様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 ２４ 日現在

機関番号：３２６２０
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９２２６５
研究課題名（和文）悪性腫瘍細胞におけるサブスタンスＰ受容体の役割と麻酔薬の与える影響

研究課題名（英文）The Inhibitory Effects of Intravenous Anesthetics on Substance P Receptor in U373 MG Human Astrocytoma Cells.

研究代表者
山口　敬介（Yamaguchi, Keisuke）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：１０３３８４１０
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円、（間接経費）　　1,170,000円

研究成果の概要（和文）：外科手術は癌患者予後に貢献しているが、麻酔薬が腫瘍細胞に与える影響は未だ不明のことが多い。神経ペプチドサブスタンスＰ(以下SP)は様々な病態と関与し、手術侵襲により誘発される炎症や疼痛などにも深く関連している。ヒト星状膠腫細胞U373MG 細胞株を用いた実験系において、SPが腫瘍細胞に及ぼす影響と、麻酔薬ケタミンが炎症に与える影響について検討した結果、SP刺激による転写因子NFkBやMAPK(ERK1/2, P38, JNK)リン酸化およびサイトカイン(IL-6, 8)産生がケタミンにより抑制された。SPを介したケタミンの抗炎症作用の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The neuropeptide substance P (SP) is an important mediator of neurogenic inflammation within the central and peripheral nervous system. We investigated the effects of ketamine on NF-B phosphorylation, as well as the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the human astrocytoma cell line U373 MG cells which express high levels of SPR. The level of phosphorylated NF-kB and MAPK (ERK1/2, P-38, and JNK) were detected by western blotting. SP increased the phosphorylation of NF-kB and MAPKs and production of IL-6 and 8. Ketamine attenuated the phosphorylation of NF-kB p65 and MAPKs in U373 MG cells. Production of IL-6 and 8 were suppressed by ketamine. The inhibitory effects of ketamine on SP-induced cytokine production may be mediated by suppressing MAPKs via NF-kB activation. This finding suggests that the inhibition of SPR function by these compounds may be important in the analgesic effects of ketamine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：サブスタンスＰ　ケタミン　MAPK　抗炎症作用　サイトカイン

１．研究開始当初の背景

癌患者に対する外科手術は患者予後に貢献している一方で、腫瘍の転移・再発を促進させる因子であると報告されている。臨床使用されているプロポフォールの抗癌作用が報告されているが、その他の麻酔薬が腫瘍細胞に与える影響については不明なことも多い。一方、サブスタンスP(以下SP)は様々な病態と深く関与する神経ペプチドであることが知られており、特に手術侵襲により誘発される炎症や疼痛などにも関連している他、癌再発促進に関わる免疫抑制や腫瘍血管新生に対しても影響している事が報告されている。

我々の研究グループはこれまで、主にSP受容体(以下SPR)の機能解析に従事し、過去の研究において、SPはSPRに結合し、数種類のG蛋白質(Gq, Gs, Go, G12, G13)と共役することや、アゴニスト存在下でG蛋白受容体酵素（GRK2, 3, 5）により受容体がリン酸化されることを示した(Warabi, Yamaguchi et al; FEBS letters 2002）。また、ヒト星状膠腫細胞を用いた実験系において、SPRを介した細胞内情報伝達経路の一部を解明し、その際、チロシンキナーゼ Src やPKCδが情報伝達経路の過程で重要な役割を担っている可能性を示した。

その結果、SPRを介したMAPキナーゼの活性化により炎症性サイトカインが産生されることからも，悪性腫瘍細胞に対してSPが炎症機構や細胞増殖、免疫機構に強く関与していることが示唆されたが、外科手術時の麻酔薬やオピオイドの影響は不明である。

２．研究の目的

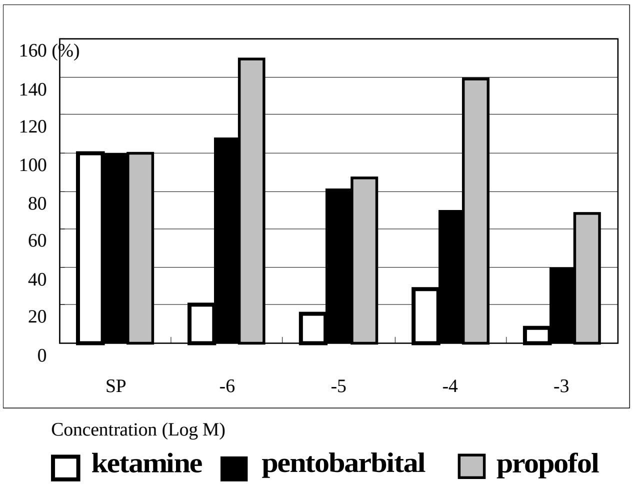
本研究は悪性腫瘍細胞に対する SP の作用と、細胞内情報伝達に対する麻酔薬およびオピオイドの影響を検討し、それに引き続く細胞増殖、免疫応答および炎症反応に対する影響を解析することを目的とした。癌外科手術への影響を分子レベルで検討することにより、将来的には癌外科手術における腫瘍の転移・再発に対する安全な麻酔法の確立を目標とした。

計画を進めていくうえで、同実験系で次のような予備的研究結果を得ている。

① NMDA(N-methyl-D-aspartic-acid) 受容体拮抗薬であるケタミンによって細胞内情報伝達経路の一部のERKリン酸化が容量依存性に抑制されたこと。
② その結果、IL-8産生が低下すること。
③ プロポフォールには同様の効果がないこと。

などを示し、ケタミンが抗炎症効果を発揮することでストレス反応を抑制し，鎮痛作用を誘導する可能性を示した(Yamaguchi et al. American Society of Anesthesiologist 58th Annual Meeting, Atlanta USA, 2005 下図)

静脈麻酔薬によるSP 刺激のERK1/2 リン酸化抑制効果



３．研究の方法

本研究計画では、SP の悪性腫瘍細胞に及ぼす影響とそれに対する麻酔薬、オピオイドの影響を解明するために、以下の研究項目を予定した。

①SPのU373MG細胞への作用と細胞内伝達系を解析する。

②血管新生に対する SP の作用と麻酔薬、オピオイドの影響を解析する。

③アポトーシスへの麻酔薬、オピオイドの影響を解析する。

④炎症性サイトカイン産生のメカニズムと麻酔薬、オピオイドの影響を解析する。

このように、SP の悪性腫瘍細胞の細胞内情報伝達系への影響を in vitro で検討し、さらには麻酔薬やオピオイドがどのように作用するかを分子生化学的に検討し、悪性腫瘍細胞の転移・再発のメカニズムの解明への足がかりとすることを目的とした。

1．SPR を介する細胞内情報伝達経路と静脈麻酔薬の影響についての検討

U373MG 細胞を用い、SP が MAP キナーゼ、特に ERK1/2 や P38 を活性化させることをウエスタンブロット法により測定した。静脈麻酔薬（ケタミン、プロポフォール、ペントバルビタール、ミダゾラム）の影響をウエスタンブロット法で見ることにより、SP を介した細胞内情報伝達経路について解明した。

2．静脈麻酔薬の炎症性サイトカイン産生抑制効果についての検討

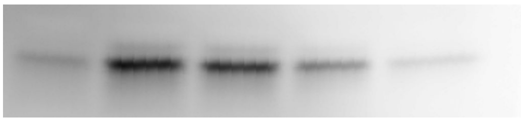
U373MG 細胞株を用いて、SP 刺激によって惹起される炎症性サイトカイン(IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α)の mRNA の発現・産生を RT-PCR 法で、タンパク質レベルを ELISA 法で定量した。さらに静脈麻酔薬（ケタミン、プロポフォール、ペントバルビタール、ミダゾラム）による発現への影響を検討した。

４．研究成果

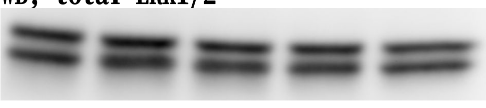
1．SPR を介する細胞内情報伝達経路と静脈麻酔薬の影響についての検討

1-1, SP 受容体を介した ERK1/2 のリン酸化に対するケタミンの影響

WB; p-ERK1/2



WB; total ERK1/2



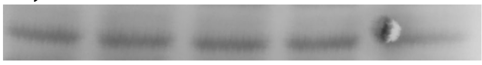
SP(nM)	0	100	100	100	100
Ket(μM)	0	0	10	100	1000

U373 細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、ケタミンを添加した。添加 60 分後、SP(100nM)により刺激し、10 分後反応を停止した。RIPA バッファーで細胞回収後、ウエスタンブロットを行った。その結果、ERK1/2 は SP によりリン酸化され、そのリン酸化は、ケタミン濃度依存性に抑制された。

1-2, SP 受容体を介した P38 のリン酸化に対するケタミンの影響

WB; p-P38

WB; total P38



SP(nM)	0	100	100	100	100
Ket(μM)	0	0	10	100	1000

U373 細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、ケタミンを添加した。添加 60 分後、SP(100nM)により刺激し、10 分後反応を停止した。RIPA バッファーで細胞回収後、ウエスタンブロットを行った。その結果、SP により P-38 はリン酸化され、そのリン酸化はケタミン濃度依存性に抑制された。

1-3, SP 受容体を介した JNK のリン酸化に対するケタミンの影響

WB; p-JNK

SP(nM)	0	100	100	100	100
Ket(μM)	0	0	10	100	1000

U373 細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、ケタミンを添加した。添加 60 分後、SP(100nM)により刺激し、10 分後反応を停止した。RIPA バッファーで細胞回収後、ウエスタンブロットを行った。その結果、SP により JNK はリン酸化され、そのリン酸化はケタミン濃度依存性に抑制された。

1-4, SP 受容体を介した NF-κB のリン酸化に対するケタミンの影響

WB; p- NF-κB

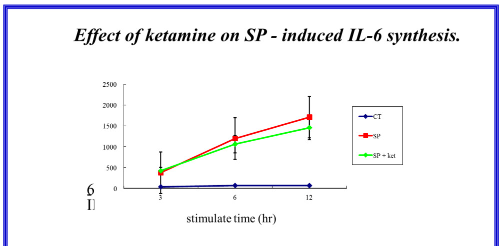
SP(nM)	0	100	100	100	100
Ket(μM)	0	0	10	100	1000

U373 細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、ケタミンを添加した。添加 60 分後、SP(100nM)により刺激し、10 分後反応を停止した。RIPA

バッファーで細胞回収後、ウエスタンブロットを行った。その結果、SP により NF-κB はリン酸化され、ケタミン濃度依存性に抑制された。

2．静脈麻酔薬の炎症性サイトカイン産生抑制効果についての検討

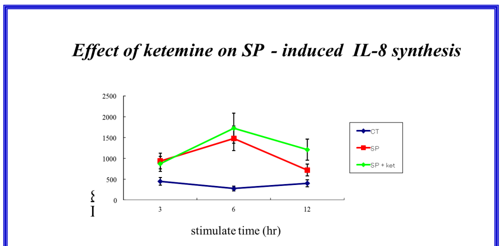
2-1，SP 受容体を介した Interleukin-6 産生に対するケタミンの影響



Serum-starved U373 MG cells were pretreated for 30 min at 37°C with ketamine (100 μM). The cells were then stimulated with 10 nM SP. After 3, 6, and 12 h, supernatant were harvested and analyzed for IL-6 secretion using a specific immunoassay. Data are given as mean ± SD from three experiments

U373 細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、ケタミンを添加した。添加 60 分後、SP(100nM)により刺激し、3，6，12 時間後に培養液を回収し、ELISA 法で培養液上清中の IL-6 を測定した。その結果、SP により培養液上清中の IL-6 産生が経時的に増加したが、ケタミン添加により IL-6 の産生は抑制された。

2-2，SP 受容体を介した Interleukin-8 産生に対するケタミンの影響



Serum-starved U373 MG cells were pretreated for 30 min at 37°C with ketamine (100μM). The cells were then stimulated with 10 nM SP. After 3, 6 and 12 h, supernatant were harvested and analyzed for IL-8 secretion using a specific immunoassay. Data are given as mean ± SD from three experiments.

U373 細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、ケタミンを添加した。添加 60 分後、SP(100nM)により刺激し、3，6，12 時間後に培養液を回収し、ELISA 法で培養液上清中の IL-8 を測定した。その結果、SP により培養液上清中の IL-6 産生が経時的に増加したが、ケタミン添加により IL-8 の産生は抑制された。

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 8 件）

1. Effects of nitrous oxide on the production of cytokines and chemokines by the airway epithelium during anesthesia with sevoflurane and propofol. Kumakura S, Yamaguchi K, Nagaoka I et al. Mol Med Rep. 8: 1643-8 2013
2. Usefulness of Stroke Volume Index Obtained with the FloTrac/Vigileo System for the Prediction of Acute Kidney Injury After Radical Esophagectomy. Sugasawa Y, Yamaguchi K et al. Ann Surg Oncol. 20: 3992-8 2013.
3. Additive effect of sirolimus and anti-death receptor 5 agonistic antibody against hepatocellular carcinoma. Kawahara T, Toso C, Yamaguchi K et al. Liver Int. 33:1441-8 2013
4. Sevoflurane Suppresses TNF-α-Induced Inflammatory Responses in Pulmonary Epithelial Cells under Conditions of Anoxia/ Reoxygenation. Watanabe K, Iwabuchi K, Matsukawa T, Yokoyama Y, Yamaguchi K. Br J Anaesth 110:637-45 2013
5. Effects of sevoflurane and propofol on pulmonary inflammatory responses during lung resection. Sugasawa Y, Yamaguchi K, Kumakura S, Murakami T, Suzuki K, Nagaoka I, J Anesth. 2012 26:62-9.
6. Modulation of neutrophil apoptosis by antimicrobial peptides. Nagaoka I, Suzuki K, Niyonsaba F, Tamura H, Hirata M. ISRN Microbiol. 27;2012
7. Effects of sivelestat on bronchial inflammatory responses after esophagectomy. Yamaguchi K, Nagaoka I, et al. Int J Mol Med. 28:187-92. 2011
8. The effect of one-lung ventilation upon pulmonary inflammatoryresponses during lung resection. Sugasawa Y, Yamaguchi

K, , Nagaoka I et al.. J Anesth. 25:170-7. 2011

〔学会発表〕（計 2 件）

1. The inhibitory effects of ketamine on substance P receptor in U373 MG human astrocytoma cells. Yamaguchi K, 2012 IARS annual meeting; Boston, Massachusetts 2012
2. Effects of Sevoflurane on Gene Expression in Pulmonary Epithelial Cells During Anoxia/Reoxygenation. Watanabe K, Iwahara C, Nakayama H, Iwabuchi K, Yamaguchi K, Kamiyama Y, Inada E 106th ASA annual meeting 2011, Chicago

６．研究組織

(1)研究代表者

山口敬介（YAMAGUCHI, Keisuke）
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：10338410

(2)研究分担者

長岡功 （NAGAOKA, Isao）
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号： 60164399