

学位論文審査結果の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 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
審 査 委 員	主 査 副 査 副 査	田中利男 水谷 仁 山崎英俊	
<p>(学位論文審査結果の要旨)</p> <p>Characterization of phosphodiesterase 2A in human malignant melanoma PMP cells</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ことが知られている。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、アミノ酸配列の高い相同性を有する複数の isozyme を持ち、ほとんどの isozyme 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>森田等はこれまでに様々な悪性腫瘍細胞での PDE 発現等を報告した。ヒト口腔由来悪性黒色腫 PMP 細胞でも PDE2 活性を認めたが、PDE2A の発現については未だ不明であった。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>PMP 細胞を用いて実験を行い、以下に示す結果を得た。RT-PCR 法にて mRNA 発現検討を行い、PDE2A2 と non-coding transcript variant 4 のみ mRNA 発現を認めた。Western blotting では抗 PDE2A 抗体 (ウサギ, ポリクローナル) を使用し、PDE2A2 に対応する約 105kDa のバンドを認めた。続いて、シークエンス解析で変異の有無を検討し、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。PDE2 特異的阻害剤 erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) 存在下に 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay により増殖能について検討したところ、EHNA によって濃度依存的に増殖が抑制された。また、EHNA 存在下に in vitro migration assay により運動能について、trypan blue exclusion test により細胞毒性について、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay により apoptosis について検討したところ、これらへの影響は認めなかった。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) cell proliferation assay では BrdU の取り込み量を ELISA 法にて検討を行い、DNA 合成は EHNA によって濃度依存的に抑制された。フローサイトメトリー法により細胞周期解析を行ったところ、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 RT-PCR 法で EHNA 存在下に cyclin A, cyclin B1, cyclin D1, cyclin E, cyclin dependent kinase (CDK) 1, CDK2, CDK4 の mRNA 発現の変化について検討したところ、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。</p> <p>以上のとおり、本研究において、森田は 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していることを証明し、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を示した。これらは、学術上極めて有益であり、学位論文として価値あるものと認めた。</p> <p>Oncology Reports 第 29 巻 P.1275~P.1284 2013 年 4 月 掲載 Hiroshi Morita, Taku Murata, Kasumi Shimizu, Kenya Okumura, Madoka Inui, Toshiro Tagawa</p>			