

論文の内容の要旨

氏名：塩野目 尚

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Anti-Cancer activity of nickel ion -Inhibitory effect on nuclear factor- κ B-

(Ni²⁺イオンによる抗癌作用に関する研究 - NF- κ B 活性の抑制を経て-)

ニッケル (Ni) は歯科治療に用いられる金属材料に含まれ、コバルトイオンなどと共にアレルギーの原因物質として認識されている。さらに、その発癌性に関する報告もあり、総じて生体には有害な物質とされている。しかし、癌細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導促進など癌の進展・増殖に対しては有効である可能性を示唆する報告もあり、種々の論議がなされている。

これまで著者は、Ni イオンが口腔扁平上皮癌細胞株 (oral squamous cell carcinoma cell: OSCC) に対して IL-8 産生を増強するという作業仮説にもとづき検討したところ、予測に反し、Ni イオンによって OSCC の自発的 IL-8 分泌が抑制される事を明らかにした。しかし、Ni がどのようなメカニズムで IL-8 分泌を抑制するかは明らかになっていない。そこで、本研究では Ni イオンによる IL-8 分泌抑制のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

実験に用いた培養細胞は、OSCC (HSC3) であり、10% 牛胎児血清加 RPMI1640 培地を用い、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

Ni は、塩化ニッケルを 1mM に調整し使用した。

HSC3 における IL-8 産生に対する Ni イオン添加の経時的・濃度的変化について実験を行った。その結果、HSC3 による IL-8 分泌は経時的に増加し、Ni イオンの濃度依存的に IL-8 分泌は抑制されることが確認された。HSC3 における IL-8 分泌が、NF- κ B 依存的であるか否かを検討するため、NF- κ B 特異的阻害剤である isohelenin および TPCK を用いて検索したところ、IL-8 分泌は両阻害剤の濃度依存的に抑制された。以上の結果から、HSC3 における IL-8 分泌は NF- κ B 依存的であることが明らかとなった。さらに、real-time PCR による検索の結果、IL-8 の産生増強が転写レベルで調節されていることが判明し、これにもとづき、IL-8 遺伝子調節領域のクローニングを行い、Luciferase assay を行った。その結果、Ni 添加によって luciferase 活性は減少した。これらの結果から、Ni は IL-8 遺伝子発現を抑制していることが示唆された。

NF- κ B は、外来刺激によって I κ B および NF- κ B subunit のリン酸化と両分子の解離、およびそれに続く 2 量体 NF- κ B の p65 および p50 subunit の核移行により活性化される。そこで、Ni イオンによる NF- κ B subunit のリン酸化状態を western blotting 法で検索した。その結果、総 p65 量およびリン酸化 p65 量には、Ni イオン刺激による変化は認めなかった。そこで、p65 および p50 の核移行を Transfer assay により測定したところ、核内に存在する p50 のみが Ni 刺激後、約 40% に減少していることが確認された。さらに免疫蛍光染色の結果、Ni イオンは p50 の核内移行を阻害していることが確認できた。これらの結果から、Ni イオンは p50 の核内移行を阻害することによって NF- κ B 活性を抑制することが明らかとなった。そこで、Ni イオンが細胞質内で直接 p50 に結合し、核への移行を阻害しているという仮説を立て、Ni カラムにより HSC3 の細胞溶解液中の p50 との結合の有無について検討したところ、Ni イオンは p50 と直接結合していることが明らかとなった。p50 の結合部位をさらに詳細に検索する事とし、p50 の全長 cDNA を PCR により増幅し、発現ベクターである pcDNA3.1 にサブクローニングした。これを鋳型とし、p50 の N 末端 1/2 および C 末端 1/2 のみを発現するベクターを構築した。これらを用いて行った免疫沈降実験から、Ni との結合には N 末端 1/2 の領域が必須であることが判明した。Ni イオンはイミダゾール基を有するヒスチジン残基と結合することから、N 末端側 1/2 に存在するヒスチジン残基についてさらに詳細に検討した。この領域には合計 9 のヒスチジン残基が存在するが、このうちの 108, 110, 112 番目の位置にヒスチジン残基のクラスターが存在する。このクラスターを欠損させた mutant を用いた実験から、Ni イオンと p50 との結合にはこのクラスターが決定的に重要であることが明らかとなった。以上の結果は、Ni イオンが転写因子 NF- κ B 活性を阻害することを明らかにしたものである。

癌細胞では、NF- κ B をはじめとする多くの転写因子が恒常的に活性化されており、この活性の程度が癌の

生物学的活性（転移・浸潤など）に相関を示すという点で極めて重要な発見であると考えた。NF- κ B は多くの遺伝子発現に密接に関係する転写因子であり、癌細胞の生活環境を有利に保つべく様々な遺伝子の発現をコントロールしている。つまり、NF- κ B 活性を抑制することは癌の転移や進展の抑制につながり、すなわち癌治療薬としての応用の可能性を示唆するものである。

Matrix metalloproteinase (MMP)は癌の転移にとって極めて重要な因子であり、特に MMP2 や MMP9 などは上皮基底膜の破壊を司る酵素であり、上皮性悪性腫瘍の転移と増殖には必須の分子である。これらの分子の発現は NF- κ B によってコントロールされており、Ni イオンが NF- κ B 活性を抑制するのであれば MMP の発現を抑制することによって癌の治療薬として応用できるのではないかと着想を得た。そこで、Ni による MMP 発現変化について検討し、治療薬としての応用を視野に基礎的データを得ることにした。

Ni イオンが HSC3 細胞における MMP (1, 2, 9, 14) の産生に及ぼす影響について検索するため、HSC3 細胞を 24 穴プレートに 2×10^5 個/well 播種し、Ni 存在下(1mM)、非存在下で刺激培養後、RNA を抽出し、cDNA を作製、real-time PCR により遺伝子発現を測定した。Real-time PCR の結果、HSC3 細胞は検索したすべての MMP を発現していることが明らかとなった。発現の程度は、MMP1 と 14 が高く、これに比較すると MMP2 と 9 は低かった。また、最も発現が高かった MMP1 に対し、Ni 存在下および非存在下での発現を比較すると、Ni 存在下では遺伝子発現は有意に抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、Ni イオンは、NF- κ B 活性の抑制を通じて MMP 発現を抑制する可能性が示唆された。

本研究から、Ni イオンは NF- κ B 活性の抑制を通じて癌の転移・浸潤に関与する MMP 発現を抑制し、抗癌作用を有用する可能性が示唆された。