

織の中では、精巢にのみで発現が認められた。

今後、詳細な解析が必要であるものの、以上の知見は、EphA10が、乳がん組織特異的で、乳がんの悪性形質に関与し、既存の治療薬の標的が陰性の症例にも高発現している可能性を示しており、発現分布の観点から、新規創薬ターゲットとして、有望であることが示された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Yamashita, T., Okamura, T., Nagano, K., Imai, S., Abe, Y., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer., *Pharmazie*, **67**(3), 253-5 (2012).
2. Yamashita, T., Nagano, K., Kanasaki, S., Maeda, Y., Furuya, T., Inoue, M., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Itoh, N., Abe, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**(1), 140-4 (2012).
3. Takano, M., Yamashita, T., Nagano, K., Otani, M., Maekura, K., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Tomiyama, T., Mori, H., Matsuura, K. & Matsuyama, S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis., *Neurosci. Lett.* **534**, 85-9 (2013).
4. 鎌田春彦: 抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術, *薬学雑誌*, **132**(4), 473-7

(2012).

G-2. 学会発表

1. Nagano K., Okamura T., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Expression of Rho GDP dissociation inhibitor correlates positively with lymph node metastasis in colorectal cancer., EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
2. Kamada H., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Nagano K., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Detection of drug-target proteins on tumor-derived exosomes by ELISA using anti-CD81 antibodies, EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
3. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Furuya T., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Distribution and functional analysis of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer, The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS 2012), Quebec (Canada), 15-18 July, 2012.
4. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Inoue M., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Functional evaluation of Eph receptor A10 as a therapeutic target for breast cancer, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.
5. Nagano K., Yamashita T., Kamada H., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Katayama S., Yoshioka Y., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Proteome analysis of lung cancer cell-derived exosomes for discovery of diagnostic

biomarkers, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.

6. 前田祐香, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん分子標的治療薬の開発に向けた Eph receptor A10 に対するモノクローナル抗体の作製., 第 28 回日本 DDS 学会学術集会., 札幌 (北海道), 2012 年 7 月
7. 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: がん個別化医療のためのシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索., 第 28 回日本 DDS 学会学術集会., 札幌 (北海道), 2012 年 7 月
8. 鎌田春彦, 山下琢矢, 長野一也, 前田祐香, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤康央, 角田慎一: がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索., 日本プロテオーム機構 第 10 回大会, 東京(東京), 2012 年 7 月.
9. Maeda Y., Nagano K., Yamashita T., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Evaluation of Eph receptor A10 as a novel drug target for breast cancer. 第 71 回日本癌学会学術集会., 札幌 (北海道), 2012 年 9 月
10. Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology. 第 71 回日本癌学会学術集会., 札幌(北海道), 2012 年 9 月
11. 前田祐香, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 井上雅己, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: Eph receptor A10 を標的とした新規乳がん治療薬開発の試み., 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮 (兵庫), 2012 年 10 月
12. 山下琢矢, 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎,

前田祐香, 鍋師裕美, 吉川友章, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 鎌田春彦, 糟谷史代, 堤康央, 角田慎一: Exosome 由来膜タンパク質のプロテオーム解析による新規乳がんバイオマーカーの探索., 第 37 回日本医用マスペクトル学会年会., 名古屋 (愛知), 2012 年 10 月

13. 長野一也, 山下琢矢, 金崎聡一郎, 前田祐香, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 井上雅己, 阿部康弘, 向洋平, 鎌田春彦, 堤康央, 角田慎一: プロテオミクスによるシスプラチン感受性マーカー蛋白質の探索と評価., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月
14. 鷹野正興, 山下琢矢, 長野一也, 尾谷三枝子, 前倉孝治, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央, 富山貴美, 森啓, 松山正剛: APPE693Δ トランスジェニックマウス海馬における 2D-DIGE によるプロテオーム解析., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月

H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

H-2. 実用新案登録

なし。

H-3. その他

なし。

I. 研究協力者

鎌田 春彦	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
向 洋平	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
長野 一也	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
山下 琢矢	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
井上 雅己	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
國丸 亜記	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト

プロジェクト

Table 1 Correlation between EphA10 mRNA expression and clinicopathological characteristics

Characteristics	n	EphA10 mRNA expression		<i>p</i> value
		High n (%)	Low n (%)	
Age				
< 45	5	2 (40.0)	3 (60.0)	1.00
≥45	30	15 (50.0)	15 (50.0)	
Gender				
Male	0	0 (0.0)	0 (0.0)	—
Female	35	17 (48.6)	18 (51.4)	
Histological classification				
Invasive ductal carcinoma	32	15 (46.9)	17 (53.1)	0.21
Invasive lobular carcinoma	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Squamous cell carcinoma	1	0 (0.0)	1 (100.0)	
pT				
T1	13	6 (46.2)	7 (53.8)	0.23
T2	18	8 (44.4)	10 (55.6)	
T3	3	3 (100.0)	0 (0.0)	
T4	1	1 (46.2)	0 (0.0)	
pN				
N0	17	5 (29.4)	12 (70.6)	0.045
N1	9	6 (66.7)	3 (33.3)	
N2	5	3 (60.0)	2 (40.0)	
N3	4	4 (100.0)	0 (0.0)	
pStage				
I	10	4 (40.0)	6 (60.0)	0.022
II	13	4 (30.8)	9 (69.2)	
III	12	10 (83.3)	2 (16.7)	

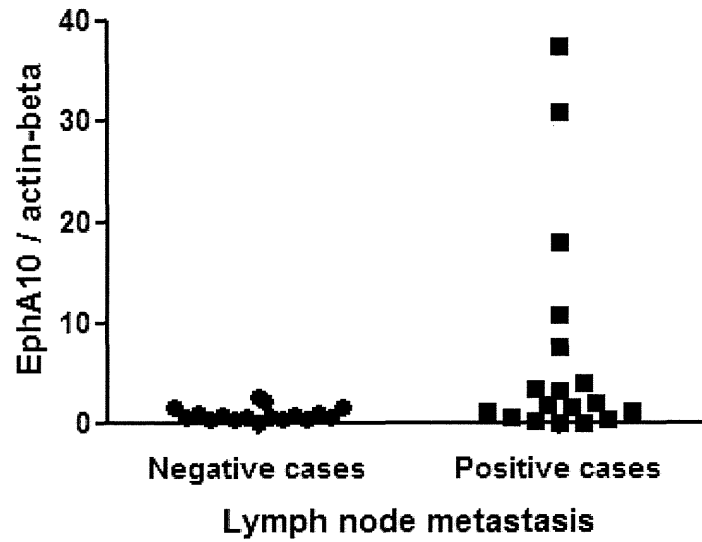
Indication of each parameter is as follows.

pT: Degree of size of the primary tumor.

pN: Degree of spread to regional lymph nodes.

pStage: Degree of cancer progression.

(A)



(B)

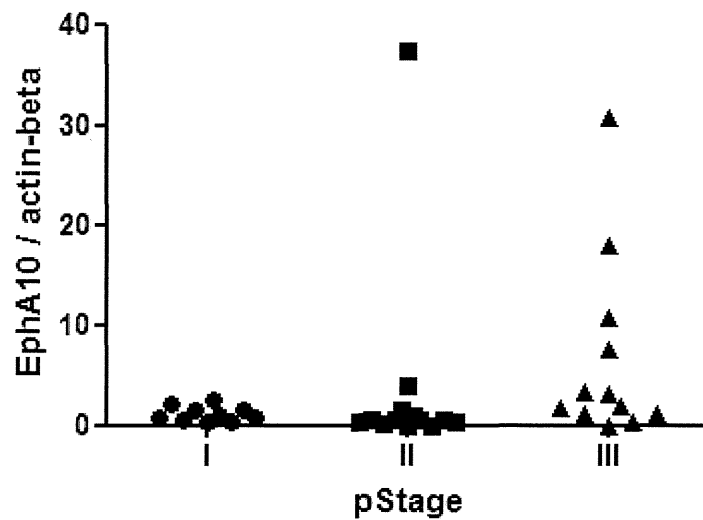


Figure 1 EphA10 mRNA expression level analysis in LN positive and negative cases, or stage I-III EphA10 mRNA expression level in each case was normalized by actin-beta. The ratio of EphA10 mRNA expression level against median value was plotted for LN positive and negative cases (A), or stage I, II and III respectively (B). Difference was evaluated using Mann-Whitney test ($p = 0.0293$) (A) and using Kruskal-Walis test ($p = 0.044$) (B).

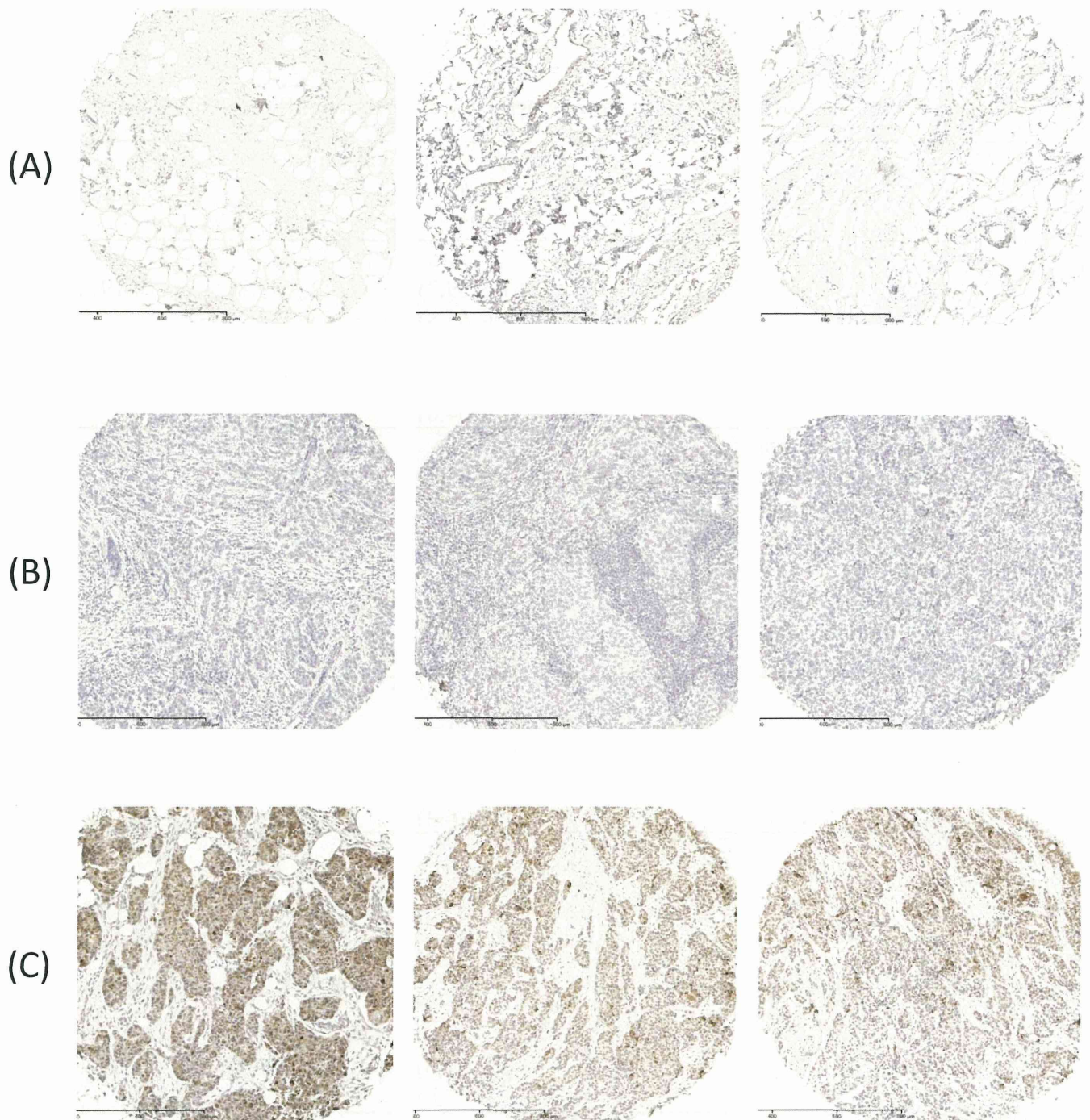


Figure 2 Immunohistochemical staining images in TMA with breast tumor and normal tissues
TMAs with breast tumor and normal tissues were stained by anti-EphA10 antibody. We showed the typical three images for normal breast tissues (A), for EphA10 negative breast cancer tissues (B), and for EphA10 positive breast cancer tissues (C). Scale bar: 200 μ m.

Table 2 Correlation between EphA10 protein expression and clinicopathological characteristics

Charcteristics	n	EphA10 protein expression		<i>p</i> value
		High n (%)	Low n (%)	
Age				
< 45	103	61 (59.2)	42 (40.8)	0.19
≥45	199	133 (66.8)	66 (33.2)	
Gender				
Male	2	2 (100.0)	0 (0.0)	0.54
Female	300	192 (64.0)	108 (36.0)	
Histological classification				
Invasive ductal carcinoma	272	177 (65.1)	95 (34.9)	0.59
Invasive lobular carcinoma	10	5 (50.0)	5 (50.0)	
Invasive papillary carcinoma	6	5 (83.3)	1 (16.7)	
Mucinous carcinoma	2	1 (50.0)	1 (50.0)	
Medullary carcinoma	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Carcinosarcoma	1	1 (100.0)	0 (0.0)	
pT				
T1	21	15 (71.4)	6 (28.6)	0.35
T2	200	127 (63.5)	73 (36.5)	
T3	46	26 (56.5)	20 (43.5)	
T4	35	26 (74.3)	9 (25.7)	
pN				
N0	154	89 (57.8)	65 (42.2)	0.034
N1	116	80 (69.0)	36 (31.0)	
N2	26	22 (84.6)	4 (15.4)	
N3	6	3 (50.0)	3 (50.0)	
pStage				
I	9	4 (44.4)	5 (55.6)	0.037
II	232	143 (61.6)	89 (38.4)	
III	61	47 (77.0)	14 (23.0)	

Indication of each parameter is as follows.

pT: Degree of size of the primary tumor.

pN: Degree of spread to regional lymph nodes.

pStage: Degree of cancer progression.

Table 3 EphA10 expression profile in genetic types of breast cancer cases

	EphA10 positive cases	EphA10 negative cases	Total
Luminal A (Her2-, ER+ and /or PR+)	33 (49%)	34 (49%)	67
Luminal B (Her2+, ER+ and/or PR+)	10 (49%)	5 (49%)	15
Her2+	16 (49%)	11 (49%)	27
Basal like (Her2-, ER-, PR-)	10 (49%)	5 (49%)	15
Total	69	55	124

Table 4 EphA10 protein expression profile in various normal tissues

Tissue	Positive case ratio	Tissue	Positive case ratio
adrenal grand	0 / 3 (0 %)	nerve	0 / 3 (0 %)
bladder	0 / 3 (0 %)	ovary	0 / 3 (0 %)
bone marrow	0 / 3 (0 %)	pancreas	0 / 3 (0 %)
breast	0 / 3 (0 %)	parathyroid gland	0 / 3 (0 %)
cerebellum	0 / 3 (0 %)	pituitary	0 / 3 (0 %)
cerebral gray matter	0 / 3 (0 %)	prostate	0 / 3 (0 %)
cerebral white matter	0 / 3 (0 %)	salivary gland	0 / 3 (0 %)
colon	0 / 3 (0 %)	skeletal muscle	0 / 3 (0 %)
esophagus	0 / 3 (0 %)	skin	0 / 3 (0 %)
eye	0 / 3 (0 %)	small intestine	0 / 3 (0 %)
head and neck	0 / 3 (0 %)	spleen	0 / 3 (0 %)
heart	0 / 3 (0 %)	stomach	0 / 3 (0 %)
kidney	0 / 3 (0 %)	testis	3 / 3 (100 %)
larynx	0 / 3 (0 %)	thymus gland	0 / 3 (0 %)
liver	0 / 3 (0 %)	thyroid	0 / 3 (0 %)
lung	0 / 3 (0 %)	tonsil	0 / 3 (0 %)
lymph node	0 / 3 (0 %)	uterine cervix	0 / 3 (0 %)
mesothelium	0 / 3 (0 %)	uterus	0 / 3 (0 %)

プロテオミクス手法による悪性黒色腫治療標的分子探索

研究分担者 仲 哲治 独立行政法人医薬基盤研究所 免疫シグナルプロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨

悪性黒色腫は非常に転移しやすい性質を持つことと、化学療法も効果が低いため、皮膚癌の死亡率の 80%を占めており、非常に予後不良な腫瘍である。また、進行期の悪性黒色腫に対する有効な治療法が確立されていないため、新規治療法を早急に開発する必要がある。

本研究では悪性黒色腫の手術組織を用いて定量的プロテオミクス手法(iTRAQ 法)により正常皮膚組織と比較して悪性黒色腫にて高発現するタンパク質を探索した。その結果、悪性黒色腫にて高発現する分子の 1 つとして Periostin を同定した。Periostin は正常皮膚では発現が非常に弱いのにに対し、悪性黒色腫で高発現を示した。免疫組織化学染色法による解析の結果、Periostin は腫瘍組織でなく、間質に発現が局在していた。さらに、Periostin の発現細胞を同定するため、悪性黒色腫細胞と線維芽細胞の共培養を行い、その後に悪性黒色腫細胞と線維芽細胞を単離後、Periostin の発現を RT-PCR にて解析した結果、共培養後の線維芽細胞から Periostin が産生されていることが明らかとなった。Periostin は integrin $\alpha\beta 3$ 、および integrin $\alpha\beta 5$ を受容体とし、p44/42MAPK 経路を介して悪性黒色腫の増殖を促進する作用を持つことを明らかにした。腫瘍の増殖に対する Periostin の役割を明らかにするため、Periostin/Rag2 欠損マウス樹立し、Periostin/Rag2 欠損マウスおよび Rag2 欠損マウスを用いて悪性黒色腫細胞(Mewo)を皮下移植した。その結果、Rag2 欠損マウスと比較して Periostin/Rag2 欠損マウスで腫瘍の増殖が有意に抑制されていることが明らかとなった。腫瘍組織に対して Ki-67 を免疫組織化学染色にて解析した結果、Rag2 欠損マウスと比較して Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて Ki-67 の発現が低く、細胞周期が抑制されていた。

本研究により Periostin が悪性黒色腫の腫瘍増殖と関係している事が明らかになったため、Periostin が悪性黒色腫の創薬標的となり得る事が示唆された。

A. 研究目的

悪性黒色腫はメラノサイトを起源とする悪性腫瘍と考えられている。悪性黒色腫は診断される癌全体のわずか 4%であるが、他の臓器に非常に転移しやすい性質を持つことと、化学療法も効果が低いため、皮膚癌の死亡率の 80%を占めており、非常に予後不良な腫瘍である。従って、悪性黒色腫に対する治療標的分子を同定することは、悪性黒色腫の新規治療法の開発につながる極めて高い。従来、治療標的分子を同定する手法としては DNA アレイ法が主に使われてきた。しかしながら、

DNA アレイ解析によって得られた遺伝子発現差の結果は必ずしもタンパク質の発現差と相関しないことと、タンパク質は局在、翻訳後修飾などにより本来の機能を発揮することを考えると、手術組織など臨床検体について発現しているタンパク質を直接解析する事は病態と関係のあるタンパク質を同定できる可能性が高いと考えられる。近年、質量分析計の性能の劇的な向上に伴って、網羅的なタンパク質の解析が可能となってきた。また、1 度の解析で多検体を比較定量解析することが可能な試薬も開発され、臨床検体を用いた疾

患関連蛋白質の探索が進められている。

本研究では、iTRAQ(isobaric tags for relative and absolute quantitation)試薬による定量的なタンパク質発現解析法を用いて、悪性黒色腫に対する創薬標的分子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

B-1 試料

悪性黒色腫手術組織は大阪大学医学部附属病院にてインフォームドコンセントについて同意を得た患者より提供していただいた。

B-2. iTRAQ 法による悪性黒色腫に発現するタンパク質の網羅的発現定量解析

iTRAQ 法を用いて正常皮膚組織と比較して悪性黒色腫にて高発現するタンパク質を探索することで悪性黒色腫特異的なタンパク質の同定を試みた。

悪性黒色腫患者の腫瘍部位と正常皮膚より、マルチビーズショッカー(安井器械)を用いて組織を破碎した。破碎した組織に対して、7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 1% protease inhibitor cocktail(ナカライテスク), 1% phosphatase inhibitor cocktail(ナカライテスク)を加え、タンパク質を抽出した。遠心(13,200rpm, 10度, 15分)後、上清を回収し、RC-DC protein assay kit(Bio-Rad)を用いてタンパク質を定量した。タンパク質を定量後、2D-Clean up kit(GE healthcare)を用いてタンパク質を10 µg ずつ脱塩した。タンパク質を10 µlの7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 1% protease inhibitor cocktail, 1% phosphatase inhibitor cocktailで溶解し、500mM TEAB pH8.5を11 µl加えた。50mM tris-(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP)を2 µl加え、37度で1時間還元処理を行い、200mM Methylmethanethiosulfonate (MMTS)を1 µl加え、室温で5分反応させることでシステイン残基をブロックした。その後、500mM TEAB pH8.5を366 µl加え、1mg/mlのTPCK-trypsin(ABSciex)を10 µl加え37度で一晩酵素消化した。その後、speed

vacで30 µlに濃縮し、iTRAQ reagents 4plex (ABSciex)を用いてラベリングを行った。

iTRAQ reagent 114:melanoma *in situ*, iTRAQ reagent 115:正常皮膚組織(melanoma *in situ*由来), iTRAQ reagent 116:invasive melanoma iTRAQ reagent 117:正常皮膚組織(invasive melanoma由来)。標識後4サンプルを1つに混合し、イオン交換HPLCにて24個のフラクションに粗分画し、それぞれの分画を脱塩後、質量分析計(LTQ Orbitrap XL)にて解析することで測定した。得られたデータを proteome discoverer ver1.1にてデータベースサーチすることで、タンパク質の同定と定量を行った。

B-3. 免疫組織化学染色

大阪大学医学部附属病院にて手術を受けた患者より得られた悪性黒色腫組織は10%ホルマリンで24時間固定し、パラフィン包埋し、マイクロトームで薄切した。スライドに貼り付けた切片はhematoxylin と eosin (H&E)で染色した。免疫組織化学染色において、切片はキシレンで脱パラフィンし、エタノールで脱水した。切片は2%BSAで10分間ブロッキングした。パラフィン包埋組織の薄切は脱パラフィン処理、アルコールによる脱水を行った。免疫組織化学染色は一次抗体として抗ヒト-Periostin抗体(1:3,000, Abcam)、および抗Ki-67抗体(1:500, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK)で1時間反応させた。Tris-Buffered Saline (TBS) containing 0.05% Triton-X100 (TBST)で洗浄後、DAKO ChemMate Envision Kit/HRP (Dako-Cytomation, Carpinteria, CA, USA)で反応させ、ヘマトキシリンで対染色した。アイソタイプコントロールとして、ウサギIgGを用いた。

B-4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)解析

メラノーマ細胞株と正常ヒト線維芽細胞(NHDFs)におけるperiostinの発現変動を解析するため、メラノーマ細胞株(Mewo, G-361, VMRC-MELG), NHDFs、および共培養した

細胞より調整したサンプルを RT-PCR 解析に用いた。トータル RNA は RNeasy mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) で精製し、500 ng のトータル RNA に対して Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen) を用いて一本鎖 cDNA を調製した。RT-PCR 解析には TaKaRa Ex Taq (Takara Bio, Shiga, Japan) を使用した。内部標準として β -actin の発現量を解析した。PCR 解析のプライマー配列と、PCR product サイズは以下の通り。

Periostin, forward,

5'-TTGAGACGCTGGAAGGAAAT-3'

reverse,

5'-AGATCCGTGAAGGTGGTTTG-3'

(199bp); β -actin, forward

5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3'

reverse

5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'(174bp)。変性ステップ 98°C 10 秒、サイクルプログラムとして、98°C 10 秒、60.1°C (Periostin) or 67°C (β -actin) 30 秒、72°C 30 秒を 33 サイクル行った。

B-5. Real-time reverse

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析

NHDFs を CFSE-で標識した Mewo あるいは CFSE で標識した G-361 と 24 時間共培養した。その後、FACS Aria を用いて、CFSE 陰性の NHDF あるいは CFSE 陽性の Mewo 及び G-361 に分離した。回収した細胞より RNeasy mini Kit を用いてトータル RNA を精製し、Quantitect Reverse Transcription kit を用いて cDNA に逆転写した。TGF β 1、TGF β 3 の発現は Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて測定した。

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を mRNA の標準化に用いた。以下のプライマー配列を用いた: TGF β 1, forward,

5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTTTG-3'

reverse,

5'-AGGAGCAGTGGGCGCTAAG-3';

TGF β 3, forward,

5'-GCCCTTGCCCATACCTCCGC-3'

reverse,

5'-CGCAGCAAGGCGAGGCAGAT-3';

GAPDH, forward,

5'-GGAGTCAACGGATTTGGTTCGTA-3'

reverse,

5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3'

B-6. ウェスタンブロット解析

SDS-PAGE(5-20%グラジエントゲル(和光純薬))には、10 μ g のタンパク質をアプライした。40mA で 50min 泳動し、PVDF 膜に 120mA、1 時間転写した。転写後、1% BSA/TBST(TBS+ 0.1% Tween20)にて室温で 1 時間ブロッキングし、抗-Periostin 抗体 (1:1,000, Abcam, Cambridge, UK), 抗-Integrin α v 抗体 (1:1,000, BD Biosciences, San Jose, CA), 抗-Integrin α 6 抗体 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 抗-Integrin β 3 抗体 (1:1,000, BD Biosciences), 抗-Integrin β 5 抗体 (1:1000, Anaspec, San Jose, CA), 抗-Integrin β 4 抗体 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), 抗-phospho-STAT3 抗体 (1:1,000), 抗-phospho-p44/42MAPK 抗体 (1:1,000), 抗-p44/42MAPK 抗体 (1:1,000), 抗-phospho-Akt (Ser473) 抗体 (1:1,000) 抗-Akt 抗体 (1:1,000) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), 抗-STAT3 抗体 (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology), 抗-phospho-FAK (Tyr397) 抗体 (1:1,000, Biosource, Camarillo, CA) 抗-FAK 抗体 (1:1,000, BD Biosciences) で、室温で 1 時間インキュベートした。TBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、TBST で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ抗体あるいは抗マウス抗体(GE healthcare)を用いて PVDF 膜を室温で 1 時間インキュベートした。PVDF 膜を TBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、蛍光

反応システム(PerkinElmer 社)により、反応したタンパク質を検出した。ローディングコントロールとして、抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)を用いた。

B-7. 細胞増殖アッセイ

増殖アッセイ

Mewo、G-361、VMRC-MELG 細胞を血清飢餓処理 4 時間行ったのち、96-well plates に 2,000 cells/well でまき、様々な濃度の遺伝子組み換えヒト Periostin を添加した。Cell Counting Reagent SF (ナカライテスク) を加えることで発色させ、Microplate reader (Bio-Rad Model 680)にて 450 nM の吸光度を測定した。

キナーゼ阻害アッセイ

96-well plates に 2,000 cells/well で細胞をまき、血清を除去するため PBS で洗浄後、血清不含培地で 24 時間培養した。その後、細胞を各種キナーゼ阻害剤(LY294002 (10 μ M) : Akt inhibitor、U0126 (20 μ M) : MAPK inhibitor)で 2 時間インキュベートし、細胞を 100 ng/ml の recombinant POSTN で刺激し、上述の方法で細胞増殖アッセイを行った。実験開始前に各種阻害剤の最適濃度を設定するため、キナーゼ阻害剤については段階希釈を行う事で検討した。

B-8. *in vivo* 実験

12 週の Rag2 欠損マウス

(Rag2^{-/-}, C57BL/6 background) 、Periostin 欠損マウス (Postn^{-/-}, C57BL/6 background、東京工業大工藤明教授より提供)、Periostin/Rag2 欠損マウスを用いた。

1 x 10⁶ 個の Mewo 細胞を Periostin/ Rag2 欠損マウス、及び Rag2 欠損マウスの皮下に移植し、週 1 回の頻度で腫瘍体積を計算した。腫瘍体積=長径 x 短径 x 高さより計算した。

(統計解析)

データは平均値+標準偏差で示した。統計解析は対応のない Student's t-test あるいは Welch test を用いた。多重検定における群間の有意差検定は Fisher's あるいは Dunnett's 法を用いて計算した。P<0.05 の時

に有意さ有りとした。

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセント

本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会、及び、医薬基盤研究所研究倫理審査委員会にて承認された研究計画書、「個人情報保護法」、「臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)」に準じて実施した。対象患者に対し、大阪大学医学部附属病院の共同研究者である医師が説明資料に従い研究について説明し、十分の理解を得た上で、文書に同意を得た。

医薬基盤研究所には大阪大学医学部附属病院において連結可能匿名化された情報が試料とともに提供し、提供される情報は年齢、性別、病名、生化学データとした。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載した。

D. 結果・考察

D-1. iTRAQ 法による悪性黒色腫における定量的プロテオーム解析

Melanoma *in situ*、及びその正常皮膚組織、invasive melanoma、及びその正常皮膚組織より抽出したタンパク質に対して iTRAQ 標識と質量分析計を用いて、網羅的なタンパク質発現解析を行った。その結果、1,062 個のタンパク質が同定され、1,036 個のタンパク質が定量情報を有していた。正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において 15 倍以上に高発現するタンパク質が 30 個、0.25 倍以下に低発現するタンパク質を 67 個検出した。悪性黒色腫で高発現する事が知られているタンパク質である S100 という分子が、正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において高発現する事が認められた。興味深いことに Periostin というタンパク質が正常皮膚組織と比較して invasive melanoma において 25.703 倍、正常皮膚組織と比較して melanoma *in situ* で 4.434 と

高発現することが確認された(表 1)。

D-2. 悪性黒色腫における Periostin の発現解析

Invasive melanoma において iTRAQ 法により検出された Periostin の発現差を確認するため、同じ抽出サンプルを用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、Periostin は invasive melanoma にて高発現し melanoma *in situ* ではわずかに発現が認められたが、正常皮膚組織では発現が認められなかった(図 1a)。続いて、19 例の invasive melanoma 組織における Periostin の発現を免疫組織化学線初期右方にて解析した。その結果、Periostin は 19 例の invasive melanoma すべてにおいて発現が認められた(図 1b)。Periostin の発現は invasive melanoma の間質に局在し、メッシュ状の構造を示していた(図 1c)。これらの結果、iTRAQ 解析により Periostin が invasive melanoma において高発現することがウェスタンブロット法、免疫組織化学染色法により確認されたことにより、Periostin がタンパク質レベルで invasive melanoma にて高発現する事が証明された。

D-3. Periostin は悪性黒色腫細胞でなく皮膚線維芽細胞(NHDFs)より産生される

3 種類の悪性黒色腫細胞株(Mewo, G-361 and VMRC-MELG)より抽出したタンパク質を用いて Periostin の発現をウェスタンブロットで評価した。しかしながら Periostin の発現はこれらの細胞において検出されなかった(図 2a)。Periostin は悪性黒色腫組織にて高発現していることから、Periostin の発現には悪性黒色腫と皮膚線維芽細胞(NHDFs)の相互作用が必要なのではないかと考えた。そこで、NHDFs と Mewo、G-361、あるいは VMRC-MELG を共培養し、RT-PCR 法とウェスタンブロット法により Periostin の発現を解析した。Periostin の発現は共培養したときにおいてのみ検出された(図 2a, b)。また、

共培養の時間依存性に Periostin がタンパク質レベルで培養上清中に検出されることが確認された(図 2c)。Periostin の産生源を調べるため、NHDFs に対して、CFSE で蛍光標識した Mewo を 48 時間共培養し、セルソーターで NHDFs と Mewo に分離した。Periostin の mRNA レベルでの発現を RT-PCR にて解析した結果、Periostin は NHDFs においてのみ発現されていることが明らかとなった(図 2d)。

D-4. TGFβ1/TGFβ3 発現は悪性黒色腫細胞と共培養した NHDFs において検出される

NHDFs と悪性黒色腫細胞の共培養は Periostin の発現誘導に効果的であるが、共培養により Periostin の発現がどのように誘導されるか不明である。悪性黒色腫細胞による可溶性因子の影響を調べるため、NHDFs を Mewo 及び G-361 の培養上清で刺激し、Periostin の発現を解析したが、Periostin の発現誘導は認められなかった(図 2e)。NHDFs における Periostin の発現誘導因子を調べるため、Periostin の発現を誘導することが知られているサイトカインである TGF-β1, 3, IL-4, and IL-13 の発現解析を行った。NHDFs と悪性黒色腫細胞株との共培養により IL-4 と IL-13 の発現に変化は認められなかったが、一方で、NHDFs と悪性黒色腫細胞株を共培養した際において、TGF-β1 と TGF-β3 の mRNA レベルでの発現が共培養後の NHDFs において有意に上昇することが明らかとなった(図 2f)。これらの結果、NHDFs と悪性黒色腫細胞株との共培養は NHDFs からの TGF-β発現に重要であることが明らかとなった。

D-5. 悪性黒色腫は Periostin 受容体である integrin αvβ3 と integrin αvβ5 を発現する integrin αvβ3、integrin αvβ5、integrin α6β4 は Periostin の受容体である事が知られているため、悪性黒色腫細胞株におけるこれ

ら分子の発現をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、MewoとG-361において、integrin $\alpha\beta3$ と integrin $\alpha\beta5$ の発現が確認された(図 3a)。一方で、integrin $\alpha6\beta4$ の発現は悪性黒色腫細胞株において検出されなかった。

D-6. 遺伝子組み換えヒト Periostin は悪性黒色腫の増殖を促進する

悪性黒色腫における Periostin の機能を解析するため、遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて悪性黒色腫細胞株に対する増殖への影響を解析した。悪性黒色腫の増殖は遺伝子組み換えヒト Periostin を添加することでコントロール群よりも有意な増殖促進作用が認められた(図 3b)。悪性黒色腫に対する遺伝子組み換えヒト Periostin による増殖促進作用は integrin $\alpha\beta3$ 、及び integrin $\alpha\beta5$ に対する中和抗体の両方の存在下で抑制されたことから、悪性黒色腫において integrin $\alpha\beta3$ と integrin $\alpha\beta5$ が Periostin の受容体として機能している事が確認された(図 3c)。

悪性黒色腫細胞に対して 100 ng/ml の濃度で遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて刺激を行った結果、Akt(Ser473)と p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)のリン酸化が検出された(図 3d)。一方で、悪性黒色腫細胞における遺伝子組み換えヒト Periostin を介した細胞増殖促進作用は LY294002 (phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase 阻害剤)により阻害されなかったが、U0126(MAPK 阻害剤)で抑制された(図 3e)。これらの結果、悪性黒色腫において Periostin は integrin/ p44/42MAPK 経路を介して細胞増殖を促進することが示唆された。

D-7. Periostin 欠損マウスにおいて、悪性黒色腫の増殖は抑制される

In vivo における Periostin による悪性黒色腫の増殖への影響を明らかにするため、免疫不全マウスである Rag2 欠損マウスと Periostin 欠損マウスを交配することで

Periostin/Rag2 欠損マウスを樹立した。Periostin/Rag2 欠損マウス、およびコントロールとして Rag2 欠損マウスの皮下に Mewo 細胞を移植し、腫瘍増殖の経過を観察した。その結果、Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて腫瘍の増殖速度が抑制されることが明らかとなった(図 4a, d)。

免疫組織化学染色法により Ki-67 陽性細胞の数が Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて有意に少なかったことから、細胞周期レベルで増殖が抑制されていることが判明した(図 4b, c)。また、筋線維芽細胞のマーカーである Γ SMA の発現についても Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて低下していることが認められた(図 4b)。

E. 結論

悪性黒色腫と正常皮膚組織の手術検体を用いて iTRAQ 法による網羅的なタンパク質発現定量解析を行った結果、悪性黒色腫に高発現するタンパク質として Periostin を同定した。Periostin は悪性黒色腫の増殖に関与することが *in vitro*, *in vivo* の実験結果より示された。悪性黒色腫に対して Periostin が創薬標的分子となり得る可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Nishioka, C., Ikezoe, T., Furihata, M., Yang, J., Serada, S., Naka, T., Nobumoto, A., Kataoka, S., Tsuda, M., Udaka, K. & Yokoyama, A. CD34(+)/CD38(-) acute myelogenous leukemia cells aberrantly express CD82 which regulates adhesion and survival of leukemia stem cells. Int J Cancer. In Press (2012).

2. Yokoyama, T., Enomoto, T., Serada, S., Morimoto, A., Matsuzaki, S., Ueda, Y., Yoshino, K., Fujita, M., Kyo, S., Iwahori, K., Fujimoto, M., Kimura, T. & Naka, T. Plasma membrane proteomics identifies bone marrow stromal antigen 2 as a potential therapeutic target in endometrial cancer. *Int. J. Cancer* **132**(2), 472-84 (2013)
 3. Yang, L., Serada, S., Fujimoto, M., Terao, M., Kotobuki, Y., Kitaba, S., Matsui, S., Kudo, A., Naka, T., Murota, H. & Katayama, I. Periostin Facilitates Skin Sclerosis via PI3K/Akt Dependent Mechanism in a Mouse Model of Scleroderma *PLoS One* **7**(7), e41994 (2012).
 4. Kotobuki, Y., Tanemura, A., Yang, L., Itoi, S., Wataya-Kaneda, M., Murota, H., Fujimoto, M., Serada, S., Naka, T. & Katayama, I. Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**(2), 219-30 (2012).
 5. Otsuka, K., Kotobuki, Y., Shiraishi, H., Serada, S., Ohta, S., Tanemura, A., Yang, L., Fujimoto, M., Arima, K., Suzuki, S., Murota, H., Toda, S., Kudo, A., Conway, S J., Narisawa, Y., Katayama, I., Izuhara, K. & Naka, T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp. Dermatol.* **21**(5), 331-6 (2012).
 6. Serada, S., Fujimoto, M., Terabe, F., Iijima, H., Shinzaki, S., Matsuzaki, S., Ohkawara, T., Nezu, R., Nakajima, S., Kobayashi, T., Plevy, S E., Takehara, T. & Naka, T. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **18**(11), 2169-79.(2012).
 7. Iwahori, K., Suzuki, H., Kishi, Y., Fujii, Y., Uehara, R., Okamoto, N., Kobayashi, M., Hirashima, T., Kawase, I. & Naka, T. Serum HE4 as a diagnostic and prognostic marker for lung cancer. *Tumour Biol.* **33**(4), 1141-9 (2012).
 8. 世良田聡、藤本 穰、仲 哲治 Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis. 潰瘍性大腸炎の疾患活動性マーカーとしての血清ロイシンリッチアルファ2グリコプロテイン *Intestine* **17**(1), 107-9(2013).
- G-2. 学会発表
1. Serada S, Kotobuki Y, Tanemura A, Katayama I, Naka T: Quantitative proteomic analysis of tumor growth associated proteins in cutaneous malignant melanoma. 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012, Mon, Apr 2.
 2. Morimoto A, Enomoto T, Serada S, Matsuzaki S, Yokoyama T, Ueda Y, Fujita M, Yoshino K, Fumimoto M, Kimura T, Naka T: Annexin A4 induces chemoresistance for multiple drugs in ovarian clear cell carcinoma. 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012, Tue, Apr 3.
 3. Yang, L, Serada, S, Fujimoto, M, Murota, H, Kotobuki, Y, Kitaba, S, Naka, T, Katayama I: Periostin, a novel matricellular protein, is required for cutaneous sclerosis in a mouse model of

- scleroderma. EULAR 2012 Berlin, Germany 6 - 9 June 2012.
4. Serada S, Takahashi T, Urase M, Fujimoto M, Harada E, Nishida T, Naka T: Quantitative phospho-proteomic analysis of gastrointestinal stromal tumors associated with imatinib resistance. 定量的リン酸化プロテオーム解析による消化管間質腫瘍のイマチニブ耐性因子の探索 第10回日本ヒトプロテオーム学会 2012年7月26日(木)-27日(金) 会場 日本科学未来館 7階
5. Yang L, Murota, H, Fujimoto M, Serada, S, Yong, M, Ohkawara, Naka T, Katayama I: Up-regulation of interleukin 8 and CXC chemokine ligand 1 by cold stimulation in human dermal microvascular endothelial cells: a role in winter ulceration and cold urticaria. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September, Geneva-Switzerland.
6. Mei Y, Fujimoto, M, Ohkawara, T, Yang, L, Serada, S, Tsunoda, S-I, Naka T: Interleukin (IL)-6 deficiency does not affect motor neuron disease caused by superoxide dismutase 1 mutations. International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September, Geneva-Switzerland.
7. Serada, S, Fujimoto, M, Naka T: Heterogeneous Nuclear RNP-K is a novel cold-related autoantigen in patients with Raynaud's phenomenon. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, in Washington, DC, November 09 - 14, 2012. November 12 (ACR 2012 第78回米国リウマチ学会議)

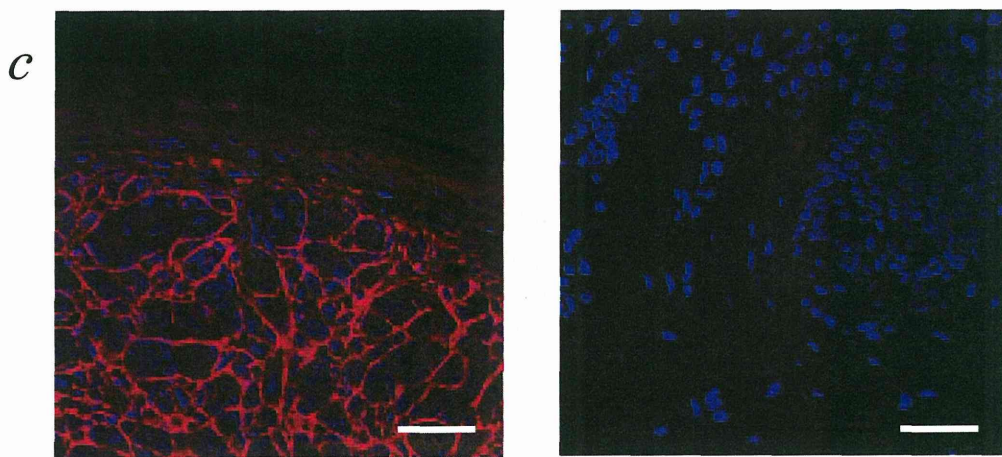
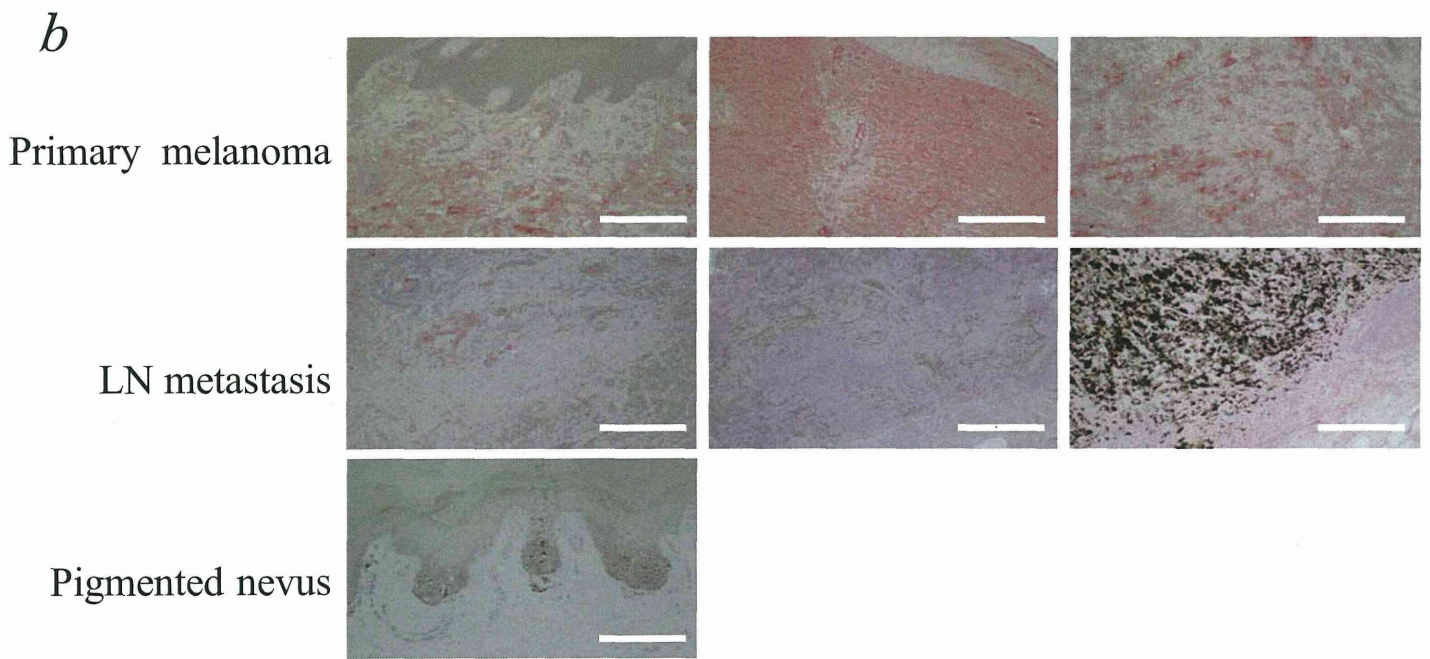
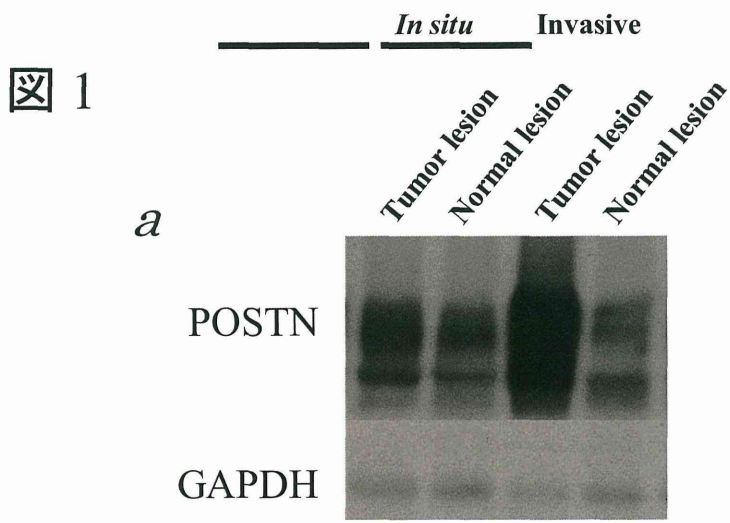
- 1) 発明の名称：結核検査用バイオマーカー
出願日：2012/4/3
出願番号：2012-84996
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所
発明者：仲 哲治、藤本 穰、世良田 聡、松本智成
- 2) 発明の名称：膠原病のレイノー症状を診断する免疫学的手法
出願日：2012/6/22
出願番号：特願 2012-141434
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所
発明者：仲 哲治、藤本 穰、世良田 聡
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

表1

	Accession	腫瘍組織(in situ melanoma) /正常皮膚組織(in situ melanoma)	腫瘍組織(invasive melanoma) /正常皮膚組織(invasive melanoma)	Description
1	Q9NP78	-	58.768	ATP-binding cassette sub-family B member 9
2	P05164	5.671	46.939	Myeloperoxidase
3	P05107	6.504	46.188	Integrin beta-2
4	Q96AY3	4.308	40.519	FK506-binding protein 10
5	Q02809	7.123	40.313	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
6	P02679	5.307	40.302	Fibrinogen gamma chain
7	P07858	7.690	34.511	Cathepsin B
8	P02788	2.419	33.117	Lactotransferrin
9	Q96D15	3.130	32.214	Reticulocalbin-3
10	P15104	12.093	31.095	Glutamine synthetase
11	Q9HD89	2.814	27.353	Resistin
12	P50454	2.725	26.377	Serpin H1
13	Q15063	4.434	25.703	Periostin
14	P14780	2.630	25.668	Matrix
15	P13796	5.983	24.970	Plastin-2
16	P02675	2.033	23.785	Fibrinogen beta chain
17	P80511	-	22.828	Protein S100-A12
18	Q16695	5.041	22.701	Histone H3.1t
19	P41218	2.273	20.974	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
20	P31146	4.035	20.861	Coronin-1A
21	P02792	1.269	20.730	Ferritin light chain
22	P17213	1.076	19.205	Bactericidal permeability-increasing protein
23	Q96AG4	3.854	18.888	Leucine-rich repeat-containing protein 59
24	Q9P2E9	3.176	18.018	Ribosome-binding protein 1
25	P24821	3.544	17.961	Tenascin
26	P00747	3.638	17.582	Plasminogen
27	O15460	2.853	17.433	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2
28	P05109	11.016	17.403	Protein S100-A8
29	Q86UX7	3.317	15.229	Fermitin family homolog 3
30	Q9UBR2	3.647	15.024	Cathepsin



Primary melanoma

Intradermal nevus

图 2

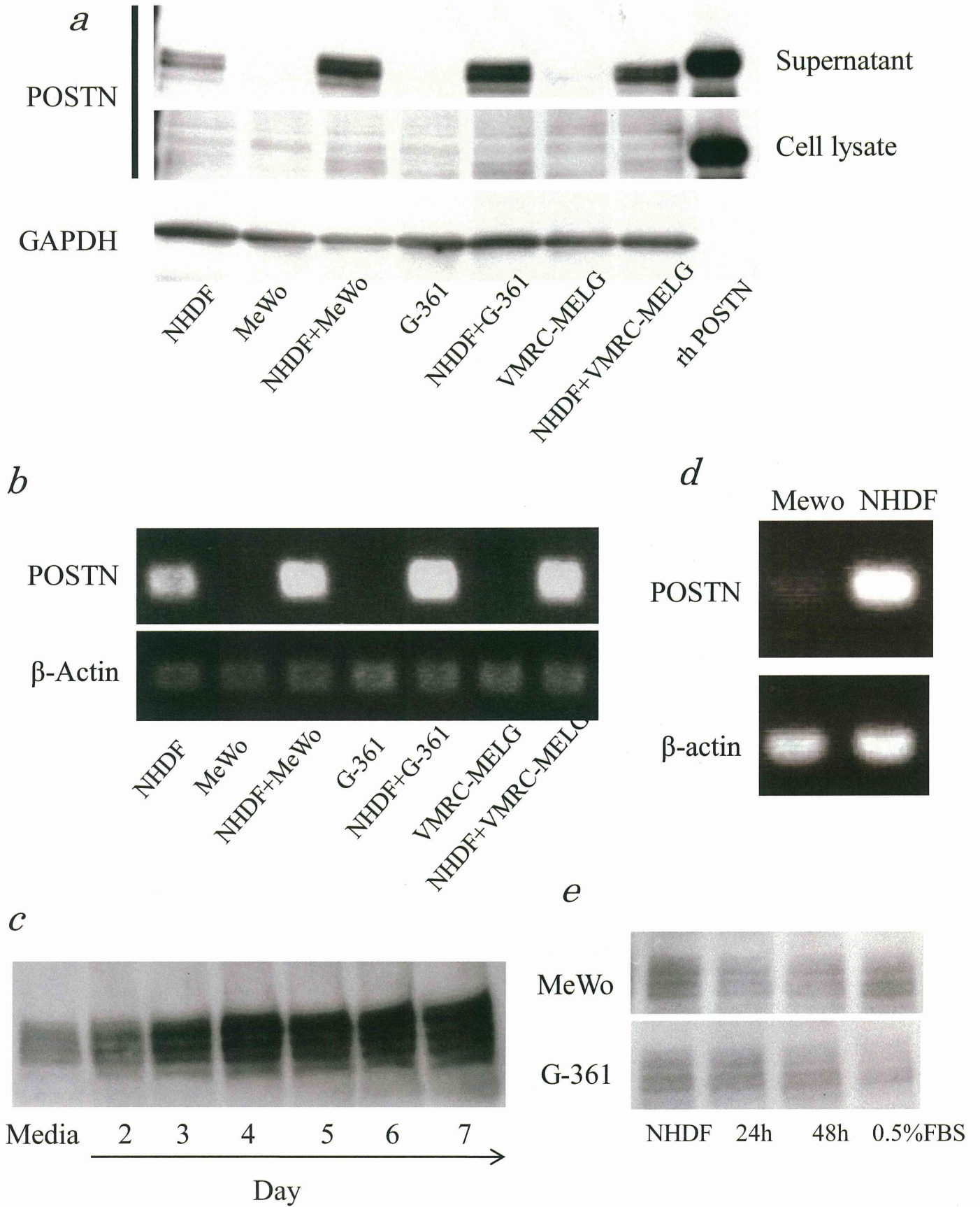


图 2

f

