

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09720

研究課題名(和文) 悪性腫瘍におけるPDE2細胞内情報伝達複合体を標的とした新規個別化治療の探索

研究課題名(英文) Search for novel personalized therapies targeting the PDE2 intracellular signaling complex in malignancies

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Phosphodiesterase(PDE)は細胞内シグナル伝達物質であるcAMPやcGMPの分解酵素で細胞内の濃度を調整し、様々な生理作用に関係している。PDEはPDE1からPDE11までの11種類のアイソザイムが存在する。これまでにわれわれはPDEのアイソザイムの一つであるPDE2が浸潤と関係することを世界で初めて報告した。そのためにはPDE2遺伝子の特定部位が変異することによりPDE2タンパク質の一つのアミノ酸が変化し、その結果PDE2タンパク質の細胞内局在が変化することが考えられた。本研究では変異型の発現量が局在と浸潤能を調節している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によりPDE2の基礎的研究をさらに進め、PDE2の遺伝子異常に対する分子標的薬の開発やPDE2細胞内情報伝達複合体を利用した新しい診断方法や個別化治療への臨床応用に道を開くことに学術的意義や社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Phosphodiesterase (PDE) regulates intracellular concentrations by degrading enzymes of intracellular signal transduction substances cAMP and cGMP, and is involved in various physiological actions. There are 11 types of isozymes from PDE1 to PDE11 in PDE. We have reported for the first time in the world that PDE2, one of the PDE isozymes, is associated with invasion. It is considered that one amino acid of the PDE2 protein is changed by mutation of a specific site of the PDE2 gene., and as a result, the intracellular localization of the PDE2 protein is changed. In this study, we found that the expression level of mutants may regulate localization and invasion.

研究分野：口腔・顎顔面外科

キーワード：phosphodiesterase cAMP melanoma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Phosphodiesterase(PDE)は11種類(PDE1-PDE11)あり、それぞれのPDEには更にアイソザイム(AからD)が存在し、20種類以上の関連遺伝子で構成されている。そして、PDEは細胞内のcAMPやcGMPを分解することによりその濃度を調節し、様々な生理作用に関係している。その阻害剤はすでに抗凝固薬、勃起不全治療薬や肺高血圧症治療薬などとして臨床で使用されている。

PDEは大きく分けて、特定のタンパク質と特異的複合体を形成し細胞内の特定部位に特異的複合体を局在させるための部位、および、PDE活性を調節する部位、cAMPやcGMPを分解するために必要な部位、より構成されている。

PDEはの部分により特定のタンパク質と特異的複合体を形成することにより細胞内の特定部位に局在し、PDEが特定の刺激によるcAMPやcGMPシグナル伝達を細胞内局所に封じ込め(compartmentalization)他の刺激由来のcAMPやcGMPシグナルを分離している。このため、PDEのの部分に遺伝子変異がありアミノ酸が変化すれば特定のタンパク質との結合(細胞内情報伝達複合体: signalosome)が変化する。そして、その結果PDEの細胞内局在が変化し、機能が変化することが考えられる。また、複合体に関係するタンパク質に異常があれば同様に複合体が変化することも考えられる。

2. 研究の目的

われわれは細胞内シグナル伝達物質(cAMPなど)の分解酵素であるPDEのアイソザイムの一つであるPDE2が浸潤と関係することを悪性腫瘍細胞を利用して世界で初めて報告した。そして、そのためにはPDE2遺伝子の特定部位が変異することによりPDE2タンパク質の一つのアミノ酸が変化し、その結果PDE2タンパク質の細胞内局在が変化することが必要である可能性を見出した。そこで本研究では他の悪性腫瘍細胞でPDE2遺伝子変異があるかどうか。PDE2遺伝子変異があれば浸潤との関係はどうか。PDE2タンパク質の細胞内局在が変化するかどうか。などの研究を行い、悪性腫瘍におけるPDE2の細胞内情報伝達複合体を標的とした新しい診断方法や個別化医療を確立することが目的とした。

3. 研究の方法

(細胞)

口腔由来悪性黒色腫は当教室で樹立したPMP、MAA、MMN9細胞を、口腔由来骨肉腫は当教室で樹立したHOSM-1細胞を使用した。他に皮膚由来悪性黒色腫細胞や肝臓由来腺癌細胞等を使用した。

(PDE2遺伝子発現)

各細胞よりトータルRNAを抽出し、逆転写酵素にてcDNAを作成した。発現はRT-PCR、リアルタイムPCRで行った。

(PDE2遺伝子変異)

各細胞よりトータルRNAを抽出し、逆転写酵素にてcDNAを作成した。これまでに特定された変異部位に特異的なプライマーを作成し、サンガー法で行った。

(浸潤能)

マトリゲルインベーションチャンバーを用いたinvasion assayで行った。インサートを通過した細胞を染色し、細胞数を測定した。

(PDE2変異率)

TaqMan probeを使用してデジタルPCRで解析した。

(クローン細胞作製)

96wellプレートに播種し、クローン細胞を作製した。

(マウスでの肺への転移)

皮下や眼科静脈叢などから細胞を投与し、肺への転移を確認した。

4 . 研究成果

(PDE2 遺伝子発現)

口腔由来悪性黒色腫 PMP 細胞と口腔由来骨肉腫 HOSM-1 細胞で PDE2 発現を認めた。

(PDE2 遺伝子変異)

口腔由来悪性黒色腫 PMP 細胞と口腔由来骨肉腫 HOSM-1 細胞で PDE2 遺伝子の同一部位に遺伝子異常を認めた。

(各細胞の PDE2 変異率と浸潤能)

ヘテロ変異型発現の多い細胞は浸潤能が高かった。

(クローン細胞の PDE2 変異率)

クローン細胞は全てヘテロ変異型であった。また、マトリゲルインベーションチャンバーを通過した浸潤能の高いクローン細胞も全てヘテロ変異型であった。しかし、発現量の多い細胞ほど浸潤能が高かった。

(細胞内情報伝達複合体の検討)

細胞内局在では少し異なっている様であったが明確ではなかったので、他の方法で検討する必要があると思われた。

(マウスでの肺への転移)

皮下や眼科静脈叢などから細胞を投与したが、肺への転移を確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murata T, Shimizu K, Kurohara K, Tomeoku A, Koizumi G, Arai N.	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of Phosphodiesterase2A in Proliferation and Migration of Human Osteosarcoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 6057-6062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.13812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田 琢、清水香澄、留奥 曜、小泉 学、新井直也
2. 発表標題 口腔悪性黒色腫クローン細胞におけるphosphodiesterase2遺伝子発現と細胞浸潤の研究
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田 琢、清水香澄、黒原一人、留奥 曜、小泉 岳、新井直也
2. 発表標題 口腔骨肉腫細胞におけるphosphodiesterase2の細胞増殖と運動能への役割
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2019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	清水 香澄 (SHIMIZU KASUMI) (20378368)	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
---------	---------