

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11242

研究課題名(和文) PDE1阻害剤による口腔悪性黒色腫の転移抑制機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of metastasis regulation mechanism of oral malignant melanoma by phosphodiesterase 1 inhibitor for novel therapeutic method

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、Phosphodiesterase(PDE)の一つであるPDE1の阻害剤が悪性黒色腫細胞の運動能を抑制する機構について解明した。当科で樹立、継代しているヒト口腔悪性黒色腫細胞MAAに sildenafil を作用させると、細胞の先端端においてアクチンの重合が抑制され、lamellipodia(膜状突起)の形成が阻害されていた。MAA細胞はPDE1を発現しPDE5を発現していないことから、sildenafilによるMAAの運動能の抑制には、PDE1の阻害を介した細胞内のcAMP濃度の上昇とlamellipodiaの阻害が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidated the mechanism that PDE1 inhibitor suppresses mobility of malignant melanoma cells. Sildenafil inhibited the polymerization of actin at the leading edge of the human oral malignant melanoma MAA cells, and also inhibited the formation of lamellipodia. Since MAA cells express PDE1 and do not express PDE5, the elevation of intracellular cAMP concentration through inhibition of PDE1 may be involved in suppression of the mobility of MAA by sildenafil.

研究分野：口腔外科学

キーワード：悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、さまざまな治療に抵抗性で、かつ極めて悪性度が高いことで知られ、新しい治療法の開発が急務である。最近、BRAF 阻害剤や、c-kit 阻害剤が悪性黒色腫の分子標的薬として注目を集めているが、それぞれ BRAF、c-kit に変異のある腫瘍にしか効果は期待できず、さらにその耐性獲得も問題となっている。

PDE は 11 種類(PDE1 から PDE11)報告されており、細胞内の cAMP、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。その阻害剤 Silostamide, Sildenafil, Valdenafil などすでに抗血小板薬、勃起不全(ED)治療薬、肺高血圧症治療薬などとして広く臨床で使用されているが、悪性腫瘍との関係はほとんど知られていなかった。一方、2004 年に研究代表者らは PDE1 が細胞性粘菌 Dictyostelium discoideum が分泌する物質である Differentiation-inducing factor (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 (Shimizu et.al. Anticancer Res. 29(4):1119-22 2009)。その後、われわれは、PDE1 阻害剤が特に悪性黒色腫の運動能を強く抑制することや、DIF、sildenafil が悪性黒色腫細胞において PDE1 阻害剤としての効果を示すことを明らかにした。

2. 研究の目的

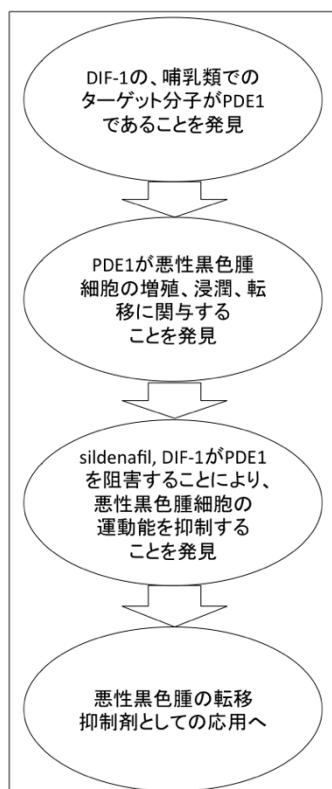
PDE1 阻害作用を持つ sildenafil は、悪性黒色腫細胞の運動能を抑制するので、その分子機構の詳細について検討した。

3. 研究の方法

主として、当科で樹立、継代しているヒト口腔由来悪性黒色腫細胞 MAA を使用した。In vivo 実験においては、および PDE1 を強く発現するマウス B16-F10 細胞を用いた。薬剤は、PDE5 阻害剤として現在広く臨床で使用されており、PDE1 阻害作用を併せ持つ sildenafil を用いて検討した。運動能は BD Falcon™ セルカルチャーインサートを用いて、boyden chamber assay にて検討した。細胞骨格の変化は、ファロイジン染色にて検討した。

4. 研究成果

MAA 細胞に sildenafil を作用させると、細胞の先端端においてアクチンの重合が抑制され、lamellipodia(膜状突起)の形成が阻害されていた。MAA 細胞は PDE1 を発現し PDE5 を発現していないことから、sildenafil による MAA の運動能の抑制には、PDE1 の阻害を介した細胞内の cAMP 濃度の上昇と lamellipodia の阻害が関与する可能性が示唆された。また、悪性黒色腫では、低分子量 G タンパク質 Rho 等が、その転移において重要であることから、MAA 細胞で RT-PCR を行った



ところ, RhoA, RhoB, RhoC の mRNA 発現が確認された.

さらに, cAMP 誘導体であり, protein kinase A(PKA) をアクチベートする 8-bromo-cAMP, N⁶-benzoyl-cAMP を作用させたところ, 糸状仮足, 葉状仮足の形成は抑制された. また PKA のインヒビターである PKI14-22 を作用させると, 糸状仮足, 葉状仮足の形成は亢進した. 次に PKA とは別の経路である Epac についても検討を行った. Epac のアクチベーターである 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP を作用させたところ, ほとんど変化がなかった.

次に, sildenafil が, in vivo で転移抑制効果を示すかどうかを確認するための実験を行った. B16-F10 細胞では PDE5 が発現しており, PDE5 を阻害することによって cGMP 経路が活性化すると運動能が促進される (Dhayade から: Cell Reports) との論文が 2016 年に掲載されたため, B16-F10 は, control として使用した. melanoma 細胞の移植は, 眼窩静脈叢より経静脈的に行った. 移植より 14 日後, 肺を摘出し, 実体顕微鏡下で転移巣を計数した. PDE1 は発現しているが, PDE5 を発現していないヒト口腔由来 melanoma MAA cell での実験を開始したが, MAA cell は, 眼窩静脈叢からの移植では明らかな肺転移は確認できなかった. sildenafil が, in vivo での転移抑制効果を示すかどうかを確認するためには, PDE1 を発現し, PDE5 を発現していない細胞で, マウスに高率に転移する細胞が必要である. MAA cell の移植方法を変更することにより, 転移巣が形成される可能性があり, こちらについても検討する必要がある.

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 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

悪性黒色腫細胞における cAMP シグナルの細胞骨格への影響

清水香澄, 村田 琢, 稲垣俊弘,

黒原一人, 新井直也

第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会
岩手医科大学附属病院

循環器医療センター

岩手県 盛岡市

平成 29 年 11 月 4 日

PDE 阻害剤 Sildenafil による悪性黒色腫細胞の運動能の抑制に関する研究

清水香澄, 森田 寛, 村田 琢, 奥村健哉, 乾 眞登可, 新井直也

第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会
名古屋国際会議場

愛知県 名古屋市

平成 27 年 10 月 16 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

村田 琢 (MURATA, Taku)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80242965

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()