

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月15日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791100

研究課題名（和文）悪性黒色腫における Periostin の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Periostin in malignant melanoma

研究代表者

世良田 聡（SERADA SATOSHI）

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員

研究者番号：50463302

研究成果の概要（和文）：

悪性黒色腫はさまざまな臓器に転移し、化学療法も効き難いため予後が極めて悪い腫瘍であり、新規治療法の開発が必要とされている。これまでに申請者は定量的プロテオミクス解析により Periostin という細胞外マトリックスタンパク質が正常皮膚と比較して悪性黒色腫にて高発現することを明らかにしている。本研究では Periostin と悪性黒色腫の増殖との関係を明らかにし、悪性黒色腫の新規治療法の開発に結びつけることを目的とした。

精製ヒト Periostin タンパク質を悪性黒色腫細胞株 (Mewo, G361, G361, VMRC-MELG) に処理すると、Periostin は投与量に依存して細胞の増殖促進作用を示した。Periostin によるこれらの細胞株の増殖促進には integrin/p44/42 MAPK 経路が重要な役割を果たしていることが示された。悪性黒色腫の増殖における periostin の *in vivo* での機能を明らかにするため、Periostin 欠損マウスと RAG2 欠損マウスを掛け合わせることで、Periostin・RAG2 dKO マウスを作出した。Periostin・RAG2 dKO マウスと RAG2 KO マウスの皮下に Mewo 細胞株を移植し、腫瘍の増殖速度を調べた結果、RAG2 KO マウスと比較して Periostin・RAG2 dKO マウスでは腫瘍の増殖速度が低下していたことから、Periostin は *in vivo* でも腫瘍の増殖促進作用を示すことが明らかになった（論文投稿中）。以上の結果、*in vitro* 及び *in vivo* の解析により Periostin が悪性黒色腫において、細胞増殖促進作用を有することと悪性黒色腫の創薬標的となり得る事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Malignant melanoma is one of the most aggressive cancers, since this tumor metastasize to various organs and resistant to chemotherapy. By using quantitative proteomic approach, we have been identified that Periostin, one of the extracellular matrix proteins, was highly expressed in the melanoma tissue compared with normal skin tissue. This study was aimed to reveal the association between Periostin and malignant melanoma.

Recombinant Periostin protein treatment significantly accelerated the proliferation of melanoma cell lines (Mewo, G361 and VMRC-MELG). This growth promoting effect induced by Periostin treatment was dependent on the integrin/p44/42 MAPK signaling pathway *in vitro*. To reveal the role of Periostin to the growth of the malignant melanoma, Periostin/RAG2 double knockout mice were developed by mating Periostin deficient mice and RAG2 deficient mice. In Periostin knockout mice and Periostin/RAG2 double knockout mice, Mewo cells were subcutaneously implanted and tumor proliferation was analyzed. Compared with Periostin knockout mice, the tumor proliferation of Mewo was significantly delayed in Periostin/RAG2 double knockout mice, demonstrating that Periostin also induce proliferation of melanoma cells *in vivo*. These results suggest that Periostin induces proliferation of tumor cells *in vitro* and *in vivo* and Periostin would be a promising therapeutic target of malignant melanoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：癌、periostin

1. 研究開始当初の背景

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、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。

これまでに申請者は最新の高感度な定量的プロテオミクス手法(iTRAQ法)と質量分析計(ナノLC-MS/MS)を用いて、悪性黒色腫と表皮内黒色腫の間でのタンパク質発現差を解析した結果、Periostinが悪性黒色腫に高発現することを見出した。

Periostinは当初マウス骨芽細胞株において前骨芽細胞の細胞接着分子として同定された細胞外マトリックスタンパク質である(Takeshita et al, Biochem J 1993, Horiuchi et al, J Bone Miner Res 1999)。その後、Periostinが肺癌などさまざまな癌組織において発現していることが報告され、癌の増殖、浸潤、血管新生など様々な作用を示すことが報告されている(Shao et al, Mol Cell Biol 2004)。肝臓やリンパ節に転移した悪性黒色腫においてPeriostinが高発現していることがmRNAレベルで報告されているが(Tilman et al, Mol Cancer 2007)、Periostinが悪性黒色腫の増殖促進作用を示すか、あるいは原発巣から転移巣への転移・浸潤の過程においてどのように機能するか、また、その分泌源となる細胞も明らかにされていない。Periostinの分泌源が癌細胞と腫瘍組織の間質である繊維芽細胞のいずれであるかを明らかにするため、申請者はin vitroで悪性黒色腫細胞株(Mewo)と正常皮膚由来繊維芽細胞との共培養を行った結果、Mewoと繊維芽細胞の共培養上清中にPeriostinがタンパク質レベルで発現していることと、共培養後のMewoと繊維芽細胞を分離してPeriostinの発現をRT-PCR法にて解析した結果、繊維芽細胞

胞においてのみPeriostinの発現が認められることを明らかにした。このことは悪性黒色腫細胞から分泌される可溶性分子による刺激を繊維芽細胞が受け取る、あるいは繊維芽細胞が癌細胞と相互作用(接触)する事でPeriostinの発現が誘導される事が示唆される。Periostinは患者組織において、表皮内黒色腫では発現せず、悪性黒色腫に高発現することから、悪性黒色腫が繊維芽細胞に刺激を与えることでPeriostinの発現を誘導させ、そのPeriostinが悪性黒色腫の増殖や浸潤・転移の促進に関係している可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究では悪性黒色腫において腫瘍組織の間質に高発現を示すPeriostinについて癌の増殖との関係を明らかにすることを目的とした。さらに、悪性黒色腫転移マウスモデルにおいてPeriostinが治療標的となる事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖アッセイ

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。

(2) 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 μM) : PI3K inhibitor, U0126 (20 μM) : MEK inhibitor)で2時間インキュベートし、細胞を100 ng/mlのrecombinant Periostin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。

(3) 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。

(4) *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。1x10⁶ 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)

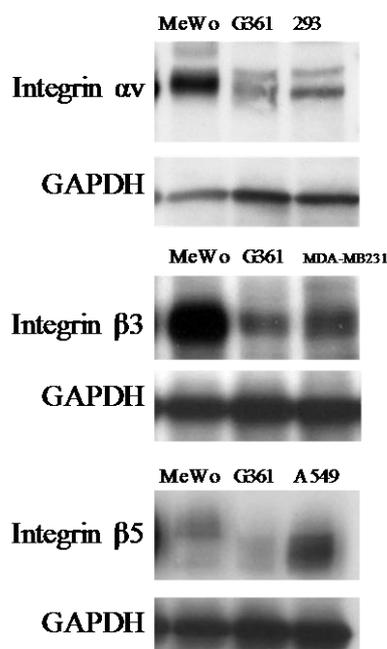
データは平均値+標準偏差で示した。統計解析は対応のない Student' s t-test あるいは Welch test を用いた。多重検定における群間の有意差検定は Fisher' s あるいは Dunnett' s 法を用いて計算した。P<0.05 の

時に有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫は Periostin 受容体である integrin α v β 3 と integrin α v β 5 を発現する integrin α v β 3、integrin α v β 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 α v β 3 と integrin α v β 5 の発現が確認された(図 1)。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(data not shown)。

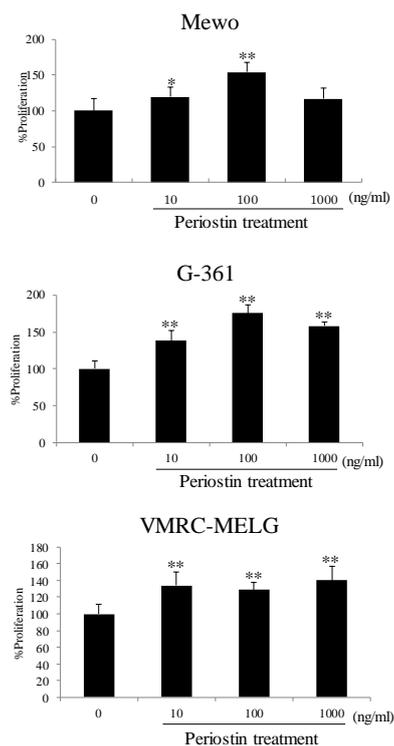
図 1



(2) 遺伝子組み換えヒト Periostin は悪性黒色腫の増殖を促進する

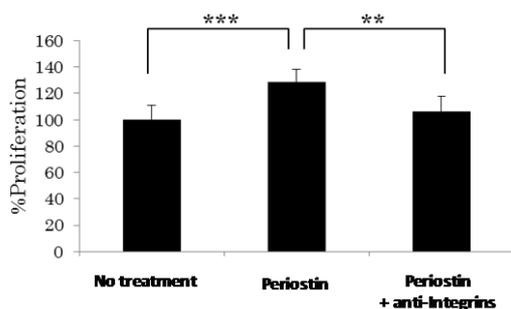
悪性黒色腫における Periostin の機能を解析するため、遺伝子組み換えヒト Periostin を用いて悪性黒色腫細胞株に対する増殖への影響を解析した。悪性黒色腫の増殖は遺伝子組み換えヒト Periostin を添加することでコントロール群よりも有意な増殖促進作用が認められた(図 2)。

図 2



悪性黒色腫細胞株である Mewo に対して、遺伝子組み換えヒト Periostin による増殖促進作用における integrin の関与を検討した。その結果、Periostin による Mewo 細胞の増殖は 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 3)。

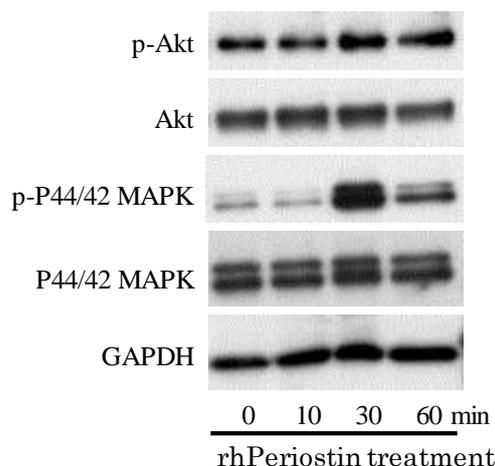
図 3



次に、Periostin による integrin を介した悪性黒色腫細胞株の増殖促進の機序について、下流のシグナル伝達経路の解明を試みた。悪性黒色腫細胞株である Mewo 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 p44/42MAPK (Thr202/Tyr204)

のリン酸化の増強が確認された(図 4)。

図 4



そこで、各種キナーゼ阻害剤を用いて、Periostin による細胞増殖促進と関与するシグナル伝達経路の解明を試みた。悪性黒色腫細胞における 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 (MEK 阻害剤) で抑制された(図 5-A, 5-B)。

図 5-A

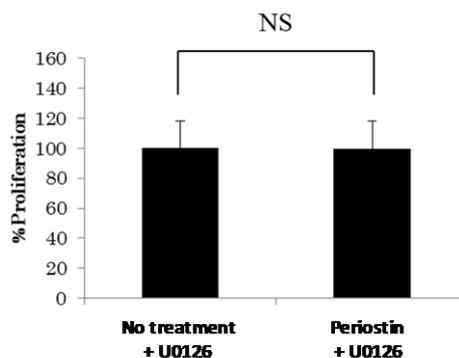
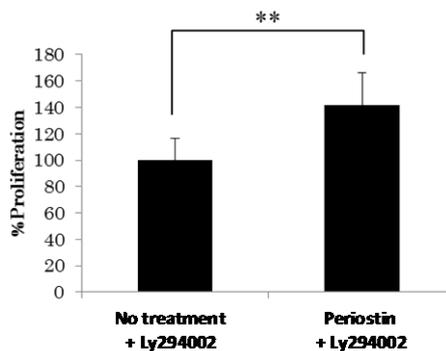


図 5-B

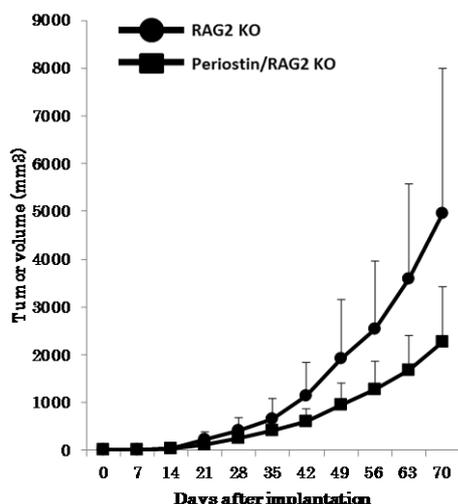


これらの結果、悪性黒色腫において Periostin は integrin/p44/42MAPK 経路を介して細胞増殖を促進することが示唆された。

(3) 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(各 N=17)。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 6)。

図 6

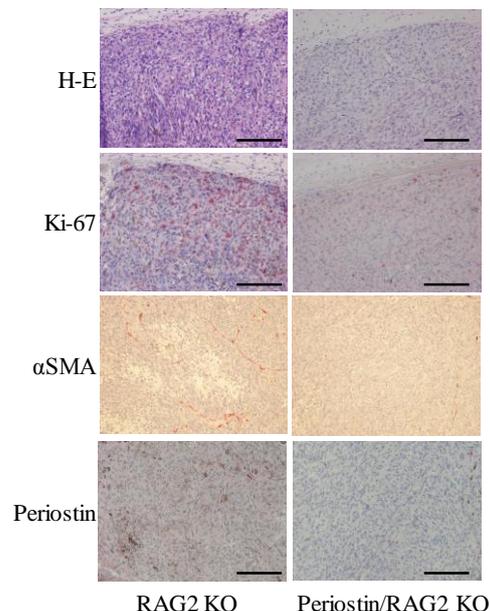


Periostin/Rag2 欠損マウス、およびコントロールとして Rag2 欠損マウスの皮下に移植した Mewo の腫瘍組織を摘出し、免疫組織化学染色法により Ki-67 の染色を行った。その結果、Ki-67 陽性細胞の数が Rag2 欠損マウスと比較して、Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて有意に少なかったことから、細胞周期レベルで増殖が抑制されていることが判明した(図 7)。また、筋線維芽細胞のマーカである α SMA の発現についても Periostin/Rag2 欠損マウスにおいて低下していることが認められた(図 7)。

これらの結果、*in vivo* における Periostin による悪性黒色腫の増殖促進効果には、腫瘍細胞に対する直接的な増殖促進作用に加え、筋線維芽細胞数を増やすことによっても腫瘍の増殖が促進されやすい環境の維持に関

係していることが示唆された。

図 7



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)

[雑誌論文] (計 11 件)

1) 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. 2012;7(7):e41994.

2) 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, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts Experimental Dermatology 2012 May;21(5):331-336.

3) 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. 2012
Mar;25(2):219-30.

4) Souma Y, Nishida T, **Serada S**, Iwahori K, Takahashi T, Fujimoto M, Ripley B, Nakajima K, Miyazaki Y, Mori M, Doki Y, Sawa Y, Naka T

Anti-proliferative effect of SOCS-1 through the suppression of STAT3 and p38 MAPK activation in gastric cancer cells. Int J Cancer. 2012 Sep 15;131(6):1287-96.

5) Haruta H, Ohguro N, Fujimoto M, Hohki S, Terabe F, **Serada S**, Nomura S, Nishida K, Kishimoto T, Naka T.

Blockade of Interleukin-6 Signaling Suppresses Not Only Th17 But Also Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein-Specific Th1 By Promoting Regulatory T cells In Experimental Autoimmune Uveoretinitis.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2011 52: 3264-71

6) **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. 2012;18(11):2169-79.

7) Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, Han Y, Ripley B, **Serada S**, Nishikawa T, Kimura A, Nomura S, Kishimoto T, Naka T.

The Influence of Excessive IL-6 Production In Vivo on the Development and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells.

J Immunol. 2011 Jan 1;186(1):32-40.

8) Iwahori K, **Serada S**, Fujimoto M, Nomura S, Osaki T, Chun Man Lee, Mizuguchi H, Takahashi T, Ripley B, Okumura M, Kawase I, Kishimoto T, Naka T

Overexpression of SOCS3 exhibits preclinical antitumor activity against malignant pleural mesothelioma

Int J Cancer. 2011 Aug 15;129(4):1005-17.

9) Terabe F, Fujimoto M, **Serada S**, Shinzaki S, Iijima H, Tsujii M, Hayashi N, Nomura S, Kawahata H, Myoung Ho Jang, Miyasaka M, Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T, Naka T
Comparative analysis of the effects of anti-IL-6 receptor mAb and anti-TNF mAb treatment on CD4+ T-cell responses in

murine colitis

Inflamm Bowel Dis. 2011
Feb;17(2):491-502.

10) Hohki S, Ohguro N, Haruta H, Nakai K, Terabe F, **Serada S**, Fujimoto M, Nomura S, Kawahata H, Kishimoto T, Naka T.

Blockade of Interleukin-6 Signaling Suppresses Experimental Autoimmune Uveoretinitis by the Inhibition of Inflammatory Th17 Responses.

Exp Eye Res. 2010 Aug;91(2):162-70.

11) **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 2010;69:770-774

[学会発表](計8件)

1)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) 米国(ワシントン)

Heterogeneous Nuclear RNP-K Is a Novel Cold-Related Autoantigen in Patients with Raynaud's Phenomenon.

Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Tetsuji Naka.

2)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(東京)

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
世良田聡, 高橋剛, 浦瀬真伊子, 藤本穰, 原田絵美, 西田俊朗, 仲哲治

3)103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, Illinois. Philadelphia (PA): AACR; 2012

Mon, Apr 2, 8:00 AM - 12:00 PM

1275/21 -米国(シカゴ)

Quantitative proteomic analysis of tumor growth associated proteins in cutaneous malignant melanoma

Short title: Proteomics of melanoma

Satoshi Serada, Yori-hisa Kotobuki, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama, Tetsuji Naka

4)第40回日本免疫学会総会 2011年11月27

日(日)～29日(火) 幕張メッセ(千葉市)
Leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) is
a novel biomarker for monitoring disease
activity in patients with Ulcerative
Colitis

Satoshi Serada, Minoru Fujimoto, Fumitaka
Terabe, Tetsuji Naka

5)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(京都市)

Periostin, a matricellular protein,
accelerates wound repair by activating
dermal fibroblasts

Yorihisa Kotobuki, Kanako Ontsuka,
Satoshi Serada, Hiroshi Shiraishi,
Atsushi Tanemura, Shoichiro Ohta, Lingli
Yang, Tetsuji Naka,
Kenji Izuhara, Ichiro Katayama

6)第9回 日本プロテオーム学会 2011年7
月28日(木)～29日(金)新潟市朱鷺メッ
セ2階(新潟市)

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

世良田聡, 横山拓平, 榎本隆之, 松崎慎哉,
森本晶子, 金雅子, 藤本穰, 木村正, 仲哲
治

7)ESMO Sat, October 9, 2010 イタリア
(ミラノ)

SOCS-1, -3 GENE DELIVERY IN GASTRIC CANCER
CELLS INDUCES A POTENT ANTI-PROLIFERATIVE
EFFECT VIA THE SUPPRESSION OF JAK/STAT AND
P38 MAPK SIGNALING PATHWAYS

S. Serada, Y. Souma, T. Nishida, M.
Fujimoto, T. Naka

ILaboratory For Immune Signal, National
Institute of Biomedical Innovation,
Ibaraki City (Osaka)/JAPAN, 2
Surgery, Osaka University, Suita/JAPAN, 3
Surgery, Osaka Police Hospital,
Osaka/JAPAN, 4 Laboratory For Immune
Signal, National Institute of Biomedical
Innovation, Ibaraki City (Osaka)/JAPAN

8)第8回 日本プロテオーム学会 2010年7
月26日(月)～27日(火)東京ベイホテル
東急(浦安市)

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

世良田聡, 藤本穰, 寺部文隆, 西川哲平, 仲
哲治

[図書] (計1件)

1)サイトカインシグナル伝達抑制分子

(SOCS)の新規抗癌剤としての応用

世良田聡, 仲哲治 医歯薬出版株式会社

医学のあゆみ, 234(5): 602-607, 2010.

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 創傷治癒剤

発明者: 寿 順久, 世良田 聡, 仲 哲治

権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興
財団

種類: 特許権

番号: 特願 2010-151139 号

出願年月日: 2010年7月1日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

世良田 聡 (SERADA SATOSHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤

研究部・研究員

研究者番号: 50463302