

## 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

太 田 裕 崇

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導: 佐藤秀一 教授, 浅野正岳 教授)

**要旨:**ニッケルは歯科用合金の組成物の一つであるが、その癌細胞増殖抑制のメカニズムは明らかにされていない。本研究では、癌の進展に関与する matrix metalloproteinase 9(MMP9)に注目し、ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞(HSC3)とヌードマウスを用いて、細胞における MMP9 発現および口腔扁平上皮癌(OSCCs)の転移や増殖に対するニッケルイオンの影響について検討した。塩化ニッケル(NiCl<sub>2</sub>)を HSC3 に作用させると、MMP9 mRNA (MMP9)発現が抑制された。また、Luciferase assay の結果、MMP9 発現が転写レベルで抑制された。そこで、OSCCs モデルマウスを作製し、NiCl<sub>2</sub> を添加した水で飼育(ニッケル刺激群)し、MMP9 発現の変化について免疫染色により検索したところ、MMP9 発現が著明に低下した。腫瘍組織の病理組織学的観察では、ニッケル刺激群で癌組織の内部に広範な壊死組織が確認され、これは CT 画像において腫瘍内部の高度な X 線透過領域として観察された。これらの変化が、血管新生因子の分泌減少によることを確認するために、IL-8 mRNA (IL-8) および VEGF mRNA (VEGF) 発現について検討したところ、ニッケル刺激群で有意な減少が認められた。さらに、所属リンパ節への転移について、ヒト β グロブリン遺伝子の検出によって比較したところ、ニッケル刺激群では有意に癌細胞の転移が抑制された。以上のように、本実験の結果からニッケルイオンは、腫瘍細胞の増殖や進展を抑制する作用を有する可能性が示唆された。

**キーワード:**ニッケル, 口腔扁平上皮癌, 血管新生, MMP9, NF-κB

### 緒 言

口腔に最も多く発生する悪性腫瘍は、口腔扁平上皮癌(OSCCs)である<sup>1)</sup>。OSCCs の進展には多くの因子が関与しており、なかでも NF-κB は最も重要な転写因子の一つとされている<sup>1)</sup>。NF-κB は、5つのファミリー分子(p50 (NFKB1), p52 (NFKB2), p65 (RELA), c-Rel (REL), RelB (RELB))のうちの2分子によって形成された2量体によって構成されており<sup>2)</sup>、炎症や免疫反応に関連する多くの因子の発現に関与している<sup>3)</sup>。NF-κB 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<sup>4,5)</sup>。これまで Shionome ら<sup>6)</sup>は、ニッケルイオンが NF-κB 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報告した。

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、今まで 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<sup>9,10)</sup>。MMPs は、亜鉛依存型エンドペプチダーゼファミリーに属し<sup>9,10)</sup>、主な機能の一つに基底膜の分解がある<sup>11-13)</sup>。癌細胞の浸潤増殖は基底膜の破壊に始まることから<sup>14)</sup>、MMPs 発現の制御は癌治療の指標となり得る<sup>13)</sup>。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<sup>11-13)</sup>、OSCC における MMP2 と MMP9 の発現等について広く研究されている<sup>15,16)</sup>。さらに、MMPs 発現は、その一部が NF-κB に依存していることが判明している<sup>17)</sup>。

そこで本研究では、ニッケルイオンが NF-κB 活性を抑制することで MMPs 発現に及ぼす影響について、さらに血管新生因子である IL-8 および VEGF の産生に及ぼす影響について検討することによって、癌の転移や浸潤を抑制する可能性について考察を加えた。

### 材料および方法

#### 1. 試薬および抗体

試薬としてのニッケルイオンは、塩化ニッケル(NiCl<sub>2</sub>, シグマアルドリッヂャパン)を用いた。抗体としては、抗ヒト MMP9 抗体(Santa Cruz)および horse radish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Jackson Immuno Research)を用いた。

#### 2. 細胞培養とニッケルイオン刺激

細胞として、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ニングである HSC3-M3<sup>18)</sup>(ヒューマンサイエンス研究資源バンク)を用いた。細胞の培養には、これらと streptomyces 50 μg/ml, penicillin 50 U/ml を添加した 10% ウシ胎児血清加 Roswell Park Memorial Institute 1640 培地(10% FCS-RPMI)を用い

(受付: 平成 29 年 1 月 16 日)

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

た。細胞は、通法に従って 5% CO<sub>2</sub>, 37°C のインキュベーター内で培養した。ニッケルイオン刺激は、細胞を 24-well plate(2 × 10<sup>5</sup> 個 /well) に播種し、これに 1 mM NiCl<sub>2</sub> を添加することにより行った。また、ニッケル刺激を行わないものを対照群とした。

### 3. リアルタイム PCR

Total RNA は、RNeasy mini kit(キヤゲン)を用いて精製した。cDNA は Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen)により合成し、リアルタイム PCR で分析した<sup>19)</sup>。リアルタイム PCR は SYBR green(タカラバイオ)を用い、Light Cycler nano(ロシュ・ダイアグノスティックス)を用いて行った。なお、この研究で用いたプライマーを第 1 表に示す。

### 4. 癌細胞の接種と免疫組織染色

HSC3(5 × 10<sup>5</sup> 個 /35 μl) を、6 週齢の雄性ヌードマウス(クレア)の舌に接種した。接種 1 週間後に腫瘍塊の形成を確認後、1 mM NiCl<sub>2</sub> を含有する水または未含有の水を 7 ~ 14 日間与えた。なお、本実験は日本大学歯学部動物実験委員会の承認を得ている(承認番号 AP14 D030-1)。

所定の飼育期間が経過した後、イソフルラン吸引および三種混合薬を腹腔内投与し、10% 中性緩衝ホルマリンで灌流固定した。目的の組織を採取し、パラフィンに包埋後 4 μm の薄切切片を用いて免疫染色を行った。切片を 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノール中で室温で 20 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化させた。さらに、10 mM のクエン酸緩衝液(pH6.0) 中で 98°C, 20 分間加熱した後、ブロッキングは 1% ウシ血清アルブミン加リソ酸緩衝生理食塩水(1% BSA-PBS) 中で 1 時間反応させた。その後、1% BSA-PBS で 50 倍に希釈した抗 MMP9 抗体を作用させて室温で 1 時間反応させた。ネガティブコントロールには 1% BSA-PBS を用いた。次いで、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG(500 倍に希釈)で 1 時間室温で反応させた。PBS による洗浄後、3,3'-diamino benzidine tetrahydrochloride(DAB, シグマアルドリッ

チジャパン)発色基質(50 mM トリス塩酸緩衝液 pH7.6, 0.01% 過酸化水素, 0.02% DAB)を用いて 7 分間反応させ、PBS で洗浄後、核染色し、光学顕微鏡(BH2, オリンパス)で観察した。

### 5. 原発巣および転移巣におけるヒト β グロビン遺伝子発現

HSC3-M3(5 × 10<sup>5</sup> 個 /35 μl) を雄性 6 週齢のヌードマウスの舌右側縁に接種し、接種 1 週間後に腫瘍塊の形成を確認後、1 mM NiCl<sub>2</sub> を含有する水または未含有の水を 7 ~ 14 日間与え、原発巣と頸部リンパ節を取り出した。その後、検体を半割し、組織学的および分子生物学的に検討した。転移の評価は、組織からゲノム DNA を抽出し、ヒト β グロビン遺伝子を nested-PCR により検出することで行った<sup>20)</sup>。

### 6. MMP9 遺伝子の 5'-非翻訳領域のクローニング

MMP9 遺伝子の非翻訳領域(5'-untranslated region, 5'-UTR) 626 bp(-626 から -1(+1 は ATG 翻訳開始コドンの A に相当) 断片を、第 1 表のプライマーを用いて増幅した。増幅した断片を、pGL4-basic ベクター(プロメガ)の Hind III と Kpn I site にサブクローニングし(pGL4-MMP9)，ルシフェラーゼアッセイに用いた。なお、MMP9 の非翻訳領域の構造を第 1 図に示す。

### 7. ルシフェラーゼアッセイ

HSC3(1 × 10<sup>5</sup> 個 /well) を、48-well plate に播種した。細胞を、OPTI-MEM(サーモフィッシュ・サイエンティック)で 2 回洗浄し、Lipofectamin(Invitrogen)を用いて pGL4-MMP9 を 5 時間トランスフェクションした。トランスフェクション後、細胞を 10% FCS-RPMI で洗浄し、1 mM のニッケルイオン刺激下あるいは非刺激下で 12 ~ 24 時間さらに培養した。その後、細胞を 1 × passive lysis buffer(プロメガ)を用いて溶解し、細胞溶解液を回収した。トランスフェクション効率は pRL/CMV ベクター(プロメガ)との同時トランスフェクションにより、ウミシイタケのルシフェラーゼ活性を測定す

第 1 表 各プライマーの塩基配列

プライマー		配列	目的
MMP9	Forward	5'-GGG ACG CAG ACA TCG TCA TC-3'	リアルタイム PCR
	Reverse	5'-TCG TCA TCG TCG AAA TGG GC-3'	
β-actin	Forward	5'-GGA GCA AGT ATC TTG ATC TTC-3'	リアルタイム PCR
	Reverse	5'-CCT TCC TGC GCA TGG AGT CCT G-3'	
IL-8	Forward	5'-CCA GCC ATC AGC CAT GAG GGT-3'	nested-PCR
	Reverse	5'-GGA GCC CTT TCT GAA TCC GCA-3'	
VEGF	Forward	5'-GCA CCC ATG GCA GAA GG-3'	ルシフェラーゼ アッセイ
	Reverse	5'-CTC GAT TGG ATG GCA GTA GCT-3'	
MMP9	Forward	5'-GTG GAA TTC CCC AGA CTT GCC TA-3'	ルシフェラーゼ アッセイ
	Reverse	5'-GGT GAG GGC AGA GGT GTC TGA-3'	
GH20	Forward	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'	nested-PCR
	Reverse	5'-GGA AAA TAG ACC AAT AGG CGA-3'	
GH21	Forward	5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3'	
	Reverse	5'-TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G-3'	
KM29	Forward	5'-GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G-3'	
	Reverse	5'-TGG TCT CCT TAA ACC TGT CTT G-3'	
KM38			

ることで補正した。測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System(プロメガ)を用い、蛍光強度をルミノメーター(Lumat LB 9507, Berthold Technologies)を用いて測定した。

#### 8. CT撮影およびヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

CT撮影には、実験動物用3DマイクロCT(R\_mCT, リガク)を用いた。HSC3-M3( $5 \times 10^5$ 個/ $35\mu\text{l}$ )を接種した実験では、CT撮影に際してイソフルラン吸引を行った後、ヌードマウスの尾静脈に注射針付きシリング(26G, テルモ)を用いて造影剤(オプチレイ320, マリックロットジャパン)を $0.5\text{ml}$ 注入し、仰臥位にて撮影した。撮影条件は、管電圧 $90\text{kV}$ 、管電流 $100\mu\text{A}$ 、照射時間2分間とした。

撮影後に舌を採取し、 $10\%$ 中性緩衝ホルマリンによって固定後、パラフィン包埋して、 $4\mu\text{m}$ の薄切切片を作製し、HE染色を行った。

#### 9. 統計学的解析

データは平均値と標準偏差で示した。有意差検定にはStudent's *t*-testを用い、有意水準を $5\%$ とした。

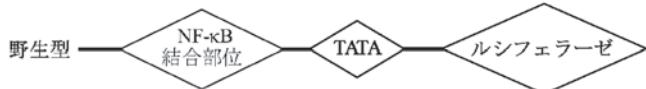
## 結果

### 1. MMP9発現

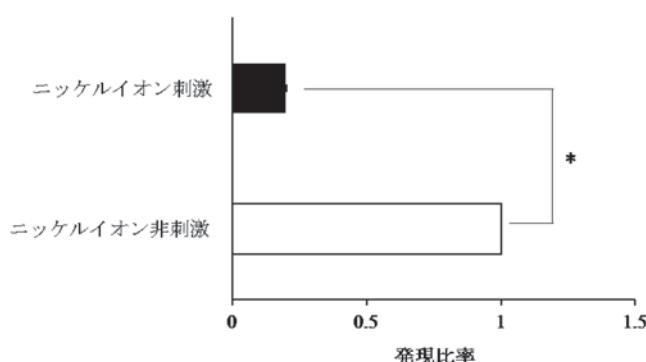
MMP9発現に対するニッケルイオンの影響について、リアルタイムPCRを用いて検索した。その結果、ニッケルイオン非刺激下での発現を1とした時、ニッケルイオン刺激下ではMMP9発現は $0.2$ に低下した(第2図)。

### 2. ルシフェラーゼアッセイ

ニッケルイオンによるMMP9発現低下が、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を行った。



第1図 MMP9遺伝子の非翻訳領域の構造



第2図 ニッケルイオン刺激がMMP9発現に及ぼす影響  
(\*P < 0.05)

ニッケルイオン非刺激下12時間後のルシフェラーゼ活性を1として比較したところ、ニッケルイオン刺激下では $0.75$ とわずかに減少し(第3図A), 24時間後ではニッケルイオン非刺激下では $1.87$ に増加し、ニッケルイオン刺激下では $0.73$ に減少した(第3図B)。

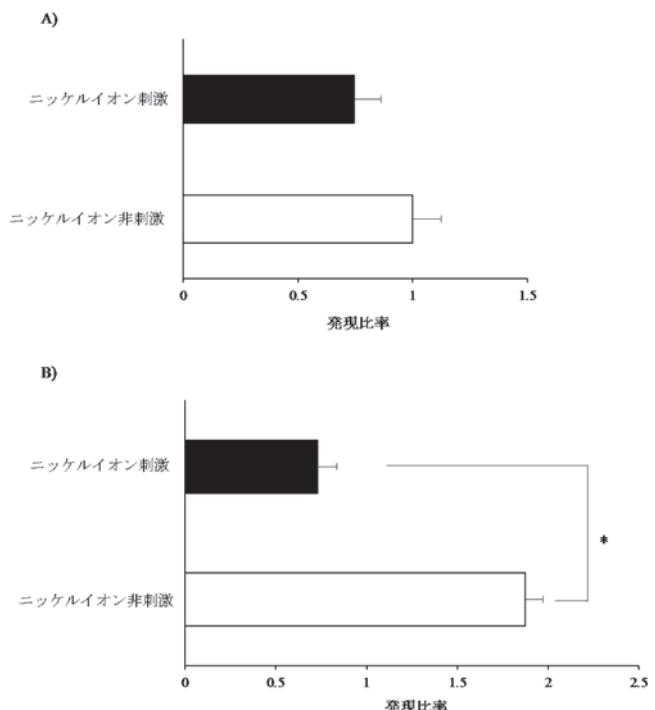
### 3. 免疫染色

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。すなわち、腫瘍組織におけるMMP9発現の変化を免疫染色により比較した。その結果、ニッケル非刺激群では、腫瘍細胞は高度のMMP9発現を示したのに対し、ニッケル刺激群では、MMP9発現は著明に減少した(第4図右)。

### 4. CTおよび組織像

ニッケルイオン刺激の有無が腫瘍増殖に及ぼす影響について、HSC3-M3( $5 \times 10^5$ 個/ $35\mu\text{l}$ )をヌードマウスの舌に接種し、接種2週間後にCT像を撮影した。ニッケル非刺激群では、境界明瞭な腫瘍塊が観察され、癌領域はボール・イン・ハンド像を呈していた(第5図A左)。一方、ニッケル刺激群では、癌領域中により高い透過領域が認められた(第5図A右)。

接種2週間後で採取した検体のHE染色による組織学的検索では、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(第5図B左)のに対して、ニッケル刺激群では腫瘍胞巣中に非刺激群に比べ広範な壊死領域が観察された(第5図B右)。

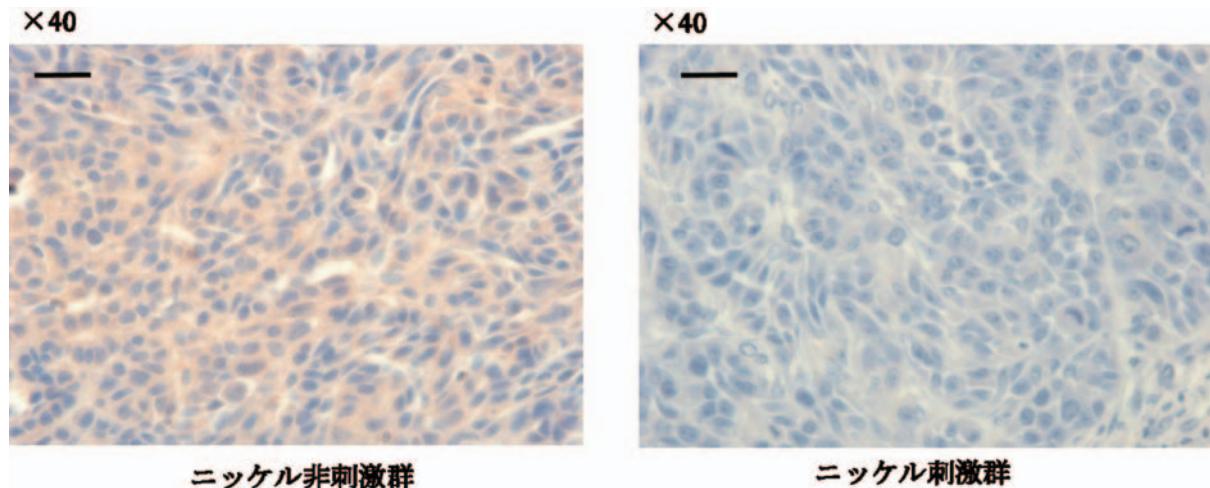


第3図 ニッケルイオン刺激がルシフェラーゼ活性に及ぼす影響  
A) 12時間後のルシフェラーゼ活性  
B) 24時間後のルシフェラーゼ活性 (\*P < 0.05)

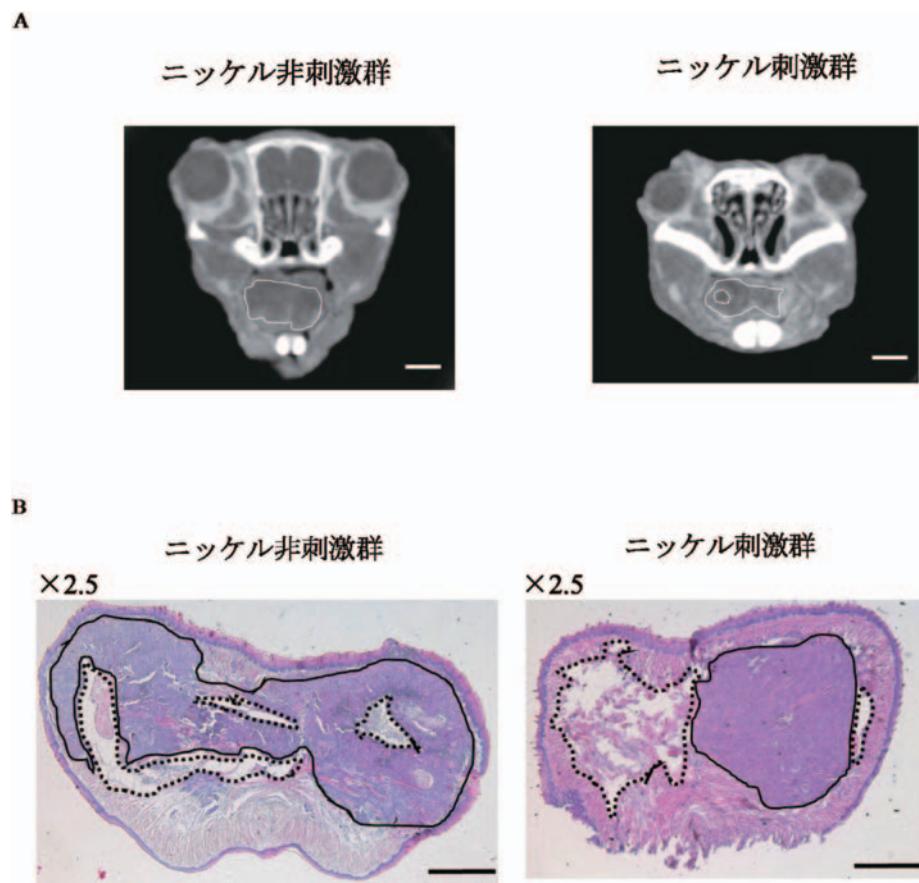
## 5. IL-8 および VEGF 発現

組織像でみられた壞死領域の形成は、血管新生の低下によるものである可能性があり、両群における血管新生因子である IL-8 および VEGF 発現をリアルタイム PCR

により比較した。その結果、ニッケル非刺激群を 1 として比較したところ、ニッケル刺激群の IL-8 発現は 0.01 に減少し(第 6 図)、VEGF 発現は 0.63 に減少した(第 7 図)。



第 4 図 ニッケルイオン刺激が MMP9 発現に及ぼす影響(— : 50  $\mu$ m)



第 5 図 腫瘍内の透過像領域

A) ヌードマウス CT 像(正面像)(— : 1 mm, 実線 : 瘤領域, 点線 : 壊死領域)

B) ヌードマウス舌組織像(HE 染色)(— : 500  $\mu$ m, 実線 : 腫瘍部, 点線 : 壊死部)

## 6. ヒト $\beta$ グロビン遺伝子発現

ニッケルイオンの転移抑制効果について、所属リンパ節におけるヒト $\beta$ グロビン遺伝子を nested-PCR を用いて検出することで比較検討した。その結果、原発巣では、ヒト $\beta$ グロビン遺伝子は両群とも同程度検出された(第8図A)。一方、リンパ節ではニッケル非刺激群と比較して、ニッケル刺激群で著明にヒト $\beta$ グロビン遺伝子発現量が減少した(第8図B)。

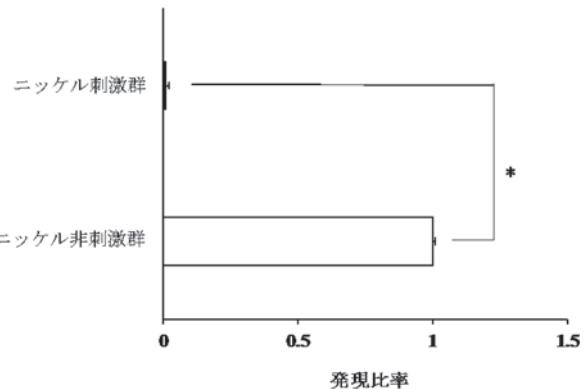
## 考 察

癌細胞の増殖と浸潤は、間質が分解されることによって進展し、これには MMPs の存在が重要とされている<sup>21)</sup>。MMPs のうち MMP9 のプロモーターは NF- $\kappa$ B 結合部位を有している<sup>22)</sup>とともに、ニッケルイオンは NF- $\kappa$ B を不活性化することから<sup>8)</sup>、ニッケルイオンは NF- $\kappa$ B 活性の抑制を通じて MMP9 発現を阻害する可能性が示唆された。

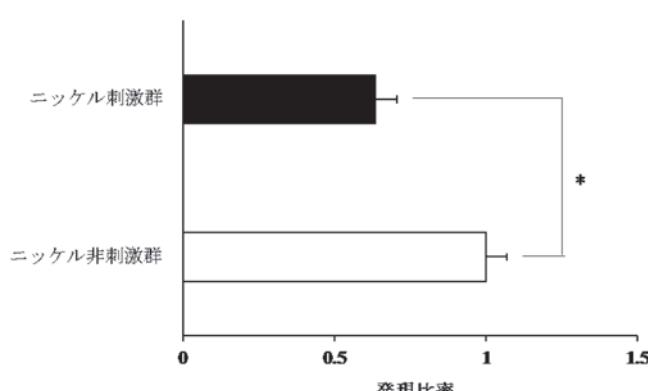
本研究の結果からは、ニッケルイオンが、MMP9 発現を有意に抑制したが、この効果は 24 時間後のルシフェラーゼ活性の結果から転写レベルで調節されていることが示唆された。しかし、ニッケルイオンによっても完全に MMP9 発現が抑制されなかったことから、activation

protein-1(AP-1)など他の転写因子の活性も MMP9 発現に関与している可能性が考えられる。

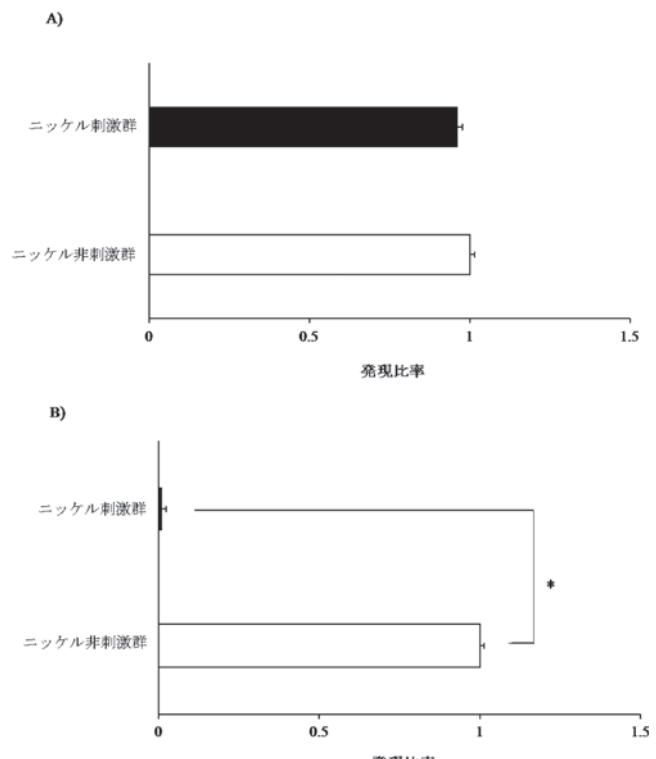
次に、1 mM NiCl<sub>2</sub> を飲み水に添加することにより、*in vivo*においてもニッケルイオンの効果が発揮されるか否かについて検討した。まず、ヌードマウスに移植した HSC3 における MMP9 発現の変化を免疫染色によって比較したところ、ニッケル刺激群ではその発現が著明に低下した。さらに、MMP9 発現の抑制が癌の増殖や転移にどのような影響を与えていたかを確認するために、HSC3 接種後のヌードマウスに造影剤を注射し、CT撮影を行った。その結果、ニッケル非刺激群のヌードマウスの舌は、癌領域の周囲の血管が不透過像となり、いわゆるボール・イン・ハンド像を呈していた。これに対してニッケル刺激群では、癌領域中により高い透過領域がみられた。また病理組織学的観察からは、ニッケル刺激群では腫瘍胞巣中に非刺激群と比較して、より広範な壊死領域が確認された。このことは、HSC3 による血管新生因子の分泌低下によって、血管新生が阻害されたことによる組織壊死の可能性を示すものと考えられた<sup>23)</sup>。すなわち、HSC3 における NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化がニッケルイオン刺激により抑制され、これによって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可能性がある。そこで、血管新生因子である



第6図 IL-8 発現 (\*P < 0.05)



第7図 VEGF 発現 (\*P < 0.05)



第8図 ヒト $\beta$ グロビン遺伝子の発現

A) 原発巣における発現

B) 転移巣におけるリンパ節での発現 (\*P < 0.05)

*IL-8* および *VEGF* 発現を確認したところ、両者ともニッケル刺激群において有意な減少が認められた。したがって、上述した仮説が裏づけられたものと考えられた。

さらに、転移抑制効果について、所属リンパ節におけるヒト $\beta$ グロビン遺伝子発現量の違いによって検討したところ、ニッケル刺激群で著明にヒト $\beta$ グロビン遺伝子発現量が低下したことから、ニッケル刺激がリンパ節への転移を著明に抑制することが示唆された。

Shionome ら<sup>8)</sup>は、ニッケルイオンが NF- $\kappa$ B の p50 サブユニットに直接結合することによってその活性を抑制することを示しているが、癌細胞がどのようなメカニズムでニッケルイオンを取り込むのかは明らかとなっていない。ニッケルイオンは 1) 細胞膜拡散、2) イオンチャネル、および 3) 貪食という 3 つの異なる経路を介して取り込まれると考えられている<sup>24,25)</sup>。このうち、ニッケルイオン輸送が大腸癌由来細胞(Caco-2)において  $Fe^{2+}$  存在下で阻害されるという報告<sup>26)</sup>は 3) の可能性を示唆するものである。最近では、プロトン結合二価陽イオントランスポーター(DCT1, NRAMP2)の関与も示唆されている<sup>27,28)</sup>。一方、ある種の細菌において、ニッケルイオンは増殖に必須の因子であり、これには細胞質へのニッケルイオンの能動輸送のシステムとしてニッケルオペロンが備わっていると報告されている<sup>29-31)</sup>。しかし、ヒトではこのシステムの存在は確認されていない。近年、ヒト Toll 様受容体 4(TLR4)の細胞外領域内のヒスチジン残基にニッケルイオンが結合することも報告されているものの<sup>32)</sup>、ニッケルイオンの取り込み経路についてはさらには検討する必要があると考えられる。

これまでに、ニッケル化合物の抗腫瘍活性は報告されているものの<sup>33,34)</sup>、ニッケルイオン そのものの抗癌作用は報告されていない。ニッケルイオンが NF- $\kappa$ B 不活性化を通じて腫瘍の増殖・進展を抑制するのであれば、ニッケルイオンを癌治療薬として応用できる可能性があり、その作用メカニズムの詳細を検討する必要がある。

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導およびご高闇を賜りました日本大学歯学部佐藤秀一教授、浅野正岳教授に謹んで心より感謝申し上げます。なお、本論文に関して開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS (2009) Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 45, 324-334.
- 2) Karin M (2006) Nuclear factor- $\kappa$ B in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- 3) Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell* 132, 344-362.
- 4) Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C (1999) Constitutive activation of transcription factors NF- $\kappa$ B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog* 26, 119-129.
- 5) Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR (2006) High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 28, 916-925.
- 6) Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC (2006) Differential expression and activation of NF- $\kappa$ B family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 119, 2840-2850.
- 7) Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Shishodia S, Sethi G, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, Aggarwal BB, Ralhan R (2007) Expression of NF- $\kappa$ B parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer* 120, 2545-2556.
- 8) Shionome T, Endo S, Omagari D, Asano M, Toyoma H, Ishigami T, Komiyama K (2013) Nickel ion inhibits nuclear factor-kappa B activity in human oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 8, e68257.
- 9) Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233.
- 10) Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.
- 11) Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263, 6579-6587.
- 12) Condeelis J, Pollard JW (2006) Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-266.
- 13) Roy R, Yang J, Moses MA (2009) Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 27, 5287-5297.
- 14) Seiki M (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 194, 1-11.
- 15) Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR (2006) High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 28, 916-925.
- 16) Mohtasham N, Babakooohi S, Shiva A, Shadman A, Kamyab-Hesari K, Shakeri MT, Sharifi-Sistani N (2013) Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity. *Pathol Res Pract* 209, 110-114.
- 17) Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253, 269-285.

- 18) Momose F, Araida T, Negishi A, Ichijo H, Shioda S, Sasaki S (1989) Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 18, 391-395.
- 19) Omagari D, Mikami Y, Suguro H, Sunagawa K, Asano M, Sanuki E, Moro I, Komiyama K (2009) Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 156, 294-302.
- 20) Shigeta T, Umeda M, Komatsubara H, Komori T (2008) Lymph node and pulmonary metastases after transplantation of oral squamous cell carcinoma cell line (HSC-3) into the subcutaneous tissue of nude mouse: detection of metastases by genetic methods using beta-globin and mutant p53 genes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105, 486-490.
- 21) Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442.
- 22) Vincenti MP, Brinckerhoff CE (2007) Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *J Cell Physiol* 213, 355-364.
- 23) Waugh DJ, Wilson C (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6735-6741.
- 24) Kasprzak KS, Sunderman FW Jr, Salnikowa K (2003) Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* 533, 67-97.
- 25) Costa M, Davidson TL, Chen H, Ke Q, Zhang P, Yan Y, Huang C, Kluz T (2005) Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat Res* 592, 79-88.
- 26) Tallkvist J, Tjälve H (1998) Transport of nickel across monolayers of human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 151, 117-122.
- 27) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488.
- 28) Knöpfel M, Schulthess G, Funk F, Hauser H (2000) Characterization of an integral protein of the brush border membrane mediating the transport of divalent metal ions. *Biophys J* 79, 874-884.
- 29) Navarro C, Wu LF, Mandrand-Berthelot MA (1993) The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* 9, 1181-1191.
- 30) Schulz GE (1993) Bacterial porins: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 5, 701-707.
- 31) Rowe JL, Starnes GL, Chivers PT (2005) Complex transcriptional control links NikABCDE-dependent nickel transport with hydrogenase expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 6317-6323.
- 32) Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* 11, 814-819.
- 33) Babahan İ, Özmen A, Orhan N, Kazar D, Değirmenci EH (2014) Synthesis, characterization, and *in vitro* anti-neoplastic activity of novel vic-dioximes bearing thiosemicarbazone side groups and their mononuclear complexes. *Bioorg Chem* 53, 92-98.
- 34) Hossain IA, Khanam JA, Jesmin M, Ali MM (2016) Antineoplastic activity of N-(2-hydroxybenzylidene)2'-hydroxyphenylimine aqua nickel(II) complex [NI(H<sub>2</sub>O) HHP] on ehrlich ascites carcinoma (EAC) in Swiss albino mice. *Exp Toxicol Pathol* 68, 15-25.