

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06866

研究課題名(和文) 熱ショック転写因子(HSF1)を標的とするがん治療法開発に向けた分子基盤の確立

研究課題名(英文) Molecular basis for the development of anti-tumor therapy by targeting HSF1.

研究代表者

小田 司(Oda, Tsukasa)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：10323643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック転写因子HSF1は熱ショック蛋白質(HSPs)や細胞増殖に関与する蛋白など多くの遺伝子発現を制御している。HSF1の欠乏は細胞老化を誘導するが、その分子機構は明らかではない。私たちはヒト線維芽細胞のHSF1欠乏誘導性細胞老化において、1)主要なHSPsの減少、およびタンパク質毒性ストレスの増加を伴わずに誘導されること、2)p53-p21経路の活性化に依存すること、3)p53安定化の原因の一部は、MDM2結合阻害因子dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2)の発現誘導によるもの、4)DHRS2の発現が老化誘導に寄与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Heat shock transcription factor 1 (HSF1) regulates the expression of a wide array of genes, control of the expression of heat shock proteins (HSPs) and cell growth. Although acute depletion of HSF1 induces cellular senescence, the underlying mechanisms are poorly understood. Here, we report that HSF1 depletion-induced senescence (HDIS) of human diploid fibroblasts (HDFs) was independent of HSP-mediated proteostasis but dependent on activation of the p53-p21 pathway, partly because of the increased expression of dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2), a putative MDM2 inhibitor. We observed that HDIS occurred without decreased levels of major HSPs or increased proteotoxic stress in HDFs. Importantly, we found that activation of the p53-p21 pathway due to reduced MDM2-dependent p53 degradation was required for HDIS. Furthermore, we provide evidence that increased DHRS2 expression contributes to p53 stabilization and HDIS.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：細胞老化 HSF1 p53 MDM2 DHRS2

1. 研究開始当初の背景

熱ショック転写因子(HSF1)は、タンパク変性ストレスに应答して、熱ショックタンパク質(HSP)などの分子シャペロンを誘導する転写因子として同定された。しかし、近年、非ストレス条件下においても、HSF1は多くの遺伝子の発現制御に関わっていることが明らかにされている。HSF1は腫瘍細胞の発生や増殖を促進することから、その生理的役割や標的遺伝子の機能解析は、がん治療に新たな知見をもたらす可能性がある。

我々は、RNAiによるHSF1の抑制が、p53-p21依存的に、ヒト線維芽細胞に細胞老化を誘導(HSF1枯渴誘導性細胞老化)することを見出した。また、このHSF1枯渴誘導性細胞老化は、活性型RAS導入細胞で亢進することが分かった。

2. 研究の目的

HSF1枯渴誘導性細胞老化におけるHSPsやタンパク変性ストレスの関与を明らかにする。

HSF1枯渴誘導性細胞老化におけるp53活性化の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

ドキシサイクリン(DOX)処理でHSF1を標的とするshRNA(shHSF1)を発現誘導できるヒト線維芽細胞株を作製し、主な実験に使用した。

細胞老化の評価は、細胞の増殖、チミジンアナログ取込みによるS期細胞の割合、Senescence-associated β -galactosidase (SA-gal) 陽性率、Senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) 陽性率、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子の発現、フローサイトメトリーによる細胞形態の変化を測定することによりおこなった。遺伝子の発現抑制は、標的遺伝子に対するshRNAをレンチウイルスベクターで導入することによりおこなった。タンパク質の発現は、ウエスタンブロットをおこない、NIH Imageで定量した。mRNA量はリアルタイムPCRで定量した。p53タンパク質の半減期は、シクロヘキシミド(CHX)を用いた方法でおこなった。

4. 研究成果

正常ヒト線維芽細胞(MRC-5, TIG-1, TIG-3)やhTERT不死化ヒト線維芽細胞(OUMS-36T-3F)のHSF1をshRNAで抑制すると細胞老化が誘導された。DOXでshHSF1が誘導されるOUMS/Tet-on shHSF1細胞を作製し、DOX処理すると同様に細胞老化が誘導された(図1)。

HSF1抑制で、主なHSPsの発現量は、mRNAレベル、タンパク質レベルで低下してい

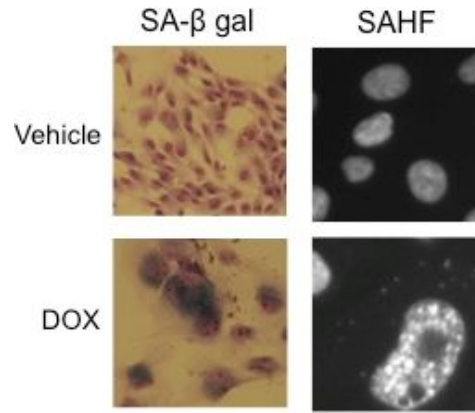


図1 HSF1枯渴誘導性細胞老化
OUMS/Tet-on shHSF1細胞をDOX存在下(下段)で12日間培養し、SA-gal陽性細胞(左)とSAHF陽性細胞(右)を検出した。

なかった。また、免疫染色法を用いて、老化細胞と正常細胞とのHSP72発現量をsingle cellレベルで比較したが、違いは見られなかった。さらにHSP72ファミリー阻害剤でタンパク変性ストレスを増加させると、増殖は抑制されたが、細胞老化は誘導されなかった。

HSF1枯渴誘導性細胞老化において、p53とp21のタンパク発現が増加した。p53を分解するHPV16 E6やshp53の導入により、細胞老化は抑制された。また、shp21の導入によっても細胞老化は抑制された。

シクロヘキシミドを用いた実験により、HSF1抑制はp53の半減期を著しく延ばすこと分かった(図2)。また、p53のポリユビキチン化が低下していた。Nutlin-3を用いた実験により、HSF1抑制でp53のE3 ligaseであるMDM2が不活性化していることが示唆された。

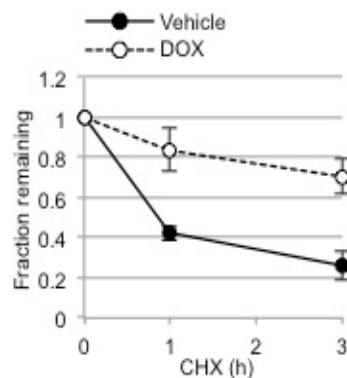


図2 HSF1抑制によるp53の安定化
DOX存在下で7日間培養したOUMS/Tet-on shHSF1細胞にシクロヘキシミドを加え、1、3時間後にウエスタンブロットでp53発現量を定量した。HSF1抑制でp53の半減期は~40分から3時間以上に延びた。

HSF1 枯渴誘導性細胞老化は、HSF1 野生型を導入すると抑制されたが、転写能を欠く HSF1 変異体では抑制されなかった。同様に、HSF1 抑制による p53-p21 の活性化は HSF1 野生型で抑制されたが、HSF1 変異型では抑制されなかった。HSF1 抑制で発現変化する遺伝子をマイクロアレイで同定し、その中から MDM2 制御因子を探索した。その結果、MDM2 結合阻害因子として報告されている Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2) (Mol Cell Biol vol.30:3981-3993, 2010) の発現が著しく高まっていることが分かった。HSF1 抑制による DHRS2 の発現増加は、リアルタイム PCR、およびウエスタンブロットで確認した(図3)。HSF1 野生型の導入は、この DHRS2 発現を抑制したが、HSF1 変異型は抑制しなかった。また、HSF1 抑制による DHRS2 の発現はヒト線維芽細胞 (MRC-5, TIG-3) でも確認された。

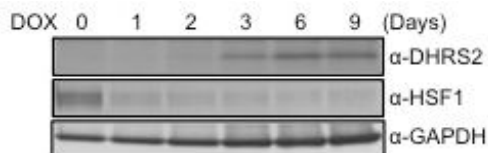


図3 HSF1 抑制による DHRS2 の発現誘導
OUMS/Tet-on shHSF1 細胞を DOX 処理し、HSF1、DHRS2 発現量をウエスタンブロットで調べた。

DHRS2 発現が高いヒト骨肉腫細胞株 U2OS を用いて MDM2 に結合することを確認した。さらに DHRS2 に対する shRNA (shDHRS2) を導入したヒト乳がん細胞株 MCF7 では、p53 の半減期が短くなり、p53、p21 の発現レベルが低下した。shDHRS2 を導入した OUMS/Tet-on shHSF1 細胞を DOX 処理すると、コントロール shRNA を導入した細胞に比べて、p53、p21 の発現量が低下した。このとき、p53 の半減期が短くなっており、ポリコピキチン化 p53 も増加していた。また、shDHRS2 を導入した OUMS/Tet-on shHSF1 細胞における HSF1 枯渴誘導性細胞老化は、コントロール shRNA を導入したものより低下していた(図4)。DHRS2 が、HSF1 の標的遺伝子か否かを明らかにするため、クロマチン免疫沈降法をおこなったが、それを示す結果は得られなかった。

本研究により、HSF1 枯渴誘導性細胞老化には、HSPs 発現の低下やタンパク変性ストレスは関与していないことが明らかになった。HSF1 は非ストレス条件

下では間接的に DHRS2 発現を抑制しており、HSF1 枯渴が生じると DHRS2 が発現誘導され、MDM2 に結合阻害し、p53 が安定化され細胞老化が誘導されるモデルが考えられる(図5)。

活性型 RAS 導入細胞では、コントロール細胞に比べ、HSF1 枯渴誘導性細胞老化が亢進していた。また、このとき、DHRS2 mRNA の発現も高まっていた。この強い DHRS2 mRNA 発現が、活性型 RAS 導入細胞の HSF1 枯渴誘導性細胞老化の亢進に関与しているか否かは今後の課題である。がん細胞特異的に DHRS2 を活性化させる薬剤は、p53 を介した新しい抗がん剤の開発につながる可能性がある。

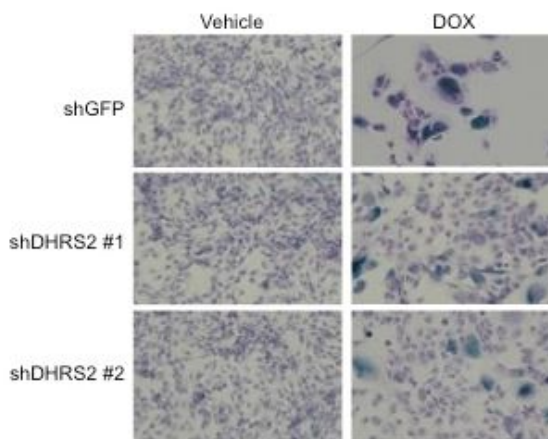


図4 DHRS2 ノックダウンによる HSF1 枯渴誘導性細胞老化の抑制

コントロール shRNA (shGFP)、shDHRS2 (#1, #2) を導入した OUMS/Tet-on shHSF1 細胞を DOX 処理し、8 日後に SA-gal assay をおこなった。shDHRS2 を導入した細胞では、コントロール細胞に比べ、SA-gal 陽性率が低下した。

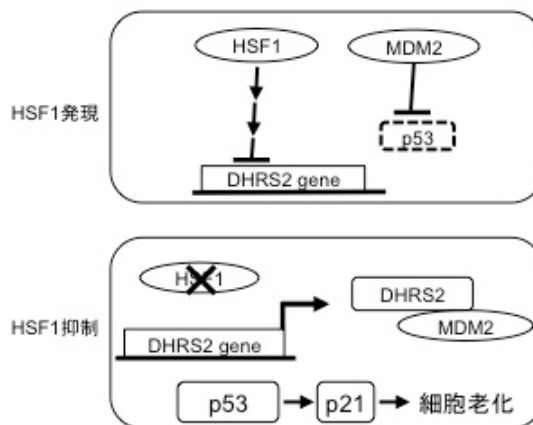


図5 HSF1 枯渴誘導性細胞老化のモデル
HSF1 は DHRS2 の発現を抑制しており、p53 は MDM2 により分解される(上)。HSF1 抑制が生じると、DHRS2 が発現誘導され、MDM2 に結合阻害する。その結果、p53 が安定化され細胞老化が誘導される。

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1件)

Tsukasa Oda, Takayuki Sekimoto, Kiminori Kurashima, Mitsuaki Fujimoto, Akira Nakai and Takayuki Yamashita. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts. Journal of Cell Science (2018) 131, jcs210724. doi:10.1242/jcs.210724 査読有

[学会発表](計6件)

小田 司 他、MDM2 阻害因子 Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2)の細胞老化における役割. 第40回日本分子生物学会年会 (2017)

Tsukasa Oda et.al, HSF1 depletion induces senescence through DHRS2-MDM2-p53 pathway in immortalized human diploid fibroblasts (iHDFs). 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2017)

小田 司 他、熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1)の発現抑制による細胞老化はMDM2阻害蛋白質 Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2)に制御されている可能性がある. 第39回日本分子生物学会年会 (2016)

Tsukasa Oda et.al, HSF1 depletion induces cellular senescence independently of proteotoxic stress in immortalized human diploid fibroblasts (iHDFs). 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2016)

小田 司 他、Heat shock factor 1 (HSF1)抑制による老化誘導機構は細胞種により異なり、またHSPs非依存である. 第38回日本分子生物学会年会 (2015)

Tsukasa Oda et.al, Acute inhibition of heat shock factor 1 (HSF1) induces cellular senescence through cell type-dependent mechanisms. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (2015)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://molgen.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 司 (ODA, Tsukasa)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号: 10323643

(2)研究分担者

なし()

研究者番号:

(3)連携研究者

山下 孝之 (YAMASHITA, Takayuki)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号: 10166671

(4)研究協力者

中井 彰 (NAKAI, Akira)
山口大学・大学院医学系研究科・教授

藤本 充章 (FUJIMOTO, Mitsuaki)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授