

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19935

研究課題名（和文）可溶性メラニンによる抗アレルギーおよびがん抑制の実証とメラニン受容体の探索

研究課題名（英文）Demonstration of anti-allergic and ant-tumor effects of solubilized melanin and exploration of the melanin receptors

研究代表者

川本 善之（Kawamoto, Yoshiyuki）

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：10410664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は独自に開発した水溶性のメラニンが、マスト細胞の活性化やがん細胞の増殖を強く抑制する発見に基づき、動物個体レベルでその効果を実証するとともに、分子メカニズムを解明することを目的として研究を実施した。培養細胞レベルでの検証で更なる分子メカニズムの解明を進めることができた。アレルギーモデルおよびがん細胞移植モデルにおいて、水溶性メラニンの経口投与はいずれも有意な抑制効果を示した。メラニンと相互症する新たな分子の同定から、新規メラニン受容体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

メラニンは紫外線防御物質として働く物質であることや、髪の毛の色素物質であるといった認識が一般的であるが、我々が独自に調整した一定の分子サイズの水溶性メラニンが、マスト細胞の活性化を抑制し、がん細胞の増殖を抑える働きがあることは新規の発見であった。そして本研究で、動物個体で一定の安全性のもと、抗アレルギー、抗腫瘍効果を、限定的なモデルであるにせよ実証することができた。本成果は様々な疾病モデルでさらに検討を進めるための基盤知見となり、今後、ペットやヒトの疾患治療薬開発への応用につながる学術的意義を持つと考える。

研究成果の概要（英文）：Based on the discovery that water-soluble melanin, which was developed by our group, strongly inhibits mast cell activation and cancer cell proliferation, this study was conducted to demonstrate whether the melanin is effective at the animal level and to elucidate the molecular mechanism. More detailed analysis at the cultured cell level allowed us to elucidate further molecular mechanisms of melanin. Oral administration of water-soluble melanin showed a significant inhibitory effect in both the allergy model and the cancer cell transplantation model. Identification of new molecules that may interact with melanin suggests the possibility of novel melanin receptors.

研究分野：生体防御学

キーワード：メラニン アレルギー がん 癌 イカスミ イカ墨

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシナーゼ RET を強発現する RET トランスジェニックマウスは、生誕直後から全身のメラニン産生が亢進し、皮膚良性腫瘍期を経て、高確率(約 70%)で高度な転移所見が認められるメラノーマを自然発症する(Kato M, Oncogene, 1998)。我々は本マウスを用いたさまざまな解析を行っていたところ、偶然、このマウスは即時型アレルギーに抵抗性である事実を見出した。全身のメラニン産生が異常に亢進していることから、メラニンが IgE を介するアレルギー応答に阻害的に寄与している可能性を考えた。イカ墨には多量のメラニンが含まれていることから、試験的にマスト細胞を用いて活性化(脱顆粒)試験を行ったところ、それを有意に抑制した。さらに、合成メラニンそのものを用いると、市販の抗アレルギー薬と同等以上の強力なマスト細胞の抑制効果が認められた。予想通り、細胞毒性が極めて低いことが確認できたが、細胞の増殖が一時的に抑制されることも、同時に発見した。果たして、手持ちのあらゆる株化がん細胞の増殖を抑制した。過去 3 年におよび綿密に基礎データを蓄積し、メラニンによるマスト細胞抑制と細胞増殖抑制の 2 点について確証を得て、それぞれ特許を出願した(「抗アレルギー剤」特願 2016-132351、「細胞増殖抑制剤」特願 2016-154949)。

メラニンによるマスト細胞の活性化の抑制と、細胞増殖抑制の現象については確実であるが、作用機序は全く分かっていない。また、動物レベルでのアレルギー予防・改善、がんの抑制効果については実証されていなかった。

2. 研究の目的

国民の約 2 人に 1 人は何らかのアレルギー疾患に罹患しており、中でも花粉症などの即時型アレルギー患者は急速に増加している。また、国民の約 2 人に 1 人は何らかのがんに罹患し、3 人に 1 人はがんが原因で亡くなる時代である。解決すべきさまざまな疾患が存在する中で、罹患患者数の多さから、アレルギーとがんの制御は喫緊の課題であり、決定的な治療法・予防法の開発が強く求められる。

本研究の目的は、L-Dopa を出発物質として独自の方法で可溶化に成功したメラニン(以下水溶性メラニン、もしくは Dopa-melanin)を用い、これまでにない安全で効果的なアレルギー緩和・予防薬、および、がん細胞増殖抑制剤の開発につなげるための基礎知見を得ることである。そのための克服すべき課題が、細胞レベルにおける水溶性メラニンの作用機序の解明と、動物個体での効果の実証である。現在、水溶性メラニンは、細胞毒性を示さない濃度で、マスト細胞の活性化を抑えること、そしてあらゆる種類の株化がん細胞の増殖を抑制するという知見を得ている。しかしながら、その仕組みは全く不明であり、動物モデルでの検証も実施されていない。信頼され安全である薬剤の利用、開発には、作用機序が分子レベルで解明され、個体レベルで安全性とともに効果が検証されていることが、学術的にきわめて重要である。当該メラニンの相互作用分子を新規に同定し、マスト細胞活性化とがん細胞増殖抑制メカニズム解明に取り組むとともに、アレルギーモデル、およびがんモデルマウスを用いて、水溶性メラニンがアレルギーの予防もしくは緩和に効果が得られるか、がんの進展・転移が抑制され寿命が延長するか、それぞれ実証することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1). マスト細胞、及びがん細胞におけるメラニンの作用メカニズムの検討

マスト細胞：モデル細胞としてラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 を用いて検討した。細胞を抗 DNP-IgE 抗体で感作後、メラニンおよびイカ墨、酵素処理イカスミを 2 時間前処理し、抗原 HSA-DNP で刺激した。脱顆粒試験は Hexosaminidase アッセイにより評価した。また細胞内シグナル伝達の解析はウェスタンブロット法により関連分子の検出を行った。

がん細胞：代表として HeLa 細胞を主に用いた。細胞をメラニンで各濃度、処理時間処理し、定法に従いウェスタンブロット用サンプルを調整した。また、メラニン処理した細胞を PI 染色し、フローサイトメーターを用いて細胞周期解析を実施した。

(2). メラニン結合タンパク質の同定

細胞を Lysis バッファー(1% Triton X-100)にて溶解し、遠心処理後に可溶性画分を抽出後、メラニンを添加し 4 で 2 時間、攪拌しながらインキュベートした。このサンプルを SDS-PAGE で展開後に CBB 染色し、水溶性メラニンなしサンプルとバンドパターンを比較した。差異のある対象バンドを切り出し、トリプシンを用いて in-gel digestion を行い、アセトニトリルを用いてペプチドを抽出した。これを LC-MS で分析し、タンパク質を同定した。

(3). 動物個体を用いた抗アレルギー、および抗腫瘍効果

アレルギーモデル：Balb/c マウスに DNP 特異的 IgE 抗体を腹腔内投与して感作させ、翌日、抗原 DNP-HSA を腹腔内投与し、経時的に直腸温を計測した。水溶性メラニン(100mg/kg)は抗原投与 30 分前に経口投与した(PSA: passive systemic anaphylaxis モデル)。また、DNP 特異的 IgE 抗体を水溶性メラニンと共にマウスの耳介へ投与し 2 日後、1% Evans Blue 溶液に懸濁した DNP-HSA を尾静脈より投与した。30 分後、マウスの耳介に漏出した色素を計測した(PCA: passive cutaneous anaphylaxis モデル)。また、オボアルブミン(OVA)をアジュバント(Alum)とともに腹腔内投与して初回と 7 日目に免疫し、14 日目から 28 日目まで OVA を 2 日おきに経口投

与し、36日目に高濃度のOVA(50mg)を投与してアナフィラキシーを誘導した(食物アレルギーモデル)。水溶性メラニン(18.9mg/ml, PBS)を浸透圧ポンプ(0.11µl/hr, 4weeks用)に注入し、ヌードマウスの皮下腹側部に移植した。翌日、浸透圧ポンプの薬液排出口近傍にマウス癌細胞株B16F10(2×10⁵個)を皮下へ注射し、その後の腫瘍体積を経時的に計測した。また、同癌細胞移植モデルにおいて、メラニン(50mg/ml, 0.2ml/mouse: 約500mg/kg)を2日おきに経口投与し、腫瘍体積を経時的に計測した。なお、本動物実験は中部大学動物実験委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1). 培養細胞を用いた分子機序の解析

マスト細胞活性化抑制メカニズム

メラニンは、細胞毒性を示さない濃度で処理濃度依存的に抗原-IgE-FcεRIを介するマスト細胞の脱顆粒反応を抑制した。また、天然メラニン源としてイカ墨を用いた場合、プロテアーゼで前処理することにより、マスト細胞の脱顆粒反応を処理濃度依存的に有意に抑制した。Fcレセプターシグナルに関わる分子のリン酸化レベルを調べた結果、抗原刺激5分におけるSyk(Y348)、PI3K(Y467/199)、PLC1(Y783)、PLC2(Y759)、ERK(p44/42)の各リン酸化は一過的に上昇するが、全てメラニンの処理濃度依存的に抑制された(図1A)。メラニン処理後の細胞表面のFcεRIに結合したIgEレベルは処理濃度依存的に低下したことから、メラニンそのものが細胞内へ取り込まれている透過型電子顕微鏡像が得られたことから(図1B 白矢印)、メラニン処理により抗原との反応可能な細胞表面のFcεRI-IgEの細胞内インターナリゼーションが引き起こされることが、活性化抑制機構の一つである可能性が見出された。さらに、細胞膜を蛍光ラベルした細胞にメラニンを処理し、局所へパルスレーザー照射後の蛍光退色後回復(FLAP)を調べたところ、メラニン処理はその回復を有意に遅らせることも見出した。すなわち、メラニンの取り込みにより細胞膜流動性が減弱し、細胞内シグナル伝達のトリガーとなる、抗原を介したIgE分子の架橋を抑制している可能性も示唆された。また、細胞表面に部分的に結合したメラニンも観察されたことから、抗原と抗体の分子会合を物理的に阻害している可能性も考えられた(図1B 黒矢印)。

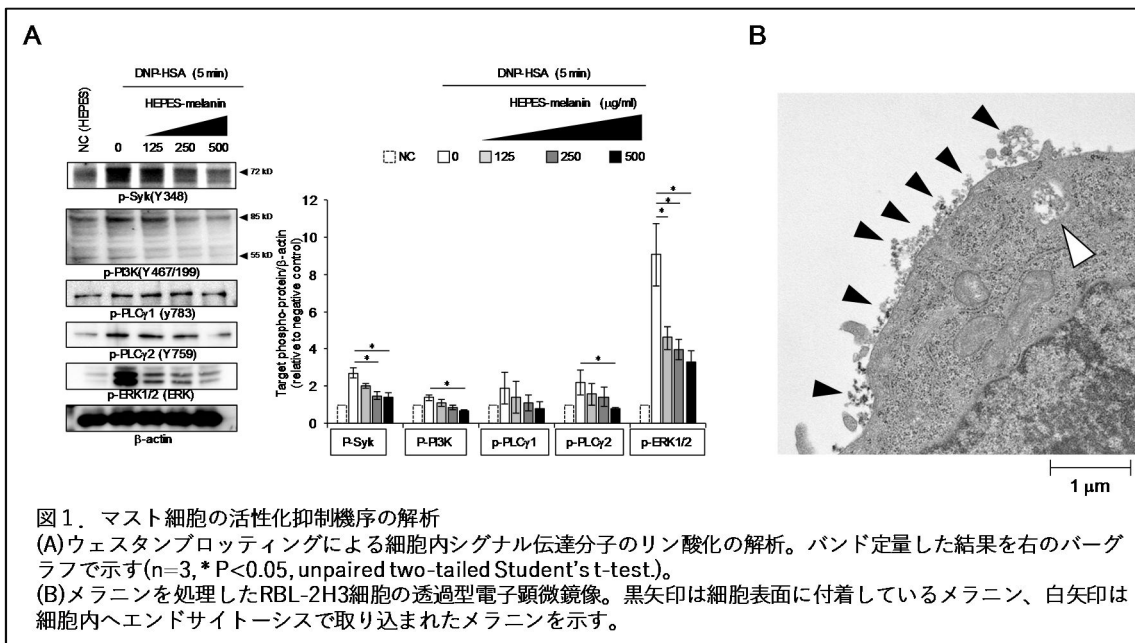


図1. マスト細胞の活性化抑制機序の解析

(A)ウェスタンブロッティングによる細胞内シグナル伝達分子のリン酸化の解析。バンド定量した結果を右のバーグラフで示す(n=3, *P<0.05, unpaired two-tailed Student's t-test.)。

(B)メラニンを処理したRBL-2H3細胞の透過型電子顕微鏡像。黒矢印は細胞表面に付着しているメラニン、白矢印は細胞内へエンドサイトーシスで取り込まれたメラニンを示す。

細胞増殖抑制メカニズム

HeLa細胞へメラニンを処理すると、処理濃度依存的にHistone H3のリン酸化(Ser10)が強く抑制され、細胞分裂の停止が引き起こされることが強く示唆された。フローサイトメトリーによる細胞周期解析の結果、メラニンを処理することで、G0/G1-arrestが引き起こされることが分かった。Cyclinの発現への影響を調べた結果、処理24時間ではCyclin A、Cyclin B、Cyclin Eの発現量に大きな差は見られなかったが、Cyclin D(1~3)発現に処理濃度依存的な抑制効果が認められた。なお、Cyclin Dと会合するCDK4、CDK6の発現パターンには影響は見られなかった。Cyclin Eと会合するCDK2の発現にも影響は見られなかったが、処理48時間後にはCdc6およびCyclin Eの発現レベルが低下した。Rbタンパク質のリン酸化レベルを調べた結果、予想通りRb(p130)のSer780(CDK4/Cyclin Dの標的基質)のリン酸化レベルがメラニン処理濃度依存的に抑制されていた。このことから、メラニンはCyclin Dの発現低下を引き起こし、Rbのリン酸化

を抑制することで転写因子 E2F の転写活性化を妨げ、その標的遺伝子である Cyclin E や Cdc6 などの発現が誘導されず、G1 期に留まるのではないかと考えられた。

(2) メラニンと相互作用する分子の解析

RBL-2H3 細胞を用い、メラニンと相互作用する分子の探索を行った。メラニンとインキュベーションしたサンプルを電気泳動にかけると、下層ゲルへ展開されず上層ゲルに留まるバンドが現れた。これを LC-MS 分析によりタンパク質のデータベースサーチを行ったところ、翻訳において、ポリペプチド鎖の伸長を促進するタンパク質の一種が同定された。当該タンパク質はペプチド伸長因子であり、タンパク質の合成中に 80S リボソームの A 部位へのアミノアシル tRNA の動員を仲介する機能が知られ、転写産物の翻訳に寄与するタンパク質である。その他、メラニン処理しないコントロールとの比較により差があるバンドのタンパク質の同定を行ったところ、アクチン重合分子として知られ、細胞分裂時に収縮環形成に重要な役割を担うタンパク質が同定された。これらは細胞表面での第一のメラニンセンサーとして働いている可能性は低いものの、細胞内でこれらの分子と会合することで、ペプチド合成阻害やアクチン重合阻害に働く可能性があり、メラニンによる細胞分裂抑制メカニズムの全容解明に向けた重要な知見である。現在更なる解析を進めている。

(3) 動物個体を用いた抗アレルギー、および抗腫瘍効果

アレルギー抑制の検討

DNP 特異的 IgE 感作によるアレルギー（受動的全身性アナフィラキシー、PSA）モデルにおいて、水溶性メラニンを胃内強制にて前処置し、DNP 抗原を腹腔内投与した後の体温変化を経時的に測定した。その結果、メラニンを胃内強制投与処置した場合に、アナフィラキシーによる一過的な体温低下の早期回復が確認された（図 2A）。このことから、水溶性メラニンはマスト細胞を介する型アレルギーの緩和に寄与できる可能性が示された。なお、メラニンの胃内投与による体重変化や食餌量に変化は見られなかった。

次に、DNP 特異的 IgE をマウスの耳介へ投与（感作）し、尾静脈より抗原を導入後に耳介の血管拡張性を評価する受動的皮膚アナフィラキシー（PCA）モデルを用いて実施した。その結果、IgE 感作時にメラニンを共投与すると、血管拡張が有意に抑制されることが分かり、メラニンはマスト細胞を介するアレルギー反応を抑制することが確認できた（図 2B）。また、メラニンをマスト細胞モデルの培養細胞（RBL-2H3）に処理することで、細胞膜と細胞質の流動性が抑制されることが分かり、メラニンによるマスト細胞抑制機序の一つである可能性が示唆された。

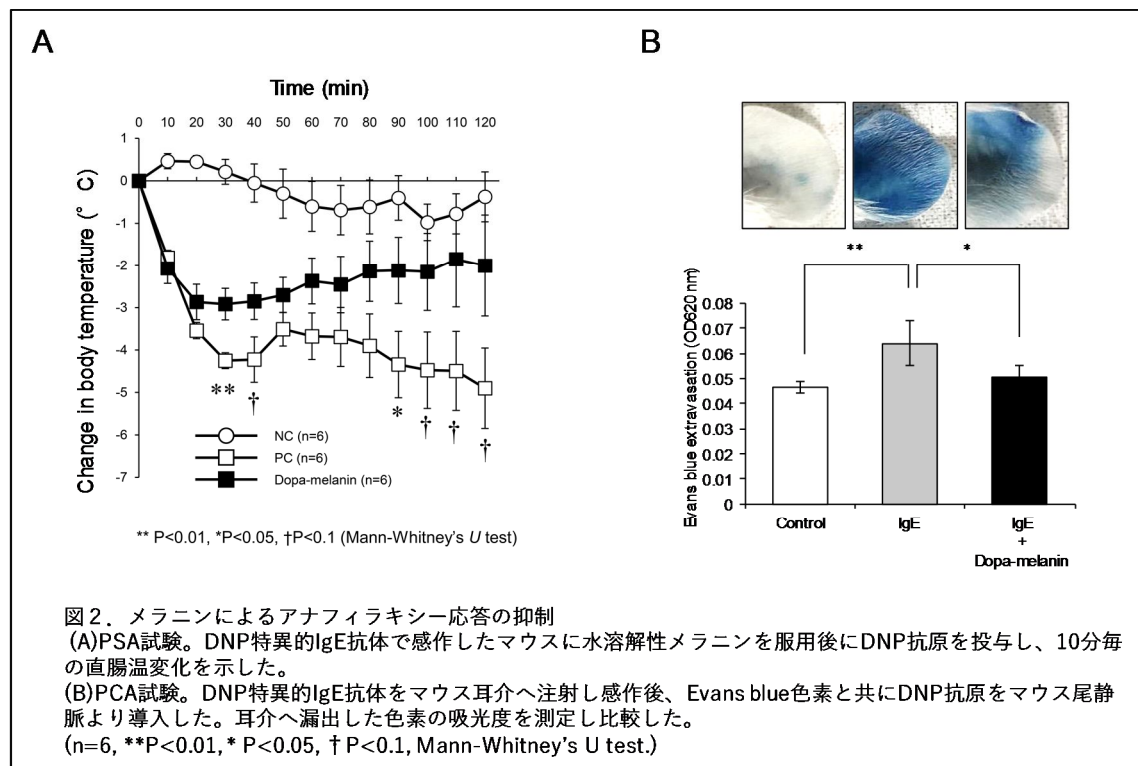


図 2. メラニンによるアナフィラキシー応答の抑制

(A) PSA 試験。DNP 特異的 IgE 抗体で感作したマウスに水溶性メラニンを服用後に DNP 抗原を投与し、10 分毎の直腸温変化を示した。

(B) PCA 試験。DNP 特異的 IgE 抗体をマウス耳介へ注射し感作後、Evans blue 色素と共に DNP 抗原をマウス尾静脈より導入した。耳介へ漏出した色素の吸光度を測定し比較した。

(n=6, **P<0.01, *P<0.05, †P<0.1, Mann-Whitney's U test.)

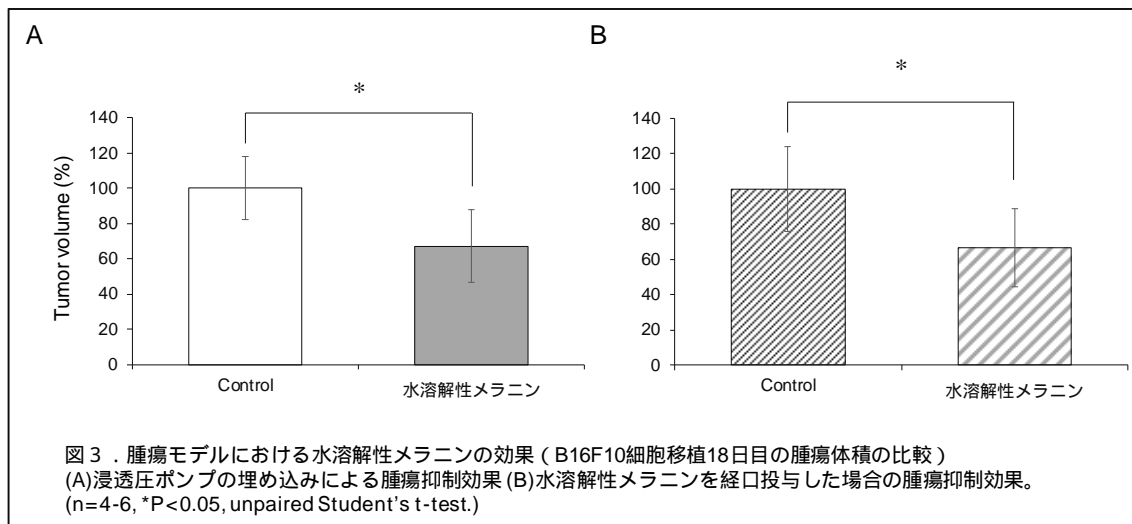
さらに、食物アレルギーモデルを用い、メラニンの経口投与でアレルギーの感作を抑制することができるか、あるいはアレルギー感作後のアレルギー反応を抑制することができるかどうかを検討した。食物アレルギーとして OVA を用い、メラニンを 1. 抗原感作期間のみ 2. 抗原負荷期間のみ 3. 抗原感作および負荷期間 に継続して投与した群を作成し、比較した。その結果、メラニンの経口投与は抗原特異的 IgE の産生を抑制することはなかったが、アレルギー感作前に前処置として服用させると、アナフィラキシー反応の抑制が見られた。今回の検討で、水溶

解性メラニンが抗原負荷時における免疫応答を負に制御し、食物アレルギーの重症化抑制に寄与する可能性が示唆された。

抗腫瘍効果の検討

ヌードマウスに対するマウスメラノーマ細胞(B16F10)の皮下移植モデルに対し、移植がん細胞の近傍にメラニンを注入した浸透圧ポンプを外科的に埋め込み、腫瘍の成長を計測した。浸透圧ポンプの排出口近傍に B16F10 を移植し、その結果、メラニンの持続的な体内放出により、近傍のがん細胞の増殖が有意に抑制された(図3A)。移植30日後までカプランマイヤー法による生存時間分析を行ったところ、生存率の低下が有意に抑制された(n=4, P<0.05, log-rank test)。

また、上記がん移植モデルに対し、メラニンを胃内強制投与し効果が得られるかどうか検討した。その結果、腫瘍体積の増大が有意に抑制されることが見出された(図3B)。



以上結果から、本研究において水溶性メラニンはマウス個体レベルでアレルギー応答を減弱させること、移植がん細胞の増殖を抑制できることが、一定の範囲で実証できた。また、水溶性メラニンと相互作用する細胞内分子の候補が新たに見出された。しかし、細胞表面においてメラニンを受容する分子は未だ分かっていない。また今回見出された水溶性メラニンと相互作用する分子が、どういったメカニズムで下流シグナル伝達分子と影響し合うのか、また経口投与した場合のバイオアベイラビリティや体内代謝、患部や標的細胞への集積の有無など不明な点も多く残されており、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawamoto Yoshiyuki, Kondo Hiromoto, Hasegawa Mari, Kurimoto Chiharu, Ishii Yuuki, Kato Chihiro, Botei Taishi, Shinya Muneshige, Murate Takashi, Ueno Yuki, Kawabe Masao, Goto Yuko, Yamamoto Ryohei, Iida Machiko, Yajima Ichiro, Ohgami Nobutaka, Kato Masashi, Takeda Kozue	4. 巻 163
2. 論文標題 Inhibition of mast cell degranulation by melanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 178 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2019.02.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川本善之、伊藤ななみ、鈴木里歩、高井夢花、林夏希、上野有紀、武田湖州恵
2. 発表標題 イカスミおよび合成メラニンによるマスト細胞活性化の抑制機序解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Kawamoto, Kozue Takeda
2. 発表標題 Analysis of cancer cell growth suppression and mechanism by synthetic melanin
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川本善之、近藤紘本、小森光華、大西新一郎、杉江麻友香、山野裕基、小林果、上野有紀、武田湖州恵
2. 発表標題 合成メラニンによるがん細胞増殖および遊走の抑制
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiyuki Kawamoto, Kozue Takeda
2. 発表標題 Cell growth inhibition by solubilized eumelanin
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiromoto Kondo, Kozue Takeda, Yoshiyuki Kawamoto
2. 発表標題 Suppression of mast cell activation by synthetic melanin
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------