

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390513

研究課題名（和文）口腔悪性腫瘍に対する PDE2 関連シグナル・遺伝子治療

研究課題名（英文）PDE2 related signal-gene therapy on oral malignant tumor

研究代表者

田川 俊郎 (TOSHIRO TAGAWA)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30046346

研究成果の概要（和文）：これまでにヒト口腔由来悪性黒色腫 PMP 細胞を中心に PDE2 の研究を進めて来たが、本研究では、更に PDE2 の機能解析の研究を進めると共に、それ以外の悪性腫瘍細胞での PDE2 の発現や特徴を検討した。何種類かの悪性黒色腫細胞で PDE2 発現を認めた。PDE2 はアポトーシスや運動能には関係がなかった。しかし、DNA 合成に関係し、PDE2 が細胞周期の調節に関係する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Until now we had studied PDE2 of human oral malignant melanoma PMP cells. In this study, we examined PDE2 functions, and PDE2 expressions and characterizations of other malignant tumor cells. PDE2 expressed in a few malignant tumor cells. PDE2 did not relate apoptosis and migration. But, PDE2 related DNA synthesis and it was suggested that PDE2 regulated cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：悪性腫瘍, phosphodiesterase, phosphodiesterase2, 運動能,

1. 研究開始当初の背景

PDE は 11 種類 (PDE1 から PDE11) に分類され、各 PDE にはいくつかのアイソザイムが存在し (A から D)、更に、各アイソザイムはスプライシングの違いにより多くのバリエーションが存在する。そして、各バリエーションの細胞内局所在が異なることにより、特定の刺激

による cAMP 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 シグナルを分離している。したがって、cAMP による細胞内シグナル伝達系が存在すれば必ずそれを調節している特定の PDE が存在し、そのシグナルに対して重要な役割を担っている。

これまでにわれわれのグループでは PDE の

遺伝子解析や生化学的特性などの一連の研究を行なってきた。また、1987年に Morrisらにより細胞性粘菌や卵細胞の分化誘導物質で、悪性腫瘍細胞の分化誘導作用や増殖抑制作用を示す Differentiation-inducing factor (DIF) が発見されたが (Nature, 328: 811-4, 1987), そのターゲット分子は 2004年まで不明であった。しかし、2004年にわれわれがそのターゲット分子が PDE1 であることを世界で初めて発見した (Cancer Research. 64(7) : 2568-71, 2004.)。この発見により分化や増殖機構を PDE と直接結び付け、PDE 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導き出した。更に、悪性黒色腫細胞で PDE2 による増殖と浸潤の制御、および、PDE2 遺伝子変異を世界で初めて発見した。

2. 研究の目的

われわれが悪性黒色腫細胞で PDE2 による増殖と浸潤の制御、および、PDE2 遺伝子変異を世界で初めて発見したが、機能や発現等はほとんど不明であったので PDE2 の機能解析の研究を進めると共に、他の悪性腫瘍細胞での PDE2 の発現や特徴を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 悪性腫瘍細胞での PDE2 発現の検討.

①悪性腫瘍細胞から total RNA を抽出した。
②total RNA の濃度を分光光度計で吸光度を測定し計算した。
③RT-PCR を行い、電気泳動後サイバークリーンで染色し、バンドを確認した。

(2) PDE2 活性測定.

①悪性腫瘍細胞を PDE 測定用 buffer でホモジナイズした。
②PDE2 特異的阻害剤や cGMP を使用して PDE2 活性測定とタンパク定量を行った。

(3) 細胞増殖試験.

①96 穴プレートに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。
②MTS assay にて細胞増殖効果を判定した。

(4) アポトーシスの検討.

①カルチャースライドに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。
②指定の時間培養後、TUNEL 染色にてアポトーシスを検討した。

(5) BrdU の取込みの検討.

①96 穴プレートに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。

②指定の時間培養後、BrdU の取込みを検討した。

(6) 運動能測定.

①コンパニオプレートに培養液 (10%FBS) を加えた。

②細胞を薬剤を含む培養液に浮遊した。

③インサートをコンパニオプレートに入れ、細胞をインサート内に入れた。

④指定の時間培養後、インサートの上面の細胞を綿棒で除去後、下面の細胞を染色した。スライドガラスにマウント後、顕微鏡下で細胞数をカウントした。

(7) 浸潤抑制機序の検討.

①24 穴プレートに細胞を播種、24 時間後に薬剤を加えた。

②指定の時間培養後、total RNA を抽出した。

③total RNA の濃度を分光光度計で吸光度を測定し計算した。

④RT-PCR を行い、電気泳動後サイバークリーンで染色し、バンドを確認した。

4. 研究成果

(1) 悪性腫瘍細胞での PDE2 発現の検討.

各悪性腫瘍細胞での PDE2 発現を RT-PCR で検討した (表 1)。

表1. 悪性腫瘍細胞でのPDE2発現

	発現量
ヒト口腔由来悪性黒色腫PMP細胞	+++
ヒト口腔由来悪性黒色腫MAA細胞	+
ヒト膣由来悪性黒色腫HMV-II細胞	+
ヒト口腔由来悪性黒色腫MMN-9細胞	-
ヒト口腔由来悪性黒色腫HMG細胞	-
ヒト皮膚由来悪性黒色腫G361細胞	-
ヒト皮膚由来悪性黒色腫C32細胞	-
ヒト肝臓由来腺癌SK-Hep-1細胞	-
ヒト口腔由来骨肉腫HOSM-1細胞	-
ヒト口腔由来骨肉腫HOSM-2細胞	-
ヒト口腔由来扁平上皮癌KB細胞	-
マウス皮膚由来悪性黒色腫B-16細胞	-

高発現(+++), 低発現(+), なし(-)

(2) 悪性腫瘍細胞での PDE2 活性の測定.

各悪性腫瘍細胞での PDE2 活性は PDE2 発現と一致した (表 2).

表2. 悪性腫瘍細胞でのPDE2活性

	活性
ヒト口腔由来悪性黒色腫PMP細胞	+++
ヒト口腔由来悪性黒色腫MAA細胞	+
ヒト臍由来悪性黒色腫HMV-II細胞	+
ヒト口腔由来悪性黒色腫MMN-9細胞	-
ヒト口腔由来悪性黒色腫HMG細胞	-
ヒト皮膚由来悪性黒色腫G361細胞	-
ヒト皮膚由来悪性黒色腫C32細胞	-
ヒト肝臓由来腺癌SK-Hep-1細胞	-
ヒト口腔由来骨肉腫HOSM-1細胞	-
ヒト口腔由来骨肉腫HOSM-2細胞	-
ヒト口腔由来扁平上皮癌KB細胞	-
マウス皮膚由来悪性黒色腫B-16細胞	-

高活性 (+++), 低活性(+), なし(-)

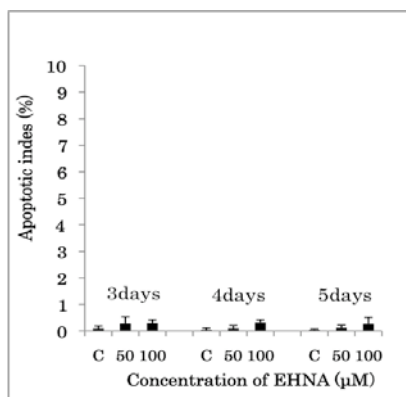
(3) PDE2 特異的阻害剤の細胞増殖への効果.

PDE2 が高発現している PMP 細胞では増殖は抑制されたことは前回報告した. しかし, 低発現の HMV-II 細胞と発現のない G361 細胞ではほとんど抑制されなかった.

(4) PDE2 特異的阻害剤のアポトーシスへの効果.

PDE2 が高発現している PMP 細胞でもアポトーシスはほとんど起こらず, PDE2 とアポトーシスは関係がないと思われた (図1).

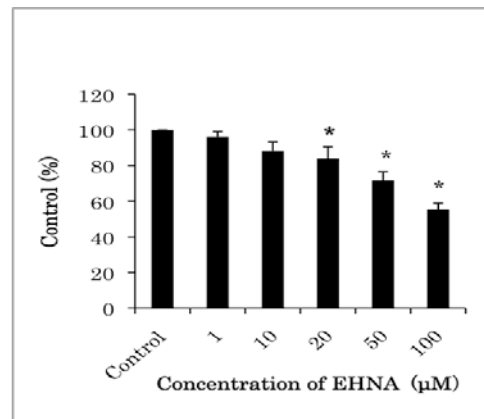
(図 1) PDE2 特異的阻害剤のアポトーシスへの効果.



(5) PDE2 特異的阻害剤 EHNA の BrdU の取込みへの効果.

PDE2 特異的阻害剤により BrdU の取込みが PMP 細胞で減少したことより, DNA 合成が抑制された (図2). このことより PDE2 が細胞周期を調整している可能性が示唆された.

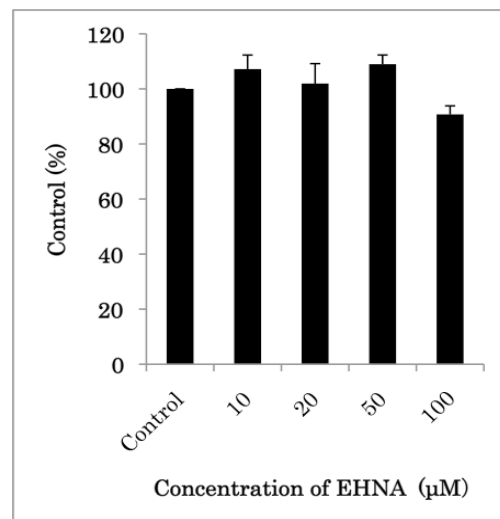
(図 2) PDE2 特異的阻害剤の BrdU の取込みへの効果



(6) PDE2 特異的阻害剤の運動能への効果.

PDE2 が高発現している PMP 細胞でも PDE2 特異的阻害剤により運動能はほとんど抑制されなかったことより, PDE2 と運動能は関係がないと思われた (図 3).

(図3) PDE2 特異的阻害剤の運動能への効果.



(7) 浸潤抑制機序の検討.

PDE2と浸潤との関係を検討するため, EHNAを作用させmatrix metalloproteaseの発現をRT-PCRなどで確認した. しかし, 特にmatrix metalloproteaseの発現に大きな変化を認めなかった.

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)

[学会発表] (計 4 件)

①森田 寛, 村田 琢, 清水香澄,
渡邊由裕, 田川俊郎

口腔由来悪性黒色腫 PMP 細胞での PDE2 特異的阻害剤の効果.

第 29 回日本口腔腫瘍学会総会.
熊本.

2011 年 1 月 28 日

②森田 寛, 清水香澄, 村田 琢, 田川俊郎.

ヒト口蓋由来悪性黒色腫細胞での
cGMP-stimulated phosphodiesterase の発現
とシークエンス.

第 37 回三重歯科・口腔外科学会
三重.

2009 年 12 月 13 日

③森田 寛, 清水香澄, 竹岡高志, 柳瀬成章,
中村真之介, 乾 眞登可, 田川俊郎

ヒト口蓋由来悪性黒色腫 PMP 細胞での
phosphodiesterase 2 スプライシングバリア
ントの発現.

東京.

2009 年 12 月 5 日

④Kasumi Shimizu, Kenichi Hiramoto,

Taku Murata, Yoshihiro Watanabe,

Madoka Inui, Toshiro Tagawa

Relationship between Phosphodiesterase2
and Growth in Oral Malignant Melanoma
cells.

9th Asian Congress on Oral and
Maxillofacial Surgery
Bangkok, Thailand.

2008 年 11 月 6 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田川 俊郎 (TAGAWA TOSHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 30046346

(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) 研究分担者

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

(4) 連携研究者

なし