

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592919

研究課題名(和文) 勃起不全治療薬ホスホジエステラーゼ5阻害剤は悪性黒色腫の分子標的となり得るか？

研究課題名(英文) Phosphodiesterase 5 inhibitor, using for erectile dysfunction treatment, may use the treatment of melanoma

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、以前、Phosphodiesterase(PDE)1シグナルと悪性黒色腫の増殖・運動能との関連を発見した。そこで、PDE1阻害作用を併せ持ち、勃起不全治療薬であるPDE5阻害剤が、悪性黒色腫等の治療薬として応用可能かを検討した。PDE5阻害剤sildenafilの運動能への影響を検討したところ、PDE1を発現する細胞では運動能を抑制した。その他のPDE1を発現していない細胞では、運動能に影響はなかった。sildenafilの効果は各細胞のPDE遺伝子発現パターンによって異なり、オーダーメイド治療への応用が考えられる。

研究成果の概要(英文)： We have already reported that the PDE1 signal affects the cell proliferation and motility in malignant melanoma cells. Therefore, we examined if the PDE5 inhibitor using for ED treatment, which also inhibits PDE1, is available as the therapeutic agent for malignant melanoma. Sildenafil inhibited cell motility of malignant melanoma MAA cells which expressed PDE1. Sildenafil was not effected for other oral malignant melanoma cells which did not express PDE1. As each oral malignant tumor cells showed the different PDE expression patterns and the effect of sildenafil varied by PDE expression pattern, PDE might be used for the personalized cancer therapy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：悪性黒色腫 Phosphodiesterase

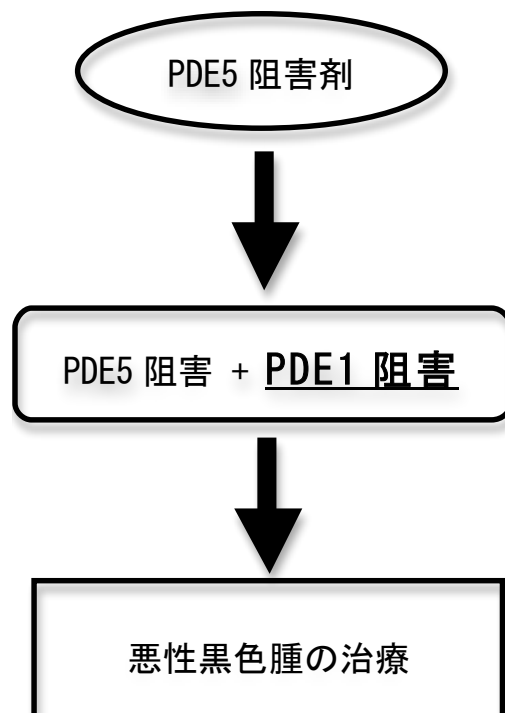
1. 研究開始当初の背景

PDE5は11種類(PDE1からPDE11)報告されているPDEファミリーの一種で、細胞内のcGMP濃度を調整することにより様々な生理作用に参与している。その阻害剤Sildenafil、Valdenafilなどはすでに勃起不全(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。本薬剤は、同時にPDE1阻害作用も持ち合わせていることが判明し、さらに他疾患への応用が期待されている。一方、2004年に申請者らは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、申請者は平成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検討、PDE1による増殖制御、および、遺伝子異常を発見した。更に平成21、22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、増殖との関係を明らかにした。現在、平成22、23年度科学研究費若手研究(B)により転移との関係を検討中である。しかし、PDE1シグナル制御に必要なPDE1特異的阻害剤や、siRNAは、現在のところ臨床応用されていない。悪性黒色腫は様々な治療に抵抗性で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、PDE5阻害剤はPDE1阻害作用を併せ持つことが判明しており、申請者は、これを悪性黒色腫の治療に応用することを着想した。PDE5阻害剤の一つである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。

本研究によってそのPDE1阻害効果および他のPDEファミリーや下流シグナルへの影響等、分子機構の詳細を解明し、臨床応用への足がかりとしたい。



2. 研究の目的

PDE5阻害剤が、悪性黒色腫細胞の増殖能、運動能等の機能を抑制するかどうかについて検討する。PDE5阻害剤による抑制効果がみられた場合、そのシグナル伝達機構について検討する。

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等、およびPDE1を強く発現する肝癌由来SK-HEP-1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いる sildenafil を用いて検討した。細胞増殖への影響は MTS assay で検討した。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。cAMP 濃度測定は cAMP-Glo™ Max Assay を用いて行った。

4. 研究成果

SK-HEP-1 細胞に sildenafil を作用させ、cAMP-PDE 活性を測定したところ、 $0.5 \mu\text{M}$ ~ $50 \mu\text{M}$ の間で、濃度依存性に活性が低下した。また、MAA 細胞においても同様の結果が得られた。これは、PDE5 阻害剤が、PDE1 活性を阻害した結果であると考えられた。MAA 細胞に sildenafil を作用させたところ、 $50 \mu\text{M}$ で、増殖抑制効果がみられた。MAA と、その他の口腔悪性黒色腫細胞で PDE5 活性を測定したところ活性はわずかで、PDE5 遺伝子をノックダウンしても効果はないと考えられた。

sildenafil の運動能への影響を検討したところ、PDE1 を発現する MAA 細胞では、 $5 \mu\text{M}$ 以上で運動能は抑制された。そのほか、ほとんどの口腔由来悪性黒色腫細胞では、PDE1 を発現しておらず、sildenafil を作用させても運動能に変化はなかった。以上より、sildenafil の効果は細胞によって異なると考えられ、各々の PDE 遺伝子発現を考慮したオーダーメイド治療への応用が考えられた。

さらに、MAA 細胞での運動能制御機構について、検討を行った。PDE1 は cAMP と cGMP の両方を分解するため、それぞれの誘導体を作用させ、MAA 細胞の運動能への影響を検討した。cAMP 誘導体である 8-Bromo-cAMP を作用させたところ、 $500 \mu\text{M}$ 以上で抑制された。しかし、cGMP 誘導体である 8-Bromo-cGMP では抑制されなかった。このことより sildenafil による運動能の抑制は cAMP シグナルによると考えられた。

そこで cAMP 濃度の変化を検討したところ濃度が増加した。次に cAMP の下流シグナルを検討した。下流には PKA と Epac があるため、それぞれのアクチベーターおよびインヒビターを使用した。PKA の特異的アクチベーターである $\text{N}_6\text{-Benz-cAMP}$ では運動能は抑制された。逆に、PKA のインヒビターである PKI14-22 では亢進した。これらの結果より、cAMP の下流シグナルは PKA の可能性が示唆された。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 のアクチベーターを作用させたところ、運動能には影響がなかった。以上の結果より、PDE1 を発現する口腔由来悪性黒色腫 MAA 細胞では sildenafil が PDE1 を阻害することにより cAMP が上昇し、PKA を介して運動能を抑制する可能性が示唆された。

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 F Ahmad, T Murata, K Shimizu,
E Degerman, D Maurice and
V Manganiello
Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases:
important signaling modulators and
therapeutic targets
Oral Diseases 21(1) p25–50, January
2015

[学会発表] (計 5 件)

- ① 清水香澄、村田 琢、中村千穂、若林宏紀
関田素子、森田 寛、松村佳彦、新井直也
悪性黒色腫細胞の運動と浸潤能への
cAMP シグナルの関与-PKA 及び PDE 阻害
剤を用いた研究
第 59 回日本口腔外科学会総会
2014 年 10 月 18 日
千葉、幕張メッセ

②清水香澄、村田 琢、森田 寛、
乾 眞登可、新井直也
In Vitro Effects of a Phosphodiesterase
Inhibitor Sildenafil on cellular
Motility of the Oral Malignant
Melanoma Cells
第 2 回日米韓口腔顎顔面外科学会
2014 年 9 月 11 日
USA, Hawaii, Honolulu

③清水香澄、村田 琢、加藤英治、関田素子、
松谷博人、渡邊由裕、野村城二
口腔悪性黒色腫に対する
Phosphodiesterase 阻害剤 sildenafil の
運動能抑制効果
第 58 回日本口腔外科学会総会
2013 年 10 月 12 日
福岡、福岡国際会議場

④清水香澄、村田 琢、乾 眞登可、森田 寛
新井直也、田川俊郎
口腔由来悪性黒色腫細胞での BRAF、
PDE5A シグナルと浸潤との関係
日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念
学術大会 総会
2013 年 11 月 23 日
東京、日本歯科大学生命歯学部

⑤清水香澄、村田 琢、佐藤 忠、奥村健哉、
田川俊郎
Phosphodiesterase as therapeutic
targets for oral malignant tumors
第 62 回ドイツ口腔顎顔面外科学会総会
(招待講演)
2012 年 5 月 31 日-6 月 2 日
ドイツ、フライブルグ

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
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

田川 俊郎 (TAGAWA, Toshiro)
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
名誉教授
研究者番号 : 30046346

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

なし