

学位論文

「Protein expression profile related to cisplatin resistance in bladder cancer cell lines detected by two-dimensional gel electrophoresis 」

(シスプラチン耐性膀胱癌細胞株における高発現タンパク質の詳細：2次元電気泳動による検索)

指導教授名 岩村 正嗣

申請者氏名 田岡 佳憲

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

<緒言>

膀胱癌は、泌尿器科学領域において 2 番目に多い悪性腫瘍である。筋層浸潤を有する進行性膀胱癌に対して、白金製剤をベースとした化学療法は有用な治療法の一つである。しかし遠隔転移を有する場合、完全寛解は 10% に満たないため、白金製剤を繰り返し使用することは臨床的に見受けられている。一方、白金製剤に対する耐性化や白金製剤を用いたレジメ以外の確立された治療法がないことが一大問題となっている。本研究では、シスプラチン耐性膀胱癌細胞株を作成し、親株とシスプラチン耐性株でのタンパク発現の差異について、プロテオーム解析を用いて比較検討を行った。

<方法>

膀胱癌細胞株 (T24) 培養液に、シスプラチンを混入させ、その注入濃度を徐々に上げ 40 μ M シスプラチン含有培養液でも生存できる膀胱癌細胞株 (T24CDDPR) を樹立した。アガロース 2 次元電気泳動法を用いて T24 と T24CDDPR のタンパク質の発現を比較した。ゲルに展開されたタンパク質を LC-MS/MS によって、差異が顕著な 25 個のタンパク質を同定した。同定されたタンパク質の性質や機能を調べ、さらに尿路上皮癌、膀胱癌、シスプラチンと関連する報告の少ない HNRNPA3、PCK2、PPL、PGK1、TKT、SERPINB2、GOT2 と EIF3A を選択した。これらのタンパク質の発現を様々な膀胱癌細胞株を用いて、ウェスタンブロット法により比較検討した。

<結果>

市販抗体を用いたウェスタンブロット解析で、T24CDDPR 細胞と T24 細胞を比較すると、HNRNPA3、PGK1、TK、SERPINB2 は T24CDDPR で 1.5 倍以上の発現増強を認めた。PCK2 と PPL は T24CDDPR 細胞で発現の減少を認めた。また、GOT2 と EIF3A は同程度の発現量であった。

さらに、増減の認めた 6 つのタンパク質の発現パターンを検証するために、様々な膀胱癌

細胞株でウェスタンブロット解析を行った。HNRNPA3、TKT、SERPINB2、PPLは、全ての膀胱癌細胞株で発現を認めた。PCK2は2種、PGK1に関してはT24のみの発現であった。

<結語>

プロテオーム解析により、シスプラチン耐性膀胱癌で25種のタンパク質において顕著な発現の差異を確認した。さらに、今まで膀胱癌やシスプラチン関連タンパク質として報告されていない8種のタンパク質をも同定した。これらのタンパク発現は今後、新規腫瘍マーカーの開発やシスプラチン耐性獲得機構の解明に寄与するものと考えられた。

目次

頁

1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 細胞株培養	3
2-2. 検体準備	3
2-3. アガロース 2 次元電気泳動と LC-MS/MS 分析による同定	4
2-4. タンパク質の選定	7
2-5. ウェスタンブロッティング	7
3. 結果	
3-1. シスプラチン関連タンパク質の同定	9
3-2. 多検体比較試験	9
4. 考察	11
5. 承認	15
6. 総括	15
7. 今後の課題	15
8. 謝辞	15
9. 引用文献	17
10. 業績目録	22

11. 図表27

1. 序論

膀胱癌は泌尿器科学領域における二番目に多い悪性腫瘍である。筋層浸潤性膀胱癌は、一般的に膀胱全摘除術の適応となるが、手術不能症例や遠隔転移をきたす場合、シスプラチンを中心とした化学療法が第一選択となる。シスプラチンは 1987 年 FDA (米国食品医薬品局) により認可されて以来、精巣癌や膀胱癌を含む様々な癌種に対する治療の主軸として用いられている[1]。膀胱癌に対してはメトトレキセート、ビンブラスチン、ドキソルビシン、シスプラチンから構成される MVAC 療法や、ゲムシタビン、シスプラチンから成る GC 療法が一次治療としての標準治療となっている[2]。しかし、進行性膀胱癌に対するシスプラチン含有化学療法の治療成績は、全生存期間 (OS) 中央値で約 14 ヶ月と報告されている [3]。また、治療成績向上のため、薬剤の追加、投与間隔の短縮、種々の薬剤の組合せなど様々な変更や修正が行われているが、現状では MVAC 療法や GC 療法を超える治療成績は報告されていない。さらに、シスプラチン含有化学療法に耐性を示した場合、二次療法として確立された方法も報告されていない[4-7]。

プロテオミクス解析による癌細胞の研究は、腫瘍マーカーの同定への有望な手法である。具体的にプロテオミクス解析は、癌組織と正常組織を用いて発現しているタンパク質の網羅的解析を行い、疾患特異的に増加・減少、機能変化を示すタンパク質の同定を可能した。膀胱癌においてもプロテオミクス解析が用いられ、現在まで様々な

腫瘍マーカー候補タンパク質が報告されている[8, 9]。一方で、体液中に存在する腫瘍マーカー検索では様々な問題点があげられる。血清中には、アルブミンや免疫グロブリンといった 22 種類の主要タンパク質が総タンパク質量の 99%を占めているため、疾患に関与するタンパク質を発見するためには、残り 1%に含まれる数千種類と考えられる微量なタンパク質を比較解析する必要がある。例えば、Carcinoembryonic antigen (CEA) や Prostate-specific antigen (PSA) などの微量タンパク質は血清 1 mL 中に数 ng しか存在しないことが知られている (図 1)。このような検体の問題点を考慮し、今回我々は膀胱癌細胞株に注目した。細胞株を使用することによって、個体差が少なく再現性を得られ易いため、臨床応用可能な腫瘍マーカーの同定や薬剤耐性に関する重要なタンパク質の検出に有用であると考えられた。探索方法として、当研究室で以前より行われている等電点電気泳動のためのアガロースゲルを使用した 2 次元電気泳動

(two-dimensional gel electrophoresis) 法を用いた。アガロース 2 次元電気泳動は、従来の 2 次元電気泳動より大量のタンパク質の分離、広範囲の分析が可能となることが報告されており[10]、当研究室では本法により、尿路上皮癌の新規腫瘍マーカー候補タンパク質を報告している [10-13]。本研究は、尿路上皮癌の腫瘍マーカー探索の一環として、シスプラチン耐性膀胱癌細胞株と親細胞株を使用し、タンパク質の発現様式を比較検討することによって、シスプラチン耐性に関連したタンパク質の同定を試みたものである。

2. 方法

2 - 1. 細胞株培養

ヒト膀胱癌細胞株 T24、RT4、5637、TCCSUP は American Type Culture Collection から購入した。EJ は、北里研究所病院（入江啓博士）から譲渡された。シスプラチン耐性細胞株（T24CDDPR）は、T24 細胞株に 13.3 μ M、26.6 μ M、40 μ M のシスプラチンを段階的に暴露することによって作成した[14]。RT4 に 50 μ g/ml ウリジンと 100g/mL ナトリウム・ピルビン酸に臭化エチジウムを加え培養する事でミトコンドリアDNA欠損膀胱癌細胞株である RT4p0 を作成した[15]。これらの細胞は、10%のウシ胎児血清（GIBCO BRL）、ペニシリン（100 μ g/mL）とストレプトマイシン（100 μ g/mL）を加えた RPMI1640 培地で 5%の CO₂、37°C に加湿されたインキュベーターで培養した。

2 - 2. 検体準備

膀胱癌細胞約 20mg をタンパク質抽出液（7M Urea、2M Thiourea、0.1M DTT、2.5% の Pharmalyte（pH 3-10）、2% CHAPS と Complete Mini EDTA 蛋白質分解酵素阻害薬（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）を加えたもの）で 30 倍に希釈し、Teflon glass homogenizer を使用して均質化した。その後、各々のホモジネートは 0.35-mm to 0.50-mm glass beads（ASONE Corporation, Osaka, Japan）に入れ攪拌し、その後 20 分間 112,000 \times g で遠心した。その上清を回収しアガロース 2 次元電気泳動に使用した。

2-3. アガロース 2次元電気泳動と LC-MS/MS 分析による同定

作成したタンパク質液を分離するために 2次元電気泳動法を使用した。D-ソルビトール 3.6 g、蒸留水 12.4 mL をビーカーに入れ、攪拌して D-ソルビトールを溶かした。続いて、Agarose IEF 0.3 g を加え電子レンジで加熱後、攪拌しアガロース IEF を完全に溶解した。さらに、尿素 9.0 g、チオ尿素 2.25 g を加え、常温になるまで冷却した。この溶液とファルマライト pH 3-10 を 10:1 で混ぜ、ガラス管（長さ 12 cm、内径 2 mm）の下端から長さ 7 cm の高さまでアガロース溶液を積み上げた。その上に上部液（4 M 尿素 / 1 M チオ尿素）10 μ l を加え、4°C で一晩静置しゲル化したものを一次元目の等電点電気泳動用アガロースゲルとした。

ゲル管から上部液を完全に取り除き、1次元目の等電点電気泳動用アガロースゲルにタンパク質抽出液をのせ、その上に上部液を加えた。等電点電気泳動は、4°C、定電圧 400 V で 15 時間行った。等電点電気泳動終了後のアガロースゲルをゲル管から取り出し、TCA 固定液（10% TCA / 5% スルホサリチル酸）に 5 分間浸した。次に、TCA 固定液を取り除き、蒸留水で 5 分間アガロースゲルを洗浄した。2次元目では、SDS-PAGE(DRC Co. Ltd., Tokyo, Japan) ゲル（幅 140 mm×高さ 80 mm×ゲル厚 1.0 mm、アクリルアミド濃度 12% or 6-10%）を用いた。今回の実験では、30kDa と 100kDa 間でのタンパク質分析のために 12%の SDS-PAGE ゲルを、50kDa 以上のタンパク質分

析のために 6%~10%の SDS-PAGE ゲルを使用し、タンパク質の解析を行った。

SDS-PAGE ではゲルの上端に洗浄したアガロースゲルを積み、1%アガロースでゲル間を密着させ固定した。このアガロースゲルの上に PAGE sample buffer を加え、定電圧 300 V で泳動した。アガロース 2次元電気泳動は T24 と T24CDDPR について各々3枚ずつ解析した。電気泳動終了後にゲルは、CBB (クーマシーブリリアントブルー) (R-350 (PhastGel Blue R; GE Healthcare, Little Chalfont, UK)で染色し、分離したタンパク質を可視化した。CS analyzer 2.0 (Atto, Tokyo, Japan) を使用して、T24 と T24CDDPR でタンパク質の発現量の相違を検索した。二次元電気泳動パターン上のタンパク質スポットを同定のためにゲル内消化しスポットのペプチド断片を得た。ゲルから CBB 染色したタンパク質スポットを切り出し、50 %アセトニトリル / 50 mM 重炭酸アンモニウムでゲル片を完全に脱色した。蒸留水でゲル片を洗浄後、100 %アセトニトリルで 15 分間脱水し、さらに Iwaki VEC-100 micro centrifugal vacuum concentrator (Asahi Techno Glass Co, Chiba, Japan) で 60 分間脱水した。乾燥したゲル片に、25 mM Tris-HCL (pH 9.0) に溶かした 0.5 ng/ml トリプシン (Sequence grade,Roche Diagnostic S) をゲル片が浸る程度加え、氷中で 45 分間静置した。その後、トリプシン溶液を除去した。50 mM Tris-HCL (pH9.0) をゲルが浸る程度加えて、37 °Cで 20 時間トリプシン消化を行った。トリプシン消化終了後、溶液を完全に回収し氷中で一次保存 (回収物 1) した。さらに、ゲル内に残っているペプチド断片を回収するために、5 %ギ酸 / 50 %アセトニトリルを

ゲル片が浸る程度加え、室温で 20 分攪拌し、溶液を回収した (回収物 2)。回収物 1 と回収物 2 を混ぜ合わせてタンパク質同定サンプルとした (図 2)。得られたペプチド断片を液体クロマトグラフィー・質量分析計 (液体クロマトグラフィー: Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan 日本; 質量分析計: LCQ-DECA, Thermo Fisher S, Germany) で分析した (図 3)。LC-MS 測定では、逆相 HPLC から溶出したペプチドは直接イオントラップ型質量分析計に導入し、ペプチドの MS スペクトルとタンデム MS スペクトル (MS/MS スペクトル) の測定を行った。

各々のタンパク質を特定するために、測定した MS スペクトルをタンパク質同定用プログラム (SEQUENT SEARCH: Thermo Fisher Scientific) を用いてデータベース検索を行った。タンパク質配列データベースは、<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/> からダウンロードした。本プログラムは、測定で得た MS スペクトル、MS/MS スペクトルとデータベース上で各タンパク質を理論的に酵素消化した MS スペクトル、MS/MS スペクトルを比較することが可能である。その結果、一致度合いの高いタンパク質を選び出し、可能性に応じて評点 (Score) を付けた。選出方法は、(1) タンパク質の Score が 50 以上 (2) 最低 2 つのペプチド断片を観測できる事を確認し、同定されていると判断した。また、一つのスポットか 2 条件を揃っているタンパク質が複数個認められた場合は、汎用性のあるタンパク質を同定されたものとした。分子量はアミノ酸配列から算出された。登録番号は、UniProt web page (<http://www.uniprot.org/>) から得た。

2-4. タンパク質の選定

まず、タンパク質分析の領域で広く検討されているミオシンやサイトケラチンを除外した。尿路上皮癌関連タンパク質を選択するため、明らかに 2-DE で増減を認めたタンパク質を選択し、PubMed で 2015 年 2 月までに報告された論文で、タンパク質名と「膀胱癌」、「尿路上皮癌」、「シスプラチン」をキーワードに検索した。タンパク質名が「膀胱癌」、「尿路上皮癌」と関連する論文数が 10 本以下、「シスプラチン」と関連する論文数が 5 本以下であることを条件とし、8 つのタンパク質を選択した。

2-5. ウェスタンブロッティング

細胞株を sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.1 M DTT, 10% glycerol, 2% SDS, and 0.1% bromophenol blue) 溶液内に入れ、Teflon glass homogenizer でホモジナイズした。SDS-PAGE (Perfect NT Gel W, 10–20% acrylamide, 28 wells; DRC Co. Ltd., Tokyo, Japan) でタンパク質を分離した。ブロッティング装置 (日本エイドー株式会社) を用いて SDS-PAGE によって分離したタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon Transfer Membranes, GE Healthcare: PORE SIZE 0.45 μm) に転写した。転写後の PVDF 膜を TBS buffer で 5 分間洗浄し、0.5% Casein で 30 分間ブロッキングを行った。TBS buffer で 3 回洗浄し、一次抗体と 1 時間反応させた。抗体と希釈倍率は anti-phosphoenolpyruvate

carboxykinase (PCK2)は 100 倍希釈 (Abgent, San Diego, CA, USA)、anti-heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (HNRNPA3)は 200 倍希釈 (Abcam, Cambridge, UK)、anti-glutamate oxaloacetate transaminase 2 (GOT2)は 1000 倍希釈 (Abnova, Taipei City, Taiwan)、anti-phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)は 200 倍希釈 (Abgent, San Diego, CA, USA)、anti-transketolase (TKT)は 100 倍希釈 (Abcam)、anti-plasminogen activator inhibitor 2 (SERPINB2)は 1000 倍希釈 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)、anti-eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A (EIF3A)は 5000 倍希釈(Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA)、anti-periplakin (PPL)は 1000 倍希釈 (Novus Biologicals)であった。1 次抗体と反応後、TBS-T buffer で 5 分間洗浄を 3 回繰り返した後、2 次抗体と 30 分間反応させた。2 次抗体は 2% normal swine serum/TBS 10,000 倍希釈した Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG(Dako, Glostrup, Denmark)を使用した。コントロールとして、ウサギ抗 β アクチン・モノクローナル抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を使用した。2 次抗体との反応後、メンブレンは TBS-T buffer で 5 分間洗浄を 3 回繰り返し、TBS buffer で 3 回洗浄した後、化学発光試薬 (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, MILLIPORE,MA,USA) を 1 ml 加え、1 分間反応させた。検出器 (LAS-3000 mini, 富士写真フイルム株式会社) 用いて、タンパク発現を確認した。表 1 ではウエスタンブロッティングに使用した buffer 組成を示す。

3. 結果

3-1. シスプラチン関連タンパク質の同定

T24 と T24CDDPR 細胞における 2 次元電気泳動でのタンパク質発現パターンを示す (図 4)。両細胞株の 2 次元電気泳動でのタンパク質発現を比較して、6%~10%ゲルにおいては 10 スポット、12%ゲルにおいては 20 スポット、計 30 スポットのタンパク質を選択した。T24 と比較して T24CDDPR で、8 スポットの増加、22 スポットの減少を認めた (表 2)。30 スポットのうち 5 つ重複がみられ、最終的に 25 タンパク質を同定した。

T24 と T24CDDPR の比較で検出した 25 タンパク質は機能別に分けると細胞骨格タンパク質 7 種 (SpotNo.8 (24)、9(25)、10(28)、12、13、26、27)、酵素モジュレーター 5 種 (Spot No.16、17、18、22、23)、トランスフェラーゼ 4 種 (Spot No.3、4、11(29)、15)、核酸-結合タンパク質 2 種 (Spot No 2、14)、輸送タンパク質 2 種 (Spot No7、20)、酸化還元酵素 1 種 (Spot No.1)、タンパク合成因子 1 種 (Spot No.5)、リアーゼ 1 種 Spot No.6)、凝固因子 1 種 (Spot No.19 (30))、翻訳因子 1 種 (Spot No.21) であった。25 タンパク質のうちウエスタンブロット法による検証には、発現量や文献検索により、HNRNPA3、PCK2、PPL、PGK1、TKT、SERPINB2、GOT2、EIF3A を選択した。

3-2. 多検体比較試験

T24細胞、T24CDDPR細胞における8タンパク質の発現を検証するため、ウェスタンブロット法による分析を行った。代表的な結果を図5に示した。

T24CDDPRでT24と比較して、HNRNPA3、PGK1、TK、SERPINB2で1.5倍以上の発現増加を認めた。PCK2とPPLは20%未満の発現減少を認めた。また、GOT2とEIF3Aは同程度の発現量であった。次に、増減のあった6タンパク質の発現パターンを検証するために、様々な膀胱癌細胞株を用いてウェスタンブロット法を行った（図6）。HNRNPA3、TKT、SERPINB2、PPLは全ての膀胱癌細胞株で発現を認めた。PCK2は、2種の細胞株で発現しなかった。PGK1は、T24やT24CDDPR以外の膀胱癌細胞株において、微量発現もしくは発現を認めなかった。シスプラチンを3つの異なる濃度で培養したT24CDDPR細胞に対して、4タンパク質の発現濃度を調査した（図7）。HNRNPA3とPGK1は、シスプラチン濃度の上昇に関係なく強発現した。PCK2とPPLは、シスプラチン濃度の上昇に反比例し発現量の減少を示した。

4. 考察

プロテオミクス解析は、組織や細胞内のタンパク質を網羅的に解析する方法であり、主にタンパク質の発現や翻訳後修飾を解析するポストゲノム研究の中心的存在である。細胞が環境変化に遭遇した場合、適応するために必要に応じたタンパク質を産生することで対応していると考えられ、タンパク質の検出は、細胞が特定の機能を発揮するために特異的なタンパク質を生産することに焦点が当てられている。種々の環境下で、状況に応じて産生されるタンパク質は、臓器や疾患に特異的な合成とも考えられ、腫瘍マーカーとして有用な候補である可能性が考えられる。

有用な腫瘍マーカーが臨床応用されていない膀胱癌領域で、多くのプロテオミクス解析が行われている。その一環として、化学療法耐性に関する報告が散見される。三浦らは 5 μ M のシスプラチン暴露下における膀胱癌細胞株 HT1376 において、親株との比較で 36 タンパク質を特定した[16]。シスプラチンに暴露された膀胱癌細胞では 21 タンパク質は発現増加を認め、15 タンパク質は発現低下を認めたとしている。特に adseverin (SCIN) (カルシウム依存性のアクチン結合蛋白) の発現は、4 倍に増加すると報告している。Meng らは、1.0mg/L のアドリアマイシン暴露下の pumc91 膀胱癌細胞株で、30 の増減するタンパク質 (19 は増加、11 は減少) を特定した[17]。その中で、カルシウム依存性のリン脂質-結合蛋白質であるアネキシン A2 (ANXA2)、非リボソームの核小体のリン蛋白である nucleophosmin (NPM1) が親株と比較してアドリ

アマイシン耐性細胞株で著名に増加していることを報告している。

本研究において、25 タンパク質の同定に成功した。これらのタンパク質は、主に細胞骨格と酵素修飾因子に関係していた。これらのタンパク質には、抗癌剤抵抗性と関連するタンパク質の可能性を、過去の報告でも確認することができた [16, 17]。一方、新たにシスプラチン耐性に対する腫瘍マーカー候補も見つかった。我々の知り得る限りでは、HNRNPA3、PCK2 と膀胱癌、尿路上皮癌との関連性を示した報告はなく、乳がんやシスプラチンに関連する報告が一報ずつあるのみであった。これらのタンパク質がシスプラチンの治療効果に関係するか否かは今後の検証が必要であるが、治療後に変化するタンパク質と臨床情報を分析することで、治療方針の決定や分子標的薬の開発の一助になる可能性が考えられた。

今回同定されたタンパク質で特に報告の少なかった 2 つのタンパク質について文献的考察を行った。HNRNPs は 20 種以上の報告がなされており、分子量として 32 kDa から 110kDa まで HNRNPA1 から HNRNPU が報告されている。HNRNPs は RNA 結合蛋白質 (RBP) であり、mRNA 代謝に重要な役割を担っている。また、テロメアの生合成や細胞情報伝達のような様々な細胞プロセスおよび細胞増殖と密接に関連している [5,19,20]。本研究で検出された HNRNPA3 は、膀胱癌細胞がシスプラチンへ高濃度暴露することで高発現し、細胞の生物学的活性をより高めている可能性を示唆していると考えられた。

PCK 活性 (ホスホエノールピルビン酸をオキサロ酢酸エステルへ転換作用) は PCK1 と PCK2 の 2 つのアイソザイムより構成されている [21]。特に細胞へのストレス暴露下では、PCK2 は細胞生長と生存維持に対して重要な役割を果たすことが報告されている。Park らは 5-fluouracyl (5-FU) を用いた化学放射線療法の反応と、PCK2 発現の関連性を検討した [22]。大腸癌細胞株において、PCK2 発現の低下が 5-FU への抵抗性を強める可能性を報告している。本研究では、シスプラチン耐性膀胱癌細胞株での PCK2 の発現の低下を見出した。PCK2 の発現低下は低代謝を促し、低エネルギーでの細胞生育を助長し、結果として化学療法の感受性を低下させている可能性が考えられた [23, 24]。

シスプラチン耐性は多因子、多段階、多経路であるとされるため、克服は容易ではない [1]。本研究において各タンパク質が、シスプラチン濃度により異なる発現量を呈することを示した。例えば、細胞運動および接着に関係するタンパク質である PPL [7] は、シスプラチン濃度の段階ごとに発現量の減少を示した。一方で、HNRNPA3 は常に増加傾向を示していた。このようにシスプラチン暴露濃度により、タンパク質発現の多様性を認めるため、シスプラチン耐性を克服するためには、一つの機序を阻害するだけでは困難である事を示しているのかもしれない。

一方、本研究において、新規腫瘍マーカー候補およびシスプラチン耐性関連タンパク質が 25 種同定された。今回の結果は、進行膀胱癌の治療戦略を確立する一環で重要な一助になると考えられる。しかし、検出された全てのタンパク質が、膀胱癌特異的

やシスプラチン耐性に関連するとは言い切れない。追加研究により、検出されたタンパク質の真の役割を今後解明していきたいと考えている。

5. 承認

本研究は、日本学術振興会から科学研究費 C (15K10607) によってサポートされた。

6. 総括

膀胱癌細胞株を使用したプロテオミクス解析で、膀胱癌およびシスプラチン耐性に関わるタンパク質を同定した。その中にはシスプラチン関連タンパク質としては報告のされていない新規タンパク質も含まれていた。今後、進行性膀胱癌のシスプラチン耐性に関する新規腫瘍マーカーの発見につながる可能性が見出された。

7. 今後の課題

他の癌腫での発現を検討し、膀胱癌に特異的タンパク質であるのか、シスプラチン耐性特有のタンパク質であるのか検討する。化学療法施行前後の臨床検体を用いて、予後や治療効果との相関関係を検討する。シスプラチン耐性関連タンパク質 25 種類について手術検体を用いた免疫染色を行い、発現強度や発現分布と臨床病理学的因子の検討を行い、腫瘍マーカーとしての側面を検討する。

8. 謝辞

本研究にあたり、総括的なご指導及び、貴重なご助言を数多く頂きました北里大学

泌尿器科学岩村正嗣教授に謹んで謝意を捧げます。全て実験過程において、直接ご指導及び、数多くの議論をして頂きました同研究室の松本和将先生に深く感謝いたします。プロテオミクスの初歩から直接御指導して下さいました北里大学理学部生体分子動力学研究室、小寺義男先生に深く感謝いたします。

本研究にご協力いただきました、北里大学医学部泌尿器科学講座の皆様、北里大学理学部物理学科生体分子動力学講座の皆様にご心より御礼申し上げます。

9. 引用文献

1. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M and Kroemer G Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869-1883. 2012
2. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM and Conte PF Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol* **18**, 3068-3077. 2000
3. Saxman SB, Propert KJ, Einhorn LH, Crawford ED, Tannock I, Raghavan D, Loehrer PJ, Sr. and Trump D Long-term follow-up of a phase III intergroup study of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Clin Oncol* **15**, 2564-2569. 1997
4. Ikeda M, Matsumoto K, Tabata K, Minamida S, Fujita T, Satoh T, Iwamura M and Baba S Combination of gemcitabine and paclitaxel is a favorable option for patients with advanced or metastatic urothelial carcinoma previously treated with cisplatin-based chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol* **41**, 1214-1220. 2011

5. Krecic AM and Swanson MS hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 363-371. 1999
6. Matsumoto K, Ikeda M, Sato Y, Kuruma H, Kamata Y, Nishimori T, Tomonaga T, Nomura F, Egawa S and Iwamura M Loss of periplakin expression is associated with pathological stage and cancer-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Biomed Res* **35**, 201-206. 2014
7. Matsumoto K, Mochizuki K, Hirayama T, Ikeda M, Nishi M, Tabata K, Okazaki M, Fujita T, Taoka Y and Iwamura M Gemcitabine plus nedaplatin as salvage therapy is a favorable option for patients with progressive metastatic urothelial carcinoma after two lines of chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* **16**, 2483-2487. 2015
8. Gnarr JR, Lerman MI, Zbar B, Linehan WM. Genetics of renal-cell carcinoma and evidence for a critical role for von Hippel-Lindau in renal tumorigenesis. *Semin Oncol*;22:3-8. 1995
9. Kawashima Y, Fukuno T, Satoh M, Takahashi H, Matsui T, Tadakazu M, et al. A simple and highly reproducible method for discovering potential disease markers in low abundance serum proteins. *J Electrophoresis* 53:13-8.2009
10. Okusa H, Koder Y, Oh-ishi M, Minamida S, Tsuchida M, Kavvoussi PK, Matsumoto K, Satoh T, Iwamura M, Maeda T and Baba S Searching for new biomarkers of bladder

- cancer based on proteomics analysis. *J Electrophoresis* **52**, 19-24. 2008
11. Minami S, Nagashio R, Ueda J, Matsumoto K, Goshima N, Hattori M, Hachimura K, Iwamura M and Sato Y Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. *Biomed Res* **35**, 25-35. 2014
 12. Tabata K, Matsumoto K, Minami S, Ishii D, Nishi M, Fujita T, Saegusa M, Sato Y and Iwamura M Nestin is an independent predictor of cancer-specific survival after radical cystectomy in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *PLoS One* **9**, e91548. 2014
 13. Tsumura H, Matsumoto K, Ikeda M, Yanagita K, Hirano S, Hagiwara M, Nagashio R, Fujita T, Sato Y and Iwamura M High expression level of preoperative serum uroplakin III is associated with biologically aggressive bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* **16**, 1539-1543. 2015
 14. Misawa T, Kikkawa F, Maeda O, Obata NH, Higashide K, Suganuma N and Tomoda Y Establishment and characterization of acquired resistance to platinum anticancer drugs in human ovarian carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* **86**, 88-94. 1995
 15. Cook CC, Kim A, Terao S, Gotoh A and Higuchi M Consumption of oxygen: a mitochondrial-generated progression signal of advanced cancer. *Cell Death Dis* **3**, e258.

2012

16. Miura N, Takemori N, Kikugawa T, Tanji N, Higashiyama S and Yokoyama M Adseverin: a novel cisplatin-resistant marker in the human bladder cancer cell line HT1376 identified by quantitative proteomic analysis. *Mol Oncol* **6**, 311-322. 2012
17. Meng Q, Lei T, Zhang M, Zhao J, Zhao XH and Zhang M Identification of proteins differentially expressed in adriamycin-resistant (pumc-91/ADM) and parental (pumc-91) human bladder cancer cell lines by proteome analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* **139**, 509-519. 2013
18. Smith L, Welham KJ, Watson MB, Drew PJ, Lind MJ and Cawkwell L The proteomic analysis of cisplatin resistance in breast cancer cells. *Oncol Res* **16**, 497-506. 2007
19. Dreyfuss G, Kim VN and Kataoka N Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 195-205. 2002
20. He Y, Brown MA, Rothnagel JA, Saunders NA and Smith R Roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A and B in cell proliferation. *J Cell Sci* **118**, 3173-3183. 2005
21. Mendez-Lucas A, Hyrossova P, Novellasdemunt L, Vinals F and Perales JC Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *J Biol Chem* **289**, 22090-22102. 2014

22. Park JW, Kim SC, Kim WK, Hong JP, Kim KH, Yeo HY, Lee JY, Kim MS, Kim JH, Yang SY, Kim DY, Oh JH, Cho JY and Yoo BC Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase linked to chemoradiation susceptibility of human colon cancer cells. *BMC Cancer* **14**, 160. 2014
23. Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS, Lim SJ and Park JG Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* **65**, 3162-3170. 2005
24. Yoo BC, Ku JL, Hong SH, Shin YK, Park SY, Kim HK and Park JG Decreased pyruvate kinase M2 activity linked to cisplatin resistance in human gastric carcinoma cell lines. *Int J Cancer* **108**, 532-539. 2004

10. 業績目録

(I) 原 著

1. (主学術論文 (英文原著))

Yoshinori Taoka, Kazumasa Matsumoto, Kazuya Ohashi ,Satoru Minamida , Masahiro Hagiwara, Shoji Nagi , Tatsuya Saito ,Yoshio Koderu , Masatsugu Iwamura .:Protein expression profile related to cisplatin resistance in bladder cancer cell lines detected by two-dimensional gel electrophoresis. Biomed Res.:36(4):253-261. 2015

2. Kazumasa Matsumoto,Kohei Mochizuki,Takahiro Hirayama, Masaomi Ikeda,Morihiro Nishi,Ken-ichi Tabata ,Miyoko Okazaki, Tetsuo Fujita, Yoshinori Taoka, Masatsugu Iwamura .:Gemcitabine plus nedaplatin as salvage therapy is a favorable option for patients with progressive metastatic urothelial carcinoma after two lines of chemotherapy.: Asian Pac J Cancer Prev.;16(6):2483-2487. 2015.

3. Satoru Minamida, Yoshinori Taoka, Takefumi Satoh, Syoji Nagi, Syuhei Hirano, Masahiro Hagiwara, Teruaki Ao, and Masatsugu Iwamura. : Clinical Utility of Stool Culture in Targeting Antibiotic Prophylaxis for Transrectal Ultrasonography-Guided Prostate Biopsy. : Jacobs Journal of Nephrology and Urology 03-06-2015

(Submitted: 03-06-2015 Accepted: 04-14-2015 Published: 04-20-2015) ▶2 (1) : ▶014,

2015

4. 平山 貴博, 田岡 佳憲, 須藤 利雄, 青 輝昭, 梶谷 雅春.: 長期留置型血液透析カテーテル(テシオカテーテル)の有用性と問題点: 埼玉県医学会雑誌 41 巻 5 号 Page416-418, 2007.
5. 平山 貴博, 田岡 佳憲, 須藤 利雄, 青 輝昭.: 根治的膀胱全摘除術が施行された高齢患者についての臨床的検討: 臨床泌尿器科)61 巻 3 号 Page243-247, 2007
6. 平山 貴博, 吉田 一成, 土田 繭美, 石井 大輔, 田畑 健一, 田岡 佳憲.: 【アクセス 2006】 上腕の深部静脈を表在化した動静脈内シャント術の検討: 61 巻別冊 アクセス 2006Page38-40, 2006
7. 岩波 直美, 中村 信也, 越野 浩江, 守屋 俊介, 石井 正浩, 土田 繭美, 田岡 佳憲, 荒川 孝, 吉田 一成, 馬場 志郎, 遠藤 忠雄.: 腎移植後 3 ヶ月目, 膀胱尿管吻合部に結石を生じ経尿道的尿管破碎術(TUL)を施行した男児症例: 日本小児腎不全学会雑誌 25 巻 Page60-62, 2005
8. 兵藤 透, 吉田 一成, 藤城 貴教, 車 英俊, 田岡 佳憲, 志村 哲, 竹川 勝治, 渡辺 京子, 山本 スミ子, 竹村 徹, 平良 隆保, 千葉 哲男, 内田 豊昭, 遠藤 忠雄, 酒井 糾, 日台 英雄, 馬場 志郎.: 外来維持血液透析患者に対するインフルエンザワクチン接種の回数別の抗体価及び臨床症状に対する効果 SARS 流行に備えたインフルエンザワクチン接種の必要性について: 日本透析医学会雑誌 36 巻 12 号 Page1719-1723, 2003

9、兵藤 透，杉本 美貴，具志堅 夏子，竹村 徹，平良 隆保，千葉 哲男，酒井 糾，
車 英俊，田岡-佳憲，遠藤 忠雄，吉田 一成，内田 豊昭，日台 英雄，馬場 志
郎．：維持血液透析糖尿病患者における至適 HbA1c 値の検討：既知の非腎不全例で
の報告のエビデンスと血液透析症例での HbA1c 値とグリコアルブミン値の相関か
らの推定：泌尿器外科 16 巻 8 号 Page873-877，2003

(II) 著 書

なし

(III) 総説・講座

1. 吉田 一成，田岡 佳憲，齊藤 毅，岩村 正嗣，馬場 志郎，遠藤 忠雄．：レシピア
ントの Marginal 症例の腎移植 あなたならどうする？ 長期透析患者への腎移植
その問題点と解決方法：泌尿器外科 17 巻臨増 Page523-528，2004
2. 吉田 一成，ウッドハムス 玲子，藤田 哲史，田岡 佳憲，松永 敬二，宇治橋 善
勝，秦 博文，遠藤 忠雄，馬場 志郎．：【シャントの諸問題】 血液透析動静脈シ
ャントのトラブル評価法 DUS,DSA,MRA,3DCTA の比較(解説/特集)：腎移
植・血管外科 15 巻 2 号 Page119-132，2004

(IV) 症例・臨床治験・その他

1. Hitoshi Yamazaki, Teppei Ohyama, Toshiki Tsuboi, Yoshinori Taoka, Dai Kohguchi ,
Hiroyoshi Iguchi, Teruaki Ao. : Prostatic stromal sarcoma with neuroectodermal

differentiation.: DiagnPathol.7;7:173.doi:10.1186/1746-1596-7-173.2012 (Received:

13 September 2012 Accepted: 14 October 2012Published: 7 December 2012)

2. 牧野 武志, 長場 泰, 田岡 佳憲, 島田 肇, 吉田 一成, 鎌田 貢壽.:再燃性 MRSA 腹膜炎を発症した PD 歴 20 年の患者の 1 例 : 腎と透析 73 巻別冊 腹膜透析 2012 Page197-198, 2012
3. 長場 泰, 牧野 武志, 田岡 佳憲, 島田 肇, 吉田 一成, 鎌田 貢壽.:腹膜透析後 腎移植を行い、透析再導入時に尿膜管癌を認めた 1 例 : 腎と透析 73 巻別冊 腹膜透析 2012 Page380-381, 2012
4. 別所 英治, 前山 良太, 田岡 佳憲, 青 輝昭, 本告 匡. : 高 IgG4 血症を認めた 限局性後腹膜線維症 : 臨床泌尿器科, 64, 337-340, 2010
5. 平山 貴博, 田岡 佳憲, 須藤 利雄, 村本 将俊, 荒川 孝, 青 輝昭. : 根治的前 立腺術術後の残存クリップによる膀胱結石の 1 例 : 泌尿器外科 (0914-6180)20 巻 3 号 Page287-289, 2007
6. 平山 貴博, 田岡 佳憲, 須藤 利雄, 青 輝昭. : 閉経後にみられた陰唇癒着症 : 臨床泌尿器科 (0385-2393)61 巻 10 号 Page839-841, 2007
7. Daisuke Ishii, Akira Irie ,Kazumasa Matsumoto, Takanori Tojo , Yoshinori Taoka, Masatsugu Iwamura ,Kazunari Yoshida , Shiro Baba.:Laparoscopic radical cystectomy and bilateral ureteric ligation for muscle-invasive bladder cancer in a patient on

hemodialysis.: Int J Urol. 1;13(7):1009-11, 2006

11. 図表

図 1

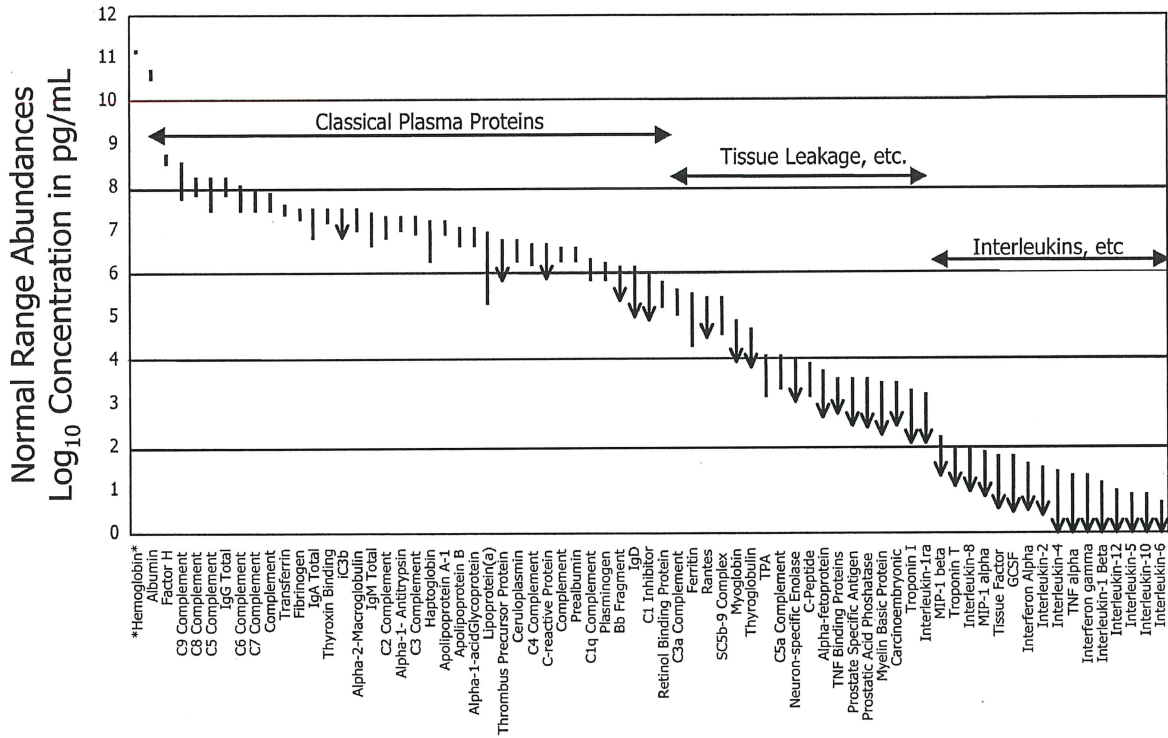


図 1 血清中に存在するタンパク質の濃度

横軸は代表的なタンパク質名、縦軸は血清中の濃度を示している。

(Anderson, N.L, Mol. Cell. Proteomics 2002; 845-867.)

図2 ゲル内消化のプロトコール

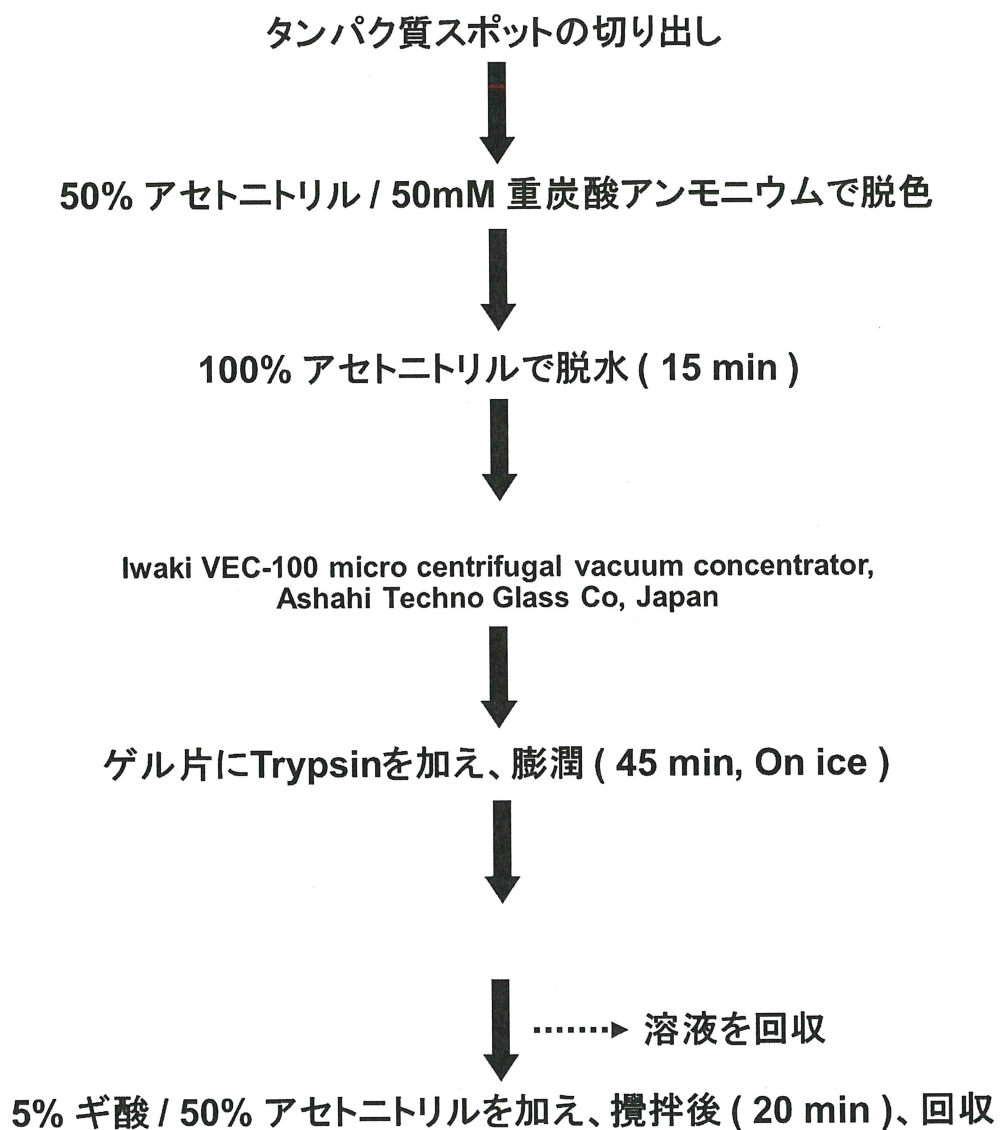
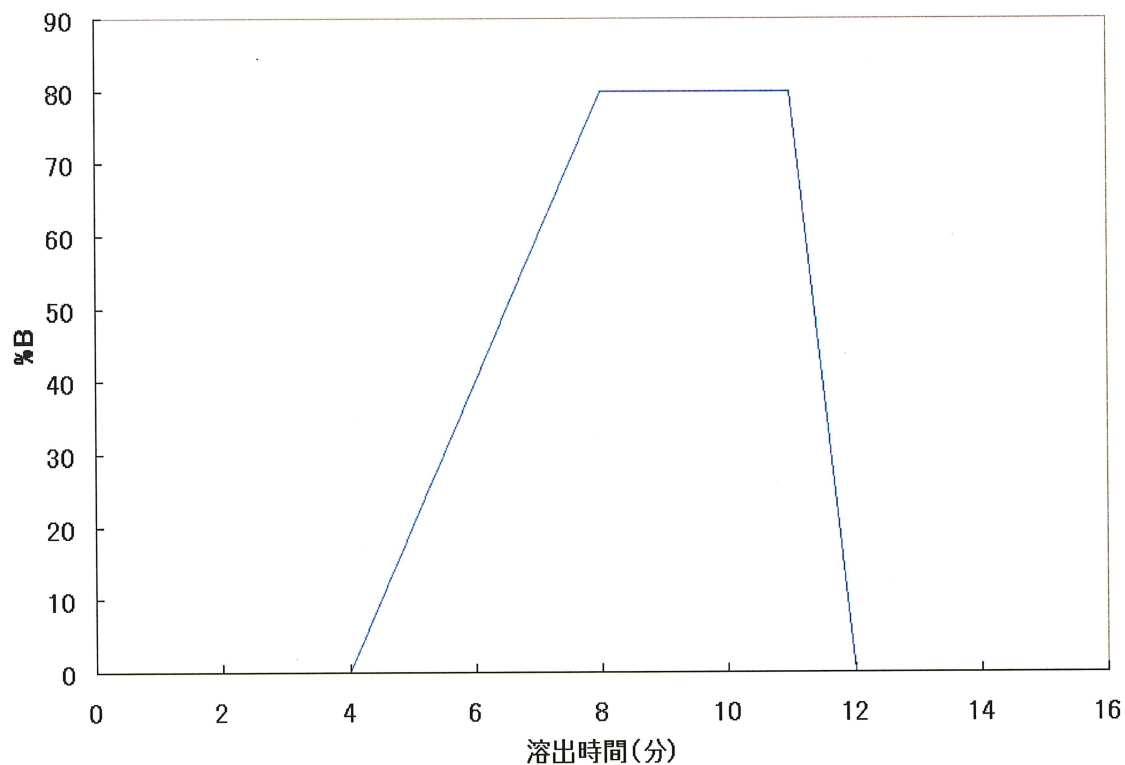


図3 液体クロマトグラフィーの分析条件



装置 : Nanospace SI-2 (資生堂 , Japan)

カラム : Cartridge Guard column E Inertsil WP300 C8

(10X1.0mmID , Cat No.5020-08517 , ジーエルサイエンス , Japan)

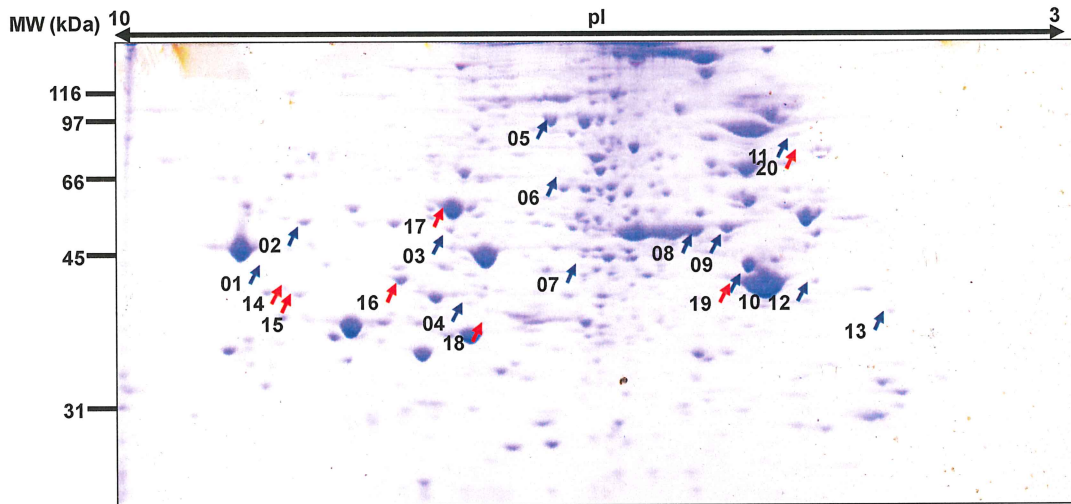
A 液 : 0.05% FA / 99.95% H₂O

B 液 : 90% アセトニトリル / 0.05% FA / 9.95% H₂O

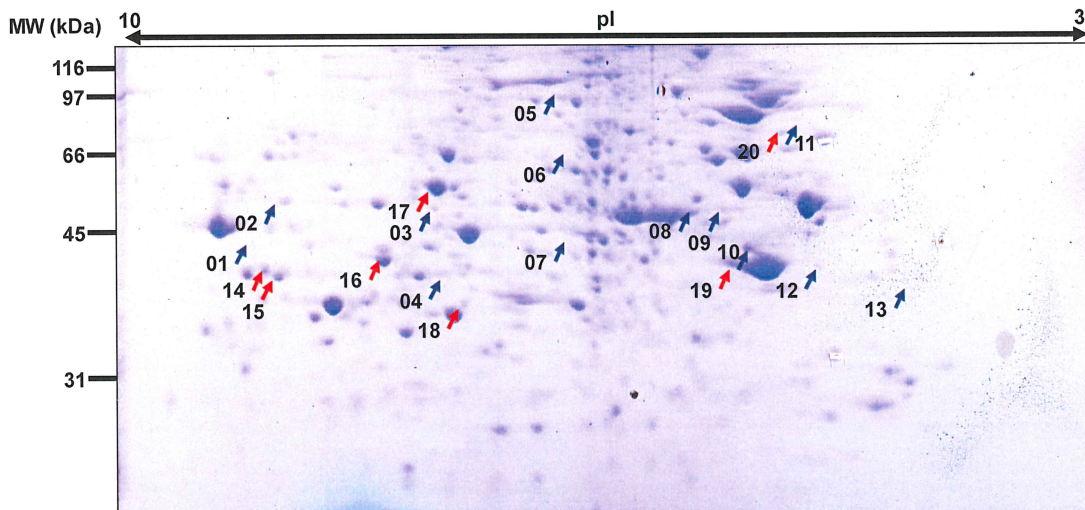
流速 : 200 μL / min

図 4.

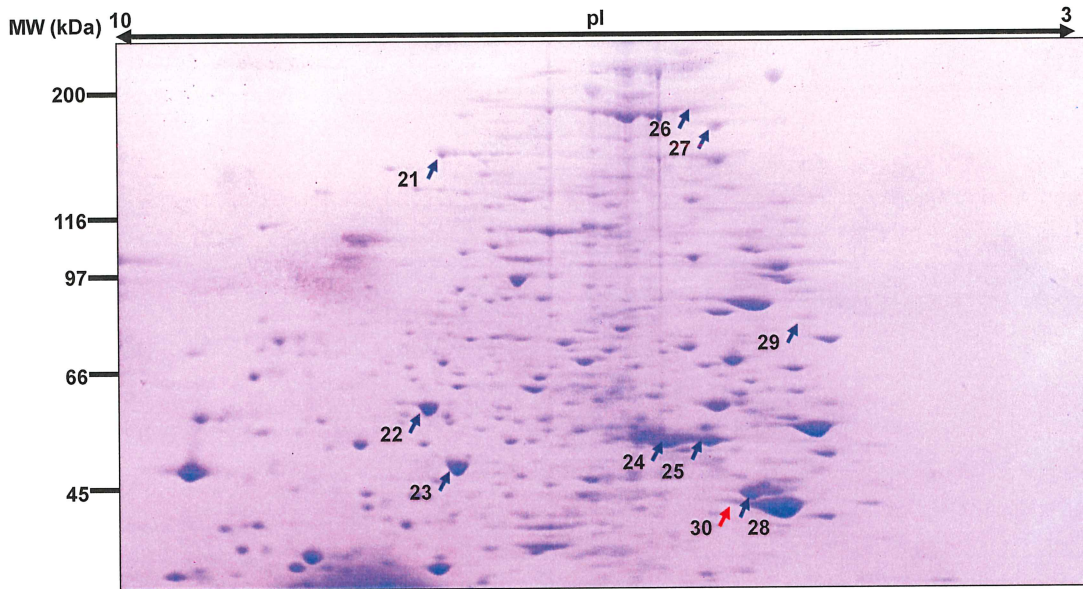
A : 12%ゲル T24



B : 12%ゲル T24CDDPR



C : 6~10%ゲル T24



D : 6~10%ゲル T24

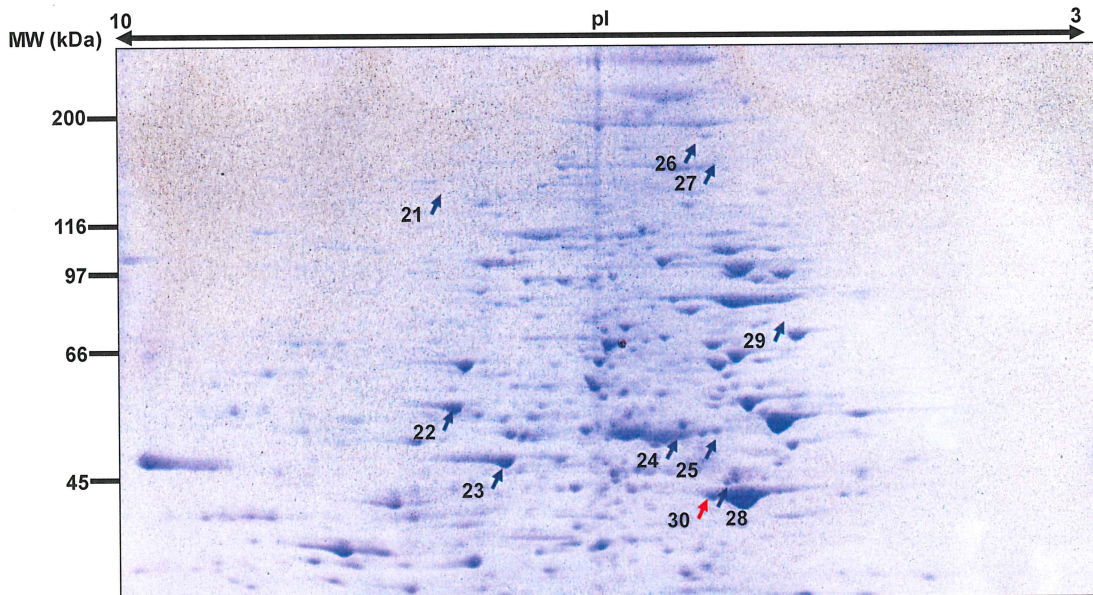
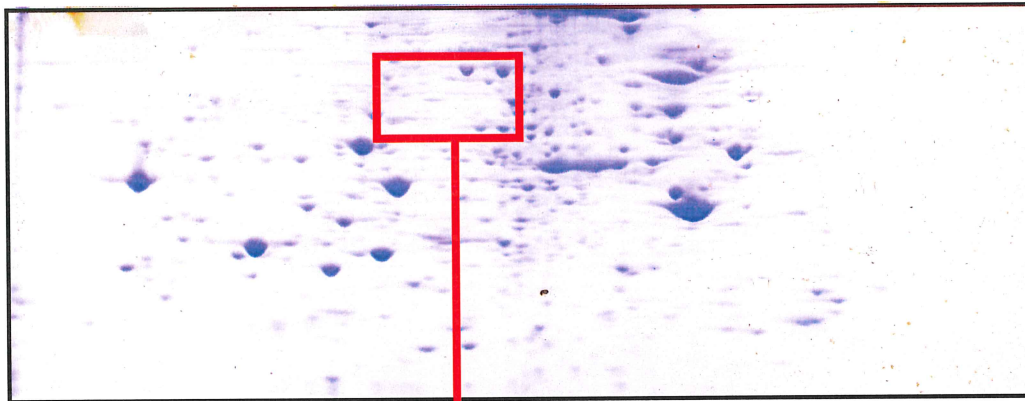


図 5-A.

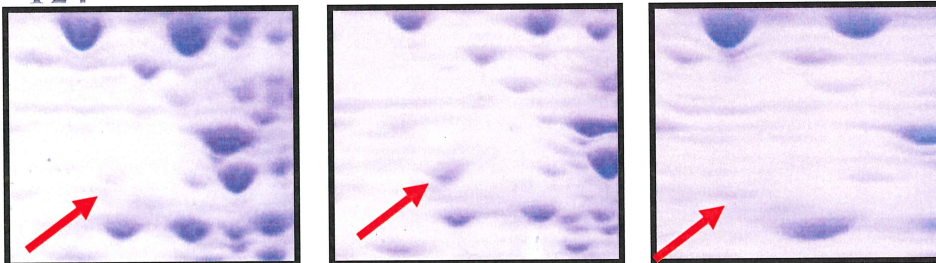
Spot No.6 Accession No.Q16822

Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK2) 70592 Da

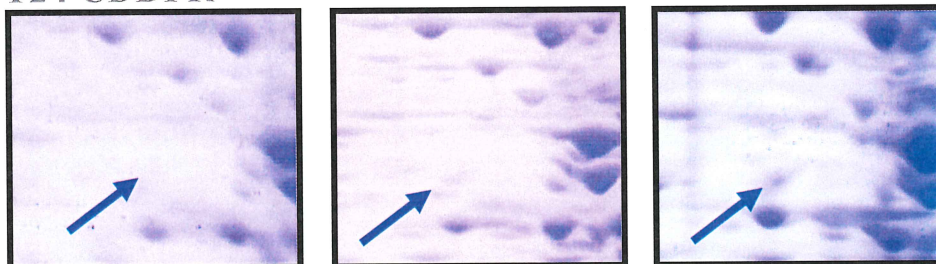
a ゲルスポット



T24

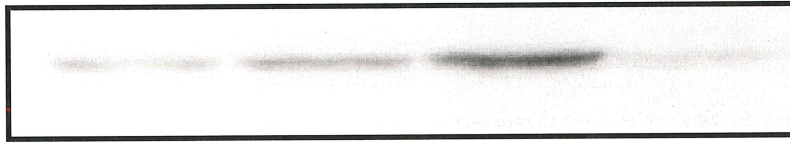


T24 CDDPR



b 検体量による発光比較

ウエスタンブロット



T24
5µg

T24
10µg

T24
20µg

T24
CDDPR
20µg

光量測定

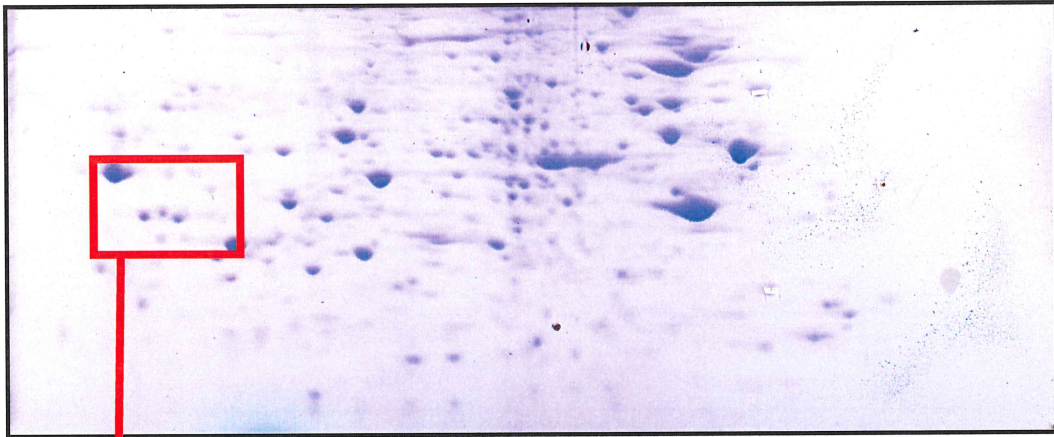
T24 5µg	T24 10µg	T24 20µg	CDDPR 20µg
3055	5983	10309	2258

図 5-B.

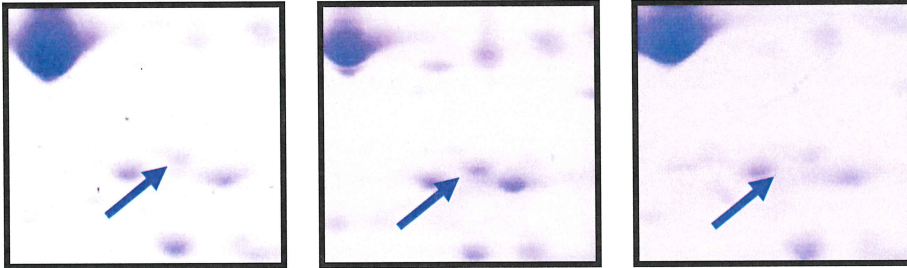
Spot No.14 Accession No.Q9Y427

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (HNRNPA3) 39595 Da

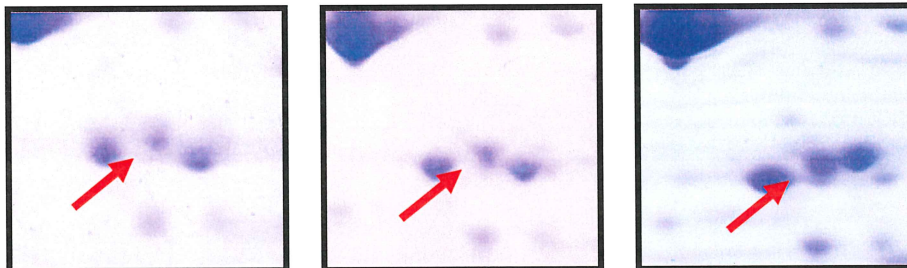
a ゲルスポット



T24

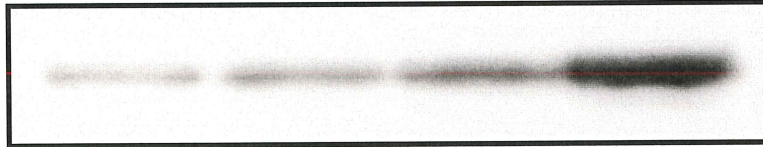


T24 CDDPR



b 検体量による発光比較

ウエスタンブロット



T24
5µg

T24
10µg

T24
20µg

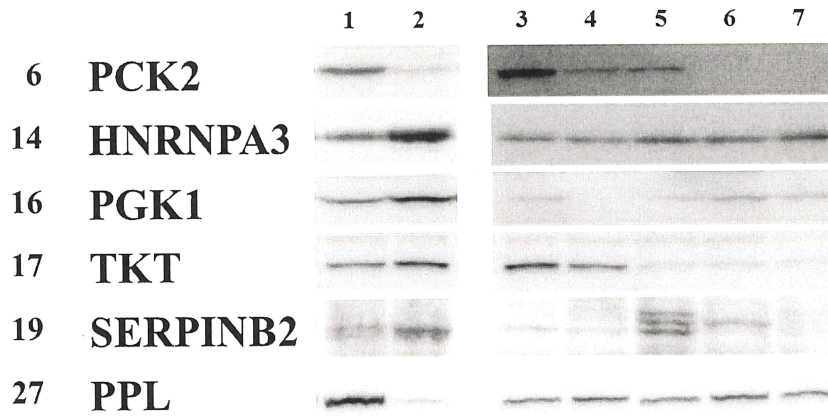
T24
CDDPR
20µg

光量測定

T24 5µg	T24 10µg	T24 20µg	CDDPR 20µg
4761	7781	12144	27189

図 6

a 細胞株、タンパク別ウエスタンブロット

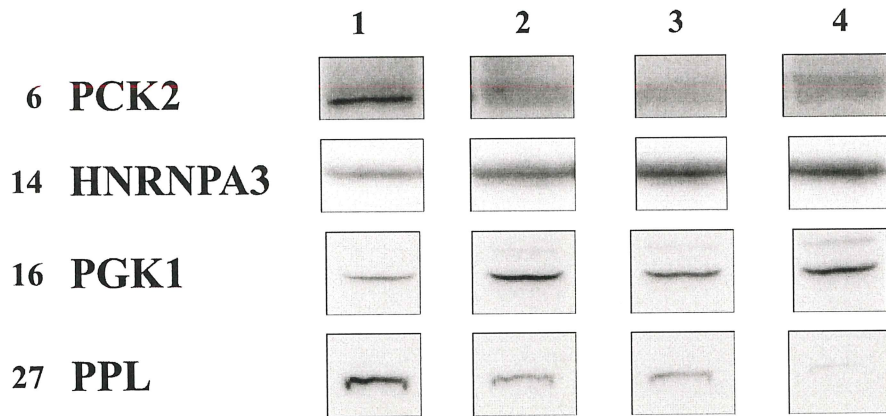


b 光量測定

Spot No.	Protein	1	2	3	4	5	6	7
		T24 (ref.)	T24 CDDPR	RT4	RT4p0	5637	EJ	TCCSUP
6	PCK2	1.0	0.2	0.8	0.2	0.3	-	-
14	HNRNPA3	1.0	2.1	0.5	0.4	0.6	0.5	0.7
16	PGK1	1.0	1.6	0.2	-	0.1	0.3	0.2
17	TKT	1.0	1.5	1.5	1.0	0.3	0.2	0.2
19	SERPINB2	1.0	1.7	0.3	0.1	2.1	0.7	0.3
27	PPL	1.0	0.1	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4

図 7

a 濃度別ウエスタンブロット



b 光量測定

Spot No.	Protein	1	2	3	4
		T24 (ref.)	T24 CDDPR		
			13.3 μM	26.6 μM	40.0 μM
6	PCK2	1.0	0.6	0.4	0.4
14	HNRNPA3	1.0	1.8	2.4	2.2
16	PGK1	1.0	2.5	1.8	2.4
27	PPL	1.0	0.4	0.4	0.1

表 1. ウェスタンブロッティングに使用した **buffer** の組成

• TBS buffer

Trizma base	14g
Trizma hydrochloride, minimum 99% titration	60g
NaCl	87.5g / 10 L

• TBS-T buffer

TBS buffer	1L
ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート	1mL

• 0.5% Casein

1M Tris-Hcl(pH 7.5)	100mL
Distilled Water	900mL
Casein	5g
NaCl	3.51g

表 2. Protein expression profile in T24CDDPR cells compared to that in T24

Spot No.	M.W. (Obs.)	M.W. (Theo.)	Protein Name	G.N.	Score	Accession No.	Seq.Cov (%)	PSMs	Status
01	43,000	49,929	Sulfide:quinone oxidoreductase	SQRDL	146.2	Q9Y6N5	27.58	16	Decrease
02	45,000	44,939	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	182.24	Q8NC51	35.71	20	Decrease
03	47,000	55,955	Serine hydroxymethyltransferase	SHMT2	200.3	P34897	32.09	21	Decrease
04	41,000	40,397	Phosphoserine aminotransferase	PSAT1	190.2	Q9Y617	37.38	20	Decrease
05	95,000	95,278	Elongation factor 2	EEF2	268.28	P13639	27.42	27	Decrease
06	70,000	70,592	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	PCK2	104.2	Q16822	16.93	11	Decrease
07	45,000	44,840	DnaJ homolog subfamily A member 1	DNAJA1	168.3	P31689	41.15	17	Decrease
08	40,000	30,760	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	206.2	P05787	52.83	21	Decrease
09	49,000	51,304	Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	154.2	P08729	30.65	16	Decrease
10	45,000	48,029	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	160.2	P05783	42.57	16	Decrease
11	80,000	77,209	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	168.3	P21980	25.25	18	Decrease
12	42,000	44,066	Keratin, type I cytoskeletal 19	KRT19	204.3	P08727	53.65	21	Decrease
13	41,000	32,658	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	58.3	Q9Y427	12.45	6	Decrease
14	43,000	39,595	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	142.3	P51991	31.78	15	Increase
15	45,000	47,446	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	110.23	P00505	26.82	11	Increase
16	45,000	44,587	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	190.25	P00558	38.25	19	Increase
17	70,000	67,835	Transketolase	TKT	186.21	P29401	25.68	19	Increase
18	40,000	37,074	Aldo-keto reductase family 1 member C4	AKR1C4	60.2	P17516	9.49	6	Increase
19	42,000	46,567	Plasminogen activator inhibitor 2	SERPINB2	108.2	P05120	29.74	11	Increase
20	70,000	71,413	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DYNC1I2	110.2	Q13409	23.23	11	Increase
21	150,000	166,469	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	220.27	Q14152	16.3	24	Decrease
22	55,000	57,901	Pyruvate kinase PKM	PKM	202.22	P14618	44.03	21	Decrease
23	45,000	47,140	Alpha-enolase	ENO1	178.23	P06733	16.3	18	Decrease
24	40,000	30,760	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	272.28	P05787	52.39	28	Decrease
25	49,000	51,304	Keratin, type II cytoskeletal 7	KRT7	222.22	P08729	37.87	23	Decrease
26	220,000	226,392	Myosin-9	MYH9	268.26	P35579	5.81	27	Decrease
27	210,000	204,526	Periplakin	PPL	72.20	O60437	5.81	8	Decrease
28	45,000	48,029	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	266.27	P05783	58.57	27	Decrease
29	80,000	77,209	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	TGM2	208.26	P21980	25.32	21	Decrease
30	42,000	46,567	Plasminogen activator inhibitor 2	SERPINB2	108.2	P05120	29.74	11	Increase

Spot No., spot number; M.W. (Obs.), observed molecular weight; M.W. (Theo.), theoretical molecular weight; G.N., gene name; Score, SEQUEST score; Accession No., accession number; Seq. Cov. (%), sequence coverage; PSMs, peptide-spectrum matches; Status, change in the expression levels of the protein in T24CDDPR compared to that in T24.