

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

2023

藤戸 淳夫

**Mechanism of hyperpigmentation induced  
by 5-Fluorouracil administration**

2023

Atsuo Fujito

## 目 次

緒論	1
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	
第1節 緒言	4
第2節 実験方法	5
第3節 結果	8
第4節 考察	19
第5節 小活	21
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節 緒言	22
第2節 実験方法	23
第3節 結果	25
第4節 考察	33
第5節 小活	35
結論	36
引用文献	38
謝辞	44
Abstract	45

## 略語一覽

5-FU	: 5-fluorouracil
$\alpha$ -MSH	: alpha-melanocyte-stimulating hormone
ACTH	: adrenocorticotrophic hormone
Ara-C	: cytarabine
ASIP	: agouti signaling protein
ATP	: adenosine triphosphate
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
CD31	: cluster of differentiation
CMC	: sodium carboxymethyl cellulose
CPT-11	: irinotecan
CRC	: colorectal cancer
CREB	: cAMP-responsive element binding protein
DHI	: 5,6-dihydroxyindole
DHICA	: 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
DMSO	: dimethyl sulfoxide
Edn1	: endothelin1
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EPAC	: exchange protein directly activated by cAMP
ESI-09	: $\alpha$ -[2-(3-chlorophenyl) hydrazinylidene]-5-(1,1-dimethylethyl) - $\beta$ -oxo-3-isoxazolepropanenitrile
FM	: fontana-masson
GDF-15	: growth and differentiation factor-15
GEF	: guanine nucleotide exchange factor
HE	: hematoxylin-eosin
IF	: immunofluorescence
IL	: interleukin
iNOS	: inducible nitric oxide synthase
JSH-23	: 4-methyl-N1-(3-phenyl-propyl)-benzene-1,2-diamine
MC1R	: melanocortin 1 receptor
MCR	: melanocortin receptor
MITF	: microphthalmia transcription factor
mRNA	: messenger ribonucleic acid

NAC	: N-Acetyl-L-cysteine
NF- $\kappa$ B	: nuclear factor-kappa B
PBS	: phosphate-buffered saline
POMC	: pro-opiomelanocortin
PSSHE	: persistent serpentine supravenuous hyperpigmented eruption
QOL	: quality of life
ROS	: reactive oxygenspecies
SPF	: specific-pathogen-free mice
SSH	: serpentine supravenuous hyperpigmentation
TYRP1	: tyrosinase related protein 1
TYRP2	: tyrosinase related protein 2
vWF	: von willebrand factor

## 緒 論

ヒト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、表皮の基底層にある細胞の 10 個中 1 個に存在するメラノサイトによって産生される (Fig. 1.)。メラノサイトは、メラニンを合成することができる唯一の細胞である。皮膚では、表皮、真皮、毛母に存在するが、皮膚色を決定しているのは表皮基底層に分布するメラノサイトである。色素沈着の原因として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ことが考えられている<sup>1,2)</sup>。

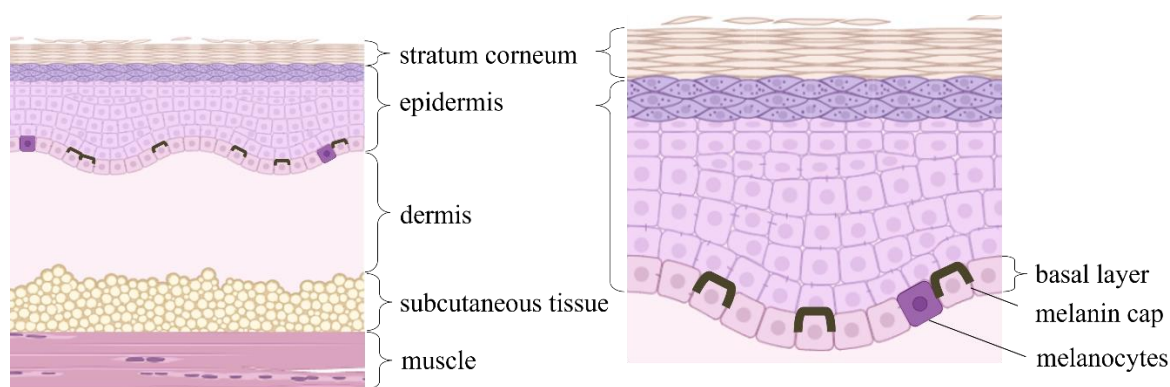
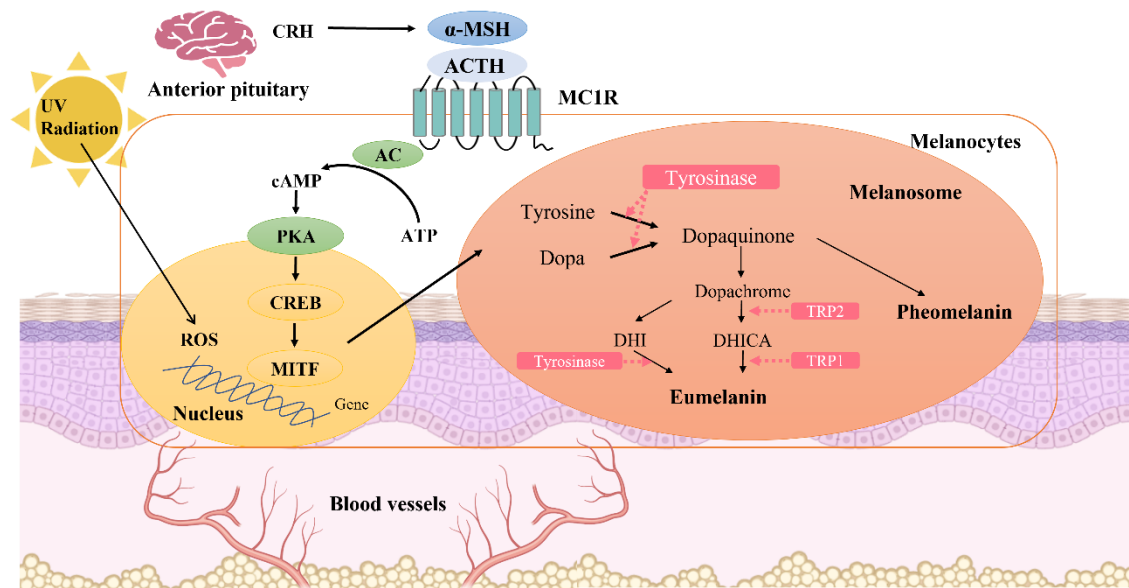


Fig. 1. Schematic diagram of skin structures

メラニンは、複雑な組成をもつ高分子化合物であり、メラニン形成酵素である Tyrosinase によって合成されることが知られている (Fig. 2.)<sup>3-6)</sup>。Tyrosine を基質とする Tyrosinase の触媒反応によって開始され、DOPA / Dopachrome / 5,6-dihydroxyindole (DHI) および 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) に変換され、最終的にメラニンを形成し、ケラチノサイトに輸送される<sup>4-6)</sup>。メラニン合成に関わる  $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) は、脳下垂体中葉で産生される corticotropin-releasing hormone (CRH) によって誘導される。 $\alpha$ -MSH は、メラノサイトにおける膜上のメラノコルチン 1 受容体 (MC1R) に結合し、cAMP の増加とそれに続くプロテインキナーゼ A/cAMP 応答エレメント結合タンパク質 (CREB) / 微小眼球関連転写因子 (MITF) シグナル伝達の活性化をもたらし、それによって Tyrosinase 酵素活性を上昇させる<sup>7-10)</sup>。メラニンは、黒色～黒褐色の Eumelanin と赤褐色～黄色の Pheomelanin の 2 種類が存在する<sup>6)</sup>。これらの 2 種類のメラニンがさまざまな比率で結合し、混合型メラニンが形成され、皮膚色に影響している<sup>4)</sup>。また、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 傷害や DNA 損傷による皮膚老化、皮膚がんを予防するといった生理的に重要な役割を担っている<sup>11)</sup>。



**Fig. 2. Melanogenesis mechanism**

臨床においてがん化学療法を開始した患者では、皮膚の色素沈着を来たした症例をしばしば経験する。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<sup>12-17)</sup>。抗がん薬治療は、脱毛や皮膚の黒ずみなどの外見的变化を引き起こし、患者の QOL を低下させる大きな要因となっている<sup>15)</sup>。外来通院で抗がん薬治療を受ける患者を対象とした調査で、Nozawa らは 80% の患者が外見的变化を苦痛に感じており、男性よりも女性の方がそのように感じる傾向が強いことを明らかにしている<sup>18)</sup>。しかし、がん化学療法による外見的变化は生命を直接脅かすものではないことから、医療従事者が重要視する傾向にないのが現状である。日本における Colorectal Cancer (CRC) 患者数は、男性では横ばいであるが、女性では増加し続けている<sup>19)</sup>。CRC に有効な抗がん薬である 5-Fulvorouracil (5-FU) 投与は、しばしば色素沈着を引き起こす。5-FU はフッ化ピリミジン系の代謝拮抗剤であり、Duschinsky ら<sup>12)</sup>によって合成され、Heidelberg ら<sup>20)</sup>を中心とした広範な基礎・臨床研究において抗がん薬として評価されている。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、現在でも日常的に使用されている抗がん薬である<sup>15,18,19)</sup>。一方、5-FU を 1 日 900~1750 mg 点滴静注した患者の 2~5%<sup>14)</sup>に色素沈着が生じることが報告されている。さらに、5-FU 静注療法患者では、投与頻度が高くなるにつれて色素沈着の発現頻度が高くなり、QOL 低下の原因となっていることが報告されている<sup>12-14)</sup>。5-FU 投与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。

我々はこれまでの研究において、5-FU を連続投与することで、マウスに色素沈着が生じることを確認しているが、色素沈着発現メカニズムは不明なままである。本研究の目的は、基礎的研究によって、5-FU の連続投与に伴う色素沈着のメカニズムを解明することとした。

がん化学療法を受ける患者の外見的变化に対する問題を解決するため、第 1 章では、5-FU 投与による酸化ストレスの過剰発現<sup>21-23)</sup>による影響と色素沈着の関連について検討した。さらに近年の研究では、色素沈着と血管密度との関連が報告されており<sup>24)</sup>、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。このことから、第 2 章では、酸化ストレスによる色素沈着発現メカニズム以外の経路を探索するため、Tyrosinase と血管との関連について検討した。



## 第1章

### 5-FU 投与における酸化ストレスがもたらす色素沈着

#### 第1節 緒言

外界とのバリアの役割を果たす皮膚は、紫外線や乾燥などの環境ストレスに常にさらされている。特に顔の皮膚は、日光に当たるとシミやシワ、たるみができやすい。シミは、メラニン色素が表皮に沈着した色素異常である。環境ストレスによる過剰なメラニン合成の基礎となる様々なメカニズムが報告されている。皮膚がストレス刺激にさらされると、活性酸素(ROS)が発生する。活性酸素は、エンドセリン-1 (Edn1)、幹細胞増殖因子、 $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH)、シクロオキシゲナーゼ、インターロイキン (IL) -1 $\alpha$ 、マクロファージ遊走阻止因子などのタンパク質の産生を促進する。これらのうち、最も広く研究されているのは  $\alpha$ -MSH である。このように、紫外線などの皮膚刺激によって誘発される色素沈着異常はよく知られている。しかし、皮膚の異常を引き起こす要因は紫外線だけではなく、アレルギーや内科的疾患によっても皮膚は影響を受ける<sup>25,26)</sup>。

抗がん薬も皮膚に影響を与える要因のひとつである。抗がん薬による皮膚障害は、直接的な影響は少ないが、見た目の変化による心理的苦痛は患者の QOL を低下させ、抗がん薬治療のコンプライアンスを複雑にする<sup>27)</sup>。抗がん薬による皮膚障害は、ざ瘡様発疹、乾燥皮膚、パロニキアなど様々な形で起こる。抗がん薬による治療を改善するために、皮膚障害の予防法や治療法が数多く研究されている<sup>27-30)</sup>が、これらの皮膚障害の一つである色素沈着については、症例報告はあるものの<sup>31,32)</sup>、その根本的な原因は究明されておらず、治療法は確立されていない。

今後の抗がん薬の開発においては、色素沈着の原因を究明し、有効な抗がん薬による治療を容易にするための対策を講じる必要がある。本研究の目的は、広く使用されている抗がん薬である 5-FU を用いて、抗がん薬の副作用としての色素沈着発現メカニズムを検討することである。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

実験には、特定の病原体を持たない (SPF) 9 週齢の Hos:HRM-2 雄性マウス (colored hairless mouse; Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan) を用いた。これらのマウスは耳介、目、足指、尾および臀部周辺の皮膚にメラノサイトを有し、メラニンを合成することができる。すべてのマウスは個々にケージに入れ、 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (light: 8:00-20:00) の環境下、固形飼料 (rodent diet EQ 5L37; Japan SLC, Inc.) および水は自由に摂取させ、いずれも 1 週間の馴化飼育を実施した。マウスは 1 グループあたり 5 匹とし、実験を 3 回繰り返し行った。本研究におけるすべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験指針 (承認番号: 第 34 号) に従って実施した。

### 2. 5-FU 投与による皮膚色素沈着の誘発

生理食塩水に希釈した 5-FU (Kyowa Kirin, Tokyo, Japan) 15 mg/kg を 1 日 1 回、8 週間連続でマウスに腹腔内注射した。生理食塩水のみを投与したマウス (Control) は、対照群とした。なお、5-FU 投与の濃度決定については、Huang ら<sup>33)</sup>の方法に基づき、予試験として 5、15、30 mg/kg の投与量を検討し、マウスに投与した際に毒性発現が観察されず、かつ毒性が最大化する最低有効濃度を採用した。

### 3. MC1R アンタゴニスト [Agouti Signaling Protein (ASIP)] の投与

1% dimethyl sulfoxide (DMSO) 中の約 10nM の ASIP (R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) を、8 週間にわたり週 3 回マウスに腹腔内注射した。Control マウスには 1% DMSO を投与した<sup>34)</sup>。

### 4. cAMP 拮抗薬 { $\alpha$ -[2-(3-Chlorophenyl) hydrazinylidene]-5-(1,1-dimethylethyl)- $\beta$ -oxo-3-isoxazolepropanenitrile (ESI-09) } の投与

20 mg/kg の ESI-09 (Cayman, Ann Arbor, MI, U.S.A.) を DMSO : phosphate-buffered saline (PBS ; 比 1 : 7) の溶液に溶解したものを、週 3 回、8 週間連続でマウスに腹腔内注射した。溶媒注射動物には DMSO : PBS (1 : 7) 溶液を投与した<sup>35)</sup>。

### 5. 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 受容体拮抗薬 [ACTH (11-24)] の投与

生理食塩水に溶かした ACTH (11-24) (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, U.S.A.) 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$  を週 3 回、8 週間連続でマウスに腹腔内注射した。Control マウスには生理食塩水を投与した<sup>36)</sup>。

## 6. NF- $\kappa$ B 阻害剤 [4-Methyl-N1-(3-phenyl-propyl)-benzene-1,2-diamine (JSH-23)] の投与

Sodium carboxymethyl cellulose (CMC) 中の JSH-23 (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, U.S.A.) 1 mg/kg を 1 日 1 回、8 週間連続でマウスに経口投与した。Control マウスには 0.5% CMC を投与した<sup>37)</sup>。

## 7. 活性酸素阻害剤 (N-Acetyl-L-cysteine (NAC)) の投与

NAC (200 mg/kg; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 0.08% DMSO に溶解したものを 1 日 1 回、8 週間連続でマウスに腹腔内注射した。Control マウスには 0.08% DMSO を投与した<sup>38)</sup>。

## 8. マウスの血液および臀部周囲の皮膚組織の採取

実験開始 8 週間後、ペントバルビタールナトリウム (5 mg/mL, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 50 mg/kg となるように腹腔内投与してマウスに麻酔したのち、心臓穿刺により 1mL の血液を採取した。また、臀部皮膚組織を採取し、-80°C で凍結保存した。すべての外科的処置は、動物の苦痛を最小限にするように的確に行った。

## 9. 皮膚組織の染色

採取した臀部周囲の皮膚を標本とし、4% phosphate-buffered paraformaldehyde で固定し、Tissue-Tek® optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek) を用いて凍結包埋し、5  $\mu$ m の厚さでマイクロトーム (Leica Biosystems) にて薄切りを行った。臀部周囲の皮膚切片は、免疫蛍光染色法 (IF) を用い解析を行った<sup>39)</sup>。まず、切片を PBS で洗浄し、1 次抗体として、Tyrosinase (1 : 100; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, U.S.A.) に対する抗体で免疫染色させたのち、サンプルを PBS で洗浄し、fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (1 : 30; Dako Cytomation, Glstrup, Denmark) を 2 次抗体として反応させた。Tyrosinase の発現レベルは、蛍光顕微鏡を用いて免疫組織化学的に評価した。他の切片は 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) を用いて染色した。臀部周囲の皮膚における DOPA 陽性メラノサイトは、0.1% L-DOPA (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) を PBS に溶解させ、37°C にて 3 時間反応させた。その後、PBS で 3 回×5 回洗浄し、70% エタノールで脱水させキシレンで透徹した後、封入剤を用い封入した後に光学顕微鏡で観察した<sup>40)</sup>。

## 10. 臀部皮膚における ACTH、 $\alpha$ -MSH、cAMP の測定

標本として採取した 100 mg の臀部周囲の皮膚を PBS で洗い、ホモジナイズし、その上清をアッセイ用に回収した。皮膚標本中の ACTH、 $\alpha$ -MSH、および cAMP 濃度は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (ACTH and  $\alpha$ -MSH: Abcam, Cambridge, MA,

U.S.A.; cAMP; MyBioSource, San Diego, CA, U.S.A.) を用い、メーカーのプロトコルに従って測定した。吸光度はマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) を用いて測定した。

## 11. 統計解析

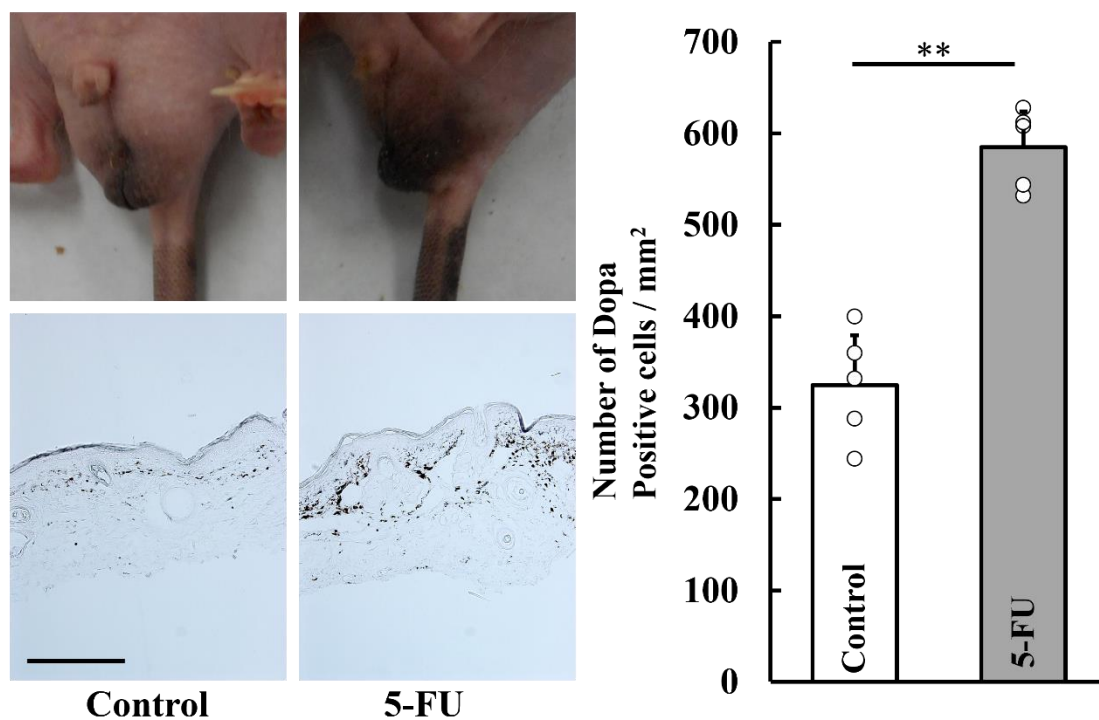
全てのデータは平均値±標準偏差 (SD) 値で示した。データの統計的有意性を分析するために、Microsoft Excel 2010 ソフトウェア (Microsoft Corp., Redmond, WA, U.S.A.) を使用し分析した。一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) のちに、Tukey's post-hoc test を行った。結果は、 $p$  値  $* < 0.05$  または  $** < 0.01$  を統計的に有意であると判断した。統計解析は SPSS version 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) にて実施した。

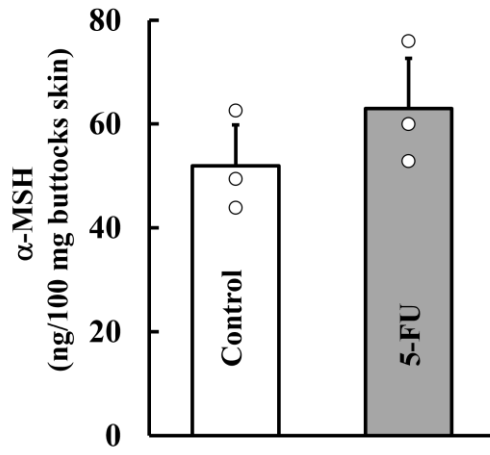
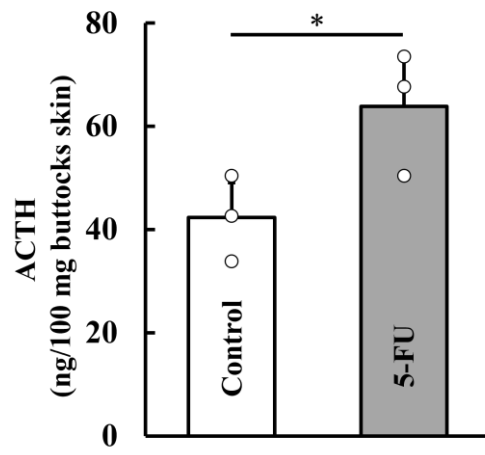
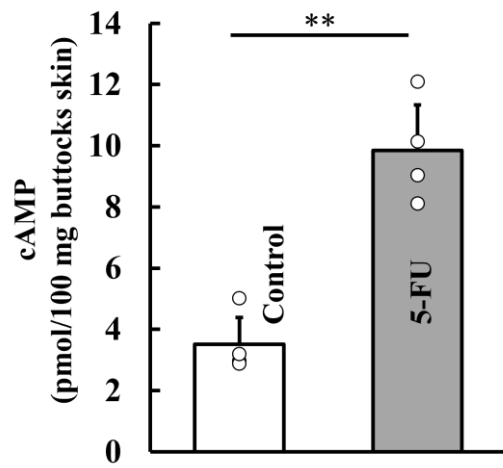
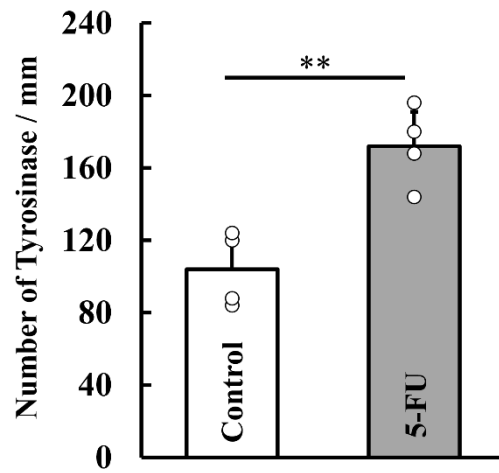
### 第3節 結果

#### 1. 臀部皮膚における色素沈着とその関連因子に対する 5-FU 投与の影響

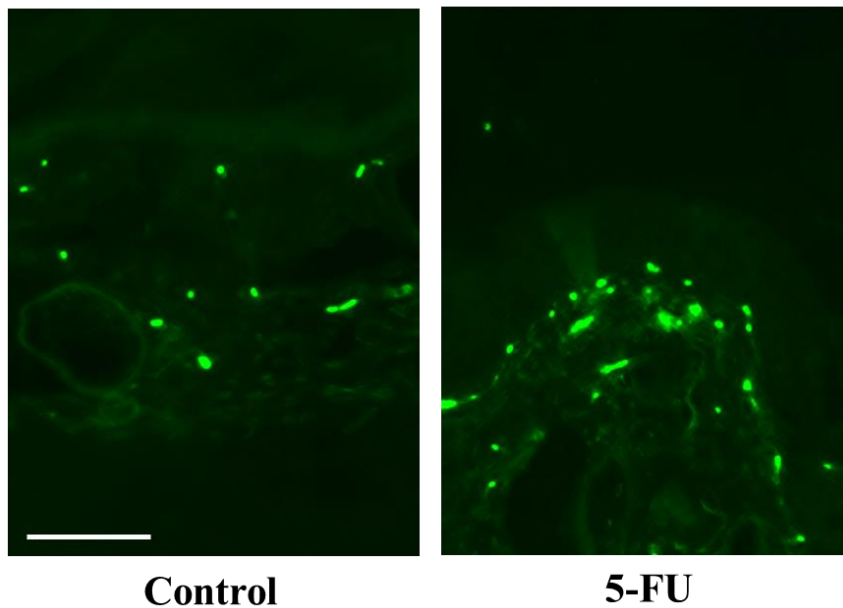
8 週間連続の 5-FU 投与によって色素沈着が誘発されるか肉眼的に比較したところ、臀部皮膚において顕著な黒色化を認めた。さらに、メラニン合成に関与する重要な Dopa を検出するための Dopa 染色を行った結果、マウスの臀部周辺の皮膚で Dopa 陽性細胞数が増加した (Fig. 3A)。さらに、5-FU 投与後、ELISA 法による ACTH、 $\alpha$ -MSH、cAMP の濃度比較では、Control 群と比して 5-FU 群で ACTH と cAMP が増加した。 $\alpha$ -MSH は増加傾向であった (Figs. 3B-D)。加えて、IF による Tyrosinase 発現数の検討では、Control 群に比して 5-FU 群で増加が確認された (Fig. 3E)。この結果から、5-FU 投与による臀部の黒色化は、ACTH、 $\alpha$ -MSH、cAMP、Tyrosinase がメラニン生成に関連していることを示唆した。

A



**B****C****D****E**

**E**



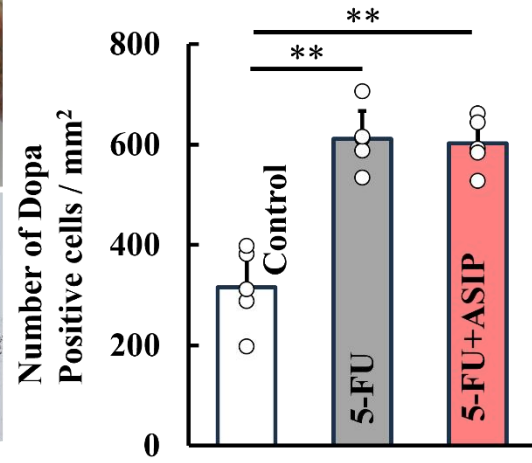
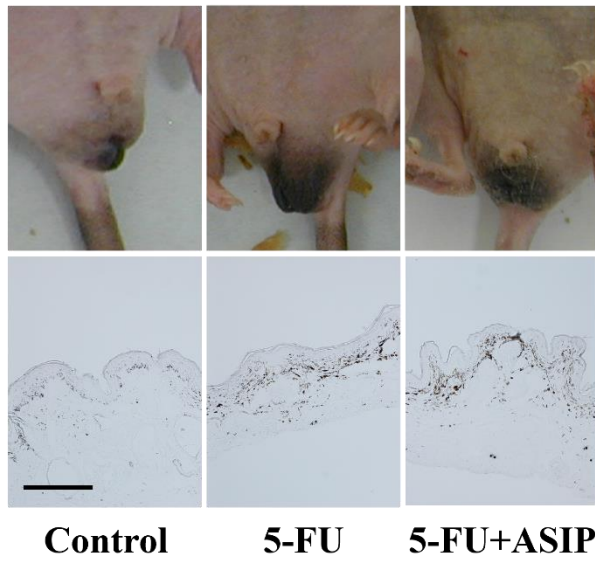
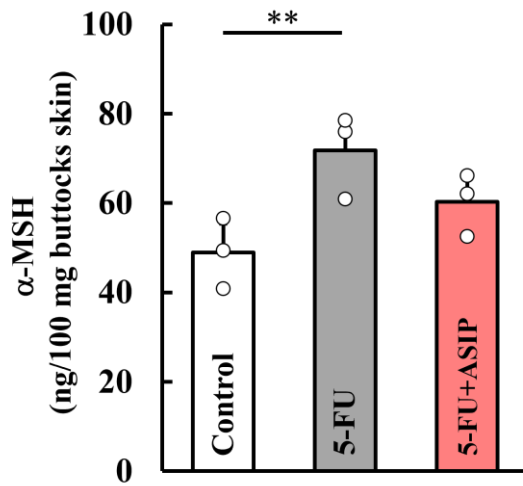
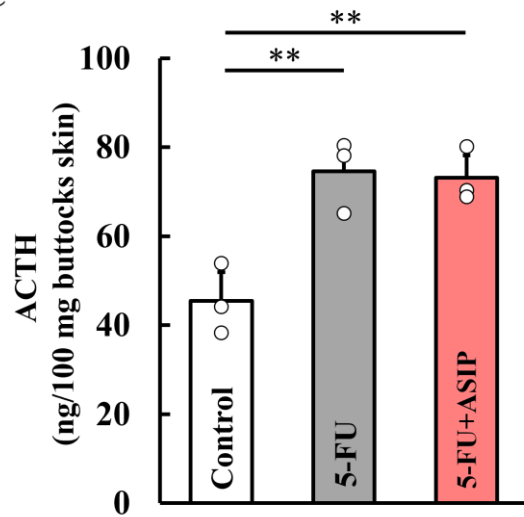
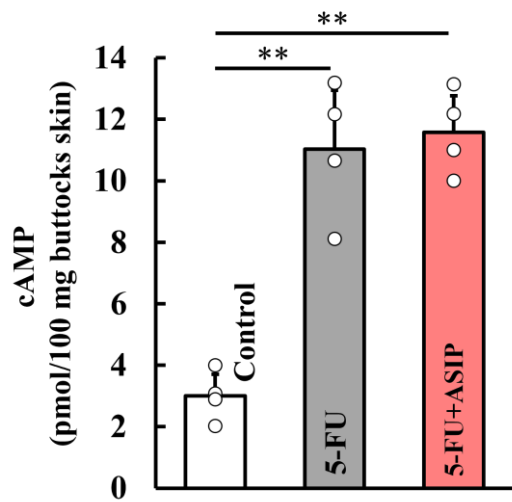
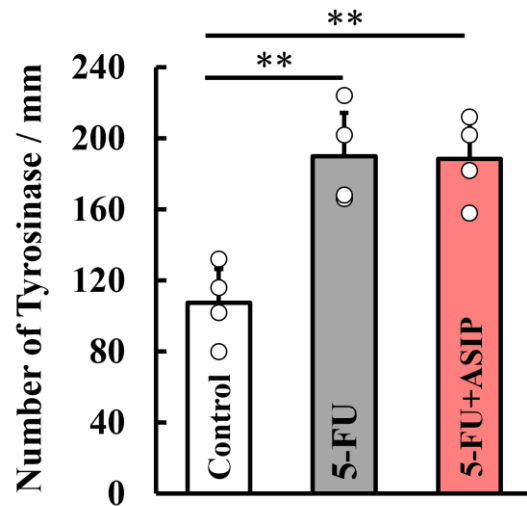
**Fig. 3. Effect of 5-FU Treatment on Pigmentation (A), Levels of  $\alpha$ -MSH (B), ACTH (C), cAMP (D), and Expression of Tyrosinase (E) in the Skin around the Buttocks of Mice**

Values are presented as the mean  $\pm$  S.D. of five animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100  $\mu$ m. 5-FU, 5-fluorouracil;  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; S.D., standard deviation.

## 2. ASIP 投与が 5-FU 投与マウスの臀部皮膚の色素沈着とその関連因子に及ぼす影響

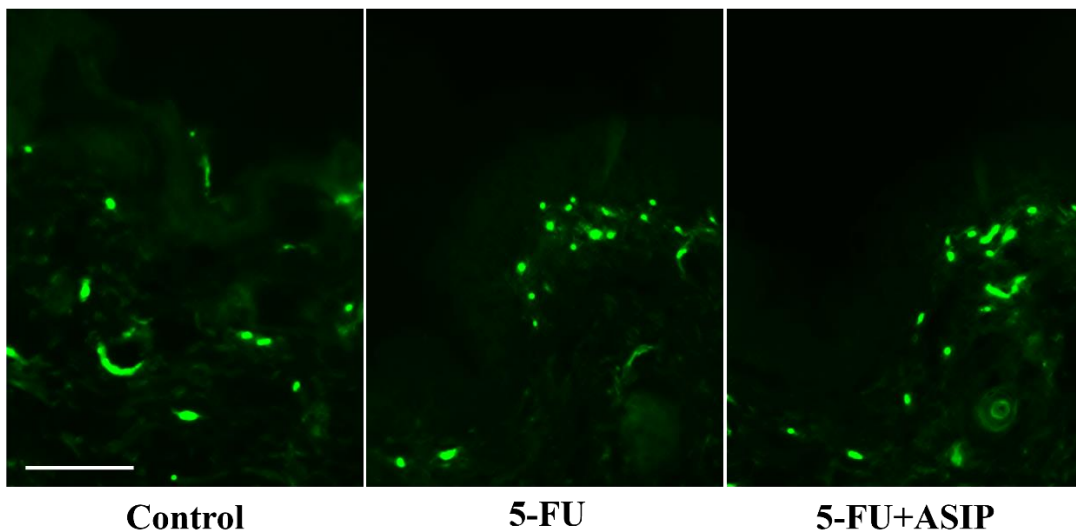
$\alpha$ -MSH の受容体である MC1R の阻害剤である ASIP を投与し、臀部周囲の色素沈着に  $\alpha$ -MSH が影響しているか調査した。5-FU 投与マウスと ASIP+5-FU 投与マウスでは、色素沈着に肉眼的な変化および Dopa 陽性細胞数には差は見られなかった (Fig. 4A)。さらに、ELISA 法を用いた  $\alpha$ -MSH、ACTH、cAMP の濃度比較では、5-FU 投与マウスと ASIP+5-FU 投与マウスに差はなかった (Figs. 4B-D)。加えて、IF による臀部周囲の皮膚における Tyrosinase 発現数の検討では、5-FU 投与マウスと ASIP+5-FU 投与マウスの 2 群間で差はなかった (Fig. 4E)。

この結果から、ASIP 投与では、5-FU による臀部の黒色化は抑制されず、ACTH、cAMP 濃度、Tyrosinase 発現に変化はみられなかったことから、 $\alpha$ -MSH は 5-FU による色素沈着に関与していないことが示唆された。

**A****B****C****D****E**



E



**Fig. 4. Effect of ASIP Treatment on Pigmentation (A), Levels of  $\alpha$ -MSH (B), ACTH (C), cAMP (D), and Expression of Tyrosinase (E) in the Skin around the Buttocks of 5-FU-Treated Mice**

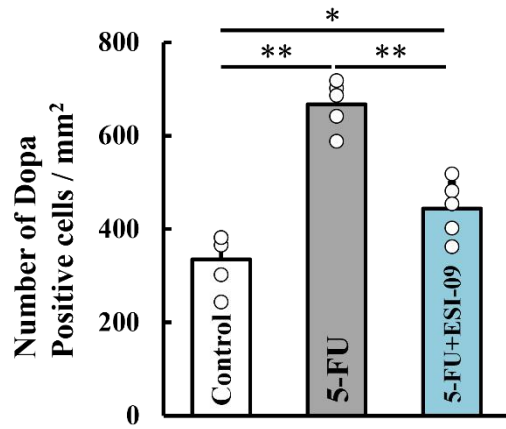
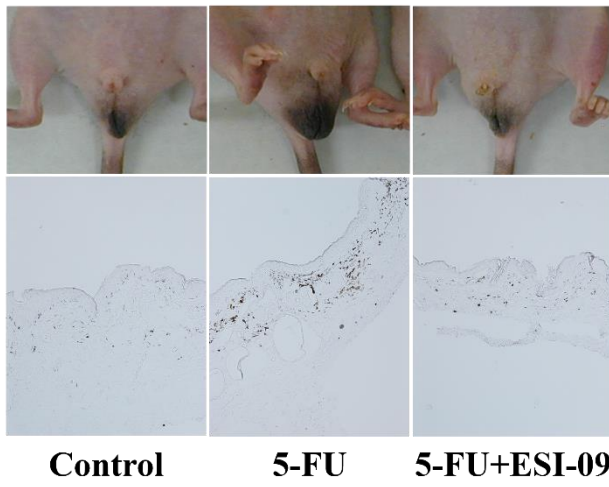
Values are presented as the mean  $\pm$  S.D. of five animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100  $\mu$ m. ASIP,  $\alpha$ -MSH inhibitor;  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; 5-FU, 5-fluorouracil; S.D., standard deviation.

### 3. ESI-09 投与が 5-FU 投与マウスの臀部皮膚の色素沈着とその関連遺伝因子に及ぼす影響

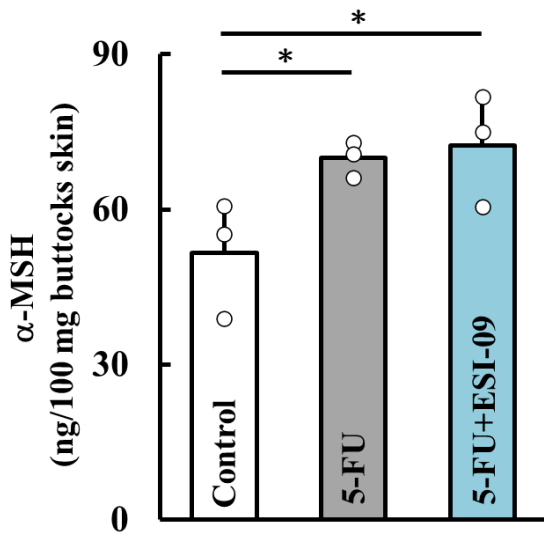
cAMP 拮抗薬の ESI-09 を投与し、cAMP の影響について検討を行った。ESI-09+5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスに比べて Dopa 陽性細胞数の増加が抑制され、肉眼的にも色素沈着が抑制された (Fig. 5A)。また、ELISA 法による  $\alpha$ -MSH、ACTH、cAMP の濃度比較では、5-FU 投与マウスと比して、ESI-09+5-FU 投与マウスで  $\alpha$ -MSH と ACTH の濃度に差はなく、cAMP 濃度の上昇が抑制された (Figs. 5B-D)。加えて、IF による Tyrosinase 発現数の検討では、5-FU 投与マウスと比して、ESI-09+5-FU 投与マウスで抑制された (Fig. 5E)。

この結果から、ESI-09 投与によって、5-FU による臀部の黒色化が抑制され、cAMP 濃度の減少、Tyrosinase 発現が抑制されたことから、5-FU 投与による色素沈着には cAMP 活性化の関与が示唆された。

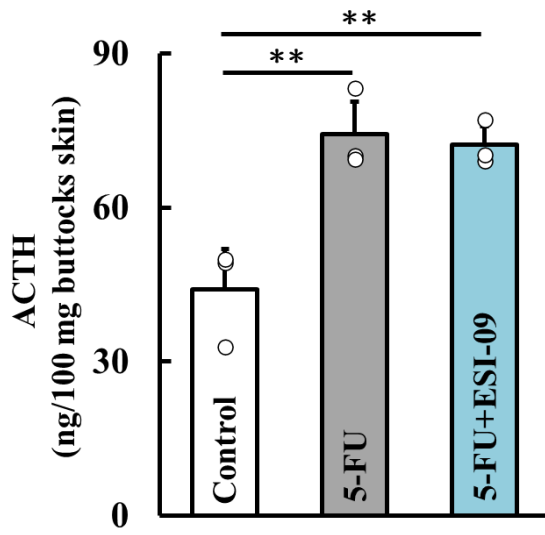
**A**



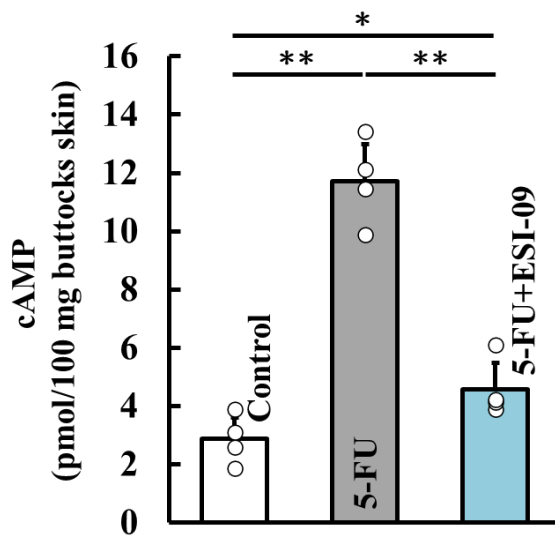
**B**



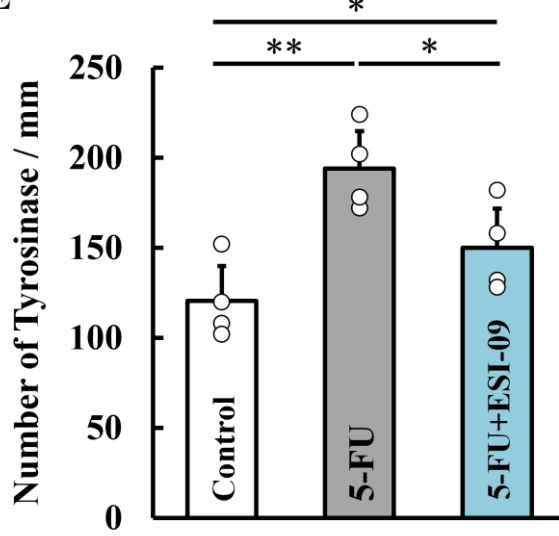
**C**



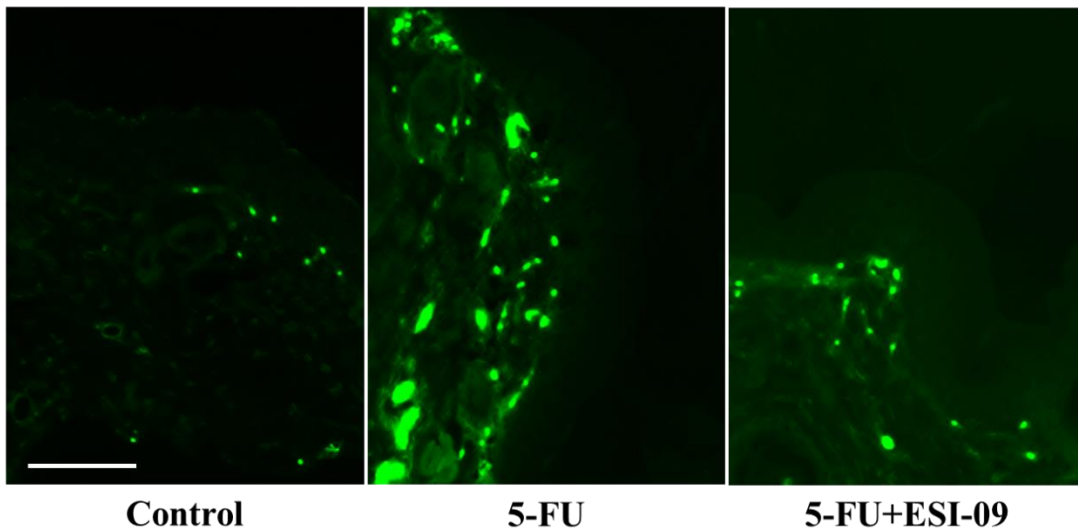
**D**



**E**



**E**



**Fig. 5. Effect of ESI-09 Treatment on Pigmentation (A), Levels of  $\alpha$ -MSH (B), ACTH (C), cAMP (D), and Expression of Tyrosinase (E) in the Skin around the Buttocks of 5-FU-Treated Mice**

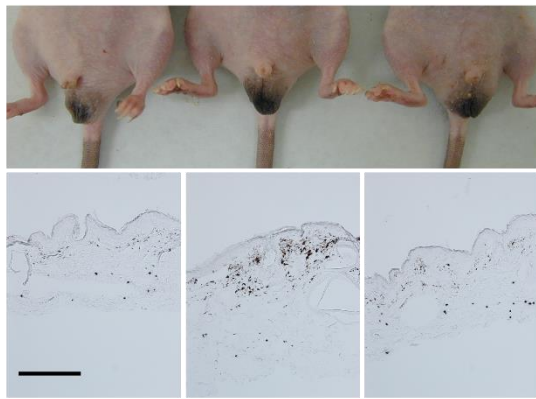
Values are presented as the mean  $\pm$  S.D. of five animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100  $\mu$ m. ESI-09, cAMP inhibitor;  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; 5-FU, 5-fluorouracil; S.D., standard deviation.

#### **4. ACTH (11-24) 投与が 5-FU 投与マウスの臀部皮膚の色素沈着とその関連因子に及ぼす影響**

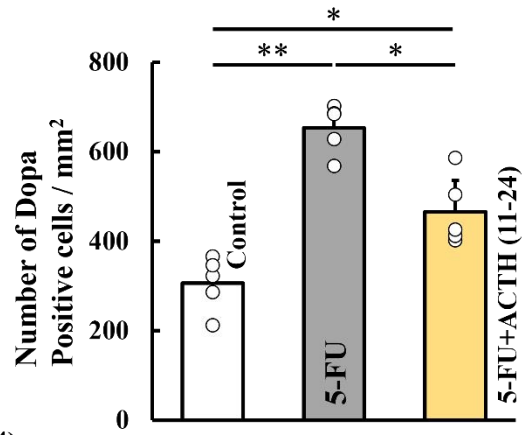
ACTH 阻害剤である ACTH (11-24) を投与し、ACTH の影響を検討した。ACTH (11-24) +5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスに比べて Dopa 陽性細胞数の増加が抑制され、臀部周囲皮膚の色素沈着は抑制された (Fig. 6A)。ELISA 法による  $\alpha$ -MSH、ACTH、cAMP の濃度比較では、5-FU 投与マウスと比して、ACTH (11-24) +5-FU 投与マウスで  $\alpha$ -MSH と ACTH の濃度に差はなく、cAMP 濃度の上昇が抑制された (Figs. 6B-D)。加えて、IF による Tyrosinase 発現数の検討では、5-FU 投与マウスと比して、ACTH (11-24) +5-FU 投与マウスで抑制された (Fig. 6E)。

この結果から、ACTH (11-24) 投与によって、5-FU による臀部の黒色化が抑制され、cAMP 濃度の減少、Tyrosinase 発現が抑制されたことから、5-FU による色素沈着には ACTH を介していることが示唆された。

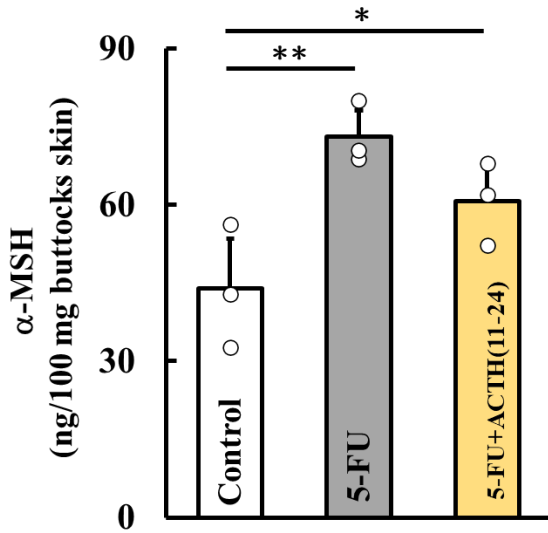
**A**



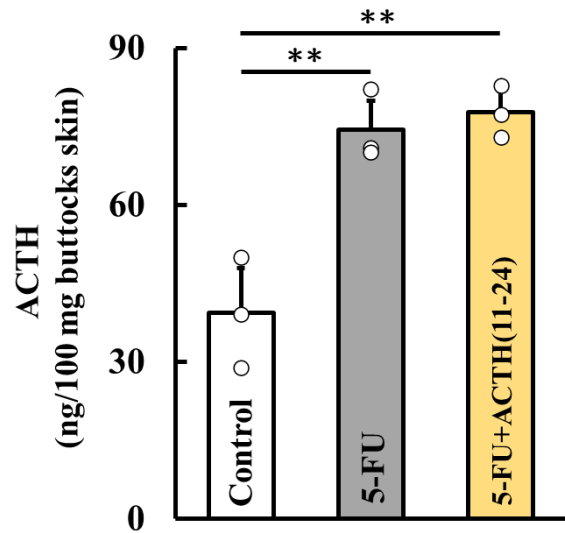
Control      5-FU      5-FU+ACTH (11-24)



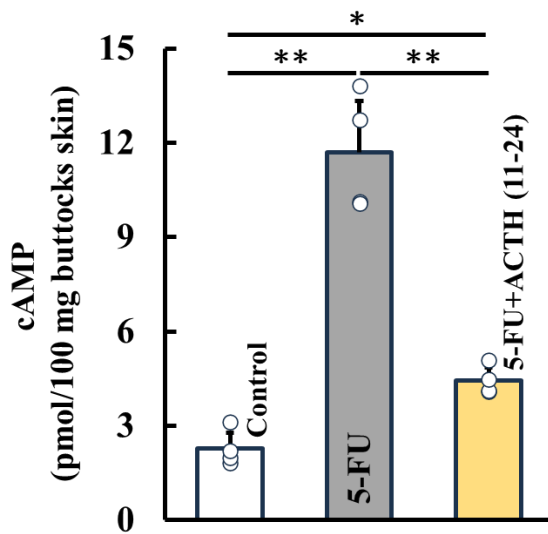
**B**



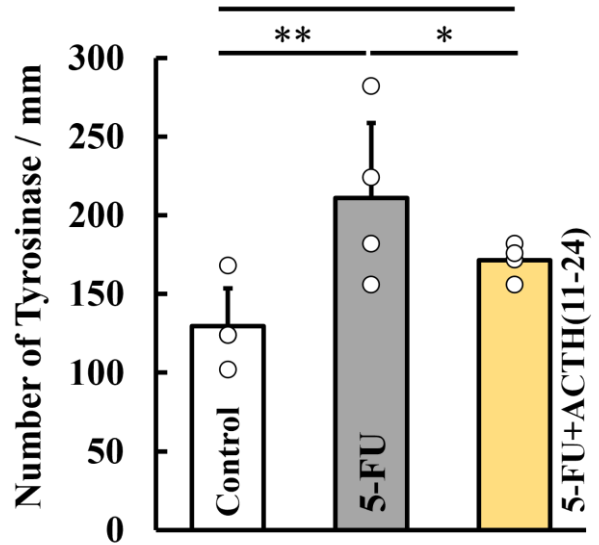
**C**



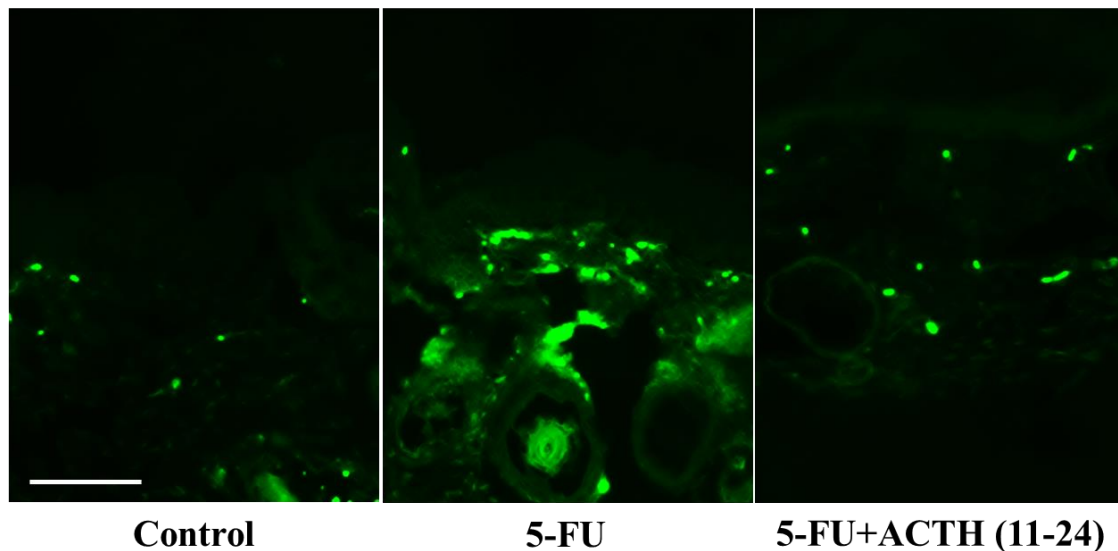
**D**



**E**



**E**



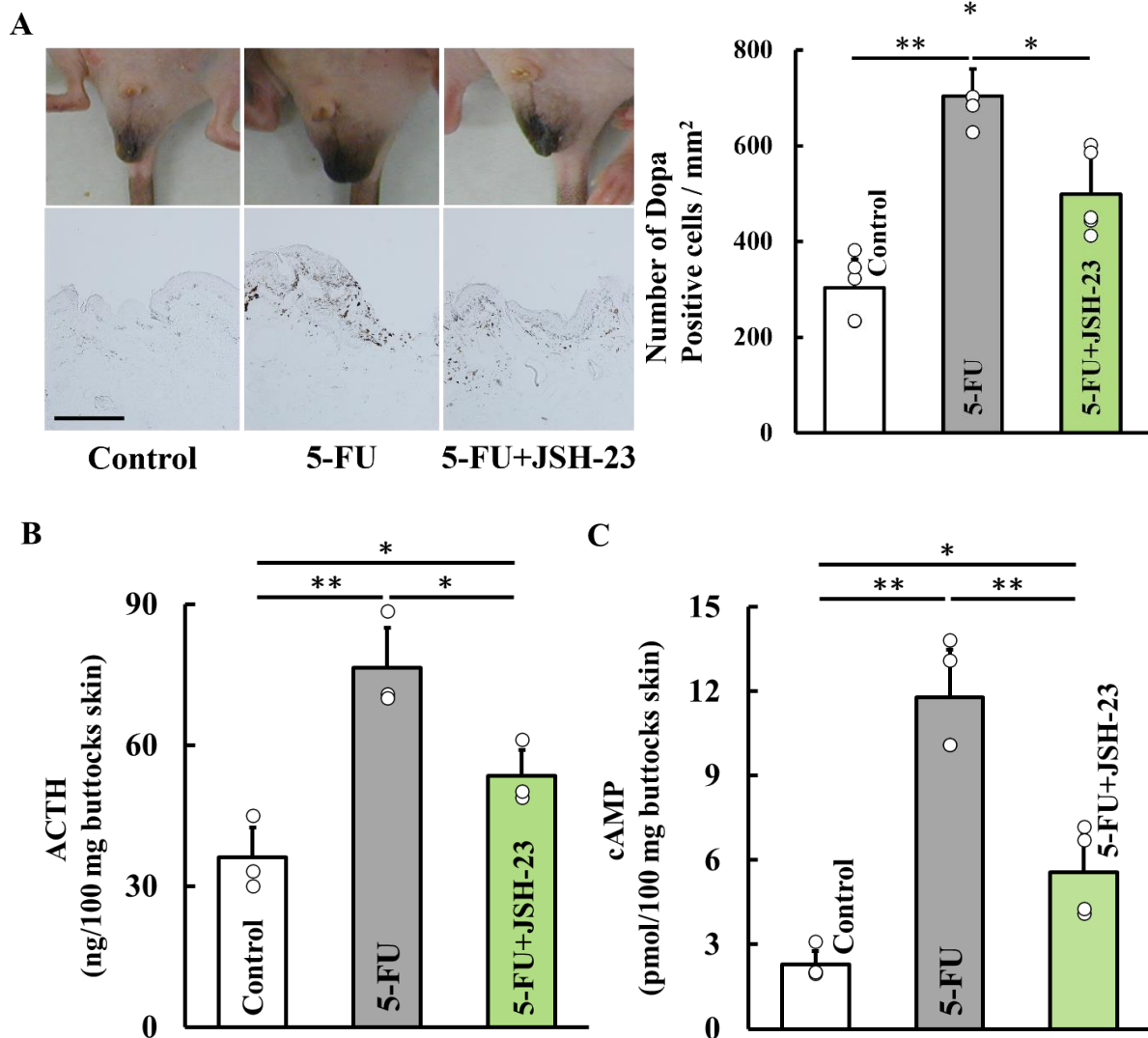
**Fig. 6. Effect of ACTH (11-24) Treatment on Pigmentation (A), Levels of  $\alpha$ -MSH (B), ACTH (C), cAMP (D), and Expression of Tyrosinase (E) in the Skin around the Buttocks of 5-FU-Treated Mice**

Values are presented as the mean  $\pm$  S.D. of five animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . ACTH (11-24), ACTH inhibitor;  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; 5-FU, 5-fluorouracil; S.D., standard deviation.

#### **5. 5-FU 投与マウスの臀部皮膚における色素沈着とその関連因子に対する JSH-23 投与の影響**

ACTH 濃度上昇のメカニズムを明らかにするために、JSH-23 を用いて ACTH 濃度を上昇させる転写因子である NF- $\kappa$ B の活性を阻害した。JSH-23+5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスに比べて、Dopa 陽性細胞数は抑制され、色素沈着が抑制された (Fig. 7A)。ELISA 法による ACTH と cAMP の濃度比較では、JSH-23+5-FU 投与マウスで、いずれにおいても 5-FU 投与マウスに比べて濃度が減少した (Figs. 7B、C)。

この結果から、臀部周囲の皮膚における色素沈着の発現には、cAMP と ACTH の濃度上昇のために NF- $\kappa$ B の活性が必要であると考えられた。



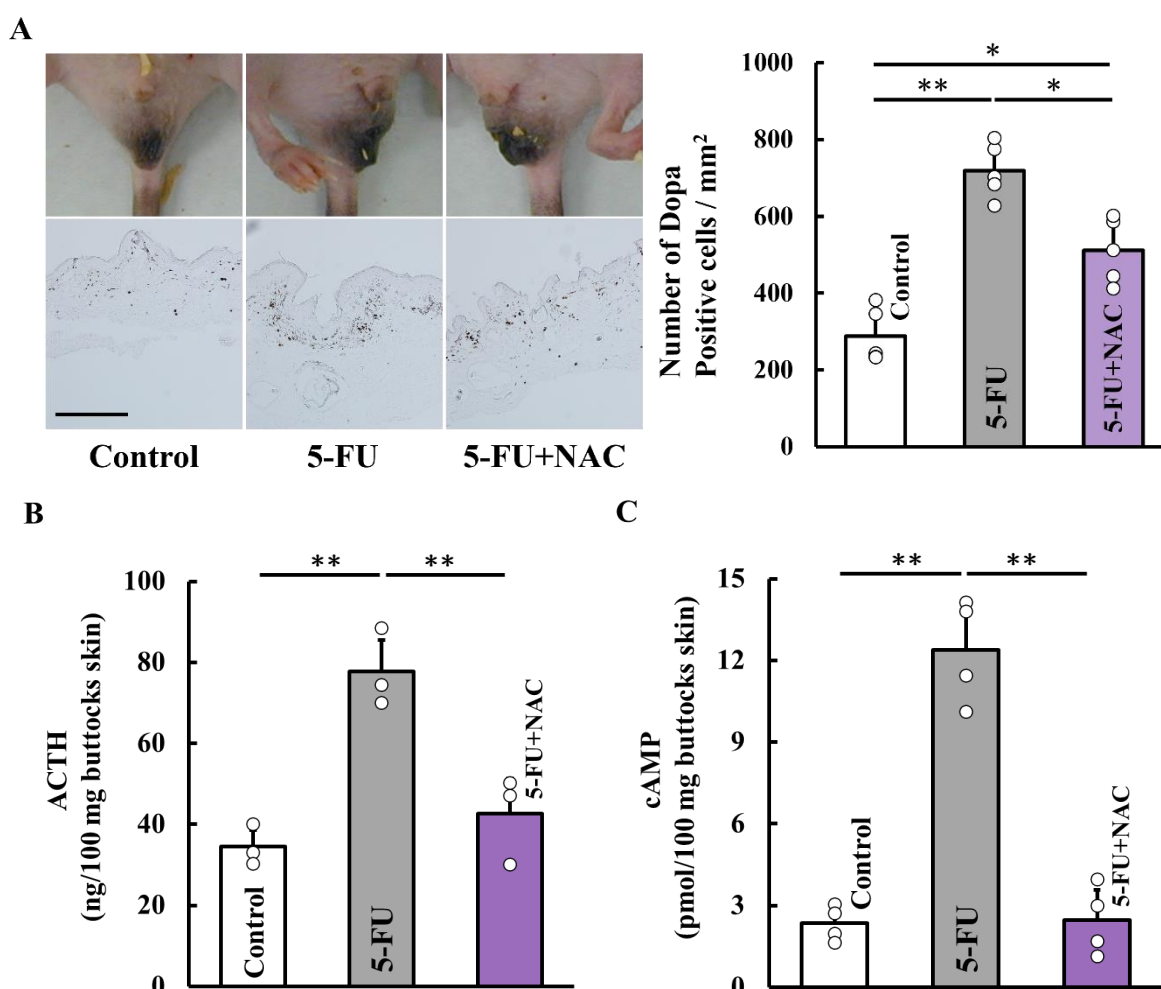
**Fig. 7. Effect of JSH-23 Treatment on Pigmentation (A) and the Levels of ACTH (B) and cAMP (C) in the Skin around the Buttocks of 5-FU-Treated Mice**

Values are presented as the mean  $\pm$  S.D. of five animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . The data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100  $\mu$ m. JSH-23, NF- $\kappa$ B inhibitor; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; 5-FU, 5-fluorouracil; S.D., standard deviation.

## 6. 5-FU 投与マウスの臀部皮膚における色素沈着とその関連因子に対する NAC 投与の効果

5-FU によって生じる酸化ストレスを抑制することで、色素沈着が抑制されるか確認するために NAC を用い検討を行った。NAC+5-FU 投与マウスでは、5-FU 投与マウスに比べて Dopa 陽性細胞数は抑制され、色素沈着が抑制された (Fig. 8A)。ELISA 法による ACTH と cAMP の濃度比較では、NAC+5-FU 投与マウスで、5-FU 投与マウスに比べていずれも濃度は減少した。さらに、ACTH および cAMP の濃度は Control 群と変わらなかった (Figs. 8B、C)。

これらの結果から、5-FU による臀部周囲の皮膚における色素沈着の発現には、酸化ストレスの誘導から始まるメカニズムが示唆された。



**Fig. 8. Effect of NAC Treatment on Pigmentation (A) and the Levels of ACTH (B) and cAMP (C) in the Skin around the Buttocks of 5-FU-Treated Mice**

Values are presented as the mean  $\pm$  S.D. of five animals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . The data show one representative experiment performed on five animals. Scale bar = 100  $\mu$ m. NAC, ROS inhibitor; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; 5-FU, 5-fluorouracil; S.D., standard deviation.



## 第4節 考察

5-FU を投与したマウスは、臀部周辺の色素沈着が顕著に増加した。さらに、色素沈着した皮膚サンプルでは、ACTH と cAMP 濃度、Tyrosinase 発現の増加が確認された。

色素沈着は一般的に、メラノサイトにおけるメラニンの産生によって起こると考えられている。メラニン合成は、メラノサイトの細胞内小器官であるメラノソームで起こり、そこでチロシンが Tyrosinase によって変換され、反応を触媒する<sup>4)</sup>。α-MSH は、メラノサイトの活性を調節することが知られている<sup>41)</sup>。メラノコルチン受容体はメラノサイトに発現し、メラニンの生合成に関与している。本実験で使用した 5-FU 製剤 (5-FU、カペシタビン、テガフルールなど) は色素沈着を引き起こす例が多い<sup>15)</sup>。そこで、まずメラノサイト活性化における α-MSH の役割を調べるため、ASIP を投与した。ASIP は α-MSH 阻害剤であり、α-MSH に関連する特定のメラノコルチン受容体 (MCR) に対してインバーシアゴニストとして作用する<sup>42)</sup>。5-FU による色素沈着は改善せず、α-MSH は 5-FU による色素沈着には関与していなかった。ASIP は cAMP 濃度を低下させることが報告されているが<sup>41)</sup>、本実験では確認されなかった。

続いて、cAMP が 5-FU 誘発性色素沈着に影響するのかについて検討するために、cAMP 阻害剤である ESI-09 を投与した。ESI-09 は、cAMP によって直接活性化される交換タンパク質 (EPAC) / cAMP 制御グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の cAMP 結合ドメインを標的とし、cAMP 依存性の EPAC/GEF 活性を阻害する<sup>43)</sup>。ESI-09 の投与は、5-FU によって誘導される色素沈着を減少させ、この過程に cAMP 活性化が関与していることを示唆した。

そこで、cAMP を活性化する物質について検討するにあたり文献的調査を行ったところ、副腎機能不全を原因とするアジソン病は、ACTH 産生を亢進させ、色素沈着を発現するとの報告があった<sup>44)</sup>。ACTH はストレスホルモンの一種であり、脳下垂体前葉の ACTH 産生細胞からプロオピオメラノコルチン (POMC) の前駆物質を経て産生され、ストレスにตอบสนองして分泌される。本試験において、5-FU 投与は ACTH 産生を増加させ、その関与が示唆された。また、ACTH 阻害剤である ACTH (11-24) を投与すると、色素沈着と cAMP 濃度が低下したことから<sup>36)</sup>、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。酸化ストレスは、腸管毒性や骨髄毒性などの重篤な 5-FU の副作用発現に関与している<sup>45)</sup>。さらに、5-FU の腹腔内投与は局所組織における酸化ストレスを増加させ、NF-κB を活性化して炎症を促進する<sup>46)</sup>。また、炎症は ACTH の放出を増加させることが知られている<sup>47,48)</sup>。したがって、これらの知見から、5-FU の投与は細胞内炎症を誘導することにより ACTH 分泌を増加させる可能性が示唆された。

以上のことから、ACTH 濃度が上昇するメカニズムについて検討を行った。本試験において、5-FU 投与は炎症マーカーである IL-6 と iNOS の血中濃度を上昇させた (data not shown)。この炎症は転写因子 NF-κB を活性化し、ACTH 値を上昇させる<sup>47,48)</sup>。したがって、NF-κB 阻害剤を投与することにより、ACTH の上昇が抑制され、色素沈着の増加が認められにくく



なった (Fig. 7)。さらに、5-FU 投与は酸化ストレスを増加させることが知られており、その結果、炎症マーカーが増加する<sup>46)</sup>。本試験では、酸化ストレスを抑制することで、ACTH 濃度と cAMP 濃度の増加が抑制された (Fig. 8)。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支持するものと考えられた。

## 第5節 小括

本試験において、5-FU 投与は臀部における色素沈着の増加を誘導し、その発現メカニズムには、5-FU/Oxidative stress/NF- $\kappa$ B/ACTH/cAMP/tyrosinase 経路の活性化が関与していることが明らかとなった。しかし、酸化ストレスを抑制すると、ACTH と cAMP はいずれも軽減したが、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発現メカニズムには、他の経路があるものと考えられた (Fig. 9.)。

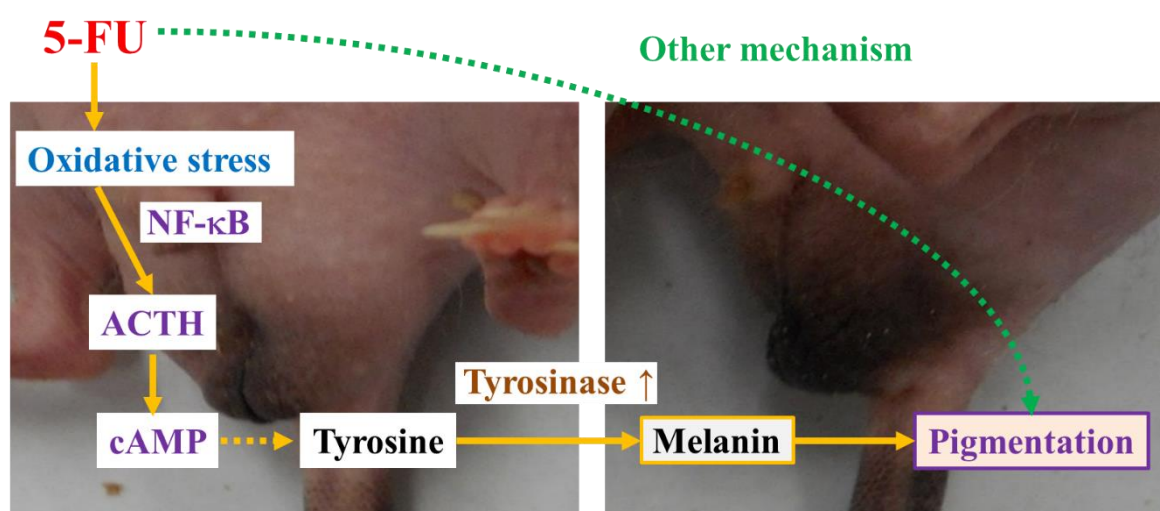


Fig. 9. Mechanism of pigmentation development in 5-FU-Treated-Mice, 5-FU/Oxidative stress/NF- $\kappa$ B/ACTH/cAMP/tyrosinase pathway and other

## 第2章

### 5-FU 投与によるメラニン生成および血管増生の関与

#### 第1節 緒言

第1章では、5-FU/Oxidative stress/NF- $\kappa$ B/ACTH/cAMP/Tyrosinase 経路の活性化が 5-FU 投与による色素沈着発現を支持することを明らかにした<sup>49)</sup>。しかし、酸化ストレスを抑制するだけでは、5-FU による色素沈着を抑制することができないため、第2章では、酸化ストレスとは異なる経路での色素沈着発現メカニズムを探索することとした。

抗がん薬による薬剤性の色素沈着発現メカニズムは、メラニン産生の直接刺激やケラチノサイトを介した刺激、炎症後に惹起される色素沈着、局所血流の増加およびその後の薬物の沈着に起因すると考えられている<sup>2)</sup>。肝斑における皮膚所見から色素沈着と血管密度の関連が報告されている<sup>21)</sup>。広く知られる肝斑は、顔面に発生する後天性色素増加性疾患の一種である。その病因は、紫外線曝露と女性ホルモンによるメラノサイトの活性化がその原因<sup>49)</sup>として考えられており、皮膚メラニン量の増加<sup>51)</sup>を特徴である。肝斑の病変部では、組織学的な研究により周囲の健康な皮膚と比較して、血管の増加が顕著であることが明らかにされている<sup>51,52)</sup>。さらに、血管内皮細胞がメラノサイトに作用し、Tyrosinase に関連するメラニン産生のシグナル誘導をすることが示唆されている<sup>21)</sup>。血管内皮細胞から分泌される血管収縮ペプチドである Edn1 の分泌を介し、メラニン産生の主要な遺伝子調節因子である MITF および Tyrosinase、チロシナーゼ関連タンパク質 TRP2 (Tyrosinase related protein-2) を上方の経路で制御している。

5-FU 投与によって引き起こされる色素沈着を伴う皮膚障害には、Persistent serpentine supravenuous hyperpigmented eruption (PSSHE)<sup>53)</sup> や Serpentine supravenuous hyperpigmentation (SSH)<sup>54)</sup> が挙げられる。これらは皮膚上の表在静脈網に続く色素沈着で、血管が開存していることが特徴であり、血管内皮細胞や炎症、メラニンが病因に関与していると考えられている。第1章では酸化ストレスや炎症が色素沈着の一端に関与していることを明らかにしたことから、第2章では 5-FU 連続投与による影響をさらに追及するため、血管と Tyrosinase との関連について検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

本研究は、SPF 9 週齢の Hos:HRM-2 雄性マウス (colored hairless mouse; Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Shizuoka, Japan) を SLC (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) から購入した。第 1 章と同条件で、すべてのマウスは個々にケージに入れ、 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55\pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (light: 8:00-20:00) の環境下、固形飼料 (rodent diet EQ 5L37; Japan SLC, Inc.) および水は自由に摂取させ、いずれも 1 週間の馴化飼育を実施した。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験指針 (承認番号: 第 82 号) に従って実施した。

### 2. 各種抗がん薬投与による皮膚色素沈着の誘発

馴化後、マウスを無作為に 2 群または 4 群に分け、1 群はコントロールマウスとして生理的食塩水 (Control) を腹腔内投与した。もう一方の群には、5-FU (15 mg/kg, Kyowa Kirin, Tokyo, Japan)<sup>55</sup>、Cytarabine (Ara-C; 20 mg/kg, Nippon Shinyaku, Kyoto Japan)<sup>56</sup>、または Irinotecan (CPT-11; 20 mg/kg, Daiichi-Sankyo, Tokyo, Japan)<sup>56</sup>を腹腔内注射した。各薬剤は 1 週間のうち 6 日間、合計 8 週間連続で投与した。

### 3. 耳介部周囲の皮膚の採取

実験開始 8 週間後、ペントバルビタールナトリウム (5 mg/mL, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 50 mg/kg となるように腹腔内投与してマウスに麻酔したのち、実験に用いた。マウスの耳介組織を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。すべての外科的処置は、動物の苦痛を最小限にするよう的確に行った。

### 4. 皮膚組織の染色

マウスから採取した耳介組織の一部は、Fontana-Masson 染色、免疫組織化学染色に用いるため、4% phosphate-buffered formaldehyde で固定した。固定した耳介部の皮膚組織は、パラフィンブロックに包埋し、Microsystems (Wetzlar, Germany) を用いて、厚さ 3  $\mu\text{m}$  の切片に切り出した。切片は、皮膚の組織学的分析を行うために、定められた手順に従って Hematoxylin-Eosin (HE) で染色し、光学顕微鏡にて観察し、組織学的に傷害の検討を行った。臀部皮膚の色素沈着面積を Image J, version 1.47 (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて定量測定した。

### 5. Fontana-Masson (FM) 染色

耳介組織を脱パラフィンし、蒸留水で洗浄した後、 $60^{\circ}\text{C}$ に温めた Fontana ammoniacal silver solution (Muto Pure Chemicals Co., Tokyo, Japan) に浸して一晩インキュベートした。その後、Gold Chloride Solution (0.2%) に浸し、30 秒インキュベートし、蒸留水

で洗浄、さらに Sodium Thiosulfate Solution (5%) で1分間洗浄し、蒸留水で洗浄し、nuclear fast solution で5分間対比染色した。組織を60%、70%、80%、90%、100%のエタノールに低濃度から順に浸し、脱水処理を行い、その後、封入を行った。片側の耳介皮膚の色素沈着面積は、Image J, version 1.47 を用いて比較した。

## 6. 免疫組織化学染色

脱パラフィン後、PBS で3回洗浄し、6  $\mu$ m 切片を2%スキムミルクで室温20分間処理してブロッッキングした。Tyrosinase および vWF (von Willebrand factor)、CD31 の発現は、免疫蛍光染色法を用いて皮膚組織サンプルで測定した。組織サンプルは、Tyrosinase (1:100; Bioss, Boston, USA) または vWF (1:100; Bioss)、CD31 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) に対する抗体を用いて4°Cで一晩染色した。PBS で3回洗浄後、ヤギ抗ウサギ IgG Alexa Flour 488 二次抗体 (A32731, Invitrogen, Waltham, MA, USA) を PBS で1:200 希釈し、室温、暗所で2時間インキュベートした。染色した組織をマウント液 (Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI; Vector Laboratories, CA, USA) を用いてマウントし、蛍光顕微鏡 (BZ-X800, Keyence, Tokyo, Japan) で観察した。Tyrosinase や vWF、CD31 陽性細胞の領域測定には、Image J, version 1.47 を用いて、各サンプルの4つの異なる領域で評価した。

## 7. 統計解析

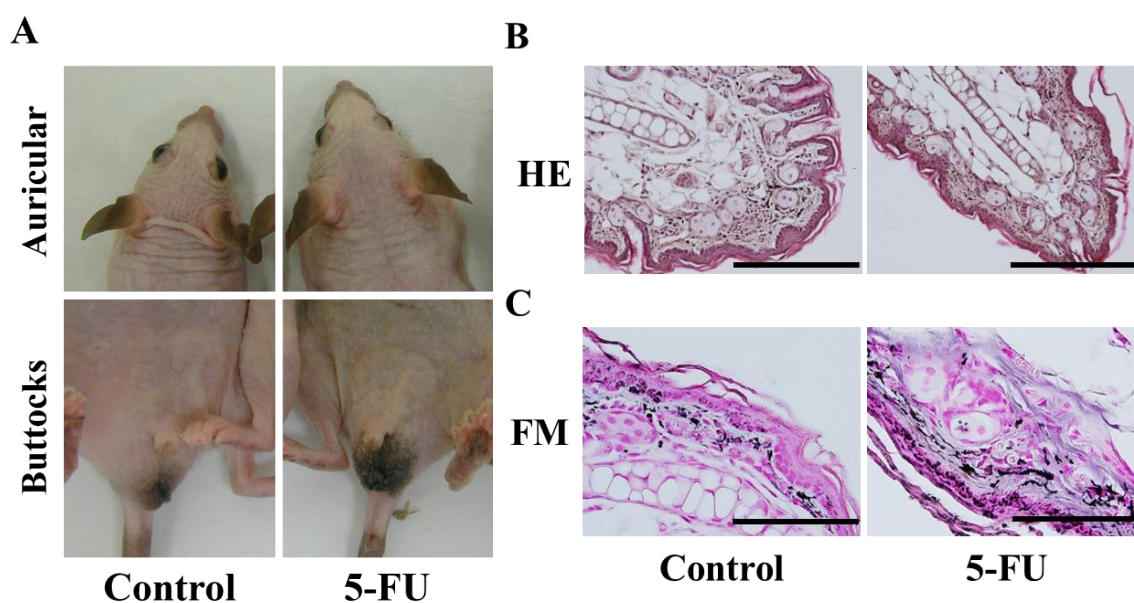
全てのデータは平均値 $\pm$ SD で表した。2群間の比較には、対応のない Student's *t*-test で分析した。3群間以上のデータの比較には、一元配置分散分析 (one-way analysis of variance: one-way ANOVA) を用い、その後の多重比較には Student-Newman-Keuls test を用いた。結果は、*p* 値 \* $<0.05$  または \*\* $<0.01$  を統計的に有意であると判断した。統計解析は SPSS version 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) にて実施した。

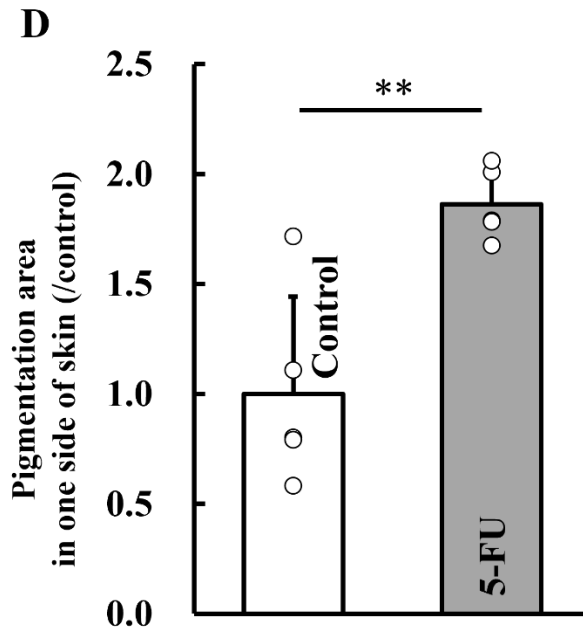
### 第3節 結果

#### 1. 皮膚とメラニン集積の肉眼的な比較

5-FU 投与 8 週後、耳介部と臀部に黒色に変化した部分が観察された (Fig. 10A)。HE 染色では各群とも明らかな組織学的変化は認められなかった (Fig. 10B)。耳介部のメラニン蓄積について FM 染色を行ったところ、5-FU 投与マウスでは Control マウスに比べて表皮基底層のメラニンが増加していた (Figs. 10C、10D)。

これらの結果から、5-FU 投与による耳介部における色素沈着にはメラニンが関与していると示唆された。





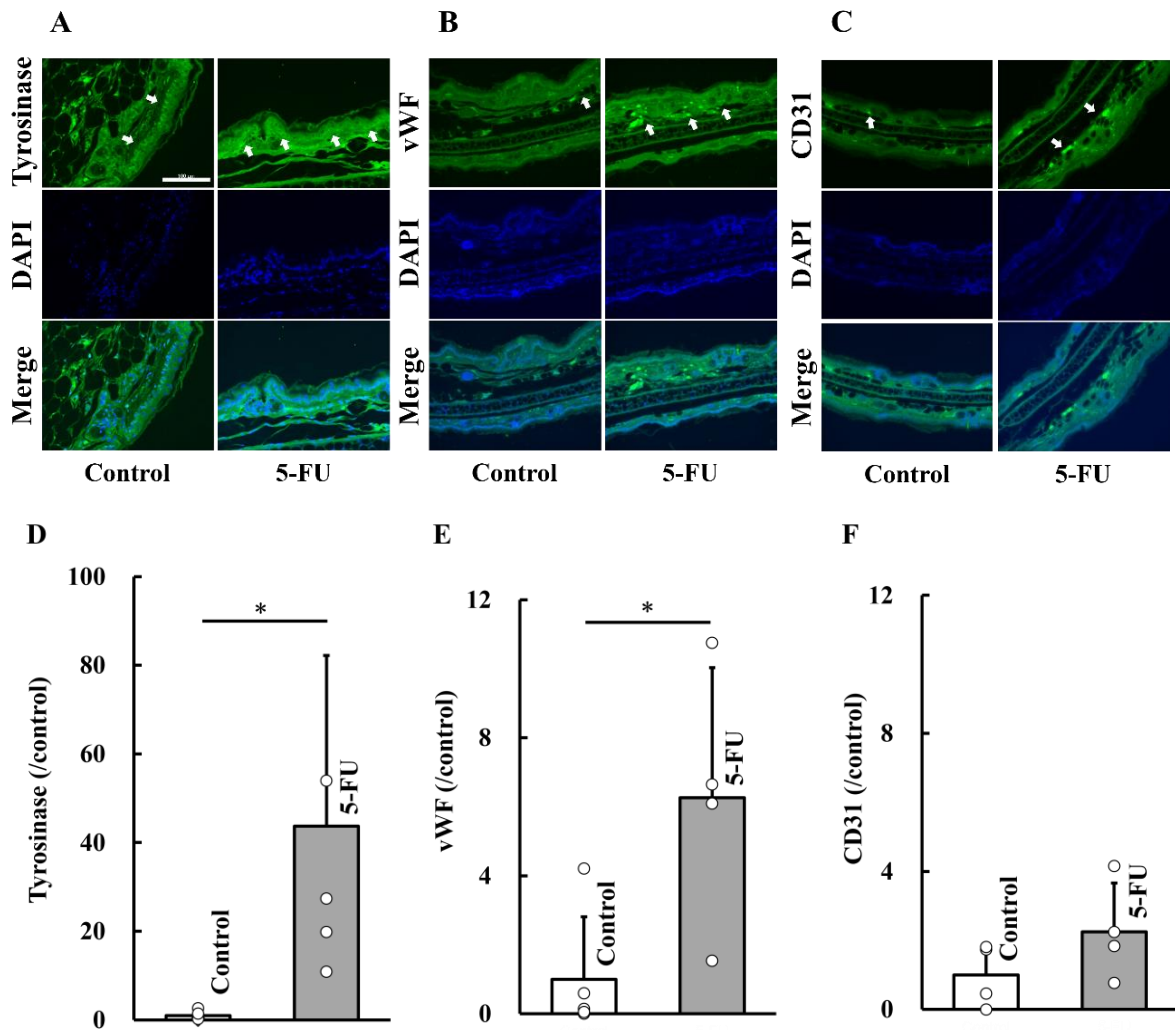
**Fig. 10. Pigmentation induced by 5-FU administration**

(A) The photographs show the pigmentation differences between the auricular and buttocks skin. (B) The auricular skin sections were stained with Hematoxylin and eosin (HE) staining. This staining was compared to histopathological changes in auricular skin in control and 5-FU-administered mice. Bar : 200  $\mu$ m (C, D) Fontana–Masson (FM) staining of the auricular skin sections. This staining was used to compare melanin expression in control and 5-FU-administered mice. Bar: 100  $\mu$ m. The values are expressed as the mean  $\pm$  SD derived from five mice. (unpaired Student's t-test, \*  $p < 0.05$  significant difference)

## 2. Tyrosinase および血管に対する 5-FU の影響

耳介部の色素沈着における Tyrosinase の関与を調査するため IF を行ったところ、5-FU 投与マウスの表皮基底層で有意な Tyrosinase 発現の増加が示された (Figs.11A、11D)。メラニン産生と血管内皮細胞との関係を調べるために、血管マーカーである vWF と CD31 の発現を IF で比較した。その結果、血管マーカー vWF の発現は、5-FU 投与マウスの真皮層で Control に比べて有意に増加しており (Figs. 11B、11E)、CD31 の発現は増加傾向を示した (Figs. 11C、11F)。

これらの結果から、5-FU 投与によるメラニン生成にも血管と同様に Tyrosinase が関与している可能性が示唆された。



**Fig. 11. Comparison by fluorescent immunostaining at the pigmentation in the auricular of control and 5-FU administered mice**

Tyrosinase (A, D), a rate-limiting enzyme for melanogenesis, vWF (B, E), and CD31 (C, F) were analyzed. (A) Bar: 100  $\mu$ m (B, C) Bar: 200  $\mu$ m Values are expressed as mean  $\pm$  SD derived from three to five mice. (unpaired Student's t-test, \*  $p < 0.05$ , significant difference)



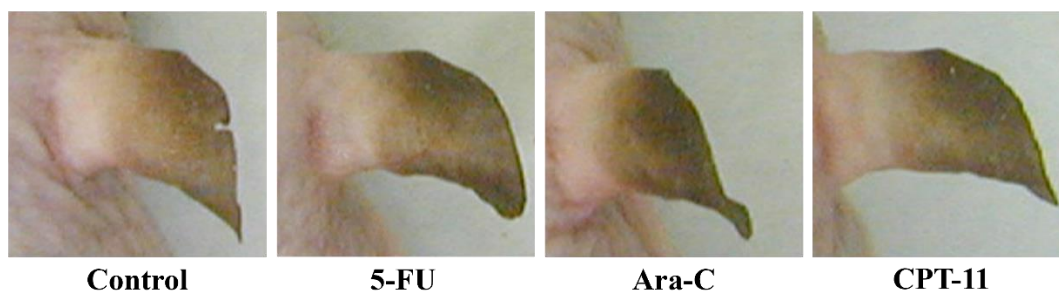
### 3. 他の抗がん薬投与マウスにおける色素沈着の比較

これらの色素沈着が5-FU特異的であるか否かを検討するため、5-FU投与マウスをAra-CおよびCPT-11投与マウスと比較したところ、5-FU投与8週間後では、耳介部が黒く変化していた(Fig. 12A)。耳介部では、Controlと比較して黒色に変化していた(Fig. 12A)。さらに、臀部皮膚の色素沈着面積は、Control、Ara-C、CPT-11投与マウスに比べて有意に拡大していた(Figs. 12A、B)。HE染色では、各群とも明らかな組織学的変化は認められなかった(Fig. 12C)。次に、耳介部のメラニン蓄積についてFM染色で比較した。表皮基底層におけるメラニン蓄積は、Control、Ara-C、CPT-11に比べ、5-FUでは有意に増加した(Figs. 12C、12D)。

これらの結果は、メラニン蓄積を伴う耳介および臀部皮膚の色素沈着が5-FUにおける特徴的な所見であることを示唆している。

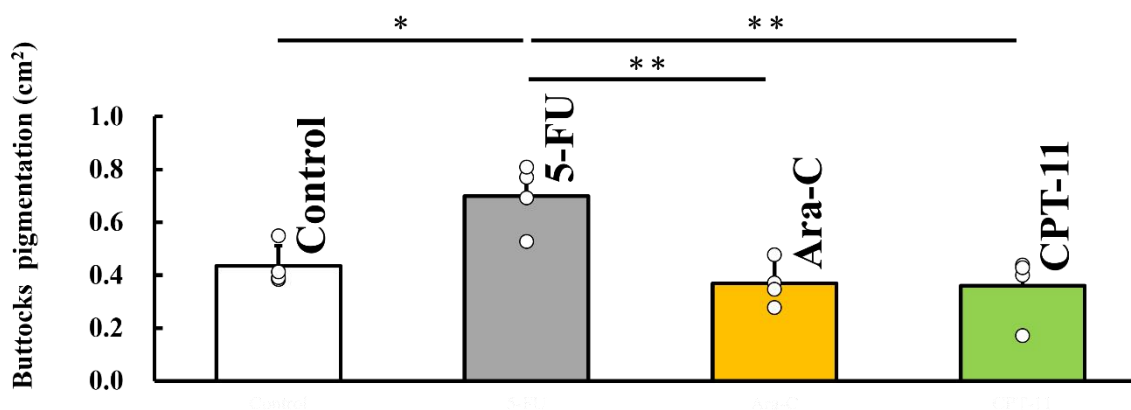
A

#### Auricular

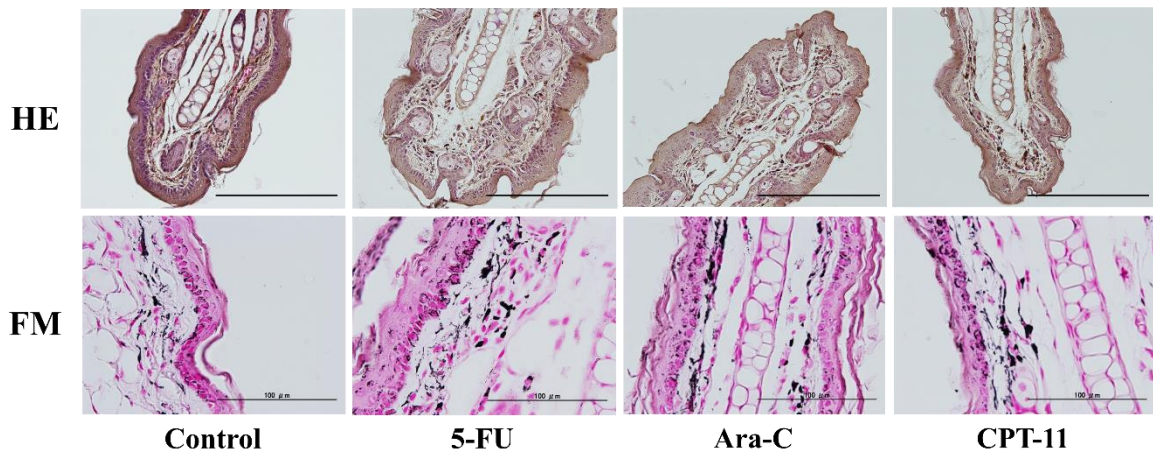


B

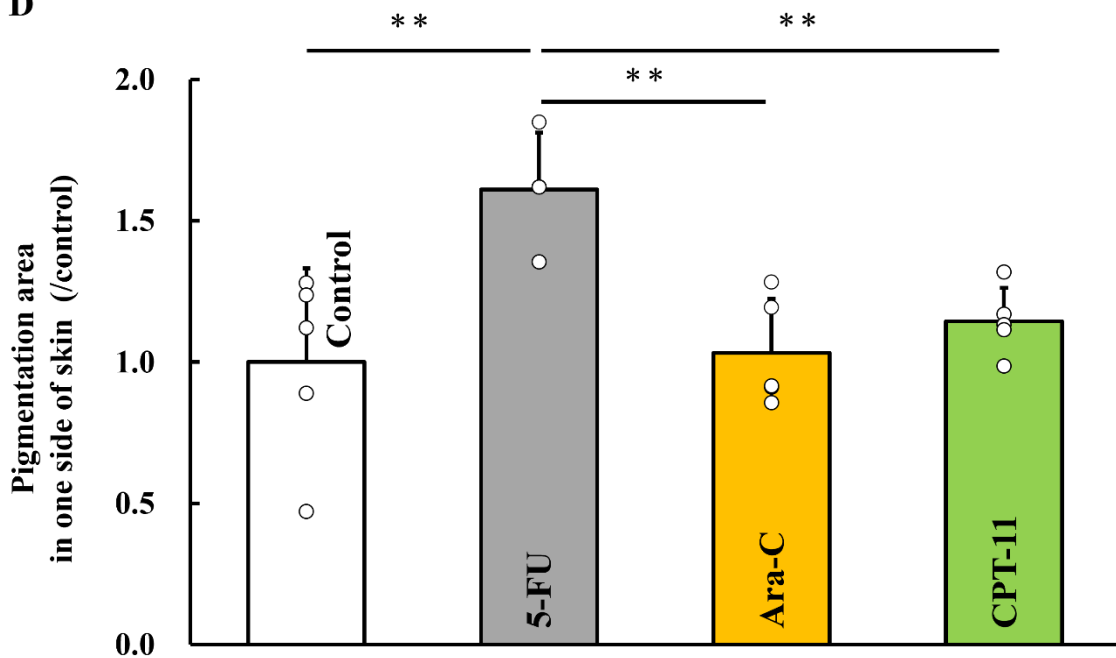
#### Buttocks



C



D



**Fig. 12. Comparison of external pigmentation in the auricular and buttocks with 5-FU, Ara-C, and CPT-11 administered mice**

Visual and histological changes in the auricular area and buttocks of the control, 5-FU, Ara-C, and CPT-11 groups were compared. (A) External color changes of the auricular skin. (B) Comparison of external color changes and areas of pigmentation on the buttocks. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD derived from four mice. Student–Newman–Keuls test, \*  $p < 0.05$ , significant difference (C, D) Hematoxylin and eosin (HE) and Fontana–Masson (FM) staining of auricular skin sections. This staining was used to compare histopathological changes and melanin expression in the auricular skin of control, 5-FU-, Ara-C, and CPT-11 administered mice. Bar: 200  $\mu$ m Hematoxylin and

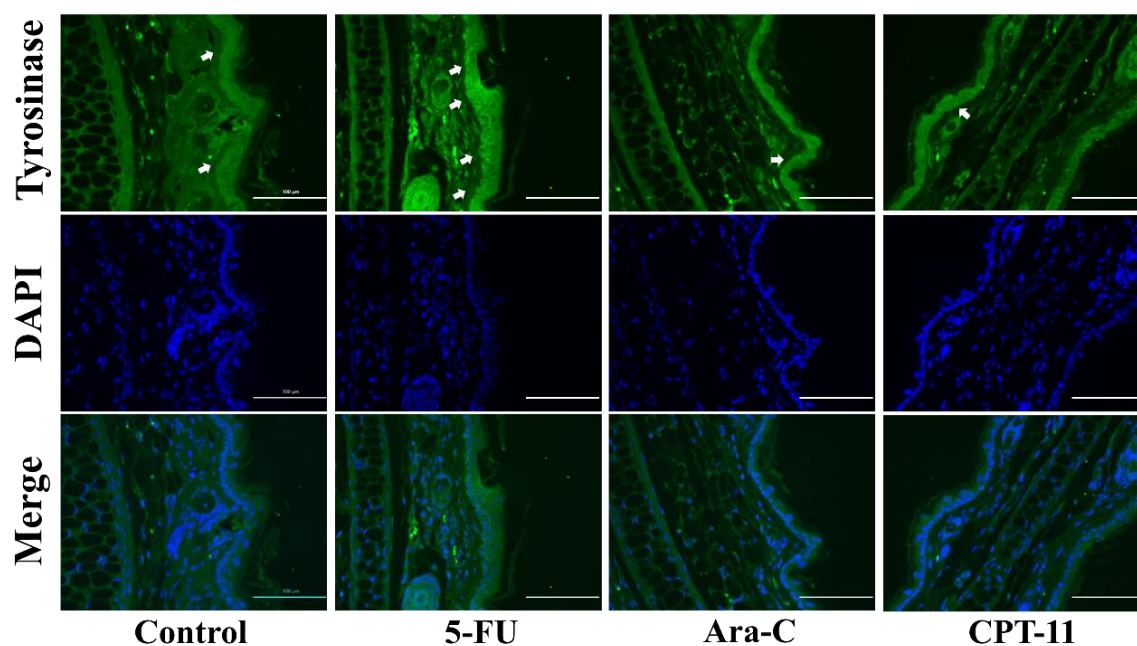
eosin (HE), Bar: 100  $\mu$ m Fontana–Masson (FM) staining. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD derived from five mice. Student–Newman–Keuls test, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

#### 4. Tyrosinase および血管に対する 5-FU および他の抗がん薬投与との比較

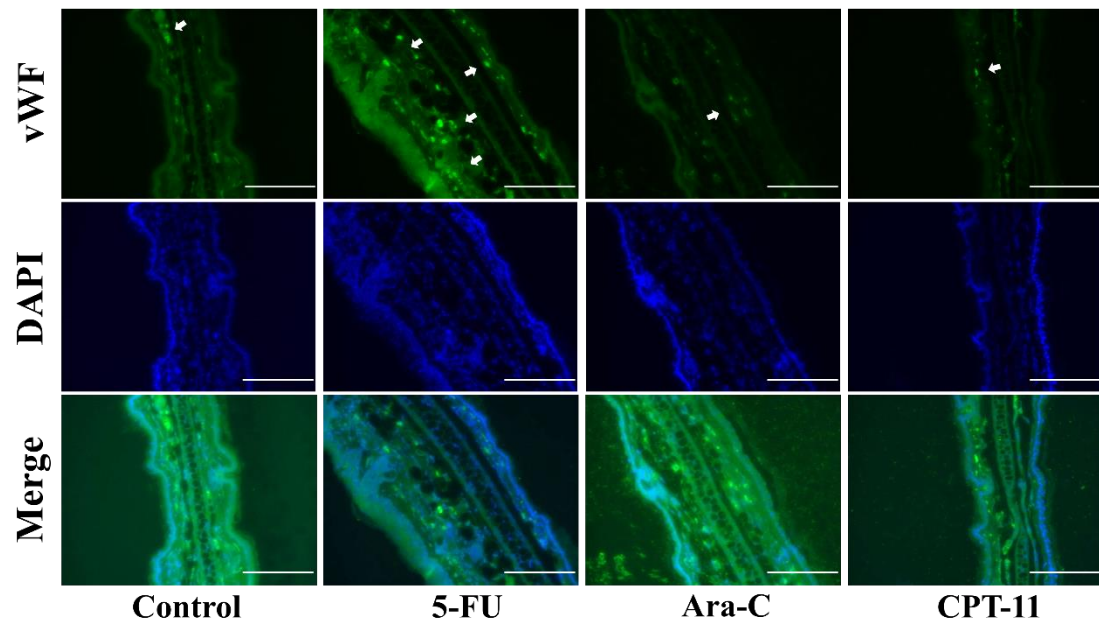
Tyrosinase および血管マーカーである vWF、CD31 の発現量を IF で比較した。Tyrosinase の発現は、5-FU では、Ara-C および CPT-11 と比べて表皮基底層で有意に増加し、Control と比べて増加傾向を示した (Figs. 13A, 13D)。vWF の発現は、5-FU では真皮で有意に増加していた (Figs. 13B, 13E)。CD31 の発現は、Control、Ara-C、CPT-11 と比較して、5-FU では、真皮で増加傾向を示した (Figs. 13B, 13F)。

これらの結果は、5-FUによる色素沈着が、異なる機序の抗がん薬と比較して、Tyrosinase と血管マーカーが関与する特徴的な機序によって引き起こされたことを示していると考えられる。

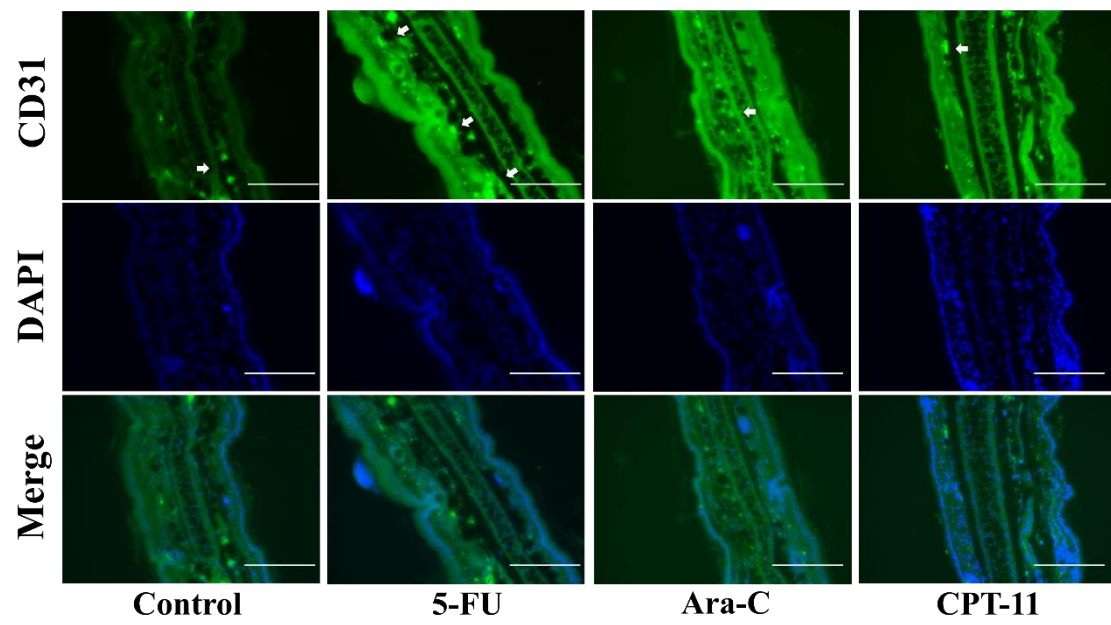
**A**

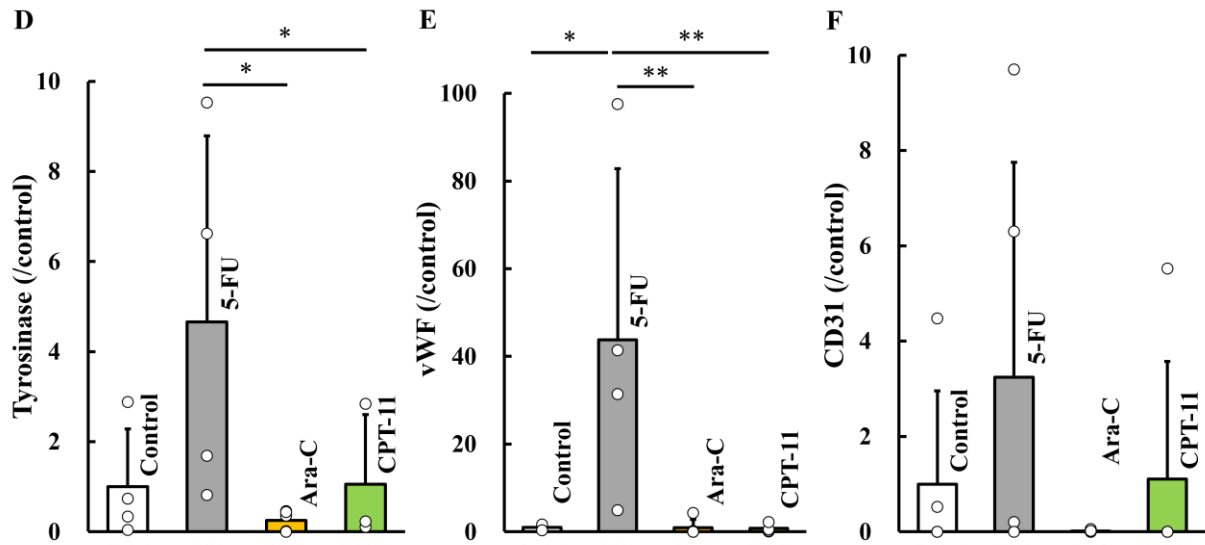


**B**



**C**





**Fig. 13. Comparison by fluorescent immunostaining at the pigmentation in the auricular of control, 5-FU, Ara-C, and CPT-11 administered mice**

The fluorescence intensities of tyrosinase (A, D), vWF (B, E), and CD31 (C, F) were compared in 5-FU-, Ara-C, and CPT-11 administration mice. Tyrosinase was expressed in the basal epidermal layer, whereas vWF and CD31 were expressed in the dermis. (A) Bar, 100  $\mu\text{m}$  (B, C) Bar, 200  $\mu\text{m}$ . Values are expressed as mean  $\pm$  SD derived from three to five mice. Student–Newman–Keuls test, \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

## 第4節 考察

本研究において、マウスに 5-FU を投与すると、耳介部および臀部に色素沈着が誘導された。さらに、5-FU 投与マウスでは、表皮基底層のメラノサイトにおける Tyrosinase 発現の亢進によってメラニンが産生されたことから、表皮基底層のメラノサイトによってメラニンが産生されていることが示唆された。さらに、血管の増生がその Tyrosinase 発現の増加に関与している可能性がある。

ヘアレスマウスに 5-FU 軟膏を投与したところ、びらん・潰瘍後に色素沈着がみられた<sup>54)</sup>が、本研究と同様に 5-FU 全身投与により色素沈着がみられた<sup>3,53,54,58,59)</sup>。また、5-FU をプロトコル含む化学療法を受けた大腸がん患者では、vWF の増加を伴う血管内皮の損傷がみられている<sup>60)</sup>。また、血小板内皮細胞接着分子である CD31 は、血管内皮細胞の運動性や血管の組織化に必要なシグナル伝達への関与が示唆されている<sup>61)</sup>。5-FU 投与により、血管マーカー発現の増加とともにメラニン形成が誘導されたことから、血管内皮細胞の増加と 5-FU による色素沈着との関連が示唆された。さらに、5-FU は Ara-C や CPT-11 に比べて血管マーカーの発現を増加させる傾向があった。この結果は、耳介部における異常な血管増殖を介した色素沈着が 5-FU に特異的である可能性を示した。

抗がん薬による色素沈着の機序は、様々なメカニズムが関与していると推測される<sup>62)</sup>。例えば、メラノサイトへの直接刺激、その後のメラニン産生亢進、副腎毒性によるコルチコトロピンの過剰分泌、 $\alpha$ -MSH の過剰分泌、Tyrosinase 阻害酵素の欠損、原因薬剤とのメラニン複合体の形成、ケラチノサイト傷害後の炎症性色素沈着（光感作の有無にかかわらず）、血栓性静脈炎後の炎症後色素沈着などである。さらに、抗がん薬によって誘発される色素沈着は、急性または慢性の傷害部位で生じ、局所血流の増加によって引き起こされた<sup>62)</sup>。本研究の結果は、色素沈着と局所血流の関連を示す重要な知見であり、色素沈着による 5-FU 投与のメカニズムに役立つと考えられる。

しかし、5-FU が Tyrosinase を直接刺激することによってメラニン合成を促進するののかについては不明であり、今後の検討課題である。また、同じ代謝拮抗薬である Ara-C は 5-FU と同様の結果を示さなかったことから、薬剤の作用機序や代謝経路の違いにより、様々なタイプのメラニンによる色素沈着が発現する可能性が示唆され、今後の検討が必要である。さらに、薬剤性色素沈着におけるメラニン産生には、多くの炎症因子が関与していることから<sup>63)</sup>、抗がん薬による炎症後色素沈着についても検討する必要がある。

さらに、5-FU は肥厚性癬痕<sup>64)</sup>やケロイド<sup>65)</sup>に対する局所投与が治療に用いられており、真皮に多く存在する線維芽細胞におけるチミジル酸合成酵素を阻害して DNA 複製を阻害することで細胞分裂が停止し、癬痕の分解が促進されると考えられている<sup>66,67)</sup>。5-FU はコラーゲン合成の負の調節因子として作用し、コラーゲンタンパク質の合成を阻害し、阻害率は 5-FU 濃度が高いほど増加する。とくに I 型および III 型コラーゲンの mRNA 発現が減少する<sup>68)</sup>。線維芽細胞由来の細胞老化に関連する成長分化因子 GDF-15 は、メラノサイト



のメラニン産生を促し色素沈着に関与する<sup>69)</sup>。また、大腸がん治療に用いるロイコボリン+5-FU+オキサリプラチンの投与によってGDF-15濃度が増加する<sup>70)</sup>ことから、抗がん薬による色素沈着の一端にGDF-15も関連していると考えられる。

## 第5節 小括

本研究では、5-FU によって誘発される色素沈着が耳介部における表皮基底層におけるメラニン産生に関与していることを明らかにした。さらに、耳介部の真皮において血管マーカーである vWF と CD31 が発現していたことから、血管新生や血管内皮細胞と関連していることを示唆した (Fig. 14.)。本章で得られた結果は、5-FU 誘発性色素沈着の発現メカニズムを解明し、色素沈着の治療および予防のための標的タンパク質を同定する上で重要であると考えられる。

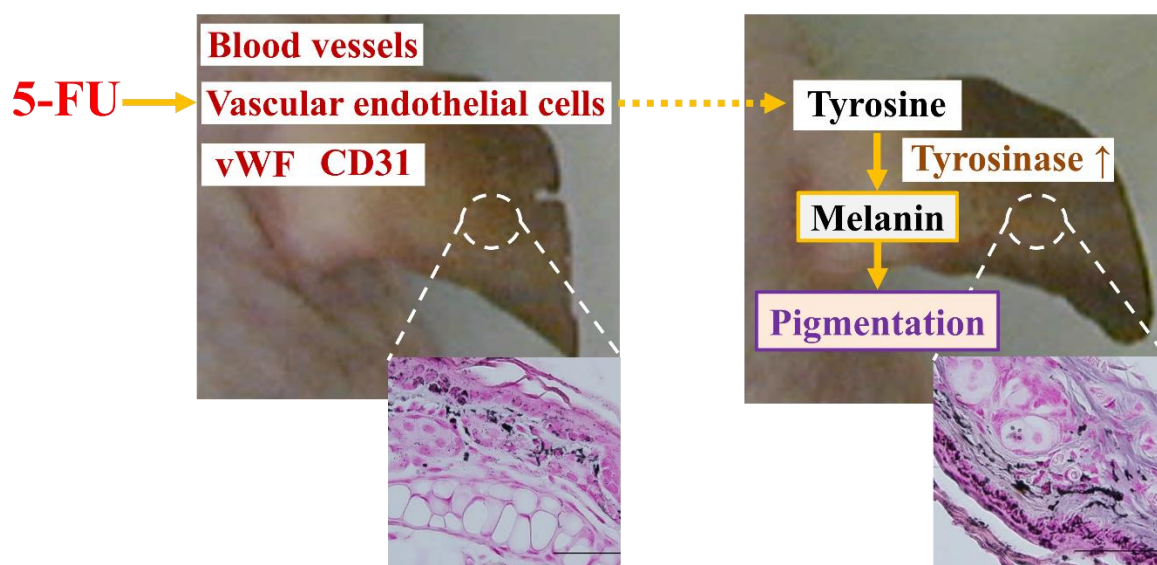


Fig. 14. Mechanism of pigmentation development in 5-FU-Treated-Mice, vascular endothelial cells mediated pathway associated with vWF and CD31



## 結 論

本論文では、実際の医療現場で遭遇するが軽視する傾向にある 5-FU 投与における色素沈着について着目した。5-FU 投与によって PSSHE や SSH といった色素沈着を伴う皮膚障害を起こすことは症例として報告されている。一方で、色素沈着の原因はメラニンであると推察されているが、これらを明らかにした研究はない。また、5-FU をはじめとした抗がん薬における色素沈着の発現メカニズムは明らかにされておらず、保湿やスキンケアといった対処療法が行われているのみである。そこで、今回我々は、5-FU 投与による色素沈着発現メカニズムについて基礎的な研究を行うことで検討した。

第 1 章では、9 週齢 Hos:HRM-2 雄性マウスに対して 5-FU を 8 週間連続投与することで、臀部周囲の皮膚で DOPA 陽性メラノサイトが増加した。さらに、5-FU 投与後、ACTH、 $\alpha$ -MSH、cAMP 濃度および Tyrosinase 発現の増加が確認された。既知の経路をもとに、酸化ストレス、NF- $\kappa$ B、cAMP、ACTH に対する阻害剤の投与は、5-FU 投与マウスの色素沈着を減少させた。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の増加を引き起こすことを示唆された。さらに、解析によって 5-FU/Oxidative stress/NF- $\kappa$ B/ACTH/cAMP/tyrosinase 経路の活性化が関与していることを明らかにした。しかし、5-FU 投与による酸化ストレスを阻害剤の投与で抑制すると、ACTH と cAMP 濃度はいずれも低下するものの、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発現メカニズムには、他の経路があると推察された

(Fig. 9.) 第 2 章では、第 1 章と同様の実験マウスを用い、5-FU を 8 週間連続投与することで、耳介部周囲の皮膚の表皮基底層で Tyrosinase 発現とメラニンが増加した。酸化ストレスとは異なる経路による色素沈着の発現メカニズムを探索するために、Tyrosinase と血管に着目し検討したところ、血管マーカーである vWF と CD31 が 5-FU 投与マウスの耳介部の真皮において増加した。血管マーカー発現の増加とともにメラニン形成が誘導されたことから、血管内皮細胞の増加と 5-FU による色素沈着との関連が示唆された。さらに、5-FU は Ara-C や CPT-11 に比べて血管マーカーの発現を増加させる傾向があった。耳介部における異常な血管増殖を介した色素沈着が 5-FU に特異的である可能性を示した。(Fig. 14.)

以上のことから、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。(Fig. 15.)

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。

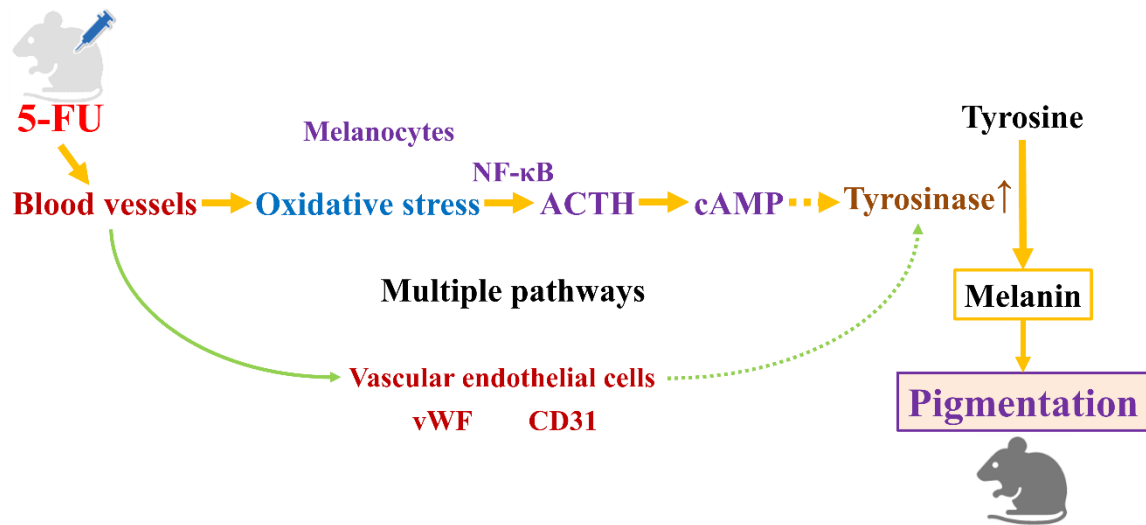


Fig. 15. Mechanism of pigmentation development in 5-FU-Treated-Mice, 5-FU/Oxidative stress/NF-κB/ACTH/cAMP/tyrosinase pathway and vascular endothelial cells mediated pathway associated with vWF and CD31

## 引用文献

1. Nahhas AF, Braunberger TL, Hamzavi IH. An update on drug-induced pigmentation. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2019, **20**, 75–96.
2. Dereure O. Drug-induced skin pigmentation. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2001, **2**, 253–262.
3. Ito S, Wakamatsu K. Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**, 582–592.
4. d'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia - Borrón JC, Kovacs D, Meredith P, Pezzella A, Picardo M, Sarna T, Simon JD, Ito S. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2013, **26**, 616–633.
5. Hirobe T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated?. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2011, **24**, 462–478.
6. Ito S, Wakamatsu K. Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**, 582–592.
7. Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA. Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.*, 1989, **92**, 565–572.
8. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2013, **30**, 30–41.
9. Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrindic mitogens for human melanocytes. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 24675–24680.
10. Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y, Kitahara T, Takema Y, Imokawa G. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2004, **165**, 2099–2109.
11. Napolitano A, Panzella L, Monfrecola G, d'Ischia M. Pheomelanin - induced oxidative stress: bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2014, **27**, 721–733.
12. Duschinsky R, Plevén E, Heidelberger C. The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4559–4560.
13. Lokich JJ, Moore C. Chemotherapy-associated palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome. *An. Intern. Med.*, 1984, **101**, 798–800.

14. Rao R, Balachandran C. Serpentine supravenuous pigmentation. A rare vasculo-cutaneous effect induced by systemic 5-fluorouracil. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.*, 2010, **76**, 714–714.
15. Giménez García RM, Carrasco Molina S. Drug-induced hyperpigmentation: review and case series. *J. Am. Board. Fam. Med.*, 2019, **32**, 628–638.
16. Levantine A, Almeyda J. Drug induced changes in pigmentation. *Br. J. Dermatol.*, 1973, **89**, 105–112.
17. Cho KH, Chung JH, Lee AY, Lee YS, Kim NK, Kim CW. Pigmented macules in patients treated with systemic 5 - fluorouracil. *J. Dermatol.*, 1988, **15**, 342–346.
18. Nozawa K, Shimizu C, Kakimoto M, Mizota Y, Yamamoto S, Takahashi Y, Ito A, Fujiwara Y. Quantitative assessment of appearance changes and related distress in cancer patients. *Psycho - Oncology*, 2013, **22**, 2140–2147.
19. Katanoda K, Hori M, Saito E, Shibata A, Ito Y, Minami T, Ikeda S, Suzuki T, Matsuda, T. Updated trends in cancer in Japan: incidence in 1985-2015 and mortality in 1958-2018-a sign of decrease in cancer incidence. *J. Epidemiol.*, 2021, **31**,426–450.
20. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 1957, **179**, 66–666.
21. Atiq A, Shal B, Naveed M, Khan A, Ali J, Zeeshan S, Al-Sharari SD, Kim YS, Khan S. Diadzein ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis by suppressing oxidative stress and inflammatory mediators in rodents. *Eur. J. Pharmacol.*, 2019, **15**, 292–306.
22. Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Hasan SK, Sultana S. Abrogation of 5-flourouracil induced renal toxicity by bee propolis via targeting oxidative stress and inflammation in Wistar rats. *Journal of Pharmacy research*, 2013, **7**, 189–194.
23. Rapa SF, Magliocca G, Pepe G, Amodio G, Autore G, Campiglia P, Marzocco S. Protective Effect of Pomegranate on Oxidative Stress and Inflammatory Response Induced by 5-Fluorouracil in Human Keratinocytes. *Antioxidants (Basel)*, 2021, **10**, 203.
24. Regazzetti C, De Donatis GM, Ghorbel HH, Cardot-Leccia N, Ambrosetti D, Bahadoran P, Chignon-Sicard B, Lacour JP, Ballotti R, Mahns A, Passeron T. Endothelial cells promote pigmentation through endothelin receptor B activation. *J.Invest.Dermatol.*, 2015, **135**, 3096–3104.
25. Manabe T, Inagaki Y, Nakagawa S, Miyoshi K, Ueki H. Ripple pigmentation of the neck in atopic dermatitis. *Am. J. Dermatopathol.*, 1987, **9**, 301–307.

26. Johnston GA, Graham-Brown RAC. The skin and disorders of the alimentary tract, hepatobiliary system, kidney, and cardiopulmonary system. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. (7th ed.) McGraw-Hill, New York*, 2008, p. 1445.
27. Sato A, Hamada K, Imataka H. Skin toxicity. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2011, **38**, 1767–1772.
28. Lynch TJ Jr, Kim ES, Eaby B, Garey J, West DP, Lacouture ME. Epidermal growth factor receptor inhibitor-associated cutaneous toxicities: an evolving paradigm in clinical management. *Oncologist*, 2007, **12**, 610–621.
29. Lacouture ME, Mitchell EP, Piperdi B, Pillai MV, Shearer H, Iannotti N, Xu F, Yassine M. Skin toxicity evaluation protocol with panitumumab (STEPP), a phase II, open-label, randomized trial evaluation the impact of a pre-emptive skin treatment regimen on skin toxicities and quality of life in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2010, **28**, 1351–1357.
30. Jatoi A, Rowland K, Sloan JA, Gross HM, Fishkin PA, Kahanic SP, Novotny PJ, Schaefer PL, Johnson DB, Tschetter LK, Loprinzi CL. Tetracycline to prevent epidermal growth factor receptor inhibitor-induced skin rashes: results of a placebo-controlled trial from the North Central Cancer Treatment Group (NO3CB). *Cancer*, 2008, **113**, 847–853.
31. Ohtsu A. Japanese nationwide post-marketing survey of S-1 in patients with advanced gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2006, **33** (Suppl. 1), 52–56.
32. Seki T, Higaki S, Morohashi M. Drug eruption by Tegafur. *Rinsho Hifuka*, 1989, **43**, 433–438.
33. Huang R, Ai G, Zhong L, Mai L, Chen JN, Liu Y, Li Y, Huang X, Su Z, Zhan JYX. Protective effects of oxyberberine in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in the mice model. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2022, **2022**, 1238358.
34. Hida T, Wakamatsu K, Sviderskaya EV, Donkin AJ, Montoliu L, Lynn Lamoreux ML, Yu B, Millhauser GL, Ito S, Barsh GS, Jimbow K, Bennett DC. Agouti protein, mahogunin, and attractin in pheomelanogenesis and melanoblast-like alteration of melanocytes: a cAMP-independent pathway. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2009, **22**, 623–634.
35. Singhmar P, Huo X, Li Y, Dougherty PM, Mei F, Cheng X, Heijnen CJ, Kavelaars A. Orally active epac inhibitor reverses mechanical allodynia and loss of intraepidermal nerve fibers in a mouse model of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Pain*, 2018, **159**, 884–893.

36. Brain PF, Evans AE. Acute influences of some ACTH-related peptides on fighting and adrenocortical activity in male laboratory mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1977, **7**, 425–433.
37. Kumar A, Negi G, Sharma SS. JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence. *Diabetes Obes. Metab.*, 2011, **13**, 750–758.
38. Hiramoto K, Yamate Y, Shirasawa T, Sato EF. The role of the active oxygen product from gp91phox NADPH oxidase on the newborn weight of mouse pups. *Biol. Med. (Aligarh)*, 2015, **7**, 5.
39. Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp. Dermatol.*, 2014, **23**, 659–663.
40. Jimbow K, Uesugi T. New melanogenesis and photobiological processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV-exposure: ultrastructural differentiation of precursor melanocytes from Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1982, **78**, 108–115.
41. Mac Neil S, Buffery J, Hill SE, Dobson J, Bleehen SS. Intracellular signalling in the control of melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, 1992, **3** (Supp2), 154–161.
42. Gantz I, Fong TM. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2003, **284**, E468–E474.
43. Almahariq M, Tsalkova T, Mei FC, Chen H, Zhou J, Sastry SK, Schwede F, Cheng X. A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Mol. Pharmacol.*, 2013, **83**, 122–128.
44. Winters SJ, Vitaz T, Nowacki MR, Craddock DC, Silverman C, Lopez FA. Addison's disease and pituitary enlargement. *Am. J. Med. Sci.*, 2015, **349**, 526–529.
45. Numazawa S, Sugihara K, Miyake S, Tomiyama H, Hida A, Hatsuno M, Yamamoto M, Yoshida T. Possible involvement of oxidative stress in 5-fluorouracil-mediated myelosuppression in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2011, **108**, 40–45.
46. Chan KH, Lam KS, Cheng OY, Kwan JS, Ho PW, Cheng KK, Chung SK, Ho JW, Guo VY, Xu A. Adiponectin is protective against oxidative stress induced cytotoxicity in amyloid-beta neurotoxicity. *PLOS ONE*, 2012, **7**, e52354.
47. Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.*, 2004, **16**, 348–355.

48. Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y. Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**, 18205–18210.
49. Fujito A, Hiramoto K, Imai M, Tanaka S, Ooi K. ACTH/cAMP-Mediated Skin Pigmentation Caused by 5-Fluorouracil Administration. *Biol. Pharm. Bull.*, 2023, **46**, 955–963.
50. Passeron T, Picardo M. Melasma, a photoaging disorder. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2018, **31**, 461–465.
51. Kang HY, Bahadoran P, Suzuki I, Zugaj D, Khemis A, Passeron T, Ortonne JP. In vivo reflectance confocal microscopy detects pigmentary changes in melasma at a cellular level resolution. *Exp. Dermatol.*, 2010, **19**, e228–e233.
52. Kim EH, Kim YC, Lee ES, Kang HY. The vascular characteristics of melasma. *J. Dermatol. Sci.*, 2007, **46**, 111–116.
53. Narang T, Dogra S, Sakia UN. Persistent serpentine supravenuous hyperpigmented eruption in lepromatous leprosy after minocycline. *Lepr. Rev.*, 2015, **86**, 191–194.
54. Somasekharan D, Narayanan B. Serpentine supravenuous hyperpigmentation—A rare cutaneous manifestation in non-neoplastic conditions. *J. Skin Sex. Transm. Dis.*, 2019, **1**, 97–100.
55. Ooi K, Ohkubo T, Higashigawa M, Kawasaki H, Kakito H, Kagawa Y, Kojima M, Sakurai M. Plasma, intestine and tumor levels of 5-fluorouracil in mice bearing L1210 ascites tumor following oral administration of 5-fluorouracil, UFT (mixed compound of tegafur and uracil), carmofur and 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, **24**, 1329–1331.
56. Ooi K, The mechanism of synergistic interaction between etoposide and cytarabine, *Yakugaku Zasshi*, 2002, **122**, 471–480.
57. Tsuji T, Nakagawa K, Hamada T. Different effects of topically applied 5 - fluorouracil on hairy and hairless mice. *Clin. Exp. Dermatol.*, 1984, **9**, 574–582.
58. Cho KH, Chung JH, Lee AY, Lee YS, Kim NK, Kim CW. Pigmented macules in patients treated with systemic 5 - fluorouracil. *J. Dermatol.*, 1988, **15**, 342–346.
59. Ansfield FJ, Schroeder JM, Curreri AR. Five years clinical experience with 5-fluorouracil. *Jama*, 1962, **181**, 295–299.
60. Jensen SA, Sørensen JB. 5-fluorouracil-based therapy induces endovascular injury having potential significance to development of clinically overt cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2012, **69**, 57–64.

61. Cao G, O'Brien CD, Zhou Z, Sanders SM, Greenbaum JN, Makrigrannakis A, DeLisser HM. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, **282**, C1181–C1190.
62. Dereure O. Drug-induced skin pigmentation. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2001, **2**, 253–262.
63. Fu C, Chen J, Lu J, Yi L, Tong X, Kang L, Pei S, Ouyang Y, Jiang L, Ding Y, Zhao X, Li S, Yang Y, Huang J, Zeng Q. Roles of inflammation factors in melanogenesis. *Mol. Med. Rep.*, 2020, **21**, 1421–1430.
64. Fitzpatrick RE. Treatment of inflamed hypertrophic scars using intralesional 5 - FU. *Dermatol. Surg.*, 1999, **25**, 224–232.
65. Nanda S, Reddy BSN. Intralesional 5 - fluorouracil as a treatment modality of keloids. *Dermatol. Surg.*, 2004, **30**, 54–57.
66. Bulstrode NW, Mudera V, McGrouther DA, Grobbelaar AO, Cambrey AD. 5-fluorouracil selectively inhibits collagen synthesis. *Plast. Reconstr. Surg.*, 2005, **116**, 209–221.
67. Berman B, Viera MH, Amini S, Huo R, Jones IS. Prevention and management of hypertrophic scars and keloids after burns in children. *J. Craniofac. Surg.*, 2008, **19**, 989–1006.
68. Huang J, Chen J, Wo Y, Wang X, Zhang Y, Chen X, Biskup E. CO2 fractional laser combined with 5-fluorouracil ethosomal gel treatment of hypertrophic scar macro-, microscopic, and molecular mechanism of action in a rabbit animal model. *Rejuvenation Res.*, 2021, **24**, 131–138.
69. Kim Y, Kang B, Kim J, Park T, Kang H. Senescent Fibroblast-Derived GDF15 Induces Skin Pigmentation. *J. Invest. Dermatol.*, 2020, **140**, 2478–1486.
70. Breen DM, Kim H, Bennett D, Calle RA, Collins S, Esquejo RM, Birnbaum MJ. GDF-15 neutralization alleviates platinum-based chemotherapy-induced emesis, anorexia, and weight loss in mice and nonhuman primates. *Cell Metab.*, 2020, **32**, 938–950.



## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、指導教員として終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 薬物治療設計・管理学分野 大井一弥 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の審査過程において、数々のご助言とご指導を賜りました、鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 佐藤英介 教授、大倉一人 教授、ならびに古川絢子 助教に深く感謝いたします。

本研究に際し、研究遂行に対する御指導、御激励を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 平本恵一 准教授ならびに 田中章太 助手に深謝の意を表します。

本研究を実施するにあたり、多大なる御協力、御助言を賜りました、鈴鹿医療科学大学保健衛生学部鍼灸サイエンス学科 有馬寧 教授に深謝の意を表します。

研究生生活において様々な御助言をいただき、お世話になりました鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 榎屋友幸准教授、坂晋 准教授 ならびに 藤田快男 助教および事務面で大変お世話になりました大学院担当 水井智子 氏をはじめ鈴鹿医療科学大学の職員の方々、ならびに病態・治療学分野 臨床薬理学研究室の皆様にご感謝いたします。

最後に、長年にわたる大学院生活において、理解をもって応援し支え続けてくれた、両親をはじめとする藤戸薬局の関係諸氏ならびに大切な家族に心から感謝いたします。

## **Abstract**

### **Mechanism of hyperpigmentation induced by 5-Fluorouracil administration**

#### **Introduction**

The skin is the largest organ in the human body, forming the boundary between the body and the outside world. It is primarily composed of the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue, and plays a crucial role in maintaining homeostasis in the organism. Melanin is the most important pigment in skin coloration. Melanin not only determines skin color but also plays vital physiological roles, such as preventing nuclear DNA damage caused by ultraviolet radiation [1]. Hyperpigmentation, a condition particularly troublesome due to visible changes, involves the activation of melanocytes, leading to increased production of melanin, which accumulates in the basal epidermal layer [2]. Melanin synthesis is facilitated by the melanin-forming enzyme tyrosinase [3].

In clinical practice, skin pigmentation is often observed in patients undergoing chemotherapy. However, changes in appearance caused by cancer chemotherapy are overlooked and underestimated by healthcare providers because they are not considered life-threatening. Cancer chemotherapy using alkylating agents, platinum agents, and antimetabolites has been reported to cause drug-induced hyperpigmentation as a side effect. [4,5]. Furthermore, 5-fluorouracil (5-FU), an effective chemotherapeutic agent against colorectal cancer, often causes hyperpigmentation. 5-FU is a routinely employed anticancer drug that demonstrates efficacy against various solid tumors, including gastric and colorectal cancers [4,6]. However, the mechanism through which 5-FU induces hyperpigmentation remains to be elucidated, and currently, no effective treatment exists. This study aimed to elucidate the mechanism underlying pigmentation using a mouse model in which pigmentation was induced by continuous 5-FU administration.

#### **Chapter 1: Pigmentation due to oxidative stress induced by 5-Fluorouracil administration**

In this study, we investigated the effects of oxidative stress induced by 5-FU administration [7] and its association with hyperpigmentation. Specific pathogen-free HRM-2 hairless mice (9 weeks old, male) were used in the experiments. Approximately

15 mg/kg 5-FU in saline was intraperitoneally injected into mice once daily for 8 weeks. Each group comprises five animals, and the experiments were repeated three times. Skin samples exhibiting macroscopic blackening were obtained from the perianal area and stained with DOPA. In 5-FU-treated mice, the number of DOPA-positive cells, which are important for melanin synthesis, increased. Furthermore, immunofluorescence (IF) staining for  $\alpha$ -MSH, ACTH, cAMP, and tyrosinase, which are known melanogenesis-related substances, exhibited an elevation in 5-FU-treated mice compared to other groups. In addition to 5-FU, ASIP (ASIP+5-FU-treated mice), ESI-09 (ESI-09+5-FU-treated mice), and ACTH (11-24) (ACTH [11-24]+5-FU-treated mice), which are inhibitors of  $\alpha$ -MSH, cAMP and ACTH, were intraperitoneally administered three times a week for 8 weeks. The control, 5-FU, and inhibitor groups were compared using gross findings from analyses including DOPA staining, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and IF. Furthermore, cAMP levels and tyrosinase expression were lower in ESI-09 + 5-FU and ACTH (11-24) + 5-FU-treated mice than in 5-FU-treated mice. Next, alongside 5-FU, JSH-23 (JSH-23+5-FU-treated mice), an inhibitor of NF- $\kappa$ B, which is a transcription factor associated with increased ACTH levels, was administered orally once daily for 8 weeks. N-acetyl-l-cysteine (N-NAC; N-NAC+5-FU-treated mice), which suppresses oxidative stress, was administered intraperitoneally once daily for 8 weeks (n = 5 for each group). The three groups of inhibitor-treated mice were compared using gross findings from analyses including DOPA staining, ELISA, and IF with control and 5-FU-treated mice. Furthermore, ACTH and cAMP concentrations were reduced in JSH-23 + 5-FU-treated mice and NAC + 5-FU-treated mice compared to those in 5-FU-treated mice. NAC + 5-FU-treated mice, when compared with 5-FU-treated mice, showed no significant difference from the control group. Consequently, our results suggested that 5-FU caused an ACTH-mediated increase in pigmentation. Furthermore, the suppression of oxidative stress prevented an increase in ACTH and cAMP levels. These results suggest a mechanism for pigmentation development initiated by the induction of oxidative stress by 5-FU administration.

## **Chapter 2: Involvement of Melanogenesis and Angiogenesis with 5-Fluorouracil Administration**

As described in Chapter 1, both ACTH and cAMP levels were reduced when oxidative stress was suppressed. However, the increase in pigmentation was not completely suppressed. Therefore, we hypothesized that 5-FU administration leads to the development of pigmentation. Recent studies have reported that melasma pigmentation is associated with vascular density [8], suggesting that vascular endothelial cells influence melanocytes to induce tyrosinase-related signalling and stimulate melanin

production. Utilizing the same mice as in Chapter 1, we conducted a fundamental examination into the pigmentation mechanism induced by continuous 5-FU administration for 8 weeks, with a focus on blood vessels. Macroscopic pigmentation was observed in the auricular skin of 5-FU-treated mice, and melanin accumulation by Fontana-Masson (FM) staining was observed in the basal epidermal layer. In addition, the expression of tyrosinase and vascular markers, vWF and CD31, exhibited an increase in the auricular skin of 5-FU-treated mice. Staining revealed increased melanin accumulation in the auricular skin of 5-FU-treated mice compared to that in Ara-C- and CPT-11-treated mice. Additionally, IF comparisons indicated that tyrosinase expression was significantly increased in the basal epidermal layer in 5-FU compared to Ara-C and CPT-11, showing an increasing trend compared to the control. vWF expression significantly increased in the dermis after 5-FU treatment, and CD31 expression also showed an increasing trend. Thus, tyrosinase may play a role in 5-FU-induced melanin production, with increased vascularity potentially contributing to this process.

### **Conclusion**

In conclusion, these findings suggest that the 5-FU/oxidative stress/NF- $\kappa$ B/ACTH/cAMP/tyrosinase pathway, starting from oxidative stress, is mainly involved in the mechanism of 5-FU-induced pigmentation. Furthermore, multiple pathways are implicated, including vWF/CD31-associated vascular hyperplasia and vascular endothelial-cell-mediated pathways. The results of this study hold significance for identifying target proteins and advancing the development of therapeutic agents for the prevention and treatment of pigmentation induced by 5-FU and other anticancer drugs.

### **Reference**

- [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.