

博士論文(2024年3月)内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏名 藤戸 淳夫

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第14号

学位授与の日付 令和6年3月8日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「5-Fluorouracil 投与による色素沈着発現メカニズム解析に関する研究」

論文審査委員(主査)教授 佐藤 英介 医学博士

(副査)教授 大倉 一人 薬学博士、博士(工学)

助教 古川 絢子 博士(医学)

# 論文要旨

氏名	藤戸 淳夫
----	-------

## 論文の題名

5-Fluorouracil 投与による色素沈着発現メカニズム解析に関する研究

## 論文の要旨

### 緒論

皮膚は、外界との境界にある人体最大の臓器である。主に表皮・真皮・皮下組織から構成され、生体の恒常性維持の役割を担っている。なかでも、皮膚の色調に最も重要な色素はメラニンである。メラニンは皮膚色の決定のみならず、紫外線による核内 DNA 傷害を予防するといった生理的に重要な役割を担っている[1]。外見的变化として問題となる色素沈着の原因は、皮膚色の決定に関与するメラノサイトが活性化することでメラニンの産生が促進され、表皮基底層に蓄積する[2]。メラニンは、複雑な組成をもつ高分子化合物であり、メラニン形成酵素の Tyrosinase によって合成される[3]。臨床においては、がん化学療法を開始した患者で皮膚の色素沈着を来した症例をしばしば経験する。しかし、外見的变化は生命を脅かすものではないことから、医療従事者によって重要視されることなく、過小評価されている。特に、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗剤などを用いた抗がん薬治療では、副作用として薬剤性色素沈着が報告されている[4,5]。さらに、大腸がんにも有効な抗がん薬である 5-Fluorouracil (5-FU) は、しばしば色素沈着を引き起こす。5-FU は胃がんや大腸がんをはじめとした多くの固形がんにも有効であり、現今でも日常的に使用されている抗がん薬である[4,6]。一方で、5-FU が色素沈着を惹起する機序は、未だ解明されておらず、有効な治療法は確立されていない。本研究では、5-FU 連続投与することによって色素沈着を誘発させたモデルマウスを用い、色素沈着の発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 第 1 章：5-Fluorouracil 投与における酸化ストレスがもたらす色素沈着

5-FU 投与による酸化ストレスの過剰発現[7]と色素沈着の関連について検討を行った。特定の病原体を持たない 9 週齢の Hos:HRM-2 雄性マウスに色素沈着を誘発させるために 5-FU を 8 週間連続で腹腔内投与した (各 n = 5)。肉眼的変化な黒色化を認めた臀部周囲の皮膚を標本とし、Dopa 染色を行った。5-FU 投与マウスでは、メラニン合成に重要な Dopa 陽性細胞数が増加した。さらに、既知のメラニン生成関連物質である  $\alpha$ -MSH、ACTH、cAMP、Tyrosinase について免疫蛍光染色法 (Immunofluorescence : IF) を用い検討を行ったところ、各群に比して 5-FU 投与マウスで増加が確認された。また、5-FU に加えて、 $\alpha$ -MSH、cAMP、ACTH に対する阻害剤である ASIP (ASIP+5-FU 投与マウス)、ESI-09 (ESI-09+5-FU 投与マウス)、ACTH (11-24) (ACTH (11-24) +5-FU 投与マウス) を週に 3 回、8 週間連続で腹腔内投与した (各 n = 5)。Control と 5-FU、阻害剤を含む 3 群について肉眼的所見、Dopa 染色、ELISA 法、IF で比較検討した。ESI-09

+5-FU 投与マウスおよび ACTH (11-24) +5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスに比べて色素沈着が抑制された。さらに、ESI-09+5-FU 投与マウスおよび ACTH (11-24) +5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスと比較して、cAMP 濃度および Tyrosinase 発現が減少した。次に、5-FU に加え、ACTH 濃度の上昇に関連する転写因子である NF- $\kappa$ B の活性を阻害する JSH-23 (JSH-23+5-FU 投与マウス) は 1 日 1 回、8 週間連続で経口投与、酸化ストレスを抑制させる N-Acetyl-L-cysteine (N-NAC; N-NAC+5-FU 投与マウス) は 1 日 1 回、8 週間連続で腹腔内投与した (各 n = 5)。Control と 5-FU、阻害剤を含む 3 群について肉眼的所見、Dopa 染色、ELISA 法、IF で比較検討した。JSH-23+5-FU 投与マウスおよび NAC+5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスに比べて色素沈着が減少した。さらに、JSH-23+5-FU 投与マウスおよび NAC+5-FU 投与マウスでは、ACTH および cAMP 濃度も 5-FU 投与マウスに比べて低下した。NAC+5-FU 投与マウスでは 5-FU 投与マウスに比べて減少し、それらの濃度は Control と変わらなかった。したがって、5-FU は ACTH を介して色素沈着の増加を引き起こすことが示唆された。さらに、酸化ストレスを抑制することで、ACTH と cAMP 濃度の増加が抑制された。これらの結果は、5-FU の投与が酸化ストレスの誘導から始まる色素沈着発現メカニズムを示唆するものと考えられた。

## 第 2 章：5-Fluorouracil 投与によるメラニン生成および血管増生の関与

第 1 章では、5-FU 投与による酸化ストレスを抑制すると、ACTH と cAMP はいずれも低下したが、色素沈着の増加を完全に抑制することはできなかった。したがって、5-FU 投与による色素沈着の発現メカニズムには、他の経路があるものと考えられた。近年の研究では、色素沈着と血管密度との関連が報告されており[8]、血管内皮細胞がメラノサイトに作用して Tyrosinase 関連のシグナルを誘導し、メラニン産生を促していることが示唆されている。第 1 章と同様のマウスを用い、5-FU を 8 週間連続投与により誘発される色素沈着のメカニズムを、血管に着目して基礎的検証を行った。5-FU 投与マウスの耳介部皮膚では、巨視的な色素沈着が見られ、Fontana-Masson (FM) 染色によるメラニン集積が表皮基底層に観察された。また、5-FU 投与マウスの耳介部皮膚では、Tyrosinase、血管マーカーである vWF と CD31 の発現が増加した。5-FU 以外の抗がん薬と比較検討するため、Cytarabine (Ara-C)、Irinotecan (CPT-11) を週に 6 回、8 週間連続投与した。FM 染色で比較検討した結果、5-FU 投与マウスの耳介部皮膚では、Ara-C 投与マウスと CPT-11 投与マウスに比し、メラニン集積の増加を認めた。さらに、IF による比較では、Tyrosinase の発現は、5-FU では、Ara-C および CPT-11 と比べて表皮基底層で有意に増加、Control と比べて増加傾向を示した。vWF の発現は、5-FU では真皮で有意に増加し、CD31 の発現は増加傾向を示した。したがって、5-FU によるメラニン産生には Tyrosinase が関与しており、血管の増加が関与している可能性が示唆された。

以上より、5-FU 誘発性の色素沈着発現メカニズムには、酸化ストレスから始まる 5-FU/Oxidative stress/NF- $\kappa$ B/ACTH/cAMP/tyrosinase 経路が主であることが示唆された。また、vWF・CD31 が関連する血管増加および血管内皮細胞を介した複数の経路も関与があることが示唆された。本論文での成果は、今後の 5-FU 投与ならびに他の抗がん薬による色素沈着を予防および治療するためのターゲットタンパク質の発見や治療薬開発の可能性を拓く重要な知見であると考えられる。

引用文献

- [1] Napolitano A. et al. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2014, 27, 721–733.
- [2] Dereure O. et al. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2001, 2, 253–262.
- [3] d'Ischia M, et al. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2013, 26, 616–633.
- [4] Giménez García RM, et al. *J. Am. Board. Fam. Med.*, 2019, 32, 628–638.
- [5] Cho KH, et al. *J. Dermatol.*, 1988, 15, 342–346.
- [6] Nozawa K, et al. *Psycho-Oncology*, 2013, 22, 2140–2147.
- [7] Atiq A, et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 2019, 15, 292–306.
- [8] Regazzetti C, et al. *J. Invest. Dermatol.*, 2015, 135, 3096–3104.