

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07192

研究課題名(和文)セロトニン-キヌレニン経路破綻に着目した抗がん剤誘発精神機能障害の病態解明

研究課題名(英文)The elucidation of the predictive of psychological changes by chemotherapy mediated the serotonin-kynurenine pathway

研究代表者

北村 佳久 (KITAMURA, YOSHIHISA)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：40423339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではがん患者の精神的負担の原因として抗がん剤投与による”ストレス脆弱性”の病態を想定し研究を実施した。実験にはラットを用い、乳がんの標準的化学療法であるドキシソルビンとシクロホスファミドのAC療法を実施し検討した。その結果、抗がん剤投与により不安症状を示し、その病態にはセロトニン2A受容体機能の亢進作用、すなわち”ストレス脆弱性”に陥ることを明らかにした。この不安症状は従来の抗不安薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬投与では悪化すること、さらにこの不安症状にはセロトニン1A受容体作用薬が有効であることを明らかにした。今後のがん患者の精神的負担の軽減に貢献できると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の3人に1人はがんで亡くなる。また、がんと診断を受けた患者の多くは精神的な負担を強いられ、抗がん剤をはじめとした治療の拒否へともつなげる。本研究では抗がん剤は不安症状といった精神的な負担を誘発することを明らかにした。その原因は中枢神経系の機能低下によるものであり、ストレスに弱い脳になることを明らかにした。また、治療薬も明らかにし、今後益々増加するがん患者の健全な精神機能の維持に貢献できた。

研究成果の概要(英文)：Serotonin (5-HT) are widely distributed throughout the brain and are involved in the regulation of mood disorders. We demonstrated that the combination of doxorubicin and cyclophosphamide induced anxiety-like behavior. We proposed that the anxiety-like behavior induced by the combination of doxorubicin and cyclophosphamide is mediated by 5-HT2A receptor hyperactivity. And, the combination of doxorubicin and cyclophosphamide induced anxiety-like behavior by 5-HT2A receptor hyperactivity via the phosphorylation of ERK1/2. Furthermore, selective serotonin reuptake inhibitors may attenuate the anxiolytic effects induced by the combination of doxorubicin and cyclophosphamide. Furthermore, a 5-HT1A receptor agonist and a 5-HT2A receptor antagonist ameliorated chemotherapy-induced anxiety-like behavior in rats. Thus, 5-HT2A receptor antagonists or 5-HT1A receptor agonists might be useful for treating chemotherapy-induced anxiety disorders.

研究分野：精神神経薬理学

キーワード：抗がん剤 不安 AC療法 神経新生 セロトニン キヌレニン セロトニン1A受容体作用薬

1. 研究開始当初の背景

近年の医学の進歩によって得られた成果の一つとして“がん”の治癒が挙げられる。その結果、社会に復帰できる“がんサバイバー”は増加し、その次の目標は生活の質 (QOL) の向上となる。しかしながら、現状はがん患者は様々な場面で心理的ストレスにさらされている。そのため、抑うつを主徴とする不安症状やうつ状態はがん患者において高頻度 (2~3 割) で合併する精神症状である (図 1A)。さらに、がん患者の悩みや負担として「再発・転移の不安」「将来に対する不安」という『不安などの心の問題』であり、多くのがん患者が心に苦しみを抱えている (図 1B)。これらがん患者の精神機能変化は、患者の自殺、QOL の低下、抗がん治療のコンプライアンス低下に関連するため、がん患者の精神的ケアは临床上重要である。

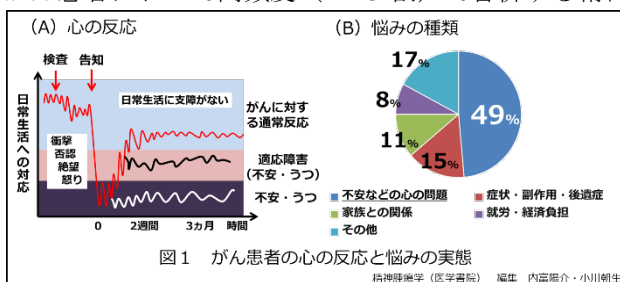


図1 がん患者の心の反応と悩みの実態

これまで申請者はラットを用いた研究において以下の成果を明らかにしていた。2015-2017 年度基盤研究 (C) (15K08589) において乳がんの標準的化学療法であるドキシソルビシンおよびシクロホスファミド投与により不安症状が現れることを明らかにした。さらに、本剤投与により海馬歯状回における神経新生の抑制作用を明らかにした。つまり、抗がん剤投与による不安症状の発現には脳内における神経新生の抑制が関与している可能性を報告した。しかしながら、抗がん剤による精神疾患発症の病態解明は十分ではなく、今後の研究が望まれている。

これまでの多くの精神疾患発症に関する研究において、セロトニン (5-HT) 神経機能の低下によるセロトニン_{2A} (5-HT_{2A}) 受容体機能の異常はよく知られている。さらに、精神疾患治療薬の多くはセロトニン神経系を賦活させる薬剤である。つまり、抗がん剤投与による精神疾患発症にはセロトニン神経系が関与することが推察される。一方、近年セロトニンと同様にトリプトファン代謝物であるキヌレニンの精神機能への関与も注目されている。中でもキノリン酸は神経変性作用を有しており精神疾患発症への関与が考えられる。さらに、炎症状態が惹起されるとセロトニン経路よりキヌレニン経路が活性化されることも明らかとなっている。従って、抗がん剤投与により炎症が惹起しセロトニン-キヌレニン経路のバランスが破綻することにより精神疾患を発症するのではないかと考え、本研究の着想に至った (図 2)。

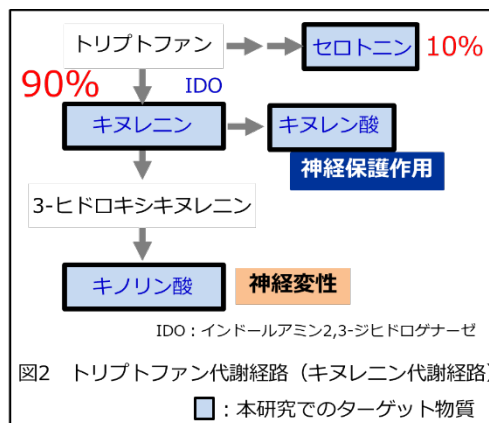


図2 トリプトファン代謝経路 (キヌレニン代謝経路)

そこで、本研究ではストレス脆弱性の関与因子としても知られている脳内トリプトファン経路であるセロトニン経路およびキヌレニン経路に着目し、「セロトニン-キヌレニンバランス破綻仮説」を基盤に病態解明を行うことを目的とした。本研究は抗がん剤投与による精神機能変化の病態解明、予測因子の発見のみならず、抗がん剤投与患者に対する最適な精神機能改善薬の創薬研究の基礎となるエビデンスを創出するものである。

2. 研究の目的

本研究では抗がん剤投与患者の健全な精神機能維持を実現するために抗がん剤投与による精神機能障害の病態に“ストレス脆弱性”への関与が考えられている 2 つのトリプトファン代謝経路 (セロトニン神経系、キヌレニン経路) を想定し、これらが病態増悪因子もしくは改善因子として成り得るのかを明らかにする (図 2 および 3 参照)。さらに、前述の精神疾患の病態像として知られている 5-HT_{2A} 受容体機能亢進に関して化学療法による影響を検討する。その病態解明により、抗がん剤誘発の精神機能障害の新たな治療法および予防法の確立を目標とした。

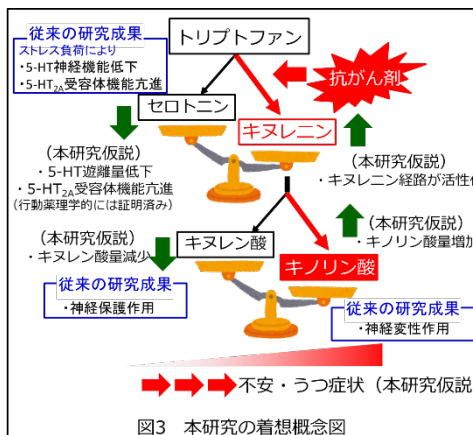


図3 本研究の着想概念図

3. 研究の方法

実験には Wistar 系雄性ラットを用いた。抗がん剤としてドキシソルビシン (5 mg/kg) およびシクロホスファミド (50 mg/kg) を 1 週間に 1 回腹腔内投与した。投与期間は 2 週間とした。

- 1) ドキシソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットを用いた脳内セロトニンおよびキヌレニン含量の変化

抗がん剤投与の 2、24、48、96 および 168 時間後に断頭し、脳を摘出後、左右背側海馬、

左右前頭葉皮質を分画し、過塩素酸 (0.1 N) 中で除タンパク、ホモジナイズを行った。その後、4° C、15,000×g、10分間遠心し、上清を0.45 μmのフィルターに通した後、-80° Cで凍結保存した。

1.1. キヌレニン量測定法

キヌレニン量の測定は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。カラムは InertSustain C18 3 μm (4.0 mm×150 mm) (ジーエルサイエンス)、プレカラムはガードカラム E 3 μm (4.0 mm×150 mm) (ジーエルサイエンス) をそれぞれ用い、カラムオープン温度は40° Cに設定した。内部標準物質は3-nitro-L-tyrosine (東京化成工業) を用いた。移動相は50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) とアセトニトリル (Sigma-Aldrich) を95:5の割合で、流速0.8 mL/minにて送液した。脳サンプルの注入量は100 μLとし、測定波長は360 nmに設定した。

1.2. 5-HT および 5-HIAA 量測定法

5-HT および 5-HIAA 量の測定は HPLC-ECD を用いて測定した。カラムは EICOMPAK SC-50DS Φ 3.0 mm×150 mm、プレカラムは PREPAK Φ4.0 mm×5.0 mm をそれぞれ用い、カラムオープン温度は25° Cに設定した。作用電極は WE-3G (ガスケット GS-25) を用い、印加電圧は+750 mV vs Ag/AgCl に設定した。脳サンプルの注入量は20 μLとした。

2) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットにおける脳内 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体機能の変化 (行動薬理学的手法での検討)

5-HT_{1A} 受容体作用薬である (±)-8-OH-DPAT (0.3 mg/kg) および 5-HT_{2A} 受容体作用薬 (±)-DOI (1 mg/kg) をそれぞれ行動観察の直前に皮下投与した。(±)-8-OH-DPAT を皮下投与し、投与直後より5分毎の flat body posture を観察しスコア化した。測定は30分間行った。スコアは0 (発現なし) から3 (最大) までとし、0.5刻みに7段階で評価した。(±)-DOI (1 mg/kg) を皮下投与し、投与直後より30分間の観察時間内に発現する wet-dog shake 行動回数を測定した。

3) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与による脳内 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体発現量の変化

抗がん剤最終投与の1週間後に断頭し、脳組織から背側海馬、前頭皮質を摘出し、測定まで-80° Cで凍結保存した。タンパク質の定量はLowry法を用いて測定し、5-HT_{1A}受容体および5-HT_{2A}受容体発現量はWestern blotting法を用いた。

4) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットによる不安症状に対する 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT 関連薬剤の影響

不安症状の測定は明暗探索試験を用いた。明暗試験には明室 (幅 30 cm × 奥行 30 cm × 高さ 30 cm) と暗室 (幅 30 cm × 奥行 30 cm × 高さ 30 cm) の間に、ラットが自由に行き来できる通り穴 (幅 10 cm × 高さ 10.5 cm) の開いた仕切り板のある明暗箱を用いた。ラットは穴と反対に向けて置き、明室での滞在時間および明室への侵入回数について10分間測定した。なお、ラットの四肢がすべて明室内に入った場合、明室へ侵入したものとみなした。5-HT_{1A}受容体作用薬としてタンドスピロンおよびミルタザピン、選択的セロトニン再取り込み阻害薬としてフルオキセチンを用いた。

5) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットを用いたフルオキセチン投与による脳内セロトニン遊離量増加に対する影響

実験には脳内微量透析法を用いた。ドキソルビシン (5 mg/kg) およびシクロホスファミド (50 mg/kg) を1週間に1回腹腔内投与し、投与期間は2週間とした。Fluoxetine (30 mg/kg) は抗がん剤最終投与の翌日に投与した。ガイドカニューレ埋め込み手術はpentobarbital sodium 麻酔下において、頭部をラット用脳定位固定装置に固定した。次に歯科用ドリルで頭蓋骨に直径1mmの小孔を開け、Paxinos and Watsonの脳図譜 (1997) に従い、ガイドカニューレの先端が背側海馬 (AP; anterior to bregma: -4.0 mm, ML; lateral to the midsagittal suture: 2.5 mm, DV; ventral to the skull surface: 2.5 mm) に来るように左側性に植え込んだ。挿入後、ガイドカニューレと頭蓋骨上に立てた1本の固定用ネジを一緒に歯科用セメント (ニッシン) で固定した。手術終了の翌日から脳内透析実験を行った。脳内微量透析法は非麻酔下のラットに対して行った。薬物投与180分前に透析プローブ (膜長: 2 mm, 直径: 0.22 mm, 長さ: 6 mm, EICOM, A-I-6-2) を、ガイドカニューレを通してラットの背側海馬に挿入し、マイクロインフュージョンポンプ (Carnegie Medicin, CMA/100) を用いてリンゲル液 (147 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂) を2.0 μL/minの流速で連続的に灌流した。灌流された透析液は60μLずつ30分毎に氷上にて収集し、測定まで-80° Cで保存した。灌流液は薬物投与前180分から薬物投与後 HPLC-ECD を用いて行った。

4. 研究成果

- 1) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド単回投与による海馬におけるキヌレニン、5-HT、5-HIAA およびトリプトファン量の経時的変化
ドキソルビシンおよびシクロホスファミド単回投与後のいずれの時間においても海馬におけ

るキヌレニン、5-HT、5-HT の代謝物である 5-ハイドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) およびトリプトファン量に有意な差は認められなかった。

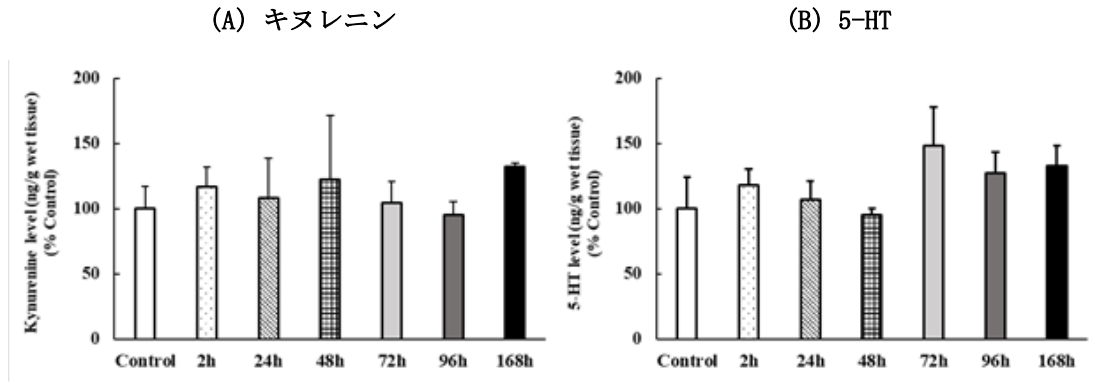


図 4 ドキソルビシンおよびシクロホスファミド単回投与による海馬におけるキヌレニンおよび 5-HT 量の経時的変化

さらに、ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与は 5-HT/トリプトファン比およびキヌレニン/トリプトファン比についても変化を認めなかった。

2) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットにおける脳内 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体を介した行動薬理的検討

ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与により (±)-8-OH-DPAT 誘発 flat body posture 行動は変化しなかった。一方、(±)-DOI 誘発 wet-dog shake 行動はドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与により有意に増加した (図 5)。

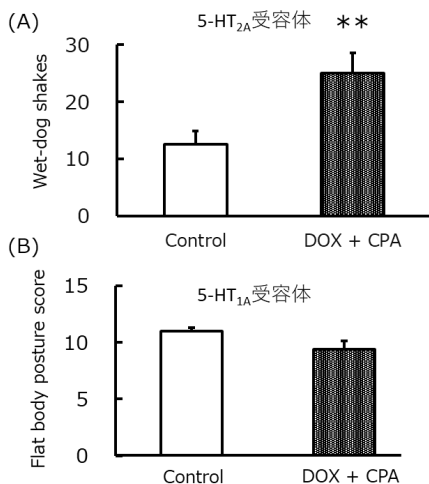


図 5 行動薬理的手法を用いたドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットにおける 5-HT_{2A} および 5-HT_{1A} 受容体を介した行動変化

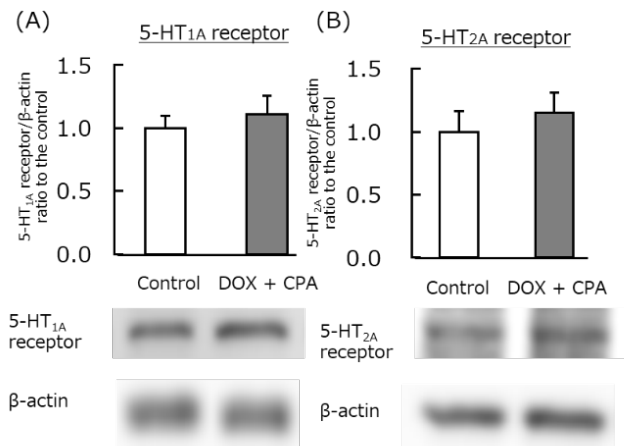


図 6 ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与による脳内 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体発現量の変化

3) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与による脳内 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体発現量の変化に関する検討

ラット海馬における 5-HT_{1A} 受容体発現量は、ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与による有意な変化は認められなかった (図 6)。

4) ラット前頭皮質における ERK1/2 シグナル伝達系に対する (±)-DOI およびドキソルビシンおよびシクロホスファミドの影響

(±)-DOI およびドキソルビシンおよびシクロホスファミド最終投与の 24 時間後における前頭皮質の p-ERK1/2 の発現量は有意に増加した (図 7)。

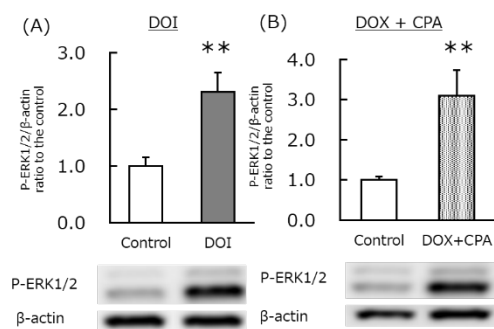


図 7 ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与による前頭葉皮質における p-ERK1/2 発現量の変化

5) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットによる不安症状に対する 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT 関連薬剤の影響

フルオキセチン群は対照群と比較して明室滞在時間の有意な増加が認められた。しかしながら、抗がん剤投与における明室滞在時間の低下に対して、フルオキセチンは抑制効果を示さなかった。一方、5-HT_{1A} 受容体作用薬であるタンドスピロンおよびミルタザピンは対照群と比較して明室滞在時間の有意な増加が認められた。また、抗がん剤投与における明室滞在時間の低下に対して、タンドスピロンおよびミルタザピンは抑制効果を示した (図 8)。

4) ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットを用いたフルオキセチン投与による脳内セロトニン遊離量増加に対する影響

ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与によって、背側海馬における 5-HT の基礎遊離量に有意な差は認められなかった。フルオキセチン (30 mg/kg) の投与 30 分後から 120 分後において、細胞外 5-HT 遊離量の有意な上昇が認められた。また、ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与群ではフルオキセチンの投与 30 分後においてのみ細胞外 5-HT 遊離量の有意な上昇が認められた (図 9)。

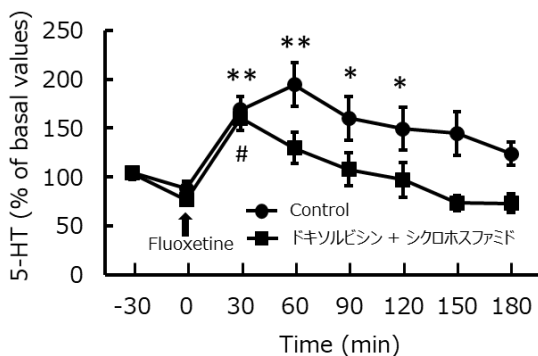


図9 ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与ラットを用いたフルオキセチン投与による海馬における5-HT遊離量の変化

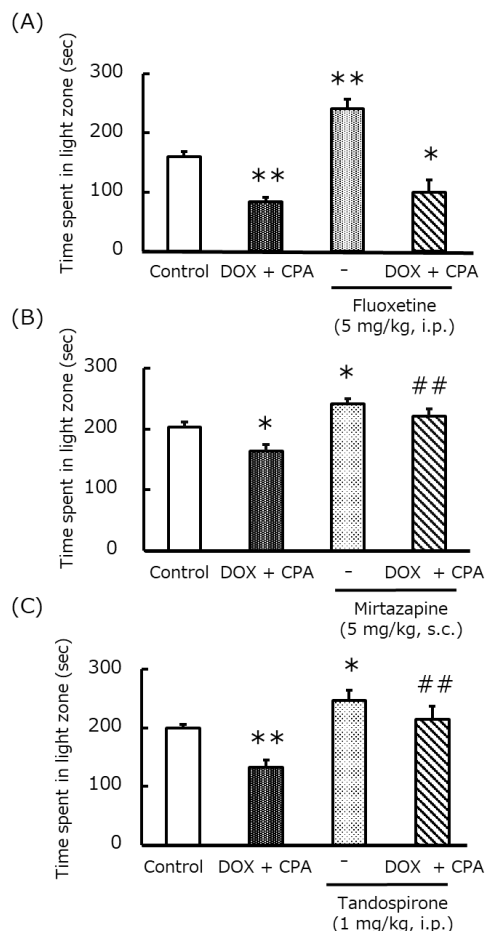


図8 ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与による不安症状に対するフルオキセチンおよび5-HT_{1A}受容体関連薬剤の影響

本研究では、抗がん剤誘発の精神機能障害の評価とその発症機序解明を目的とし、ラットを用いて乳がん標準療法として用いられるドキソルビシンおよびシクロホスファミドを投与し、抗がん剤投与モデル動物を作製した。本モデル動物を用いて精神機能に影響を与える因子の探索のため、トリプトファン₂の2つの代謝経路であるセロトニン系とキヌレニン系のそれぞれの生理活性物質の定量を行った。その結果、抗がん剤投与により何ら影響を受けなかった。しかしながら、抗がん剤投与により、不安症状および5-HT_{2A}受容体機能の亢進、さらに5-HT_{2A}受容体機能を介した ERK1/2 の活性化の亢進が認められたことより、抗がん剤投与により中枢神経系は5-HT_{2A}受容体機能亢進を背景に持つ“ストレス脆弱性”を獲得することを明らかにした。また、抗がん剤投与により誘発される不安症状は選択的5-HT再取り込み阻害薬であるフルオキセチン併用投与により改善されなかったが、5-HT_{1A}受容体作用薬であるタンドスピロンおよびミルタザピンの併用投与により改善された。この結果より、5-HTトランスポーターの発現量が低下しシナプス前神経終末からの5-HT遊離機構は低下することが考えられた。しかしながら、ドキソルビシンおよびシクロホスファミド投与によって、フルオキセチンの5-HT遊離促進作用の持続効果は短縮するものの、有意に細胞外5-HT遊離量を増加させることを明らかにした。このことから、ドキソルビシンおよびシクロホスファミドにより誘発される不安症状やその症状をフルオキセチンが改善しないことは、5-HT遊離機構が関与していない可能性が示唆された。つまり、ドキソルビシンおよびシクロホスファミドにより誘発される不安症状は5-HT_{2A}受容体を介した ERK1/2 の活性化の亢進が関与しており、そのため5-HT遊離を増加させる薬剤はこの5-HT_{2A}受容体をさらに活性化させるために抗不安効果は認められないことが考えられた。この抗がん剤による不安症状の改善には亢進している5-HT_{2A}受容体を遮断し、5-HT_{1A}受容体を刺激することが有効であることが示唆された。本研究の成果は、臨床において報告されるがん患者の精神症状発症防止のエビデンス構築、さらになん患者のQOL向上に貢献できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tabuchi H, Kitamura Y, Ushio S, Kan S, Wada Y, Sumiyoshi Y, Izushi Y, Miyazaki I, Asanuma M, Sendo T.	4. 巻 238
2. 論文標題 Influence of 5-HT2A receptor function on anxiety-like behavior induced by combination treatment with doxorubicin and cyclophosphamide in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Psychopharmacology	6. 最初と最後の頁 3607-3614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-021-05979-5	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 -

1. 著者名 Kitamura Y, Ushio S, Sumiyoshi Y, Wada Y, Miyazaki I, Asanuma M, Sendo T.	4. 巻 106
2. 論文標題 N-acetylcysteine attenuates the anxiety-like behavior and spatial cognition impairment induced by doxorubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmacology	6. 最初と最後の頁 286-293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512117.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshihisa Kitamura, Soichiro Ushio, Yudai Wada, Toshiaki Sendo
2. 発表標題 Involvement of 5-HT1A receptor in the anxiety-like behavior induced by doxorubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats.
3. 学会等名 2020 Forbidden City International Pharmacist Forum（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihisa Kitamura, Yuka Nakamura, Yusuke Sumiyoshi, Nanami Naito, Yudai Wada, Ikuko Miyazaki, Masato Asanuma, Toshiaki Sendo
2. 発表標題 Effects of serotonin1A receptor agonist on doxorubicin and cyclophosphamide-induced anxiety-like behavior in rats
3. 学会等名 Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	浅沼 幹人 (Asanuma Masato) (00273970)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

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
---------	---------