

令和元年6月7日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10123

研究課題名(和文) 化学物質誘発性尋常性白斑の発症に関与する感受性遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analyzes of chemical-induced vitiligo susceptibility genes.

研究代表者

鈴木 民夫 (Suzuki, Tamio)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30206502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ロドデノール誘発性脱色素斑(RD白斑)発症に関わる感受性遺伝子を明らかにすることにより、化学物質誘発性尋常性白斑に共通する遺伝的背景を解明することを目的とした。259人(RD白斑患者147人、RD-Control 112人)遺伝子を用いてGWASを行った結果、 5×10^{-8} を超えたSNPは認められなかったが、 10^{-6} を採用したところ、少なくとも3つの遺伝子(匿名にて記載：A, B, C)が該当した。その遺伝子の機能解析を行い、少なくとも遺伝子Aについては、感受性遺伝子の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2013年7月に社会問題となったRD白斑は、当該化粧品を使用したすべての人に発症しているわけではなく、発症率は使用者の約2%強であった。この発症率はこれまでに報告されてきた他の化学物質誘発性尋常性白斑の発症率とほぼ同様であったことから、化学白斑発症には共通する感受性遺伝子の存在が予想されていたが、本研究により、そのうちの1つを明らかにすることができた。この遺伝子多型を持つ人は、化学物質誘発性尋常性白斑の発症の危険性が高いことを化粧品等を使用前に予想することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：In order to identify susceptibility genes for chemical-induced vitiligo, we identified at least one gene in genome-wide association study in 147 patients with Rhododendrol-induced leukoderma (RD) and 112 controls. No loci did not achieve genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$), however, 3 loci achieved suggestive level ($P < 10^{-6}$). Functional investigation revealed that one of the 3 loci, gene A, would be a susceptibility gene for RD with siRNA and expression experiments. Furthermore, the gene A was turned out to not contribute susceptibility to another chemicals.

研究分野：皮膚科学

キーワード：尋常性白斑 化学物質誘発性白斑 感受性遺伝子 ロドデノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本で2013年7月に社会問題となったロドデノール誘発性脱色素斑(以下、RD 白斑)の症例では、顔面、頸部、手背、前腕などのRD含有化粧品使用部位に白斑が認められたが、当該化粧品を使用したすべての人に発症したわけではなく、発症率は使用者の約2%であった。これは、これまで報告されてきた主にフェノール類やカテコール類、そしてその誘導体による化学物質誘発性尋常性白斑(chemicals triggering occupational vitiligo; 以下 co-Vit)の発症頻度と同様であった。また、これまでにRD白斑の病態については、in vitroの研究からロドデノール代謝産物によるメラノサイトへの細胞毒性、ファゴソームの機能不全、局所の免疫応答の関わり等が報告されてきているが、これらの報告は発症頻度が約2%であることに對して解答を与えていない。以上のことから、RD白斑を含めてco-Vit全体に共通する遺伝的背景が存在し、白斑発症に大きく関わっていると予想され、この遺伝的背景・遺伝子を明らかにすることが学問的に重要になった。

2. 研究の目的

本研究は、co-Vitに共通する遺伝的背景を明らかにすることを最終目的とし、そのためにまずはRD白斑発症に関与する感受性遺伝子(以下、RD感受性遺伝子)を明らかにする。そして、明らかにしたその遺伝子が他のco-Vit発症に関わっているかどうかについてを確認する。一方で、未だ不明点多いRD白斑発症のさらなる病態解明を目指し、その結果を踏まえた新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

我々は本研究遂行のためにRD白斑患者計230症例、ロドデノールを使用しても白斑が生じなかったコントロール計136名から唾液試料収集を行い、DNAを抽出した。その後の解析にて不適切と判明した25人(患者群9人、コントロール群16人)の試料を取り除き、最終的には計341名のDNAサンプルを高密度SNPチップ(HumanOmni2.5-8 v1.1)で遺伝子型判定を行った。そして、遺伝子型結果と臨床症状の関連性(GWAS)を行った。その結果、明らかとなった感受性遺伝子候補の機能を培養メラノサイトを用いたin vitro実験系で解析した。まずは、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のOMIMやPubmed等のデータベースを使用して、既知の情報を集めて検討した。その後、培養細胞メラノサイトを用いて、その発現を明らかにする。また同時に、培地にRDを添付した時の候補遺伝子の発現の変動を経時的に観察した。その後、RD感受性が異なる培養メラノサイト13種のRD負荷時のRD感受性候補遺伝子の発現応答を明らかにし、RD感受性との相関関係を明らかにする。一方で、各RD感受性遺伝子候補に特異的なsiRNAを作製し、培養メラノサイトに添加して各感受性遺伝子候補を特異的に発現抑制することにより、RD感受性の変化を明らかにする。以上の方法により、統計解析により明らかになったRD感受性遺伝子候補の中から、真のRD感受性遺伝子を同定する。

次に明らかとなったRD感受性遺伝子を再度ノックダウンさせて、これまでにco-Vitの原因として報告されているフェノール類の添加実験を行ない、同定した遺伝子がRD感受性遺伝子であるのみならずco-Vitの感受性遺伝子であるかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) GWASの結果について: 221人の白斑患者 vs. 120人のRD白斑発症しなかった群をLogistic regression analysisを行ったところ、 $P < 5 \times 10^{-8}$ 以下のピークは認められなかった。そこで、年齢とRD使用量(本数)のデータがある259人(Case 147人、RD-Control 112人)

を使用して、再度、259人について主成分分析を行い、4つの主成分、年齢、使用量を調整したロジスティック回帰モデルにより、GWASを行った。その結果、やはり有意水準のベンチマークである genome-wide significance (一般的に 5×10^{-8} 以下) を超えた SNP は認められなかったが、 10^{-6} を suggestive として採用したところ、少なくとも3つの遺伝子(匿名にて記載: A, B, C) が該当した。

(2) 機能解析結果について: GWASの結果から得られた3つの候補遺伝子について以下の方法で解析した。

各種データベースを使用して、各遺伝子の既知の機能や組織発現を検討したところ、いずれもメラノサイトにおいて遺伝子発現されており、白斑発症に何らかの関わりが予想された。

3種類の候補遺伝子に特異的な siRNA を作製し、培養メラノサイトに添加して各遺伝子を実験的に発現抑制して、RD 感受性の変化を確認したところ、3種のうち2種類の遺伝子(A, C)に関してはRD 感受性の変化が認められたが、培養条件や使用する細胞によって結果の再現性が得られなかった。siRNA の配列を作成し直すのに加え、RD の至適添加濃度設定を繰り返して、最終的に遺伝子 A についてはノックダウンすることにより RD に対して感受性が増すことを明らかにした。

遺伝子 A の発現抑制が、ロドデノール感受性を高める機序として、チロシナーゼ酵素の発現量の増加ならびに抗アポトーシス分子の発現量の低下の可能性を示した。

培養メラノサイトの培地に RD を添付した時の候補遺伝子の発現の変動を経時的に観察したところ、いずれの遺伝子も遺伝子発現誘導はかからなかった。

RD 感受性が異なる培養メラノサイト 13 種(Kasamatsu S, et al. J Dermatol Sci 76:16-24, 2014) における RD 負荷時の発現を解析したが、3種類の遺伝子には大きな変動は認められなかった。

これらの結果から、遺伝子 A の発現抑制がメラノサイトにおけるロドデノール感受性を高め、ロドデノール誘発性脱色素斑の発症のしやすさに関与することが示唆された。しかしながら、contribution はさほど大きくないことが予想された。

(3) 遺伝子 A の co-Vit に対する効果について: これまでに化学白斑を発症させることが報告されているメラノサイトの MBEH, 4TBP 等の物質に対する高感受性について検討した。遺伝子 A を siRNA によってノックダウンさせ、上記と同様な手法で感受性の変化を観察した。その結果、有意な差のある感受性の変化は認められなかった。以上の結果より、遺伝子 A は co-Vit 全体に貢献している可能性は低いと考えられた。

(4) 我々がこれまでに確立した RD 白斑モデルマウスを使用してそれぞれの遺伝子 A, B, C 産物の発現やその増減を解析したが、明らかな変化は認めなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 34 件)

1. Tsutsumi R, Sugita K, Abe Y, Hozumi Y, Suzuki T, Yamada N, Yoshida Y, Yamamoto O: Leukoderma induced by rhododendrol is different from leukoderma of vitiligo in pathogenesis: A novel comparative morphological study. J Cutan Pathol. 46(2):123-129. (2019) doi: 10.1111/cup.13396. 査読あり
2. Bae JM, Oh SH, Kang HY, Ryoo YW, Lan CE, Xiang LH, Kim KH, Suzuki T, Katayama I, Lee SC; East Asia Vitiligo Association.: Development and validation of the Vitiligo Extent Score for a Target Area (VESTA) to assess the treatment response of a target

lesion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32(2):315-319. (2018) doi: 10.1111/pcmr.12730.

査読あり

3. Hayashi M, Okamura K, Araki Y, Suzuki M, Tanaka T, Abe Y, Nakano S, Yoshizawa J, Hozumi Y, Inoie M, Suzuki T: Spectrophotometer is useful for assessing vitiligo and chemical leukoderma severity by quantifying color difference with surrounding normally pigmented skin. *Skin Res Technol.* 24(2):175-179. (2018) doi:10.1111/srt.12410. 査読あり
4. 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(1):28-40. (2017) doi: 10.1111/pcmr.12561. 査読あり
5. Okamura K, Hayashi M, Abe Y, Araki Y, Hozumi Y, Suzuki T: 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) doi:10.1016/j.jdermsci.2016.10.012. 査読あり

[学会発表](計14件)

1. Chemical vitiligo: instructive evidence that we have learned from Rhododendrol-induced leukoderma. Tamio Suzuki: The 70th KDA Annual Autumn Meeting Seoul COEX Intercontinental Hotel, Seoul. Korea, October 20-21, 2018
2. Repigmentation in a vitiligo mouse model. Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Yutaka Hozumi, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito: The 2nd EAVA meeting Annual Meeting, Osaka International Convention Center, Osaka, March 9, 2018
3. Repigmentation in a vitiligo mouse model. Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Yutaka Hozumi, Kazumasa Wakamatsu, Shosuke Ito: The 2nd EAVA meeting Annual Meeting, Osaka International Convention Center, Osaka, March 9, 2018
4. Rhododendrol-induced leukoderma analyzed with a model mouse: Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu: VITILIGO INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2016, the hotel NH Vittorio Veneto, Roma, Dec. 2-3, 2016
5. Rhododendrol-induced leukoderma in a mouse model mimicking Japanese skin: Tamio Suzuki, Yuko Abe, Ken Okamura, Masakazu Kawaguchi, Yutaka Hozumi, Hitomi Aoki, Takahiro Kunisada, Shosuke Ito, Kazumasa Wakamatsu, Kayoko Matsunaga, 1st meeting of the East-Asia Vitiligo Association. Severance Hospital, Seoul, Korea, April 16, 2016

[図書](計5件)

1. Masahiro Hayashi, and Tamio Suzuki. Albinism and Other Genetic Disorders of Pigmentation. Fitzpatrick's Dermatology 9th Edi. Edited by Sewon Kang et.al., Mc Graw Hill Education, 2019, P1309-1329

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ：<http://minfo2.id.yamagata-u.ac.jp/hifuka/index.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：穂積 豊、荒木 勇太、岡村 賢

ローマ字氏名： Hozumi Yutaka、Araki Yuta、Okamura Ken

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。