

平成21年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390537  
 研究課題名（和文）DIF・PDEシグナルをターゲットとした悪性黒色腫細胞に対する分子標的薬の開発  
 研究課題名（英文）Development of molecular targeted drugs for DIF・PDE signals in malignant melanoma cells  
 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

## 研究成果の概要：

細胞性粘菌が分泌する Differentiation-inducing factor (DIF) のターゲット分子が phosphodiesterase (PDE)1であることを発見したことより、PDEが細胞増殖に関与する可能性を導きだし本研究を行った。多くの悪性腫瘍細胞で発現しているPDEとほとんどないPDEがあった。recombinant PDE3活性はDIFで抑制されなかった。また、PDE5阻害剤等では増殖が抑制されたが、PDE7阻害剤等では抑制されなかった。更に、PDE2遺伝子導入細胞では増殖が促進した。以上からPDEは細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,900,000	0	7,900,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	2,250,000	17,650,000

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. 研究開始当初の背景

Differentiation-inducing factor (DIF) は、細胞性粘菌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1987年に Morrisらにより単離され (Nature, 328: 811-4, 1987), DIF-1やDIF-2など複数の分子が知られている (DIFファミリー)。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、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。しかし、2004年にわれわれがDIFのタ

ーゲット分子がphosphodiesterase (PDE)1であることを世界で初めて発見した (Cancer Research, 64(7) : 2568-71, 2004)。

PDEは11種類 (PDE1からPDE11)あり、細胞内のセカンドメッセンジャーであるcAMPやcGMPを分解できる唯一の酵素でそれらの濃度を調整している。これまでにいくつかの悪性黒色腫細胞でPDE発現を発見し、更に、これらの細胞でDIFが細胞増殖を抑制することを確認した。また、PDE1阻害剤の多くが他のPDEを阻害することが報告されるようになり、DIFもPDE1以外の他のPDEをターゲット分子とすること

が考えられた。そのためPDE1以外のPDEが細胞増殖に関係する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

われわれが DIF のターゲット分子が PDE1 であることを世界で初めて発見したことより、PDE が細胞増殖に関係する可能性が示唆された。そこで本研究では悪性腫瘍細胞での PDE 発現を確認し、発現のある PDE に対して阻害剤と DIF を作用させ増殖との関係を検討すると共に、PDE 遺伝子変異の確認と遺伝子導入を行い、PDE と増殖との関係を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 悪性腫瘍細胞での PDE 発現の検討.

- ①悪性腫瘍細胞からトータル RNA を抽出した.
- ②トータル RNA の濃度を吸光度で測定した.
- ③RT-PCR を行い、電気泳動でバンドを確認した.

### (2) recombinant protein 作成.

- ①上記の RT で全長のためのプライマーを作成し、PCR を行った.
- ②電気泳動で PCR 産物のサイズを確認した.
- ③PCR 産物を TA cloning にてプラスミドベクターに導入後、大腸菌にプラスミドベクターをトランスフェクションし、寒天プレート上でコロニーを選択した.
- ④選択したコロニーを LB 培地で培養し、プラスミドを精製した.
- ⑤制限酵素処理で確認後、シークエンサーでシークエンスを行った.
- ⑥制限酵素処理後、baculovirus 用のプラスミドに組み込み、Sf9 細胞にトランスフェクションした.

### (3) PDE 活性.

- ①PDE 測定用 buffer でホモジナイズした.
- ②PDE 活性測定とタンパク定量を行った.

### (4) 細胞増殖試験.

- ①96 穴プレートに細胞を播種 24 時間後に薬剤を加えた.
- ②MTS assay にて細胞増殖効果を判定した.

### (5) PDE 遺伝子変異の確認.

- ①上記 (2) で作成したプラスミドを使用した.
- ②シークエンス用のプライマーを作成し、シークエンスを行った.

### (6) PDE 遺伝子導入.

- ①PDE 遺伝子を組み込んだプラスミドを作成した.

②細胞にプラスミドを導入し、抗生剤で選択し、クローンを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 悪性腫瘍細胞での PDE 発現の検討.

これまでにいくつかの悪性腫瘍細胞で、個々の PDE 発現が報告されているだけであった。そこで悪性黒色腫細胞を中心に PDE 発現を確認した。PDE4 や PDE7 は多くの細胞で発現していた。PDE2 や PDE5 等はいくつかの細胞で発現が確認できた。しかし、PDE3 や PDE11 はほとんど発現していなかった。

### (2) recombinant protein 作成と PDE 活性.

PDE2 や PDE3 等の recombinant protein を baculovirus システムを使用して、Sf9 細胞で作成した。PDE2 は cGMP により活性が上昇し、PDE2 阻害剤 EHNA で抑制される。Recombinant PDE2 の活性はトータルで約 0.8 nmol/min/mg protein で非常に高く、cGMP により 3 倍に活性が上昇し、EHNA で抑制された (図 1)。また、recombinant PDE3 活性もトータルで約 1.3 nmol/min/mg protein で非常に高く、PDE3 阻害剤 cilostamide で抑制された (図 2)。しかし、DIF は PDE3 活性を抑制しなかった。

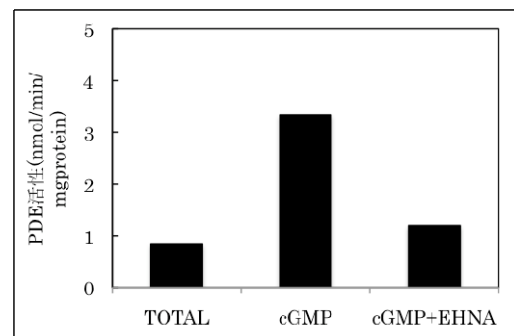


図 1. RecombinantPDE2 の PDE 活性

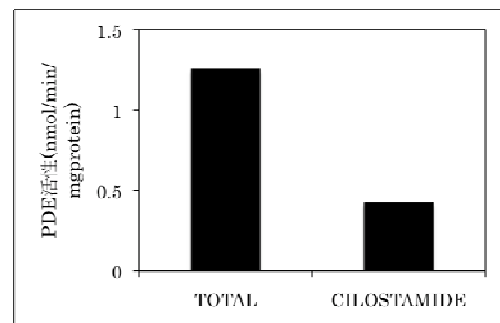


図 2. RecombinantPDE3 の PDE 活性

(3) PDE 阻害剤と DIF での細胞増殖への影響.

これまでにわれわれはいくつかの悪性腫瘍細胞で PDE と増殖との関係を報告したが、詳細は不明であった。そこで阻害剤のある PDE5 や PDE7 阻害剤等で増殖との関係を検討した。ヒト口腔由来悪性黒色腫 MAA 細胞は PDE5 阻害剤により増殖が濃度依存性に抑制された (図 3)。また、DIF でも同様に MAA 細胞の増殖を抑制した (図 4)。しかし、PDE7 阻害剤では全く抑制されなかった。

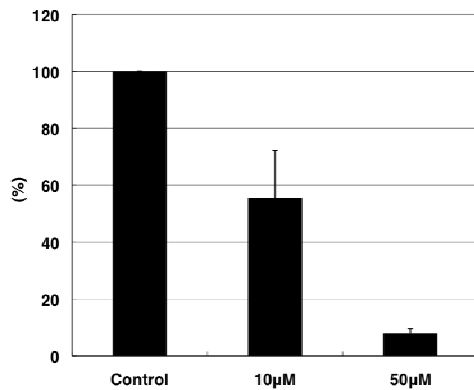


図 3. MAA 細胞での PDE5 inhibitor dipridamole の増殖への効果

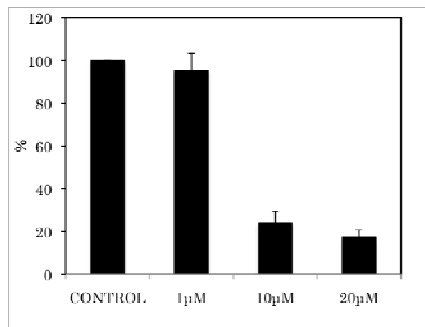


図 4. MAA 細胞での DIF の増殖への効果

(4) PDE 遺伝子変異の確認.

これまでに悪性腫瘍細胞での PDE の遺伝子変異は報告されていないので検討をおこなった。PDE2, および, PDE4 遺伝子では, 遺伝子変異が確認できたが, アミノ酸レベルでは変化は認めなかった。変異部分に対する siRNA はうまく作成できなかった。

(5) PDE 遺伝子導入.

PDE2 遺伝子の導入を MAA 細胞に行った。最も活性の高いクローンではトータル活性が約 15 pmol/min/mg protein で cGMP により約 110 pmol/min/mg protein と 7 倍に活性が上昇した (図 5)。プラスミドだけを導入したコントロールと比較して細胞増殖は促進していた。

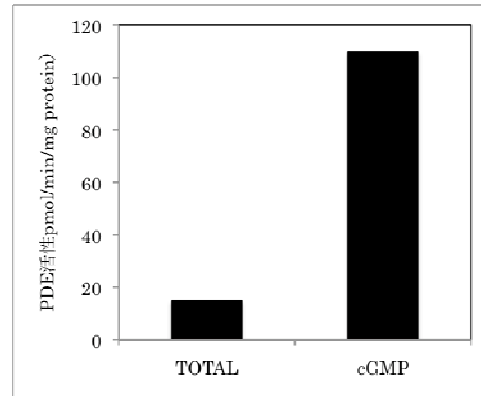


図 5. MAA 細胞への PDE2 遺伝子導入

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)

[学会発表] (計 4 件)

①村田 琢, 清水香澄, 森田 寛, 渡辺由裕, 関田素子, 野村城二, 乾真登可, 田川俊郎. 悪性黒色腫細胞への phosphodiesterase 2A 遺伝子導入.

第 45 回口腔組織培養学会.  
松本.

2008 年 11 月 15 日

②Kasumi Shimizu, Taku Murata, Yoshihiro Watanabe, Kenichi Hiramoto, Motoko Sekida, Toshiro Tagawa.

Study of cGMP-related phosphodiesterase in human oral malignant melanoma cell line. 18th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery.

Bangalore, India.

2007 年 11 月 14 日

③清水香澄, 村田 琢, 成田 素, 山本紗野子, 平本憲一, 奥村健哉, 田川俊郎. 悪性黒色腫細胞株での PDE5 阻害剤での影響.

第 32 回日本口腔外科学会中部地方会.  
金沢.  
2007 年 5 月 26 日.

④Kasumi Shimizu, Taku Murata, Madoka Inui,  
Kenichi Hiramoto, Tasuku Fujii, Takayuki  
Nagata, Toshiro Tagawa.  
Phosphodiesterase (PDE) 7 in human oral  
malignant melanoma cell lines.  
11th International Congress on Oral  
Cancer.  
Grado, Italy.  
2006 年 5 月 15 日.

## 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

田川 俊郎 (Tagawa Toshiro)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：30046346

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

なし