

大学院博士論文要旨

1 α , 25-ジヒドロキシビタミン D₃ で誘導した HL60 細胞における単球分化において、ゲニステインは、食細胞共通形質の発現を促進したが、単球特異的なマーカーである CD14 の発現には影響を及ぼさなかった

辻井 真理

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：熊取 厚志 教授)

はじめに

単球 / マクロファージと好中球は自然免疫を担う重要な細胞であり、共に食細胞として異物を認識し貪食・殺菌・分解する。両細胞は骨髄の造血幹細胞 (HSC) から顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (GMP) を経て分化する。それに伴い単球では食細胞共通マーカーである CD11b (補体受容体成分) や gp91phox (CYBB) といった食細胞 NADPH オキシダーゼ 2 (Nox2) の成分などが発現すると同時に貪食能や活性酸素種 (ROS) による殺菌能なども獲得する。加えて、単球特異的なマーカーである CD14 (Toll-like receptor 4 の共受容体) などが発現し単球特有の機能も獲得する。HSC または GMP の遺伝的欠陥は白血病を引き起こすが、その治療法には、従来の抗がん剤や放射線を使用して白血病細胞を殺傷する方法に加え、白血病細胞を分化・成熟させる分化療法がある。特に急性前骨髄球性白血病 (APL) における、オールトランス型レチノイン酸 (ATRA) による好中球への分化治療は予後を有意に改善した。また、GMP を単球へ分化誘導する 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン D₃ (VD₃) も治療への応用が試みられているが、副作用として高カルシウム血症を引き起こすことから、VD₃ の分化作用のみを促進できる天然化合物の発見や化合物の開発が試みられている。

ゲニステイン (Gen) は大豆イソフラボンの一種であり、

in vivo および *in vitro* で抗増殖効果や白血病細胞のアポトーシスを誘導することから注目されている。Gen は、ATRA で誘導した好中球分化を促進することが示されている。一方、Gen の VD₃ による単球分化誘導に関しては、細胞内信号伝達系の解析のためにタンパク質キナーゼ阻害剤として Gen を薬理的な高い濃度で用い、しかも単球特異的なマーカーである CD14 に関して解析がなされていない 2 件の報告のみであり、Gen の VD₃ による単球分化誘導に対する効果、特に生理的濃度 (食事で達成可能な濃度) での効果は十分に明らかにされていない。

目 的

VD₃ による単球分化に及ぼす食事で達成可能な濃度での Gen の効果をタンパク質 (CD11b, CYBB, CD14) の発現, mRNA (CD11b, CYBB) の発現, 細胞増殖, 細胞周期, 貪食能に着目し詳細を明らかにする。

方 法

HL60 細胞は、10% ウシ胎児血清加 RPMI1640 培地で懸濁し、37°C・5% CO₂ 条件下で培養した。HL60 細胞 (10⁵ 個 / ml) は、VD₃ (100nM) で刺激し 3 日間培養した。Gen (10 μ M) は、VD₃ で分化誘導開始 30 分後に添加した。単球への分化度は、細胞増殖率, 細胞周期, 貪食能, 細胞表面抗原及び mRNA の発現により評価した。細

胞増殖は、血球計算板を用いて解析した。細胞周期、食能、及び表面抗原 (CD14, CD11b, CYBB) の発現はフローサイトメトリーで解析した。また、mRNA の発現 (CD11b, CYBB) は、リアルタイム RT-PCR で解析した。

結 果

細胞増殖率：Gen 単独または VD_3 単独での細胞増殖率は、未処理の細胞 (None) と比較して差はなかった。 VD_3 と Gen の共刺激では 3 日目のみ None の増殖率と比べて有意に抑制された。

細胞周期： G_2/M 期の割合は、None ($11.6 \pm 1.5\%$) と Gen 単独 ($11.5 \pm 2.2\%$) で差は認められなかったが、 VD_3 単独で処理した細胞の G_2/M 期の割合は、Gen を加えることで $9.5 \pm 0.8\%$ から $7.1 \pm 0.4\%$ に減少した。また、 G_0/G_1 期の割合は、None ($34.9 \pm 7.0\%$) と Gen 単独 ($39.1 \pm 2.6\%$) で差はほとんどなかったが、 VD_3 単独では $54.5 \pm 3.5\%$ と大幅に増加し、それに Gen を加えることでさらに $72.9 \pm 2.4\%$ まで増大した。

食能活性：Gen 単独では、None 同様食能活性は観察されなかったが、Gen は、 VD_3 刺激後 3 日目の細胞に対しては、食能した細胞の割合を $17.8 \pm 4.2\%$ から $31.4 \pm 3.4\%$ に有意に増大した。

細胞表面マーカーと mRNA の発現： VD_3 で誘導された CD11b 陽性細胞の割合は、1 日目、2 日目と Gen を加えることで $34.2 \pm 3.1\%$ から $71.1 \pm 1.6\%$ 、 $66.4 \pm 2.4\%$ から $84.4 \pm 0.5\%$ と有意に増大した。 VD_3 で誘導された CYBB 陽性細胞の割合は、Gen の添加により 1 日目と 2 日目において、それぞれ $2.3 \pm 1.2\%$ から $4.2 \pm 1.5\%$ 、 $13.2 \pm 4.8\%$ から $20.8 \pm 7.3\%$ と有意に増大した。 VD_3 で誘導された CD14 陽性細胞の割合は、2 日目と 3 日目と明らかに増大したが、その割合が、Gen 添加によってさらに増大することはなかった。Gen 単独では、すべてのマーカーの発現において影響しなかった。また、 VD_3 で誘導された CD11b と CYBB の mRNA 発現は、 VD_3 を 1 としたとき CD11b では 3.7 倍、CYBB では、2.5 倍と共に有意に増大した。

考 察

本研究では、まず、Gen が VD_3 の単球分化における細

胞増殖抑制および細胞周期における G_0/G_1 期の割合の増大に追従する細菌食能の誘導を促進することを確認した。また、食作用において重要とされる CD11b (補体受容体 3:CR3) の発現が VD_3 で誘導され、その発現を Gen がさらに高めることを見出した。この結果は、Gen が VD_3 による CD11c (補体受容体 4:CR4) の発現を促進するという先行研究と一致することから、Gen は CD11b 及び CD11c によって共有される発現メカニズムに作用していることが示唆される。そして、殺菌に関与する ROS を産生する酵素で、Nox2 の成分である CYBB の VD_3 による発現は、Gen を加えることでさらに増大することを明らかにした。この結果は、Gen が ROS の産生を増強することを示した先行研究と一致している。さらに本研究では、Gen は、 VD_3 による CD11b 及び CYBB の発現を、タンパク質レベル同様に mRNA レベルでも高めることを見出した。このことから、Gen はこれらをコードする遺伝子の転写促進に関与していることが示唆される。以上の結果から、Gen は VD_3 による食細胞共通な形質を促進することが示唆される。

一方、 VD_3 による単球特異的な CD14 の発現は、Gen によって影響されないことを本研究で初めて示した。このことから、CD14 の発現調節には Gen が関与しない独自の経路が存在する可能性が示唆される。

また、本研究で使用した Gen の濃度は、食事 (サプリメントを含む) の摂取で達成可能な血清濃度範囲内 ($4.3\text{--}16.3\mu\text{M}$) であることから、Gen は生体内においても食細胞共通の形質発現を促進する可能性が示唆される。

結 論

本研究では、Gen が、 VD_3 により誘発される単球分化において、好中球や単球等の食細胞共通の形質発現を促進できるが、単球特異的なマーカーである CD14 の発現は促進できないことを明らかにした。

Tsujii M, Kubo T, Kumatori A. Genistein promotes phagocytic phenotypes, except those associated with monocytic marker CD14, in 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3 -induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Int J Anal Bio-Sci.* 2023;11:25-31.

痔瘻癌の組織型の予測における MRI の ADC 値

山本 進治

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：岡田 幸法 客員教授)

はじめに

直腸肛門部の痔瘻に発生する癌（痔瘻癌）は、長期にわたる痔瘻に関連する悪性腫瘍であり、大腸癌の 2-3% 程度を占めると報告されている。World Health Organization の分類では、既存の肛門腺および瘻管から発生する腫瘍と定義されている。痔瘻癌は、複雑に入り組んだ痔瘻瘻管に発生するため初期の臨床症状に乏しく早期診断が困難であることが指摘されている。

痔瘻癌の治療方針として腹会陰式直腸切断術が第一選択である。しかし、腹会陰式直腸切断術では永久的な人工肛門となり生活の質の低下が予想される。また、広範なリンパ節廓清を実施した場合にはリンパ節浮腫などを合併症として生じる可能性がある。また、微小なリンパ節転移は術前画像などから予測できない可能性が考えられる。直腸癌では術前術後の放射線・化学療法が有効であり肛門温存手術の適応が広がっている。しかし、痔瘻癌に対する放射線・化学療法の報告は少なく、その治療効果は不明である。直腸癌の報告から管状型腺癌の痔瘻癌では、放射線・化学療法への反応性が期待できるが、粘液型腺癌の痔瘻癌では放射線・化学療法の反応性が乏しいことが予想される。このため、治療前に痔瘻癌の病理組織型を評価できるかが重要であると考えられる。

痔瘻癌の MRI の診断所見では、スピンエコー系の MRI にて充実性の造影される腫瘍でメッシュ様の造影様式を示し、線維化されたカプセルなどはなく、液体貯留

を示し、腫瘍の辺縁は造影される特徴が報告されている。また、T1 強調画像および T2 強調画像では、不均一な高信号を示すと報告されている。このような画像所見は粘液型腺癌の多房性の隔壁内にタンパク質成分を含む嚢胞性腫瘍としての特徴を反映していると考えられる。しかし、粘液型腺癌と管状型腺癌の MRI 所見の違いについては詳細な検討を行った報告はこれまでにない。

目 的

本研究の目的は、肛門瘻癌の病理組織学的タイプを決定するために、MRI における見かけの拡散係数 (ADC) 値の有用性を調査すること、また臨床情報、手術所見、ADC 値と病理組織学的タイプ（粘液型腺癌または管状型腺癌）との関係を検討することである。

方 法

本検討は施設の倫理委員会の許可を受けて実施した。単一施設における後方視的症例対照研究である。JCHO 東京山手メディカルセンターにおいて 2013 年 1 月から 2021 年 12 月までの期間に、肛門瘻癌と診断された 69 症例について、電子カルテ、読影端末などを用いて調査検討を実施した。その中で同じ 1.5T MRI 装置検査を実施していること、また当院で手術を受け病理組織診断が行われた症例を最終的に選択した。検討項目は粘液型腺癌と管状型腺癌の間での ADC 値について、また TNM 分類での Tis-T1-T2 の早期と T3-T4 の進行期の段階の腫瘍間で比較検討を行った。MRI 上の腫瘍病変の関心

領域の設定は、2人の放射線科専門医が実施した。1人は経験年数20年以上、もう1人は経験年数20年以上であり、かつ痔瘻MRI診断を専門とする放射線科専門医であった。2群間の有意差検定はMann-Whitney U Testを使用し、 $p < 0.05$ を統計学的有意水準とした。

結 果

連続25症例が選択された。肛門瘻癌のADCの中央値は粘液型腺癌で $1.97 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、管状型腺癌で $1.36 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり統計学的有意差を認めた ($p < 0.01$)。ROC解析では、カットオフ値 $1.74 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、曲線下面積0.857、95%信頼区間0.627-1、感度0.857、特異度0.885であった。ADC値の中央値は、Tis-T1-T2期の腫瘍で $1.62 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、T3-T4期の腫瘍で $2.01 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ であり統計学的有意差を認めた ($p = 0.02$)。ROC解析では、カットオフ値 $1.96 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ 、曲線下面積0.780、95%信頼区間0.595-0.965、感度0.714、特異度0.818であった。

考 察

痔瘻癌の画像診断では、MRIが利用されている。DWIは、腫瘍を高信号として描出することが可能であるとされている。さらにADC値は量的パラメータであり、その測定値を定量的イメージングのバイオマーカーであるquantitative imaging biomarkerとして臨床現場で使用可能である。本研究においても、粘液型腺癌と管状型腺癌

のADC値の違いが両者の病理学的違いを反映していることが示された。このため、術前のMRI診断は必要であり、病理組織の診断にまでつながるものと考えられた。

本検討からMRIのADC値より粘液型腺癌と管状型腺癌の鑑別が可能であることが示された。この理由として①粘液型腺癌は間質へ漏れ出す粘液が多いため管状型腺癌より間質が多く浮腫状になること②粘液型腺癌は間質が多いため細胞密度が疎になることが多く、管状型腺癌と比較して癌病巣内の血管の数が少ない可能性が考えられた。また、本検討からMRIのADC値よりTis-T1-T2期とT3-T4期の鑑別が可能であることが示された。この理由として病変が進展するほど腫瘍量が多くなり拡散が制限されるためADC値が低下したためと考えられた。

結 論

MRIのADC値は、肛門瘻癌の粘液型腺癌と管状型腺癌の病理組織学的タイプ分類するのに有用である。また腫瘍の進行度を示すTis-T1-T2の早期とT3-T4進行期の判別を予測する可能性が考えられた。

Yamamoto S, Yonezawa K, Fukata N, Takeshita K, Kodama M, Yamana T, Kiryu S and Okada Y. Value of apparent diffusion coefficient on MRI for prediction of histopathological type in anal fistula cancer. Medicine (Baltimore) 2023 Apr 7; 102 (14) : e33281.

生体における亜鉛の役割に関する研究

— 高齢者の健康問題に対する亜鉛の効果 —

中川 直也

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：西田 圭吾 教授)

序 章

亜鉛はヒトにおいて 300 種以上の酵素に含有されている重要な必須微量元素の一つである。亜鉛が不足すると、味覚異常、筋力の低下、創傷治癒遅延、免疫異常など様々な症状を呈することが知られている。また、亜鉛とキレートを形成する薬剤の服用や吸収率の低下などから、高齢者で亜鉛欠乏状態になるリスクが高く、高齢化が進む日本において問題となっている。しかしながら、生体における亜鉛の役割は、未だ十分に理解されていない。本研究では、生体における亜鉛の役割を解明するため、腫瘍免疫や高齢者の筋力低下と腸内細菌叢の変化などに焦点を当てて解析を行った。

第一章

亜鉛の不足が悪性腫瘍の増悪に関与することは、以前より多くの臨床研究により報告されている [1-3]。このことから、亜鉛を適切に摂取することはがんによる死亡リスクを低下させる可能性がある。第一章では、亜鉛と腫瘍免疫の関係について新たな知見を述べる。マウスにアゾキシメタン (AOM) とデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与し、大腸がんを発生させ、飼料中の亜鉛含有量と大腸の腫瘍数、腫瘍面積の関連を観察した。また、抗体により CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞あるいは NK1.1 陽性ナチュラルキラー細胞をマウスから除去し、AOM/DSS を同様に投与した。さらに、マウス脾臓中の免疫担

当細胞を用いた亜鉛の効果を検証するための *in vivo* 及び *in vitro* 実験により、その分化増殖や機能発現についてフローサイトメトリーやリアルタイム PCR により評価した。大腸の腫瘍数は、亜鉛非添加群でコントロール群より有意に増加し、高用量亜鉛摂取群でコントロール群より約半数に減少した。腫瘍の平均面積に変化は観察されなかった。T 細胞を除去したマウスでは高用量亜鉛摂取群の腫瘍数がコントロール群と同様であった。脾臓中の T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、マクロファージの分化増殖に亜鉛の効果は観察されなかったが、細胞傷害性 T 細胞が抗原刺激を受けた際に放出されるグランザイム B の転写量は亜鉛の添加により有意に増加した。また、亜鉛添加によるグランザイム B の転写活性化がカルシニューリン活性に依存することを明らかにした。以上の結果より、亜鉛が細胞性免疫の中心である T 細胞に作用して腫瘍抑制効果を発揮することを示し、腫瘍免疫で重要な分子の一つであるグランザイム B の転写を増加させることを示した。よって、亜鉛を過不足なく摂取することはがんの予防につながる可能性を提示した [4]。

第二章

今日、高齢者における亜鉛欠乏症の罹患率の高さが問題となっている。日本国内の調査で成人の約 20% に亜鉛欠乏を認め、加齢とともに血清亜鉛値が減少することが示されるなど、亜鉛欠乏は高齢者の健康に多くの悪影響を及ぼしていることが考えられる [5]。一方、高齢者はサ

ルコペニアや皮膚疾患、免疫機能の低下など様々な健康問題を抱えている。また、加齢による腸内細菌叢の変化も近年注目されており、腸内細菌叢の組成が高齢者の健康に大きく関わっていることが示されている [6-8]。亜鉛欠乏は高齢者が抱える健康問題の一つであるが、上述した亜鉛欠乏による症状と高齢者が抱える健康問題には共通点が多いと考えられる。しかし、高齢者の抱える健康問題が亜鉛欠乏による症状と関連する可能性について、未だ十分に解析されていない。第二章では、高齢者の筋力や腸内細菌叢における亜鉛の役割について新たな知見を述べる。特別養護老人ホームに入所している高齢被検者 30 人を亜鉛摂取群 (14 人) と非摂取群 (16 人) に分けた。インフォームドコンセントを実施後、亜鉛摂取群の被検者に普段の食事に加えて亜鉛 (10mg/day) を 8 週間与え、その前後で全被検者の下腿周囲長 (CC)、上腕周囲長 (AC)、皮膚の角層水分量 (SWC) などを測定した。また、亜鉛摂取開始後 8 週目に全被検者から糞便を採取し、亜鉛の有無による腸内細菌の占有率や短鎖脂肪酸 (SCFA) の変化を観察した。さらに、腸内細菌の占有率の変化と CC, SWC の変化量に相関が認められるか調査した。亜鉛摂取群と非摂取群で一週間の食事からのエネルギー、タンパク質、脂質、鉄、亜鉛、銅の平均摂取量に有意な差はなかった。亜鉛の摂取により、高齢被検者の筋肉量の指標 CC、乾燥皮膚の指標 SWC が改善したことから、亜鉛の適切な摂取により筋肉量の維持や皮膚の乾燥防止の効果が期待できる可能性が示された。腸内細菌叢の解析では、ファーミキューテス門に属する菌で比較的多くの種類が減少し、バクテロイデス門に属する Rikenellaceae やテネリキューテス門に属する菌が増加した。Rikenellaceae をはじめとしたバクテロイデス門の菌の占有率の減少は、先行研究により高齢者の筋力低下と関係していることが示されていることから、亜鉛はバクテロイデス門に属する菌の占有率を増加させることで高齢者の筋力低下を抑制することが示唆された [9]。よって、亜鉛を適切に摂取することは高齢者の生活の質の向上、腸内細菌叢の制御に役立つ可能性が提示された。

引用文献

- [1] Gyorkey, F.; Min, K. W.; Huff, J. A.; Gyorkey, P., Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic, and neoplastic. *Cancer Res* 1967, 27, (8), 1348-53.
- [2] Ozeki, I.; Nakajima, T.; Suii, H.; Tatsumi, R.; Yamaguchi, M.; Arakawa, T.; Kuwata, Y., Predictors of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication following direct-acting antiviral treatment: relationship with serum zinc. *J Clin Biochem Nutr* 2020, 66, (3), 245-252.
- [3] Epstein, M. M.; Kasperzyk, J. L.; Andren, O.; Giovannucci, E. L.; Wolk, A.; Hakansson, N.; Andersson, S. O.; Johansson, J. E.; Fall, K.; Mucci, L. A., Dietary zinc and prostate cancer survival in a Swedish cohort. *Am J Clin Nutr* 2011, 93, (3), 586-93.
- [4] Nakagawa, N.; Fujisawa, Y.; Xiang, H.; Kitamura, H.; Nishida, K., Inhibitory Effect of Zinc on Colorectal Cancer by Granzyme B Transcriptional Regulation in Cytotoxic T Cells. *Int J Mol Sci* 2023, 24, (11).
- [5] Kurasawa, R.; Kubori, S.; Kamioka, H.; Okada, S.; Matsumura, O., Zinc Deficiency in Aged Residents and Lowered Serum-Zinc-Concentration As Population Level in the Same Rural Region. *Biomed Res Trace Elements* 2005, 16, (1), 61-65.
- [6] Maynard, C.; Weinkove, D., The Gut Microbiota and Ageing. *Subcell Biochem* 2018, 90, 351-371.
- [7] Rashidah, N. H.; Lim, S. M.; Neoh, C. F.; Majeed, A. B. A.; Tan, M. P.; Khor, H. M.; Tan, A. H.; Rehiman, S. H.; Ramasamy, K., Differential gut microbiota and intestinal permeability between frail and healthy older adults: A systematic review. *Ageing Res Rev* 2022, 82, 101744.
- [8] O'Toole, P. W.; Jeffery, I. B., Gut microbiota and aging. *Science* 2015, 350, (6265), 1214-5.
- [9] Ticinesi, A.; Mancabelli, L.; Tagliaferri, S.; Nouvenne, A.; Milani, C.; Del Rio, D.; Lauretani, F.; Maggio, M. G.; Ventura, M.; Meschi, T., The Gut-Muscle Axis in Older

Subjects with Low Muscle Mass and Performance: A Proof of Concept Study Exploring Fecal Microbiota Composition and Function with Shotgun Metagenomics Sequencing. Int J Mol Sci 2020, 21, (23).

Int. J. Mol. Sci. Vol.24 No.11, 9457 (2023)
Doi; 10.3390/ijms24119457

公示の方法・時期

Inhibitory effect of zinc on colorectal cancer by granzyme B transcriptional regulation in cytotoxic T cells

Effects of Zinc Supplementation in the Elderly with Focus on Muscle Mass, Dry Skin, and Gut Microbiota
BPB Reports Vol.6 No.6, 217-225 (2023)
Doi; 10.1248/bpbreports.6.6_217

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

藤戸 淳夫

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大井 一弥 教授)

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 α -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、 α -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- κ 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- κ 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える。

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.

公示の方法・時期

ACTH/cAMP-Mediated Skin Pigmentation Caused by
5-Fluorouracil Administration.

Biological and Pharmaceutical Bulletin. Vol.46 No.7, 955-
963. (2023)

DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b23-00108>

The Mechanism of 5-Fluorouracil-Induced
Hyperpigmentation in HRM-2 Hairless Mice: Focus on the
Increase of Blood Vessels

Biological and Pharmaceutical Bulletin. Vol.47 No.1, 311-
317. (2024)

DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b23-00584>

非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) による 皮膚生理機能への影響に関する研究

丸山 清子

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大井 一弥 教授)

緒 論

超高齢社会である日本では、骨折や関節痛が急増し、NSAIDs の需要が高まっている。

NSAIDs はシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害し、プロスタグランジン (PG) の合成阻害により消炎鎮痛効果を発揮する薬剤である¹⁾。COX には COX-1, COX-2 というアイソフォーム²⁾が存在し、COX-1 は常時体内に存在するが、COX-2 は炎症により発現誘導される。COX-1 選択性の高い NSAIDs では、PG 合成阻害により胃・十二指腸潰瘍の発現リスクが高まるが、COX-2 はそのリスクが低い³⁾ため、高齢者に対して安全性が高いと言える。今回、NSAIDs 投与後に発現する皮膚生理機能の変化について、研究を行うこととした。

第 1 章

非ステロイド性抗炎症薬インドメタシン投与による PPAR γ を介して誘発される乾燥皮膚発現メカニズムの解明

2014 年当該研究室では、NSAIDs 投与による小腸炎症発症に伴う乾燥皮膚発現について報告した⁴⁾。その報告では、COX-1 選択性の高いインドメタシンの投与によって、小腸炎症が発現し、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1 が上昇したことで、I 型コラーゲンは減少し、マスト細胞の増加がみられた。この結果により、マスト細胞の脱顆粒が生じたと思われたが、どのシグナルにより脱顆粒が生じたのかについては

不明であった。そこで、本研究では、マスト細胞の脱顆粒発現機序を明らかにすることとした。

インドメタシンは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) γ のリガンドとして働くことが知られている⁵⁾。PPAR γ は、脂肪組織やマクロファージに高発現しているタンパク質であり、リガンドとの結合により活性化され、糖代謝や脂肪蓄積に関与し^{6,7)}、炎症には抑制的に作用する⁸⁾。また、インドメタシンは、PPAR γ を活性化し、B 細胞の発現を増加させ、免疫グロブリン (Ig) E 抗体の増加を促すことが知られている。マスト細胞は、細胞表面に発現している Fc ϵ 受容体に IgE 抗体が結合している状態で待機している⁹⁾。アレルギー反応は、IgE 抗体に抗原が結合することにより脱顆粒が開始し、ヒスタミンなどのケミカルメディエーターが放出されることで惹起される。また、脱顆粒の発現要素として IgE 抗体の急増がトリガーになることも報告されている。

本研究では、インドメタシン群において、ロキソプロフェン群やセレコキシブ群と比較して、IgE 抗体が著しく増加していることから、脱顆粒のトリガーとなったと考えられた。インドメタシンは、IgE 抗体の発現を誘導し、マスト細胞の脱顆粒を促し、放出されたケミカルメディエーターは循環血流に乗り全身を巡り、皮膚では、乾燥皮膚発現を惹起したと考えられた。

第 2 章

加齢マウスにおけるインドメタシン投与によるジアミノ

キシダーゼ (DAO) と皮膚生理機能低下の発現メカニズムの解明

炎症や痛みを回復させる恒常性がうまく機能しないとき、NSAIDs が使用される。加齢による恒常性機能の低下と NSAIDs の副作用との関係に着目した報告は少ない。

本研究では、薬剤による炎症が生じた際に働く防御機構の因子の 1 つであると考えられる DAO と加齢との関連性について検討した。DAO は小腸絨毛組織の先端部で生成され、炎症で過剰分泌されたヒスタミンの影響を軽減化し、ヒスタミンのコントローラーとしての役割を担う¹⁰⁾。小腸生理機能評価にも使用される血清 DAO 活性は、小腸粘膜傷害により低下することが報告されている^{11, 12)}。NSAIDs 投与による皮膚生理機能の変化と恒常性維持に働く DAO の変化について、加齢マウスと若齢マウスを比較検討したところ、加齢マウスのみ、インドメタシン投与による小腸絨毛組織の挫滅が生じており、DAO 活性も著しく低下していることが明らかになった。以上の結果から、加齢による恒常性の低下は、インドメタシン投与による小腸炎症を増悪させる可能性が示唆された。第 1 章でインドメタシン投与による乾燥皮膚発現にヒスタミンの関与を明らかにしており、加齢による DAO 活性の低下は、ヒスタミンの影響の増大を招き、乾燥皮膚発現の増悪の原因の 1 つと考えられた。

第 3 章

加齢マウスにおけるセレコキシブ投与による乾燥皮膚発現メカニズムの解明

COX-2 選択性の高いセレコキシブは、高齢者に対して安全性が高いと考えられている。しかし、本研究では、セレコキシブを投与した加齢マウスにおいて、皮膚の肥厚が認められ、クレアチニン値の上昇が確認された。これは、セレコキシブ投与によって急性薬剤性腎障害が発現していると考えられ¹³⁾、腎障害による腫瘍壊死因子 (TNF) - α の発現により、乾燥皮膚が発現した可能性が示唆された。薬剤性腎障害による乾燥皮膚発現は、セレコキシブ投与に加えて、加齢の要因も考慮に入れておく方がよいと考えられる。

結 論

若齢マウスにおいて、インドメタシンの投与による乾燥皮膚発現メカニズムは、インドメタシンが PPAR γ を活性化し、IgE 抗体の過剰発現により、マスト細胞の脱顆粒を促し、その結果コラーゲンが減少し、乾燥皮膚発現に至ったことを明らかにした。また、ヒスタミンコントローラーの DAO は、加齢と小腸炎症により活性が低下し、乾燥皮膚発現を増長する。安全性が高いとされるセレコキシブ投与による加齢マウスの乾燥皮膚発現メカニズムは、急性薬剤性腎障害発現によることを明らかにした。これらの結果から、NSAIDs の投与は、COX に関係なく乾燥皮膚発現に繋がり、加齢により発現リスクの上昇と、悪化傾向を示すことが考えられ、消化器症状以外の副作用の発現にも注意する必要性が示唆された。

引用文献

- [1] Vane JR. *Nature New Biol.* 1971. 231: 232-235.
- [2] Kujubu DA, et al. *Journal of Biological Chemistry.* 1991. 266: 12866-12872.
- [3] Graham DY, et al. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2005, 3, 55-59.
- [4] Yokoyama S, et al. *Biol. Pharm. Bull.* 2015, 38, 947-950.
- [5] Ana C Puhl, et al. *Nucl Recept Signal.* 2015, Vol 13.
- [6] Kubota N, et al. *Mol Cell.* 1999, Vol.4. Issue 4. 595-607.
- [7] Okuno A, et al. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 1354-1361.
- [8] Poynter ME, et al. *J Biol Chem,* 1998, 273: 32833-32841.
- [9] P. Kinet. *Annu. Rev. Immunol.* 1999, 17, 931.
- [10] Sanjay Ponskshe. *WebMD Editorial Contributors,* 2023.
- [11] Cai C, et al. *Hepatogastroenterology,* 2012, 59: 155-158.
- [12] Forget P, et al. *Pediatr Res,* 1985, 19: 26-28.
- [13] Inna Slutsky, et al. *Cell Systems.* 2021, Vol. 12. Issue 12. 1124-1126.

公示の方法と時期

Indomethacin, a Non-steroidal Anti-inflammatory Drug,

Induces Skin Dryness via PPAR γ in Mice.

Biol. Pharm. Bull. 45, 77-85 (2022).

DOI: 10.1248/bpb21-00532

Effect of Celecoxib Administration on the Skin of 40-Week-Old Mice.

Biol. Pharm. Bull. 45, 1857-1861 (2022).

DOI:10.1248/bpb.b22-00518

Effects of Indomethacin Administration on the Small Intestines of 40-Week-Old Mice.

BPB Reports. 6, 136-140 (2023).

DOI:10.1248/bpbreports.6.4_136