

# 学位論文の要旨

所属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 病態修復医学講座 口腔・顎顔面外科学分野	氏名	渡邊 由裕
----	--	----	-------

主論文の題名

Phosphodiesterase 4 regulates the migration of B16-F10 melanoma cells

主論文の要旨

## 【目的】

悪性黒色腫治療の最も重要な要因は早期に診断し、適切なマージンをもって外科的に切除することで、現在、転移した悪性黒色腫への有効な治療方法はない。それゆえに、悪性黒色腫細胞での転移のメカニズムを解明し、新しい治療方法を開発することが必要である。

Phosphodiesterase (PDE)は、細胞内のセカンドメッセンジャーである cAMP や cGMP を分解しその濃度を調節している。したがって、cAMP や cGMP による細胞内シグナル伝達系が存在すれば必ず PDE が存在し、そのシグナルに対して重要な役割を担っている。PDE は 11 種類 (PDE1 から PDE11) に分類され、約半数では独立した遺伝子にコードされ、高いアミノ酸配列相同性を示すアイソザイムが存在し、21 遺伝子から構成されている。各アイソザイムには N 末端側での選択的スプライシングにより多くの splice variants が存在する。PDE4 は、cAMP を特異的に分解し、その特異的阻害剤は喘息、慢性閉塞性肺疾患に対する治療薬として 2011 年、米食品医薬品局(FDA)に承認されている。さらに、PDE4 は様々な悪性腫瘍に発現し、その役割についても研究されているが、悪性黒色腫での PDE4 の発現、役割についてはほとんどわかっていない。そこで、本研究では、高い転移能を有するマウス B16-F10 メラノーマ細胞での PDE4 の発現、役割について検討を行った。

## 【材料および方法】

マウス B16-F10 メラノーマ細胞を用いて、以下の実験を行った。

1. PDE 活性測定：細胞をホモジナイズし、PDE 活性を測定した。PDE4 特異的阻害剤 (rolipram) を作用させた時の PDE 活性の値と、total PDE 活性の値の差を PDE4 活性として算出した。
2. RT-PCR：PDE4 は PDE4A-D の 4 種類のアイソザイムが報告されている為、どの PDE4 アイソザイムが発現しているかを RT-PCR を用いて確認した。また splice variants については Serrels et.al.(Curr Biol.2010.)により扁平上皮癌細胞の運動能との関与が示唆された PDE4D5, Marquette et.al.(Nat Struct Mol Biol.2011.)によりヒト悪性黒色腫細胞株での発現が報告された PDE4B2, PDE4D5 について検討した。

3. 増殖能 : cAMP 誘導体(8-bromo-cAMP), PDE4 特異的阻害剤 (rolipram,denbufylline) 存在下で 6 日間培養し、細胞増殖への影響を検討した。
4. cAMP 濃度 : Cyclic AMP EIA kit を用いて PDE4 特異的阻害剤 (rolipram,denbufylline) の存在下で cAMP 濃度を測定した。
5. 運動能 : BD Falcon™ Cell Culture Inserts を用いて 0.1%FBS を含む培養液(Insert) に細胞を加えた後、8-bromo-cAMP, PDE4 特異的阻害剤 (rolipram,denbufylline) 、 Protein kinase A(PKA)阻害剤(PKI14-22)、exchange protein activated by cAMP(Epac) 誘導体(8-pCPT-2'-O-Me-cAMP)を作用させ 20%FBS 培養液(Companion wells)に浸漬させた。次いで、12 時間培養後、ディフ・クイック染色を行い Insert 上部より下部へ移動した細胞数を測定した。

**【結果および考察】**

PDE4 活性は PDE 活性全体の約 60%であった。PDE4 アイソザイムは PDE4B と PDE4D の発現を認めた。また splice variants は PDE4B2、PDE4D5 の発現を認めた。8-bromo-cAMP は細胞増殖を抑制したが、rolipram、denbufylline は細胞内 cAMP 濃度を濃度依存性に上昇させたにも関わらず増殖に影響を与えなかった。これは細胞内に局在するそれぞれの PDE がそれぞれの cAMP シグナルを局所に封じ込め制御するためである (compartmentalization)。このことより PDE4 以外の PDE が増殖に関係している可能性が示唆された。また、8-bromo-cAMP、rolipram、denbufylline は運動能を抑制した。PKI14-22 は運動能を亢進させたが、8-pCPT-2'-O-Me-cAMP では変化を認めなかった。また、rolipram により抑制された運動能は、PKI14-22 により回復した。

以上より、PDE4 は cAMP-PKA シグナルを通じマウス B16-F10 メラノーマ細胞の運動能に対して重要な役割を果たしていると考えられ、PDE4 が悪性黒色腫治療の新しい分子標的である可能性が示唆された。