



Figure 4 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-Wallis test ($p = 0.044$) (B).

プロテオミクス手法による癌の創薬標的分子探索

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

我々のグループではプロテオミクス手法を用いて癌などの各種難病に対する有効な治療法の開発に資する有用なバイオマーカー探索を目的として、以下3つの研究を実施した。

1つ目として、抗癌剤抵抗性として知られる卵巣明細胞腺癌と抗癌剤感受性として知られる卵巣漿液性腺癌の間で発現差を示すタンパク質を蛍光2次元ディフュージョン電気泳動法(2 Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis: 2D-DIGE法)を用いて抗癌剤耐性分子の探索を試みた。その結果、卵巣明細胞腺癌に高発現する分子の一つとして Annexin A4 を同定した。Annexin A4 は漿液性腺癌と比較し、卵巣明細胞腺癌において有意に高発現を示す事が免疫組織化学染色法及びウェスタンブロット法により明らかになった。さらに、Annexin A4 は漿液性腺癌に強制発現させることでカルボプラチンに対して抵抗性を誘導し、その機序として Annexin A4 がカルボプラチンの細胞内取り込み抑制と排出を促進することが細胞内カルボプラチンの定量解析により明らかになった。本研究結果から、Annexin A4 が抗癌剤耐性を克服する上で創薬標的となることが示唆された。

2つ目として、子宮内膜癌に対して定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)を用いて細胞表面膜タンパク質を定量的に解析する基盤技術の確立と、抗体医薬品開発における癌抗原の標的分子の探索を試みた。本手法により同定された創薬標的候補分子の一つとして Bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2)を同定した。BST2 は82%の子宮内膜癌患者組織で高発現を示したのに対し、正常子宮内膜組織の発現頻度は19%であり、BST-2 は正常組織と比較して癌組織で優位に高発現を示した。続いて抗体医薬品の標的としてのBST2の有用性を *in vitro*, *in vivo* で解析した。その結果、抗BST2抗体は子宮内膜癌細胞株に対して、ADCC活性とCDC活性を介して抗腫瘍効果を示した。さらに、抗BST2抗体による抗腫瘍効果をSCIDマウスに子宮内膜癌細胞株(SNG-II, HEC88nu)を皮下移植したゼノグラフトモデルに対して、検証した結果、抗BST2抗体はコントロール抗体、およびPBS投与群のいずれに対しても優位な抗腫瘍効果を示した。さらに、抗BST2抗体はNOD/SCIDマウスに対しては抗腫瘍効果を示さなかったことから、*in vivo* においてはADCCを介して抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。本研究によりBST-2が子宮内膜癌の抗体医薬品標的分子として有用であることが示唆された。また、プロテオミクス手法による細胞表面膜タンパク質の網羅的定量解析が新規癌抗原を探索する基盤技術として有用であることが示唆された。

3つ目として、非常に転移しやすく化学療法も効きにくい予後不良な腫瘍である悪性黒色腫に対して、定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)により創薬標的分子を探索した。その結果、悪性黒色腫にて高発現する分子の一つとして 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。

本研究により抗癌剤耐性に関与するタンパク質として Annexin A4、子宮内膜癌の抗体医薬標的分子として BST-2、悪性黒色腫の増殖促進分子として Periostin を同定することが出来ており、創薬標的としての有用性が証明された。

A. 研究目的

我々のグループではプロテオミクス手法を用いて癌などの各種難病に対する有効な治療法の開発に資する有用なバイオマーカー探索を目的として、以下 3 つの研究を実施した。

1 つ目として、卵巣癌における抗癌剤耐性因子の同定を目的とした。卵巣明細胞腺癌は上皮性卵巣癌組織型の中でも比較的早期に発見される率が高い一方で再発率が高く、化学療法に極めて高く抵抗性を示す予後不良な癌である。従って、再発性の卵巣明細胞腺癌において有効な治療法を開発するためには抗癌剤耐性に関係する分子を同定し、その機序を明らかにすることが重要である。本研究では卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性分子を同定し、機序の解明を試みた。

2 つ目として、子宮内膜癌に対する抗体医薬品の標的となり得る新規癌抗原タンパク質を同定することを目的とした。癌に対する特異的な抗原を同定することは、標的とする抗原に特異的な抗体を作成することで、抗体医薬品による新規治療法を開発することが可能である。実際に EGFR や Her2 など癌細胞に高発現する細胞表面膜タンパク質に対する抗体が癌に対する治療薬として臨床応用されている。現在、これらの分子以外にも癌細胞特異的な細胞表面膜タンパク質、すなわち癌抗原の同定が試みられている。しかし、従来の DNA アレイ法などでは膨大な候補分子から

癌抗原候補分子を絞り込む効率的な方法が無いことや、解析対象が mRNA レベルであることから実際にタンパク質として高発現している点が不明であることに加え、mRNA レベルでの解析ではタンパク質の翻訳後修飾情報が得られないため、抗体医薬品の標的と成り得る癌細胞特異的な細胞表面膜タンパク質を同定することが容易ではなかった。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推進されている。婦人科悪性腫瘍の 1 つである子宮内膜癌は手術と化学療法が標準的な治療法であるが、再発や転移した癌に対する有効な治療法が確立されていない。そのため、子宮内膜癌の癌抗原タンパク質を同定する事が出来れば、新たな治療法の開発につながるものと期待される。本研究ではビオチン標識による細胞表面膜タンパク質の濃縮と、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を組み合わせることで、子宮内膜癌に対する新規癌抗原タンパク質の同定を試みた。

3 つ目として、非常に予後不良な腫瘍出ある悪性黒色腫に対する創薬標的分子の同定を試みた。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。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の同定を試みた。

B. 研究方法

疾患関連タンパク質の解析

1. 卵巣明細胞腺癌薬剤耐性分子の同定と抗癌剤耐性機序の解析

(1) 試料

卵巣明細胞腺癌(Clear cell carcinoma: CCC)、卵巣漿液性腺癌(serous adenocarcinoma: SAC)、卵巣類内膜癌(endometrioid adenocarcinoma)、卵巣粘液性腺癌(mucinous cystadenocarcinoma)患者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。卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO, OVKATE)はJCRBより入手した。

(2) 2D-DIGE用のタンパク質抽出

抗癌剤耐性として知られる卵巣明細胞腺癌より樹立された卵巣明細胞腺癌細胞株 OVISE、抗癌剤感受性として知られる卵巣漿液性腺癌より樹立された卵巣漿液性腺癌細胞株 OVSAHO を RPMI1640 培地(10% FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有)を用いて増殖させた。増殖した OVISE, OVSAHO を PBS(-)で洗浄後、cell scraper ではがし、遠心分離により細胞を回収した。タンパク質はタンパク質抽出用キット (complete mammalian proteome extraction

kit(Calbiochem 社) を用いて抽出した。抽出したタンパク質は、タンパク質定量キット (RC-DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories 社))を用いてウシ血清アルブミン(BSA)をスタンダードとして定量した。

(3) 2D-DIGE

OVISE および OVSAHO より抽出したタンパク質各 75 μ g をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 Cy3、Cy5 (GE healthcare) と混合し、氷上で 30 分間反応させ、その後 10 mM lysine を加え、氷上で 10 分間静置し、反応を停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.0002% BPB, 1.0% Bio-lyte 3-10, 1.2% destreak で 450 μ l にメスアップした。2 次元電気泳動後に蛋白質を回収するために、ラベル化しない蛋白質サンプルも同様に混合調製し、等電点電気泳動(IEF)を行った。IEF には 24 cm のストリップゲル(ReadyStrip TM IPG strips pH3-10NL)を用いた。タンパク質を含む膨潤溶液で 12 時間、50V の電圧をかけてストリップゲルを膨潤させ、タンパク質をゲルに取り込ませた。膨潤後、2 時間で 250V、その後 1 時間で 10,000V まで上昇させ、99,000Vh 通電した。IEF 後のストリップゲルを以下の手順で還元アルキル化した。最初に 20 mg/ml DTT を含む平衡化緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 6 M Urea, 20%v/v グリセロール, 2%SDS, pH8.8)で 40 分間振とうし、その後、25 mg/ml ヨードアセトアミドを含む平衡化緩衝液で 30 分間遮光して振とうした。2 次元目泳動には、後のステップでゲルの溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10%) に IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、電気泳動槽 Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE healthcare) を用いて、2 次元目の電気泳動を行った。定量解析用ゲルはそのまま蛍光スキャンを行い、質量分析解析用ゲルは染色には MS (Mass Spectrometry) 銀染キット(和光純薬)により染色した。

(4) トリプシンを用いたゲル内消化法

2D-DIGE 法にて発現差を示したタンパク質のスポットについて、銀染色したゲルより対応するスポットを切り出した。MS 銀染キットに付属の脱色液を用いて切り出したゲル片の脱色操作を行った後、以下の論文に従ってゲル内消化を行った(Shevchenko A et al., Anal Chem 1996, 68, 850-8.)。トリプシン消化ペプチドは、5%トリフルオロ酢酸(TFA)、45%蒸留水(DW)、50% CH₃CN により抽出し、凍結乾燥した。その後、0.1% TFA, 2% CH₃CN, 98% DW で溶解し、質量分析のサンプルとした。

(5) 質量分析

質量分析は、液体クロマトグラフィー(LC)と質量分析計(MS)を組み合わせた LC/MS 解析システムにより行った。LC は 逆相 HPLC システムにより、Magic 2002 capillary HPLC (Michrom BioResources 社)を用い、カラムは C-18 RP column (length 15 cm, i.d. 200 μm; GL Sciences Inc 社)を用いた。ペプチドは以下の溶媒 A、溶媒 B を 30 分 5~65% にグラジェントをかけることでカラムから溶出した (溶媒 A : 0.1%ギ酸を含む 2:98 のアセトニトリル/蒸留水 ; 溶媒 B : 0.1%ギ酸を含む 95:5 のアセトニトリル/蒸留水)。ナノスプレーイオン源を介してイオン化したペプチドは LCQ イオントラップ型質量分析機 (ThermoElectron 社)で解析した。データは、MS スキャンとそれに続いて最も強いピークを MS/MS スキャンにより得た。MS/MS スペクトルは MASCOT 検索プログラム (Matrix Science 社)を用い、ヒトタンパク質 SwissProt database (human protein Swiss-Prot database)に対してデータベースサーチをした。

(6) AnnexinA4 のリアルタイム PCR 法による発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株

(OVSAHO, OVKATE)より RNeasy mini kit(Qiagen)にて RNA を抽出した。mRNA は SuperScriptTM III Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)により cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR 法は SYBR green premix (Invitrogen)を用いた。検量線として AnnexinA4 をコードするプラスミド (pcDNA3.1AnxA4)を段階希釈した。プライマーは以下の配列を用いた。Forward primer, 5'-ggaggtactgtcaaagctgc-3'、Reverse primer, 5'-gccactcagttctgacttcag-3'。PCR 条件は以下の通りである。1 cycle at 95°C for 1 min and 42 cycles of 95°C for 20 sec, 50°C for 20 sec and 72°C for 30 sec。PCR 産物は My IQTM Single-Color Real-Time Detection System (Bio-Rad Laboratories)にて検出した。

(7) AnnexinA4 のウェスタンブロット法による発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO, OVKATE)より PBS(-)で洗浄後、cell scraper ではがし、遠心分離により細胞を回収した。細胞は RIPA buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM Na₃VO₄, 1 x protease inhibitor cocktail (ナカライテスク))により溶解し、遠心分離(13,200rpm, 4°C, 15min)により上清をタンパク質流出液として回収した。卵巣癌凍結組織は液体窒素にて凍結し、マルチビーズショッカー(安井器械)にて粉末状に粉砕し、RIPA buffer を加えることで溶解し、遠心分離(13,200rpm, 4°C, 15min)により上清をタンパク質流出液として回収した。タンパク質濃度はタンパク質定量キット(DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories 社))を用いてウシ血清アルブミン(BSA)をスタンダードとして定量した。

SDS-PAGE(5-20%グラジェントゲル(和光純薬))には、各細胞 10μg のタンパク質をアブ

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% スキムミルク/PBST(PBS+ 0.1% Tween20)にて室温で 1 時間ブロッキングし、300 倍希釈した抗 AnnexinA4 ポリクローナル抗体 (sc-1930; Santa Cruz Biotechnology)で、室温で 1 時間インキュベートした。PBST で 10 分間、3 回ずつ洗浄した後、PBST で 5,000 倍希釈した HRP 標識抗ヤギ抗体(Santa Cruz 社)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 PBST 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。

(8) AnnexinA の免疫組織化学染色

卵巣癌患者組織(パラフィンブロック)中の AnnexinA4 の発現は ABC Kit (Vector Laboratories)で検出した。計 126 検体の組織切片(43 CCC, 13 endometrioid, 8 mucinous, 62 SAC) について 3 μ m にて切片を作成し、脱パラフィン処理を行い、脱水処理をした。抗原の賦活化は 98 $^{\circ}$ C で 40 分間、target retrieval solution (DAKO) にて処理する事で行った。内在性のペルオキシダーゼ活性は 3% H₂O₂/メタノールにて 20 分間行った。BlockAce (大日本住友製薬) で室温にて 30 分間ブロッキングした後、300 倍希釈した抗 AnnexinA4 ポリクローナル抗体で 4 $^{\circ}$ C にて一晚インキュベートした。続いて、biotinylated anti-goat IgG antibody (Vector)にて室温で 1 時間反応させ抗原抗体複合体は avidin-biotin-peroxidase complex solution(Vector Lab) で検出し、DAB (MERCK, Darmstadt, Germany)にて発色させた。組織切片は hematoxylin でカウンター染色した。90%以上の腫瘍細胞が染色されている検体はスコア 3、50%から 90%の腫瘍細胞が染色されている場合はスコア 2、50%未満の腫瘍細胞が陽性の時はスコア 1、全く

染まっていないか、染まりが弱いときはスコア 0 とした。

(9) AnnexinA4 安定発現 OVSAHO の樹立

Annexin A4 の遺伝子は、OVISE の cDNA ライブラリーに対し、Annexin A4 に特異的なプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 産物をほ乳類発現ベクターである pcDNA3.1V5/HisTOPO ベクターに TA クローニングし、DNA シーケンス解析により遺伝子配列が正しいことを確認した。pcDNA3.1-AnxA4 を lipofectamine 2000 (invitrogen)を用いて AnnexinA4 の発現が低い漿液性腺癌細胞株 OVSAHO に導入し、0.5mg/ml G418 で selection した。

(10) カルボプラチンに対する IC₅₀ 測定

AnnexinA4 ベクターあるいは空ベクターの安定発現株は 96-well plates に 3,000 cells/well ずつまいた。翌日、カルボプラチン(Sigma)(0-150 μ M)にて 72 時間処理し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo)を加えることで発色させ、microplate reader (Bio-Rad Model 680)にて 450nm の吸光度を測定した。

(11) 細胞内カルボプラチンの定量

細胞内に取り込まれたカルボプラチンの量は細胞内プラチナ量を定量する事で測定した。AnnexinA4 ベクターあるいは空ベクターの安定発現株を 60mm plate にまき、24 時間後、1 時間、37 $^{\circ}$ C で 2 mM カルボプラチンで処理し、PBS で洗浄、あるいはカルボプラチンを含まない培地にて 6 時間インキュベートした。細胞溶解物は偏光ゼーマン原子吸光度計(model Z-8000; 日立)にて測定する事で、プラチナ量を定量した。プラチナの絶対量はプラチナ標準溶液を用いて検量線を作成することで定量した。

(12) 統計解析

免疫組織化学染色の解析は Kruskal Wallis test を用いた。その他の統計解析は Student's

t tests を用いた。P 値が 0.05 未満のときに有意差有りとした。

2. 子宮内膜癌の抗体医薬標的分子の探索

(1) 試料

子宮内膜癌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。正常子宮内膜細胞 E6E7/TERT は金沢大学医学部産婦人科学教室、京哲先生より分与していただいた。

(2) iTRAQ 法による細胞表面膜タンパク質の定量解析

正常子宮内膜細胞 E6E7/TERT に対して子宮内膜癌細胞株 HEC1, HEC1A, HEC6, HEC108, HEC116, HEC251, SNGII にて高発現する細胞表面膜タンパク質を探索することで子宮内膜癌特異的な癌抗原タンパク質の同定を試みた。まず、150 mm シャーレで培養した 8 種類の細胞株に対して、sulfo-NHS-SS-biotin で細胞表面膜タンパク質をビオチン標識した。抽出したタンパク質を Neurto-avidin ビーズにて精製した。このとき、サンプル間での誤差を補正するため、sulfo-NHS-SS-biotin で標識したウシ血清アルブミンを内部標準として等量ずつ加え、質量分析計による定量結果の補正に用いた。精製したタンパク質をトリプシンで消化し、iTRAQ 試薬で標識した。8 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(nano LC-MS/MS)解析にて測定した。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。

(3) RT-PCR および FACS による癌抗原発現の確認

RT-PCR 解析

正常子宮内膜細胞株(EM-E6/E7/TERT)、及び子宮内膜癌細胞株 HEC-1, HEC-1A,

HEC-6, HEC-88nu, HEC-108, HEC-116, HEC-251, SNG-II について、RNeasy mini kit(QIAGEN)により RNA を精製し、QuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen)を用いて cDNA へ逆転写した。RT-PCR は TaKaRa Ex Taq DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて行った。以下のプライマー配列を用いた。

BST2, forward primer

5'-CGGCCTTCGGGCAGTGATGG-3' and reverse primer

5'-GCTGAGGCCAGCAGCACAA-3';

β -actin, forward

primer 'AGCCTCGCCTTTGCCGA-3' and reverse primer

5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'.

FACS 解析

細胞は PBS (Nacalai Tesque)で 2 回洗浄し、0.02% EDTA solution (Nacalai Tesque)で dish よりはがした。細胞を FACS staining buffer (PBS supplemented with 1% FBS and 0.1% sodium azide)で 2 回洗浄し、100 倍希釈した mouse anti-human BST2 antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA) で染色し、続いて 100 倍希釈した Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse IgG antibody (Invitrogen)で染色した。染色した細胞は FACS Canto cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)で測定し、FlowJo software (Tree Star, Stanford, CA, USA)を用いてデータ解析した。

(4) 免疫組織化学染色法による癌抗原の発現解析

ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織(正常子宮組織 59 検体、子宮内膜癌組織 123 検体)は大阪大学医学部附属病院にて手術を受けた患者より得た(検体の臨床情報の詳細は表 3 参照)。

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。BST2

に対する免疫組織化学染色は ABC 法をにより抗 BST2 抗体を用いて行った。免疫組織化学染色の結果、染色強度を 4 段階に分類した (no staining = 0, weak staining = 1, moderate staining = 2, strong staining = 3)。染色結果は 3 名の産婦人科腫瘍学者により独立して実施した。

(5) siRNA およびモノクローナル抗体による増殖阻害アッセイ

子宮内膜癌細胞は 96 ウェルプレートに 1,000 cells/well まき、lipofectamine 2000 を用いた siRNA トランスフェクション後 24, 48, 72 時間後、あるいは抗体を加えた 72 時間後に WST-8 アッセイ法によって細胞増殖アッセイを行った。に対する siRNA および、negative control siRNA は QIAGEN 社より入手した。

(6) 癌抗原に対するモノクローナル抗体による ADCC アッセイ

ADCC アッセイは calcein-acetoxymethyl ester (calcein-AM) release assay により実施した。SCID マウス由来骨髓細胞を RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 50 ng/ml recombinant human IL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) and 10 ng/ml recombinant mouse GM-CSF (Peprotech)にて 5 日間培養し、NK 細胞、マクロファージを含む細胞障害活性をもつ細胞集団を bone marrow-derived lymphokine-activated killer cells (BM-LAK)として、エフェクター細胞として使用した。ターゲット細胞は Calcein-AM (Nacalai Tesque) を用いて 37 度で 2 時間標識した。1×10⁴ cells の細胞を 96 ウェルプレートに撒き、0, 0.1, 1 (μg/ml)の濃度の抗 BST2 抗体を加え、エフェクターターゲット比率を 50:1 に設定した。抗体を含まない培地を添加したウェルを自発的な calcein-AM の放出量、1% Nonidet P-40 を添加したウェルを calcein-AM の最大放出量とした。ADCC

アッセイは 37 度にて 4 時間行った。100 μl の培養上清を新しいプレートに移し、Wallac 1420 ARVO fluoroscan (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)を用いて蛍光強度を測定した。相対細胞障害活性は以下のように計算した

$$\% \text{ lysis} = (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release}) \times 100$$

(7) 癌抗原に対するモノクローナル抗体による CDC アッセイ

CDC アッセイは ⁵¹Cr release assay を用いて行った。子宮内膜癌細胞を 0.1 μCi の ⁵¹Cr-sodium chromate を用いて 37 度で 2 時間標識し、DMEM 培地で 2 回洗浄した。標識した子宮内膜癌細胞を 1×10⁴ cells ずつ 96 ウェルプレートに撒き、0-1 μg/ml の濃度の抗 BST2 抗体と 15 分反応させた。加えた。続いて、仔ウサギ由来補体 (CL3441, lot .6304, Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) を終濃度 12.5%で加え、37 度で 90 分インキュベートした。インキュベート後、100 μl の培養上清を新しいプレートに移し、γ カウンターを用いて放射活性を測定した。相対細胞障害活性は上記式を用いて計算した。

(8) 癌抗原に対するモノクローナル抗体による抗腫瘍効果の *in vivo* における解析

Scid マウス (8 週齢、メス)皮下に HEC88nu および SNG-II を 5×10⁶ cells/100 μl (PBS:マトリゲル=1:1)で移植した。HEC88nu は移植後 9 日目に抗 BST2 抗体、isotype control 抗体を 10mg/kg、あるいは PBS を週 2 回の頻度で 4 週間腹腔内に投与した。HEC88nu は抗体投与終了後 4 週目に腫瘍重量を計測した。SNG-II は 4 日目にマウスを 3 群に分け、抗 BST2 抗体、isotype control 抗体を 5 mg/kg、あるいは PBS を週 2 回の頻度で 4 週間投与した。SNG-II は抗体投与終了後 8 週目に腫瘍重量を計測した。週 2 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

り計算した。

(9) 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。

3. 悪性黒色腫の創薬標的分子の探索

(1) 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(13200rpm, 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 11µl 加えた。50mM tris-(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP)を 2µl 加え、37°C で 1 時間還元処理を行い、200 mM Methylmethanethiosulfonate (MMTS) を 1µl 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 366µl 加え、1mg/ml の TPCK-trypsin(ABSciex)を 10µl 加え 37°C 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 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。

(2) 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、ミ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。

(3) 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。

(4) 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'-GCCCTTGCCATACCTCCGC-3'

reverse,

5'-CGCAGCAAGGCGAGGCAGAT-3' ;

GAPDH, forward,

5'-GGAGTCAACGGATTTGGTTCGTA-3'

reverse,

5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA-3'

(5) 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 (1:1,1000, Biosource, Camarillo, CA) 抗-FAK 抗体 (1:1,1000, 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。

(6) 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 450nm 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。

(7) *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。

(8) 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 の時に有意差有りとした。

(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され、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

1. 卵巣明細胞腺癌薬剤耐性分子の同定と抗腫瘍剤耐性機序の解析

(1) 2D-DIGE 法による卵巣明細胞腺癌と卵巣漿液性腺癌細胞間のタンパク質発現解析

2D-DIGE 法を用いて卵巣明細胞腺癌細胞株 (OVISE) と卵巣漿液性腺癌細胞株 (OVSAHO) の間におけるタンパク質発現差を解析した(図 1 A)。OVISE にて高発現を示したタンパク質(8spot)、及び、OVSAHO にて高発現を示すタンパク質(6spot)について、それぞれ対応するスポットを、銀染色を行ったゲル(図 1 B)より切り出し、トリプシンを用いたゲル内消化法を行い、ペプチドを抽出した。得られたペプチドサンプルを質量分析計(LC-MS/MS(LCQ))にて解析を行い、MASCOT サーチエンジンにてデータベースサーチを試みた。その結果、卵巣明細胞腺癌

において、グルタチオン S トランスフェラーゼなど解毒に関するタンパク質も発現上昇が認められたが、卵巣明細胞腺癌に高発現するタンパク質として Annexin A が同定された(表 1)。Annexin A4 はカルシウムイオン依存的にリン脂質二重膜に結合する細胞内タンパク質であり、細胞膜の透過性やエンドサイトーシス、エクソサイトーシスに関係することが報告されており、抗癌剤の細胞内取り込みなどに関係していることが考えられた。

(2) AnnexinA4 の発現解析

卵巣明細胞腺癌細胞株(OVISE, OVOKO, RMG-1, OVMANA)、卵巣漿液性腺癌細胞株(OVSAHO, OVKATE) に対して Annexin A4 の発現をリアルタイム PCR 法及び、ウェスタンブロット法にて解析した結果、Annexin A4 は mRNA レベル、タンパク質レベル共に卵巣漿液性腺癌に(図 2A, B)比べ、卵巣明細胞腺癌にて特異的に高発現を示した。

(3)卵巣癌患者組織における AnnexinA4 の発現解析

卵巣明細胞腺癌(CCC)、卵巣漿液性腺癌(SAC)、卵巣類内膜癌(endometrioid adenocarcinoma)、卵巣粘液性腺癌(mucinous cystadenocarcinoma) 患者組織 126 検体(表 2)について免疫組織化学染色にて Annexin A4 の発現を解析した結果(図 3A,B)。

免疫組織化学染色の結果、Annexin A4 の発現が卵巣漿液性腺癌に比べ卵巣明細胞腺癌にて高発現していた。この結果を確認するため、凍結手術組織よりタンパク質を抽出し、Annexin A4 の発現をウェスタンブロット法にて解析した結果、Annexin A4 の発現は確かに卵巣漿液性腺癌に比べ、卵巣明細胞腺癌で特異的に高発現を示していた(図 3C)。

(4) AnnexinA4 安定発現株の作成とカルボプラチンの IC₅₀ 測定

卵巣明細胞腺癌にて高発現している

Annexin A4 が抗癌剤耐性と関係することを明らかにするため、抗癌剤感受性である卵巣漿液性腺癌に Annexin A4 遺伝子発現ベクター、及びコントロールとして空ベクターを導入し、安定発現株を樹立した(図 4A)。Annexin A4 安定発現株と空ベクターのクローンについて、細胞増殖アッセイキット(Cell Counting Kit-8 (Dojindo))を用いてカルボプラチンに対する IC₅₀ 値を用いてアッセイした結果、コントロール株では 23 μ M であるのに対し、Annexin A4 安定発現株では 42 μ M と、Annexin A4 を強制発現させると抗癌剤に対して耐性を誘導することが明らかになった(図 4B)。

(5) AnnexinA4 安定発現株における抗癌剤の細胞内取り込み、細胞外排出に関する実験

Annexin A4 安定発現株が誘導するカルボプラチン耐性機序を明らかにするため、Annexin A4 が細胞膜の透過性を制御する分子であることから、カルボプラチンの細胞内取り込み、及び細胞外への排出に関する実験を行った。細胞内カルボプラチン量はプラチナを測定することで定量した。Annexin A4 安定発現株、及び、コントロール細胞について 2mM のカルボプラチンで 1 時間処理した後、細胞内プラチン量を定量した結果、細胞内に蓄積したプラチン量はコントロール細胞株と比べ Annexin A4 安定発現株にて有意に低下を示した(図 5)。このことから Annexin A4 の強制発現は細胞内への抗癌剤取り込みを抑制することが示唆された。さらに、Annexin A4 安定発現株、及び、コントロール細胞について 2mM のカルボプラチンで 1 時間処理した後、抗癌剤を含まない培地で 6 時間培養した後、細胞内に残存したカルボプラチン量を測定した結果、コントロール細胞群では 6 時間の培養で細胞内の抗癌剤の排出に有意な差は見られなかったが、Annexin A4 安定発現株では抗癌剤を含まない培地で 6 時間培養することで細胞内に残存したカルボプラチン量が有意に低下した(図 5B)。このこと

から、Annexin A4 は細胞内に取り込まれたカルボプラチンの細胞外排出にも関与する事が示唆された。

2. 子宮内膜癌の抗体医薬標的分子の探索

(1) iTRAQ 法による子宮内膜癌細胞表面膜タンパク質の定量的プロテオーム解析

網羅的なタンパク質発現解析の結果、364個のタンパク質が同定された。これらの中において、細胞膜貫通ドメインを有する分子が160個同定された(図6)。正常子宮内膜細胞と比較して、7種類の子宮内膜癌細胞株の内、4種類の癌細胞株にて2倍以上に高発現する細胞表面膜タンパク質として15個同定した。これらの中には既に論文で子宮内膜癌に高発現することが知られているタンパク質である、L1 cell adhesion molecule (L1CAM)が含まれていた。今回、我々が行った解析の結果、これまで子宮内膜癌に高発現することが報告されていないタンパク質としてBST2を同定した(図7)。

(2) RT-PCR および FACS による癌抗原発現の解析

同定されたBST2について、特異的なプライマーを用いてRT-PCR法によりBST2が正常子宮内膜細胞では発現せず、子宮内膜癌細胞株に発現していることを確認した(図8)。

さらに、BST2について、特異的な抗体を用いてFACS (fluorescence-activated cell sorter)にて解析を行った。その結果、BST2が実際に癌細胞表面に発現していることを確認した(図9)。

これらの結果、iTRAQ法により同定された結果と関連した結果が得られており、正常子宮内膜細胞ではなく、子宮内膜癌細胞表面に特異的に高発現することが明らかとなった。

(3) 癌抗原候補分子の癌組織での発現の検証

BST2について、手術組織に対し免疫組織化学染色法を行うことで、細胞株でなく、癌組織における、癌抗原候補分子の発現につい

て評価した。

その結果、BST2について、正常子宮内膜組織よりも子宮内膜癌組織において有意に高発現することが判明した(図10, 11)。特にBST2については正常組織での発現が低く、癌組織での発現レベルが高いことと、細胞表面に発現していることから、抗体医薬品の標的として有用性が高いものと考えられた。

(4) 癌抗原候補分子に対する抗体を用いたADCC、CDCアッセイ

BST2が正常子宮内膜細胞と比較して子宮内膜癌細胞株に特異的に高発現することから、BST2に対する抗体が創薬標的となり得る可能性がある。BST2は癌細胞の増殖と直接関係しないが、BST2はADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)やCDC (complement-dependent cytotoxicity)を介して抗体医薬の標的となり得る可能性が示唆された。ADCCアッセイを行った結果、抗BST2抗体はBST2陽性細胞に対して細胞障害活性を示すことが判明した(図12)。CDCアッセイについても、抗BST2抗体はBST2陽性細胞に対して細胞障害活性を示すことが明らかとなった(図13)。

(5) 癌抗原候補分子に対する siRNA および抗体を用いた増殖阻害アッセイ

BST2が子宮内膜癌細胞株の増殖と関係しているかどうかについて明らかにするため、BST2に対するsiRNAを用いた発現抑制、及びBST2に対するモノクローナル抗体を用いて、*in vitro*での抗腫瘍効果を検討した。BST2陽性子宮内膜癌細胞に対して、BST2に対するsiRNA、及び抗BST2抗体は直接的な抗腫瘍効果を示さなかった(図14,15)。

(6) *In vivo*における抗BST2抗体による抗腫瘍効果

*In vivo*における抗BST2抗体による抗腫瘍効果を明らかにするため、BST2陽性細胞である子宮内膜癌細胞(HEC88/nu及び

SNG-II)を SCID マウスの皮下に 5x10⁶ 個ずつ移植させた。その後、PBS 投与群、isotype control IgG 投与群、抗 BST2 抗体の 3 群に分け、週 2 回の頻度で 4 週間投与を行った。腫瘍体積を測定した結果、抗 BST2 抗体投与群では PBS 投与群、及び control IgG 投与群のいずれに対しても *in vivo* での腫瘍の増殖に対して有意な阻害効果を示した(図 16,17,18)。これらの結果、抗 BST2 抗体は子宮内膜癌細胞に対し優れた抗腫瘍効果を示すため、優れた治療薬と成り得る可能性が高いと考えられる。

さらに、抗 BST2 抗体が *in vivo* において ADCC を介して抗腫瘍効果を示すことを証明するため、NK 細胞が欠失し、ADCC を示さない免疫不全マウスである NOD/SCID マウスを用いて *in vivo* での抗 BST2 抗体による抗腫瘍効果を検討した。BST2 陽性細胞である子宮内膜癌細胞 (HEC88/nu) を NOD/SCID マウスの皮下に 5 x 10⁶ 個移植した。その後、PBS 投与群、isotype control IgG 投与群、抗 BST2 抗体の 3 群に分け、週 2 回の頻度で 4 週間投与を行った。腫瘍体積を測定した結果、抗 BST2 抗体投与群において有意な抗腫瘍効果は認められず、PBS 投与群、及び control IgG 投与群のいずれも腫瘍の増殖が同程度に認められた。(図 19,20)。これらの結果、抗 BST2 抗体は *in vivo* において ADCC を介して子宮内膜癌細胞に対し優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

3. 悪性黒色腫の創薬標的分子の探索

(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、1036 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 4)。

(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 21a)。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 21b)。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 21c)。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。

(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 22a)。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 22a, 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 22c)。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 22d)。

(4) TGF β 1 と TGF β 3 の mRNA 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 22e)。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- β 1, 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- β 1 と TGF- β 3 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 22f)。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。

(5) 悪性黒色腫は Periostin 受容体である integrin $\alpha\beta$ 3 と integrin $\alpha\beta$ 5 を発現する

integrin $\alpha\beta$ 3、integrin $\alpha\beta$ 5、integrin α 6 β 4 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 $\alpha\beta$ 3 と integrin $\alpha\beta$ 5 の発現が確認された(図 23a)。一方で、integrin α 6 β 4 の発現は悪性黒色腫細胞株において検出されなかった。

(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 23b)。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 $\alpha\beta$ 3、及び integrin $\alpha\beta$ 5 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 $\alpha\beta$ 3 と integrin $\alpha\beta$ 5 が Periostin の受容体として機能している事が確認された(図 23c)。

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 23d)。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 23e)。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。

(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 24a, 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 24b, c)。また、筋線維芽細胞のマーカーである α 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 24b)。

E. 結論

本研究の結果、卵巣明細胞腺癌の抗癌剤耐性分子として Annexin A4 を同定した。Annexin A4 の強制発現は漿液性腺癌細胞株 OVSAHO に対してカルボプラチンの耐性を誘導したが、その機序として Annexin A4 がカルボプラチンの細胞内取り込みを抑制し、細胞外への排出を促進することが明らかになった。以上の結果から、Annexin A4 は抗癌剤耐性を克服するための標的分子となり得ると考えられる。

細胞表面膜タンパク質のビオチン標識による濃縮と iTRAQ 法による網羅的な定量

解析は正常細胞と比較して癌細胞に高発現する癌抗原の同定に効果的であることが示された。本手法により BST2 は子宮内膜癌の治療標的としての有用性が *in vitro*, *in vivo* の実験結果より示された。本手法は様々な癌種に対して応用出来るため、優れた創薬基盤技術であると考えられる。

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. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Kim, A., Enomoto, T., Serada, A., Ueda, Y., Takahashi, T., Ripley, B., Miyatake, T., Fujita, M., Lee, CM., Morimoto, K., Fujimoto, M., Kimura, T. & Naka, T. Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. *Int J. Cancer* **125**(10),2316-22 (2009).
2. Serada, S., Fujimoto, M., Ogata, A., Terabe, F., Hirano, T., Iijima, H., Shinzaki, S., Nishikawa, T., Ohkawara, T., Iwahori, K., Ohguro, N., Kishimoto, T. & Naka, T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 770-4 (2010).
3. Kim, A., Serada, S., Enomoto, T. & Naka, T. Targeting annexin A4 to counteract chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 963-71 (2010).

4. Serada, S., Fujimoto, M., Terabe F., Iijima, H., Shinzaki, S., Matsuzaki, S., Ohkawara, T., Nezu, R., Nakajima, S., Kobayashi, T., Plevy, SE., Takehara, T. & Naka, T. Serum leucine-rich alpha-2 glycoprotein is a disease activity biomarker in ulcerative colitis *Inflamm. Bowel Dis.* **17**(2), 491-502 (2011).
 5. Ontsuka, 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. Kotobuki, Y., Tanemura, A., Yang, L., Itoi, S., 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).
 7. Kim, A., Ueda, Y., Naka, T., Enomoto, T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 14. (2012)
 8. 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.
 9. 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).
 10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
- F-2. 学会発表
1. Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Fumitaka Terabe, Teppei Nishikawa, Tadamitsu Kishimoto, Tetsuji Naka : Proteomics-based identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel biomarker associated with disease activity of inflammatory autoimmune disorders. 第39回日本免疫学会総会 2009年12月2日～4日,大阪国際会議場 (グランキューブ大阪)
 2. A. Kim, S. Serada, T. Takahashi, B. Ripley, Y. Souma, M. Fujimoto, T. Naka:

Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. ECCO 15 - 34th ESMO Multidisciplinary Congress Internationale Congress Centrum Berlin (ICC Berlin), Berlin, Germany from Sunday 20 to Thursday 24 September 2009.

3. S. Matsuzaki, S. Serada, T. Naka: EXPRESSION OF ANNEXIN A4 AT ENDOMETRIAL CANCER AND RELATION TO CARBOPLATIN SENSITIVITY. ESMO - European Society for Medical Oncology (ESMO), Milan, 8-12 October 2010.
4. Shinya Matsuzaki, Serada Satoshi, Kim Ayako, Takuhei Yokoyama, Takashi Miyatake, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Takayuki Enomoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka : Expression of Annexin A4 at endometrial cancer and relation to carboplatin sensitivity. 第69回日本癌学会 大阪国際会議場, リーガロイヤルホテル大阪, 2010年9月
5. Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Fumitaka Terabe, Teppei Nishikawa, Tadamitsu Kishimoto, Tetsuji Naka: Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is a novel biomarker for monitoring disease activity during therapy in patients with inflammatory autoimmune disease. 第14回国際免疫会議, 神戸国際展示場, 2010年8月
6. 世良田聡, 藤本 穰, 寺部文隆, 西川哲平, 仲 哲治: 自己免疫疾患の新規活動性マーカーとしてのleucine rich alpha 2 glycoprotein, 第8回日本プロテオーム学会, 東京ベイホテル東急, 2010年7月
7. Noriko Umegaki, Katsuto Tamai, Keisuke Nimura, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Takehiko Yamazaki, Hajime Nakano, Yasufumi Kaneda, Ichiro Katayama: Investigation of roles and molecular mechanisms of karyopherin alpha2 in keratinocyte proliferative disorders. European Society for Dermatological Research. Helsinki, Finland. 9/11 2010.
8. Takuhei Yokoyama, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Shinya Matsuzaki, Toshihiro Kimura, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Kiyoshi Yoshino, Ayako Kim, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka: Quantitative proteomic analysis of cell-surface membrane proteins: Biomarker discovery in endometrial cancer AACR 2011 4/2-4/6 Wed, Apr 6.
9. L. Yang, M. Fujimoto, S. Serada, H. Murota, B. Ripley, S. Kitaba, Y. Kotobuki, T. Naka, I. Katayama: PERIOSTIN GENE KNOCKOUT IS PROTECTIVE AGAINST THE DEVELOPMENT OF BLEOMYCIN-INDUCED MURINE SKIN SCLERODERMA EULAR 2011 5/25-28, London.
10. S. Serada, B. Ripley, M. Fujimoto, F. Terabe, L. Yang, T. Nishikawa, T. Naka: LEUCINE RICH ALPHA 2 GLYCOPROTEIN (LRG) AS A NOVEL BIOMARKER FOR MONITORING DISEASE ACTIVITY DURING THERAPY IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY AUTOIMMUNE DISEASE. EULAR 2011 5/25-28., London.
11. Satoshi Serada, Takuhei Yokoyama, Takayuki Enomoto, Shinya Matsuzaki, Akiko Morimoto, Ayako Kim, Minoru Fujimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka: 定量的プロテオーム解析による子宮内膜癌抗原蛋白質の探索 第9回日本

- プロテオーム学会 2011年7月28日～29日 新潟市朱鷺メッセ
12. Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Fumitaka Terabe, Tetsuji Naka: Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is a novel biomarker for monitoring disease activity in patients with Ulcerative Colitis. 第40回日本免疫学会総会 2011年11月27日～29日幕張メッセ (千葉市)
 13. Yori-hisa Kotobuki, Kanako Ontsuka, Satoshi Serada, Hiroshi Shiraishi, Atsushi Tanemura, Shoichiro Ohta, Lingli Yang, Tetsuji Naka, Kenji Izuhara, and Ichiro Katayama: Periostin, a matricellular protein, accelerates wound repair by activating dermal fibroblasts. 第36回日本研究皮膚科学会学術大会・総会: 2011年12月9日～11日 国立京都国際会館
 14. Satoshi Serada, Yori-hisa Kotobuki, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama, Tetsuji Naka: 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, 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Mar 31-Apr 4 2012., Chicago, Illinois.
 15. kiko Morimoto, Takayuki Enomoto, Satoshi Serada, Shinya Matsuzaki, Takuhei Yokoyama, Yutaka Ueda, Masami Fujita, Kiyoshi Yoshino, Minoru Fumimoto, Tadashi Kimura, Tetsuji Naka: Annexin A4 induces chemoresistance for multiple drugs in ovarian clear cell carcinoma. AACR2012, Apr 3 2012, Chicago, Illinois.
 16. Yang S. Serada, M. Fujimoto, H. Murota, Y. Kotobuki, S. Kitaba, T. Naka, T.: PERIOSTIN, A NOVEL MATRICELLULAR PROTEIN, IS REQUIRED FOR CUTANEOUS SCLEROSIS IN A MOUSE MODEL OF SCLERODERMAL. EULAR 2012 Berlin, Germany 6 - 9 June 2012.
 17. Satoshi Serada, Tsuyoshi Takahashi, Maiko Urase, Minoru Fujimoto, Emi Harada, Toshiro Nishida, Tetsuji Naka: 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-27日 日本科学未来館
 18. L. Yang, H. Murota, M. Fujimoto, S. Serada, M. Yong, T. Ohkawara, T. Naka, I. Katayama : 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
 19. Y. Mei, M. Fujimoto, T. Ohkawara, L. Yang, S. Serada, S.-I. Tsunoda, T. Naka: INTERLEUKIN (IL)-6 DEFICIENCY DOES NOT AFFECT MOTOR NEURON DISEASE CAUSED BY SUPEROXIDE-DISMUTASE 1 MUTATION International Cytokine Society 10th joint Annual meeting, 11th-14th September,

Geneva-Switzerland.

20. Satoshi Serada, Minoru

Fujimoto, Tetsuji Naka: 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)

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

1) 報道発表

- ・日本経済新聞 夕刊 2009 10/28
炎症判断の物質特定
- ・日本経済新聞 2009 7/15
抗癌剤の「敵」発見

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 発明の名称: 血管新生誘導分子

出願日: 2009/12/3

出願番号: 特願 2009-275254

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者: 仲 哲治、世良田聡

2) 発明の名称: 創傷治癒剤

出願日: 2010 年 7 月 1 日

出願番号: 特願 2010-151139 号

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者: 寿 順久、世良田聡、仲 哲治

3) 発明の名称: 自己免疫疾患検査用バイオマーカー及び検査方法

出願日: 2009 年 6 月 9 日

出願番号: 特願 2009-138408

出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所、国立大学法人大阪大学

発明者: 仲 哲治、世良田聡、岸本忠三

4) 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

5) 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

H. 研究協力者

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 主任研究員 藤本穰

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 主任研究員 世良田聡

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 特任研究員 横山拓平

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 特任研究員 寺部文隆

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 特任研究員 岩堀幸太

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 特任研究員 金雅子

大阪大学大学院 医学系研究科 呼吸器免疫アレルギー内科 講師 緒方篤

大阪大学大学院 医学系研究科 消化器外科 助教 高橋剛

大阪大学大学院 医学系研究科 産婦人科 助教 上田豊

大阪大学大学院 医学系研究科 産婦人科 助教 松崎慎哉

大阪大学大学院 医学系研究科 消化器外科 助教 高橋剛

大阪大学大学院 医学系研究科 消化器内科 助教 飯島英樹

大阪大学大学院 医学系研究科 消化器内科 助教 新崎信一郎