

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700756

研究課題名(和文) 精神的ストレス応答システムHPA経路に基づくがん発症・進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Involvement of the HPA axis in the relationship between the psychological stress and cancer development.

研究代表者

渡邊 映理(Watanabe, Eri)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20433253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：がんは日本における死因の第1位を占める疾患である。精神的ストレスががん発症、進展の一因であることは広く知られているが、その分子メカニズムについては、これまでほとんど解明されていなかった。そこで本研究では、精神的ストレスに関連するHPA系とがん進展のメカニズムの関連を検討した。その結果、精神的ストレスを受けると分泌が増加するコルチゾールが、濃度依存的に、ヒトの胃、大腸、子宮、乳腺、肺などの腫瘍細胞の増殖を促進すること、また低酸素などの環境も腫瘍増殖に影響することが確認された。したがって、精神的ストレスとがんの発症、進展を結びつける因子として、HPA系が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancers are the leading cause of death in Japan. It is widely considered that psychological stress is one of the important factors that affect carcinogenesis, but the molecular mechanisms underlying the causal relationship remain poorly understood. In this study, we examined whether the HPA axis is that plays important roles in psychological stress may have impact on tumor cell growth. As results, cortisol, the serum level of which is elevated upon psychological stress, significantly promoted the growth of tumor cells including human stomach, colon, uterus, mammary, and lung cancers, while environmental conditions such as hypoxia also affected the growth rates of the tumors. The present study suggests that the psychological stress may cause cancer development and progression through the HPA pathway.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学 2403

キーワード：HPA経路 精神的ストレス がん発症・進展 糖質コルチコイド がん発症遺伝子 GCR 腫瘍細胞
フィードバック機能

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで生活習慣病と精神的ストレスとの関連について研究を行ってきたが、特に近年は日本人の死因の1位(30.4%、2006年WHO)であるがんについて調査を進め、がん患者の心理状態を改善するプログラムで、免疫能やストレスホルモンの変化を調査した。また、糖質コルチコイドであるコルチゾールは、今まで急性ストレスにより短時間で上昇することは知られていたが、慢性ストレスとの関連は不明瞭であった。申請者は、横断研究により20代の成人健康女性85名で、コルチゾールレベルのベースラインが高いほど、日常的な精神的ストレスレベルが高く(p=0.028)、自覚的な健康状態が悪い(p=0.010)ことを突き止め、急性ストレスだけでなく、健康成人での慢性ストレスと健康状態、通常での糖質コルチコイドレベルに関連がある可能性を示唆した。臨床的、疫学的研究では30年前からうつや慢性ストレスが、がん発症・進行の重要なリスクファクターであり(Moreno-Smith M et al. Future Oncol. 2010) またアドレナリン投与によるストレス反応がDNAを損傷するという示唆が最近なされたばかりであるが(Hara MR et al. Nature. 2011) その分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。精神的ストレスに対する生体反応として、ストレス刺激が視床下部に伝わると、防衛反応として血糖値を維持する目的で、下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモンが分泌され、副腎皮質を介してコルチゾール等の糖質コルチコイドが分泌される、HPA(hypothalamic-pituitary-adrenal axis)経路がはたらくことは、従来からよく知られている。HPA(hypothalamic-pituitary-adrenal axis)経路は精神的ストレスに関わる最も重要な経路であり、がんの発症・進展にも関与すると考えられている。しかしながら、その分子生物学的メカニズムは殆ど明らかになっていない。

本研究では、HPA系とがん進展のメカニズムの関連を探ることを目標とする。

このメカニズムが解明されれば、現在まで

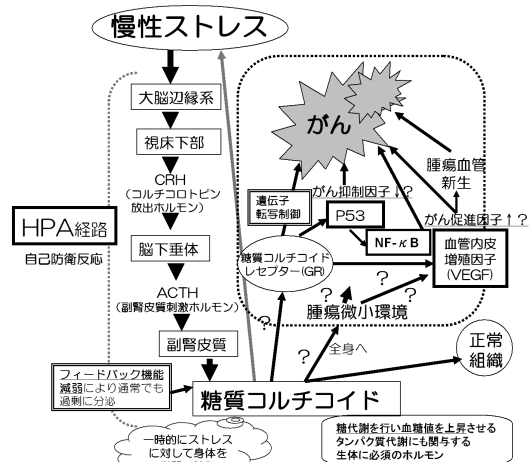


図2. 精神的ストレス、HPA系とがん発症のメカニズム

に蓄積された精神的ストレスとがん進展に関する疫学的・臨床的証拠を、遺伝子レベルで理解できるとともに、精神的ストレス解除に関する行動療法や HPA 経路に関する薬理的療法の開発に繋がり、さらに広く化学的、免疫学的療法の開発にも役立つと期待される。

HPA 経路には糖質コルチコイドレセプターを介したフィードバック機能が備わっており、健康な状態ではストレス刺激に対する HPA 経路の反応が過剰にならないようになっている。健康成人に CRH を投与しても ACTH、コルチゾール分泌反応は起こらない。しかしながら、うつ病患者ではコルチゾール濃度が増加し、HPA 経路のフィードバック機能が低下していることが確認されている(福田正人ら、臨床精神医学 2005)。申請者が調査した健康成人集団でも、慢性ストレスが強い者ほどこの HPA 経路のフィードバック機能低下が起こり、通常の状態でもコルチゾールレベルが高くなっていることが考えられる。

糖質コルチコイドは細胞内で細胞質にある糖質コルチコイドレセプター(GCR)と結合し、種々の遺伝子の転写制御を行っている。GCR は通常は非活性な状態であるが、糖質コルチコイド(GC)が結合すると、結合していた熱ショックプロテインが乖離して活性化し、核内に移行する。GC-GCR 複合体は転写因子として、標的とする遺伝子の転写制御領域に結合し、転写を促進あるいは抑制することでその遺伝子産物の発現を調節し、生体にいろいろな作用を引き起こす。HPA 経路のフィードバック機能低下により高コルチゾール値が持続すれば、細胞質に存在する GCR が活性化し続け、細胞内情報伝達系や、核内転写制御に影響する。その結果、様々な遺伝子発現に影響を引き起こすと予測される。2011 年には、がん抑制タンパク p53 が GCR によって抑制されている、という報告もなされている(Murphy SH et al, PNAS 2011)。精神的ストレス HPA 経路 GC GCR ががん進展・抑制因子 細胞がん化のメカニズムは現在非常に注目され、部分的に研究が進んでいるが、まだ未解明である部分も多く、HPA 経路が、がん発症・進行に関与する分子生物学的メカニズムの解明には到っていない。

2. 研究の目的

精神的ストレスと HPA 経路、がん進展の分子メカニズムが解明されれば、現在までに蓄積された精神的ストレスとがん進展に関する疫学的・臨床的証拠を、遺伝子レベルで理解できるとともに、臨床的にがんの予防的措置やがん患者への治療に、その結果を役立てることができる。がん患者の急増により、がんの予防、治療に関する研究が急がれている。しかし、これまでのがんの分子生物学的研究は細胞、組織レベルの研究が主体であり、

生体全体に関わるメカニズムと、がんを規定する遺伝子発現の関連についてはあまり焦点が当てられてこなかった。

一方、精神的ストレスに関する、がんの臨床・疫学的研究は以前から多く行われてきているが、ストレスホルモンが腫瘍微小環境の中で腫瘍やがん細胞にどのような影響を与えているのかということを理解するための証拠や、がん進展における環境因子の役割に関する証拠が不足している。本研究は学際的な視点から、がんという疾患自体を解明するという、極めて独創的な研究である。HPA系とがん進展のメカニズムの関連が遺伝子、タンパク、個体レベルで解明できれば、直接、精神的ストレス解除に関する行動療法やHPA経路に関する薬理的療法の開発につながると考えられる。また、GCのようなストレス伝達物質はガン腫瘍の進展に影響しているばかりでなく、多くの生体経路に関与していると考えられる。そのため、例えばHPA系のような経路との関連を新たに特定することは、広く薬物療法、免疫学的療法の開発にも役立つと期待される。

3. 研究の方法

〔1〕腫瘍細胞増殖とグルココルチコイド濃度

まず、腫瘍細胞(マウス、ヒト)にグルココルチコイドを添加しある濃度で増殖することを確認する実験を行った。腫瘍細胞にグルココルチコイドを添加し、GR SGK1(グルココルチコイド誘導タンパクキナーゼ) HIF1 VEGF (p53との関連) への影響 解糖系因子(乳酸脱水素酵素 LDH, GAPDH) への影響 腫瘍細胞増殖(酸素・グルコース・温度等の環境によりさらに亢進)に影響があるかどうかということについて確認することにした。

〔2〕腫瘍増殖と微小環境

腫瘍増殖促進に慢性ストレスが関係していると考えられ、がんに関わる因子の発現が変化している可能性がある。がん増殖は、解糖に依存しているという特性があり、慢性ストレスによる細胞内の微小環境の変化により、さらに促進されるのではないかと想定される。

そのため、ヒト腫瘍細胞(一般的な肺がん、大腸がん、胃がんなど)のホルチゾールでもっとも増殖する濃度を探し、PCR、ウェスタンブロッティング法で、ガン関連因子 p53、HIF1、VEGF、MDM2、解糖との関連因子(乳酸脱水素酵素 LDH、解糖系酵素グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ GAPDH)を、ホルチゾール無添加、最も増殖したときの濃度での添加で比較した。グルココルチコイドによる増殖速度の変化には

解糖系が関与しているのではないかと推定され、(腫瘍細胞は、ATP産生を解糖に依存しており、酸素があっても解糖を行ない、正常細胞の40倍の乳酸を産生する)グルココルチコイドによって、増殖が行われているかの鍵はグルココルチコイドレセプター(GR)と推定されるため、グルココルチコイドのシグナルを抑制した場合、増殖、各因子は変化するかということを確認した。低酸素下、高グルコース下、低温度下でさらに増殖、さらに因子が変化しているかどうかを確認した。(実験1)

マウス腫瘍細胞(マウス肺がん LL2, マウス結腸癌 MC38)を使用したホルチゾール、およびデキサメタゾンによる増殖試験

まず、マウス腫瘍細胞(マウス肺がん LL2, マウス結腸癌 MC38)を使用し、実験を行った。糖質ホルチコイド(GC)によって、糖質ホルチコイドレセプター(GCR)が活性化し、がん細胞・腫瘍増殖が起こるかどうか調べるために、まず細胞増殖試験を行った。LL2, MC38にDOSEを変えたホルチゾール、および合成糖質ホルチコイドであるデキサメタゾンを添加し、24, 48, 72, 96hで増殖させた。(実験2)

一般的ながんである肺がん、大腸がん、胃がんなど、ヒト腫瘍細胞で増殖試験を行った。具体的には、以下の表の細胞で検討を行った。

cell line	origin	形態
H9	リンパ系	Lym.
CEM	ヒト急性リンパ芽球性白血病・Tリンパ球様	Lym.
Caki-1	腎癌	Epith.
HCT116 p21+/+	ヒト結腸腺癌	Epith.
HeLa	ヒト子宮頸部癌	Epith.
MCF-7	ヒト乳癌	Epith.
T47D	ヒト乳癌	Epith.
MKN28	胃がん	Epith.
MKN45	胃がん	Epith.
DLD-1	ヒト結腸腺癌	Epith.
HCT-15	ヒト結腸腺癌	Epith.
A549	肺がん	Epith.
PC14	肺由来低分化型腺がん	Epith.
RERF-LC-Ad1	肺がん	Epith.

さらに、コルチゾールを添加した細胞について、細胞の微小環境の変化により増殖能に影響するのどうか実験を行った。微小環境については糖、酸素濃度の違いによる増殖能の変化について検討した。

(1) 培地にブドウ糖を添加した場合について、さらに増殖率が上がるかどうか濃度を変えて検討した。(2) 酸素5%、1%の低酸素の環境下で、通常酸素濃度と比較して細胞の増殖能に影響するのどうか検討した。

4. 研究成果

マウスの腫瘍細胞 LL2、MC38 を 24 時間コルチゾール添加培地で培養すると、いずれもコルチゾール濃度が $5 \times 10^{-5} \mu\text{g/ml}$ のときに、通常培地と比較して最大 1.3 倍の増殖率を得た(LL2: $p < 0.001$, MC38: $p < 0.001$)。デキサメタゾン添加、48h、72h 後も同様の結果になった。なお、これ以上の濃度では逆に増殖が抑制され、腫瘍細胞増殖に適した糖質コルチコイド濃度が存在するという結果が示された。

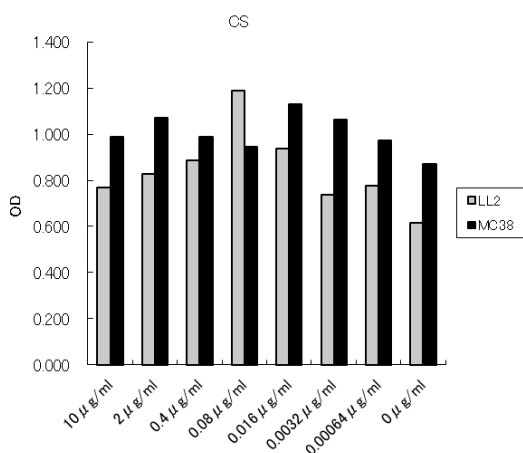


図1：コルチゾールを5倍段階希釈で添加した際の24hでのマウス腫瘍細胞増殖率 (n=12)

さらに、様々なヒト腫瘍細胞にコルチゾール添加試験を行うと浮遊細胞も接着細胞もすべてマウス腫瘍細胞と同様の傾向が見られ、高濃度では増殖が抑制されたが、低濃度で増殖した。ピークや増殖率はヒト腫瘍細胞の種類によって異なっていたが、 $10^{-4} \mu\text{g/ml} \sim 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ の範囲のコルチゾール濃度で細胞の増殖が見られた。24時間培養した結果、例えば、HeLa細胞やH9細胞は比較的コルチゾール添加に対しての増殖率が良く、DLD1はピークが見られなかった。しかし、72時間培養するとDLD1でもピークが観察されるようになった。

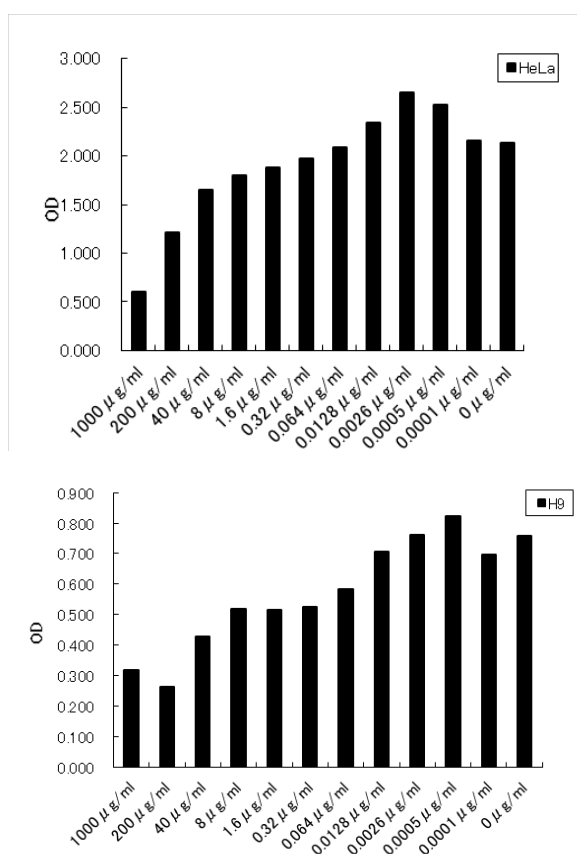


図2：コルチゾールを5倍段階希釈で添加した際の24hでのヒト腫瘍細胞増殖率 (n=12)

培地にコルチゾールを添加し、さらにブドウ糖を添加した場合は予想に反して細胞増殖が抑制され、ブドウ糖が低濃度の条件下では差がなかった。5%、1%の低酸素環境下で細胞を増殖させた時は腫瘍細胞により増殖傾向が見られた。これらのコルチゾールの増殖効果および低酸素の環境と、GCR・GCとの関係、がん関連遺伝子との関係は現在RT-PCR法などを用いて、現在解析中である。この結果をもとに、腫瘍細胞の増殖とHPA経路との関係をより明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. 90分間のVDT (Visual Display Terminals)作業が健常男性の唾液中コルチゾールおよび気分、作業効率に及ぼす影響. 渡邊映理, ケニー・クフタ, 亀井勉, 松田修. 日本生理人類学会雑誌. 18(3), 105-113 (2013.08)

〔学会発表〕(計2件)

1. A randomized cross-over human trial on the mood enhancing effects of bergamot (Citrus bergamia (Risso) Wright & Arn.) volatile oil vapor with regards to personality and lifestyle related changes in salivary cortisol levels. Eri Watanabe,

Kenny Kuchta, Hans Wilhelm Rauwald,
Tsutomu Kamei, Jiro Imanishi.
Gesellschaft Deutscher Chemiker. Leipzig,
GERMANY 2013.9.11-13

2. Mood enhancement by bergamot (Citrus
bergamia (Risso) Wright & Arn.)
volatile oil vapor with regards to
personality and lifestyle related changes in
salivary cortisol levels. Eri Watanabe,
Kenny Kuchta, Hans Wilhelm Rauwald,
Tsutomu Kamei, Jiro Imanishi. 61st
International Congress GA 2013 Münster,
GERMANY 2013. 9.1-5

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊映理 (ERI WATANABE)

研究者番号：20433253

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし