

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890218

研究課題名（和文）Ni²⁺イオンの口腔癌治療薬への応用に関する研究研究課題名（英文）Study on the application to oral cancer treatment drug of Ni²⁺ ion

研究代表者

尾曲 大輔 (OMAGARI DAISUKE)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：10608699

研究成果の概要（和文）：IL-8 は、悪性腫瘍の進行において重要な役割を示唆している。Ni 化合物は、発がん性物質として認識されているが、IL-8 との関連には不明な点が多い。口腔扁平上皮癌細胞株を用いて自発的な IL-8 の分泌に対する Ni²⁺イオンの効果を検討した結果、Ni²⁺イオンは、用量および時間依存的に IL-8 分泌を阻害することが示した。IL-8 発現は NF- κ B に大きく依存していて、p50 の分子の N 末端部分におけるヒスチジンのクラスターが結合に必要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：IL-8 plays an important role by put the progression of malignant tumors. Ni compounds have been recognized as a carcinogen, but there are many unclear points in the context of IL-8. We studied the effect of Ni²⁺ ions for the secretion of IL-8 spontaneous using oral squamous cell carcinoma cell lines, As a results, Ni ions inhibited IL-8 secretion in a dose-and time-dependent manner. It indicated that the cluster of histidine at the N-terminal part of the molecule of p50 is required for binding of the Ni ions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：金属イオン、癌、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域の悪性腫瘍のうち最も発生頻度の高い扁平上皮癌では、細胞接着因子やケモカインなどの自発的な産生が認められる。これは種々の転写因子が恒常的に活性化されているためであるが、その詳細なメカニズムは不明である。特に、NF- κ B は発現調節に関与する遺伝子の種類が多く、その活性の程度が、腫瘍の転移や悪性度などの生物学的

性状に相関していると考えられており、最も研究の進んだ転写因子である。

一方、近年の研究で、以下のことが明らかとなった。

(1) 口腔扁平上皮癌 (OSCC) では、pattern recognition receptor である toll-like receptor4 (TLR4) が発現している。(Cancer Res 69, 3105-3113, 2009)

(2) 口腔扁平上皮癌細胞の TLR4 をそのリガ

ンドである lipopolysaccharide (LPS)により刺激すると、NF- κ B の活性化を引き起こす。(3) TLR4 は、LPS 以外に Ni²⁺イオンにも結合する。(Nat Immunol 11, 814-819, 2010)以上の報告に基づき、申請者はヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞である Ca9-22 細胞、HSC2 細胞、HSC3 細胞を用いて、LPS および Ni²⁺イオンに対する反応性の比較を行った。ヒト血管内皮細胞である HUVEC 細胞が、LPS および Ni²⁺イオンに反応し IL-8 の産生を亢進させることが報告されており、これをコントロールとして用いた。その結果、いずれの細胞においても IL-8 の自発的産生が認められ、LPS 刺激では IL-8 の産生がさらに増強されることが解った。驚くべき事に、Ni²⁺イオン刺激においてはその産生は、濃度依存的に抑制されていた。更に、HSC3 細胞を用いた luciferase assay の結果、Ni²⁺イオンは NF- κ B の活性を抑制することが解った。この結果は、Ni²⁺イオンが、NF- κ B の活性抑制により、OSCC の転移を抑制しうる可能性を示唆するものであった。

2. 研究の目的

歯科領域で用いられる材料中に含まれる Ni²⁺イオンは、金属アレルギーや口腔扁平苔癬などの病的な状態を誘導する物質であると考えられており、有害なものとされている。申請者はこれまでに、Ni²⁺イオンはヒト口腔扁平上皮癌(OSCC)による自発的 IL-8 産生を低下させることを発見した。この効果は NF- κ B を介するものであり、腫瘍の転移に関連する MMP-9 の遺伝子発現も発現低下させた。

そこで、本研究では、(1) Ni²⁺イオンが、NF- κ B を介する情報伝達系に及ぼす影響の検討、(2) Ni²⁺イオンの腫瘍転移に及ぼす影響とそのメカニズムの解析、(3) Ni²⁺イオン効果と腫瘍分化度との関連という点について明らかにすることを目的とする。

さらに、Ni イオンを口腔扁平上皮癌由来の培養細胞 HSC3 に作用させることにより、HSC3 が恒常的に分泌している IL-8 の産生を抑制することを確認されたことから(4) Ni²⁺イオンによる IL-8 産生抑制効果の分子メカニズムの解明、また、近年 Ni²⁺イオンが toll-like receptor 4 (TLR4) に結合することが報告されたが、(5) TLR4 の Ni イオンの効果への関与という 5 点について検索することとした。

3. 研究の方法

Ni²⁺イオンの NF- κ B を介する情報伝達系に及ぼす影響について、OSCC である HSC3 を用いて実験を行う。

(1) Ni²⁺イオンによる IL-8 の産生抑制が TLR4 を介しているか否かを検討する。Ni²⁺イオンの調整は、nickel chloride hexahydrate を PBS に溶解し、1mM の濃度を

用いる。使用する細胞は、RPMI に、10%ウシ胎児血清を添加したものをを用いて培養する。① HSC3 を抗 TLR4 抗体および class matched control 抗体にて 1 ないし 2 時間、5 % CO₂ インキュベーターにおいて前培養する。培養後細胞を洗浄し、1 mM Ni²⁺イオンの存在下ないし非存在下で更に 24 時間培養する。培養後、それぞれの培養上清を回収し、IL-8 濃度を human IL-8 ELISA kit を用いて測定する。

② HSC3 に control および TLR4 siRNA を transfection する。Transfection には RNAi/MAX transfection 試薬を用い、50 nM siRNA を 3 時間、5 % CO₂ インキュベーターにおいて反応させる。反応後、細胞を培養液により洗浄した後、1 mM Ni²⁺イオン存在下、非存在下に培養し、24 時間後に IL-8 濃度を ELISA により測定する。

(2) Ni²⁺イオンは NF- κ B を介する情報伝達系のどのステップに影響を及ぼしているのか検討する。

① HSC3 において恒常的な p65 のリン酸化が認められることを、Western blot 法により確認している。そこで、Ni²⁺イオンが、HSC3 における p65 のリン酸化の程度にどのような影響を及ぼすかについて検討する。すなわち、HSC3 を Ni²⁺イオン存在下、非存在下に培養し、培養 30、60、120、180 分後に細胞溶解液を回収する。これを用いて Western blot を行い、p65 のリン酸化の変化を観察する。

② NF- κ B の活性化は、リン酸化に続く核への移行が極めて重要である。そこで、HSC3 を Ni²⁺イオン存在下、非存在下に 60 分間培養した後、核抽出液を調整し、核内の p65 および p50 サブユニットの量を測定する。また、同様に刺激した細胞を用いて、p65 および p50 に対する特異的抗体を用いて、免疫蛍光染色を行い、両分子の核移行の変化について観察する。

(3) Ni²⁺イオンによる IL-8 産生抑制効果の分子メカニズムの解明

HSC3 細胞における IL-8 の自発的産生は IL-8 発現に極めて重要な役割を果たす転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化しているためと考えられる。そこで Ni イオンが NF- κ B 活性にどのような影響を及ぼすかということに関して luciferase assay により検索する。また、Ni²⁺イオンの NF- κ B 活性の減弱のメカニズムの解明を目指し、NF- κ B のサブユニット p65 および p50 のリン酸化および核移行に対する Ni²⁺イオンの作用について検索する。HSC3 細胞を Ni²⁺イオン存在下又は非存在下に培養し、培養後の細胞から細胞溶解液を調整する。これを用いて p65 のリン酸化の変化について検討する。抗 p65 抗体および抗リン酸化 p65 抗体を用いて Western blot 法により検索する。また、免疫蛍光染色法によ

り細部における p65 および p50 サブユニットの細胞内局在が Ni²⁺イオンによる刺激の結果どのように変化するか検索する。

(4) TLR4 の Ni²⁺イオンの効果への関与
近年の研究により、Ni²⁺イオンはグラム陰性菌の菌体外多糖である lipopolysaccharide (LPS) のレセプターである TLR4 の細胞外領域に結合することが報告された。Ni²⁺イオンの IL-8 産生抑制効果が TLR4 を介するものであるか否かを検討する目的で、HSC3 細胞を抗 TLR4 抗体またはコントロール抗体で前処理し、Ni²⁺イオンの効果がどのような影響を受けるかということについて検討する。さらに、TLR4 の発現を small interfering RNA (siRNA) を transfection することにより抑制し、この状態で Ni²⁺イオンの IL-8 産生抑制効果がどのように変化するか確認する。

4. 研究成果

Ni²⁺イオンを口腔扁平上皮癌由来の培養細胞 HSC3 に作用させることにより、HSC3 が恒常的に分泌している IL-8 の産生を抑制することを実験的に確認した。そこでこの現象が HSC3 特異的な変化であるか否かを検証する目的で、この他の細胞株 (HSC2、Ca9-22) を用いて同様の実験を行なったところ、程度の差はあるものの抑制効果が認められたことから細胞特異的な効果ではないことが解った (図 1)。

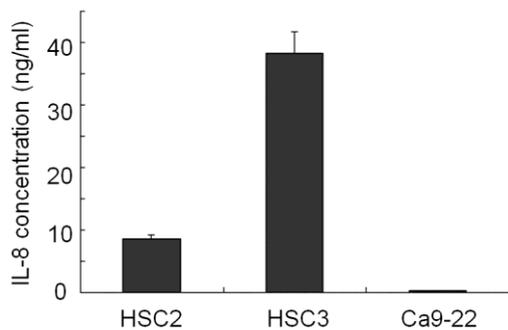


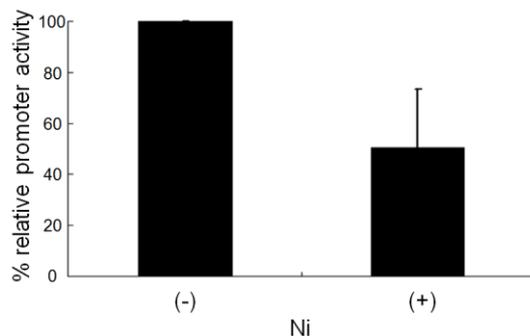
図 1 IL-8 の細胞特異性

Ni²⁺イオンの濃度と作用時間を様々に変えて行った実験から、その効果が濃度および時間依存的に増強することが解った。

さらに、HSC3 を抗 TLR4 抗体および class matched control 抗体にて前培養し、Ni²⁺イオンの存在下でさらに培養させた実験では、抗 TLR4 抗体を用いた系では IL-8 の産生は抑制されなかった。HSC3 における IL-8 の自発的産生は IL-8 発現に極めて重要な役割を果たす転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化しているためと考えられる。そこで NF- κ B 特異的阻害剤を用い、HSC3 における IL-8 の分泌について検証したところ、IL-8 の分泌が抑制され、HSC3 の IL-8 の自発的産生は NF- κ B の

活性に起因していることが分かった。

Ni²⁺イオンの濃度と作用時間を様々に変えて行った実験から、その効果が濃度および時間依存的に増強することが解った。HSC3 細胞における IL-8 の自発的産生は転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化しているためと考えられる。Ni²⁺イオンが NF- κ B 活性にどのような影響を及ぼすかということに関して luciferase assay により検索した結果、Ni²⁺イオンは刺激の 1 時間後に NF- κ B の活性を阻害することが判明した。これらの結果から、Ni²⁺イオンが TLR4 を介して NF- κ B 活性を阻害し IL-8 の分泌を抑制する効果を持っている



ことが確認された (図 2)。

図 2 Ni²⁺イオン存在下における NF- κ B 活性

また、Ni²⁺イオンの NF- κ B 活性の減弱のメカニズムについて、Western blot 法により検索した結果、NF- κ B のサブユニット p65 のリン酸化には、Ni²⁺イオンの影響は見られなかったが p50 では大幅なリン酸化の抑制が見られた。さらに、Dpn I 法を用いた遺伝子組み換え実験において、Ni²⁺イオンの結合には、N 末端から、108, 110, 112 番目のヒスチジンが強く関連していることが示唆された。Ni²⁺イオンはグラム陰性菌の菌体外多糖である lipopolysaccharide (LPS) のレセプターである TLR4 の細胞外領域に結合することが報告されている。TLR4 の Ni²⁺イオンの効果への関与について Ni²⁺イオンの IL-8 産生抑制効果が TLR4 を介するものであるか否かを検討する目的で、HSC3 細胞を抗 TLR4 抗体またはコントロール抗体で前処理し、Ni²⁺イオンの効果がどのような影響を受けるかということについて検討した結果、両者において IL-8 の分泌に差はみられなかった (図 3)。

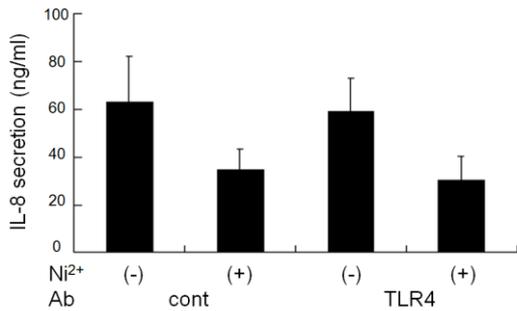


図3 TLR4抗体の影響

さらに、TLR4の発現を small interfering RNA (siRNA)を transfection することにより抑制し、この状態における Ni²⁺イオンの IL-8 産生抑制効果について検索しても顕著な差は認められなかった (図4)。

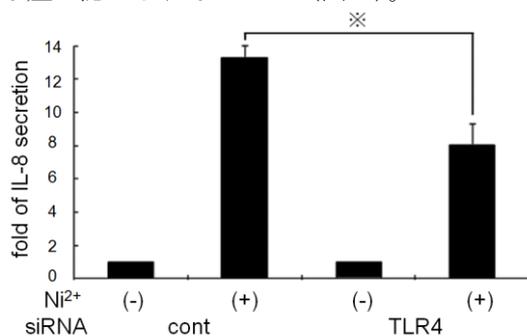


図4 TLR4 SiRNA transfection

この結果より Ni²⁺イオンによる IL-8 産生抑制効果には TLR4 を介さない独立したプロセスの存在が示唆された。

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)

[学会発表] (計1件)

①遠藤 茂樹、Ni²⁺ ion inhibited the secretion of IL-8 by oral squamous cell carcinoma cells (OSCCs). 第22回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2011年8月24日、九州大学(福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾曲 大輔 (OMAGARI DAISUKE)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号: 10608699

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: