

令和 3 年 5 月 19 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：18K09765

研究課題名(和文) 口腔悪性黒色腫新治療薬の開発-PDE1阻害剤の臨床応用を目指して

研究課題名(英文) Studies for clinical application of PDE1 inhibitors to the treatment of malignant melanoma

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 実験に使用した高転移悪性黒色腫細胞株A375SMのPDEの発現について確認を行った結果、PDE1活性とPDE1C mRNAの発現を確認した。また、PDE5Aの発現はわずかで、以前の悪性黒色腫細胞株MAAのPDE発現の特徴と一致していた。

A375SM cellを眼窩静脈叢から移植し肺転移を確認したが、PDE1阻害効果を確認するためのsildenafilの至適濃度についてはさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、新治療法の開発が急務である。本研究によって、高転移悪性黒色腫細胞株にもPDE1が発現していることが確認され、PDE1阻害剤が悪性黒色腫細胞の治療に応用できる可能性が高くなった。

研究成果の概要(英文)：As a result of confirming the expression of PDE in the highly metastatic malignant melanoma cell line A375SM used in the experiment, the expression of PDE1 activity and PDE1C mRNA was confirmed. In addition, the expression of PDE5A was slight, consistent with the characteristics of PDE expression of MAA.

Pulmonary metastasis was confirmed by transplanting A375SM cells from the orbital venous plexus, but it was thought that sufficient effects could not be expected by the method of allowing cells to act with a PDE1 inhibitor and then transplanting to mice, so inhibition after transplanting A375SM cells. We decided to perform the experiment by intraperitoneally administering the drug and comparing the lung metastases with the control group. However, further studies are needed on the optimal concentration of sildenafil to confirm the PDE1 inhibitory effect.

研究分野：口腔外科

キーワード：phosphodiesterase 悪性腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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, 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)。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。そこで申請者らは、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。すなわち、PDE1 を分子標的とした悪性黒色腫の新治療法の実現を行うことが、本研究課題の核心である。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も申請者らは着目している。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。

2. 研究の目的

申請者らは最近、以下で説明する Phosphodiesterase (PDE) 1 を阻害する作用を持つ Differentiation-inducing factor (DIF) や sildenafil といった薬剤が、悪性黒色腫細胞の増殖・運動能を抑制することを発見した。そこで、PDE1 阻害剤が PDE1 を発現する悪性黒色腫等の治療に応用可能か、in vivo で検討を行う。

3. 研究の方法

(1)悪性黒色腫細胞株 MAA 細胞のマウス皮下への移植

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu)背部皮下に 1×10^6 個の MAA 細胞を移植し、肺転移の有無を確認した。

(2)高転移悪性黒色腫細胞株の入手

北海道大学大学院歯学研究院血管生物分子病理学講座より譲渡を受け、高転移悪性黒色腫細胞株 A375SM 細胞を入手した。

(3)A375SM 細胞での PDE1 活性の確認

A375SM 細胞を 3 日間培養後、cAMP を基質とする PDE 活性を測定した。Ca²⁺、カルモジュリンで促進された PDE 活性を PDE1 活性と定義した。

(4)A375SM 細胞での PDE1 アイソザイム mRNA 発現の検討

A375SM 細胞を 3 日間培養後、mRNA を抽出し、リアルタイム PCR およびデジタル PCR にて PDE1 の 3 つのアイソザイム(PDE1A、PDE1B、PDE1C)の mRNA 発現の確認を行った。

(5)A375SM 細胞のマウス皮下への移植

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu)背部皮下に 1×10^6 個の A375SM 細胞を移植し、肺転移の有無を確認した。

(6)A375SM のマウス眼窩静脈叢への移植と肺転移の確認

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu) 眼窩静脈叢に 1×10^6 個の A375SM 細胞を移植し、肺転移の有無を確認した。

(7)sildenafil のマウス腹腔内への投与

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu) 眼窩静脈叢に 1×10^6 個の A375SM 細胞を移植し、その後 sildenafil を生理食塩水に懸濁して投与した。

4 . 研究成果

(1)悪性黒色腫細胞株 MAA 細胞のマウス皮下への移植

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu)背部皮下に 1×10^6 個の MAA 細胞を移植したところ、背部には腫瘤を形成したが、その後 10 週経過しても肺転移は確認できなかった。

(2)高転移悪性黒色腫細胞株 A375SM 細胞の入手

北海道大学大学院歯学研究院血管生物分子病理学講座より譲渡を受け、高転移悪性黒色腫細胞株 A375SM 細胞を入手した。A375SM 細胞の PDE1 活性およびそのアイソザイムの mRNA 発現については不明であるため、(3)、(4)の実験を行った。

(3)A375SM 細胞での PDE1 活性の確認

A375SM 細胞で PDE1 活性を確認した。

(4)A375SM 細胞での PDE1 アイソザイム mRNA 発現の検討

A375SM 細胞で PDE1C mRNA 発現を確認した。

(5)A375SM 細胞のマウス皮下への移植

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu)背部皮下に 1×10^6 個の A375SM 細胞を移植したところ、背部には腫瘤を形成したが、肺転移は確認できなかった。

(6)A375SM 細胞のマウス眼窩静脈叢への移植と肺転移の確認

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu) 眼窩静脈叢に 1×10^6 個の A375SM 細胞を移植したところ肺転移が確認できた。

(7)sildenafil のマウス腹腔内への投与

8 週齢ヌードマウス(BALB/cAJcl nu-nu) 眼窩静脈叢に 1×10^6 個の A375SM 細胞を移植し、

その後 sildenafil を生理食塩水に懸濁して投与することとしたが、sildenafil の至適濃度にはさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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