

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07360

研究課題名（和文）分子シャペロンHSP70によるがんの転移制御

研究課題名（英文）Regulation of cancer metastasis by molecular chaperone HSP70

研究代表者

塩田 正之（Shiota, Masayuki）

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30381990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト膵癌細胞PANC-1のHSP70欠損細胞、再構成細胞を樹立し、表現型と分子機序の解析を行った。HSP70欠損によって細胞遊走が抑制したが、HSP70再構成によって優位に回復した。プロテオーム解析を行ったところ、HSP70欠損によりアドヘレンスジャンクションに関するタンパク質群が顕著に発現亢進した。特に  $\beta$ -カテニンはHSP700依存的にリン酸化レベルが変化することでユビキチン-プロテアソーム系で常時分解されていることが判明した。実際に、細胞遊走部位でHSP70と  $\beta$ -カテニンの発現は逆相関していた。またヒト膵癌患者の癌組織でも両分子が逆相関している部分が存在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって膵癌細胞ではHsp70がカテニンを分解誘導することで細胞間接着を低下させ、細胞遊走を促進していることが示唆された。Hsp70が結合するコシャペロンに依存して分解を促進するという興味深い知見を得た。転移の初発段階は原発腫瘍の細胞が細胞間接着から離脱することである。がんで高発現したHsp70はカテニンを分解促進し、細胞間接着を低下させることが転移のトリガーになっているのかもしれない。また作出した細胞膜局在Hsp70抗体は顕著な抗腫瘍活性を有していた。有望な創薬シーズを取得すると同時に、細胞膜上のHsp70ががんの生存に必須である可能性や抗腫瘍免疫を抑制しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Heat shock protein 70 (HSP70) is highly expressed in cancer and are multilaterally related to malignant transformation. However, the molecular mechanism of HSP70s in cancer metastasis remains elusive. To elucidate the significance of HSP70s in cancer migration, we established HSP70-knockout human pancreatic adenocarcinoma PANC-1 cells. We identified that cell migration activity was significantly reduced in HSP70-KO cells to that in parental PANC1 cells. Proteomic analysis indicated that components of adherence junctions, such as N-cadherin and  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -catenins, were significantly increased in HSP70-KO cells. In particular,  $\beta$ -catenin was found to be constantly degraded by the ubiquitin-proteasome system via Hsp70-dependent phosphorylation. Indeed, Hsp70 showed inverse correlation with  $\beta$ -catenin in migrated cells. These results suggested that HSP70 affect cancer cell migration through  $\beta$ -catenin regulation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：プロテオスタシス HSP70 腫瘍生物学

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

HSP70 (HSPA1A) に代表される HSP70 ファミリーは 13 種以上のメンバーからなり、新生されるタンパク質をフォールディングする分子シャペロンである。なかでも HSP70 (HSPA1A) ストレス応答分子としても知られ、ストレス負荷に応じて発現誘導され、変性したタンパク質をリフォールディングする。すなわちタンパク質の品質を管理し、タンパク質の恒常性を維持することで細胞を保護している。HSP70 はがんで発現亢進し、抗癌剤耐性に関与するが、近年、HSP70 がシャペロン活性非依存的な細胞死の抑制やエクソソームを含む細胞外 HSP70 の作用、さらには細胞膜に局在する HSP70 の存在と機能が報告されている。したがって HSP70 の生理機能を理解し、治療に役立てるには、カノニカルなシャペロンとしての機能にとらわれず、細胞外や細胞膜の HSP70 も含め、HSP70 特異的に解析する必要がある。

膵がんは 5 年生存率が 10% 以下と最も低く、また主たる治療手段である化学療法の適用抗癌剤も限定されていることから、抗癌剤耐性の克服や新規薬剤開発が切望されるがんである。興味深いことに膵がんでは HSP70 の発現がきわめて高い。そこで膵がんにおける HSP70 の機能を明らかにし、治療につなげるために膵がん細胞 PANC-1 の HSP70 (HSPA1A) 欠損細胞を樹立した。細胞生物学的な解析の結果、欠損細胞では薬剤感受性の著明な亢進に加え、遊走能の低下、細胞間接着の亢進を認めた。一方、HSP70 の過剰発現は細胞間接着を低下させたことから、HSP70 量の増減が一群の細胞間接着分子の発現を変化させ、細胞間接着を制御していることが示唆された。

### 2. 研究の目的

HSP70 欠損細胞を用いて細胞間接着の制御にどのように関わるのか明らかにする。HSP70 が転移の初発段階を制御するマスタースイッチである可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Hsp70 欠損による細胞遊走の抑制

transwell アッセイ、wound healing アッセイにて細胞遊走能を調べた。また U 底 96 穴プレートを用いて、1 週間の三次元培養を行い、スフェロイドの形成を評価した。

#### (2) Hsp70 欠損によるタンパク質発現変化

Hsp70 欠損におけるタンパク質発現変化を解析するために密度勾配遠心にて細胞膜画分、細胞質画分を分画し、それぞれプロテオーム解析した。解析ソフト Scaffold による定量で 2 倍以上増減した分子を抽出し、Metascape にてエンリッチメント解析を行った。プロテオーム解析の結果はウェスタンブロットにて検証した。

#### (3) Hsp70 による $\beta$ -カテニン分解メカニズム

タンパク質分解の関与を解析するため、シクロヘキシミドを用いた CHX Chase を行った。また分解経路を調べるためにプロテアソーム阻害剤、リソソーム阻害剤、オートファジー阻害剤によるカテニンの発現を解析した。さらにユビキチン-プロテアソーム系で分解されていることを明らかにするために K48 ユビキチン化タンパク質を認識する K48TUBE でアフィニティー精製を行った。

#### (4) Hsp70 に依存したカテニンの局在

定法にのっとり、野生型、欠損細胞で免疫染色を行った。また MG132 処置 3 時間後に細胞を固定し、免疫染色を行った。

#### (5) $\beta$ -カテニン分解に関わる Hsp70 コシャペロンの解析

まず Hsp70 で免疫沈降を行い、プロテオーム解析にて Hsp70 に結合するコシャペロンを同定した。候補となったコシャペロンを siRNA でノックダウンして  $\beta$ -カテニンの発現量を検証することで  $\beta$ -カテニン分解に関わるコシャペロンを特定した。

#### (6) 細胞遊走、転移と $\beta$ -カテニン発現

Wound を形成して 6 時間後に細胞を固定し、Hsp70 および  $\beta$ -カテニンの免疫染色を行った。また市販の膵癌組織アレイにて Hsp70 および  $\beta$ -カテニンの免疫染色を行った。

#### (7) 細胞膜局在型 Hsp70 抗体の作製

細胞膜局在型 Hsp70 を認識する抗体を取得するために、マウスに GST-Hsp70 を免疫しリンパ節法にてモノクローナル抗体を作製した。ELISA、免疫染色によるスクリーニングを行った。抗体の性能評価として 6 週齢雌性 BALB/c Slc-nu/nu を 4 匹使用した。ルシフェラーゼ遺伝子を安定発現させたヒト膵癌細胞 PANC-1 を、マウスの右背皮下に 10,000,000 cells 移植した。移植 1 週間以降、1 回/週で IVIS を用いて腫瘍の増大を評価した。移植 4 週間後に、同程度の腫瘍サイズの個体を 2 匹ずつ選び、マウス IgG 又は作出抗体を週 1 回の頻度で 3 週間、腹腔内投与することで抗腫瘍効果を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) Hsp70 欠損による細胞遊走の抑制

2種類のHsp70 (*HSPA1A/HSPA1B*) 欠損 PANC-1 細胞、および Hsp70 の再構成細胞を樹立し、Hsp70 の機能を解析した。まず野生型と Hsp70 欠損細胞の増殖能を評価したところ、両者に有意な差は認めなかった。細胞遊走能を調べたところ、Hsp70 欠損によって優位に抑制された細胞遊走は再構成細胞にて野生型と同程度まで回復した。また三次元培養の結果、Hsp70 欠損細胞は全細胞が結合した球状のスフェロイドを形成した。野生型、再構成細胞は周辺部の細胞が散在し、スフェロイドのサイズも大きかったことから、Hsp70 欠損により細胞間接着が強固になっていることが示唆された。

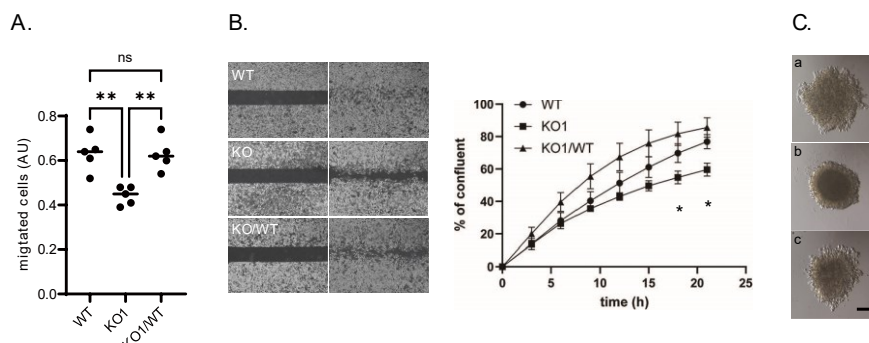


図1 Hsp70 欠損細胞の表現型

A. transwell アッセイによる細胞遊走能の評価, B. Wound healing アッセイによる細胞遊走能の評価, C. スフェロイド形成能の評価, a: WT, b: KO, c: KO/WT

### (2) Hsp70 欠損によるタンパク質発現変化

Hsp70 欠損におけるタンパク質発現変化を解析するために細胞膜画分、細胞質画分を分画し、それぞれプロテオーム解析した。Alpha-catenin binding, cadherin binding, cell-cell adhesion mediator activity といった細胞間接着に関わる分子群、small GTPase binding, GTPase regulator activity が Hsp70 の欠損によって増加した。実際には、N-カドヘリン、 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニン、 $\gamma$ -カテニンといったアドヘレンスジャンクションを構成する分子が劇的に増加した。プロテオーム解析の結果を検証するために、Hsp70 再構成細胞を加えて、ウェスタンブロットを行った。N-カドヘリン、 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニン、 $\gamma$ -カテニンは Hsp70 欠損によって発現亢進し、再構成細胞で優位に抑制した。発現機序を明らかにするために、定量的 PCR を行ったところ、N-カドヘリンは mRNA レベルで有意な発現増加を認めた。 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニン、 $\gamma$ -カテニンは発現変化しないか、むしろ低下した。したがって、N-カドヘリンは mRNA レベル、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニンはタンパク質レベルで制御されていることが明らかとなった。この際、上皮間葉転換 (EMT) のマーカータンパク質群は変化しなかった。

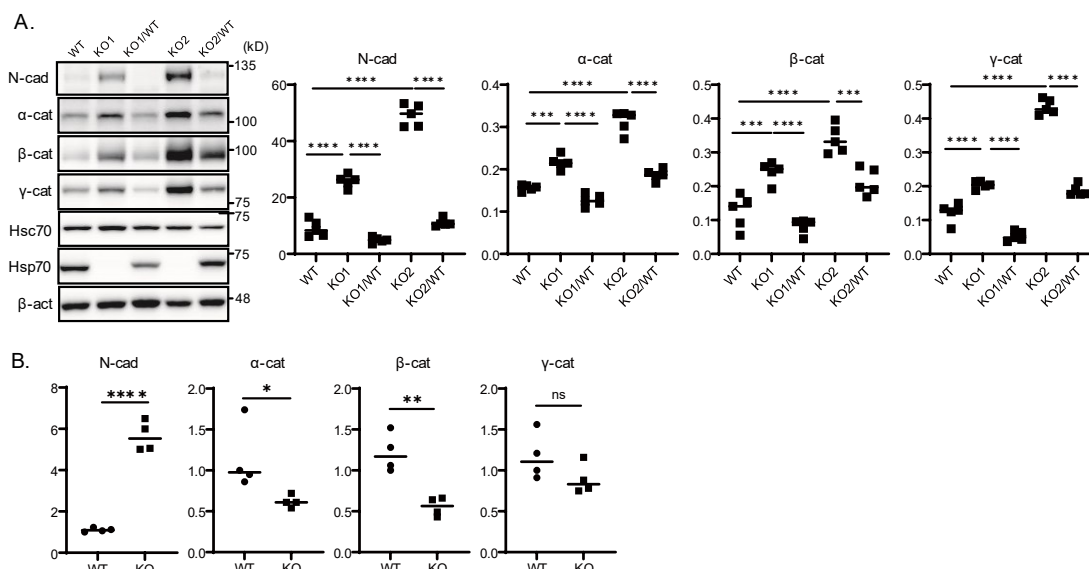


図2 Hsp70 欠損による発現変化

A. Hsp70 に依存した N-カドヘリン、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニンタンパク質発現変化, B. Hsp70 に依存した N-カドヘリン、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニンの遺伝子発現変化 \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$

### (3) Hsp70 による $\beta$ -カテニン分解メカニズム

mRNA の発現が変化しない一方で、タンパク質の発現が増加したことから、シクロヘキシミドを用いて、カテニンタンパク質の分解を検証した。野生型細胞では、シクロヘキシミド処置により、カテニンの発現が減少したが、Hsp70 欠損ではこれらの減少が低下していた。中でも  $\beta$ -カ

テニンシクロヘキシミドにより発現がほとんど変化しなかった。さらに、Hsp70 欠損細胞で  $\beta$ -カテニンタンパク質の寿命を検証したところ、 $\beta$ -カテニンはタンパク質寿命が顕著に延長していた。そこで、3種類のカテニンの中でも  $\beta$ -カテニンが直接的な作用対象であると考え、 $\beta$ -カテニンに焦点を当てて解析を進めた。タンパク質分解メカニズムを明らかにするためにプロテアソーム阻害剤、リソソーム阻害剤、オートファジー阻害剤による影響を調べた。その結果、MG132、ボルテゾミブで  $\beta$ -カテニンの発現量が顕著に増加し、プロテアソームで分解されていることがわかった。 $\beta$ -カテニンは何らかの刺激に応じて分解されるのではなく、Hsp70 依存的に恒常的に分解されていることが示唆された。

野生型、Hsp70 欠損細胞を MG132 で処理した後、プロテアソームによるタンパク質分解を導く K48 ユビキチン鎖の付加したタンパク質を単離したところ、Hsp70 欠損により K48 ユビキチン化タンパク質が低減していた。また、ユビキチン化  $\beta$ -カテニンが Hsp70 欠損によって低下した。 $\beta$ -カテニン分解においてトリガーとなる Ser45 のリン酸化を検討した結果、Hsp70 欠損ではリン酸化が入っていないことが明らかとなった。以上より、Hsp70 欠損によってカゼインキナーゼ 1 によるリン酸化が起こらないため、ポリユビキチン化せず、 $\beta$ -カテニンが分解しないことが明らかとなった。Hsp70 欠損によって CK1 やアダプターとなる AXIN1 の量的変化は認めず Hsp70 の直接の作用点については現段階で解明できていない。

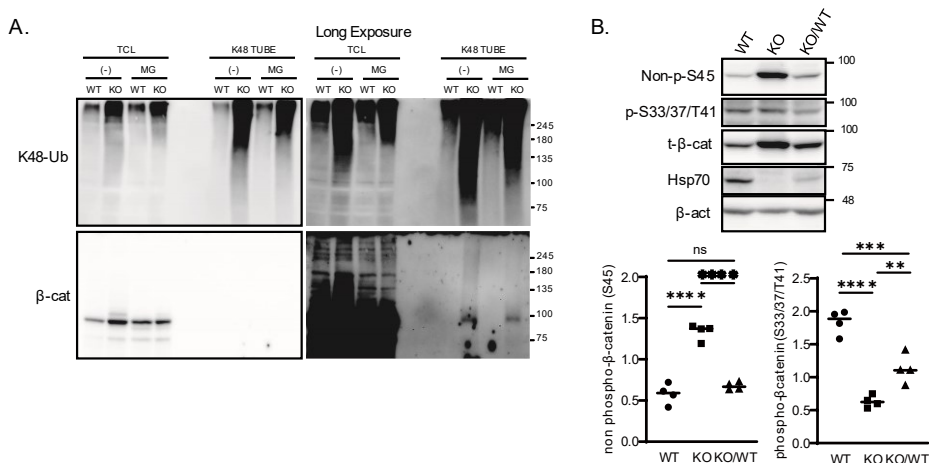


図3 Hsp70による $\beta$ -カテニンの分解機構

A. K48 ユビキチン鎖 Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs) によるユビキチン化と  $\beta$ -カテニンリン酸化の解析, B.  $\beta$ -カテニンリン酸化の解析 \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

#### (4) Hsp70 に依存したカテニンの局在

次に、野生型細胞と Hsp70 欠損細胞における  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニンの細胞内局在を解析した。いずれのカテニンも野生型細胞では、主として核と核周辺の細胞質に局在化したが、Hsp70 欠損では細胞間接着部位の細胞膜上に局在した(図3)。本来、カテニンはカドヘリンの裏打ちタンパク質として機能することから、Hsp70 欠損によって発現亢進するタンパク質がフォールディングできない凝集体として蓄積しているのではなく、本来の機能を有していることが示唆された。さらに MG132 処置時のカテニン、Hsp70 の細胞内局在を観察したところ、細胞膜ではなく、細胞質あるいは核での発現増加を示した。これにより、Hsp70 欠損によって発現亢進するカテニンタンパク質が、生理的な機能を有することが示された。

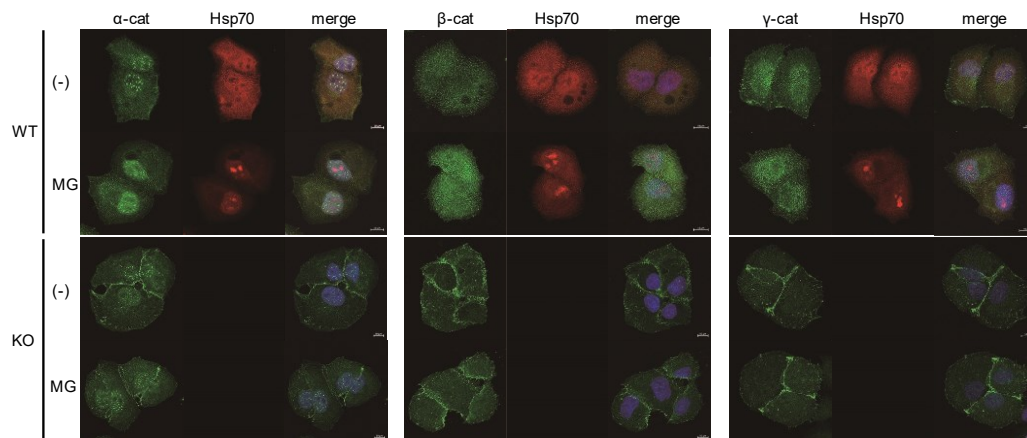


図4 カテニンタンパク質の細胞内局在

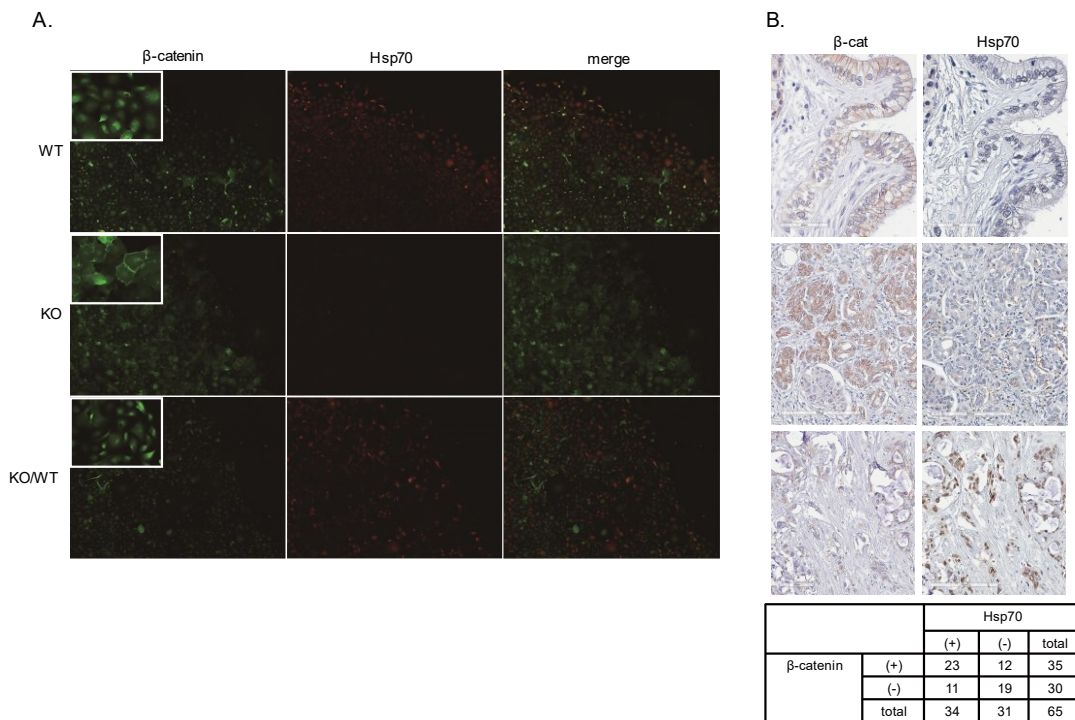
Hsp70 欠損に伴う  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニンの細胞内局在の変化 MG 処置 (3 時間) による  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -カテニン、および Hsp70 の局在

(5)  $\beta$ -カテニン分解に関わる Hsp70 コシヤペロンの解析

本来 Hsp70 はタンパク質のフォールディングに関わる分子として認識されている一方、結合するコシヤペロンの種類によってタンパク質の分解にも関与するというソケットモデルが提唱されている。そこで、Hsp70 による  $\beta$ -カテニン分解の分子機序を明らかにするために、分解に関わるコシヤペロンを解析した。Hsp70 抗体にて免疫沈降し、結合するコシヤペロンを解析したところ、Hsp  $\beta$  8、BAG1、BAG3 が候補に挙げられた。そこで、これらのコシヤペロンをノックダウンすることで  $\beta$ -カテニン発現量を解析した。BAG1、BAG3 とともに Hsp  $\beta$  8 と同時にノックダウンすることで、 $\beta$ -カテニンの発現を有意に増加させた。したがって Hsp70-Hsp  $\beta$  8-BAG1、Hsp70-Hsp  $\beta$  8-BAG3 がユビキチン化を介する分解に関わっていることが示唆された。

図 5  $\beta$ -カテニンおよび Hsp70 の発現と生理機能

A. wound healing 時の遊走先端の細胞における  $\beta$ -カテニンおよび Hsp70 の発現, B. ヒト膀胱癌組織における  $\beta$ -カテニンおよび Hsp70 の発現



(6) 細胞遊走、転移と  $\beta$ -カテニン発現

Hsp70 による  $\beta$ -カテニン分解が細胞遊走、ひいては転移に関与するかを明らかにするために、Wound healing アッセイ時の間隙付近の細胞の Hsp70 と  $\beta$ -カテニンの発現を免疫染色にて解析した。その結果、野生型では遊走部位先端で Hsp70 が発現し、逆に  $\beta$ -カテニンの発現が低下していた。一方、Hsp70 欠損細胞では遊走部位先端で  $\beta$ -カテニンが細胞膜に発現していた。最後に、膀胱癌患者組織で両分子の発現を解析した。統計学的に有意な相関性は認めなかったが、 $\beta$ -カテニン陽性の際に Hsp70 陰性の症例が 18.4%、 $\beta$ -カテニン陰性の際に Hsp70 陽性の症例が 16.9%存在した。このように Hsp70 と  $\beta$ -カテニンの発現が逆相関している症例が全体の 35.4%存在した。

(7) 細胞膜局在型 Hsp70 抗体の作製

細胞膜局在型 Hsp70 を認識する抗体を取得するために、マウスに GST-Hsp70 を免疫しリンパ節法にてモノクローナル抗体を作製した。ELISA、免疫染色によるスクリーニングを行い、約 2,700 クローンから細胞膜が染色可能な 1 クローンを選抜した。抗体の性能評価の一環として、膀胱癌細胞の増殖に対する作用、膀胱癌細胞を皮下移植した担癌マウスを用いた抗腫瘍効果を評価した。その結果、顕著な抗腫瘍効果を認めた。特許申請の兼ね合いで、結果の記載は割愛する。  
<引用文献>

1. Ranes M, Zaleska M, Sakalas S, Knight R, Guettler S. (2021) Reconstitution of the destruction complex defines roles of AXIN polymers and APC in  $\beta$ -catenin capture, phosphorylation, and ubiquitylation. *Mol Cell*. 81, 3246-3261.
2. Fernández-Fernández MR, Gragera M, Ochoa-Ibarrola L, Quintana-Gallardo L, Valpuesta JM. (2017) Hsp70 - a master regulator in protein degradation. *FEBS Lett*. 591, 2648-2660.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩田正之、徳永文稔
2. 発表標題 膵がん進展におけるHsp72依存的 細胞接着因子制御の寄与
3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗Hsp70抗体	発明者 塩田正之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023- 86517	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 健二郎  (Kimura Kenjiro)  (60597285)	大阪公立大学・大学院医学研究科・講師   (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------