

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10068

研究課題名(和文) PDE1を分子標的とした口腔悪性黒色腫新規治療法の開発

研究課題名(英文) Studies for a new treatment for oral malignant melanoma using PDE1 as a molecular target

研究代表者

清水 香澄 (Shimizu, Kasumi)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20378368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔悪性黒色腫細胞株を使用し原発巣由来PMP細胞ではPDE1Cのバリエーションの一つであるPDE1C3が、同一患者の腋窩リンパ節転移巣由来MAA細胞ではPDE1C1が発現していることを明らかにした。また、PDE1C1遺伝子を強制発現させたPMP細胞では増殖能・形態に変化はみられなかったが、運動能が上昇しており、PDE1C3遺伝子を強制発現させたPMP細胞では増殖能・形態・運動能いずれも変化はなかった。以上のことから、PDE1C1が口腔悪性黒色腫細胞の運動能に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫のなかでも口腔に発生するものは、皮膚に発生するものよりも予後不良で、生存期間の中央値は2年とされている。一般的に悪性黒色腫の発症に関連する遺伝子変異としてBRAF、RAS、およびKIT遺伝子変異が知られているが、口腔悪性黒色腫では、関連する遺伝子変異は、KITが10-30%、RASが10-20%、BRAFは10%未満である。本研究ではPDE1のバリエーションの一つであるPDE1Cが口腔悪性黒色腫の運動能を促進している可能性を明らかにし、PDE1阻害剤が悪性黒色腫の治療に応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We found that PDE1C3, a variant of PDE1C, was expressed in PMP cells derived from the primary tumor, whereas PDE1C1 was expressed in MAA cells derived from metastases in the axillary lymph nodes of the same patient. Moreover, when PMP cells overexpressed the PDE1C1 gene, their motility increased, but there were no changes observed in their proliferation or morphology. Conversely, when PMP cells overexpressed the PDE1C3 gene, there were no changes observed in their proliferation, morphology, or motility. These findings suggest that PDE1C1 may be involved in the motility of oral malignant melanoma cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：悪性腫瘍 phosphodiesterase

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る。最近、BRAF 阻害剤や c-kit 阻害剤といった分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬ニボルマブ等が悪性黒色腫の治療薬として注目を集めているが、分子標的薬はそれぞれ 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。特に、口腔に発生する悪性黒色腫では、BRAF 変異は 10%未満、KIT 変異は 10-30%とわずかである (WHO Classification of Head and Neck Tumours WHO/IARC Classification of Tumours, 4th Edition, Volume 9, p126-127.)。免疫チェックポイント阻害薬においては無効例も少なくないほか、高額な治療費も問題となっており、さらなる治療薬の開発が急務である。

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 Cilostamide, Sildenafil, Vardenafil などはずでに抗血小板薬、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 年にわれわれは 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)。その後、口腔悪性黒色腫細胞で PDE1 が発現していることを発見し、増殖等の機能に関与している可能性を見出した (Shimizu et.al. Anticancer Res. 29(4):1119-22 2009)。

DIF は、哺乳類の腫瘍細胞に対し強力な増殖抑制作用を持つ。そこでわれわれは、PDE1 阻害剤を悪性黒色腫の治療薬として応用することを着想した。PDE1 阻害剤は未だ臨床応用されていないが、PDE5 阻害剤としてすでに一般的に広く使用されている sildenafil が PDE1 阻害作用を併せ持つことにわれわれは着目した。Sildenafil は 1990 年代に、もともと狭心症治療薬として開発され、治験段階で陰茎勃起促進効果が発見されたというエピソードがある。また、1998 年に ED 治療薬として発売された後、2008 年に肺高血圧症治療薬として新たに承認を得たという歴史からもうかがえるように、今後、さらなる適応拡大の可能性を持った薬剤である。そしてわれわれは sildenafil を、PDE1 を発現する口腔悪性黒色腫細胞に作用させ、その運動能を抑制するという結果を得た。

2. 研究の目的

これまでの研究結果より、sildenafil が cAMP シグナルを介して口腔悪性黒色腫細胞の運動能を抑制することが示唆されたが、PDE1 を阻害して運動能を抑制していることを証明するためには PDE1 発現を増強あるいは阻害して、運動能が変化するかどうかを確認する必要がある。そこで本研究では口腔悪性黒色腫細胞で PDE1 発現を増強して運動能が変化するかどうかを確認することとした。PDE1 には PDE1A、PDE1B、PDE1C のサブタイプがあり、それぞれにさらにバリエーションが存在する。これまでにわれわれは、口腔悪性黒色腫細胞において PDE1C のバリエーションである PDE1C1、PDE1C3 が発現することを示した。そこで本研究では、PDE1C1 発現プラスミド、PDE1C3 発現プラスミドを口腔悪性黒色腫細胞に導入し強制発現させることで、運動能への影響を検討した。

3. 研究の方法

細胞は、当教室で樹立したヒト口蓋由来悪性黒色腫 PMP 細胞と、同一患者の腋下リンパ節転移巣由来 MAA 細胞を使用した。

PDE1C バリエント mRNA 発現の確認:PDE1C には PDE1C1 から PDE1C5 まで 5 つのバリエントが報告されているが、われわれはこれまでに MAA 細胞で PDE1C1、PDE1C3 が発現していることを報告している。しかし real-time PCR は行っておらず、発現量については不明であった。そこで、PMP 細胞、MAA 細胞で real-time PCR を行い、PDE1C1、PDE1C3 の mRNA 発現量について検討した。

PMP 細胞での PDE1C1、PDE1C3 強制発現:PDE1C1 発現遺伝子、PDE1C3 発現遺伝子を作成し、pcDNA3.1(+) プラスミドに組み込み、Lipofectamine®2000 を使用して PMP 細胞に導入した。PDE1C1 mRNA 発現の確認は real time PCR、タンパク質発現の確認はウエスタンブロットで行った。

運動能の測定:PDE1C1 発現遺伝子を PMP 細胞に導入後、BD Falcon™ セルカルチャーインサート(ポアサイズ 8 μm)に細胞を播種し、移動した細胞をディフクイック染色して計数した。

細胞増殖試験:PDE1C1 発現遺伝子を PMP 細胞に導入後、Cell Counting Kit-8(Dojindo)で検討した。

細胞形態変化の確認:PDE1C1 発現遺伝子を PMP 細胞に導入後、位相差顕微鏡で細胞の形態を確認した。

4. 研究成果

リアルタイム PCR では、PMP 細胞に PDE1C1 発現プラスミドを導入すると、ベクターのみ導入したものと比較して PDE1C1 mRNA が大量に発現していることを確認した。

ウエスタンブロットでは、ベクターのみ導入したものではバンドが確認できなかったのに対して PDE1C1 を導入した細胞のみ約 70kDa のバンドを確認した。

運動能は、ベクターのみ導入した細胞と比較し、PDE1C1 を強制発現させた細胞で有意に上昇していた。

細胞増殖試験では、ベクターのみ導入した細胞と PDE1C1 を強制発現させた細胞を比較して有意差は認めなかった。

本研究では、PDE1C1 を発現していない口腔悪性黒色腫細胞株に PDE1C1 を強制発現させることによりその運動能が上昇した。PDE1C1 を発現している MAA 細胞での過去の研究結果とあわせ、PDE1C1 が細胞の運動能に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水香澄、村田琢、小泉岳、新井直也
2. 発表標題 口腔悪性黒色腫細胞におけるPDE1の発現と悪性度への影響
3. 学会等名 第57回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水香澄、村田琢、小泉岳、滝川享、新井直也
2. 発表標題 口腔悪性黒色腫細胞におけるphosphodiesterase 1C1の運動能への影響
3. 学会等名 第59回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 琢 (Murata Taku) (80242965)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------