

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460918

研究課題名(和文)慢性ストレス状態は癌細胞の転移能を増大する

研究課題名(英文)Chronic stress state promotes cancer metastatic ability

研究代表者

市田 成志 (ICHIDA, Seiji)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：00125121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性ストレスはがん転移にどのような影響を与えるのか肺がん転移モデルを使用して検討した。その結果以下の知見を得た。(1)肺がん転移モデルにおいて慢性ストレスによりがん転移ならびに腫瘍増大は促進した。(2)慢性ストレスマウスは、肺のNK細胞やマクロファージ数が減少し、マクロファージの貪食能が低下していた。

すなわち、慢性ストレスは肺胞マクロファージの免疫能を低下によりがん転移や腫瘍増大を促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether chronic stress influences on cancer metastatic ability using a lung cancer metastasis model B16BL6 cell. As a result, we obtained the following findings. 1) The cancer metastasis and the tumor growth in B16BL6 cell were promoted in chronically stressed mice. 2) The number of NK cell and alveolar macrophage and the phagocytic activity of the macrophage in the chronically stressed mice were decreased.

It is suggested from these results suggest that the cancer metastatic ability of B16BL6 cell in chronically stressed mice is prompted so that the immunocompetence of the alveolar macrophage is decreased in the chronically stressed mice.

研究分野：ストレス科学

キーワード：慢性ストレス がん 転移

### 1. 研究開始当初の背景

ストレスは「ホメオスタシス(恒常性)を傷害するような刺激を受けた場合にあらわれる反応」と定義され日常経験する感情的な興奮(怒り)や心理的重圧(不安)、運動や気温の急激な低下や上昇などストレスを引き起こす刺激がストレッサーとなる。

ストレスには急性ストレスと慢性ストレスがあり、各々のストレスで発症する症状も大きく異なる。このようなストレス関連疾患は精神系、神経系、循環器系、呼吸器系、消化器系など全身に及ぶ。ストレスとの因果関係を認める疾患が心身症であり、自律神経の失調状態などを引き起こし、全身に様々な不定愁訴を生じる。

一方、ストレス状態で認められる自律神経系のアンバランスや免疫機能の低下は、癌の進行や転移能に影響を及ぼす付加的要因になり得る可能性が示唆されている。

がん治療において、薬物療法や外科的療法はもちろん必須であるが、もしストレスを回避することによってがんの進行(悪化)や転移の促進を抑制することができるのなら、精神面からのアプローチによってさらに患者のQOLを改善することができると考えられる。

### 2. 研究の目的

一般的に、ストレス状態で認められる自律神経系のアンバランスや免疫機能の低下は、癌の進行や転移能に影響を及ぼす付加的要因になり得る可能性が報告されている。そこで、慢性ストレスの研究によく用いられている Specific alternation of rhythm in temperature(SART)ストレス動物を用いることにより、癌細胞の進行、特に転移能に関して、慢性ストレス状態はいかなる影響を及ぼすのかという疑問・探求心が本研究の着想の基となっている。

SARTストレスは、春先や秋口の日間や日内の気温の急激な変化や、夏あるいは冬におけるエアコンで制御された室内と寒暑厳しい屋外を行き来する場合の急激な気温変化等をシミュレートしたものである。一連の研究により、SARTストレス負荷動物には様々な生理機能異常、生化学的異常、神経化学的異常、血液・循環器系の異常などが示されている。この動物の自律神経の緊張は失調状態にあるが、その変化は身体の各部位、臓器等で必ずしも同方向ではない。しかし、全身的には Vagotonia 型(副交感神経緊張亢進型)の自律神経失調状態にあることが知られている。この動物は持続的な低血圧状態にあり、病態として起立性低血圧を起こす。また強制水泳テストや高架式十字迷路テストにおいて不安を伴った抑うつ状態にあり、さらに過敏性腸症候群様症状を示す。

### 3. 研究の方法

#### 1. 実験動物

実験動物として体重約 20g(約 4 週齢)の ddY 系雄性マウス(日本 SLC)を使用した。マウスの通常飼育は室温  $24 \pm 1$ 、12 時間毎の明暗サイクル(午前 8 時から午後 8 時、点灯)下で行い、8 匹/1 ゲージとし、飼料(MF、オリエンタル酵母)及び水は自由に摂取させた。

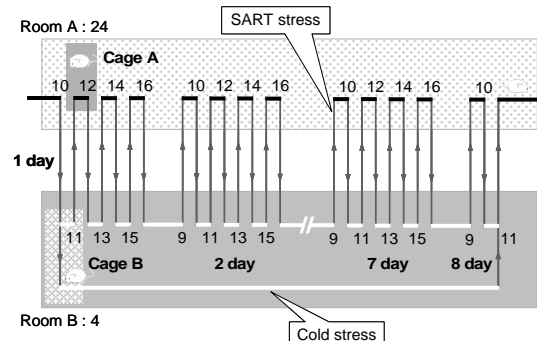
#### 2. ストレスの負荷方法(図 1)

##### SART ストレス

ストレスの負荷は、室温 24 の飼育室と庫内温度 4 の動物飼育用チャンパーの両方にマウス飼育用ケージを用意し、マウスを、毎日 9 時から 16 時までの間は 1 時間ごとに両ケージ間に移し変え、16 時から翌朝 9 時までは 4 のチャンパー内で飼育するという環境温度ストレスに最長 7 日間曝すことにより負荷した。

##### Cold ストレス

寒冷側の対照群として、マウスを SART ストレスと同期間、庫内温度 4 のチャンパー内で飼育することにより負荷した。



#### 3. 細胞培養

細胞株は B16BL6 悪性黒色腫細胞(B16BL6 細胞)を用いた。この細胞を 10% FBS, 100  $\mu$ g/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, および 25 mM HEPES を含む RPMI1640 にて、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

#### 4. 肺転移モデルの作成

B16BL6 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/0.2 ml) をマウスに尾静脈注射した。マウスは尾静脈注射後 8, 10 および 14 日間飼育を行った後、実験に使用した。

#### 5. ストレス負荷スケジュール

本研究では、B16BL6 細胞投与前にストレスを負荷した Pre-SART ストレス群と Pre-Cold ストレス群、投与後にストレスを負荷した Post-SART ストレス群と Post-Cold ストレス群、および同期間中、通常飼育を行った Control 群を実験に使用した。(図 2)

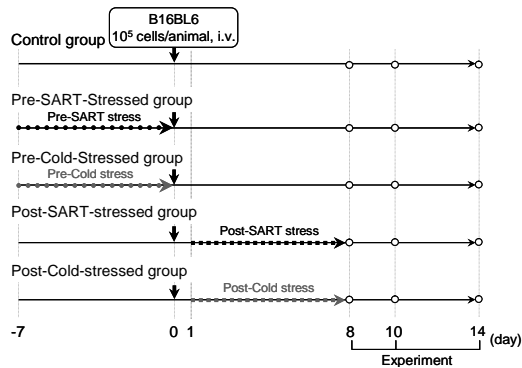


図2 ストレス負荷スケジュール

## 6. 肺転移結節数の計測

B16BL6 細胞の投与した日を 0 日目として、投与後 8, 10, 14 日目のマウスを使用した。それぞれのマウスをエーテル麻酔下、右心房より採血及び放血致死させ、肺を摘出し表面に転移した肺における黒色の結節数を計測した。

## 7. 腫瘍体積の測定

摘出した肺表面の転移結節における長径および短径を測定し、下記の式で体積を算出した。

$$\text{体積}(\text{mm}^3) = \frac{1}{6} \times \text{長径}(\text{mm}) \times (\text{短径}(\text{mm}))^2$$

## 8. 組織免疫染色法

摘出した肺は 4% paraformaldehyde (PFA) で固定後、10%, 20%, 30% スクロース溶液 (in 0.1M phosphate buffer) へと段階的に移し替え、一晩 4℃ で冷蔵保存した。肺組織から cryostat (CM1800, Leica) で厚さ 6 μm の連続切片を作製し、免疫染色に使用した。すなわち、まず凍結切片を 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 40% methanol で一晩、4℃ でインキュベートした。0.1M phosphate buffered saline (PBS 溶液) で 5 分間洗浄した後、5% Normal Goat Serum (NGS) を含む PBS 溶液にて 20 分間、室温にて blocking した。続いて一次抗体 (5% NGS を含む PBS 溶液) にて、室温で 30 分間放置した。次に PBS 溶液で 5 分間洗浄後、ビオチン化された二次抗体 (5% NGS を含む PBS 溶液) にて、室温で 30 分間放置した。続いて PBS 溶液で 5 分間洗浄した後、シグナルを増幅するため peroxidase-conjugated avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit) を用いて 30 分間、室温で処理した。次に、0.1M Tris-HCl 溶液 (pH7.6) にて 5 分間洗浄した後、0.05% 3,3'-diaminobenzidine-tetra HCl (DAB), および 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 0.1M Tris-HCl 溶液を使用して室温にて発色させた。対比染色としてメチルグリーンを使用した。免疫染色した切片を蒸留水で洗浄、メチルグリーン溶液にて 5 分間染色を行った。風乾後、切片をエンタランニューにて封入した。NK 細胞の組織免疫染色には、一次抗体として anti-asialo GM1 (Rabbit), 二次抗体として Biotinylated anti-rabbit IgG を使用した。

マクロファージの組織免疫染色には、一次抗体として Rat anti Mouse F4/80 antigen,

二次抗体として Biotinylated anti-rat IgG を使用した。

顕微鏡下 400 倍、1 サンプル中 5 視野に存在する NK 細胞およびマクロファージを計測し、それらを平均した値を使用した。

## 9. 蛍光ビーズ法による肺胞マクロファージ貪食能活性の測定

肺胞マクロファージを採取し、その貪食能活性を測定した。マウスをエーテル麻酔下、気管を切開した後、ポリエチレンチューブ (PE50, 日本ベクトン・ディッキンソン) をカニューレションし、4℃ に冷却した PBS 溶液 0.5mL で 4 回洗浄することにより気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) を収集した。得られた BALF の細胞成分を遠心分離 (1000 rpm, 2 min) し、5% fetal bovine serum (FBS) を含む RPMI1640 medium (GIBCO) (培養液) で懸濁させ、35mm dish (NUNC) に播種し、インキュベーター内 (37℃, 7.5% CO<sub>2</sub>) で 1 時間培養した。このとき、マクロファージのみが dish に接着することを利用して、BALF 中のマクロファージを採取した。PBS 溶液で 3 回洗浄した後、0.05% EDTA を含む PBS 溶液でマクロファージを剥離させ、1000rpm で 2 分間遠心した。上清を捨てて培養液でもどし、マクロファージ数を 5 × 10<sup>5</sup> cells/mL となるようにそろえて 4well Plate (NUNC) にまき、1 時間インキュベーター内で培養した。次に、Fluoresbrite Carboxylate Microspheres (2.5% Solids-Latex), 2.0 μm YG (蛍光ビーズ) を含む培養液 (25 beads/マクロファージ) に入れ替え、30 分後に PBS 溶液で洗浄後、4% PFA で固定し、DAPI で核染色を行った。顕微鏡下 200 倍、1well 中 10 視野に存在するマクロファージのうち、ビーズを貪食しているマクロファージの割合を算出した。

## 10. サイトカインの測定

マウスをエーテル麻酔下、右心房より採血を行った。採血した血液は室温にて 30 分放置後、6000rpm, 10 分間遠心分離し、上清を採取することにより血清を得た。

血清サイトカイン IL-6, IL-1 および TNF-α 濃度の測定は invitrogen ELISA kit Mouse を使用して行った。各種濃度の算出は kit のプロトコールに従って行った。

BALF サイトカインの測定には肺胞内マクロファージ採取の際に収集した BALF 上清を使用して、血清サイトカインの濃度測定と同様の方法で行った。

## 4. 研究成果

### 1. 各種ストレスによる B16BL6 悪性黒色腫細胞の肺転移への影響

#### 1.1. 各種ストレス刺激による肺転移結節数の変化

B16BL6 細胞投与後、8, 10, 14 日目における Control 群, Pre-SART ストレス群,

Post-SART 群それぞれの肺表面における結節数を計測し、棒グラフに示す(図3)。転移結節数は、経過日数と共に増加した。

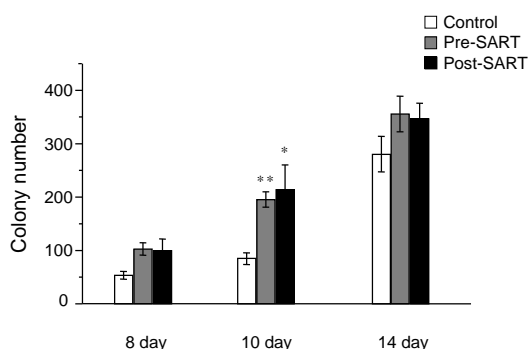


図3 ストレスによる肺転移結節数の変化

### 1.2. ストレス刺激による腫瘍体積の変化

B16BL6 細胞投与後 14 日目における肺表面の転移結節の体積を算出した。Control 群と比較して、Post-SART ストレス群において有意な腫瘍体積の増大が見られた。Pre-SART ストレス群は有意な差ではないが増大傾向であった。(図4)

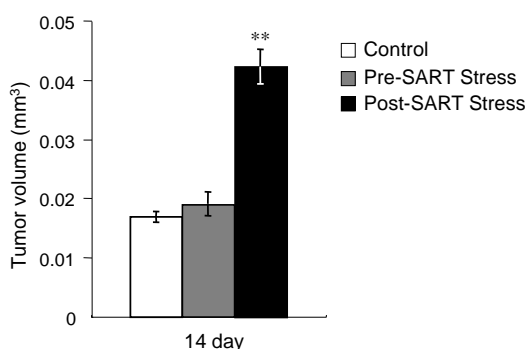


図3 ストレスによる腫瘍体積の変化

## 2. SART ストレスによる免疫細胞への影響

### 2.1. 肺組織免疫染色によるNK細胞数の比較

肺組織切片において免疫染色法によりNK細胞を染色した。NK細胞数はControl群13.9±1.2個、SARTストレス群10.2±0.8個であり、SARTストレス群において有意に減少していた。

### 2.2. 肺組織免疫染色によるマクロファージ数の比較

NK細胞と同様、マクロファージを染色した。マクロファージ数は、Control群16.7±1.1個であったのに対し、SARTストレス群9.1±0.6個であり、SARTストレス群で有意な減少が認められた。

### 3. 蛍光ビーズ法による肺胞マクロファージ貪食能の比較

蛍光ビーズ投与後30分後における肺胞マクロファージの貪食を蛍光顕微鏡にて観察し、全てのマクロファージに対する貪食作用を示したマクロファージの割合を計算した。

Control群においては57.5±6.1%の肺胞マ

クロファージが貪食作用を示したのに対し、SARTストレス群では29.8±2.1%しか貪食していなかった。マクロファージ1個あたりが貪食したビーズ数を比較しても、SARTストレス群はControl群よりも少なく、肺胞マクロファージの活性低下が見られた。

## 4. SART ストレスマウスにおけるサイトカイン量の変化

### 4.1. 血清中サイトカイン量の変化

Control群およびSARTストレス群のマウス血清中のIL-1, IL-6およびTNF-をそれぞれ測定したが、いずれもELISA kitにより検出することができず、比較できなかった。

### 4.2. BALF上清中サイトカイン量の変化

Control群およびSARTストレス群のBALF上清中のIL-1, IL-6およびTNF-をそれぞれ測定したところ、いずれもSARTストレス群において減少傾向が見られた。

## 5. 貪食能低下に対するジアゼパムの効果

SARTストレスによって減少していた肺におけるNK細胞数やマクロファージ数、また肺胞マクロファージの貪食能低下やBALFサイトカインの減少は、SARTストレス負荷期間中におけるジアゼパム連日投与によってすべて改善が認められた。

以上の結果から、肺がん転移モデルにおいて、慢性ストレス状態は肺の自然免疫を低下させることによって、がん転移能及び腫瘍の増大を促進させることが示唆された。さらにストレスによるがんの進行はジアゼパムによって改善することができたことから、がん治療において精神面のケアが重要であると考えられた。

## 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1件)

Tsubaki M, Takeda T, Tani T, Shimaoka H, Suzuyama N, Sakamoto K, Fujita A, Ogawa N, Itoh T, Imano M, Funakami Y, Ichida S, Satou T, Nishida S. PKC/MEK inhibitors suppress oxaliplatin-induced neuropathy and potentiate the antitumor effects. Int J Cancer., 137(1), 243-250, 2015年 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

植芝 慧子, 大友 菜, 杉原小雪, 山村愛美, 船上 仁範, 和田 哲幸, 市田 成志. SART ストレス誘発肺胞マクロファージ貪食能低下に対する 2 受容体刺激薬サルブタモールの改善効果とそのシグナル伝達経路について. 日本薬学会 第135年会(神戸) 2015.3.26-28 デザイン・クリエイティブセンター神戸(神戸)

Yoshinori Funakami, Keiko Ueshiba, Chisato Nishijima, Nosomi Tashiro, Tetsuyuki Wada, Seiji Ichida. The adrenergic agonists improve the impaired phagocytosis of alveolar macrophages in chronically stressed mice. Pharmacology 2014. 2014.12.16-18 London (UK)

植芝慧子, 船上仁範, 大友 菜, 杉原小雪, 山村 愛美, 和田哲幸, 市田成志. SART ストレス誘発肺胞マクロファージの機能異常に対する自律神経系の関与. 生体機能と創薬シンポジウム 2014. 2014.8-28-29 近畿大学薬学部 (東大阪)

植芝慧子, 船上仁範, 田代のぞみ, 西島知里, 大友 菜, 杉原小雪, 阪井邦正, 和田哲幸, 市田成志. SART ストレスによる肺胞マクロファージの食食能低下は交感神経系の活性化によって改善する. 日本薬学会 第 134 年会 (熊本). 2014.3.28-30 熊本市総合体育館 (熊本)

Seiji Ichida, Yoshinori Funakami, Chiyuki Wakaki, Keiko Ueshiba, Mariko Nakao, Kunimasa Sakai, Tetsuyuki Wada. Diazepam improves the functional disorder of the alveolar macrophage caused by chronic stress in mice. Pharmacology 2013. 2013.12.17-19 London (UK)

植芝慧子, 田代のぞみ, 西島知里, 大友 菜, 杉原小雪, 浅野 肇, 阪井邦正, 船上仁範, 和田哲幸, 市田成志. SART ストレスマウスから採取した肺胞マクロファージの食食能に対するアドレナリン、ノルアドレナリンの効果. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2013.10.20 同志社女子大学 (京田辺)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市田 成志 (ICHIDA, Seiji)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号：00125121

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

西田 升三 (NISHIDA, Shozo)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号：40208187

船上 仁範 (FUNAKAMI, Yoshinori)  
近畿大学・薬学部・講師  
研究者番号：70449833