

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791508

研究課題名（和文）DIF・PDE1 シグナルをターゲットとした悪性黒色腫に対する siRNA 療法

研究課題名（英文）siRNA therapy targeting DIF・PDE1 signaling in malignant melanoma

研究代表者 清水 香澄（Kasumi Shimizu）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20378368

研究成果の概要：

悪性腫瘍細胞で細胞内のセカンドメッセンジャーである cAMP 等を分解しその濃度を調整している phosphodiesterase (PDE)1 アイソザイム (PDE1A, PDE1B, PDE1C) のいくつかが発現していることを確認した。PDE1C の遺伝子変異部分に対する siRNA を作成し、導入を行った。細胞増殖はやや抑制された。科学研究費若手研究(B)（平成 21, 22 年度）では転移との関係を解明する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：悪性黒色腫, Phosphodiesterase 1

1. 研究開始当初の背景

Differentiation-inducing factor (DIF) は、1987 年に Morris らにより細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が分泌する物質で粘菌の柄細胞への分化を誘導する物質として単離され、DIF-1 や DIF-2 など複数の分子が知られている (Nature, 328: 811-4, 1987)。DIF ファミリーは粘菌細胞以外にも哺乳類細胞で分化誘導作用

や増殖抑制作用を示すが、DIF のターゲット分子（結合タンパクや受容体）は全く不明であった。2004 年に、われわれは細胞内のセカンドメッセンジャーである cAMP 等を分解する phosphodiesterase (PDE)1 が DIF のターゲット分子であることを世界で初めて発見した (Cancer Research, 64(7) : 2568-71, 2004)。

PDE 1 は11種類 (PDE 1 からPDE11) 報告され

ているPDEファミリーの一種で、細胞内のcAMPやcGMP濃度を調整することにより、様々な生理作用に関与している。そして、科学研究費若手研究(B)（平成17, 18年度）で悪性黒色腫細胞でのPDE1発現とPDE1Cの遺伝子変異を発見した。PDE1の遺伝子変異の報告は皆無でありこの発見は世界で初めてである。そこで本研究では 悪性黒色腫細胞を含め他の悪性腫瘍細胞でのPDE1発現、PDE1Cに対するsiRNAの導入を行った。また、遺伝子変異部位特異的なsiRNAを作成した。

2. 研究の目的

(1) 科学研究費若手研究(B)（平成17, 18年度）でいくつかの悪性黒色腫細胞でのPDE1発現を確認したので、悪性黒色腫細胞を含め他の悪性腫瘍細胞で同様に発現を検討する。

(2) PDE1には3種類のアイソザイム(PDE1A, PDE1B, PDE1C)が存在するため、各アイソザイムに対するsiRNAを作成し、*in vitro*で悪性黒色腫細胞などへの導入条件を決定する。

(3) 各PDE1アイソザイムのsiRNAでそれぞれのPDE1のmRNAを特異的に抑制し、どのPDE1アイソザイムが増殖と関連するかを解明する。

(4) 科学研究費若手研究(B)（平成17, 18年度）で発見したPDE1の遺伝子変異部位に対するsiRNAを作成する。

(5) PDE1の遺伝子変異部位に対するsiRNAで遺伝子変異のあるPDE1のmRNAを特異的に抑制し、増殖と関連するかを解明する

3. 研究の方法

(1) 悪性腫瘍細胞でのPDE1の発現の確認。

RT-PCR でPDE1 アイソザイムの発現を検討した。

(2) siRNAの導入条件の決定。

① 腫瘍細胞に positive control (GAPDH siRNAなど)を導入し、48時間後にRNA抽出を行った。RT後、Real-Time PCRで標的遺伝子のmRNAのノックダウンを確認した。

② 悪性腫瘍細胞に蛍光標識した Non-silencing siRNAなどを導入し、導入を確認した。

(3) PDE1 アイソザイムに対する siRNA の導入。

① 上記条件を中心にして PDE1 の siRNA を導入し、48 時間後に RNA 抽出を行った。RT 後、Real-Time PCR で標的遺伝子の mRNA のノックダウンを確認した。

(4) PDE1 アイソザイムの siRNA による PDE1 アイソザイムと増殖との関連の確認。

① PDE1 アイソザイムに対する siRNA を作成した。

② 上記で決定した導入条件で各アイソザイムに対する siRNA を導入した。

③ MTS assay で細胞数を測定した。

(5) PDE1 遺伝子変異部位に対する siRNA の作成と遺伝子変異の確認。

(6) PDE1 遺伝子変異部位に対する siRNA による PDE1 アイソザイムと増殖との関連の確認。

① 上記条件を中心にして PDE1 の siRNA を導入し、48 時間後に RNA 抽出を行った。RT 後、Real-Time PCR で標的遺伝子の mRNA のノックダウンを確認した。

② ①で決定した導入条件で siRNA を導入した。

③MTS assay で細胞数を測定した.

4. 研究成果

(1) 悪性腫瘍細胞でのPDE1の発現の確認.
各悪性腫瘍細胞でのPDE1アイソザイム (PDE1A, PDE1B, PDE1C) の発現をRT-PCRで検討した. 多くの細胞でPDE1AかPDE1C, あるいは, PDE1AとPDE1Cの両方が発現していたが, PDE1Bはほとんど発現していなかった (表1).

表1. 悪性腫瘍細胞でのPDE1発現

PDE1AとPDE1Cが発現	
ヒト口腔由来悪性黒色腫HMG細胞	
ヒト口腔由来悪性黒色腫PMP細胞	
ヒト口腔由来悪性黒色腫MAA細胞	
ヒト子宮由来悪性黒色腫HMV-2細胞	
ヒト皮膚由来悪性黒色腫G361細胞	
ヒト肝臓由来腺癌SK-Hep-1細胞	
PDE1Aが発現	
ヒト皮膚由来悪性黒色腫C32細胞	
ヒト白血病K562細胞	
PDE1Cが発現	
マウス皮膚由来悪性黒色腫B-16細胞	
PDE1A, PDE1BとPDE1Cが発現	
ヒト口腔由来悪性黒色腫MMN9細胞	

(2) siRNA の導入条件の決定.
MAA細胞やSK-Hep-1細胞等に positive control として GAPDH 等に対する siRNA を Lipofectamine™ RNAiMAX にて導入し, Real-Time PCRでGAPDH mRNAの発現量を定量した. そして, 抑制率が70%以上である導入条件を決定した. 更に, 蛍光標識したNon-silencing siRNAなどを導入し, 導入を確認した.

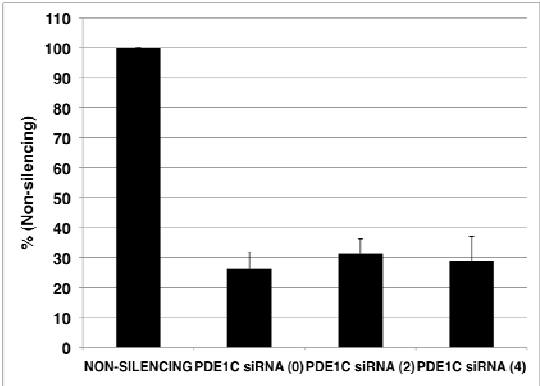
(3) PDE1 アイソザイムに対する siRNA の

導入.
上記条件を中心にしてPDE1AとPDE1Cの siRNAを導入し, 抑制率が70%以上である導入条件を決定した.

(4)PDE1 アイソザイムの siRNA による PDE1 アイソザイムと増殖との関連の確認.
上記の条件で細胞増殖試験を行ったが, PDE1AとPDE1Cでは増殖には変化が認められなかった.

(5) PDE1遺伝子変異部位に対するsiRNA作成と遺伝子変異の確認.
SK-Hep-1細胞等で遺伝子変異が確認できた部位に対するsiRNAを作成した. また, 他の悪性腫瘍細胞で同遺伝子変異部位を確認し, 他の細胞で遺伝子変異が無いことを確認した.

(6) PDE1 遺伝子変異部位に対する siRNA による PDE1 アイソザイムと増殖との関連の確認.
上記条件を中心に検討を行い抑制率が70%以上である導入条件を決定した (図1). そこでこの条件でsiRNAを導入し細胞増殖試験を行ったところ, PDE1Cに対するsiRNAの作用で増殖抑制効果を認めた.



(図1) siRNA の発現抑制効果

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 1 件)

(1)Kasumi Shimizu, Taku Murata, Yoshihiro Watanabe, Chu Sato, Hiroshi Morita and Toshiro Tagawa. Characterization of Phosphodiesterase 1 in Human Malignant Melanoma Cell Lines. Anticancer Research. 2009. 29(4). 1119-1122. 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1)清水香澄, 村田 琢, 渡邊由裕, 溝井 心 鈴木智子, 森田 寛, 平本憲一, 田川俊郎 分化誘導因子による悪性黒色腫細胞増殖

抑制効果の検討

第 51 回日本口腔科学会中部地方部会

平成20年10月11日

愛知学院大学(名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし