

学 位 論 文 要 旨

氏 名 田 岡 佳 憲



論 文 題 目

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 承 認 印

岩 村 正 嗣



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)

氏名 田岡 佳憲

< 諸語 >

膀胱癌は、泌尿器学的領域において2番目に多い悪性腫瘍であり、診断時にすでに進行性膀胱癌患者は、その後局所進行または遠隔転移へ移行する。進行性膀胱癌患者において、化学療法は治療法の一つであり、白金製剤をベースとした化学療法が最も効果的な化学療法である。しかしながら、膀胱癌の白金製剤に対する耐性化が問題となっている。また現在、白金製剤ベースの治療法以外で確立された治療法はない。シスプラチン抵抗性に関連したタンパク質を検索する為に、膀胱癌細胞株およびシスプラチン耐性膀胱癌株を使用しプロテオーム解析を行った。

< 方法 >

シスプラチン耐性の細胞株の作成をまず行った。膀胱癌細胞株の培養液にシスプラチンを混ぜながら徐々に濃度を上げてゆき、シスプラチン含有の培養液でも生存できる膀胱癌細胞株を作成した。細胞株をホモジナイズし、その後アガロース2次元電気泳動法を用いて、膀胱癌細胞株とシスプラチン耐性膀胱癌細胞株のタンパク質を展開・比較し、癌特有のタンパク質を検索した。ゲルに展開されたタンパク質をLC-MS/MSにより同定を行った。25個のタンパク質が同定された。PubMedから、これらのタンパク質の性質や機能を調べ、腫瘍マーカー候補タンパク質として、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調査する為にウェスタンブロット法を使用した。

< 結果 >

8つのタンパク質の存在を検証する為にウェスタンブロットでの検証試験を行った。シスプラチン耐性膀胱癌株と正常膀胱癌細胞株を比較して、HNRNPA3、PGK1、TKとSERPINB2はシスプラチン耐性膀胱癌細胞株で1.5倍以上の発現を認めた。また、PCK2とPPLはシスプラチン耐性膀胱癌細胞株で20%未満の発現の減少を認めた。GOT2とEIF3Aは同程度の発現量であった。その後、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為に、様々な膀胱癌細胞株でウェスタンブロット分析を行った。HNRNPA3、TKT、SERPINB2とPPLは、全ての膀胱癌細胞株で発現を認めた。PCK2は、2つ細胞株で発現した。PGK1に関しては、最初に使用した膀胱癌細胞株以外の膀胱癌細胞株においては少量もしくは発現を認めなかった。

<考察>

膀胱癌細胞株およびシスプラチン耐性膀胱癌細胞株でのタンパク質発現の違いを同定するために、プロテオミクス分析を行い、発現量が有意違う 25 のタンパク質の同定に成功した。これらのタンパク質は、主に細胞骨格タンパクと酵素修飾因子に関係していた。また、いくつかは、過去にプロテオミクス分析で化学療法抵抗と関係していることが報告されたのと同じであった。これらの治療後に変化するタンパク質を分析することによって、治療方針を決定する要因となる可能性や、膀胱癌治療を最適化できるようになる可能性もある。

シスプラチン抵抗は多因子、多段階で、多経路である。今回の研究でシスプラチン抵抗性に関連していると思われるタンパク質を発見し、各々のタンパク質がシスプラチンのさまざまな濃度で各々の発現を示すことを示した。PPL はシスプラチンの濃度と相関し、段階的に発現量が減少していった、反対に HNRNPA3 は増大傾向を示した。このように様々なタンパク質がシスプラチンの暴露濃度で変動する、これはシスプラチン抵抗性を完全に阻止し感受性を元に戻すには、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。

今回の結果は、新しい腫瘍マーカーの開発にもつながるであろう。そして、進行癌患者のために治療戦略を確立することにおける重要なステップになると期待できる。しかしながら、検出された全てのタンパク質がシスプラチン抵抗に関連がある事は無いと思われる、それは癌細胞自体がタンパク質プロファイルを変化させるからである。また、癌細胞の異質性のためか発見されたタンパク質は、他の癌モデルでも共通に増減している事に気づかれてなかったタンパク質もあった。

今後の追加研究でシスプラチン抵抗に関連し変化したタンパク質の潜在的役割が決定されていくであろう。

<結論>

我々は、膀胱癌細胞株を使用しプロテオーム解析することで、シスプラチン抵抗性膀胱癌の関連タンパクを発見した。