

ニコチンが口腔癌の増殖および リンパ節転移に与える影響に関する研究

兒玉 真一

The study on the effect of nicotine on proliferation and
lymph node metastasis in oral cancer

Shinichi KODAMA

(平成 24 年 12 月 14 日 受付)

緒 言

喫煙は発癌や癌の進行に関連する¹⁾。国際がん研究機関 (IARC) の因果関係評価によると、喫煙は口腔、咽頭、喉頭、肺癌、食道、胃、大腸、肝臓、膵臓、腎細胞、腎盂・尿管、膀胱、子宮頸、卵巣に対して発癌性ありと判定されている。特に、口腔、咽頭、喉頭、肺などのタバコ煙に直接的に曝露する臓器の危険性が高い²⁾。

タバコ煙は粒子相と気相に分類され、粒子相はタールとニコチン、気相は一酸化炭素などの毒性物質をそれぞれ含む。タールはベンゾピレンやニトロソアミンなどの発癌性物質を多く含有する³⁾。ニコチンは依存症に関与するが発癌性物質ではない⁴⁾。そのため禁煙治療には、ニコチンをガムやパッチなどの形態で補給するニコチン置換療法が行われる³⁾。

タバコ煙中のニコチンは、大部分が肺胞から吸収され、残りは口腔、気道、胃、腸管の粘膜から吸収される^{5,6)}。ニコチンは、神経伝達物質であるアセチルコリンに分子構造が類似するため、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor : 以下nAChR) に結合する⁷⁾。nAChRは α 1-10, β 1-4, γ , δ , ϵ のサブユニットから構成されるホモもしくはヘテロ5量体であり、中枢神経系や神経筋接合部に存在する⁸⁾。ニコチンが中脳の腹側被蓋野に存在するnAChRに結合すると、視床下部にある側坐核に過剰のドーパミンが放出され、前頭葉へ投射されることにより (報酬系), 多幸感や覚醒作用をもたらす。これが繰り返されニコチン依存症が獲得される⁹⁾。

nAChRは主に神経系に局在すると考えられていた。しかし気管支上皮, 尿路上皮細胞, 皮膚細胞, 血管内皮細胞, 血管平滑筋細胞などの非神経細胞にも広く存在することが明らかになった¹⁰⁻¹⁷⁾。また肺癌, 乳癌, 膵癌, 大腸癌でも発現を認め, 腫瘍増殖の促進に関与することが報告された¹⁸⁻²¹⁾。

口腔は最も早期にタバコ煙中のニコチンに曝される臓器である。正常口腔粘膜上皮においては nAChR 発現が認められ, 分化, アポトーシス, シグナル伝達を促進する。口腔癌細胞についての報告は全くない。正常上皮と同様に, 口腔癌細胞においても nAChR 発現が認められる可能性が推測されるが, その役割については全く分かっていない。そこで本研究では, ニコチン-nAChR 系が口腔癌細胞の増殖・転移に与える影響について検討を行った。

材料ならびに方法

1. 細胞培養

本研究には、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3 (RIKEN より供与, 茨城), OSC-19, OSC-20 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより供与, 大阪) 細胞を使用した。培養には、56 °Cで 30 分間熱処理を行うことで非動化した 10 % ウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum, 以下 FBS : JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA) および 1 % ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium と Ham F-12 Medium の等量混合培地 (以下 DMEM/F12 : Invitrogen) を用い、5 % CO₂, 37 °C で培養した。細胞に作用させるニコチン濃度は、喫煙者の血中ニコチン濃度が 0.1~1μM であるとの報告と、培養細胞を用いた諸家の報告を参考に決定した。ニコチン (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を Dulbecco's Ca²⁺, Mg²⁺ 不含 Phosphate Buffered Salts (以下 PBS : TaKaRa, 滋賀, 日本) に 0.5μM で溶解し用いた。

2. マウスリンパ節転移モデルの作製

癌のリンパ節転移の評価には、癌細胞浮遊液をヌードマウス足底の皮下に移植するリンパ節転移動物実験モデルを用いた。まずサブコンフルエントな状態になるまで OSC-19 細胞を培養し、移植を行う 24 時間前に培地の交換を行った。0.25% トリプシン-0.01% EDTA 液で細胞を分散し、DMEM/F12 で 1.6×10⁷ 個/ml になるように調整し、癌細胞浮遊液を作製した。5 週齢雄 BALB/C 系 nu/nu ヌードマウス (日本クレア, 東京, 日本) をエスカイン吸入麻酔薬 (マイラン製薬, Pennsylvania, USA) により吸入麻酔を行い、30 ゲージ注射針を用いて足底皮下に癌細胞浮遊液を 50μl (8×10⁵ 個) 移植した。癌細胞の移植の翌日から、ニコチンを PBS で溶解し (1.5mg/kg, 30μg/mouse), 隔日で腹腔内注射した。移植 2 週

間後から腫瘍体積を経時的に計測した。移植 6 週間後にマウスを屠殺し、足底の原発巣と膝下リンパ節をそれぞれ摘出して、10%中性緩衝ホルマリンで 24 時間浸漬した。続いて冷エタノール系列で脱水後、パラフィンに包埋した。厚さ 4 μ m で切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (Hematoxilin & Eosin : HE) 染色を行い組織学的に検討した。

原発巣におけるリンパ管新生は、抗マウス LYVE1 ウサギポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, UK) を用い、免疫組織化学的に検討を行った。組織切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素を含むメタノールによる内因性ペルオキシダーゼ阻害を行った。抗原性の再賦活化法としては 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理を行った。1次抗体には抗ヒト LYVE1 ウサギポリクローナル抗体を 1:100 に希釈した。2次抗体には Envision+ system-HRP Labelled Polymer Anti-rabbit (Dako, Carpinteria, CA, USA) を用いた。発色はホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) を用いた酵素抗体法 (Envision system, Dako, Carpinteria, CA, USA) を使用した。

なお、この実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い行った。

3. 細胞増殖能の検討

6well micro プレートに OSC-19 細胞を 1×10^5 個ずつ播種し、無血清 DMEM/F12 で 24 時間培養後、全自動セルカウンター TC10TM (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて細胞数を計測した。計測後に培地を 0.5%FBS 含有 DMEM/F12 に交換後、ニコチンを添加し経時的に計測を行った。

4. 細胞運動能の検討

細胞運動能の検討は wound healing assay で評価を行った。OSC-19 細胞を 6cm

シャーレ上で 10%FBS 含有 DMEM/F12 で培養した。細胞密度がサブコンフルエントに達した後、無血清培地で 24 時間培養し、シャーレ上をプラスチックチップで引っ掻き、模擬的な創傷を作製し経時的に創傷面積を測定した。作製直後の創傷面積からの差を計算し評価した。面積の測定は画像解析ソフト Image J (Version1.43r, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いた。

5. 細胞遊走能の検討

24well マトリゲルインベージョンチャンバー (BD Falcon, New Jersey, USA) のノンコートインサートを使用した。ポアサイズ $8\mu\text{m}$ のメンブレン上層に OSC-19 細胞を 3×10^4 個ずつ播種し、下層にニコチンを加え、24 時間後に遊走能を検討した。メンブレン下層の細胞はディフ・クイック (国際試薬株式会社, 兵庫) で固定・染色し、細胞数を計測して評価した。

6. 細胞浸潤能の検討

24well マトリゲルインベージョンチャンバーを使用した。ポアサイズ $8\mu\text{m}$ のメンブレン上層に OSC-19 細胞を 3×10^4 個ずつ播種し、メンブレン下層にニコチンを加え、24 時間後に浸潤能を検討した。メンブレン下層の細胞はディフ・クイック (国際試薬株式会社, 兵庫) で固定・染色し、細胞数を計測して評価した。

7. 受容体発現の検討

nAChR の発現は定量的リアルタイム RT-PCR で評価した。口腔扁平上皮細胞における nAChR は $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$, $\beta 4$ のサブユニットの存在が報告されている。OSC-19 細胞を 6 cm シャーレに播種し、サブコンフルエントに達した時点で無血清培地に交換後、24 時間培養を行った。ニコチンを添加し 8 時間培

養後に RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA 量は, Nano Vue (GE Healthcare, UK) を用いて測定した。定量した total RNA を, TaKaRa RNA PCR Kit (TaKaRa, 滋賀, 日本) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を作製した。定量的リアルタイム RT-PCR 法には, Chromo4 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を使用した。cDNA と 10 μ M の各プライマーおよび SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, 大阪, 日本) を使用し PCR 反応を行った。内部標準として β -actin mRNA の定量を上記と同様の条件で行った。各種プライマーの塩基配列を以下に示す。

標的遺伝子	プライマーの塩基配列
$\alpha 3$	F : 5'-CCATGTCTCAGCTGGTG-3' R : 5'-GTCCTTGAGGTTTCATGGA-3'
$\alpha 5$	F : 5'-CTGCTGCTCTTGGTCCAGCT-3' R : 5'-TAAAAGAGAGGCAGGCGCTTG-3'
$\alpha 7$	F : 5'-CTCCTGCACTGCGGCGCAT-3' R : 5'-TAGAGTGTCTCCTGCGGCGCAT-3'
$\alpha 9$	F : 5'-GAAAGCAGCCAGGAACAAAG-3' R : 5'-GCACTTGCGGATGTACTCAA-3'

$\beta 2$ F : 5'-CAGCTCATCAGTGTGCA-3'
R : 5'-GTGCGGTCGTAGGTCCA-3'

$\beta 4$ F : 5'-CTGAAACAGGAATGGACT-3'
R : 5'-CCATGTCTATCTCCGTGT-3'

β -Actin F : 5'-GACGATATCGCTGCGCTGGT-3'
R : 5'-CTTGCTCTGGGCCTCGTCAC-3'

8. 細胞内シグナル伝達経路の検討

細胞内シグナル伝達経路はウエスタンブロット法を用い検討した。nAChR の非選択的阻害薬であるメカミラミン塩酸塩 (SIGMA, St.Louis, MO, USA) と $\alpha 7$ 選択的阻害薬の α -ブンガロトキシシン (abcam, Cambridge, UK) を用い, Akt と ERK のリン酸化について検討した。

OSC-19 細胞がサブコンフルエントに達した時点で無血清培地に交換後, 24 時間培養を行った。その後メカミラミン塩酸塩 (50nM), α -ブンガロトキシシン (1 μ M) をそれぞれ添加し 1 時間後にニコチンを添加した。細胞溶解液 [50mM Tris(ph7.2), 150mM NaCl, 1%NP-40, 0.5%Deoxycholate, 1mM sodium vanadate, 20mM leupeptin, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1% aprotinin] で細胞を可溶化し蛋白を回収した。蛋白濃度は Protein Assay System® (Thermo, Rockford, USA) を用いて定量を行なった。20 μ g の蛋白質を含む各サンプルを Sample buffer(Bio-Rad)と β -メルカプトエタノールと混合して 95°C, 5 分間の加熱によっ

て還元した後に、泳動用緩衝液(Tris, Glycine, SDS)を用いてポリアクリルアミドを10%含有するゲルにて100Vの定電圧下にて約80分間泳動することで蛋白を分画した。分画した蛋白は転写用緩衝液(Tris, glycine, methanol)中100Vの定電圧下にて90分間ポリフッ化ビニリデン膜(以下PVDF膜: Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA)へ転写した。そのPVDF膜は1%BSA溶液に60分浸して、ブロッキング操作を行なった。その後、1次抗体としてAkt, pAkt Ser473, ERK1/2, pERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA)をCan get signal®Solution1 (TOYOBO, 大阪, 日本)に1:1000で希釈し4°Cでovernightにて反応させた。2次抗体はHRP標識ポリクローナル抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)をCan get signal® Solution2 (TOYOBO, 大阪, 日本)に1:1000で希釈し、90分間反応させた後、ECLシステム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてX線フィルムに化学発光した。

9. 統計分析

有意差検討には unpaired Student's t-検定, chi-square test を用いて行い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. ニコチンがリンパ節転移モデルに与える影響

OSC-19細胞を5週齢雄のヌードマウスの足底の皮下に移植し(図1-A)、ニコチン投与群と対照群の腫瘍体積を経時的に計測した(図1-B)。腫瘍の定着を認めたのは、ニコチン投与群と対照群それぞれ30匹中23匹であり同数であった。両

群ともに経時的に腫瘍体積は増加し、移植6週間後に腫瘍体積はニコチン投与群 $298.3 \pm 66.4 \text{mm}^3$ 、対照群 $181.4 \pm 69.7 \text{mm}^3$ になった。ニコチン投与群が対照群と比べて有意に腫瘍体積が大きかった。

膝下リンパ節への転移については、摘出したリンパ節をH-E染色し評価した (図1-C)。対照群は23匹中3匹 (13%) に、ニコチン投与群は23匹中9匹 (39%) にそれぞれ転移巣を認め、ニコチン投与群が対照群に比べて有意にリンパ節転移を高い頻度で認めた (図1-D)。

また原発巣におけるリンパ管新生については、リンパ管内皮細胞の特異的マーカーであるLYVE1に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討した (図1-E)。リンパ管密度の高い部位を100倍視野下で3視野選び、リンパ管数を計測して平均値を算出し評価した。リンパ管数はそれぞれ対照群 18.5 ± 7.2 個、ニコチン投与群 18.1 ± 9.3 個でリンパ管数には有意差は無く、ニコチン投与によりリンパ管新生の亢進は認められなかった (図1-F)。

2. ニコチンがヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖、運動、遊走、浸潤に与える影響

HSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20を用いて細胞増殖能を検討した。いずれの細胞においてもニコチン添加群が対照群と比較して増殖能を促進していた (図2-A)。

OSC-19細胞を用いてwound healing assayで運動能を検討した (図2-B)。ニコチン添加群が対照群と比較して創傷面積を縮小させ、運動能が有意に促進していた (図2-C)。

OSC-19細胞を用いてmigration assayで遊走能を検討した (図3-A)。メンブレン下層へ遊走した細胞数は、対照群 196.7 ± 17.6 個、ニコチン添加群 302.7 ± 24.2 個で

あり、運動能と同様にニコチン添加群が対照群と比較して遊走能が有意に促進していた (図3-B)。

OSC-19細胞においてマトリゲルインベージョンチャンバーを用いたinvasion assayで浸潤能を検討した (図3-C)。マトリゲルを破壊しメンブレン下層へ浸潤した細胞数は、対照群 121.7 ± 29.3 個、ニコチン添加群 254 ± 48.6 個であり増殖能、運動能、遊走能と同様にニコチン添加群が対照群と比較して浸潤能が有意に促進していた (図3-D)。

3. ニコチンがOSC-19細胞のnAChRに与える影響

OSC-19細胞のnAChRの発現は定量的リアルタイムRT-PCRで評価した (図4)。口腔扁平上皮細胞での発現が報告されている $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$, $\beta 4$ のサブユニットについて検討した。ニコチン添加8時間後にtotal RNAを抽出し、定量的リアルタイムRT-PCRを行ったところ、ニコチン添加群は対照群と比較して $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ の発現増加を認めた。 $\alpha 9$ についてはニコチン添加により対照群と比較して増加傾向を示したが、有意差は認めなかった。

4. ニコチンがOSC-19細胞の細胞内シグナル伝達経路に与える影響

ニコチンがOSC-19細胞の細胞内シグナル伝達経路に与える影響を検討するためにウエスタンブロット法を用いて評価した (図5)。nAChRの非選択的阻害剤メカミラミン塩酸塩と $\alpha 7$ 選択的阻害剤 α -ブンガロトキシンを添加し、ニコチンによるAktおよびERKのリン酸化の発現について検討した。OSC-19細胞にニコチンを添加したところ、リン酸化ERKは経時的に上昇し、ニコチン添加30分後に最大となった。しかし、メカミラミン塩酸塩および α -ブンガロトキシンを添加してもリン酸化ERKの発現の減少を認めなかった。またリン酸化Aktもニコチン

添加により発現の増加を認めた。メカミラミン塩酸塩添加および α -ブンガロトキシンの添加によってリン酸化Aktの発現が減少していた。

考 察

喫煙は口腔癌の危険因子である¹⁾。本邦における喫煙と口腔癌での死亡についての相対リスクは男性で2.7, 女性で2.0である²²⁾。タバコの成分の1つであるニコチンは世界保健機関の国際疾病分類第10版 (ICD-10) で規定される依存性薬物である²³⁾。ニコチンに発癌性は認めないが, 細胞増殖や血管新生を促進しアポトーシスを抑制することで, 肺癌, 乳癌, 膵癌の増殖と転移に影響を与えると報告されている²⁴⁾。

最近の研究で, 不死化口腔扁平上皮細胞と口腔癌細胞においてニコチンが細胞周期や分化に関与することが明らかになった²⁵⁾。しかし, ニコチンが口腔癌の増殖や転移に与える影響についての報告はない。本研究では, 口腔癌細胞をヌードマウスの足底皮下に移植してリンパ節転移モデルを作製し, 原発巣の腫瘍体積とリンパ節転移の頻度を評価した。ニコチン投与群は対照群と比較して腫瘍体積が増大し, リンパ節転移は促進されていた。

腫瘍体積の増加については, 肺癌細胞を用いた動物モデルにおいても報告されている¹⁸⁾。これはヌードマウス背部皮下に肺癌細胞を移植し, ニコチンを腹腔内投与もしくはパッチの形態で経皮的に投与した。腹腔内投与群, パッチ群ともに腫瘍体積の増大を認めた。本研究において用いた口腔癌細胞株のいずれにおいても, ニコチン添加群は対照群と比較して有意に細胞増殖が促進されて

いた。これは、現在までにニコチンによる細胞増殖の促進効果の報告があった肺癌、乳癌、膵癌と同様の結果である。細胞増殖については動物実験の結果と整合しており、ニコチンが口腔癌細胞において腫瘍増殖に影響を与えられたと考えられた。

癌組織内ではリンパ管新生が誘導されている²⁶⁾。リンパ管新生はリンパ管内皮細胞が遊走し、増殖して新しいリンパ管を形成する一連の過程である。癌組織内のリンパ管数が増えることで、癌細胞がリンパ管内に浸潤する割合が増加し、リンパ節転移が惹起される。本研究において、ニコチンはリンパ節転移を促進した。ニコチンによって原発巣でのリンパ管新生が誘導されているか否かについて、リンパ管内皮細胞の特異的マーカーLYVE1 に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。ニコチン投与群と対照群でリンパ管数に有意差は認められず、ニコチンによってリンパ管新生は促進されていなかった。本研究において認められたニコチンによるリンパ節転移の頻度の増加は、リンパ管新生以外に原因があると考えられた。

ニコチンはさまざまな癌細胞の浸潤・転移に影響を与える²⁴⁾。本研究では口腔癌細胞の運動能、遊走能、浸潤能についても、ニコチン添加群と対照群で比較検討した。これらはいずれもニコチン添加群が対照群よりも有意に促進していた。乳癌細胞においても PKC や cdc42 などのシグナル伝達因子を介しニコチンが運動能を亢進し、肺転移を促進しているとの報告がある²⁰⁾。また肺癌細胞においてもニコチンは浸潤能を促進する²⁷⁾。以上のことから、ニコチン投与によるリンパ節転移の促進については、癌細胞の運動能、遊走能、浸潤能の亢進が関与すると考えられた。

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT, 上皮間葉移行) は上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり, 癌細胞の浸潤に関連する。肺癌細胞と乳癌細胞において, ニコチン曝露により上皮系マーカーの E-カドヘリンと β -カテニンの減弱と, 間葉系マーカーのフィブロネクチンとビメンチンの増強を認め, 上皮間葉移行を認めたと報告されている²⁴⁾。本研究では, ニコチン刺激で口腔癌細胞の明らかな形態的变化は認めなかったが, 上皮間葉移行が関与している可能性はあると考えられる。

口腔粘膜上皮細胞での発現が既に報告されている nAChR サブユニット $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9, \beta 2, \beta 4$ について, 口腔癌細胞において検討した。 $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 9, \beta 2, \beta 4$ サブユニットの発現を認め, ニコチンの添加により $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$ サブユニットの発現は増加した。口腔癌細胞ではニコチンにより nAChR 発現が制御されていた。ニコチンによる nAChR サブユニットの発現変化については, 肺癌細胞では発現増加を, 乳癌細胞では発現の変化を認めず, 細胞種により異なるようである^{18,20)}。肺癌や大腸癌においては $\alpha 7$ サブユニットが細胞増殖に関与していると考えられている^{18,19)}。また膵癌においては, ニコチンは nAChR 下流のシグナル伝達因子を活性化させることで, 細胞増殖や転移をもたらし, $\alpha 7$ サブユニットの阻害によって細胞増殖は抑制されたと報告された²¹⁾。また口腔扁平上皮細胞において $\alpha 7$ サブユニット 下流の ERK1/2 経路を活性化することが報告されている²⁵⁾。ERK1/2 経路は細胞増殖に関与することが報告されている²⁸⁾。本研究ではニコチン添加により ERK1/2 活性化を認めた。しかし nAChR 阻害剤のメカミラミン塩酸塩や α -ブンガロトキシシン添加で ERK1/2 活性化の低下を認めなかった。 α -ブンガロトキシシンは $\alpha 7$ 選択的阻害剤であり, メカミラミン塩酸

塩は nAChR の非選択的阻害剤である。ERK1/2 の活性化については、口腔癌細胞においてメカミラミン塩酸塩および α -ブンガロトキシンでは阻害できない nAChR サブユニットの存在を推測させるが、詳細は分からない。ニコチンが活性化させる ERK1/2 経路を介して細胞増殖が促進された可能性がある。また細胞の生存とアポトーシスの調整に重要な役割を果たす Akt は、ニコチン添加により活性化を認めた。メカミラミン塩酸塩および α -ブンガロトキシンを添加したところ Akt のリン酸化の抑制を認めた。これはニコチンが nAChR を介し Akt 経路を活性化していると考えられた。また、少なくとも Akt の活性化に関与している nAChR サブユニットに $\alpha 7$ が含まれると考えられる。口腔癌細胞においてニコチンが Akt 経路を活性化することで抗癌剤耐性に関与することが報告されている²⁵⁾。活性化した Akt がアポトーシスを抑制的に働く survivin 蛋白の発現を増加させることで抗癌剤であるシスプラチンが促進するアポトーシスを阻害した。原発巣から離脱した癌細胞は、足場依存性の成長を“阻害され”アポトーシス（アノイキス）が促進される。本研究において、原発巣を離脱しリンパ管に侵入した細胞において促進されるアポトーシスを、ニコチンが抑制している可能性が考えられた。

まとめ

口腔癌細胞において、ニコチンは nAChR の発現を増加させ、シグナル伝達因子 Akt および ERK を活性化し、細胞増殖とリンパ節転移を促進している可能性があると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、御懇切なる御指導と御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野、佐々木 朗教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導いただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野、伊原木 聰一郎博士に感謝いたします。また、様々な面で多くの貴重な御援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野および岡山大学病院口腔外科（病態系）の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Burns, D.M. : Tobacco-related diseases. *Semi Oncol Nurs.*, **19**, 244-249, 2003.
- 2) Tobacco Smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum.*, **38**, 1986.
- 3) 入山公成 :ニコチン依存症とニコチン置換療法のための製剤. *薬剤学.*, **69**, 167-175, 2009.
- 4) Benowitz, N.L. : Neurobiology of nicotine addiction : implications for smoking cessation treatment. *American Journal of Medicine.*, **121**, 3-10, 2008.
- 5) 西口榮子, 鈴木幸江, 金子和美, 塗々木和男, 増水卸町, 槻木恵一, 川瀬俊夫 : 歯根膜線維芽細胞の形態変化におよぼすたばこ煙とニコチンの影響. *日本歯周病学会会誌.*, **50**, 238-249, 2008.
- 6) 川村浩樹, 伊藤弘, 鴨井久一, : ヒト歯肉由来培養細胞に対するニコチンの毒性について. *歯学.*, **84**, 366-372, 1996.
- 7) 村松郁延, 朱軍, 谷口隆信 : 神経系に作用する薬物マニュアル1998. *生体の科学.*, **49**, 343-345, 1998.
- 8) Coe, J.W., Brooks, P.R., Vetelino, M.G. : Varenicline: an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J Med Chem.*, **48**, 3474-3477, 2005.
- 9) 鈴木幸男, 竹下啓, 平岡理佳, 土本寛二 : ニコチン依存症. *治療.*, **91**(増刊), 881-884, 2009.
- 10) Heusch, W.L., Maneckjee, R. : Signalling pathways involved in nicotine

- regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis.*, **19**, 551–556, 1998.
- 11) Minna, J.D. : Nicotine exposure and bronchial epithelial cell nicotinic acetylcholine receptor expression in the pathogenesis of lung cancer. *J Clin Invest.*, **111**, 31–33, 2003.
 - 12) Guo, J., Chu, M., Abbeyquaye, T., Chen, C.Y. : Persistent nicotine treatment potentiates DHFR amplification in rat lung epithelial cells as a consequence of Ras activation. *J Biol Chem.*, **280**, 30422-30431, 2005.
 - 13) Xu, L., Deng, X. : Protein kinase C promotes nicotine induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of A- and m-calpains. *J Biol Chem.*, **281**, 4457-4466, 2006.
 - 14) Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Jolkovsky, D.L., Pinkerton, K.E., Grando, S.A. : Receptor-mediated tobacco toxicity : cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/ STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J.*, **20**, 2093–2101, 2006.
 - 15) Zhu, B.Q., Heesch, C., Slievers, R.E. : Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res.*, **4**, 191–196, 2003.
 - 16) Li, S., Zhao, T., Xin, H. : Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit mediates migration of vascular smooth muscle cells toward nicotine. *J Pharmacol Sci.*, **94**, 334–338, 2004.
 - 17) Ye, Y.N., Liu, E.S.L., Shin, V.Y., Wu, W.K.K., Luo, J.C., Cho, C.H. :

Nicotine promoted colon cancer growth via epidermal growth factor receptor, c-src, and 5-lipoxygenase-mediated signal pathway.

J Pharmacol Exp Ther., **308**, 66–72, 2004.

- 18) Davis, R., Rizwani, W., Banerjee, S., Kovacs, M., Haura, E., Coppola, D., Chellappan, S. : Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLoS One.*, **4**, e7524, 2009.
- 19) Cucina, A., Dinicola, S., Coluccia, P., Proietti, S., D'Anselmi, F., Pasqualato, A., Bizzarri, M. : Nicotine stimulates proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer cell lines through activation of survival pathways. *J Surg Res.*, **178**, 233-241, 2012.
- 20) Guo, J., Ibaragi, S., Zhu, T., Luo, L.Y., Hu, G.F., Huppi, P.S., Chen, C.Y. : Nicotine promotes mammary tumor migration via a signaling cascade involving protein kinase C and CDC42. *Cancer Res.*, **68**, 8473-81, 2008.
- 21) Al-Wadei, M.H., Al-Wadei, H.A., Schuller, H.M. : Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop that is activated by nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3$, $\alpha 5$, and $\alpha 7$. *Mol Cancer Res.*, **10**, 239-249, 2012.
- 22) Katanoda, K., Marugame, T., Saika, K., Satoh, H., Tajima, K., Suzuki, T., Tamakoshi, A., Sugane, S., Sobue, T., : Population attributable fraction of mortality associated with tobacco smoking in Japan: a pooled analysis of three large-scale cohort studies. *J Epidemiol.*, **18**, 251-264, 2008.
- 23) 加濃正人, : ニコチンの心理的依存. *日本アルコール精神医学雑誌.*

- 15, 3-14, 2008.
- 24) Dasgupta, P., Rizwani, W., Pillai, S., Kinkade, R., Kovacs, M., Rastogi, S., Banerjee, S., Carless, M., Kim, E., Coppola, D., Haura, E., Chellappan, S., : Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer.*, **124**, 36-45, 2009.
- 25) Xu, J., Huang, H., Pan, C., Zhang, B., Liu, X., Zhang, L., : Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, **36**, 739-744, 2007.
- 26) 久保肇, : リンパ管新生とリンパ行性癌転移機構. *J Jpn Coll Angiol.*, **48**, 131-135, 2008.
- 27) Xu, L., Deng, X., : Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J Biol Chem.*, **279**, 53683-53690, 2004.
- 28) 小原祐太郎, 中畑則道, Philip J.S.Stork., : 神経系細胞におけるcAMPによるERK1/2活性化のシグナル伝達について. *日本薬理学雑誌.*, **133**, 63-68, 2009.

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔顎顔面外科学分野

(主任：佐々木 朗教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 30 回日本口腔腫瘍学会総会 (2012 年 1 月, 埼玉)

第 66 回日本口腔科学会総会 (2012 年 5 月, 広島)

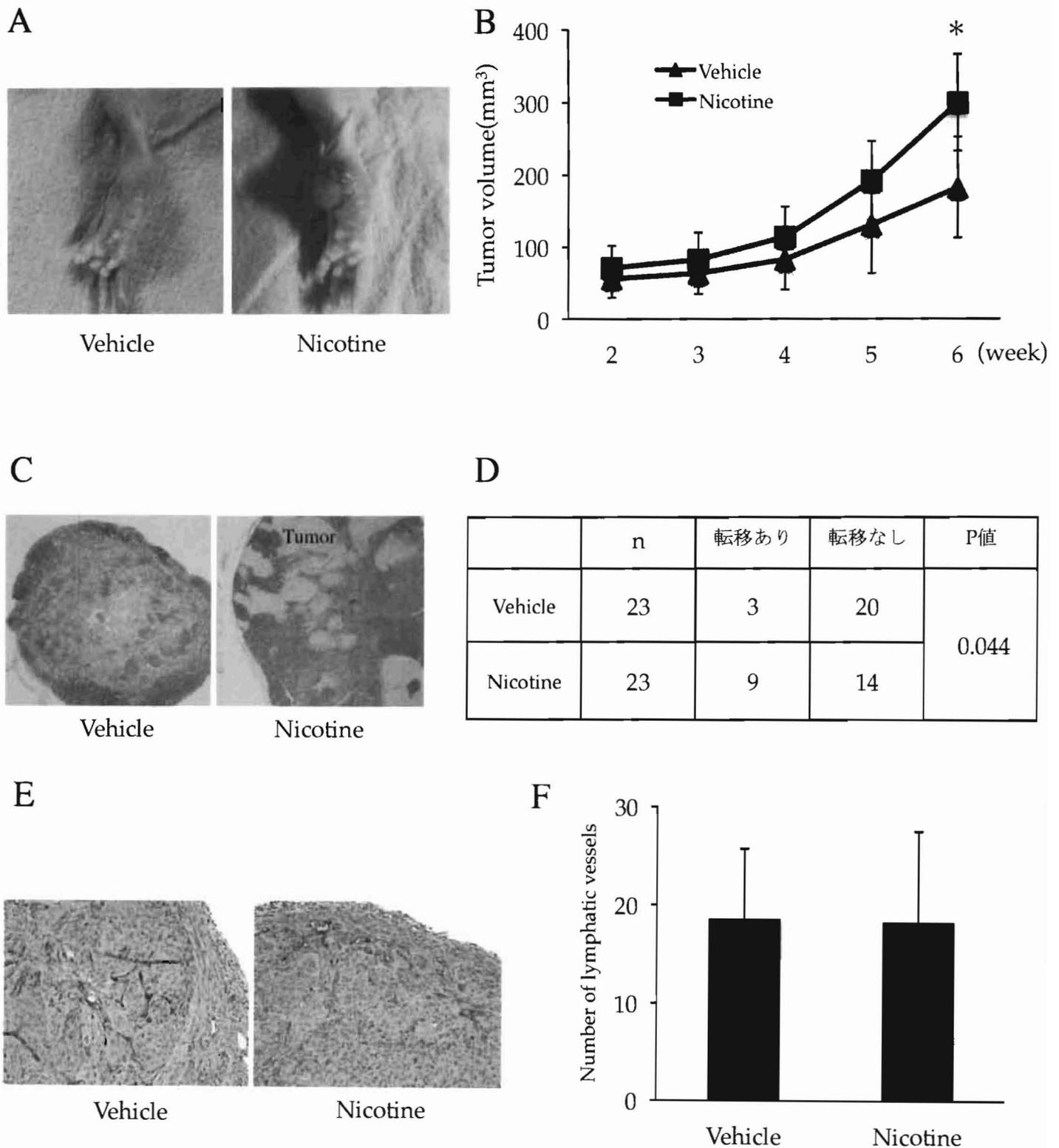


図1：ニコチンがマウスリンパ節転移モデルにおける原発巣と転移巣に与える影響

ヒト口腔扁平上皮癌細胞OSC-19を5週齢雄ヌードマウスの足底皮下に 8×10^5 個移植した。移植6週後の写真(A)を示す。移植翌日から隔日にPBSで溶解したニコチンを1.5mg/kg(約30 μ g)で腹腔内注射した。移植2週後から腫瘍体積を経時的に計測した(B)。移植6週間後にマウスを屠殺し、膝下リンパ節を摘出した。摘出したリンパ節のH.E.染色を行い(C)、転移リンパ節数を検討した(D)。原発巣も摘出し、抗LYVE1抗体で免疫組織化学染色を行い(E)、リンパ管密度の高い部位を100倍視野下で3視野選び、リンパ管数を計測して平均値を算出し、リンパ管新生について評価した(F)。平均値 \pm 標準偏差(n=3)を示す。

*：対照群に対するニコチン添加群の統計的有意差を示す(p<0.05)。

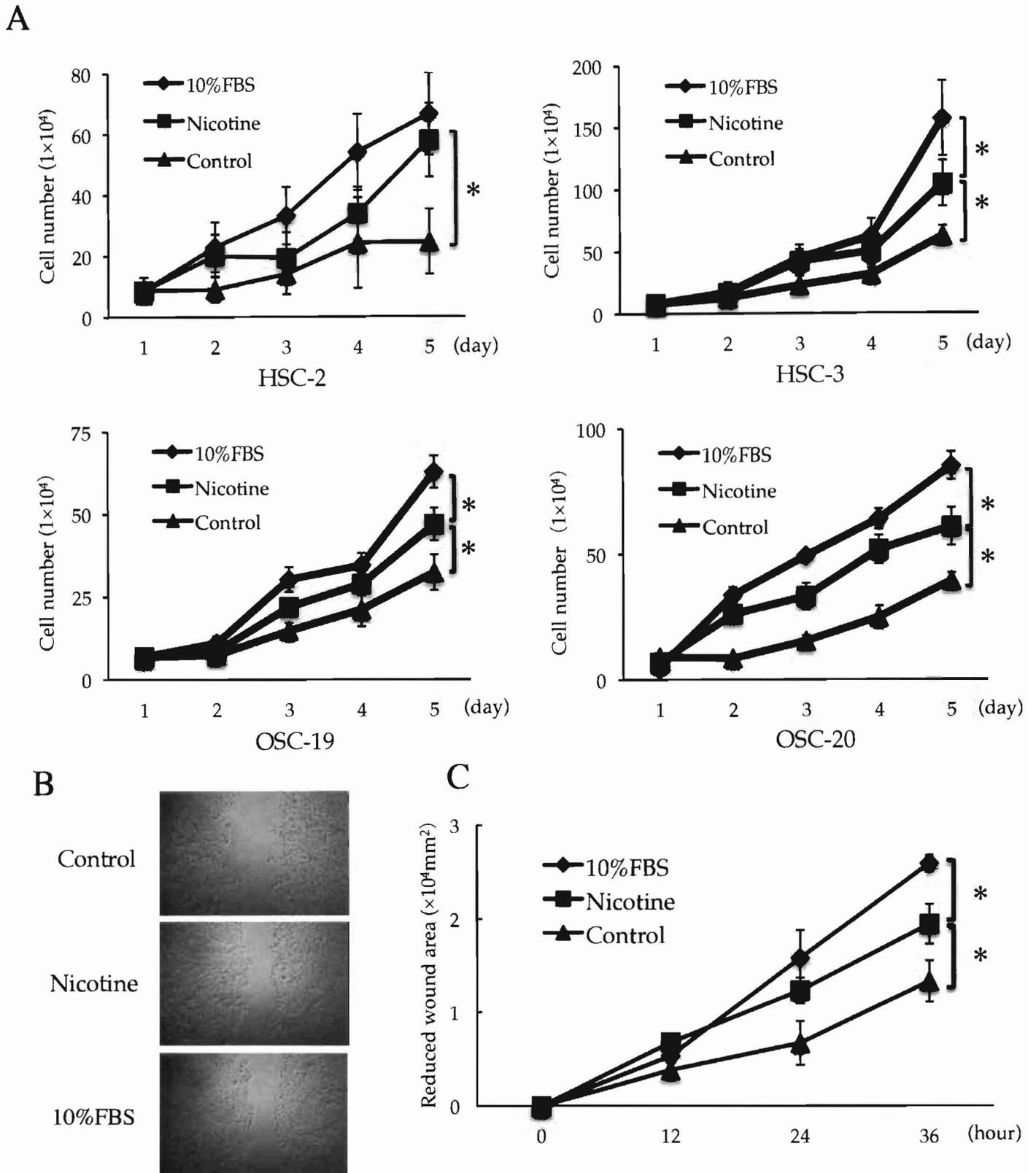
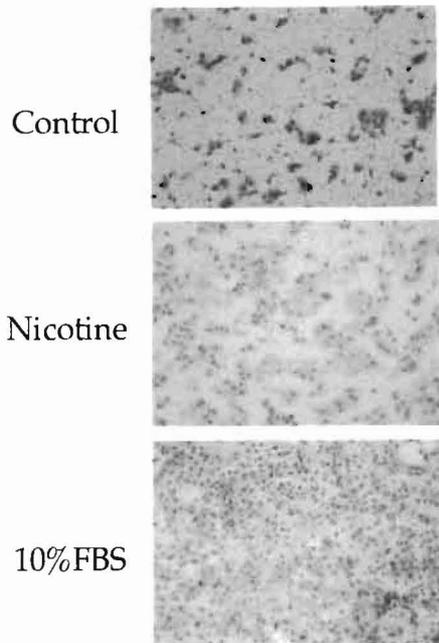


図2：ニコチンがヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖能と運動能に与える影響

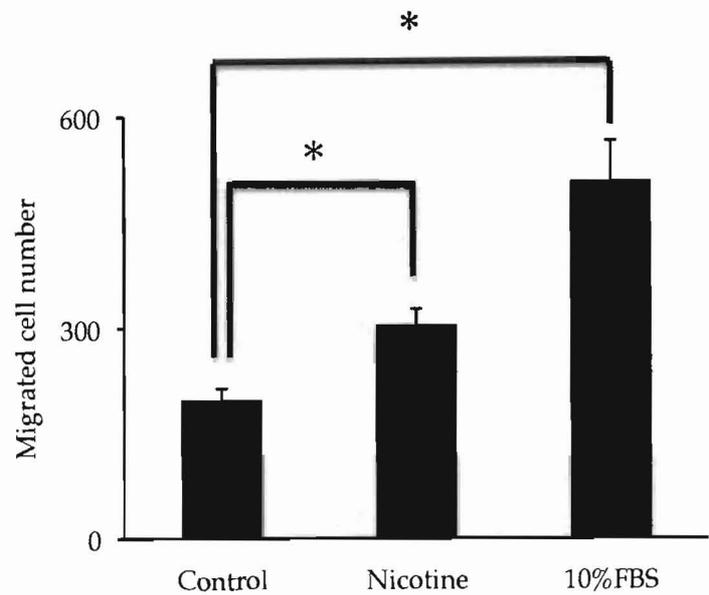
6wellプレートにHSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20を 1×10^5 個ずつ播種し、サブコンフルエントに達した後、無血清DMEM/F12で24時間培養し、細胞数を計測した。計測後に培地を0.5%FBS含有DMEM/F12に交換し、ニコチン(0.5 μ M)を添加し、経時的に細胞数を測定し増殖能を検討した(A)。運動能の検討は、wound healing assayで評価を行った。OSC-19を培養し、サブコンフルエントに達した後、無血清DMEM/F12で24時間培養し、シャーレ上をプラスチックチップで引っ掻き、模擬的な創傷を作製した。ニコチン(0.5 μ M)を添加し、経時的に創傷面積を測定した(B, C)。平均値 \pm 標準偏差(n=3)を示す。

*：対照群に対するニコチン添加群の統計的有意差を示す(p<0.05)。

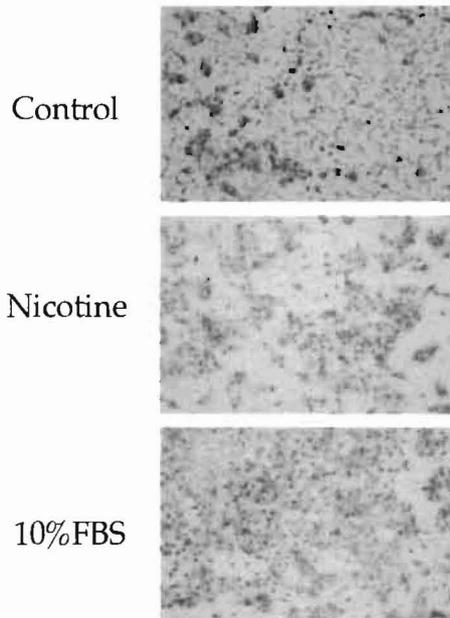
A



B



C



D

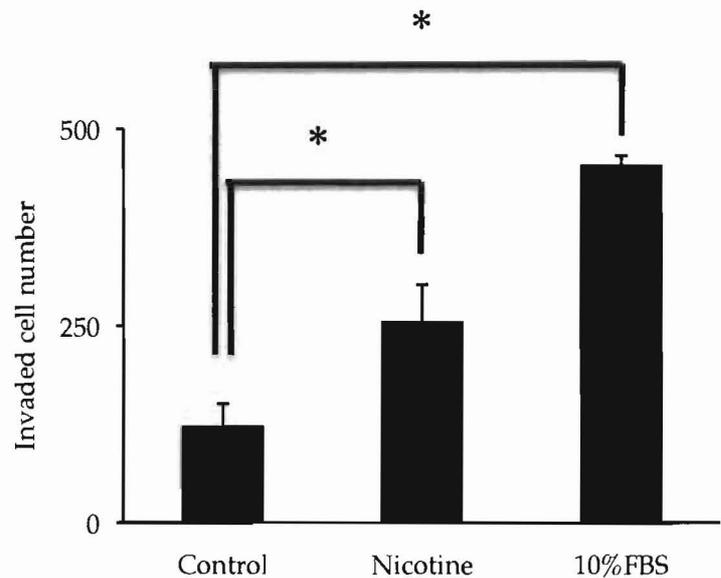


図3: ニコチンが口腔扁平上皮癌細胞細胞の遊走能と浸潤能に与える影響

遊走能の評価には、24wellのマトリゲルインベーションチャンバーのノンコートインサートを使用した。ポアサイズ $8\mu\text{m}$ のメンブレン上層にOSC-19を 3×10^4 個ずつ播種し、下層にニコチン ($0.5\mu\text{M}$) を加えた。24時間後にメンブレン下層の細胞をディフ・クイックで固定・染色を行い細胞数を計測し、対照群 (0.5%FBS含有DMEM/F12) と遊走能を比較検討した (A, B)。

浸潤能の評価には、24wellのマトリゲルインベーションチャンバーを使用した。ポアサイズ $8\mu\text{m}$ のメンブレンを使用し、遊走能の検討と同様の条件で行い、メンブレン下層の細胞はディフ・クイックで固定・染色し、細胞数を計測して評価した (C, D)。平均値 \pm 標準偏差 (n=3) を示す。

* : 対照群に対するニコチン添加群の統計的有意差を示す ($p < 0.05$)。

A

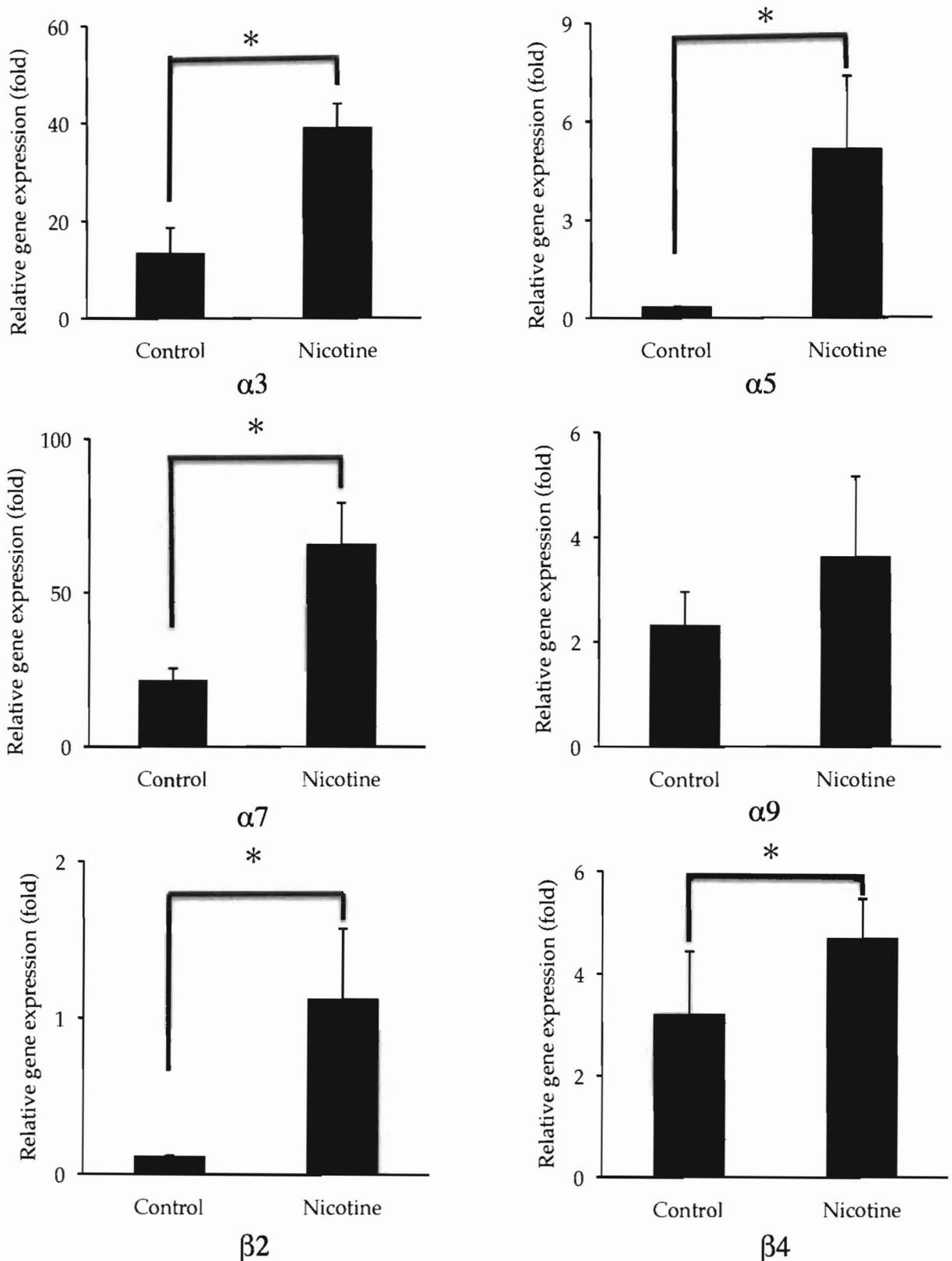


図4：ニコチンが口腔扁平上皮癌細胞のnAChRに与える影響

OSC-19のnAChRの発現はリアルタイムRT-PCRで評価した。OSC-19細胞を6cmシャーレに播種し、サブコンフルエントに達した時点で無血清DMEM/F12に交換後、24時間培養を行った。ニコチン (0.5 μ M) を添加し、8時間培養後に対照群とともにtotal RNAを抽出した。定量したtotal RNAを逆転写反応を行い、cDNAとした。cDNAと10 μ Mの各プライマーおよびSYBR Green Realtime PCR Master Mixを使用し、PCR反応を行った。内部標準として β -actin mRNAの定量を上記と同様の条件で行った。口腔扁平上皮細胞で発現が認められている $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$, $\beta 4$ のサブユニットについて検討した。

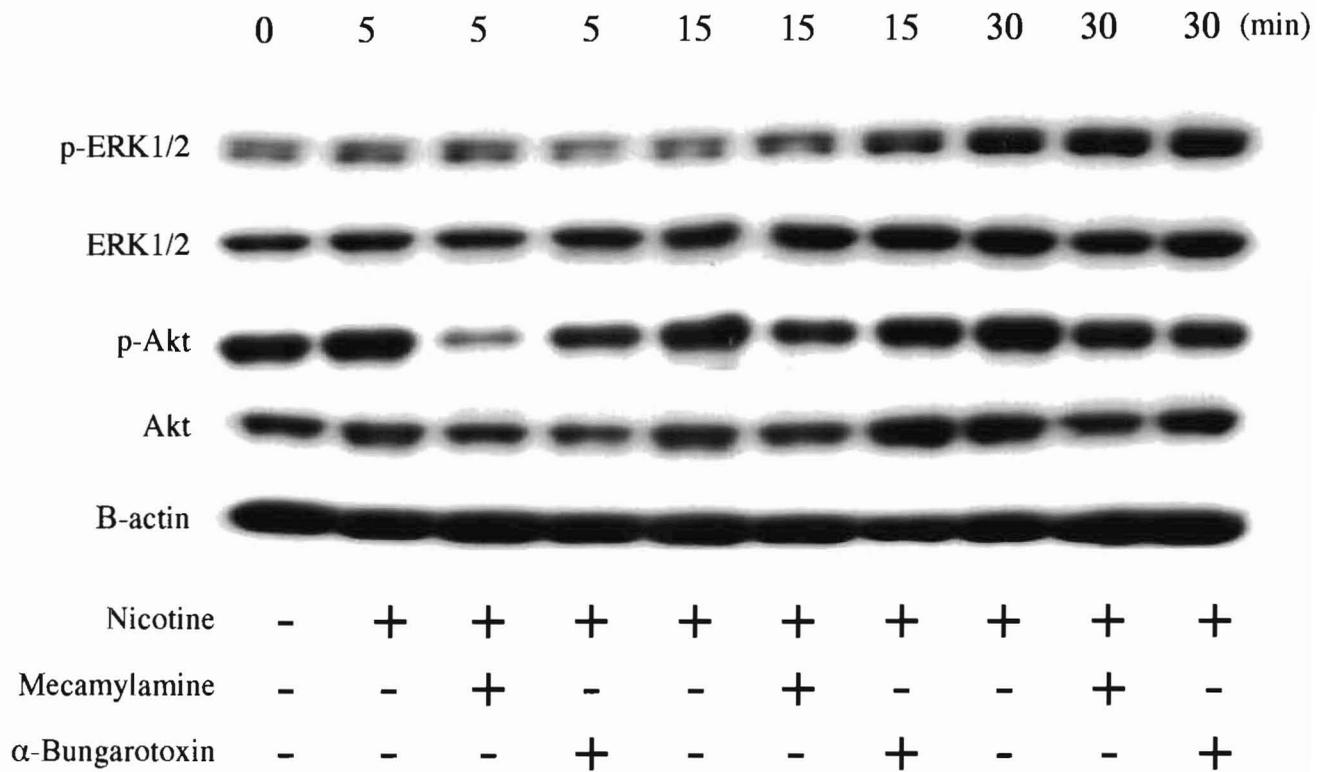


図5：ニコチンが口腔扁平上皮癌細胞のシグナル伝達に与える影響

nAChRの非選択的阻害薬であるメカミラミン塩酸塩と $\alpha 7$ 選択的阻害薬の α -ブンガロトキシンを用い、ERK1/2、Aktならびにのリン酸化ERK1/2、Akt発現の経時的変化をウェスタンブロット法にて検討した。タンパクはニコチン投与前、ニコチン投与5、15、30分後にそれぞれ回収した。