

Thesis

低血清刺激された神経芽細胞腫のプロテオーム解析

埼玉医科大学 小児外科

池田 理恵

Proteomic Analysis of Proteins which Expressed in GOTO Cells Stressed by Low Serum Concentration

Rie Ikeda (Department of Pediatric Surgery, Saitama Medical University, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

(目的) 腫瘍細胞になんらかの刺激(低酸素, 温度, 抗癌剤など)を与えると, これに応答して細胞内に生存, 増殖に関する蛋白質の発現調節が起こると推測される。われわれは神経芽腫細胞株 GOTO 細胞に低血清刺激を与えた時に有意に発現する細胞内蛋白質を, 近年開発された蛍光標識 2次元ディファレンスゲル電気泳動システム (2D-DIGE) によるプロテオーム解析によって捕らえ, 蛋白質レベルでどのような調節が行われるかを検討した。

(方法) GOTO 細胞を 10% ウシ胎仔血清 (FBS) 入り RPMI-1640 培地で 70-80% の細胞密度まで培養後, 1% FBS 入り同培地に置換し 24 時間培養した。10% FBS 同培地で 24 時間培養したサンプルをコントロールとした。各群の蛋白質を抽出, 蛍光標識し 2次元電気泳動を行った。電気泳動後, ゲルイメージの発現蛋白質量の差異を解析した。有意な発現変化のあるスポットを切り出し, ゲル内でトリプシン消化, 消化物を質量分析し, 各スポットの蛋白質同定を行った。

(結果) 10% FBS 群に比べ 1% FBS 群でアポトーシス, 増殖, 分化に関する 6 つの蛋白質 (cytochrome C, endoplasmic reticulum calcium-binding protein 55, laminin-binding protein, stathmin, pre-mRNA splicing factor SF2, heat shock cognate protein 70) の発現増加や減少が認められた。

(考察) 同定した蛋白質は細胞増殖促進や抑制の相反する作用を持つ蛋白質だった。これらの蛋白質の発現増加および減少は低血清濃度という危機的環境において, 生存や増殖の継続に向けた分子レベルでの調節機構が, GOTO 細胞内で生じていることを示唆している。今回の様なストレス負荷時に発現する蛋白質の解析と同定は, 神経芽腫の治療戦略上重要な情報を提供すると思われる。

Keywords: 神経芽細胞腫, プロテオーム解析, 2D-DIGE

はじめに

神経芽細胞腫 (NB) は脳腫瘍を除く小児悪性固形腫瘍のなかで頻度が高く, ときに自然消退や治療により神経節細胞へ分化するなどの特徴を有する^{1,2)}。しかし, 進展や生存に関連し, NB に特異的に発現するであろう蛋白質や癌抑制遺伝子の転写などについて十分な解明がなされていない。これら分子機構の解明は NB のもつ特異的病態の解明に繋がり, ひいては治療方針の決定に重要な情報となると考えられる。腫瘍細胞になんらかの刺激 (低酸素, 温度, 抗癌剤など) を与えると, これに応答して細胞内に生存, 増殖に関する

蛋白質の発現調節が起こる。このことを利用してアポトーシスを誘導, それに応答する細胞内蛋白質の発現調節について様々な研究が行われている^{3,5)}。NB 培養細胞は通常, 10% 牛胎児血清 (FBS) 培地下で生存, 進展を維持することが可能である⁶⁾。われわれは神経芽腫細胞株 GOTO 細胞を用いた予備実験で, 1% FBS 培養下で培養すると, 24 時間後で一時培養細胞数は減少するが, 48 時間以降には細胞数は漸増し, その後 4 日目 (96 時間) まで生存することを確認した。そこでこの実験モデルを用い, 低血清で培養した 24 時間の時点にて, 10% FBS 培養に比べて有意に発現する細胞内蛋白質を近年開発された蛍光標識 2次元ディファレンスゲル電気泳動システム (2D-DIGE) によるプロテオーム

解析⁷⁾によって捕らえ、蛋白質レベルでどのような調節が行われるのかを検討した。神経芽腫細胞腫における2D-DIGEによるプロテオーム解析の報告はこれまでにない。

実験方法

A. 実験細胞

1. ヒト神経芽腫細胞株GOTO細胞と培養

実験に供したGOTO細胞 (Health Science Research Resources Bank, Tokyo, Japanより購入)は、13ヶ月、男児の左副腎から発生した神経芽腫細胞腫から得られた細胞で、N-myc 増幅が約40倍とされる。本細胞を2 mM sodium pyruvate (Wako, Osaka, Japan), 10% ウシ胎児血清 (FBS, Wako, Osaka, Japan) に50 µg/ml surfate gentamycin (Wako, Osaka, Japan) を添加したRPM1640液体培地 (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて75 cm²のフラスコ (Falcon, Tokyo, Japan) 中で37°C, 5% CO₂, 95% 大気で培養した。

B. 検討項目と測定方法 (Table 1)

1. 低血清刺激による細胞の生存と形態学的変化

10% FBS 培地で培養したGOTO細胞が70-80%の細胞密度になってからPBSで洗浄後1% FBS 培地 (以下1% FBS群) および10% FBS 培地 (以下10% FBS群) に移し、いずれも72時間培養した。また培養後24時間、48時間、72時間に両群の細胞数と生存率をトリパンプルテストで測定し、両群間で比較した。統計解析はStudent's t-testで行った。統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。同時に細胞の形態学的変化を光学顕微鏡で観察した。トリパンプル染色は0.2%のtrypan blue (Invitrogen, Tokyo, Japan) で染色し、Glasstic slide 10 with grids 血球計 (HYCOR KOVA, garden grove, CA, U.S.A) で、細胞数と生存率を測定した。

2. サンプル調整と蛋白質解析

1% FBS群で細胞数及び生存率が最も減少した培養24時間の時点における1% FBS群の細胞についてプロ

テオーム解析を用い、10% FBS群に比べ有意に発現する細胞内蛋白質をとらえるために解析を行った。細胞は遠心後Grinding microtube (Amersham Pharmacia, Tokyo, Japan), 2次元用サンプル溶解バッファー (8 M Urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 20 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2 mM Pefabloc plus, Roche, Tokyo, Japan) でホモゲナイズし、超音波処理をしてから、10,000 g, 20分間、20°Cで遠心した。上清を濃縮後にサンプルのpHを約8.5に調整し、蛋白質の濃度を2D-Quant kit (Amersham Bioscience) にて測定した。

3. 蛍光標識2次元ディファレンスゲル電気泳動解析システム (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis: 2D-DIGE)

2D-DIGE法は、複数の試料を3種類の蛍光色素 (Cyanine dyes, Cy2, Cy3, Cy5) で標識し、これらを同一ゲル上で一括して2次元電気泳動を行う。この方法は複数試料を1枚のゲル上で解析するため、複数試料間での蛋白質発現変動の差異を高精度に解析することが出来る^{10, 11)}。Amersham Bioscienceのマニュアルに従って、2つの実験グループの間のタンパク質発現差異を統計学的に検出するために、4回の2-D DIGEを行った。1% FBS群のサンプル40 µgと10% FBS群のサンプル40 µgをそれぞれCy3, Cy5で標識した。内部標準として、実験のすべてのサンプルを同等量混合し、40 µg をCy2で標識した。1次元目は、dry polyacrylamide gel strips (IPG strip: 13 cm x 0.9 mm, pH 3-10, Amersham Bioscience) を使用し、20°Cで12時間膨潤後、プログラムした電圧勾配に従って行った (S1: Step 500 V 2 h, S2: Grad 1000 V 1 h, S3: Grad 8000 V 2.5 h, S4: Step 8000 V 1.5 h, S5: Step 50 V 20 h)。ゲルストリップは平衡化バッファー (125 mM Tris, 40% (w/v) glycerol, 3% (w/v) SDS, 65 mM DTT, pH 6.8) で15分間、25 mg/mlの濃度のヨードアセトアミドを含んだTris-buffer (125 mM Tris, 40% (w/v) glycerol, 3% (w/v) SDS, pH 6.8) で15分間処理した。2次元目 (SDS-PAGE) は、ストリップを10-20% リアルゲルプレート (13 cm x 15 cm x 0.7 mm, Bio-Craft, Tokyo, Japan) 上に乗せ、15 mA 定電流15分、30 mA 定電流3時間、電気泳動を行った。

4. 画像解析

ゲルイメージを蛍光イメージアナライザー (Typhoon 9410, Amersham Biosciences) で取り込んだ。取り込んだゲルイメージはImage Quantソフトウェア (Amersham Bioscience) で処理した。ゲル内のスポット検出とゲル間の差異解析は、それぞれDeCyderソフトウェア (Version 5.02, Amersham Biosciences) のDifferential In-gel Analysis (DIA) モードとBiological-Variation Analysis (BVA) モードを使用して行った。ゲルのスポット強度は内部標準で修正された。統計解析はStudent's t-testで行った。統計学的有意差は $p < 0.05$ とした。

Table 1. Experimental scheme

1. GOTO細胞の培養 (RPMI1640 + 10%FBS)
- ↓
2. 低血清刺激による細胞の生存率と形態変化
- ↓
3. サンプル調整
- ↓
4. 蛍光標識2次元ディファレンスゲル電気泳動解析法 (2-D DIGE)
- ↓
5. ゲルイメージの取り込み、画像解析
- ↓
6. 蛋白質発現量の差異解析、ゲルの切り出し
- ↓
7. 質量分析器による蛋白質同定

5. ゲル内トリプシン消化

ゲルは40%メタノール(Wako)と20%酢酸(Wako)で、30分間室温で固定した。Sypro Ruby 蛍光染色液(Bio-Craft)にて1時間室温で処理し、10%メタノールと7%酢酸で洗浄した。解析結果から、有意に発現量に差のあるスポットをゲルから切り出し、アセトニトリルを加えて、乾燥させた。ゲル片を50 mM Tris-HCl, pH 8.0のトリプシン(Roche, Tokyo, Japan) またはLys-C (Roche, Tokyo, Japan) 溶液を加え37°Cで20時間処理した。60%アセトニトリルを含む100 µg/ml 0.1% TFAを添加し、遠心して酵素消化ペプチドをゲルから抽出した。その後、抽出溶液を遠心乾燥機で乾燥させた。

6. LC-MS/MS (liquid chromatography/tandem mass spectrometry)

抽出したペプチドを0.1% TFAに溶かしてから、オートサンプラー、HTC-PAL (CHROMSIS LLC, Alexandria, VA), と高速液体クロマトグラフィー, DiNa (KYA Technologies, Co, Tokyo, Japan), を装備した質量分析器, LCQ Advantage (Thermo Electron Corporation, Waltham, WA), を用いて解析した。液体クロマトグラフィーにはReverse phase Capillary column (Develosil ODS-HG5, 0.15 mm i.d. X 50 mm, Nomura Chemical Co. Ltd., Seto, Japan)を用い、ペプチドは、300 nl/minの流速で、0.1%ギ酸溶液中でアセトニトリル濃度を4-72%の直線的に濃度を変化させて、溶離した。得られたデータはSEQUEST (Thermo Electron Corporation, Waltham, WA)およびMASCOT (Matrix Science)⁸⁾を用いて解析した。

結果

1. 10% FBS群と1% FBS群の細胞数と生存率(Fig. 1)

1% FBS群は培養後24時間で細胞数は培養開始時に比べ減少し($p=0.001$)、かつ生存率も66%に低下した。しかし低下は一時的で、それ以降は徐々に増加し、48時間で70%、72時間で72%まで回復した。一方、10% FBS群の細胞は減少することなく経時的に増加し、生存率も培養24時間で151%、48時間後210%、72時間後372%と増強した。生存率の有意差は24時間後 $p=0.002$ (*)、48時間後 $p=0.0006$ (**), 72時間後 $p=0.00003$ (***)だった。

2. GOTO細胞の形態変化(Fig. 2)

GOTO細胞は1% FBS群では24時間以降は、10% FBS群に比べて神経突起の伸長現象を認めた。24時間以降も1% FBS培地で培養を続けると、神経突起はさらに伸長した。

3. 画像解析(Fig. 3)

マスターゲル上の3472スポットの中から発現に差異のあった38のスポットを検出した。さらにスポットの画像から良好なピークが得られた9つのスポットを

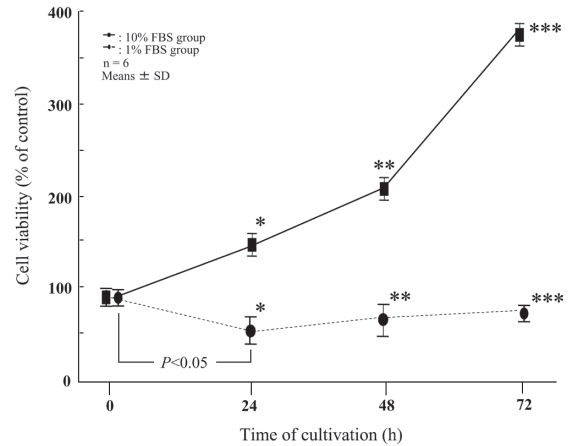


Fig. 1. The viability rates of GOTO cells in the 1% and 10% FBS groups. The 10% FBS group showed the following viability rates of GOTO cells at 24, 48 and 72 h of cultivation: 151%, 210% and 372%, respectively. The 1% FBS group showed the following viability rates of GOTO cells at 24, 48 and 72 h of cultivation: 66%, 70% and 72%, respectively. (significant difference; *: $p=0.002$, **: $p=0.0006$, ***: $p=0.00003$, Student's t-test, $p<0.05$).

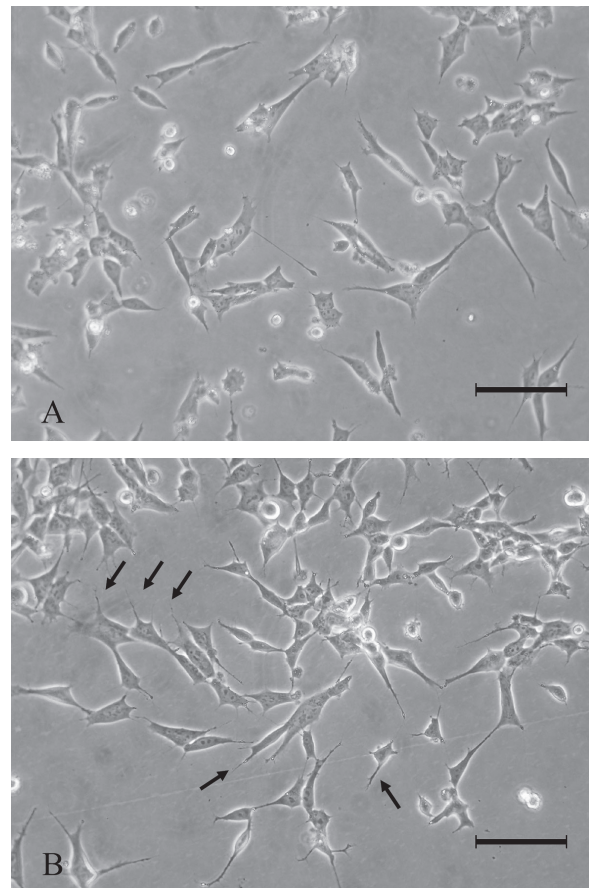


Fig. 2. Typical inverted photomicrographs of GOTO cells. GOTO cells were tear-drop, small-sized cells, resemble fibroblasts and proliferated densely. GOTO cells at 24 h of cultivation in the 1% FBS medium showed neurite outgrowth compared to the 10% FBS medium (arrows). Scale bar: 100 µm. Panel A: 10% FBS medium; Panel B: 1% FBS medium.

切り出した。1% FBS群では10% FBS群に比較して、6つのスポットで発現増加を、3つのスポットで発現減少を認めた。

4. LC-MS/MS (liquid chromatography/tandem mass spectrometry) (Table 2)

発現増加を認めた6つのスポットについて蛋白質が同定できたのは5つで、1つは同定出来なかった。同定出来た蛋白質は、Cytochrome C (Mr 16752, pI 6.3)^{9,10}, endoplasmic reticulum calcium-binding protein 55 (ERC-55; Mr: 36854, pI 4.26)^{11,12}, Laminin-binding protein (LBP; Mr: 32702, pI 4.76)¹⁶⁻¹⁹, Stathmin (Mr 17161, pI 5.77)^{22,23}, pre-mRNA splicing factor SF2 (Mr 31314, pI 4.79)^{24,25}であった。発現減少を認めた3つのスポットのうち蛋白質が同定出来たのは1つで、Heat shock cognate protein 70 (HSC70; Mr 70854, pI 5.37)¹³⁻¹⁵であり、残り2つは同定出来なかった。

考 察

神経芽細胞腫 (NB) は多様性 (予後良好群, 予後不良群, 自然退縮群または増殖型腫瘍) を有する。これまで nerve growth factor (NGF) の receptor である TrK ファミリーの発現が NB の分化, 生存および増殖に関与することが指摘されている²⁾。しかし, 進展や生存に関連し, NB に特異的に発現している蛋白質や癌抑制遺伝子の転写などについて十分な解明がなされていない。一般に腫瘍細胞は増殖のために十分な酸素と栄養を必要とする²⁶⁾。従って, 多くの細胞成長因子や栄養成分を含む血流を操作することは癌治療のひとつの

方法であり, 塞栓術がその代表的なものである。血流の減少が血清濃度の低下という環境を招くことも容易に推測される。血清濃度の低下という危機的環境において腫瘍細胞が生存, 増殖に向けどのように応答するのか, 即ち, 細胞内の蛋白質レベルでどのような調節がおこなわれるのかを理解することは, NB の特異的病態の解明に重要なヒントを与えてくれると思われる。

神経芽細胞は通常, 10% FBS 培地で継代培養される⁶⁾。交感神経節細胞の培養では, NGF などの神経栄養因子を含まない培地, 即ち培養液の血清濃度を低下させると培養細胞は死滅していく²⁷⁾。しかし GOTO 細胞は無血清培地でも生存し, 数時間で神経突起の伸長現象が認められることが既に知られている²⁸⁾。われわれの予備実験でも 1% FBS 群の GOTO 細胞は, 10% FBS 群に比べ神経突起の伸長現象を認めた (Fig. 2)。また, 24 時間後に細胞数は減少するが 48 時間以降には漸増した。この減少から増加に至る期間は, 低濃度血清という危機的環境におかれた細胞が生存, 増殖に向け, 細胞内で蛋白質の発現, 調整を行っている可能性が推測される。プロテオーム解析の結果, 10% FBS 群に比べ 1% FBS 群 24 時間の時点にて 6 つの蛋白質の発現に有意差を認め, 各々, Cytochrome C, endoplasmic reticulum calcium-binding protein 55 (ERC-55), Heat shock cognate protein 70 (HSC70), Laminin-binding protein (LBP), Stathmin, pre-mRNA splicing factor SF2 と同定された。

Cytochrome C はアポトーシスに関与する蛋白質

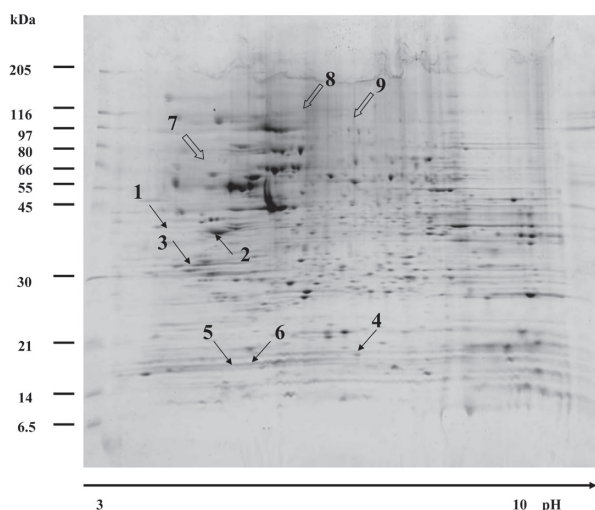


Fig. 3. Two dimensional gel electrophoresis images of GOTO cells. The first dimensional gel electrophoresis was conducted with dry polyacrylamide gel strips, and the two electrophoresis by SDS-PAGE. The gel was stained with Spyro Ruby. The ordinate denotes molecular weight (kDa), and the abscissa isoelectric point (pI). Arrows indicate the gel spots where the 1% FBS group showed statistically significant changes (up-regulation: →; down-regulation: ⇒).

Table 2. Outlines of proteins which showed significant changes in the expression of GOTO cells identified by LC-MS/MS analysis in 1% FBS groups

Spot No.	Accession No.	Theoretical (Mr/pI)	p	Alteration	Protein name
1	I37371	36854/4.26	0.048	↑	ERC-55
2	P08865	32702/4.79	0.033	↑	Laminin binding-protein
3	JT0762	31343/4.74	0.031	↑	Pre-mRNA splicing factor SF2
4	P16949	17161/5.77	0.038	↑	Stathmin
5	Q8TB65	16752/6.30	0.0094	↑	Cytochrome C
6	—	—	0.043	↑	—
7	A27077	70854/5.37	0.0086	↓	Heat shock cognate protein 70
8	—	—	0.044	↓	—
9	—	—	0.034	↓	—

Student's t-test; $p < 0.05$

Six proteins in GOTO cells which were identified in this study are listed along with theoretical molecular weight (kDa), theoretical isoelectric point (pI), and results of the statistical analysis by Student's t-test ($p < 0.05$). Spot No. corresponds to each number in Fig. 4. Changes in protein expression in the 1% FBS group are shown with arrows (up-regulation: ↑; down-regulation: ↓; not identified: —).

の1つである。アポトーシスは生体の恒常性を保つための重要な役割を果しており、細胞はダメージを受けたり増殖のバランスが崩れるとアポトーシスを起こし除去される。細胞にストレスを与えると細胞はCytochrome Cをミトコンドリアから細胞質内に放出し、そのCytochrome CはApaf-1やcaspase-9と提携して細胞質内のアポトーシス関連酵素を活性化する。其の結果、アポトーシスをおこし、最終的に細胞を死に誘導する⁹⁾。従ってCytochrome Cの発現の増加は低濃度血清というストレスの加わった1% FBS培養24時間の細胞数および生存率の低下につながったと考えられる。しかし、最近の研究において、細胞が低栄養にさらされた時、ミトコンドリア内の酸化ストレスの縮小が認められた¹⁰⁾。ミトコンドリアの数の増加はミトコンドリア内蛋白質であるCytochrome Cの増加にもつながり、GOTO細胞におけるCytochrome Cの増加はアポトーシスだけでなく、ストレスに対する細胞の生存維持にも関与している可能性が強い。

一方で、ERC-55の発現増加が認められた。ERC-55は小胞体に存在する蛋白質で、細胞の増殖と分化の伝達経路に関与するカルシウム結合蛋白質ファミリーのひとつである。他の蛋白質との相互作用は血清とカルシウム濃度に依存すると言われている¹¹⁾。交感神経節細胞は、培養液中の神経栄養因子であるNGFを除去しても、細胞内カルシウムイオン濃度を増加させたり、ある種の蛋白質を投与することで、細胞死を阻止出来ることが知られている²⁷⁾。ERC-55は他の蛋白質と結合し、活性後に細胞の退化、アポトーシスを制御し、アポトーシスによる細胞死を阻止する作用を有する。即ち細胞内での重要な増殖調整因子であり¹¹⁾、1% FBS群で認められたERC-55の発現増加は危機的環境におかれ、死滅、減少したGOTO細胞が生存に向け、アポトーシスを極力おさえようとする反応の表れであると思われる。この一連の応答はHSC70の発現にも現れている。HSC70は1% FBS群で唯一発現の減少を認めた蛋白質である。いわゆるHeat shock proteinは様々な物理化学的ストレスに誘導され、多くはストレスに対する細胞の応答として発現するが非ストレス下でも構成的に発現し、細胞の分化、増殖、生存、機能など様々な細胞の営みに不可欠な蛋白質でもある。

HSC70は癌細胞の細胞表面に発現しているといわれ、腫瘍発生と増殖の指標や腫瘍に対する免疫治療、およびウイルス感染の受容体としての機能が注目されているが、NBとの関係は不明である^{13,14)}。細胞に熱を加えると一般的に増殖は抑制される。一方で細胞癌化ではHSC70が例外なく増加する。しかもHSC70遺伝子を過剰に発現させると細胞の増殖がある程度抑制される¹⁵⁾。以上のことはHSC70が細胞増殖を制御する働きを有する事を示唆している。またHSC70は血清中のepidermal growth factorなどの成長を刺激する因子に

よって、細胞表面に発現する¹³⁾。従って1% FBS群における培養24時間でのHSC70の発現減少は培養液中のこれらの成長因子の濃度の低下およびGOTO細胞の数の減少、増殖率の低下によって負に誘導されたものと考えられ、結果的に72時間後の細胞増殖に繋がったと考えられる。

1% FBS群では10% FBS群に比べ、培養24時間で細胞の生存率が最低となり、神経突起伸長現象が認められ、Laminin receptor(LR)であるLBPの発現が著明となった。細胞外マトリックス分子であるLamininが癌細胞の接着移動能を促進することや転移性癌細胞で膜上のLRの発現が高いことも報告されている¹⁶⁾。一方で神経細胞突起を伸長させ、神経細胞の接着と分化を促進することも知られている¹⁷⁾。こういった細胞マトリックス分子は悪性転換すると合成や蓄積が減少するとも指摘されており、癌の増殖や浸潤過程における接着、遊離の制御に関与している^{16,18,19)}。1% FBS培養後48時間には生存率の増加が認められたと考えられる。同じく発現増加を認めたStathminは、oncoprotein18(Op18)またはmetablastinとして良く知られている細胞質内蛋白質で細胞シグナル伝達を統制する機能を有する。stathminはほとんどのNBの原発巣にて発現が認められている。一般に細胞周期においてresting stateにある細胞内のstathminの発現は少なく、検出の限界レベルにあるが細胞増殖に進むと増加し、体細胞の分裂(M)期にはピークに達する²⁰⁾。M期においては細胞分裂の過程で形成された紡錘極の周辺に微小管構造中心が出来、そこでtubulinと呼ばれる蛋白質が重合して微小管となる。stathminはこのtubulinと結合し、微小管の安定化に影響し、ひいてはNBの薬剤耐性を誘導するとされる^{21,22)}。1% FBS群でstathminの発現増加をみたことは生存する細胞が細胞周期においてM期にあることを示唆している。一方、stathminは神経特異的な突起伸長関連分子SCG10とアミノ酸配列が酷似しており、SCG10はstathminの神経特異的なアイソフォームであると言われている²³⁾。従ってstathminの発現増加はLamininと同様、神経突起伸長にも関与している可能性がある。

同様に発現のあったpre-mRNA splicing factor SF2は筋小胞体蛋白質(sarcoplasmic reticulum protein, SR protein)のひとつでありmRNAのプロセッシング過程において転写の活性や特定のRNA配列を認識し、結合したり他の蛋白質と相互作用してスプライシング反応の調節に関与する。このようなSR蛋白質の選択的スプライシング反応は転写が進行している部位で行われ、細胞特異的な蛋白質の発現に重要な役割を果している。即ち、真核生物がその多様性を生み出すために獲得した遺伝子発現制御システムと考えられている^{24,25)}。発現の増加が認められたことはGOTO細胞においても形質転換に向けた反応が行われているこ

とを示唆している。

今後、NBにおいて選択的スプライシング反応の調節機構が解明されれば転写調節の研究と相まって、NBの形質転換のメカニズム解明に貢献すると思われる。

結 論

2D-DIGEによるプロテオーム解析にて、1% FBSで培養後24時間目のGOTO細胞内で、アポトーシス、増殖、分化に関する6つの蛋白質の発現増加や減少が認められた。これらは細胞増殖促進、抑制の相反する作用を持つ蛋白質だった。これらの蛋白質の発現増加は低血清濃度という危機的環境において、生存や増殖の継続に向けた分子レベルでの調節機構が、GOTO細胞内で生じていることを示唆している。NBの分化、増殖は、NGFと言った生物学的活性因子や転写因子、受容体などによって複雑に制御されている。今回の様なストレス負荷時に発現する蛋白質の解析と同定は、神経芽腫の治療戦略上の標的として重要な情報を提供する可能性が示唆された。加えて、NBの多様性を理解する上でも有用である。

本稿の要旨は the 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, (Washington, DC, November, 2005), 第106回日本外科学会総会(東京, 2006年3月), 第43回日本小児外科学会総会(秋田, 2006年6月)で発表した。

謝 辞

この稿を終えるにあたり、埼玉医科大学小児外科里見昭教授の御校閲、同生理学教室吉村和法先生、東京都精神医学総合研究所亀谷富由樹先生の御指導に深謝致します。また蛋白質の発現解析に関して藤牧香代氏の御指導に深謝致します。

参考文献

- Grosfeld JL. Neuroblastoma. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EQ, Coran AG, editors. *Pediatric Surgery*. 5th ed. St. Louis Mosby-Year Book Inc 1998;p:405-19.
- Nakagawara A. The NGF story and neuroblastoma. *Med Ped Onc* 1998;31:133-5.
- Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumor growth. *Cancer* 2002;2:38-47.
- Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60s ribosomal subunits, alters micro RNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:1865-70.
- Shindo H. Effect of anti-cancer drugs on the expression of the N-myc protein during the cell cycle of neuroblastoma cells. *J Med Sch Toho Univ* 1991; 37:782-92.
- Sekiguchi M, Oota T, Sakakibara K, Inui N, Fujii G. Establishment and characterization of a human neuroblastoma cell line in tissue culture. *Jap J Exp Med* 1979;49:67-83.
- Sitek B, Apostolov O, Stühler K, Pfeiffer K, Meyer HE, Eggert A, et al. Identification of dynamic proteome changes upon ligand activation of Trk-receptors using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2005;3:291-9.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein Identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20:3551-67.
- Suzuki Y, Takahashi-Niki K, Akagi T, Hashikawa T, Takahashi R. Mitochondrial protease Omi/HirA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell death Differ* 2004;11:208-16.
- López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1768-73.
- Honoré B, Vorum H. The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca²⁺-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells. *FEBS Lett* 2000;466:11-8.
- Sherman L, Itzhaki H, Jackman A, Chen JJ, Koval D, Schlegelt R. Inhibition of serum-and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation and binding to E6BP. *Virology* 2002; 292:309-20.
- Sato K, Narumi K, Sakai T, Abe T, Kikuchi T, Matsushima K, et al. Cloning of 67-kDa laminin receptor cDNA and gene expression in normal and malignant cell lines of the human lung. *Cancer Lett* 2004;62:199-203.
- Lamoureux P, Zheng J, Buxbaum RE, Heidemann SR. A cytomechanical investigation of neurite growth on different culture surfaces. *J Cell Biol* 1992;118: 655-61.
- Pei DP, Han Y, Narayan D, Herz D, Ravikumar TS. Expression of 32-kDa laminin-binding protein mRNA in colon cancer tissue. *J Surg Res* 1996;61:120-6.
- Wewer UM, Liotta LA, Jaye M, Ricca GA, Dorhan WN, Claysmith AP, et al. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells

- that have different abilities to bind laminin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:7137-41.
- 17) Wimmer K, Kuick R, Thoraval D, Hanash SM. Two-dimensional separations of the genome and proteome of neuroblastoma cells. *Electrophoresis* 1996;17:1741-51.
- 18) Nishio K, Nakamura T, Koh Y, Kanazawa F, Tamura T, Saijo N. Oncoprotein 18 overexpression increases the sensitivity to vindesine in the human lung carcinoma cells. *Cancer* 2001;91:1494-9.
- 19) Paolo GD, Pellier V, Catsicas M, Antonsson B, Catsicas S, Grenningloh G. The phosphoprotein stathmin is essential for nerve growth factor-stimulated differentiation. *J Cell Biol* 1996;133:1383-90.
- 20) Grenningloh G, Soehrman S, Bondallaz P, Ruchti E, Cadas H. Role of the Microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J Neurobiol* 2004;58:60-9.
- 21) Dauksaite V, Akusjärvi G. Human splicing factor ASF/SF2 encodes for a repressor domain required for its inhibitory activity on pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2002;277:12579-86.
- 22) Li X, Wang J, Manley JL. Loss of splicing factor ASF/SF2 induces G2 cell cycle arrest and apoptosis, but inhibits internucleosomal DNA fragmentation. *Genes Dev* 2005;19:2705-14.
- 23) Azuma K, Shichijo S, Takedatsu H, Sawamizu H, Itoh K. Heat shock cognate protein 70 encodes antigenic epitopes recognised by HLA-B4601-restricted cytotoxic T lymphocytes from cancer patients. *British J Cancer* 2003;89:1079-85.
- 24) Sagara Y, Tsujimura M, Kojima E, Shiraki H, Maeda Y. 71 kDa heat shock cognate protein on the surface of human peripheral blood mononuclear cells. *Jap J Trans Med* 2003;49:33-9.
- 25) Yehiely F, Oren M. The gene for the rat heat-shock cognate, hsc 70, can suppress oncogene-mediated transformation. *Cell Growth Differ* 1992;3:803-9.
- 26) Ho R, Minturn JE, Hishiki T, Zhao H, Wang Q, Cnaan A, et al. Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2005;65:9868-75.
- 27) Johnson EM, Koike T, Franklin J. A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol* 1992;115:163-6.
- 28) Ando K. Post-transcriptional regulation of protease nexin-1 by thrombin in a neuroblastoma cell line, GOTO. *Bulletin of Kobe Univ Med Sch* 1996;60:75-80.