

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15417

研究課題名(和文)病は気からを科学する - 交感神経と転移

研究課題名(英文)Role of the sympathetic nervous system in metastasis

研究代表者

家口 勝昭 (Ieguchi, Katsuaki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90586348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではストレス受容器である交感神経に着目し、転移における交感神経の機能解析を行った。交感神経は原発巣において血管新生に関与し、がん細胞の増殖に寄与していること、また、転移巣においては転移前微小環境形成に関与していることが示唆された。さらに、交感神経は免疫担当細胞と直接相互作用していること、また交感神経受容体アゴニストが骨髄由来免疫抑制細胞に作用し炎症サイトカイン群の発現を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The researcher investigated the functional relationship between the sympathetic nervous system and metastasis. The researcher found that the sympathetic nervous system partially contributed to angiogenesis, cell proliferation, and establishment of pre-metastatic niche in lungs. Moreover, tyrosine hydroxylase-positive neurons physically interacted with immunocompetent cells, and beta adrenergic agonists induced gene expression of inflammatory cytokines.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：交感神経 転移 炎症性サイトカイン 転移前微小環境

1. 研究開始当初の背景

がんは血管、リンパ管、免疫細胞、神経などが混在した組織である。がん組織内における血管、リンパ管、免疫細胞の機能は明らかとなってきたが神経の機能は不明な点が多い。臨床サンプルの解析により、前立腺がん、肝がん、胃がんなどで交感神経活動が確認されていることから、がんは神経に支配された機能的組織として捉えることができる。また、他の研究グループが慢性的なストレス（交感神経の活性化）はがんの増殖や転移を促進することを報告している。これらの実験結果より、がん組織における交感神経支配の存在とがんの増殖・転移への関与が明らかとなり、がん組織内における交感神経活動を無視することができず、その機能解析と交感神経を標的とした治療戦略が重要となる。しかしながら、これまでにがんを神経に支配された組織として捉え、その機能解析を行いがんの増殖・転移における交感神経の分子機構を明らかにした研究は存在しない。これまでに行われてきたがんの研究では神経細胞由来のがんを除いて神経の生物学またはがん組織に存在する神経活動をまったく無視した研究が行われてきた。腫瘍組織内の交感神経の有無に着目した疫学的研究は行われており、神経の有無で予後や悪性度に顕著な差がありながらその分子機構の解明はなされていない。さらに、腫瘍組織内に存在する神経束が転移する細胞の通り道となっていることが報告されている。このように腫瘍組織に神経が存在するにも関わらず腫瘍組織内での神経活動に着目した研究はなされてこなかった。その理由としてがん発症の根幹は遺伝子変異の蓄積によるもの、また、がん増殖の本体は各種成長因子群シグナル、血管新生因子群シグナル、免疫担当細胞等によるものであると考えられているからと推測される。成長因子、血管新生因子、免疫担当細胞はがんの発生・増殖に非常に重要な因子群であることには間違いないが、交感神経が存在する限りその機能を無視することはできない。

2. 研究の目的

“病は気から”と言われるようにストレス受容器である交感神経と疾患は密接な機能的関連を有している。例えば、交感神経の有無が前立腺がんの進行・再発に関与すること、また、交感神経の活性化ががんの増殖や転移を促進することが報告されているがいずれも分子機構は不明であり現象論の域を出ない。本研究は日本人の死因の第一位であるがんと交感神経活動に着目し、がんと交感神経活動の機能的関連を明らかにしがん患者の予後改善を目指すとともに、“病は気から”を科学的に証明することにより、がんの治療時における心のケアの重要性を明らかにし、がん患者の QOL (生活の質) の向上を目指す

す。さらに、既存の高血圧症治療薬（交感神経β受容体遮断薬）が転移を抑制するかどうか明らかにする。実際に臨床の現場で血管腫のようながんの一部で交感神経β受容体遮断薬（βブロッカー）が使用されている。しかし、それは交感神経活動を標的としたものではなく、がん細胞に発現するアドレナリンβ受容体の機能阻害を目的とした治療で、交換神経活動を考慮した治療ではない。本研究では実体のない目に見えない精神的ストレスのがんの増殖・転移への関与を科学的に証明し、具現化することでがん治療における交感神経支配の重要性を示し、がん患者の QOL の向上およびがん治療への臨床応用に貢献することが最終的な目的となる。

3. 研究の方法

神経毒 6-OHDA をマウスに投与し可逆的に交感神経を消失させたマウスの皮下に高転移性がん細胞株 3LL を移植し、これを交感神経除去転移モデルマウスとして、以下の解析に用いた。

原発巣の解析は凍結切片を作成し、血管内皮細胞マーカーである抗 MECA-32 抗体、ペリサイトマーカーである抗α-SMA 抗体を用いて免疫蛍光染色法により、染色し共焦点顕微鏡で観察した。それぞれの蛍光強度を ZEN2011 Image Browser で計測し数値化し、血管新生および腫瘍血管のペリサイトによる被覆率を検討した。

臨床応用に向けて既存の交感神経β受容体遮断薬が転移抑制に対して効果があるかどうか検討するために交感神経除去転移モデルマウスに交感神経β受容体遮断薬を投与し、転移に対する効果を転移臓器である肺の転移巣を蛍光実体顕微鏡で観察した。

次に転移前肺の微小環境形成における検討は交感神経除去転移モデルマウスの肺から total RNA を精製し、cDNA を合成し、定量 PCR により、炎症性サイトカイン群の発現レベルを解析した。炎症性サイトカイン群発現細胞群の特定は肺凍結切片を作成し、マクロファージマーカーなどを用いた染色および共焦点顕微鏡による観察で同定した。In vitro における精神的ストレスが誘起する炎症性サイトカイン群の発現解析はマウス単球・マクロファージ様細胞株およびアドレナリンβ受容体特異的アゴニストおよびアンタゴニストを用いて定量 PCR により検討した。また、骨髄から肺への免疫抑制細胞の動員についての検討は交感神経除去転移モデルマウスから肺を単離し、酵素処理により単一細胞化し、抗 Ly-6C 抗体、抗 Ly-6G 抗体、抗 CD11b 抗体の 3 重染色によりフローサイトメーターで検討した。

4. 研究成果

交感神経除去転移モデルマウスの原発巣

における血管新生およびペリサイト被覆率を検討したところ、コントロール群と比較して交感神経除去群で血管新生が顕著に低下し（図1）、また、腫瘍血管内のペリサイト被覆率の上昇が観察された（図2）。

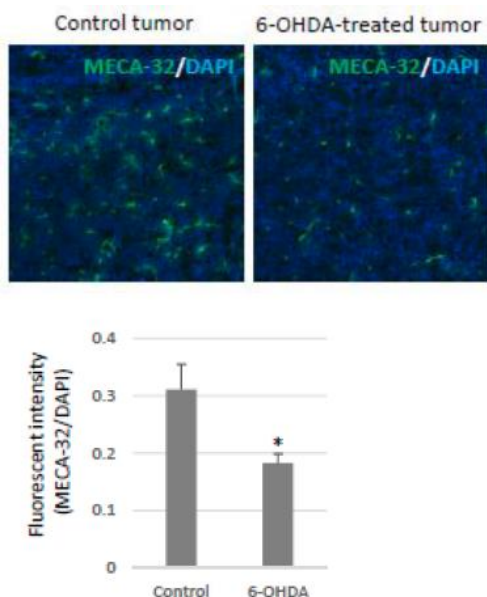


図1 交感神経除去による原発巣における血管新生の検討

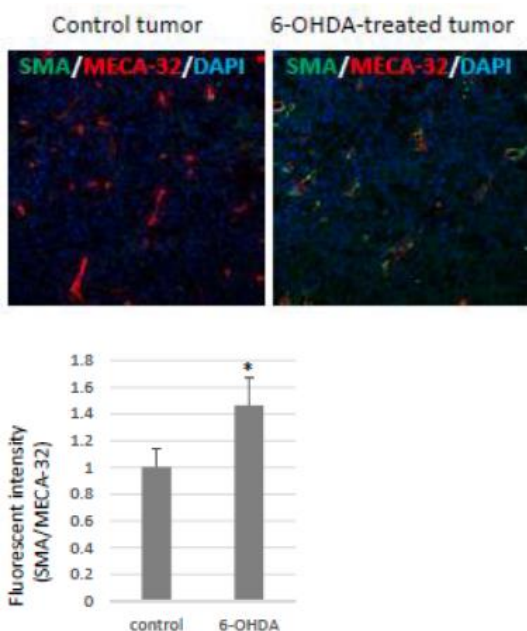


図2 交感神経除去による原発巣におけるペリサイト被覆率の検討

本研究の予備検討において既に交感神経除去により肺転移を顕著に抑制することを明らかにしていたが交感神経β受容体の遮断薬、高血圧治療薬として臨床で使用されているβブロッカー（プロプラノロール）の投与によって転移を抑制できるかどうか検討した。その結果、原発巣の増殖を抑制することはできなかったが肺転移を抑制することを示唆する結果が得られた。

次に転移前肺の微小環境形成における交感神経機能の解析を行った。その結果、交感神経除去群では骨髄からの免疫抑制細胞の

動員が顕著に減少していることが明らかとなった。また、骨髄由来免疫抑制細胞の動員に伴う炎症性サイトカイン群の発現の低下が観察された。また、転移前肺では神経末端と免疫担当細胞の相互作用が観察された。さらに、この相互作用は *In vitro* における再現実験でも観察された（図3）。

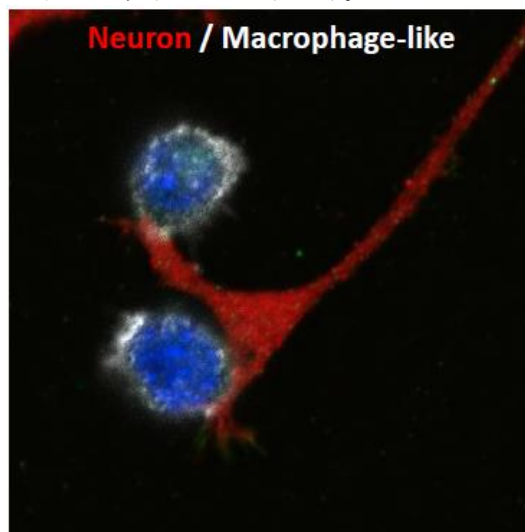


図3 神経と単球・マクロファージ様細胞の相互作用
これらの結果より、交感神経アゴニストが骨髄から動員された免疫抑制細胞に作用し、炎症性サイトカイン群の発現を誘導している可能性が示唆された。よって、*In vitro* においてこの点について検討した。その結果、マウス単球・マクロファージ様細胞を *Isoproterenol* で刺激すると炎症性サイトカイン群の発現上昇が観察された。また、その発現上昇はβブロッカーによって完全に抑制された。しかしながら、*In vivo* での実験において、βブロッカーは部分的に炎症性サイトカイン群の発現を低下させるにとどまった。このことから、おそらく交感神経による炎症性サイトカイン群の発現誘導は限局的な機能であると考えられる。

以上の結果より、交感神経の活性化、つまり精神的ストレスは交感神経を活性化することで原発巣では腫瘍血管新生を亢進し、ペリサイトの被覆率を低下させ、血管を未熟な状態にしていることが明らかとなった。未熟な血管は腫瘍内で漏出傾向となり、抗がん剤が腫瘍内に行き渡らない原因となり、治療効果を下げることが知られている。さらに、交感神経の活性化は転移前微小環境形成においては限局的であるが交感神経と免疫担当細胞との相互作用により炎症性サイトカイン群の発現を誘導していること、また、メカニズムは不明だが骨髄由来免疫抑制細胞の転移前肺への動員に関与していることが示唆された。

βブロッカーの投与により、転移前微小環境形成が減弱されたこと、また、転移が抑制されたことから精神的ストレスは転移を促進する原因の一つであると考えられることができる。今後、どのようながんの転移に交感神

経が関与しているのか、また、 $\beta 1$ - $\beta 3$ のどのアドレナリン β 受容体が転移に関与しているのかなど明らかにすることができれば β ブロッカーなどの安価な交感神経 β 受容体遮断薬が転移予防薬として使用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Ieguchi K, Maru Y. Savior or not: ADAM17 inhibitors overcome radiotherapy-resistance in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* 2016 , 2016, 査読有 , (8):E813-5. doi: 10.21037/jtd.2016.07.56.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/yakuri/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

家口 勝昭 (Ieguchi, Katsuaki)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90586348