

平成21年 4月 8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590688
 研究課題名（和文） 癌関連精神ストレスと腫瘍進展血管新生のバイオロジカルサイコオンコロジー研究
 研究課題名（英文） Biological psycho-oncology study on cancer-related psychological stresses and tumor angiogenesis
 研究代表者
 海老原 覚（EBIHARA SATORU）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：90323013

研究成果の概要：人は癌を告知されたとき様々な精神状態となる。また、癌そのものによっても様々な精神状態をきたす。精神状態は神経伝達物質による神経活動によって規定されるがそのなかでも大きな役割を果たしているのはドーパミンとセロトニンである。そこでドーパミンとセロトニンの変化がどのように腫瘍に影響を与えるか遺伝子改変マウスにて解析した。今回の研究結果は癌患者のせん妄状態や抑うつ状態に対する対処法に示唆を与えるのみならず、新しい分子標的治療法の開発につながる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：ドーパミン、ドーパミントランスポーター、セロトニン、セロトニントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

インフォームドコンセントという考え方の実践が求められるようになり、癌医療においても情報開示を前提とした医療が行われるようになった。同時に医療者は、悪い知らせを伝えたあとに後に生じる様々なストレスからくる落胆、不安、絶望、孤立感などの通常の心理的反応から、うつ病や適応障害など臨床的介入を要する精神症状に至るまで、癌患者の様々な心理的ストレスからくる精神

状態への対応が要求されるようになっていく。これまでさまざまな疫学研究や動物実験によりストレスが、癌の進展に影響を与える可能性が示唆されてきた。しかしながら、その **biological mechanism** はほとんどわかってなく、また様々な臨床上の結果も相反している。

2. 研究の目的

(1) まずドーパミン系の異常による精神状

態と腫瘍の関係の解明を行う。そこで錯乱・せん妄の動物モデルで hyperdopaminergic 状態にあるドーパミントランスポーター (DAT) 欠損マウスにおける腫瘍進展の影響とその機序解析する。つぎにまずセロトニン系の異常による精神状態と腫瘍の関係の解明を行う。そこで抑鬱の動物モデルでセロトニン枯渇状態にあるドーパミントランスポーター (DAT) 欠損マウスにおける腫瘍進展の影響とその機序解析する。

(2) セロトニンの腫瘍細胞に対する影響とセロトニン受容体発現・シグナル伝達、血管新生因子の生成に対する *in vitro* での解析。セロトニンの血管内皮細胞に対する作用の *in vitro* での解析。セロトニンと腫瘍の関係の解明不安・鬱の動物モデルでセロトニン枯渇状態にあるセロトニントランスポーター (SERT) 欠損マウスにおける腫瘍進展の影響とその機序解析。セロトニンの腫瘍細胞に対する影響とセロトニン受容体発現・シグナル伝達、血管新生因子の生成に対する *in vitro* での解析。セロトニンの血管内皮細胞に対する作用の *in vitro* での解析。

3. 研究の方法

(1) DAT^{+/+}、DAT^{+/-}、DAT^{-/-}マウスにLLC細胞を移植し腫瘍の増大を時間経過と共に計測する。さらに血管新生に関してもSERTと同じように *in vivo* および *in vitro* の両方から解析する。さらに、ドーパミン系の場合にはセロトニン系と比べてレセプターが複雑ではなく大きく、ドーパミンD1レセプター、ドーパミンD2レセプターの2種類に分かれる。そこで、このマウスの腫瘍に於いて、これらのレセプターが機能的増減を放射性リガンドのbinding assay によって調べる。

(2) また、我々はDRD1ノックアウト、DRD2ノックアウトマウスについても解析し、腫瘍増大の結果がDATの解析の解釈について検討する。上記の解析にてターゲットレセプターが確定されれば *in vitro* において、血管内皮細胞のセルラインにおいてRNA interference によってドーパミン受容体の作用を抑制して、その関わりを明らかにする。

さらに上記のiRNA導入細胞において、細胞内シグナル伝達がどのように変化するか、ウェスタンなどで検索する。

(3) 次にセロトニントランスポーター (SERT) 遺伝子改変マウスの解析を行う。東北大学精神・神経生物学分野(曾良一郎教授)から C57BL/6Jx129SvEv バックグラウンドとして homologous recombination により作成した SERT 遺伝子改変のヘテロのマウス (SERT^{+/-}) を譲り受け繁殖させる。これら

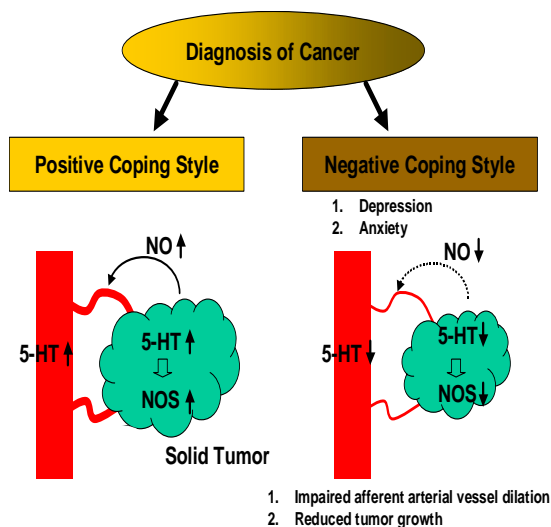
のマウスにおいては SERT 遺伝子の第2エクソンが phosphoglycerine kinase-neo gene cassette と置き換わっている。ジェノタイプングによりワイルド、ヘテロ、ホモすべて充分実験に必要な匹数供給されることが確認されている。異常な精神状態そのものが、どのような影響を固形腫瘍の増大に与えるのかを調べる。腫瘍の周辺でどのような神経伝達物質の遊離異常があるのか?そしてそれは腫瘍細胞そのものに対してどのような影響があるのか?また、腫瘍の血管内皮細胞など腫瘍を維持する微小環境 (Niche) に対してはどういう影響があるのだろうか?を明らかにする。まず SERT の機能と腫瘍の進展の関係を調べるため SERT^{+/+}、SERT^{+/-}、SERT^{-/-}マウスに皮下腫瘍 (LLC、KLN205、B6) を植え、その成長を測定する。

4. 研究成果

(1) 平成 19 年度は癌患者の告知時などにおける強い精神ストレスにより、しばしば患者は錯乱状態やせん妄をきたす。そのようなせん妄状態は癌にとってプラスかマイナスかをせん妄マウスに癌細胞を移植し皮下腫瘍の進展を観察することにより研究した。せん妄のモデルマウスとしては神経伝達においてハイパードーパミンergicな状態になっているドーパミントランスポーターノックアウトマウス (DAT^{-/-}マウス) を作成し用いた。腫瘍の増大はコントロールワイルドマウスに比べて、DAT^{-/-}マウスでは有意に増大が抑えられた。DAT^{-/-}マウスの末梢血中のドーパミンは減少しており、腫瘍のドーパミン受容体を調べたところドーパミンD1受容体が減少していることが判明した。またドーパミン刺激により血管内皮細胞のVEGF受容体2の細胞表面の発現が減少していることがわかった。また細胞内Srcを介してVEGF受容体2のリン酸化を促進していることがわかった。以上のことを考えると、DAT^{-/-}マウスにて腫瘍の増大が抑制される機序としてはハイパードーパミンergicな状態により腫瘍の血管内皮のドーパミンD1受容体が減少し、また末梢のドーパミンも減少する。それにより、ドーパミンD1受容体刺激により促進されていた血管新生が抑制され、固形腫瘍の増大が抑制されるものと考えられた。この研究より、せん妄状態は腫瘍の増大が抑制されることがわかったとともに、ドーパミンD1受容体が固形腫瘍の治療における新たな分子標的となりえる可能性が示唆された。

(2) 平成 20 年度は癌関連精神ストレスのうち抑鬱と癌とりわけ腫瘍進展様式の関係の研究した。そこで鬱の原因神経伝達物質であるセロトニンと癌の進展の関係を調べた。鬱のモデルであるセ

ロトニントランスポーターノックアウトマウスに皮下腫瘍を植えるとその腫瘍内のセロトニン濃度は半減しており、腫瘍の増大は有意に抑えられた。また、腫瘍内の endothelial nitric oxide synthase (eNOS)の発現が抑えられていた。そこで血管内皮細胞(HUVEC)に生理的濃度以下のセロトニンを投与したところ、セロトニンの用量依存性にeNOSが誘導された。網羅的リン酸化酵素検出にて、このときに誘導されるリン酸化酵素を調べたところ、ERK1/2の活性化がみられた。そこでin vitroにおいて調べてみるとHUVECにおいて用量依存性に生理的濃度のセロトニンはeNOSとERK1/2が活性化することが判明した。HUVEC上のセロトニン受容体を調べたところセロトニン2Bとセロトニン2C受容体があることを確認した。そこで選択的セロトニン2B受容体であるSB20474はセロトニンによるeNOSとERK1/2の活性化が阻害されたが、選択的セロトニン2C受容体であるRS102221はセロトニンによるeNOSとERK1/2の活性化を阻害しなかった。以上のことからセロトニントランスポーターノックアウトマウスにおける腫瘍増大の抑制はセロトニンの枯渇によるセロトニン2B受容体の生理的刺激の減少が原因であると考えられた。鬱の患者はセロトニン伝達が阻害されている状態と考えられるが、むりに治療によりセロトニン伝達を上昇させると、癌の進展の観点から悪影響を与える可能性がある。近年、セロトニンやその受容体を修飾する薬剤が広く臨床の場で使われているが、そういった薬剤を応用して分子標的治療薬の開発の可能性はある(下図)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Freeman S, Kurosawa H, Ebihara S, Kohzuki M. Caregiving Burden for the Oldest Old: A Population Based Study of Centenarian Caregivers in Northern Japan. Arch Gerontol Geriatr 2009 (in press). 査読有
2. Freeman S, Ebihara S, Ebihara T, Niu K, Kohzuki M, Arai H, Butler JP. Olfactory stimuli and enhanced postural stability in older adults. Gait Posture. 2009 Mar 13. [Epub ahead of print] 査読有
3. Yamanda S, Ebihara S, Asada M, Okazaki T, Niu K, Ebihara T, Koyanagi A, Yamaguchi N, Yagita H, Arai H. Role of ephrinB2 in non-productive angiogenesis induced by Delta-like 4 blockade. Blood. 2009 Feb 13. [Epub ahead of print] 査読有
4. Asada M, Ebihara S, Yamanda S, Niu K, Okazaki T, Sora I and Arai H. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial NOS and ERK1/2 phosphorylation. Neoplasia 2009; 11: 408-417. 査読有
5. Yamanda S, Ebihara S, Ebihara T, Yamasaki M, Asamura T, Asada M, Une K, Arai H. Impaired urge-to-cough in elderly patients with aspiration pneumonia. Cough 4:11, 2008. 査読有
6. Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Niu K, Arai H. Erythropoietin promotes the growth of tumors lacking its receptor and decreases survival of tumor-bearing mice by enhancing angiogenesis. Neoplasia 10: 932-939, 2008. 査読有
7. Ebihara S, Ebihara T, Arai H. Cough and transdermal long-acting α_2 agonist in Japan. Respir Med 2102: 1497, 2008. 査読有
8. Ebihara S, Arai H. Prospects for health-systems research. Lancet. 2008, 7; 371. 査読有
9. Munakata M, Kobayashi K, Niisato-Nezu J, Tanaka S, Kakisaka Y, Ebihara T, Ebihara S, Haginoya K, Tsuchiya S, Onuma A. Olfactory stimulation using black pepper oil facilitates oral feeding in pediatric patients receiving long-term enteral nutrition. Tohoku J Exp Med. 214(4):327-332, 2008. 査読有

10. Asada M, Ebihara S, Numachi Y, Okazaki T, Yamanda S, Ikeda K, Yasuda H, Sora I, Arai H. Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter. *Int J Cancer* 123(3):511-518, 2008. 査読有
 11. Niu K, Hozawa A, Guo H, Kuriyama S, Ebihara S, Yamg G, Ohmori-Matsuda K, Nakaya N, Takahashi H, Fujita K, Wen S, Arai H, Tsuji I, Nagatomi R. Serum C-reactive protein concentration is associated with physical performance even within very low range in a community-based elderly population aged 70 years and over. *Gerontology* 54: 260-267, 2008. 査読有
 12. Niu K, Hozawa A, Awata S, Guo H, Kuriyama S, Seki T, Ohmori-Matsuda K, Nakaya N, Ebihara S, Wang Y, Tsuji I, Nagatomi R. Home blood pressure is associated with depressive symptoms among elderly population aged 70 years and over: a population-based, cross sectional analysis. *Hypertension Res* 31: 409-416, 2008. 査読有
 13. Ebihara S, Aida J, Freeman S, Osaka K. Infection and its control in group homes for the elderly in Japan. *J Hosp Infect* 2008; 68: 185-186. 査読有
 14. Yamasaki M, Ebihara S, Freeman S, Ebihara T, Asada M, Yamnda S, Arai H. Sex differences in the preference for place of death among community-dwelling elderly people in Japan. *J Am Geriatr Soc* 56: 376-376, 2008. 査読有
 15. Yamasaki M, Ebihara S, Ebihara T, Freeman S, Yamanda S, Asada M, Yoshida M, Arai H. Cough reflex and oral chemesthesis induced by capsaicin and capsiate in healthy never-smokers. *Cough* 31(1): 9, 2007. 査読有
 16. Ebihara S, Ebihara T, Yamasaki M, Asada M, Yamanda S, Niu K, Sasaki H, Arai H. Contribution of gastric acid in elderly nursing home patients with cough reflex hypersensitivity. *J Am Geriatr Soc* 55: 1686-1688, 2007. 査読有
 17. Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Saijo Y, Shiraishi Y, Ebihara T, Niu K, Mei H, Arai H, Yambe T. Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes. *Am J Pathol* 171: 1093-1103, 2007. 査読有
 18. Sato T, Ebihara S, Kudo H, Fujii M, Sasaki H, Butler JP. Toe clearance rehabilitative slipper for gait disorder in the elderly. *Geriatr Gerontol Int* 7: 310-311, 2007. 査読有
 19. Ohara Y, Ohru T, Ebihara S, Ebihara T, Sasaki H, Arai H. Accidental carbon monoxide poisoning at home in Japan. *Pediatr Pulmonol* 42: 853-853, 2007. 査読有
 20. Ebihara S. More doctors needed before boosting clinical research in Japan. *Lancet* 369: 2076-2076, 2007. 査読有
 21. Ebihara S, Ebihara T, Yamanda S, Asada M, Arai H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and smoking cessation. *Respiration* 74: 478-478, 2007. 査読有
 22. He M, Ohru T, Ebihara T, Ebihara S, Sasaki H, Arai H. Mosapride citrate prolongs survival in stroke patients with gastrostomy. *J Am Geriatr Soc*, 54: 142-144, 2007. 査読有
 23. Ebihara T, Ebihara S, Ida S, Ohru T, Yasuda H, Sasaki H, Arai H. Acid and swallowing reflex. *Geriatr Gerontol Int* 7: 94-95, 2007. 査読有
- 〔学会発表〕 (計 1 件)
1. Yamanda S, Ebihara S, et al Notch ligand delta-like 4 blockade suppresses tumor growth in mouse lung carcinoma model. *ATS 2007 International Conference*. H19. 5. 20 San Francisco, CA, USA
6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 海老原 覚 (EBIHARA SATORU)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号 : 90323013
- (2) 研究分担者
 なし
- (3) 連携研究者
 なし