

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15375

研究課題名（和文）ロドデノール誘発性白斑症における隠蔽自己抗原の解析とその応用

研究課題名（英文）Analysis and its application of cryptic-self antigens in patients with rhododendrol-induced leukoderma

研究代表者

松下 祥（MATSUSHITA, SHO）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：50167649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：美白剤に含まれるロドデノール（rhododendrol）は皮膚の白斑症を誘発するため社会的問題となったが、その発症機序についての説明はすべての患者の症状を十分に説明出来るものではなかった。そこで我々は「隠蔽自己抗原」の概念を用いて、ロドデノールの結合を受けたチロシナーゼ蛋白から隠蔽自己抗原ペプチドが産生され、これを非自己と認識したT細胞によってメラノサイトが傷害される事、さらにはこの免疫応答を利用してロドデノールがメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を誘導出来る事を証明した。今後はロドデノールの臨床応用も視野に入れた研究や、尋常性白斑の研究にも発展させたい。

研究成果の概要（英文）：Rhododendrol, a phenolic compound contained in lightening/whitening cosmetics, can bind and inhibit tyrosinase, and was reported to induce leukoderma in Japan. Only 2% of the cosmetics users are affected, and tacrolimus is effective in the treatment. To test the hypothesis that the disease is an autoimmune disorder, short-term T-cell lines were established using PBMCs from 8 patients with human melanoma-associated and tyrosinase-derived synthetic peptides. Seven out of 8 patients were positive for HLA-DR4. Both class I- and class II-restricted and tyrosinase peptide-specific T-cell responses were observed. Immunization of mice with rhododendrol-treated and irradiated B16 melanoma cells successfully delayed the growth of melanoma cells in vivo. These observations collectively indicate that rhododendrol-induced leukoderma is an autoimmune disorder, with rhododendrol as an environmental factor and HLA-DR4 as a genetic factor. Rhododendrol might be effective in treating melanomas.

研究分野：医歯薬学

キーワード：メラノーマ ロドデノール 白斑症 自己免疫 T細胞 チロシナーゼ HLA 隠ぺい自己抗原

1. 研究開始当初の背景

2008～2013年にかけてロドデノールは皮膚の白斑症を誘発するとして大きな社会的問題となった。問題が発覚した当初、ロドデノールはチロシナーゼと結合しその働きを抑制するだけでなくヒドロキシロドデノール(ロドデノール自体より有毒)に変化しメラノサイトのアポトーシスを誘発するという発症機序が公表されたのだが、このアポトーシス誘導に必要なロドデノールの濃度は実際の皮膚局所で生じうる濃度の100倍以上と推測されているうちに、化粧品利用者のわずか2%しか影響を受けていない事、免疫抑制剤(例えばタクロリムス)がロドデノール誘発性白斑に効果がある事など、当初考えられていた機序だけでは白斑症発症を十分に説明することは難しいものだった。

化学反応の中には結合する基質の構造によっては酵素のコンフォーメーションが変化する事が知られている。つまりこれによってプロテアーゼのアクセシビリティも変化する。そこで今回、我々はロドデノールがチロシナーゼと結合する事により生理的には存在しないチロシナーゼ由来ペプチド断片(免疫学的非自己)を産生させ、T細胞の活性化が起こったという作業仮説のもと研究を行う事とした。また今回の作業仮説の元となる「隠蔽自己抗原ペプチド」の基礎的見地となる発見は、申請者らが1994年に明らかにした自己免疫病(インスリン自己免疫症候群)を端緒とする。インスリン分子はS-S結合が3カ所存在するペプチドダイマーだが、ここにバセドウ病の治療に用いられるメチマゾールのような還元剤が作用すると一部のS-S結合が切断されて、鎖のモノマーが出現する。この分子はHLA-DRB1\*04:06に高親和性で結合する構造モチーフを持っているため、生理的には存在しないHLA-ペプチド複合体が多数出現する。生体はこれを「免疫学的非自己」と勘違いしてT細胞を活性化し、

インスリンに対する抗体が産生されて低血糖のような症状を引き起す事は既に発見していた。

2. 研究の目的

ロドデノール誘発性白斑症がインスリン自己免疫症候群と同様「隠蔽自己抗原ペプチド」を介した自己免疫病であることを証明する事を目的とした。

3. 研究の方法

【ロドデノール誘発性白斑症患者検体の解析】埼玉医科大学病院 IRB の承認を得て研究を開始し、同意を得られたロドデノール誘発性白斑の患者8名より静脈血の提供を受けPBMCを分離した。

Peptide #	Sequence (position)	Restriction
1	DAEKCDICTDEY (p240-251)	HLA-A1
2	MLLAVLYCL (p1-9)	A2
3	YMDGTMSQV (p369-377)	A2
4	SEIWRDIDF (p192-200)	B44
5	AFLPWHRFL (p206-214)	A24
6	QNILLSNAPLGPQFP (p56-70)	DRB1*04:01
7	YSYLQSDSDPDSFQD (p448-462)	DRB1*04:01
8	NCTERLLVRRNIFDLSAPEK (p111-131)	DRB1*04:05
9	FLHHAFFVDSIFEQWLRHRP (p386-406)	DRB1*15:01
10	LLGGSEIWRDIDFAHEAPAF (p188-208)	DRB1*04:05
11	CLLWSFQTS (p8-17)	A2

HLA restriction shown in the table indicates a typical antigen-presenting molecule.

ヒトメラノーマ関連T細胞エピトープの各種報告に基づいて上記に記したチロシナーゼ由来のペプチドの合成を行った後、PBMCを共培養しT細胞株の樹立を行った。

T細胞株はチロシナーゼペプチドとX線照射(30Gy)処理を行った自己PBMCと共培養し72時間培養後に1μCi/wellの<sup>3</sup>H-thymidineで16時間処理、液体シンチレーションによって放射活性を測定し増殖反応を観察した。患者R02,R07,R08から得られたT細胞株はペプチド4または9の存在下で培養し、2日後に培養上清を用いてIFNγ, IL-4, IL-5, IL-17, TNFαとGM-CSFをELISA測定法にて測定。HLAタイピングは顆粒白血球から得られたDNAより行った。

【メラノーマ動物モデル治療の有効性】

実験動物委員会の承認を得て研究を開始した。B16黒色腫細胞(C57/BL6由来)を培養し、

ロドデノール (20 µg/ml) で 18 時間共培養ののち洗浄, 完全にロドデノールを除去した後 X 線照射 (60Gy) し PBS で調整後 2 × 10<sup>6</sup> 個を 6 ~ 8 週令の C57/BL6 雌マウスの背部皮下に免疫した. 10 日の間隔をあけて 3 回マウスに免疫し, 最終接種から 10 日後 2 × 10<sup>6</sup> 個の X 線照射無しの B16 細胞を皮下接種し, 腫瘍の長軸の長さを観察し続けた.

#### 4 . 研究成果

Patient #	HLA-A*	B*	C*	DRB1*	Peptide specificity
R01	02:01/11:01	15:01/35:01	04:01/08:01	<u>04:03/09:01</u>	2, 4, 8
R02	24:02/24:02	07:02/15:01	03:03/07:02	01:01/08:02	4
R03	24:02/31:01	40:02/40:02	03:03/03:04	<u>04:10/11:01</u>	-
R04	11:01/11:01	54:01/54:01	01:02/01:02	<u>04:05/04:05</u>	-
R05	03:01/26:02	15:01/59:01	01:02/03:03	<u>04:05/14:06</u>	-
R06	24:02/24:02	40:02/40:02	03:04/03:04	<u>04:10/04:10</u>	-
R07	24:02/26:03	35:01/59:01	01:02/03:03	<u>04:05/04:10</u>	9
R08	24:02/24:02	15:01/54:01	01:02/08:01	<u>04:05/11:01</u>	9

HLA-DR4-associated alleles are underlined.  
Increased frequency of DR4 : p=0.0015

上記に示すように, 患者 8 名中 7 名が HLA-DR4 陽性であった. チロシナーゼ由来の自己ペプチドに反応する T 細胞を観察するとペプチド 2, 4, 8, そして 9 に特異的だった. ペプチド 2, 4 はクラス I 拘束性で Tc17 のサイトカイン産生パターンを示し, ペプチド 8, 9 はクラス II 拘束性で Th0 のパターンを示した.

対照として HLA-DR4 陽性の健康人ボランティア 3 人から採血を行い用い同様の実験を行ったが, ペプチド特異的反応を示さなかった. これらの結果は, 感受性には HLA が遺伝要因として関与しており, 患者 PBMC 中には自己チロシナーゼペプチドに特異的な自己反応性ヘルパー T(Th) 細胞およびキラー T(Tc) 細胞が存在することを示唆している.

つまりはこのような免疫応答がロドデノールで誘発されるのであれば, ロドデノールはメラノーマに対する抗腫瘍免疫応答を誘導できるはずであると考えマウスを用いた実験を行った.

ロドデノール処理した B16 細胞で免疫されたマウスは, 免疫されなかったマウスに比べて体内における腫瘍の成長抑制を有意に示

し, 25 日目の時点ではロドデノール処理群では 0mm, 対象群では 10mm という大きな差が見られた. そして, 予想通りロドデノール処理群は全身性の白斑症を発症した. 同じ実験を 4 回繰り返したが, 同様の結果を得る事が出来た. マウスにはロドデノールを直接注射したり塗ったりしたわけではないので, ロドデノールによる直接的な細胞障害は考えられない. 自己の免疫系を介して起こった事象であると思われる. また, その組織像は腫瘍内への炎症細胞浸潤のみならず, 真皮への細胞浸潤とその表皮内への浸潤が観察出来た. 炎症細胞は単核球と, 多核球からなっており, 後者には少量の好酸球も含まれていた.

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. 松下 祥: IL-10 とアレルギー  
アレルギー・免疫 Vol. 23, No. 11, 30-35, 2016. 査読無

2. Rie Takagi, Masaaki Kawano, Koichiro Nakamura, Tetsuya Tsuchida and Sho Matsushita, T-cell responses to tyrosinase-derived self-peptides in patients with leukoderma induced by rhododendrol: Implications for immunotherapy targeting melanoma.

*Dermatology* 232:44-49, 2016 査読有

3. Miyano, K., Matsushita, S., Tsuchida, T., and Nakamura, K. The inhibitory effect of a histamine 4 receptor antagonist on CCL17 and CCL22 production by monocyte-derived Langerhans cells in patients with atopic dermatitis.

*J. Dermatol.*43(9):1024-9, 2016. 査読有

4. 高木理英、松下祥 : ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である。  
臨床皮膚科 71 巻 5 号 42-45, 2017 査読無

5. 松下 祥: 免疫療法の基礎。アレルギー-64: 685-692, 2015. 査読無

6. 松下 祥: アレルゲン免疫療法の免疫学的基盤の解明-最近の進歩。  
臨床免疫・アレルギー科 64: 468 - 473, 2015. 査読無

7. Masaaki Kawano, Rie Takagi, Atsushi Kaneko and Sho Matsushita. Berberine is a dopamine D1-, D2-like receptor antagonist and ameliorates experimentally induced colitis by suppressing innate and adaptive immune responses.  
*J. Neuroimmunol.* 289:43-55, 2015 査読有

[学会発表](計7件)

1. KAWANO Masaaki, TAKAGI Rie, and MATSUSHITA Sho

Dopamine modulates cytokine secretion in early immune responses as well as the generation of T-helper subsets in adaptive responses.

The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2016

December 6, 2016 Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan

2. Enomoto Yutaka, Kiniwa Tsuyoshi, Naito Yutaka, Takagi Rie, Kawano Masaaki, Matsushita Sho, Ochiya Takahiro, Miyajima Atsushi

HBV-induced exosomal miRNAs down-regulate the expression of IL-21 mRNA by binding to its 3' UTR

The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese

Society for Immunology, 2016

December 6, 2016 Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan

3. 高木 理英,川野 雅章,中村 晃一郎,土田 哲也,松下 祥 ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である  
第 6 5 回日本アレルギー学会学術大会  
2016 年 6 月 18 日, 東京

4. 高木 理英,川野 雅章,中村 晃一郎,土田 哲也,松下 祥 ロドデノール誘発性白斑症は自己免疫病である  
第 1 1 5 回日本皮膚科学会総会 2016 年 6 月 4 日, 京都

5. Enomoto Yutaka, Matsushita Sho, Miyajima Atsushi  
Identification of the novel 3'UTR sequences of IL-21 mRNA as potential targets of miRNAs

BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会 合同大会)  
2015 年 12 月 2 日 神戸

6. 曾根敏雄、松下祥  
プロテオソーム解析による Trypanosoma cruzi の種内変異の評価  
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同大会 2015 年 12 月 1~4 日  
神戸

7. Kawano Masaaki, Takagi Rie, Kaneko Atsushi, Matsushita Sho.  
Berberine is a dopamine D1-, D2-like receptor antagonist and ameliorates experimentally induced colitis by suppressing innate and adaptive immune responses.

The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology

2015年11月18日(水)・19日(木)・20日(金) 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：母乳または飲食品がアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性を評価する方法、およびアトピー性皮膚炎の発症を誘導する危険性が減少された母乳または飲食品

発明者：松下 祥

権利者：埼玉医科大学(50%)  
          有限会社イムノ(50%)

種類：特願2009-248505

番号：特許第5859310号

取得年月日：2015年12月25日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/meneki/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松下 祥 (MATSUSHITA, Sho)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50167649

### (2) 研究分担者

なし( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

土田 哲也 (TSUCHIDA Tetuya)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70126126

中村 晃一郎 (NAKAMURA Kouichiro)  
埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60175502

川野 雅章 (KAWANO Masaaki)  
埼玉医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30447528

高木 理英 (TAKAGI Rie)  
埼玉医科大学・医学部・助手  
研究者番号：00569080

(4) 研究協力者  
なし( )