

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20853

研究課題名（和文）ニコチンによる口腔がん細胞増殖メカニズムの解明と科学的根拠に基づく禁煙の啓蒙

研究課題名（英文）Elucidation of oral cancer cell proliferation mechanism by nicotine and enlightenment of smoking cessation based on scientific evidence.

研究代表者

西岡 貴志 (Nishioka, Takashi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50641875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タバコの構成主成分の1つであるニコチンに着目し一連の実験を行ってきた。ニコチンは喫煙者の血中に高濃度で存在するが、ニコチン自身の発がん性は証明されていない。ニコチン刺激が口腔がん細胞の増殖や分裂、分化におよぼす影響について口腔がん細胞を用い、ウェスタンブロット法を中心とした分子生物学的手法を用い解析を行った。ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）を介して上皮成長因子受容体（EGFR）のリン酸化を誘導し、その下流の分子促進因子活性化タンパク質を活性化することを確認した。これらより細胞増殖シグナルを活性化し、ニコチンが口腔がん細胞の増殖・分裂促進に働く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種々の病気に対し、タバコは明らかなリスクファクターとして認識され、単一で最大の生活習慣病の原因である。特に、口腔がんは発生部位である口腔の特殊性から、摂食・咀嚼・嚥下障害、発音障害、味覚障害など重要な口腔機能が障害されることにより患者のQOLは著しく低下する。本研究はタバコの構成主成分の1つであるニコチンをターゲットに実験を遂行し、ニコチンが口腔がん細胞の増殖促進に有意に関連することが示された。さらなるエビデンスの集積は必要であるが、本成果は基礎的な分子メカニズムの解明に基づく禁煙の啓蒙につながり、健康長寿の観点からも社会に貢献しうると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on the nicotine, which is one of the main components of tobacco. Although, the nicotine is present in high concentrations in the bloodstream of smokers, its effect on carcinogenesis is not clear yet. The nicotine was used to examine the effect the cell growth, division and differentiation of the oral cancer cells. The oral cancer cells were stimulated by nicotine, cells were analyzed using molecular biological techniques such as Western blotting. The results showed that the nicotine induced the phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) through the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), and its downstream molecular promoter activation proteins were activated. These results suggest that the nicotine was activated the cell proliferation signals and might be potential to promote the proliferation and division in oral cancer cells.

研究分野：口腔診断・口腔内科・歯科放射線

キーワード：ニコチン 口腔がん

## 1. 研究開始当初の背景

口腔がんの発生率と喫煙の間には相関関係がある。口腔はタバコ煙の直接的な摂取経路であり、口腔粘膜を通して吸収される。特にインドを中心とした東南アジア地域で特異的な生活習慣である噛みタバコと口腔がんの関係を指摘する報告が多いことがそれを裏付けている。タバコ煙中には数千種類の化学物質が含まれ、そのうちの数百種類以上は発がん物質を含む有害物質である。特にニコチン由来のニトロソ化合物には遺伝子障害作用があり、タバコの代表的な発癌物質として認識されている。タバコの構成主成分の1つであるニコチンは、これまでその強い依存性に関する研究が多く行われてきた。ニコチンは体内に吸収されると血液中に移行し、喫煙者および重度受動喫煙者の血液中に高濃度で存在する。近年、がん細胞と腫瘍血管への血管新生の誘発・増大作用や細胞増殖、分化促進にニコチンが関与することなどの報告も徐々になされるようになり、依存性以外の研究も注目されるようになってきている。ニコチンがこれまで直接的に発がんに影響することは証明されていないが、そのメカニズムの詳細については不明な点が多く、エビデンスの集積が必要である。我が国における成人の喫煙率は、社会的な背景から減少傾向にあるが、先進国としては、いまだ高い水準である。また、直接喫煙だけでなく、受動喫煙（間接喫煙）も現在の大きな問題となっている。喫煙は単一で最大の生活習慣病の原因であり、タバコの外箱には喫煙の有害事象が具体的に記されるなどの工夫が行われているにもかかわらず禁煙の徹底はなされていない。申請者はニコチン自身が、がんの進行を促進する可能性を見出しており、健康長寿の観点からも禁煙啓蒙は社会的に取り組むべき課題であると考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ニコチンが促進する細胞増殖の分子生物学的作用機序を解明し、禁煙啓蒙の科学的根拠とすることにある。つまり、アセチルコリン受容体の一つであるニコチン性アセチルコリン受容体（ニコチン受容体；non-selective nicotinic acetylcholine receptor, nAChR）のアゴニストであるニコチンが、同受容体を介して細胞に作用し、口腔がん細胞の増殖を促進させる活性化シグナル経路を解明し、口腔がん細胞の増殖促進に関わるメカニズムについて明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究では、正常口腔上皮細胞（HGEP）とヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株（HSC-2）を解析に使用した。それぞれの細胞の増殖、分化の状態をコントロール群、ニコチン投与群（1  $\mu$ M）に分けて観察し、増殖能の違いの有無について評価した。本研究で選択したニコチンの投与量は、喫煙者の血液中のニコチン濃度に相当するものでありそれを模倣した形で実験を行った。成長成分として細胞培養液で用いられる血清の影響を極力排除するため、ニコチン刺激の24時間前に血清を飢餓状態（10%から0.5%に置換）にしてから細胞の反応を解析した。血清0%については事前に検討を行ったが、細胞そのものを維持できなかったため0.5%とした。刺激後の細胞の増殖能の評価についてはWST-1試薬を用いて行った。96ウェルプレートに細胞を播種した培養細胞にニコチン刺激を行い、1, 2, 4, 6, 8時間培養後、WST-1試薬を添加しマイクロプレートリーダーにより細胞活性を発色定量した。申請者はこれまで、がんの発生と進行に重要な因子として知られる、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) シグナルとニコチンとの関連性を検討し、同シグナルが、nAChRサブユニット、特にalpha 7サブユニットを介して活性化されることを見出している。そこで、さらなるシグナル探索のために、nAChRの下流で発現が予想されるp44/42 mitogen-activated protein kinases (ERK)およびprotein kinase B (AKT) シグナルについて、そのシグナル発現の活性を確認した。その後、各種シグナル阻害薬（Mecamylamine hydrochloride; nAChR阻害薬, Perifosine; AKT阻害薬, AG1478; EGFR阻害薬, U0126; ERK阻害薬）を用いてそれぞれの経路についての抑制反応の有無をウェスタンブロット法にて確認した。各阻害薬は各種プロトコルに記載の至適濃度および論文を参考にし、予備実験を行ったのちに決定し使用した。

## 4. 研究成果

細胞増殖試薬のWST-1を用いた細胞活性は、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株におけるニコチン投与群では対象のコントロール群に比べ、細胞の増殖能の促進が認められ、時間依存的にその傾向は強くみられた。しかし、対象として使用した正常口腔上皮細胞においてはどのタイムポイントにおいてもニコチン投与でわずかな増加はみられるものの有意な差までは認められなかった。また、ウェスタンブロット法によるシグナル伝達経路の解析においても、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株におけるニコチン投与群では対象のコントロール群に比べ、ERKやAKTのリン酸化タンパクが有意に上昇してみられた。ウェスタンブロット法においても正常口腔上皮細胞では有意な反応は見られなかった。また、ERKやAKTのリン酸化タンパクの発現上昇が認められたシグナル伝達経路はそれぞれの阻害薬を使用することで、これらのシグナルが抑制す

ることも実証できた。以上から、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株におけるニコチンの刺激は、ERK や AKT のリン酸化、つまり、MEK/ERK 経路と PI3K-AKT 経路の活性化を誘導することが示された(ただし、AKT のリン酸化のうち、有意差がみられたのは T308 のみで、S473 について有意差は認められなかった)。増殖促進シグナルにおいて、ニコチンが、nAChR、EGFR を介して上記経路を活性化することが実証されたことで、がん細胞の増殖促進因子の 1 つとしてニコチンが単独に関わり、誘導を促進している可能性が示唆された。一連の本研究成果は、国際科学誌 (Biochemical and Biophysical Research Communications) にて掲載された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Nishioka T, Tada H, Ibaragi S, Chen C, Sasano T.

Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cells through the  $\alpha 7$  subunit of the nicotinic acetylcholine receptor.

Biochem Biophys Res Commun. 2019, 509(2):514-520. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.154.

Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, Kuwajima D, Kodama S, Nishioka T, Okui T, Obata K, Takabatake K, Kawai H, Ono K, Okamoto K, Nagatsuka H, Sasaki A.

Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma.

Int J Oncol. 2019, 54(1):283-294. doi: 10.3892/ijo.2018.4631.

Tada H, Nishioka T, Takase A, Numazaki K, Bando K, Matsushita K.

*Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier.

Cell Microbiol. 2019, 21(3):e12972. doi: 10.1111/cmi.12972.

Kojima I, Sakamoto M, Iikubo M, Shimada Y, Nishioka T, Sasano T.

Relationship of MR imaging of submandibular glands to hyposalivation in Sjögren's syndrome.

Oral Dis. 2019, 25(1):117-125. doi: 10.1111/odi.12941.

Iikubo M, Nishioka T, Okura S, Kobayashi K, Sano T, Katsumata A, Arijii E, Kojima I, Sakamoto M, Sasano T.

Influence of voxel size and scan field of view on fracture-like artifacts from gutta-percha obturated endodontically treated teeth on cone-beam computed tomography images.

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2016, 122(5):631-637. doi: 10.1016/j.oool.2016.07.014.

Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, Matsushita K.

*Porphyromonas gingivalis* Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells.

PLoS One. 2016, 11(4):e0152794. doi: 10.1371/journal.pone.0152794.

[学会発表](計 5 件)

多田浩之、西岡貴志、松下健二、尾之上さくら、川原一芳

歯周病における neutrophil extracellular traps 産生と血管内皮細胞の炎症誘導

第 23 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会

2017 年 12 月 1 日~2 日、西宮神社会館(兵庫)

多田浩之、沼崎研人、西岡貴志、松下健二、菅原俊二

Neutrophil extracellular traps によるヒト血管内皮細胞の Del-1 産生抑制

第 59 回歯科基礎医学会学術大会

2017 年 9 月 16 日~18 日、松本歯科大学キャンパス(長野)

西岡貴志、多田浩之。

ニコチンは p44/42 MAPK シグナルを介して上皮細胞癌の増殖促進を誘導する

第 59 回歯科基礎医学会学術大会

2017 年 9 月 16 日~18 日、松本歯科大学キャンパス(長野)

Iikubo M, Nishioka T, Kobayashi K, Sasano T

Fracture-like artifacts of gutta-percha cones on CBCT images influenced by the voxel size

and FOV.

21st International Congress of Dento-Maxillo-Facial Radiology

2017年4月26日～29日、Kaohsiung (台湾)

沼崎研人、西岡貴志、松下健二、多田浩之

*Fusobacterium nucleatum* によるヒト好中球からの neutrophil extracellular traps 誘導

第58回歯科基礎医学会学術大会

2016年8月24日～26日、札幌コンベンションセンター (札幌)

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。