

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463004

研究課題名(和文)ニコチンのEGFR発現促進作用が口腔癌のリンパ節転移に果たす役割

研究課題名(英文)Nicotine Induces Lymph Node Metastasis of Oral Cancer Cells through EGFR Activation

研究代表者

伊原木 聡一郎 (IBARAGI, Soichiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80549866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タバコの主要成分ニコチンは、喫煙により肺胞や口腔粘膜から吸収され、血中に移行する。血中のニコチンは中枢神経系のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に作用し、タバコの依存性に関与する。最近、ニコチンが乳癌細胞において上皮成長因子受容体(EGFR)を介して増殖・浸潤を促進している可能性があることが報告された。しかしニコチンが口腔癌に与える影響は不明である。そこで、ニコチンが口腔癌細胞のEGFRリン酸化とリンパ節転移に与える影響を検討した。ニコチンはnAChRを介してEGFRのリン酸化と核内移行を惹起し、口腔癌細胞のリンパ節転移を促進していた。

研究成果の概要(英文)：Nicotine, which is one of the main component of tobacco, is absorbed from oral mucosa and pulmonary alveoli by smoking, and moves to blood. Nicotine in blood binds to nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in central nervous system and relates to tobacco addiction. Recently, it has been reported that nicotine promotes proliferation and invasion in breast cancer cells through epidermal growth factor receptor (EGFR) activation. However, the role of nicotine in oral cancer cells is still unknown although oral cavity is most exposed organ to tobacco smoke. Therefore, this study assessed the effects of nicotine on oral cancer cells. Nicotine increased lymph node metastasis of oral cancer cells in animal model. The mechanism underlying the tumor progressive effects of nicotine in oral cancer cells consists of upregulation of cell proliferation, migration and invasion via the activation of EGFR.

研究分野：口腔外科

キーワード：ニコチン

1. 研究開始当初の背景

喫煙は発癌や癌の進行に関連する。国際がん研究機関 (IARC) の因果関係評価によると、喫煙は、口腔、咽頭、喉頭、肺癌、食道、胃、大腸、肝臓、膵臓、腎細胞、腎盂・尿管、膀胱、子宮頸、卵巣に対して発癌性ありと判定されている。特に、口腔、咽頭、喉頭、肺などのタバコ煙に直接的に曝露する臓器の危険性が高い。

タバコ煙は粒子相と気相に分類され、粒子相はタールとニコチン、気相は一酸化炭素などの毒性物質を、それぞれ含む。タールはベンゾピレンやニトロソアミンなどの発癌性物質を多く含有する。ニコチンは依存症に関与するが発癌性物質ではない。そのため禁煙治療には、ニコチンをガムやパッチなどの形態で補給するニコチン置換療法が行われる。タバコ煙中のニコチンは、大部分が肺から吸収され、残りは口腔、気道などの粘膜から吸収される。ニコチンは、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor: 以下 nAChR) に結合する。nAChR は 1-10, 1-4, , のサブユニットから構成されるホモもしくはヘテロ 5 量体であり、中枢神経系や神経筋接合部に存在する。ニコチンが中脳の腹側被蓋野に存在する nAChR に結合すると、視床下部にある側坐核に過剰のドーパミンが放出され、前頭葉へ投射されることにより (報酬系)、多幸感や覚醒作用をもたらす。これが繰り返されニコチン依存症が獲得される。

nAChR は主に神経系に局在すると考えられていた。しかし気管支上皮、尿路上皮細胞、皮膚細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などの非神経細胞にも広く存在することが明らかになった。また乳癌、肺癌、大腸癌、でも発現を認め、腫瘍増殖や転移の促進に関与することが報告された。

口腔は最も早期にタバコ煙中のニコチンに曝される臓器である。正常口腔粘膜上皮においては nAChR 発現が認められ、分化、アポトーシス、シグナル伝達を促進する。口腔癌細胞においても、正常上皮と同様に nAChR 発現が認められる可能性が推測されるが、その発現および役割については分かっていない。

上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor: EGF) は前歯萌出と眼瞼開裂を促進する物質として、マウス唾液腺から単離された。EGF が細胞表面の受容体 (EGFR) に結合すると、EGFR の細胞内領域でのチロシンキナーゼの活性化と自己リン酸化が引き起こされ、PI3K-AKT-mTOR, Ras-Raf-MEK-MAPK, などのシグナル伝達因

子が活性化する。シグナル伝達因子は核内移行し、癌細胞の増殖・浸潤・転移を促進する。EGFR は、口腔癌、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、腎癌、前立腺癌、卵巣癌、で過剰発現がみられる。癌の EGFR 過剰発現は予後不良因子である。EGFR の発現制御機構は未だ明らかでない。

研究開始までに申請者は、口腔癌細胞においてニコチンが EGFR を活性化 (リン酸化) させる、ことを予備的な実験で確認していた。

2. 研究の目的

(1) 口腔癌細胞においてニコチン-nAChR 系は、EGFR のリン酸化を制御し浸潤・転移を促進しているか

(2) ニコチン-nAChR 系の阻害によって口腔癌細胞の浸潤・転移を制御できるか

以上の2点について申請期間中に、以下の方法でその解明を行なった。

3. 研究の方法

(目的1) ニコチンが口腔癌細胞に与える影響の解析

ニコチンが nAChR を介して EGFR のリン酸化を起こし、口腔癌細胞の増殖能、運動能を促進しリンパ節転移を促進する、というモデルを考えた。

平成 26 年度は、ニコチンの機能解析を行った。口腔癌細胞 (HSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20) を用いて、ニコチン (0.5 μM) 存在下と非存在下で培養し解析を行った。細胞に作用させるニコチン濃度は、喫煙者の血中ニコチン濃度が 0.1~1 μM であるとの報告と、培養細胞を用いた報告を参考に決定した。EGFR 発現、EGFR リン酸化は Western blot 法を用いて調べた。運動能、増殖能と遊走能はそれぞれ Wound healing アッセイと MTT アッセイと Boyden chamber 法を用いて測定した。正常口腔扁平上皮細胞における nAChR は 3, 5, 7, 9, 2, 4 のサブユニットの存在が報告されている。これらの nAChR 発現は Real time RT-PCR 法を行い評価した。

平成 27 年度は、in vitro において、ニコチン-nAChR 系が EGFR リン酸化させるシグナル伝達経路を明らかにした。nAChR 非選択的阻害剤 (メカミラミン塩酸塩)、7 nAChR 選択的阻害剤 (α-ブンガロトキシン)、抗ヒト EGFR キメラ化モノクローナル抗体 (Cetuximab)、EGFR 阻害剤、MAPK 阻害剤、Akt 阻害剤を用いてニコチン

-nAChR 系のシグナル伝達因子を阻害した。EGFR 発現,および p-EGFR, p-ERK, p-AKT, などシグナル伝達因子のリン酸化は Western blot 法を用いて調べた。

(目的2)ニコチンが口腔癌リンパ節転移に与える影響の解析

平成 26 年度は,ヌードマウス可移植性ヒト口腔扁平上皮癌のリンパ節転移モデルの作製を行った。5 週齢雄 BALB/C 系 nu/nu ヌードマウスの足蹠皮下に口腔癌細胞 OSC-19 を移植し,膝窩リンパ節への転移の有無を評価した(口腔癌リンパ節転移動物モデル)。OSC-19 を用いた舌同所性移植モデルでは腫瘍増大が著しく,リンパ節転移の発生前にマウスが死亡したためモデル確立に至らなかった。足蹠皮下への移植では呼吸や経口摂取に影響を与えないため,比較的長期に腫瘍を観察できた。

移植後は連日,ニコチンを腹腔内注射し,移植部の大きさを計測した。マウスを屠殺し,移植部と膝窩リンパ節を摘出して,4%パラホルムアルデヒドで固定後,パラフィン包埋組織切片を作製した。

平成 27 年度は,移植部と所属リンパ節の病理組織学的検討を行った。移植部においては nAChR および EGFR, リン酸化 EGFR 発現を免疫組織化学的に評価した。膝窩リンパ節においてはリンパ節転移陽性率を評価した。移植部のリンパ管新生は抗 LYVE-1 抗体を用いて,血管新生は抗 CD31 抗体を用いて,それぞれ免疫組織化学的に評価した。

平成 28 年度は,口腔癌リンパ節転移動物モデルにおいて,ニコチン-nAChR 系を阻害し,リンパ節転移の抑制効果を調べた。ニコチン-nAChR 系の阻害には,nAChR 阻害薬を用いた。

4. 研究成果

(1)ニコチンが口腔癌細胞の増殖能に与える影響

OSC-19細胞,OSC-20細胞,HSC-2細胞,HSC-3細胞を用いて細胞増殖能を検討した。いずれの細胞においてもニコチン添加群が対照群と比較して増殖能を有意に促進した。メカミラミン,-ブンガロトキシンはニコチンの効果を有意に抑制した。

(2)ニコチンが口腔癌細胞の運動能に与える影響

OSC-19細胞,HSC-3細胞を用いて wound healing assay で運動能を検討した。ニコチン添加群は対照群と比較して創傷面積が縮小しており,運動能が有意に促進されていた。メカミラミン,-ブンガロトキシンはその効果を抑制した。

(3)ニコチンが口腔癌細胞の遊走能に与える影響

OSC-19細胞,HSC-3細胞共に運動能と同様に,ニコチン添加群が対照群と比較し遊走能が有意に促進されており,メカミラミン,-ブンガロトキシンはその効果を抑制した。

(4)ニコチンが口腔癌細胞の浸潤能に与える影響

OSC-19細胞,HSC-3細胞を用いて invasion assay で浸潤能を検討した。OSC-19細胞,HSC-3細胞共に,ニコチン添加群が対照群と比較し浸潤能が促進し,メカミラミン,-ブンガロトキシンはその効果を抑制した。

(5)ニコチンが口腔癌細胞の細胞内シグナル伝達経路に与える影響

OSC-19細胞,HSC-3細胞を用いて,ウエスタンブロット法で細胞内シグナル伝達経路について検討した。OSC-19細胞,HSC-3細胞ともに,ニコチン添加1時間後から3時間でEGFRの発現が減少し,6時間後から再発現を認めた。リン酸化EGFR,リン酸化AKTは1時間後から3時間で上昇し,6時間で低下した。OSC-19細胞,HSC-3細胞ともに,ニコチン添加によりEGFR,Aktのリン酸化が亢進した。ニコチンとメカミラミン塩酸塩および-ブンガロトキシンの共存下では,EGFR,Aktのリン酸化は抑制された。

ニコチンとAKT阻害薬の共存下では,ニコチン添加群と比較して,Akt,mTORのリン酸化は抑制されたが,EGFRのリン酸化に変化はなかった。また,ニコチンとmTOR阻害剤の共存下では,ニコチン添加群と比較して,mTORのリン酸化は抑制されたが,EGFR,Aktのリン酸化に変化はなかった。

(6)ニコチンが口腔癌細胞におけるリン酸化EGFRの細胞内局在に与える影響

OSC-19細胞とHSC-3細胞を用いてリン酸化EGFRの細胞内局在についてウエスタンブロット法を用いて検討した。OSC-19細胞とHSC-3細胞から抽出した蛋白を,細胞質と核に分画し,EGFR発現とEGFRのリン酸化をウエスタンブロット法にて検討した。EGFRの発現はOSC-19細胞,HSC-3細胞の対照群,ニコチン添加群ともに細胞質で認められ,核内ではほとんど認めなかった。EGFRのリン酸化は,OSC-19細胞,HSC-3細胞のいずれにおいても

ニコチン添加群において、核内で増加していた。ニコチンによって EGFR がリン酸化し核内移行したと考えられた。

リン酸化 EGFR の細胞内局在を、蛍光免疫染色を用いて検討した。OSC-19 細胞、HSC-3 細胞をそれぞれカバーガラス上で培養し、ニコチンを 1 時間もしくは 3 時間作用させた後メタノールで固定し、抗リン酸化 EGFR 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。ニコチンを作用させると経時的に核内にリン酸化 EGFR が移行していく様子が観察された。

(7)ニコチンが口腔癌細胞のリンパ節転移に与える影響

OSC-19 細胞を用いて口腔癌リンパ節転移動物モデルでリンパ節転移の頻度を検討した。ニコチン添加群では対照群と比較しリンパ節転移陽性率が上昇し、メカミラミンはその効果を抑制した。

腫瘍移植部のリン酸化 EGFR の核内陽性率を病理組織学的に検討した。ニコチン添加群では対照群と比較しリン酸化 EGFR の核内陽性率が上昇し、メカミラミンはその効果を抑制した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Soichiro Ibaragi, Shinichi Kodama, Daisuke Kuwajima, Tatsuo Okui, Norie Yoshioka, Tsuyoshi Shimo, Akira Sasaki
Nicotine Induces Lymph Node Metastasis of Oral Cancer Cells through EGFR Activation
6th World Oral Cancer Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO)
May 17 to 20, 2017. Bangalore, India.

桑島大介, 伊原木聡一郎, 高島清文, 吉岡徳枝, 岸本晃治, 志茂剛, 長塚仁, 佐々木 朗
口腔癌細胞におけるニコチンと上皮成長因子受容体の関連性について,
第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2016 年 4 月 16 日～17 日 福岡

〔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

伊原木聡一郎 (IBARAGI Soichiro)
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍制御学講座 口腔顎顔面外科学分野 助教
研究者番号：80549866

(2)研究分担者

佐々木 朗 (SASAKI Akira)
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腫瘍制御学講座 口腔顎顔面外科学分野 教授
研究者番号：00170663

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

Mohammad Monsur Hassan
School of Dentistry & Health Sciences,
Charles Sturt University, Orange NSW,
Australia

Guo-Fu Hu
Molecular Oncology Research Institute,
Tufts Medical Center, Boston,
Massachusetts, U.S.