

機関番号：14101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791986
 研究課題名（和文）DIF・PDE1 シグナルによるヒト悪性黒色腫に対する siRNA 療法
 研究課題名（英文）siRNA therapy targeting DIF・PDE1 signal transduction pathway on human 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（和文）：ヒト悪性黒色腫細胞に、PDE1A, PDE1C に対する siRNA を作用させた場合の運動能の変化を検討した。その結果いずれの場合にも運動能は、やや亢進した。PDE1 とアポトーシスとの関係を検討したが、関係は認めなかった。また、PDE1 と DNA 合成との関係を認め、PDE1 が細胞周期を調節している可能性を発見した。PDE1 と浸潤との関係を検討するため、PDE1 特異的阻害剤を作用させ matrix metalloproteinase (MMP) の発現を確認した。MMP2 の発現は完全に抑制されたが MMP3、MMP8 の発現には大きな変化を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effect of PDE1A siRNA and PDE1C siRNA for human malignant melanoma cell migration. Both of them increased cell migration slightly. And, PDE1 did not relate apoptosis. But, PDE2 related the DNA synthesis and it suggested that PDE2 may regulates the cell cycle. Furthermore, PDE1 specific inhibitor inhibits the expression of MMP2, but did not inhibit expression of MMP3 and MMP8.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Phosphodiesterase、悪性黒色腫

1. 研究開始当初の背景

Differentiation-inducing factor (DIF) は、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 (Morris *et. al.* 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、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。しかし、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 (Shimizu *et. al.* Cancer Research. 64 ; 2568-71 2004). この発見により分化や増殖機構を PDE1 と直接結び付け、PDE1 シグナルが悪性腫瘍細胞の新しい分子標的であることを初めて導き出した。

PDE1 は 11 種類 (PDE1 から PDE11) 報告されている PDE ファミリーの一つで、3 種類のアイソザイム (A, B, C) が存在する。そして、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が、悪性腫瘍との関係は全く知られていなかった。私は、平成 17, 18 年度科学研究費若手研究 (B) の助成を受け、悪性黒色腫細胞を中心に PDE1 と増殖との関係、および、遺伝子異常を検討し、PDE1 の増殖制御、および、遺伝子異常を世界で初めて発見した。更に、平成 19, 20 年度科学研究費若手研究 (B) の助成により、この遺伝子異常部位のみに作用する siRNA を作成し、増殖との関係を検討した。

2. 研究の目的

平成 17, 18 年度、および、平成 19, 20 年度科学研究費若手研究 (B) で、以下に説明する PDE1 の遺伝子変異を世界で初めて発見し、変異部位特異的な siRNA を作成した。そこで本研究では、口腔由来悪性黒色腫細胞を中心に、この siRNA を使用して PDE1 と転移の重要なファクターである運動能等との関係、および、細胞増殖の機序を更に詳細に解明する事を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 悪性黒色腫細胞での siRNA の各遺伝子発現抑制効果の検討。

① 悪性黒色腫細胞に siRNA を導入し、指定の

時間培養した。

② 悪性黒色腫細胞から total RNA を抽出した。

③ total RNA の濃度を分光光度計で吸光度を測定し計算した。

④ リアルタイム PCR を行い、siRNA 抑制効果を確認した。

(2) 悪性黒色腫細胞での siRNA による運動能への効果の検討。

① コンパニオンプレートに培養液 (10% FBS) を加えた。

② 細胞を培養液に浮遊した。

③ インサートをコンパニオンプレートに入れ、細胞をインサート内に入れた。

④ 指定の時間培養後、インサートの上面の細胞を綿棒で除去後、下面の細胞を染色した。スライドガラスにマウント後、顕微鏡下で細胞数をカウントした。

(3) アポトーシスの検討。

① カルチャースライドに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。

② 指定の時間培養後、TUNEL 染色にてアポトーシスを検討した。

(4) BrdU の取込みの検討。

① 96 穴プレートに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。

② 指定の時間培養後、BrdU の取込みを検討した。

(5) 浸潤抑制機序の検討。

① 24 穴プレートに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。

② 指定の時間培養後、total RNA を抽出した。

③ total RNA の濃度を分光光度計で吸光度を測定し計算した。

④ RT-PCR を行い、電気泳動後サイバークリー

ンで染色し、バンドを確認した。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫細胞での siRNA の各遺伝子発現抑制効果

それぞれの発現は 70%以上抑制された。

(2) 悪性黒色腫細胞での siRNA による運動能への効果の検討。

siRNA によって PDE1A, PDE1C の発現を抑制すると、いずれの場合にも運動能は、やや亢進した。

図 1. PDE1A に対する siRNA の悪性黒色腫細胞の運動能への効果

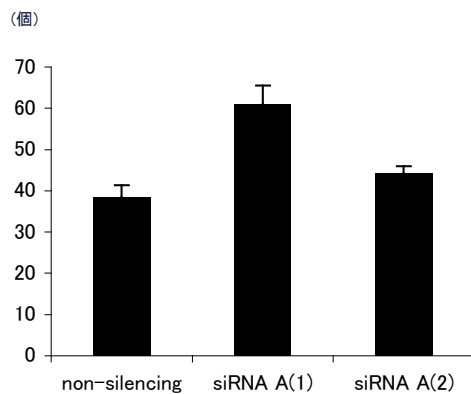
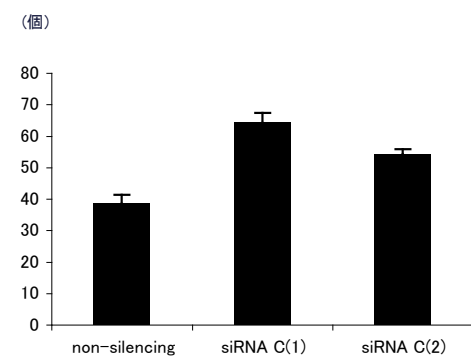


図 2. PDE1C に対する siRNA の悪性黒色腫細胞の運動能への効果



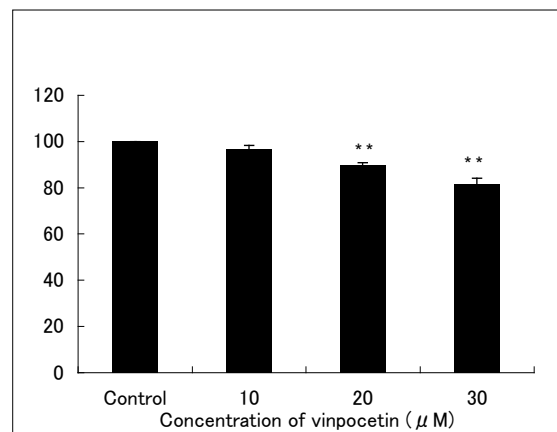
(3) アポトーシス

PDE1 とアポトーシスとの関係を検討するため、PDE1 特異的阻害剤を作用させ TUNEL 染色を行った。しかし、特に変化を認めず PDE1 とアポトーシスとの関係は認めなかった。

(4) BrdU の取込み

PDE1 と DNA 合成との関係を検討するため、PDE1 特異的阻害剤を作用させ BrdU の取り込みを測定した。PDE1 特異的阻害剤の濃度依存性に BrdU の取り込みが減少したため PDE1 と DNA 合成との関係を認め、PDE1 が細胞周期を調節している可能性を発見した。

図 3. PDE1 特異的阻害剤の BrdU の取込みへの効果



(5) 浸潤抑制機序

PDE1 と浸潤との関係を検討するため、PDE1 特異的阻害剤を作用させ matrix metallo- protease(MMP)の発現を RT-PCR などで確認した。MMP2 の発現は完全に抑制されたが MMP3、MMP8 の発現には大きな変化を認めなかった。

表1. 悪性黒色腫細胞のMMP発現に対する
PDE1特異的阻害剤の効果

	control	10 μ M	20 μ M
MMP2	+	+	+
MMP3	+	+	+
MMP8	-	-	-

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

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2件)

① 清水香澄, 村田 琢, 竹岡高志, 稲垣俊弘
山口晋司, 渡邊由裕, 森田 寛, 田川俊郎
ヒト口腔由来悪性黒色腫細胞株での
PDE1 遺伝子発現抑制
第54回日本口腔外科学会総会
平成21年10月9日
札幌

② 渡邊由裕, 村田琢, 清水香澄, 関田素子,
田中宏明, 平本憲一, 田川俊郎
B16メラノーマ細胞での
phosphodiesterase 1 の特徴
第63回日本口腔科学会総会
平成21年4月16日
浜松

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