

## 論文の内容の要旨

氏名：太田裕崇

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ニッケル投与による血管新生阻害を介した口腔扁平上皮癌増殖の抑制

歯科治療に使用される合金に含まれるニッケルは、金属アレルギーの原因となることなどから、生体に対して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を誘導するとも報告されており、抗腫瘍効果について可能性を示唆する報告もあるが、その作用メカニズムや効果については未だに解明されていない。

口腔内に最も多発する悪性上皮性腫瘍は口腔扁平上皮癌 (OSCCs) である。OSCCs では転写因子である NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化されている。これらが活性化することで、癌の増殖、浸潤、転移や腫瘍血管の新生に関与するといわれており、その活性の程度が OSCCs の増殖や転移に大きく影響することが知られている。NF- $\kappa$ B は 5 つのファミリー分子 (p50 (NF $\kappa$ B1), p52 (NF $\kappa$ B2), p65 (RELA), c-Rel (REL), RelB (RELB)) から構成されており、このうちの 2 分子により形成された 2 量体が遺伝子の転写に関与する。NF- $\kappa$ B の標的遺伝子には、癌の転移に関係するもののみならず、炎症や免疫反応に関連するものなど多くの因子が知られており、NF- $\kappa$ B は最も研究の進んでいる転写因子である。NF- $\kappa$ B 活性は前癌病変から OSCCs へと移行するにつれて増加することから、癌の増殖に重要な影響を及ぼすと考えられている。Shionome らは、ニッケルイオンが NF- $\kappa$ B p50 サブユニットに直接結合し、核移行を阻害することにより、IL-8 分泌を抑制することを解明した。

Matrix metalloproteinases (MMPs) は、細胞外マトリックスのリモデリングにとって重要な役割を担っており、現在まで 20 種類以上のファミリー分子の存在が明らかにされている。MMPs は、亜鉛依存型エンドペプチダーゼファミリーに属し、主な機能の一つに基底膜の分解がある。癌細胞の浸潤増殖は基底膜の破壊に始まることから、MMPs 発現の制御は癌治療の指標となり得る。なかでも MMP2 と MMP9 は、基底膜の主な成分である IV 型コラーゲンを基質としていることから、OSCCs における MMP2 と MMP9 の発現等は広く研究されている。この MMPs 発現は、その一部が NF- $\kappa$ B に依存していることが判明している。

そこで、ニッケルイオンが NF- $\kappa$ B 活性を抑制することにより、MMPs 発現を抑制するのではないかと、さらに、Shionome らによって示されたニッケルイオンによる IL-8 産生抑制は、癌細胞による血管新生の抑制につながるのではないかとという作業仮説を立てた。本研究では、癌細胞の浸潤増殖に関与する MMP9 に注目し、ニッケルイオンによる MMP9 発現と血管新生因子である IL-8 および VEGF の産生に及ぼす影響と、OSCCs の転移や増殖を抑制する効果について研究することとした。

実験に用いた細胞は、ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞 (HSC3) およびそのサブクローンである HSC3-M3 を用いた。試薬としてのニッケルイオンは塩化ニッケル (NiCl<sub>2</sub>) を 1 mM に調整し使用した。MMP9 発現に対するニッケルイオンの効果についてリアルタイム PCR を用いて検討したところ、ニッケルイオン刺激下では MMP9 発現が低下した。さらに、MMP9 発現抑制が転写レベルで調節されていることを確認するため、MMP9 遺伝子の 5'-UTR を用いたルシフェラーゼアッセイで検索したところ、ニッケルイオンが転写レベルにおいても MMP9 発現を低下させることが明らかになった。そこで、ニッケルイオン刺激が MMP9 発現に及ぼす影響について *in vivo* モデルを用いて検討した。HSC3 をヌードマウスの舌に接種し、腫瘍形成を確認後、1 mM NaCl<sub>2</sub> を含有する水 (ニッケル刺激群) または未含有の水 (ニッケル非刺激群) を 7~14 日間与えて飼育した。腫瘍組織における MMP9 発現の変化を免疫染色により検討したところ、ニッケル非刺激群と比べ、ニッケル刺激群では MMP9 の発現が低下した。次に、MMP9 発現の抑制が癌の増殖や転移にどのような影響を与えているかを検討するために、HSC3 をヌードマウスの舌に接種、腫瘍形成を確認後、上述と同じようにニッケル刺激群とニッケル非刺激群に分けて飼育し、造影剤を注射し、CT 撮影と HE 染色による組織学的観察を行った。舌の腫瘍病巣における CT 画像では、ニッケル非刺激群では境界明瞭な腫瘍塊がみられ、ニッケル刺激群では癌領域中に高い透過領域が観察された。組織学的観察では、ニッケル非刺激群では

充実性の腫瘍胞巣が形成されていたのに対して、ニッケル刺激群では腫瘍胞巣中に広い壊死領域が認められた。この壊死領域の形成は HSC3 における NF- $\kappa$ B の恒常的な活性がニッケルイオン刺激により抑制され、血管新生因子の分泌が阻害され、低酸素環境の形成と細胞の壊死を誘導したものと考えられた。そこで、血管新生因子である IL-8 と VEGF の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて比較したところ、ニッケル非刺激群に比べてニッケル刺激群において IL-8 と VEGF 発現とも有意に減少した。したがって、上述した仮説が裏付けられたと考えられる。また、所属リンパ節への癌細胞の転移の状況を、ヒト  $\beta$  グロビン遺伝子発現を nested-PCR を用いて比較した。原発巣においてヒト  $\beta$  グロビン遺伝子はニッケル非刺激群、ニッケル刺激群ともに同程度検出された。一方、リンパ節ではヒト  $\beta$  グロビン遺伝子がニッケル非刺激群と比べて、ニッケル刺激群で著明に減少したことから、リンパ節への転移を抑制することが示唆された。

ニッケルイオンがどのような方法で細胞内に入るのかという根本的な問題は未だに不明であるが、以上の結果は、ニッケルイオンを新たな癌治療薬として応用し得る可能性を示唆するものであり、臨床きわめて有意義な結果であると考えた。