

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11086

研究課題名(和文) Ni²⁺イオンによる口腔癌治療の可能性に関する研究研究課題名(英文) The possible application of Ni²⁺ for the oral cancer treatment

研究代表者

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：10231896

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)：Ni²⁺イオンの腫瘍増殖抑制効果について検討した。ヌードマウス舌にヒト口腔扁平上皮癌由来細胞を接種し、腫瘍形成確認後、通常の水(control)または1mM Ni²⁺水溶液(Ni)を2～3週間自由飲水させた。実験動物用マイクロCTによる腫瘍の撮影によりcontrol群では腫瘍塊がいわゆるball-in-hands像を呈していたのに対してNi群では、透過像中にひととき透過性の高い領域が観察され、これは広範な壊死領域に相当することが組織学的観察により明らかとなった。マイクロアレーによる網羅的遺伝子発現解析により、Ni群では腫瘍転移に関連する多くの遺伝子の発現が著しく抑制されていることが解った。

研究成果の概要(英文)：In the present study, inhibitory effect of Ni²⁺ on tumor growth was examined. Human oral squamous cell carcinoma-derived culture cells were injected to nude mice tongue. The tumor mass formation was confirmed 1 week after tumor cell administration. The mice were fed with or without 1 mM NiCl₂-containing water for 2 to 3 weeks. The CT images were taken every other week. The cancer mass was observed as a translucent area in control mice. In NiCl₂-fed mice, much highly translucent area was observed within the translucent area. Histologically, this area corresponded to the necrotic area in the tumor mass. Using the microarray technique, expressions of various cancer metastasis-related genes were examined. In NiCl₂-fed mice, most of these genes were significantly reduced.

研究分野：口腔病理学

キーワード：塩化ニッケル 口腔扁平上皮癌 マトリックスメタロプロテアーゼ ヌードマウス NF-kappaB

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で我々は、ニッケルイオン (Ni²⁺イオン) が NF-κB の活性を抑制することを明らかにしてきた。これは Ni²⁺イオンが細胞内で NF-κB の p50 subunit に結合し、核内移行を抑制することによるものであり、Ni²⁺イオンは p50 subunit の N 末端側にあるヒスチジン残基のクラスターに結合することが分かった。口腔内の悪性腫瘍の大半は扁平上皮癌であり、その増殖・転移活性が転写因子 NF-κB の活性に相関していることが知られている。すなわち、上皮性異型性、上皮内癌、浸潤癌と進行するにつれて NF-κB 活性が増強していくとされている。これらの事実から、Ni²⁺イオンが NF-κB 活性を抑制するのであれば、扁平上皮癌の進展抑制につながるのではないかとこの着想を得た。

2. 研究の目的

上記の様な背景から、Ni²⁺イオン投与が NF-κB の活性抑制を通じて、口腔扁平上皮癌の増殖や転移を抑制するのではないかと考え、本研究を企図した。研究では、口腔扁平上皮癌由来細胞株 (oral squamous cell carcinoma-derived cell line: OSCC) を用いて、Ni²⁺イオンの増殖・転移に対する効果について in vitro 実験により、また、マウス生体内でも Ni²⁺イオンは効果を発揮するものかという点について in vivo 実験を計画し検討することとし、Ni²⁺イオンの抗腫瘍薬としての応用の可能性について追及することにした。

3. 研究の方法

(1)細胞

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC3 および同株の高転移亜株である HSC3-M3 を用いた。細胞の培養は 10%ウシ胎児血清加 RPMI 1640 培地を用いた。

(2)real-time PCR

実験前日に HSC3 を 1×10⁵/24 well plate に播種した。1 mM NiCl₂ 存在下または非存在下に培養し、培養後の細胞から total RNA を調整した。これを用いて通法に従って cDNA を作成した後、real-time PCR を行い matrix metalloproteinase 9 (MMP9) などの発現変化について検討した。また、タンパク質を抽出し Western blot 法によりタンパク発現の変化を観察した。

(3)in vivo 実験

HSC3-M3 をヌードマウス舌側縁に接種し腫瘍塊の形成を確認後、飲水中に 1 mM NiCl₂ を添加して飼育した。通常の水で飼育した群をコントロールとした。飲水開始後に腫瘍部分を摘出し、real-time PCR により各種 MMP 発現の変化を観察した。また、造影剤を注入し舌における腫瘍塊の観察を動物実験用マイクロ CT を用いて行った。さらに、腫瘍塊を

組織学的に観察するため、4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定を施し組織の摘出を行った。摘出後の組織は後固定を行ったのち、パラフィン切片を作製し、抗ヒト MMP9 抗体を用いて免疫組織学的解析を行った。

(4) luciferase assay

HSC3 に図 6 に示した reporter vector 1 μg を Lipofectamine plus reagent を用いて 5 時間 transfection した。新しい培養液に変換後さらに 18 時間培養を行った。培養後、NiCl₂ 存在下 (+) または非存在下 (-) にさらに 24 時間培養し、luciferase 活性の測定を行った。

(5) PCR array

マウス舌に形成された腫瘍を確認した後、NiCl₂ 水溶液または通常の飲用水により 1 週間飼育した。その後腫瘍塊を摘出し、total RNA を抽出し、RNA array を用いて腫瘍転移を助長する遺伝子群の発現変化について検討した。

4. 研究成果

(1) Ni²⁺イオンは口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) において腫瘍転移に重要な MMPs の発現を抑制した。OSCC である HSC3 細胞において MMP1, 2, 8, 9, 13, 14 のすべてが Ni²⁺イオンにより発現抑制されることを明らかにした (図 1)。特に、MMP9 および MMP14 の発現抑制が顕著に認められた。そこで腫瘍転移に際して重要と考えられている MMP9 に着目してさらに検討を加えた。すなわち HSC3 を Ni²⁺存在下 (+) および非存在下 (-) で培養した後細胞溶解液を調整し、抗ヒト MMP9 抗体を用いて免疫沈降実験とこれに続く Western blot を行った (図 2)。その結果、Ni²⁺イオン添加群では明らかな MMP9 発現の抑制が確認できた (図 2)。

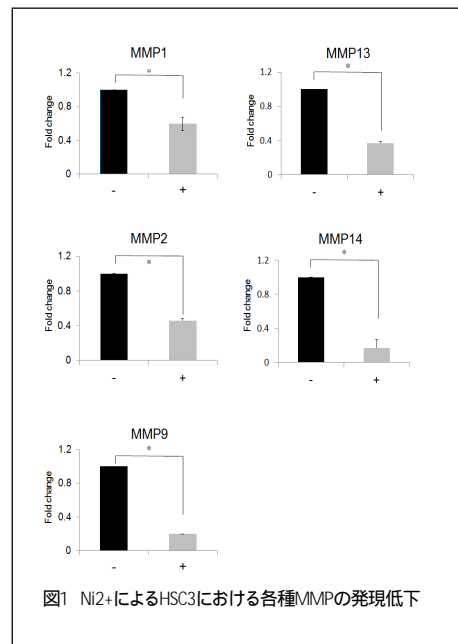


図1 Ni²⁺によるHSC3における各種MMPの発現低下

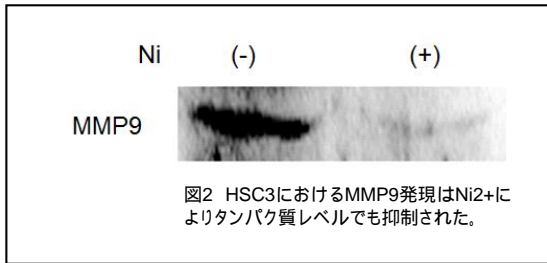


図2 HSC3におけるMMP9発現はNi2+によりタンパク質レベルでも抑制された。

(2) in vivo 実験

マウスの舌に形成された腫瘍塊の観察
 以上の結果をもとに、in vivo における NiCl2 の効果についてさらに検討することとした。ヌードマウス舌側縁に HSC3 の高転移亜株である HSC3-M3 を摂取し、形成された腫瘍塊における MMP9 発現の変化について免疫組織学的に観察を行った。その結果、飲水中に NiCl2 を添加した群では、有意に MMP9 発現が低減することが確認された (図 3)。

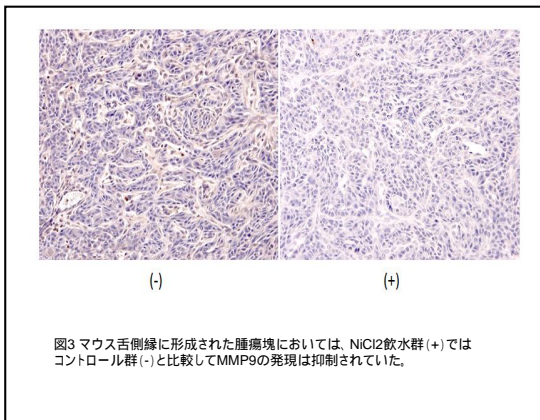


図3 マウス舌側縁に形成された腫瘍塊においては、NiCl2 飲水群 (+) ではコントロール群 (-) と比較して MMP9 の発現は抑制されていた。

実験動物用マイクロ CT および組織学的観察

次に、舌に形成された腫瘍塊をマイクロ CT により観察し、腫瘍の構造について観察を行うこととした。マウス尾静脈より造影剤を注入し CT 撮影を行ったところ、control 群では、腫瘍は舌全体に広がる X 線透過像として観察された。いわゆる ball-in-hands の像を呈しており、これは腫瘍により形成促進された新生血管が腫瘍全体を取り囲むことにより形成された像と考えられる (図 4)。これに対して Ni 群では、透過像中にひととき透過性の高い領域 (hyper translucent area) が観察された (図 4)。同組織を摘出し HE 染色標本により組織学的な比較を行ったところ、Ni 群では腫瘍中に広範な壊死領域 (図 5 における黒矢印部分) が形成されていることが明らかとなり、CT 像において観察された hyper translucent area が壊死組織に相当することが解った (図 5)。

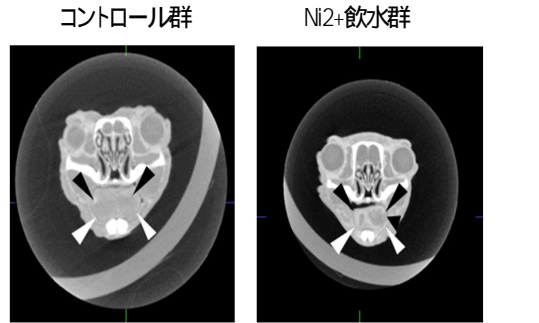


図4 コントロール群では白矢印に示す通りいわゆるball-in-hands像を呈しているのに対して、Ni2+飲水群ではその中にさらに透過性の高い領域が形成されている。

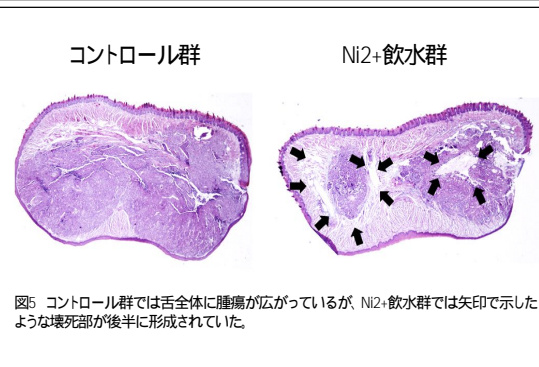


図5 コントロール群では舌全体に腫瘍が広がっているが、Ni2+飲水群では矢印で示したような壊死部が後半に形成されていた。

そこで、腫瘍組織から RNA を抽出し、real-time PCR により血管新生に關与する IL-8 および vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現変化について検討した (図 6)。その結果、NiCl2 飲水群では、両者ともに有意な発現の低下が認められ、NiCl2 の飲水中への添加が、腫瘍細胞による血管新生因子の発現低下を介してその増殖を抑制している可能性が示唆された。

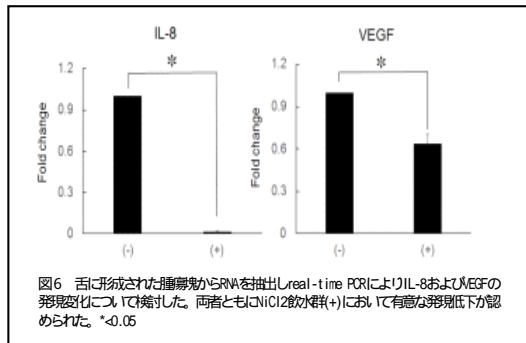
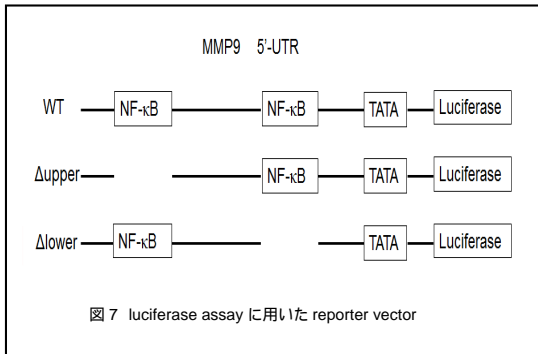


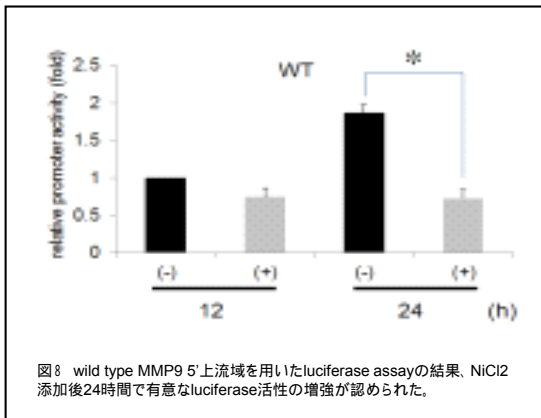
図6 舌に形成された腫瘍塊からRNAを抽出しreal-time PCRによりIL-8およびVEGFの発現変化について検討した。両者ともにNiCl2飲水群 (+) において有意な発現低下が認められた。* < 0.05

(3) NF-kB の関与

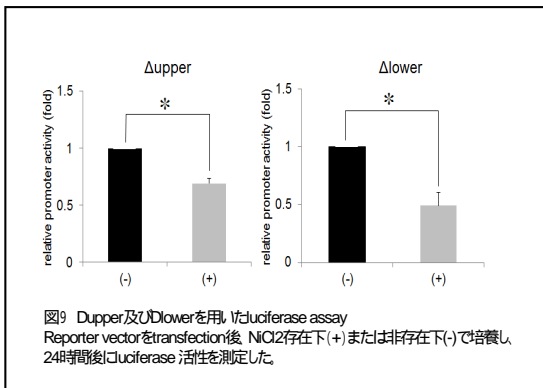
以前の報告で我々は、Ni2+イオンが NF-kB の p50 subunit の N 末端側にあるヒスチジンクラスターに結合することによりその活性を減弱させることを報告したが、上記の腫瘍増殖抑制効果が、NF-kB の活性抑制によるものであるか否かについて luciferase assay により検証した。実験は HSC3 に reporter vector を transfection することにより行ったが、図 7 に用いた vector construction を示す。



この実験には、MMP9 の上流約 1.5 kb を用いた。この領域には 2 箇所 の NF-κB 結合領域が見られ、それぞれを欠失した construct を Δupper 及び Δlower として実験を行った。初めに、WT vector を用いて実験を行ったところ、NiCl₂ 添加 24 時間後に有意な luciferase 活性の増強が認められた (図 8)。



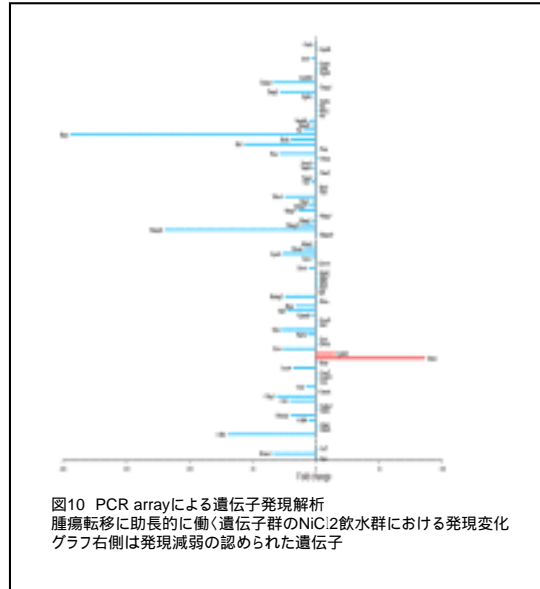
そこで次に上流、下流いずれの NF-κB 結合領域が MMP9 発現に重要なのかを知るために、Δupper 及び Δlower を用いて同様に実験を行った。その結果、図 9 に示すように、両者ともに NiCl₂ 添加 24 時間後に luciferase 活性は約 50% 前後に減弱し、MMP9 発現には両部位の関与が重要と考えられた。しかし、Δlower では Δupper に比較して活性が 45% 程度にまで減少し、若干下流の NF-κB 結合領域が優位に關与する可能性が示唆された。



(4) 転移関連遺伝子の発現変化

上記の結果は、NiCl₂ が転写因子 NF-κB の活性抑制を通じて遺伝子発現を減弱させて

いることを示すものであった。そこで腫瘍の転移を助長すると考えられている遺伝子の発現変化について、PCR array を用いて網羅的に解析することとした。その結果、図 10 で示した結果と同様に、MMP 遺伝子はすべて発現が減弱した (図 10)。しかし、これらの中で elastase および Eph receptor B2 遺伝子の発現のみ増強され、この意義については今後の研究課題とするべきと考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ota H, Shionome T, Suguro H, Saito S, Ueki K, Arai Y, Asano M. Nickel chloride administration prevents the growth of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 査読有, 2018, Vol. 9, (No. 35), 24109-24121.

Matsumoto Y, Sakurai H, Kogashiwa Y, Kimura T, Matsumoto Y, Shionome T, Asano M, Saito K, Kohno N. Inhibition of epithelial-mesenchymal transition by cetuximab via the EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in head and neck cancer. *Head Neck*. 査読有, 2017, Vol. 39, (No. 3), 476-485.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：10231896

(2) 研究分担者

尾曲 大輔 (OMAGARI, Daisuke)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：10608699

塩野目 尚 (SHIONOME, Takashi)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：10757652

五條堀 孝廣 (GOJOURI, Takahiro)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：10755573