

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11241

研究課題名(和文) PDE2遺伝子変異を標的とした悪性腫瘍の新規治療方法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic methods for malignant tumors targeting PDE2 gene mutation

研究代表者

村田 琢 (MURATA, TAKU)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80242965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：cAMPやcGMPの分解酵素であるPhosphodiesterase (PDE)はPDE1-11のファミリーにより構成されている。これまでにわれわれは口腔由来悪性黒色腫細胞でPDE2が浸潤に関係し、PDE2遺伝子変異が見られることを報告した。そこで、細胞浸潤とこの変異との関係を検討した。PDE2の発現のない口腔悪性黒色腫細胞に変異型を強制発現させると浸潤は促進した。そして、浸潤細胞はヘテロ変異型であった。これらの結果より、PDE2の変異が細胞浸潤に関係する可能性を認めた。

研究成果の概要(英文)：Phosphodiesterase (PDE) is a degrading enzyme of intracellular transmitter (cAMP and/or cGMP) and 11 types (PDE 1 - PDE 11) are present. We have reported that PDE 2 is involved in the invasion of malignant tumor cells, and the mutation of a specific site of PDE2 gene. Therefore, we investigated the relationship between cell invasion and this mutation. Invasion was promoted by overexpression of mutant in oral malignant melanoma cells without expression of PDE2. And, invasion cells were heterozygous. From this results, we confirmed that the mutation of PDE 2 may be related to cell invasion.

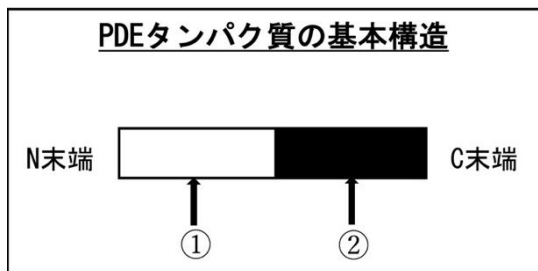
研究分野：口腔外科

キーワード：phosphodiesterase cAMP melanoma

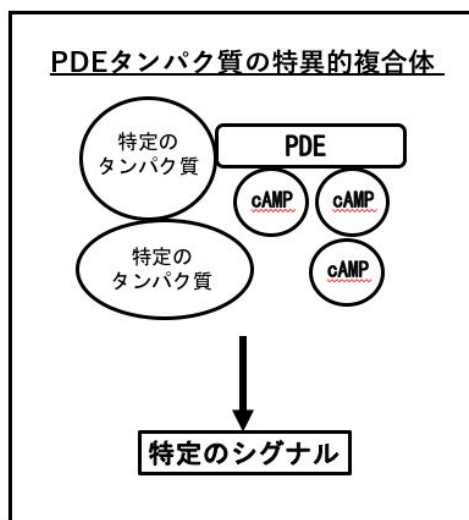
## 1. 研究開始当初の背景

Phosphodiesterase(PDE)は11種類(PDE1からPDE11)あり、それぞれのPDEにはさらにアイソザイム(AからD)が存在し、20種類以上の関連遺伝子で構成されている。そして、PDEは細胞内のcAMPやcGMPを分解することによりその濃度を調節し、様々な生理作用に関係している。

PDEタンパク質の基本構造は、特定のタンパク質と特異的複合体を形成し細胞内の特定部位に特異的複合体を局在させたり、PDE活性を調節する部位、cAMPやcGMPを分解するために必要な部位、より構成されている。



そして、PDEは①の部位により特定のタンパク質と特異的複合体を形成することにより細胞内の特定部位に局在し、PDEが特定の刺激によるcAMPやcGMPシグナル伝達を細胞内局所に封じ込め (compartmentalization)、他の刺激由来のcAMPやcGMPシグナルを分離している。



このため、PDEの②の部分に遺伝子変異がありアミノ酸が変化すれば特定のタンパク質との結合 (細胞内情報伝達複合体: signalosome) が変化する。そして、その結果PDEの細胞内局在が変化し、機能が変化することが考えられる。

PDEの阻害剤はすでに抗凝固薬、勃起不全治

療薬や肺高血圧症治療薬として広く臨床で使用されている。しかし、PDE2は数十年前に11種類あるPDEの中で2番目に発見されたのにもかかわらず、PDE2が浸潤を制御していることは、口腔由来悪性黒色腫細胞で2014年に世界で初めて報告するまで知られてなかった。

## 2. 研究の目的

これまでにわれわれはPDE2阻害 (阻害剤やsiRNAなど)により浸潤能が低下する口腔由来悪性黒色腫細胞で、PDE2遺伝子変異が見られることを報告した。そして、その変異は基本構造の「特定のタンパク質と特異的複合体を形成し細胞内の特定部位に特異的複合体を局在させたり、PDE活性を調節する」部位であった。そこでこの遺伝子変異が浸潤と関係するかどうかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(細胞)

当教室で樹立継代している口腔由来悪性黒色腫細胞などを使用した。

(PDE2下流シグナル)

PDE2下流シグナルを検討するためcAMP analog、PKA-specific-cAMP inhibitor、PKA stimulator、EPAC-specific cAMP analogなどを使用した。

(浸潤能)

マトリゲルインベージョンチャンバーを用いたinvasion assayで行った。インサートを通じた細胞を染色し、細胞数を測定した。

(口腔悪性黒色腫細胞へのPDE2野生型と変異型プラスミドの導入)

PDE2野生型と変異型を組み込んだプラスミドをリポフェクション法にてPDE2が発現していない口腔由来悪性黒色腫細胞に導入した。導入の確認、および、効率は免疫染色、リアルタイムPCR、PDE2 assay、western blottingで行った。

(PDE2野生型と変異型の安定発現細胞株の作成)

PDE2野生型と変異型を組み込んだプラスミドをリポフェクション法にてPDE2が発現していない口腔由来悪性黒色腫細胞に導入した。次に、抗生剤を添加した培養液に播種し

し安定発現細胞株を作成した。

(デジタル PCR)

細胞より DNA を抽出、逆転写後、PDE2 野生型と変異型を識別できる PRIMER を使用して行った。

(PCR 産物のシーケンス)

各悪性腫瘍細胞より DNA を抽出し、逆転写後、PCR を行った。PCR 産物を精製後、シーケンスを行った。

#### 4. 研究成果

(PDE2 下流シグナル)

PDE2 は cAMP を分解する酵素なので cAMP の下流シグナルを検討した。cAMP analog と PKA-specific-cAMP inhibitor では浸潤能は抑制された。しかし、PKA EPAC-specific cAMP analog では変化がなかった。また、PKA inhibitor では亢進した。

(口腔悪性黒色腫細胞への PDE2 野生型と変異型の強制発現)

野生型と変異型 PDE2 導入群はいずれも導入効率はリアルタイム PCR で約 35%で、PDE assay では高い PDE2 活性を、Western blotting では強い PDE2 タンパク質の発現を認めた。しかし、control 群と plasmid 群では全く認めなかった。

(PDE2 野生型と変異型強制発現細胞での浸潤との関係)

変異型 PDE2 導入群のみ Invasion assay で約 1.5 倍細胞浸潤が増加していた。以上より、PDE2 の遺伝子変異が悪性黒色腫細胞の浸潤能亢進に与える可能性が示唆された。

(親細胞と浸潤細胞での PDE2 遺伝子変化の割合)

シーケンスで変異部位にわずかであるが野生型のピークを認めたため、デジタル PCR で確認した。親細胞と浸潤細胞ともにホモ野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型の組み合わせである可能性があった。

(浸潤細胞のクローン細胞での PDE2 遺伝子変化の割合)

浸潤細胞を 96 well plate に各 1 細胞の割合で播種し、クローン細胞を作成した。8 種類のクローン細胞で PDE2 遺伝子変化をデジタル PCR で検討したところ全てヘテロ変異型で

あった。

(他の悪性腫瘍細胞の PDE2 遺伝子変化)

口腔悪性黒色腫細胞で PDE2 の遺伝子変異が悪性黒色腫細胞の浸潤能亢進に与える可能性が示唆されたことより、他の悪性腫瘍細胞で検討した。いくつかの悪性腫瘍細胞でも同様の結果であった。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

口腔悪性黒色腫細胞における phosphodiesterase 2 遺伝子変異と細胞浸潤に関する基礎的研究  
村田 琢、清水香澄、稲垣俊弘、留奥 曜、黒原一人、新井直也  
第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会  
ひめぎんホール  
平成 27 年 4 月 26 日 4 月 28 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 琢 (MURATA, Taku)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80242965

(2) 研究分担者

清水 香澄 (SHIMIZU, Kasumi)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20378368

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )