

## 2次元電気泳動法による肺癌蛋白解析で検出される蛋白 Reticulocalbin-1 と CDDP を中心とした化学療法との関係

竹川広三<sup>1</sup>・平野 隆<sup>1</sup>・日吉利光<sup>1</sup>・中川彩子<sup>1</sup>・田口史子<sup>1</sup>・  
大平達夫<sup>1</sup>・池田徳彦<sup>1</sup>・海老原善郎<sup>2</sup>・加藤治文<sup>1</sup>

**要旨** **目的** .CDDP 耐性肺癌培養細胞とその親株の蛋白の2次元電気泳動像からその耐性に関与すると見られる蛋白を検出し、臨床症例における影響を検討した。**方法** .肺癌培養細胞 H69 と PC14 の CDDP 耐性株とその親株での2次元電気泳動像を比較し明らかに発現量の変化した蛋白を検出した。1994年10月～1998年9月に外科的切除され2次元電気泳動による肺癌蛋白解析が施行された80症例を対象にこの蛋白発現と臨床病理学的緒因子および予後との関係を検討した。**結論** .CDDP 耐性株で顕著に発現低下する分子量44.0kDaの分子を検出した。この分子はN末端アミノ酸配列解析よりカルシウム結合性蛋白 Reticulocalbin-1 と同様な蛋白であった。この蛋白発現と臨床病理学的緒因子との関係に有意なものはなかった。しかし術後の白金製剤による全身化学療法施行症例にかぎり Reticulocalbin-1 相同蛋白発現例が低発現例に比べ有意に予後良好であった。Reticulocalbin-1 相同蛋白分子が白金製剤の薬剤耐性機構に何らかの関与をしている可能性が示唆された。(肺癌. 2002;42:113-118)

**索引用語** 2次元電気泳動, Reticulocalbin-1, 予後, 生物学的悪性度, 肺癌

## The Relationship Between CDDP-Based Chemotherapy and the Reticulocalbin-1 Detected by Two-Dimensional Electrophoresis of Primary Lung Cancer

Hiromi Takekawa<sup>1</sup>; Takashi Hirano<sup>1</sup>; Toshimitsu Hiyoshi<sup>1</sup>; Ayako Nakagawa<sup>1</sup>; Fumiko Taguchi<sup>1</sup>; Tatsuo Ohira<sup>1</sup>; Norihiko Ikeda<sup>1</sup>; Yoshiro Ebihara<sup>2</sup>; Harubumi Kato<sup>1</sup>

**ABSTRACT** **Objective.** We attempted to detect a polypeptide related to drug resistance and investigated its clinical effects in cases of primary lung cancer. **Study Design.** Comparing the two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) patterns of the parent strain and CDDP-resistant cultured lung cancer cells (H69 and PC14), we detected a polypeptide in which the expression levels clearly changed. Measurement of clinical materials in 2-DE was successful in 80 patients with primary lung cancer between 1994 and 1998. We evaluated the relationship between the expression levels of this polypeptide, clinicopathological factors and outcome. **Conclusion.** We detected a polypeptide (molecular weight 44.0 kDa) which significantly decreased in expression level in CDDP-resistant cells. The amino acid sequence suggested that this polypeptide might be homologous with reticulocalbin-1. We could not recognize any statistically significant relationship between the expression of reticulocalbin-1 and any clinicopathological factors. However, only in cases with adjuvant chemotherapy using platinum-based drugs with positive expression of reticulocalbin-1 was a better outcome obtained compared with cases without reticulocalbin-1 expression. Therefore, it was suggested that the

東京医科大学病院 <sup>1</sup>外科第一講座, <sup>2</sup>第二病理.  
別刷請求先: 竹川広三, 東京医科大学病院外科第一講座, 〒  
160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1.  
Department of <sup>1</sup>Surgery and <sup>2</sup>Pathology, Tokyo Medical Uni-  
versity, Japan.

Reprints: Hiromi Takekawa, Department of Surgery I, Tokyo  
Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku Tokyo 160-  
0023, Japan.

Received October 11, 2001; accepted February 8, 2002.

© 2002 The Japan Lung Cancer Society

reticulocalbin-1 molecule might have some kind of involvement in the chemical tolerance mechanism of platinum-based drugs. (*JJLC*. 2002;42:113-118)

**KEY WORDS** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Reticulocalbin-1, Prognosis, Biological malignancy, Lung cancer

## 緒言

2次元電気泳動法は蛋白質の解析法として既に確立されたものであり、腫瘍学への応用に関しては培養細胞での解析はあるものの、外科切除材料での解析は血清蛋白・間質細胞の混入などの問題から高分解能の解析は困難であった。著者らは1989年以来固形腫瘍切除材料を非酵素的に処理することで可能になった固形癌の2次元電気泳動法による腫瘍蛋白解析を進めてきた<sup>2,3</sup>。この手技を肺癌切除材料に応用することで腫瘍の生物学的特性を明らかにする試みを行ってきた<sup>4,5</sup>。

近年いわゆる新規抗癌剤の登場に伴い術前・術後の化学療法が施行される症例が増加してきたが、いまだ化学療法の効果を投与前に明確に予測することは困難であるのが現状である。そこで現在肺癌治療に最も多用されている白金製剤に対する薬剤耐性培養細胞株とその親株の蛋白発現を2次元電気泳動ゲル上で比較することで、薬剤耐性に関与している可能性の高い蛋白の同定を試みた。また同時にこの蛋白の外科的切除材料での発現と臨床病理学的緒因子および予後との関係について検討した。

## 材料と方法

### 1. 原発性肺癌培養細胞および外科的切除材料

原発性肺癌培養細胞：原発性小細胞癌培養株 H69 および低分化腺癌培養株 PC14 の CDDP 耐性株とその親株は国立がんセンター病院 西條長宏先生より供与された。

外科的切除材料：1994年10月～1998年9月までに東京医科大学病院外科にて術前加療なしに切除された原発性肺癌のうち2次元電気泳動法による解析が可能であった80例を解析対象とした。80症例中白金製剤を中心とした術後化学療法が32例に施行されていた。80症例の組織学的内訳は、腺癌66例（内術後化学療法施行例24例）、扁平上皮癌13例（同7例）、大細胞癌1例（同1例）、また術後病理病期は、IA期15例（内術後化学療法施行例0例）、IB期8例（同0例）、IIA期5例（同2例）、IIB期8例（同3例）、IIIA期28例（同18例）、IIIB期11例（同6例）、IV期5例（同3例）であった。

### 2. 非酵素的処理による2次元電気泳動サンプルの調整および2次元電気泳動法

固形腫瘍の2次元電気泳動用サンプルの調整は、B. Franzen, K. Okuzawa らの方法に従い施行した。外科的

切除された腫瘍は切除後凍結保存されることなく直ちに処理された。培養細胞材料、外科的切除材料ともに蛋白量 30 μg のサンプルが一回の2次元電気泳動により解析された。蛋白の2次元電気泳動法は1次元めに蛋白の持つ電荷により分離する等電点電気泳動を内径 1.2 mm、長さ 200 mm のガラス管内で施行（800 V, 14.5 時間；1000 V, 1.0 時間）した。等電点電気泳動終了後スバゲッティータのゲルは 180 mm × 190 mm × 1.0 mm の大きさの 10%～13% T の linear gradient SDS-polyacrylamide gel 上にのせ 8～10 mA の条件下で泳動した。2次元電気泳動後 20% エタノールにて蛋白をゲル上に固定、銀染色にて各蛋白のスポットを描出した。<sup>6</sup>

### 3. CDDP 耐性獲得により発現低下するポリペプチドの抽出と N 末端アミノ酸配列の決定

電気泳動にて分離されたポリペプチドは、Western Blot 法を用いて Immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, Bedford, MA) に転写し、各蛋白によるスポットは Coomassie Brilliant Blue により染色され抽出された。目的のスポットを PVDF 膜より切り出すことで抽出し、気相蛋白アミノ酸配列分析機 (HPG 1005A Protein Sequencing System; Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA) を用いて目的ポリペプチドの N 末端アミノ酸配列を決定した。

### 4. 切除材料の2次元電気泳動による蛋白解析

2次元電気泳動ゲル上の目的の位置に銀染色にてスポットが肉眼的に明瞭に確認できる場合を発現陽性、確認できない場合を発現陰性とした。

### 5. 生存率の解析と統計学的解析

統計学上の end-point を再発とし、以下の事象をみとめた時点を再発とした。

1) 組織学的あるいは細胞診にて再発が証明された場合。

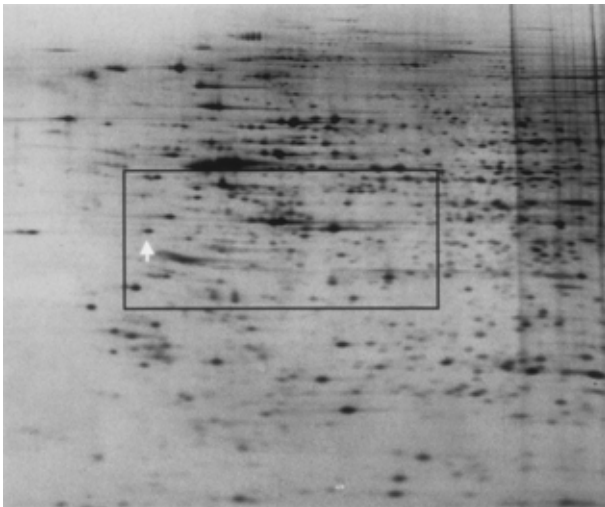
2) 形態学的診断がおこなわれない場合

a. 肺内転移、胸膜播種：レントゲン CT 上多発性の肺内転移病巣あるいは胸膜播種病巣を認めた場合。

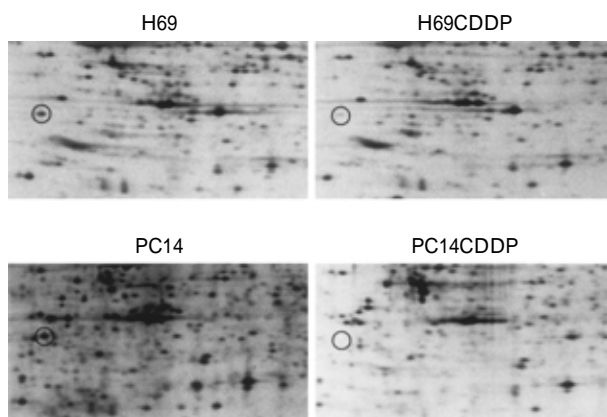
b. 骨転移：骨シンチグラフィにて陽性所見があり、同部位有症状であるかまたはレントゲンにて骨融解像を中心とした変化を認めた場合。

c. 脳転移・副腎転移：レントゲン CT 上明らかな腫瘍性病変を認め、転移病巣と判断された場合。

また、再発確認日はその検査施行日とし、術後5年を経過していない症例に関しては最終来院日をもって打ち



**Figure 1.** Overview of the two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis pattern of the H69 small cell lung carcinoma (parent strain). The regions subjected to this analysis are enclosed by a box. The spot indicated by a white arrow-head shows a clear decrease in appearances, when we evaluated 2-DE patterns of the CDDP-resistant strains.



**Figure 2.** 2-DE patterns of the CDDP-resistant strains and parent strains of H69 (small cell lung cancer) and PC14 (poorly differentiated adenocarcinoma). The spots indicated by circles showed a very clear decrease in appearance of the CDDP-resistant strains.

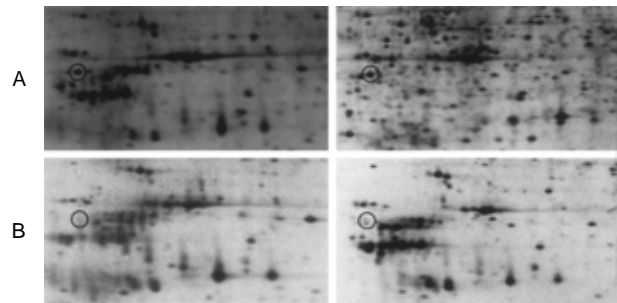
切り日とした。

Kaplan-Meier 法にて無再発曲線を描き、各群間の有意差検定は Logrank test により行い、危険率 5% 未満をもって有意と判定した。

## 結果

### 1. 原発性肺癌培養株の 2 次元電気泳動法による解析

肺小細胞癌培養株 H69 および低分化腺癌培養株 PC14 の CDDP 耐性株とその親株の 2 次元電気泳動像の比較



**Figure 3.** Figure 3 shows 2-DE findings of surgically resected materials. **A.** Representative cases with reticulocalbin-1 expression. **B.** Representative cases without reticulocalbin-1 expression.

から耐性株で顕著な発現低下を認めるスポット (分子量 44kDa) を検出した。Figure 1 に肺小細胞癌培養株 H69 の 2 次元電気泳動像 (全体像) と解析対象としたスポットの位置を示す。

Figure 2 に肺小細胞癌 H69 および低分化腺癌 PC14 の親株および CDDP 耐性株の 2 次元電気泳動像を示す。で示されるスポットは CDDP 耐性株で著明な発現低下を示した。

### 2. 薬剤耐性関連ポリペプチドの抽出と N 末端アミノ酸配列の決定

H69 肺癌培養株を用いた 2 次元電気泳動法と Western Blot 法により抽出した目的の CDDP 耐性関連ポリペプチドは N 末端側より 22 番目までのアミノ酸配列を決定した。(Lys)-Pro-Thr-Val-Arg-( )-Glu-Arg-Val-Val-Arg-Pro-Asp-Ser-Glu-Leu-Gly-Glu-Arg-Pro-Pro-Glu( ) ( ) は不確定のアミノ酸)。この配列は  $Ca^{2+}$  結合性蛋白として知られている Reticulocalbin-1 と相同のアミノ酸配列であった。

### 3. 原発性肺癌切除材料の 2 次元電気泳動像からみた Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現

Figure 3A に代表的な Reticulocalbin-1 相同蛋白発現症例, Figure 3B に非発現症例を提示する。解析可能であった全 80 症例中, 49 例 (61.25%) が発現例, 31 例 (38.75%) が非発現例と判断された。解析された 80 症例の患者背景および臨床病理学的諸因子と Reticulocalbin-1 相同蛋白発現との関係を Table 1 に示す。また adjuvant chemotherapy が施行された 32 症例について Table 2 に示す。Table 1, 2 において Reticulocalbin-1 相互蛋白の発現を臨床病理学的諸因子との間に統計的に有意な関係はみとめなかった。

### 4. 術後全身化学療法施行別にみた Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現と予後との関係

全身化学療法を術後に施行していない症例の無再発生存曲線を Figure 4A に、術後に白金製剤を中心とした化

**Table 1.** Relationship between clinicopathological factors and the expression of reticulocalbin-1

		reticulocalbin 1		
		negative	positive	total
Sex	Male	18	30	48
	Female	13	19	32
Age	<59	14	24	38
	60-	17	25	42
Histological type	Adc	28	38	66
	SqCC	2	11	13
	LCC	1	0	1
t-factor	t1, t2	22	37	60
	t3, t4	9	11	20
n-factor	n 0	11	18	29
	n 1-3	20	31	51
Pathological stage	I A	6	9	15
	I B	2	6	8
	II A	1	4	5
	II B	3	5	8
	III A	11	17	28
	III B	5	6	11
Adjuvant chemotherapy ( - )	( - )	15	33	48
	( + )	16	16	32

Adc indicates adenocarcinoma; SqCC, squamous cell ca.; and LCC, large cell ca.

学療法施行症例の無再発生存曲線を Figure 4B に示す。術後化学療法未施行群では Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現の有無と予後との間に有意差を認めなかった ( $p = 0.2364$ )。しかし、化学療法施行群では Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現症例が非発現症例に比べ統計学的有意に予後良好であった ( $p = 0.0226$ )。

## 考 察

著者らは固形腫瘍より抽出した蛋白を材料とした 2 次元電気泳動法による蛋白解析を 1989 年以来スウェーデンカロリンスカ研究所病理部と共同で行ってきた。非酵素処理によるサンプル処理法の確立により乳癌・肺癌などの固形腫瘍由来の蛋白解析が高解像度 2 次元電気泳動法により可能となった。<sup>2</sup> 2 次元電気泳動による蛋白解析と病理組織学的評価による対比から既に肺癌の組織学的分化傾向に特徴的な 2 次元電気泳動パターンがあることを示してきた。<sup>4</sup> 今回著者らは機能を有する新規腫瘍関連蛋白の同定のため、CDDP 耐性肺癌培養株とその親株の 2 次元電気泳動パターンを比較検討し、CDDP 耐性に関与する蛋白の検出を試みた。その結果 2 種類の耐性株で発現が顕著に低下したスポット (分子量 44.0 kDa) を同定し、その蛋白は N 末端アミノ酸配列解析の結果から

**Table 2.** Relationship between clinicopathological factors and the expression of reticulocalbin-1 in cases with adjuvant chemotherapy using platinum-based drugs

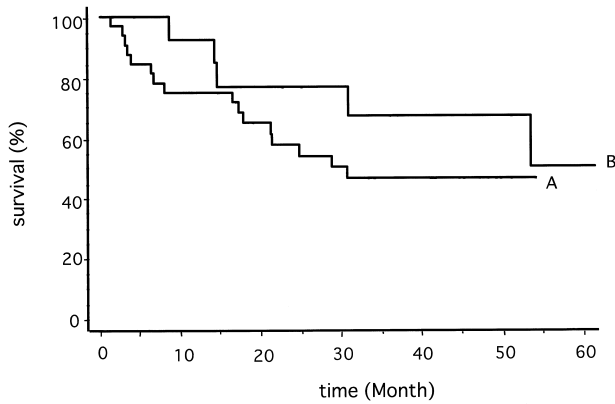
		reticulocalbin 1		
		negative	positive	total
Sex	Male	9	6	15
	Female	7	10	17
Age	<59	7	8	15
	60-	9	8	17
Histological type	Adc	15	12	27
	SqCC	1	3	4
	LCC	0	1	1
t-factor	t1, t2	9	10	19
	t3, t4	7	6	13
n-factor	n 0	6	7	13
	n1-3	10	9	19
Pathological stage	I A	0	0	0
	I B	0	0	0
	II A	1	1	2
	II B	2	1	3
	III A	9	9	18
	III B	3	3	6
Total		16	16	32

Adc indicates adenocarcinoma; SqCC, squamous cell ca.; and LCC, large cell ca.

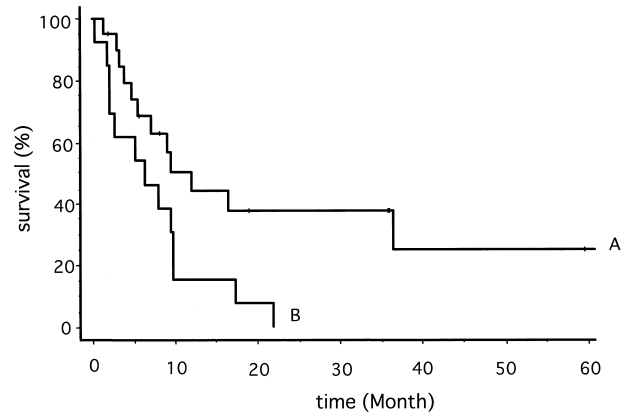
カルシウム結合性蛋白 Reticulocalbin-1 と相同なアミノ酸配列を有する蛋白であることが分かった。<sup>7</sup>

Reticulocalbin-1 相同蛋白は EF ハンド型  $Ca^{2+}$  結合タンパク質に属し、分子量 44kDa を示す。小胞体 (ER) のルミナルタンパク質として知られており、<sup>8,9</sup> アミノ酸配列および分子量の点から私達の解析結果と一致した。Reticulocalbin-1 相同蛋白には 1 個の elongation factor (EF) hand motif を有するドメインが 6 個反復していることが知られているが、その機能についていまだ明確には示されていない。<sup>8</sup> 腫瘍細胞での解析では肝細胞癌で正常肝細胞に比べ高発現の報告があり、カルシウム調節を介したヒト細胞の悪性化に関与している可能性が示唆されているが、<sup>10</sup> 腫瘍学における Reticulocalbin-1 相同蛋白発現に関する報告は非常に少ない。その中で浸潤性の高い乳癌培養細胞において Reticulocalbin-1 相同蛋白が高発現し、浸潤性の低い培養細胞では発現されなかったとする報告があり注目されている。<sup>11</sup> しかしながら解析された培養細胞株の数が非常に限られており、その意義については不明な点が多いと考える。

Figure 2A に典型的な Reticulocalbin-1 相同蛋白高発現パターンを示した 2 症例、Figure 2B に低発現パターンを示した 2 症例を提示した。2 次元電気泳動は今回肉眼



**Figure 4A.** Non-relapse mortality curves of cases without adjuvant chemotherapy. **A.** Cases with reticulocalbin-1 expression (  $n = 33$  ). **B.** Cases without reticulocalbin-1 expression (  $n = 15$  ). No statistically significant differences between the curves are recognized (  $p = 0.2364$  )



**Figure 4B.** Non-relapse mortality curves of the cases with adjuvant chemotherapy using platinum-based drugs. **A.** Cases with reticulocalbin-1 expression (  $n = 16$  ). **B.** Cases without reticulocalbin-1 expression (  $n = 16$  ). Statistically significant differences between the curves are recognized (  $p = 0.0226$  )

的に評価したが、発現症例ではスポットの検出は比較的容易であった。解析した 80 症例あるいは術後化学療法施行 32 症例の Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現と臨床病理学的諸因子、病理病期との間に有意な関係は認めなかった。

今回 2 次元電気泳動ゲル上の Reticulocalbin-1 相同蛋白分子は CDDP 耐性肺癌培養細胞で親株よりも顕著に発現低下しているポリペプチドとして同定された。従って外科的切除材料での Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現が術後化学療法の効果発現に寄与している可能性が示唆された。外科的切除材料での性別、年齢、組織型および病理病期を比較した Table 1 および 2 では Reticulocalbin-1 の発現と各因子間で統計学的な差は認めなかった。白金製剤を中心にすえた術後化学療法を施行した症例 (Figure 4B) と未施行の症例 (Figure 4A) とに分け、それぞれのグループで Reticulocalbin-1 相同蛋白発現の有無と予後 (術後無再発期間) との間に差がないか検討した。術後化学療法未施行症例では Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現の有無は予後に影響を全く与えていなかったが、化学療法施行群では Reticulocalbin-1 相同蛋白の高発現例が低発現例に比べ統計学上有意に予後良好であった ( $p = 0.0226$ )。Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現が白金製剤を中心とした全身化学療法に何らかの関係があることが示唆され、術後に切除材料を用いた Reticulocalbin-1 相同蛋白発現の検索が術後の白金製剤を中心とした adjuvant chemotherapy 適応決定の指標となりうる可能性を示している。

前述のように Reticulocalbin-1 相同蛋白の生理学的機能はいまだ解明されておらず、腫瘍細胞における発現低下の意義についても明らかにされていない。今回の私達

の検討で Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現が白金製剤による術後化学療法施行症例の予後に関与する可能性が示唆された。今後今回同定された白金製剤耐性関連蛋白 Reticulocalbin-1 相同蛋白分子の生理学的機能を明らかにしつつ、この分子が CDDP 薬剤耐性にいかに関わっているのか、その作用機序の解明が必要と考える。

## 結 語

1) 2 次元電気泳動法による CDDP 耐性肺癌培養細胞株とその親株の蛋白解析の比較により検出された Reticulocalbin-1 相同蛋白の発現と臨床病理学的諸因子との間には有意な関係は認めなかった。

2) 術後化学療法施行症例で白金製剤による Reticulocalbin-1 相同蛋白高発現症例は低発現症例に比べ予後が良好であり、Reticulocalbin-1 相同蛋白分子が白金製剤の薬剤耐性機構に何らかの関与している可能性が示唆された。

## REFERENCES

1. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;250:4007-4021.
2. Franzen B, Linder S, Okuzawa K, et al. Nonenzymatic extraction of cells from clinical tumor material for analysis of gene expression by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1993;14:1045-1053.
3. Okuzawa K, Franzen B, Lindholm J, et al. Characterization of gene expression in clinical lung cancer material by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 1993;15:382-390.
4. Hirano T, Franzen B, Uryu K, et al. Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *Br J Cancer.* 1995;72:840-848.

- 5 . Hirano T, Fujioka K, Franzen B, et al. Relationship between TAO1 and TAO2 polypeptides associated with lung adenocarcinoma and histocytological features. *Br J Cancer*. 1997;75:978-985.
- 6 . Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem*. 1981;117:307-310.
- 7 . Honore B, Vorum H. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca<sup>2+</sup>-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett*. 2000;466:11-18.
- 8 . Tachikui H, Navet AF, Ozawa M. Identification of the Ca<sup>2+</sup>-binding domains in reticulocalbin, an endoplasmic reticulum resident Ca<sup>2+</sup>-binding protein with multiple EF-hand motifs. *J Biochem*. 1997;121:145-149.
- 9 . Ozawa M, Muramatsu T. Reticulocalbin, a novel endoplasmic reticulum resident Ca<sup>2+</sup>-binding protein with multiple EF-hand motifs and a carboxyl-terminal HDEL sequence. *J Biol Chem*. 1993;268:699-705.
- 10 . Yu LR, Zeng R, Shao XX, et al. Identification of differentially expressed proteins between human hepatoma and normal liver cell lines by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2000;21:3058-3068.
- 11 . Liu Z, Brattain MG, Appert H. Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231:283-289.