

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870047

研究課題名(和文) 口腔がんの発症に係るニコチン性アセチルコリンレセプターに関する分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular basis related to the nicotinic acetylcholine receptor involved in the development of oral cancer

研究代表者

西岡 貴志 (NISHIOKA, TAKASHI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・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)：タバコは口腔がんの主要なリスクファクターの一つである。タバコの構成主成分であるニコチンは、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、本研究において、細胞の分裂促進に関連するシグナル伝達経路であるEpidermal Growth Factor Receptor(EGFR)のリン酸化を促進すること、また、その経路においてニコチンレセプター $\alpha 7$ サブユニットの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The tobacco is one of the major risk factor for oral cancer. Nicotine is a main component of tobacco, but has not been demonstrated to affect directly carcinogenesis yet. In the present study, nicotine promotes phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) signal, which pathways associated with mitogenic for cells, also the involvement of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ was suggested.

研究分野：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：ニコチン 口腔がん 喫煙

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国や日本における口腔がんの発症率は、がん全体の数パーセントと頻度はあまり高くないが、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。

口腔がんのリスクファクターの一つであるタバコの煙の中には4000種類以上の化学物質が含まれ、そのうち数百種類以上が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一つである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。また、ニコチンは、がん細胞と腫瘍血管の増殖(血管新生の誘発・増大)作用があることが報告されているが、直接的に発がんに影響することは証明されていない。しかし、これは理論上、がんの転移を示唆するものであることからニコチン自身が直接的にがん細胞に作用する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ニコチンは、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レセプター(ニコチン受容体; nAChR)のアゴニストで、同レセプターを介して細胞に作用する。nAChRは、ヒトの神経系組織以外にも血管内皮、肺・気管上皮をはじめ、口腔上皮、食道上皮、神経筋接合部など全身の多くの器官の細胞で発現が確認されている。肺がん(特に非小細胞がん)においては、喫煙者と非喫煙者間でレセプターが異なった発現のパターンを示すことがわかっている。また、nAChRは、5つのサブユニット(α1、α2、α3、α4、α5)が確認されており、さらにサブユニッ

トで10種類、サブユニットで4種類の変異体を持ち、合計17種類が発見されている。

本研究では、ニコチンが与える口腔細胞への影響を検討するために、ニコチン誘導性シグナル伝達経路の解析を行い、また、関連するサブユニットを明らかにし、ニコチンが口腔がん発生に及ぼす分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) ニコチン刺激によるEGFR活性化の解析

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するため、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株(HSC-2)を用い実験を行った。ニコチン(1 μM)を培養上清中に添加し、1時間、2時間後、細胞を回収し、ウェスタンブロット法にて解析した。また、ニコチン刺激24時間後の変化を創傷治癒アッセイを用いて行い、細胞増殖能の検討も行った。本細胞培養・継代はEMEM培地+10%FBS(ウシ胎児血清)を用いて行ったが、実験時は血清の影響を受けないようにニコチン刺激24時間前に10%から0.5%へ交換し血清飢餓状態とした。

(2) ニコチンシグナルとEGFRシグナルとの関連性の解析

ニコチンの刺激によりEGFRシグナルが活性化されることを確認するために、nAChR拮抗薬であるmecamylamine hydrochloride(MCA)をニコチン刺激30分前に投与し、ニコチン投与後1時間で細胞を回収した後、ウェスタンブロット法にて解析を行った。

(3) nAChRサブユニットの解析

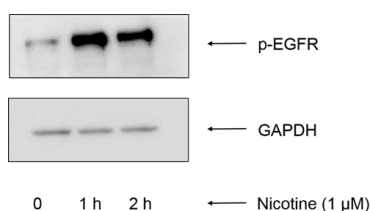
前述のように17種類が確認されているnAChRサブユニットの中で、がんの発生と増殖に関連が高いとされている7受容体に注

目し、HSC-2 細胞において nAChR $\alpha 7$ 選択的拮抗薬である alpha-Bungarotoxin (BTX) を用いて解析を行った。MCA と同様の実験スケジュールでウェスタンブロット法にて解析を行った。

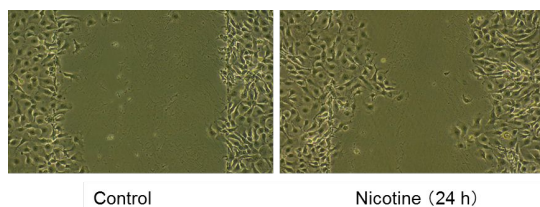
4. 研究成果

(1) ニコチン刺激による EGFR 活性化の解析

ニコチン刺激後 1 時間、2 時間において EGFR のリン酸化を確認した。ニコチンにより EGFR シグナルを活性化することが示唆された。

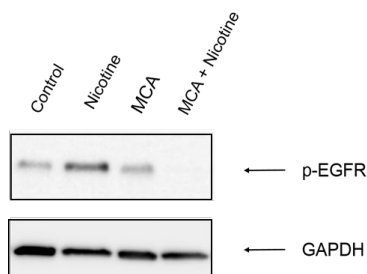


創傷治癒アッセイにてニコチン刺激による細胞増殖能を確認した。ニコチン刺激群は無刺激群に比べ増殖促進が見られた。これによりニコチンの刺激による細胞増殖促進作用が示唆された。



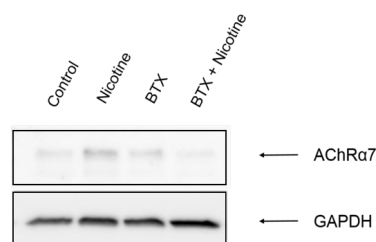
(2) ニコチンシグナルと EGFR シグナルとの関連性の解析

MCA 投与群では、EGFR のリン酸化を誘導しないことを確認した。これによりニコチンが EGFR シグナルの活性化に関与していることが示唆された。



(3) nAChR サブユニットの解析

これまでのニコチン刺激による EGFR 活性化はどのサブユニットが関連しているかについて検討を行った。ニコチン刺激により nAChR $\alpha 7$ の発現が認められたが、BTX 投与群ではその発現が抑制されたことから本実験においては $\alpha 7$ サブユニットが関連していることが示唆された。他のサブユニットの関連性については今後の検討が必要である。



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 2 件)

Kumasaka A, Iikubo M, Nishioka T, Kojima I, Shoji N, Sakamoto M, Sasano T.

Insulin-Like Growth Factor I Inhibits Alveolar Bone Loss Following Tooth Extraction in Rats.

Clin Implant Dent Relat Res.

17(6), 1174-79, 2015. 査読有

doi: 10.1111/cid.12227.

Nishioka T, Luo LY, Shen L, He H, Mariyannis A, Dai W, Chen C.

Nicotine increases the resistance of lung cancer cells to cisplatin through enhancing Bcl-2 stability.

Br J Cancer.

110(7), 1785-92, 2014. 査読有

doi: 10.1038/bjc.2014.78.

〔学会発表〕(計 5 件)

Takashi Nishioka, Hiroyuki Tada, Takashi Sasano. Nicotine exposure through the nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 7$

induces the proliferation of oral cancer cell.

Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science-

2016年1月18日-19日、艮陵会館(仙台)

Takashi Nishioka, Hiroyuki Tada. Nicotine exposure induces the proliferation of oral cancer cell.

第57回歯科基礎医学会学術大会、
2015年9月11日-13日、朱鷺メッセ(新潟)

Takashi Nishioka, Ling-Yu Luo, Ling Shen, Huan He, Alexandros Mariyannis, Takashi Sasano, Changyan Chen. Nicotine exposure increases the resistance of lung and breast cancer cells to cisplatin through enhancing Bcl-2 stability and promotes activation EGFR signal in oral cancer cells.

19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine 2014、

2014年10月9日-11日、Metropolitan Hotel、アテネ、(ギリシャ)

Takashi Nishioka, Ling-Yu Luo, Ling Shen, Huan He, Alexandros Mariyannis, Changyan Chen. Nicotine Exposure Increases the Resistance of Cancer Cells to Cisplatin through Enhancing Bcl-2 Stability.

Thirteenth Scientific Symposium of the Flight Attendant Medical Research Institute.

2014年5月5日-7日、JW Marriott Miami、マイアミ(アメリカ)

Takashi Nishioka, Takashi Sasano. Sensitization of epithelial growth factor

receptors by nicotine exposure may explore oral cancer.

Innovative Research for Biosis-Abiosis Intelligent Interface Symposium -The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science-

2014年1月20日-21日、片平さくらホール(仙台)

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西岡 貴志(NISHIOKA, TAKASHI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 50641875

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし