

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

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	森 田 寛
主論文の題名			
Characterization of phosphodiesterase 2A in human malignant melanoma PMP cells			
主論文の要旨			
<p>【目的】</p> <p>悪性黒色腫は予後不良であり，新しい治療法の開発が必要である．</p> <p>phosphodiesterase (PDE) は細胞内のセカンドメッセンジャーである cAMP, cGMP を分解してその濃度を調整し，様々な生理作用に関与する．現在報告されている 11 種類の PDE (PDE1 から PDE11) は，その約半数が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複数のアイソザイムを持ち，ほとんどのアイソザイムには異なる選択的転写開始部位と選択的スプライシングによって複数の isoform が存在する．PDE2A では N 末端の構造の違いから PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3 の 3 種類が報告されている．</p> <p>我々はこれまでにヒト口腔由来悪性黒色腫細胞で PDE1, PDE3, PDE5 が発現していることを報告したが，PDE2A の発現については未だ不明である．そこで本研究では，PDE2A の発現と役割について検討した．</p> <p>【材料および方法】</p> <p>当科で樹立継代しているヒト口腔由来悪性黒色腫 PMP 細胞を用いて以下の実験を行った．</p> <ol style="list-style-type: none">1. RT-PCR (PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3) : PDE2A1, PDE2A2, PDE2A3 に特異的な primer を作製し，mRNA 発現を検討した．2. Western Blotting : 抗 PDE2A 抗体 (ウサギ，ポリクローナル) を用いてタンパク質の発現を検討した．3. DNA シークエンス解析 : DNA シークエンス解析を行い，遺伝子変異の有無を検討した．4. In vitro migration assay : PDE2 特異的阻害剤 erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) 存在下で 8µm pore insert (BD Bioscience) の上部から下部へ移動した細胞を Diff-Quik™ で染色し，細胞数を顕微鏡下に測定した．			

5. 増殖試験 : EHNA 存在下でそれぞれ 3 日間と 5 日間培養し, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium assay (MTS assay) を行った.
6. Trypan Blue 排除法 : EHNA 存在下でそれぞれ 3 日間と 5 日間培養し, trypan blue 染色により細胞毒性を評価した.
7. BrdU 細胞増殖試験 : EHNA 存在下で 24 時間培養し, BrdU の取り込み量を ELISA 法にて検討した.
8. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling Assay (TUNEL assay) : EHNA 存在下で 24 時間培養し, apoptosis 細胞数を顕微鏡下に測定した.
9. 細胞周期の分析 : EHNA 存在下で 5 日間培養し, G0/G1 期, S 期, G2/M 期にある細胞数の割合をそれぞれ flow cytometer で測定した.
10. RT-PCR (cyclins, CDKs) : EHNA 存在下で 5 日間培養し, cyclin A, cyclin B1, cyclin D1, cyclin E, CDK1, CDK2, CDK4 の mRNA 発現の変化を RT-PCR で検討した.

【結果および考察】

PMP 細胞では PDE2A2 と non-coding transcript variant 4 のみ mRNA 発現を認めた. western blotting では PDE2A2 に対応する約 105kDa のバンドを認めた. シークエンス解析では, 4 箇所でヌクレオチドの変異を認め, そのうち 1 箇所は N 末端にアミノ酸の変異を認めた. EHNA による運動能への影響は認めなかった. 増殖試験では EHNA 存在下で増殖能が抑制された. しかし, 細胞毒性, apoptosis の誘導は認めなかった. 一方, DNA 合成は EHNA によって濃度依存的に抑制された. さらに, 細胞周期は EHNA によって G0/G1 期の細胞数が減少し, G2/M 期の細胞数が増加していた. また S 期と G2 期に関与する cyclin A の mRNA 発現が減少し, G1 期から S 期への移行に関与する cyclin E の mRNA 発現が増加していた.

以上より, PMP 細胞ではアミノ酸の変異した PDE2A2 が発現し, 細胞周期の制御により増殖に関与することが考えられ, PDE2 が悪性黒色腫の治療に対する新しい分子標的である可能性が示唆された.

(注) 2, 000 字以内にまとめて記入すること。