

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10289

研究課題名（和文）NETsを起点とした口腔がん発生機序の解明～口腔細菌とニコチンのクロストーク～

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Oral Cancer Development Starting from NETs ~ Crosstalk between Oral Bacteria and Nicotine ~

研究代表者

西岡 貴志（NISHIOKA, TAKASHI）

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50641875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：好中球の新たな機能として注目されている好中球細胞外トラップ Neutrophil extracellular traps (NETs)は、様々な機能を有している。今回、好中球に細菌感染のみならずニコチンの刺激が加わることで誘導されること、NETs産生を起点としてがん細胞の増殖や転移が促進されることに着目し細菌感染やニコチンによる口腔粘膜上皮バリア破綻、NETsによる炎症誘導のメカニズムについて研究を実施した。レチノイン酸処理によりヒト前骨髄球性細胞株（HL-60細胞）を好中球に分化させた細胞にニコチン刺激を行いNETsの挙動について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タバコは明らかなるリスクファクターとして広く認識され、単一で最大の生活習慣病の原因である。タバコの構成主成分の一つであるニコチンは、自身の発がん性は証明されていないものの喫煙者の血中に高濃度で存在し、口腔がんや歯周病において影響をおよぼす。本研究は、NETsとニコチンの関係に焦点をあて、口腔がん発生メカニズムの解明に寄与したい。

研究成果の概要（英文）：Neutrophil extracellular traps (NETs), which have attracted attention as a new function of neutrophils, have various functions. In this study, we investigated the mechanisms underlying the disruption of the oral mucosal barrier by bacterial infection and nicotine and the induction of inflammation by NETs, focusing on the fact that neutrophils are induced not only by bacterial infection but also by nicotine stimulation and that the production of NETs promotes cancer cell proliferation and metastasis. We investigated the behavior of NETs by nicotine stimulation of human promyelocytic cell line (HL-60 cells) differentiated into neutrophils by retinoic acid treatment.

研究分野：口腔診断、歯科放射線

キーワード：ニコチン NETs 口腔がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔は他の臓器・組織に比べ、外界と常に交通し、恒常的に細菌感染、化学物質の暴露、温熱・物理刺激を受ける特殊な環境にある。このような厳しい環境の中、日々問題無く食事や会話などの日常生活が可能なのは口腔粘膜のバリア機能が高いことが考えられる。一方、喫煙は代表的なリスクファクターとして知られ、口腔がんの発生率には相関関係がみられる。

細菌などに対する防御反応で中心的役割を果たす好中球の新たな機能として、好中球細胞外トラップ；Neutrophil extracellular traps (NETs)が注目されている。細菌感染で活性化した好中球は、NETsを産生する。NETsは、核酸DNAや抗菌物質からなる網状構造物を放出し、侵入してきた細菌などを網状に一挙に捕捉して殺傷した後、自爆する。このような感染防御機構を有するNETsは、一方で、がん細胞の血行性遠隔転移の促進にも関与している (J Clin Invest, 2013, 123:3446)。ニコチンとNETsに関しては、好中球にニコチン刺激が加わることで、細菌感染の有無に関わらずNETsが誘導されること (J Leukoc Biol, 2016, 100:1105)、タバコの煙に曝露したマウス血中において検出されたNETsが、活動静止状態にあるがん細胞を覚醒させ、がん細胞の増殖・転移に関わること (Science, 2018, 361:6409)などが報告されている。

タバコは口腔がん、咽頭がん、肺がんの最大のリスクファクターであり、タバコの構成主成分であるニコチンは、喫煙者の血中に高濃度で存在するが、その直接的な発がん作用は、これまで証明されていない。我々は、そのニコチンに着目し、ニコチンがアセチルコリンレセプター7を介して上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナルを刺激し、口腔がん細胞の増殖促進を誘導すること、その誘導にはAKT (アポトーシスの抑制的に働く) やERK (細胞増殖や分化に関わる) のシグナルの活性化が重要であることを明らかにし (Nishioka et al., Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(2):514)、ニコチン自身ががんの進行を促進する可能性を見出している。

以上の背景から、ニコチンの口腔粘膜への慢性的で継続的な刺激がバリア破綻を引き起こし、口腔がんの発生を誘導している可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は、(1)細菌感染やニコチンによる口腔粘膜上皮バリア破綻の解析、(2)好中球の集積、NETs産生、炎症誘導を検証し、NETsを起点とした口腔がん発生のメカニズムを明らかにすることを目的とし、以下の方法でその解析を行った。

3. 研究の方法

(1)口腔粘膜上皮のバリア機能の解析：歯周病原細菌とニコチン刺激による口腔上皮細胞のバリア機能について、培養細胞中の経上皮電気抵抗値(trans-epithelial electrical resistance, TEER)を測定することで評価した。何種類かの口腔上皮細胞と比較対象として口腔以外の組織である腸管上皮細胞を用いてその抵抗値を解析した。また、口腔がん細胞にニコチン刺激を行い、細胞間接着分子の解析をウェスタンブロット法にて行った。

(2)好中球の集積、NETs産生、炎症誘導の検証：NETs産生誘導実験には、各種歯周病原細菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*)とニコチンを使用した。好中球の分化は、ヒト前骨髄球性白血病細胞株 (HL-60細胞)を10 mM all-trans retinoic acid (レチノイン酸)で5日間培養処理し、フローサイトメトリー法によりCD11b発現を確認した。細菌による刺激後の回収は、Warnatschらの方法 (Science, 349:316)で行い、NETsフラグメントの回収はSYTOX Green染色法で確認した。ニコチン刺激によるNETs産生については、ヒストンH3のシトルリン化を指標としてウェスタンブロット法にてタンパク質の発現量の検出・解析を行った。細胞に刺激を加えるニコチン濃度は、喫煙者の血中ニコチンの濃度が0.1~1 μ Mである報告とこれまでの培養細胞を用いた経験から0.5 μ Mを基準刺激濃度とし、1 μ M、5 μ M、10 μ Mの高濃度も試行した。

4. 研究成果

(1)TEER種々の口腔上皮細胞ならびに腸管上皮細胞において解析した結果、当初、口腔上皮細胞の方が高い抵抗値(バリア能)を示すことが予想されたが、予想に反し、腸管上皮細胞の方が高い抵抗値を示した。また、口腔上皮細胞では数値の変動が大きく安定した数値を検出することが難しかった。この結果の考察として、口腔上皮細胞は重層扁平上皮であるのに対し、腸管上皮細胞は単層上皮であることから、タイトジャンクションなどバリア機能の違いがTEERにおける抵抗値に反映されたと推察された。

口腔がん細胞にニコチン刺激を行い、細胞間接着分子の反応を解析した。刺激グループにおいては発現量の低下を予想したが、明らかな差は得られなかった。

(2)NETsの産生誘導に必要なリガンド刺激を行うため、また、口腔内の環境に近づけるために、歯周病の代表的な細菌を使用してその産生誘導能を評価したところ、試行した歯周病原細菌の中では *Fusobacterium nucleatum* が最もNETs産生能が高いことがわかった。

HL-60細胞から好中球に分化させ、ニコチン刺激を加え、ヒストンH3のシトルリン化の解析を行った。ニコチンの刺激時間および刺激濃度について様々な組み合わせを検討した結果、

NETs 形成の特徴であるヒストン H3 のシトルリン化は、低濃度、短時間刺激グループではコントロールグループと比べ発現上昇がみられなかったが、高濃度、長時間刺激グループでは発現上昇が認められた。また、ニコチン単独刺激でもヒストン H3 のシトルリン化が確認できたが、反応の上昇度の差はわずかであった。そこで、さらに他の刺激（細菌など）と組み合わせることでさらなる発現上昇や発現のピークの変化、ニコチン低濃度刺激での発現など相乗的な増強反応が予想されたため、歯周病原細菌とニコチンによる共刺激でのヒストン H3 のシトルリン化についても解析したが、予想に反し、意外にも共刺激による有意な上昇は今回認められなかった。タンパクレベルでの解析においては予想していたような有意な発現上昇が得られなかったが、ニコチン刺激した後の NETs 産生の反応を、SYTOX Green で染色し蛍光顕微鏡でその発現状態を確認したところ、コントロールグループに比べて発現量の増加が確認できた。HL-60 細胞から分化させた好中球にニコチン刺激後の培養液中に含まれる NETs 含有上清を回収した試料の DNA 量を PicoGreen にて測定した結果においては、コントロールグループと比較してニコチン刺激のグループにおいて有意な差は得られなかった。また、ニコチン単独の刺激に加えて歯周病原細菌などの口腔細菌との共刺激による反応についても当初予想していた発現上昇がこれまで確認できていないが、別に他の刺激因子が必要な可能性が考えられる一方で、HL-60 細胞から分化させた好中球の反応は生体における反応に比べ弱い可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1. 著者名 Tada Hiroyuki, Nishioka Takashi, Ishiyama Rina, Song Li-Ting, Onoue Sakura, Kawahara Kazuyoshi, Nemoto Eiji, Matsushita Kenji, Sugawara Shunji | 4. 巻 674 |
| 2. 論文標題 Macrophage migration inhibitory factor-mediated mast cell extracellular traps induce inflammatory responses upon Fusobacterium nucleatum infection | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 90 ~ 96 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.06.060 | 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 該当する |
| 1. 著者名 ENDO MANABU, NISHIOKA TAKASHI, NUMAZAKI KENTO, HASEGAWA HIROSHI, TAKAHASHI TETSU, SUGAWARA SHUNJI, TADA HIROYUKI | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Reactivation of p53 by RITA Induces Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 2931 ~ 2937 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15775 | 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 Shimada Yusuke, Kojima Ikuho, Nishioka Takashi, Sakamoto Maya, Iikubo Masahiro | 4. 巻 111 |
| 2. 論文標題 Root canal narrowing patterns of mandibular first premolars on panoramic radiographs according to the number of root canals diagnosed on cone beam computed tomographic images | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Odontology | 6. 最初と最後の頁 172 ~ 177 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-022-00713-9 | 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 Tada Hiroyuki, Kawahara Kazuyoshi, Osawa Hiraku, Song Li-Ting, Numazaki Kento, Kawai Junya, Onoue Sakura, Nishioka Takashi, Nemoto Eiji, Matsushita Kenji, Sugawara Shunji | 4. 巻 636 |
| 2. 論文標題 Hericium erinaceus ethanol extract and ergosterol exert anti-inflammatory activities by neutralizing lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.10.090 | 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 Jiang Chloe Meng, Nishioka Takashi, Hong Guang, Yu Hao, Zhang Chang-yuan, Chu Chun Hung | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Mapping of dental graduates' career paths in Hong Kong, Japan and mainland China | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Oral Health | 6. 最初と最後の頁 1-8 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/froh.2022.994613 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 1. 著者名 Song Li-Ting, Tada Hiroyuki, Nishioka Takashi, Nemoto Eiji, Imamura Takahisa, Potempa Jan, Li Chang-Yi, Matsushita Kenji, Sugawara Shunji | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Gingipains-Mediated Degradation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Leads to Delayed Wound Healing Responses in Human Endothelial Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Innate Immunity | 6. 最初と最後の頁 1~14 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000519737 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishioka Takashi, Mayanagi Gen, Iwamatsu Kobayashi Yoko, Hong Guang | 4. 巻 85 |
| 2. 論文標題 Impact of the COVID 19 pandemic on dental clinical training and future prospects | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Dental Education | 6. 最初と最後の頁 1999~2001 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jdd.12562 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

| |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Numazaki, K., Tada, H., Nishioka, T., Matsushita, K., Mizoguchi, I., Sugawara, S |
| 2. 発表標題 The functional role of neutrophils in RANKL-induced osteoclastogenesis |
| 3. 学会等名 2023 Annual Meeting of ADEAP CA+inD International Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 沼崎 研人, 西岡 貴志, 松下 健二, 多田 浩之 |
| 2. 発表標題 Neutrophil extracellular trapsのdouble-stranded DNAは破骨細胞分化を制御する |
| 3. 学会等名 第27回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 多田 浩之, 西岡 貴志, 松下 健二, 菅原 俊二 |
| 2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisジンジバインはヒト血管内皮細胞のPAI-1を分解し, 血管内皮の創傷治癒を遅延させる |
| 3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Yusuke Shimada, Ikuho Kojima, Takashi Nishioka, Maya Sakamoto, Masahiro Iikubo |
| 2. 発表標題 Root canal narrowing patterns of mandibular first premolars on panoramic radiographs according to the number of root canals diagnosed on cone beam computed tomographic images |
| 3. 学会等名 ACOMFR (アジア歯科顎顔面放射線学会) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 | 多田 浩之 (Tada Hiroyuki) (70431632) | 東北大学・歯学研究科・講師 (11301) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 伊原木 聡一郎 (Ibaragi Soichiro) (80549866) | 岡山大学・医歯薬学域・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 | | | |
|---------|-------------------------|--|--|--|
| 米国 | Northeastern University | | | |