。

以上の結果、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。主たる生成物は、*o*-キノン体あるいはカテコール体であった。

#### D. 考察

Rhododendrol (RD) 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発症と関連していることが強く示唆される。それに続く発症メカニズムは明らかになっていないが、チロシナーゼにより酸化を受けることを検出可能な試験方法の開発が望まれる。そこで「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」の分担研究「安全性評価法の構築(II)」において、伊藤はフェノール類のチロシナーゼに対する反応性を検討した。チロシナーゼとしては試薬として入手が容易なマッシュルームチロシナーゼを用いた。その結果、RD, RK, BzP, MoP 及び TBP について基質が減少し、対応するカテコールが検出され、酸化が起これを確認した(Ito and Wakamatsu (2015))。また、MeP, RES, CAP 及び CIP についても酸化が起これを確認した。

ヒトの安全性評価の目的にはヒトチロシナーゼを用いる方法が望ましい。チロシナーゼの阻害剤

に関しては、マッシュルームチロシナーゼとヒトチロシナーゼに特異性に違いがあることが最近 Kolbe らにより報告され(Mann *et al.* J Inv Dermatol 2018; in press)たことから、安全性評価についてヒトチロシナーゼを用いる必要性が支持される。そこで、この手法によりフェノールの酸化を観察することが可能であることが示されたため、ヒトチロシナーゼを用いた反応を検討することとした。

RD はマッシュルームチロシナーゼの場合と同様に RD-catechol が検出され、今回用いたリコンビナントヒトチロシナーゼが *in vitro* 系で RD を酸化できることが示された。

他の4置換フェノールでは、RK, BzP, MeP, RES, MoP, TBP, CAP 及び CIP は RD と同様に酸化された。しかし、RUS 及び MOB は酸化が見られなかった。以上の結果はマッシュルームチロシナーゼの場合と同様であった。

#### E. 結論

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。主たる生成物は、*o*-キノン体あるいはカテコール体であった。チロシナーゼによる代謝活性化を用いる検出法としての条件の一部が満たされた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

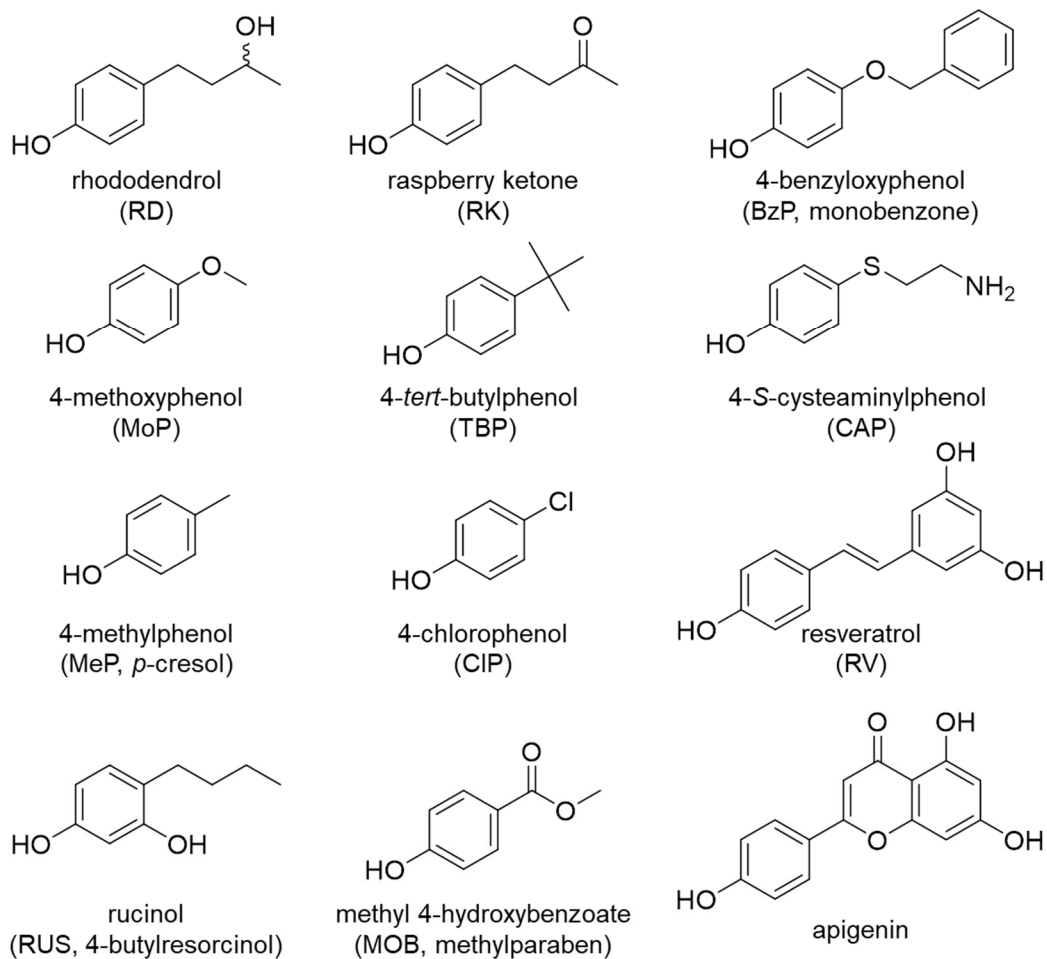
なし

##### 2. 学会発表

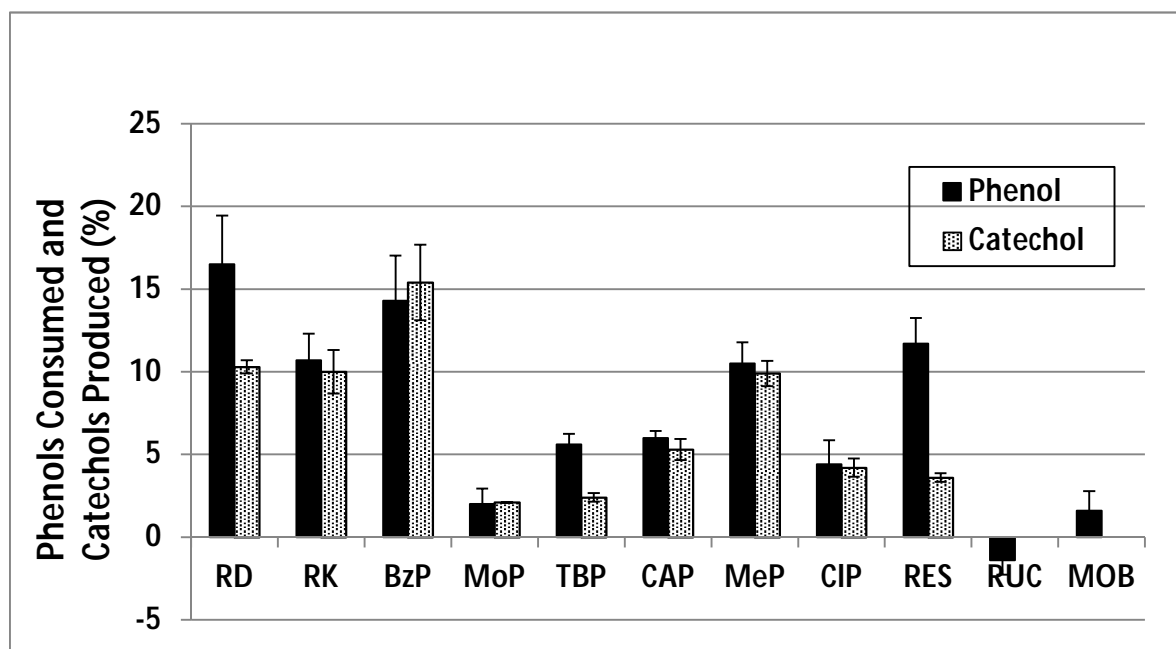
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録 3. その他 なし



**Fig. 1.** Structures of 4-substituted phenols.



**Fig. 2.** Effects of Human Tyrosinase on Various Phenols.

## 安全性評価法(代謝物分析系)の構築 (II)

研究分担者 伊藤 祥輔 藤田保健衛生大学医療科学部 名誉教授

### 研究要旨:

ロドデノール(RD)はチロシナーゼの基質となり毒性代謝物オルトキノンを生産するが、その後の代謝は不明であった。昨年度は RD-ユーメラニン(RD-EM)が強い酸化促進作用を示すことを示したので、今年度は、その作用が UVA 照射により増強されるか否かを調べた。RD-ユーメラニンを合成し、細胞内抗酸化物質の酸化促進作用を比較検討した。その結果、RD-ユーメラニンによるグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、および NADH の酸化は UVA 照射により2~4倍に増強された。同時に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生じた。これは RD 白斑が塗布部に多く、夏季に顕著であるという知見と一致する。

### A. 研究目的

ロドデノール(RD)はチロシナーゼ活性に依存して細胞傷害性を示すが、その機序の全貌は未だ解明されていない。昨年度は 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。

### B. 研究方法

RD-ユーメラニン(RD-EM)は 0.1 mM RD をチロシナーゼで2時間酸化して調製した。これに 1 mM のグルタチオン、システイン、アスコルビン酸、あるいは NADH を加え、UVA 照射(3.5 mW/cm<sup>2</sup>)下で2時間反応させ、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。

### C. 研究結果

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。

### D. 考察

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生産する。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、夏季に顕著であるという臨床所見に一致する。

### E. 結論

RDのチロシナーゼ酸化はRD-キノンおよびRD-ユーメラニンを産生し、前者は細胞内タンパクと結合す



ることにより、また後者は細胞内抗酸化物質を酸化(枯渇)して同時に活性酸素を産生することにより細胞傷害性を惹起しているものと考えられる。後者の機序はUVAにより増強される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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, 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, published online, 2018. DOI: 10.1111/pcmr.12969.

Ito S, Wakamatsu K. Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *Int. J. Mol. Sci.*

19, 552, 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.*, accepted for publication, 2018.

### 2. 学会発表

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.

## 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

## 安全性評価法(細胞系)の構築

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 主任研究官

### 研究要旨:

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を検討した。ロドデノールを含む白斑誘導性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体に代謝されることが報告されている。白斑誘導性の四化合物(ロドデノール、4SCAP、MBEH、4TBP)について、チロシナーゼ依存性の細胞毒性増強が認められるか、チロシナーゼ発現の高いメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、チロシナーゼを阻害、siRNA ノックダウン、cAMP 誘導で検討した。予想通りのチロシナーゼ依存性は4SCAPのみ認められ、ロドデノールを含む三化合物には認められなかった。これは昨期のヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた結果や、MBEH・4TBP については過去の文献報告に一致している。したがって、ロドデノールを含め白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼによる代謝活性化は必ずしも細胞毒性にはつながらず、白斑発症に関連する他の細胞応答を明らかにする必要性が示唆される。

### 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に関しては、これまで白斑病変部での表皮色素細胞メラノサイトの消失、ロドデノールのチロシナーゼによる代謝、チロシナーゼ依存性のメラノサイト毒性などが報告されている。類似の4-アルキル/アリル置換フェノール構造を有する白斑誘導性化合物については、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されることが報告されており、白斑発症において、化合物のチロシナーゼによる代謝活性化とメラノサイト傷害の関与が強く示唆される。

そこで前期研究班(平成27-28年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「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」)の分担研究「安全性評価法の構築(III)」において、白斑誘導性フェノール類の代謝活性化がメラノサイト傷害をもたらす可能性を検証した。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として、メラノーマ細胞 B16 のチロシナーゼ

発現を変化させ、ヒトチロシナーゼ強制発現 293T 細胞を用い検討した。しかしながら、ともにロドデノールの細胞毒性にチロシナーゼ依存性は認められず、では、チロシナーゼ発現による細胞毒性増強が4S-システアミニルフェノール(4SCAP)とともに、内因性チロシンに対しても顕著に観察された。ロドデノールなど外来のフェノール類はオルトキノン体に代謝され毒性を発揮すると予測していたが、内因性チロシン代謝物ドーパキノンの毒性も同様に顕著であることが示唆される。

本研究においては、引き続きメラニン合成系、白斑発症関連因子の改変により細胞感受性の増強を図り、白斑発症と強く相関する細胞応答を明らかにし、評価に有用な細胞モデルを構築することを目的とする。今年度は、チロシナーゼの発現量が高い B16BL メラノーマ細胞の利用、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞へのメラニン合成系下流遺伝子 TYRP1 の共発現により、細胞毒性感受性の増強を試みた。

## 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、細胞毒性へのチロシナーゼや関連タンパクの役割を解析した。マウス B16BL6 メラノーマ細胞は播種 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。フェニルチオウレア(PTU) 100  $\mu$ M 前処理によりチロシナーゼを阻害し、diBi-cAMP 200  $\mu$ M 前処理によりチロシナーゼ発現誘導を行った。またチロシナーゼ特異的 siRNA (Stealth<sup>TM</sup> Select RNAi, Invitrogen, #1 ~ #3) トランスフェクションによりチロシナーゼをノックダウンした。チロシナーゼノックダウン効率および発現誘導は、mRNA をリアルタイム PCR で測定し判定した。

また HEK293T 細胞にヒトチロシナーゼ遺伝子 (NM\_000372) をチロシナーゼ関連タンパク 1 (TYRP1) 遺伝子 (NM\_000550) の共存下/非共存下一過性に発現させ、24 時間後に薬物処理を開始し、24 および 48 時間後の細胞生存率を ATP 含量の測定により決定した。チロシナーゼ発現量はリアルタイム PCR で mRNA を測定、あるいはウェスタンブロットング、ならびに酵素活性の測定により判定した。

## C. 研究結果

### 1. B16BL 細胞のチロシナーゼ発現量変化による細胞毒性評価

ロドデノール (RD) および白斑誘導性類似化合物 (モノベンジルエーテルヒドロキノン (MBEH)、4-ter-ブチルフェノール (4-TBP)、4SCAP など) はチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝活性化されることが報告されている。チロシナーゼによる代謝活性化が細胞毒性増強をもたらす可能性を検証するために、前期研究班では B16 メラノーマ細胞を用い検討を行ったが、ロドデノール毒性にチロシナーゼ依存性は認められなかった (平成 27 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金「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」分担研究報告書「安全性評価法の構築 (III)」)。今年度はチロシナーゼ発現量の高いメラノーマ細胞 B16BL6 を用いて再度検討を行った。

B16BL6 細胞のチロシナーゼ mRNA 発現レベルは B16 細胞の約 60 倍高かった。ロドデノール (0.1 ~ 3mM)、4SCAP (0.003 ~ 0.3mM)、MBEH (0.01 ~ 1mM)、4-TBP (0.03 ~ 3mM) 処理により細胞生存率は 24 時間後でそれぞれ最大 50%、0%、30%、0%まで低下した。チロシナーゼ阻害剤フェニルチオウレア (100  $\mu$ M) で処理した場合には、細胞生存率は 4SCAP 0.1mM では 10%が 70%に (図 A)、0.3mM では 0%が 55%に上昇し、4SCAP 添加による低下が抑制された。しかしながら、ロドデノール、MBEH、4-TBP の場合には影響は認められなかった。

引き続き 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。細胞生存率は 24 時間の 4SCAP 0.3mM 処理細胞では 0%であったが、三種類の siRNA 前処理により 90%、85%、95%に上昇し、4SCAP による低下がほぼ完全に抑制されることが判明した。一方、ロドデノール、MBEH、4-TBP の場合には、三種類の siRNA による共通の影響は認められなかった (図 C)。したがって、4SCAP はチロシナーゼに依存した細胞毒性が明確に認められる一方、他三種類の化合物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。

さらに細胞を diBu-cAMP (200 $\mu$ M) で前処理することにより、チロシナーゼを誘導した。チロシナーゼ mRNA レベルは 1.2 倍に増加し、4SCAP 0.03mM 処理細胞の生存率は 90%から 25%に低下し (図 B)、チロシナーゼ発現の増加は 4SACP の毒性を増強することが示された。

### 2. ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞へのメラニン合成系下流遺伝子共発現

白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ代謝による細胞毒性増強を検出する細胞モデルの

構築をめざし、前期研究班においては 293T 細胞にヒトチロシナーゼを発現させ検討した。4SCAP では顕著な細胞毒性増強が観察されたが、ロドデノール、MBEH、4-TBP の場合には影響は認められなかった。この系では内因性チロシン代謝による毒性が経時的に発現したことから、メラニン合成系におけるチロシナーゼ下流遺伝子を共発現することにより、内因性毒性の抑制を試みた。

今年度はチロシナーゼ関連タンパク 1 (TYRP1) を対象にヒトチロシナーゼとの共発現条件の検討を行い、チロシナーゼ活性に大きく影響せずに TYRP1 が共発現される条件を見いだした。タグ抗体のウェスタンブロットにより、チロシナーゼとほぼ同等の TYRP1 発現を確認した。この条件下で細胞の生存率は、チロシナーゼ発現により 24 時間後に約 30% に低下したが、TYRP1 の共発現により約 70% まで回復しており、内因性チロシン由来の毒性抑制が可能であることが示唆された。

#### D. 考察

ロドデノールや類似の白斑誘導性 4-置換フェノール類は、共通してチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝される。ロドデノールの場合には、特定のメラノサイトにおいて代謝によるメラノサイト毒性増強が見いだされ、白斑発症との関連が示唆されている。しかしながらメラノサイトの個体差も同時に報告され、「チロシナーゼ代謝によるメラノサイト毒性増強」がロドデノールを含め白斑誘導性フェノール類に広く共通して認められる応答であるのか解明が望まれる。

本研究では昨期に引き続き、メラノサイトに代替する細胞モデルを構築し、「代謝活性化によるメラノサイト傷害仮説」の検証を試みた。今年度はチロシナーゼの発現量の高いメラノーマ細胞 B16BL6 を用い、チロシナーゼ活性/発現量を阻害剤、siRNA ノックダウン、cAMP による発現誘導の三つの手段で変化させ、白斑誘導性フェノール類の細

胞毒性への影響を検討した。4-SCAP の場合はチロシナーゼに依存した細胞毒性の増強が認められたが、ロドデノール、MBEH、4-TBP による細胞毒性には認められなかった。この結果は、昨期において、ヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞で得られた結果と同様である。また過去の文献情報を精査すると、4-SCAP はチロシナーゼによる毒性増強が報告されているが、4-TBP、MBEH については細胞毒性へのチロシナーゼ依存性は否定されており、本研究の結果と一致している。

ロドデノールや類似構造の 4-置換フェノール類がチロシナーゼにより代謝されて生成するオルトキノン体は、付加反応性が極めて高い。細胞内 SH 基との反応を引き起こし、グルタチオン・システイン等の細胞内 SH プールの枯渇をもたらす。またオルトキノン体やさらなる代謝産物が ROS を産生し、毒性を発揮すると推定されている。

しかしながらヒトチロシナーゼ発現 293T 細胞を用いた検討により、内因性チロシンもチロシナーゼにより毒性が増強されることが判明した。生成する DOPA キノンも 4-置換フェノール類のオルトキノン代謝物と同様の反応性・毒性を有しており、メラノサイト/メラノーマ細胞には内因性チロシン代謝による毒性発現を防止するシステムが備わっていることが推定される。このために、ロドデノールや白斑誘導性フェノール類の代謝は必ずしも細胞毒性をもたらさないと推定される。

ロドデノールをはじめとする白斑誘導性の 4-置換フェノール類がチロシナーゼによりオルトキノン体に代謝されることは、これまで複数の研究機関から報告されており、白斑発症との強い関連が推定される。白斑発症をもたらす細胞応答は、オルトキノン体生成以降、細胞死以前に存在する可能性が推定されるが、解明にはさらなる研究の進展を待つ必要がある。オルトキノンと細胞内 SH 基との反応は、酸化ストレス亢進に加え、タンパク修飾により機能不全や抗原提示を促進する可能性が推定される。次年度においては、初発段階である「チロシナーゼによるオルトキノン体への代謝」の評価

に焦点を絞った検討を進める予定である。

### E. 結論

ロドデノールや白斑誘導性フェノール類のチロシナーゼ代謝は必ずしも細胞毒性をもたらさないことを、複数の細胞モデルで示した。ヒトチロシナーゼとTYRP1の共発現により内因性チロシン代謝による毒性抑制の可能性が示された。

### 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 2. 実用新案登録 3. その他

なし

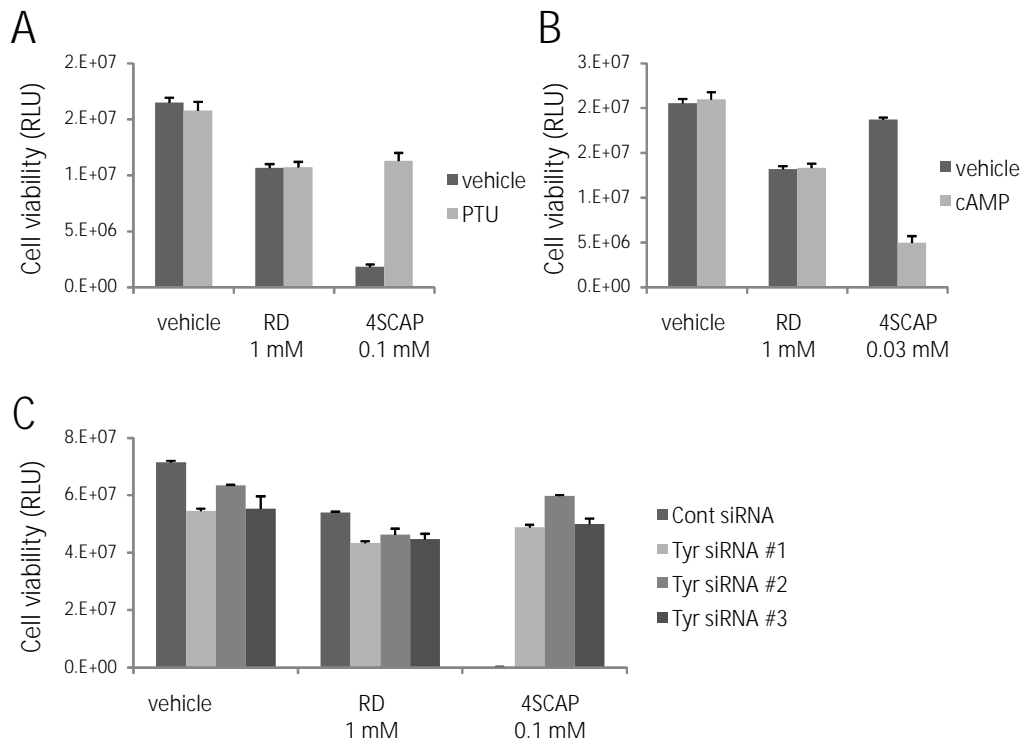


図1. メラノーマ細胞B16BL6におけるロドデノール(RD)および4SCAPの細胞毒性  
(A)チロシナーゼ阻害剤PTU, (B)diBucAMP処理, (C)チロシナーゼsiRNAノックダウンによる影響

## 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	第X 章 皮膚疾患	松田暉 / 萩原俊男 / 難波光義 / 鈴木久美 / 林直子	疾病と治療	南江堂		2017	編集
片山一朗	Ⅲ皮膚癢痒症 1皮膚癢痒症.	渡辺晋一・古川福実	皮膚疾患 最新の治療2017-2018	南江堂	東京	2017	pp55-6
片山一朗	第X 章 皮膚疾患 2. 皮膚疾患各論 E. 蕁麻疹	松田暉、萩原俊男、難波光義、鈴木久美、林直子	疾病と治療	南江堂	東京	2017	pp81-2
片山一朗	コラム2.	秋山一男、大田健、近藤直実	アトピー性皮膚炎とフィラグリン アレルギーのはなし	朝倉書店	東京	2017	p97
片山一朗	12リウマチ・アレルギー 12-34その他のアレルギー疾患 1)じんま診・血管浮腫	矢崎義雄	内科学 第11版	朝倉書店	東京	2017	1334-6
鈴木民夫	尋常性白斑	福井次矢ら	今日の治療指針2017私はこう治療している	医学書院	東京	2017	1226
鈴木民夫	母斑細胞母斑	渡辺晋一ら	皮膚疾患最新の治療2017 2018	南江堂	東京	2017	241-242
鈴木民夫	尋常性白斑	猿田享男, 北村惣一郎	1336専門家による私の治療2017-18年度版	日本医事新報社	東京	2017	1023-1025

## 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
Ito S, Okura M, Wakamatsu K, Yamashita T	The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells	<i>Pigment Cell Melanoma Research</i>	30	63-67	2017

Ito S, Agata M, Okochi K, Wakamatsu K	The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation	<i>Pigment Cell Melanoma Research</i>	31	Published online	2018
Ito S, Wakamatsu, K	Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>	19	522	2018
Goto N, Tsujimoto M, 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 stresses	<i>Experimental Dermatology</i>	in press		2018
Takeuchi Y, et al	Clinical response to PD-1 blockade correlates with a sub-fraction of peripheral central memory CD4+ T cells in patients with malignant melanoma.	<i>Int Immunol.</i>	30(1)	13-22.	2018
Yamaga K, et al	Claudin-3 loss causes leakage of sweat from the sweat gland to contribute to the pathogenesis of atopic dermatitis.	<i>J Invest Dermatol.</i>	in press		2017
Yang F, et al	Dysregulation of autophagy in melanocytes contributes to hypopigmented macules in tuberous sclerosis complex.	<i>J Dermatol Sci</i>	in press		2017
Yang F, et al	Uncoupling of ER/mitochondrial oxidative stress in mTORC1 hyperactivation-associated skin hypopigmentation.	<i>J Invest Dermatol.</i>	in press		2017
Murota H, et al	Periostin in the pathogenesis of skin diseases.	<i>Cell Mol Life Sci.</i>	74	4321-4328	2017
Murota H, et al	Impact of Jumihaidokuto (Shi-Wei-Bai-Du-Tang) on treatment of chronic spontaneous urticaria: A randomized controlled study.	<i>Chin J Integr Med.</i>	in press		2017
Kurata R, et al	Three-dimensional cell shapes and arrangements in human sweat glands as revealed by whole-mount immunostaining.	<i>PLoS One.</i>	12	e0178709	2017
Nakagami H, et al	Physician-initiated first-in-human clinical study using a novel angiogenic peptide, AG30/5C, for patients with severe limb ulcers.	<i>Geriatr Gerontol Int.</i>	Nov;17(11)	2150-2156	2017
Itoi-Ochi S, et al	Occult HIV infection in Japanese rupioid psoriasis.	<i>J Dermatol.</i>	Jul;44(7)	e172-e173	2017

Arase N, et al	Novel autoantibody against the $\beta$ 2-glycoprotein I/human leucocyte antigen-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcers.	<i>Br J Dermatol.</i>	178	272-275	2018
Kato K, et al	Novel interferon- $\gamma$ enzyme-linked immunoSpot assay using activated cells for identifying hypersensitivity-inducing drug culprits.	<i>J Dermatol Sci.</i>	86	222-229	2017
Kamei R, et al	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. 35 Suppl.	<i>Clin Exp Rheumatol.</i>	106	214-215	2017
Kaneko S, et al	Usefulness of Sweat Management for Patients with Adult Atopic Dermatitis, regardless of Sweat Allergy: A Pilot Study.	<i>Biomed Res Int.</i>	2017	8746745	2017
Katayama I, et al	Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for atopic dermatitis 2017.	<i>Allergol Int.</i>	66	230-247	2017
Katayama I, et al	Itch: Its perception and involvement in allergy.	<i>Allergol Int.</i>	66	1-2	2017
Yamaoka T, et al	Value of ultrasonography findings for nail psoriasis before and after adalimumab administration.	<i>Clin Exp Dermatol.</i>	42	201-203	2017
Gan EY, et al	VGICC Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	30	28-40	2017
Murota H, et al	Exacerbating factors of itch in atopic dermatitis.	<i>Allergol Int.</i>	66	8-13	2017
Wataya-Kaneda M, et al	Efficacy and Safety of Topical Sirolimus Therapy for Facial Angiofibromas in the Tuberous Sclerosis Complex : A Randomized Clinical Trial.	<i>JAMA Dermatol.</i>	153	39-48	2017
Deguchi A, et al	Anti-RNA polymerase III antibody positive limited cutaneous systemic sclerosis with cryoglobulin-induced digital gangrene.	<i>Clin Exp Dermatol.</i>	42	200-201	2017
Tanaka A, et al	Critical renal adverse event induced by nivolumab therapy in a stage IV melanoma patient.	<i>J Dermatol.</i>	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.	<i>J Dermatol</i>	On line published	doi: 10.1111/1346-8138.1415	2017
Omura R, et al	Ultrastructural study of dyschromatosis symmetrica hereditaria with widespread pigmentary eruption.	<i>J Dermatol.</i>	44	150-151	2017
Okamura K, et al	Characterization of melanosomes and melanin in Japanese patients with Hermansky-Pudlak syndrome types 1, 4, 6, and 9.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	31	267-276	2018
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.	<i>J Dermatol Sci</i>	85	131-134	2017
Ozaki S, et al	Melanotic Malignant Melanoma in Oculocutaneous Albinism Type 4.	<i>Acta Derm Venereol.</i>	97	287-288	2017
Gan EY, et al	VGICC.: Repigmentation in vitiligo: position paper of the Vitiligo Global Issues Consensus Conference.	<i>Pigment Cell Melanoma Res.</i>	30	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.	<i>Skin Res Technol.</i>	On line published	doi: 10.1111/srt.12410.	2017