

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590726

研究課題名（和文）原発性肝細胞がんの発症・進展における低分子量ストレス蛋白質の役割に関する解析

研究課題名（英文）Role of low-molecular-weight heat shock proteins and the molecular mechanism in hepatocellular carcinoma cell proliferation

研究代表者

小澤 修 (KOZAWA OSAMU)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90225417

研究成果の概要（和文）： ストレス蛋白質は、熱や化学物質などのストレスにより組織・細胞内に誘導される一群のタンパク質の総称である。肝細胞がんにおける低分子量ストレス蛋白質の役割の詳細は明らかとされていない。本研究では、肝発がんにおける低分子量ストレス蛋白質の役割およびその分子機序を検討した。本解析により、低分子量ストレス蛋白質の一つである HSP20 が肝がん細胞において、p44/p42 マップキナーゼおよび AKT の細胞内情報伝達系を制御し、その増殖を抑制することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）： Heat shock protein (HSP) 20, one of the low-molecular-weight HSPs, is known to have versatile functions, such as vasorelaxation. However, its precise role in cancer proliferation remains to be elucidated. While HSP20 is constitutively expressed in various tissues including the liver, we have previously reported that HSP20 protein levels in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells inversely correlate with the progression of HCC. In this study, we investigated the role of HSP20 in HCC proliferation. Our results strongly suggest that HSP20 suppresses the growth of HCC cells via p44/p42 mitogen-activated protein kinase and AKT signaling pathways, thus suggesting that the HSP20 could be a new therapeutic target for HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

わが国におけるB型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染者はおおよそ150万人と推定され、HBV感染者の10-15%、HCV感染者の60-70%が慢性肝炎に移行するとされる。また肝細胞がんは、HBV、HCVの持続感染による慢性肝炎や肝硬変を母地として発

症することがほとんどである。このことから、肝細胞がんは高危険群が容易に設定できることが他のがんにはない大きな特徴である。肝硬変患者から年率5-7%という高率な割合で肝細胞がんを併発するとされ、我が国の悪性新生物による死亡率では肝細胞がんは第4位と増加傾向にある。最近では、早期発見と治療法の進歩により根治

的治療がなされる症例が増えてきているものの、一方では転移再発、多中心性再発が高頻度で認められ、このことが予後改善を図る上で大きな問題となっている。現在、肝細胞がんの再発予防策として、インターフェロンをはじめとしたウイルスの排除が最も重要とされ、それ以外にも非環式レチノイド、ビタミンK、分岐鎖アミノ酸製剤、免疫療法、angiotensin converting enzyme阻害剤、化学療法剤などにより、がん再発予防の試みがなされているが、未だ十分な治療結果は得られていないのが現状である。したがって、肝細胞がんの発症・進展の機序の詳細をさらに解析し、新たながん増殖抑制の治療方法および良い予後予測の指標の確立が求められている。

種々のストレスに対する生体反応をストレス反応と呼んでおり、環境の変化に対し生体は迅速に反応する。ストレス蛋白質(heat shock protein; HSP)は、熱や化学物質などのストレスにより誘導される一群のタンパク質の総称で分子量が70kDaのHSP70や90kDaのHSP90などの高分子量HSPおよび分子量が10kDa-30kDaのHSP27、 α BクリスタリンやHSP20などの低分子量HSPに大きく分類されている。これら一連のHSPはストレス応答に際し、生体防御機構の中心的役割を担い、細胞内で分子シャペロンとして作用することがよく知られている。最近、分子シャペロン作用以外にも各HSP固有の作用が明らかにされつつある。私共は低分子量HSPの中でHSP20及び α Bクリスタリンがストレス応答に際し細胞外に遊離し、細胞外で機能すること(血小板の粘着・凝集反応を抑制すること)を世界で初めてヒトの病態との関連において証明し、一般に認知されている。低分子量HSPは高分子量HSPと異なり、セリン残基のリン酸化により修飾を受けること、リン酸化された低分子量HSPは重合体から二量体/単量体に解離し核内へ移行することが知られているが、その役割の詳細は未だ判然としていない。

近年、種々の癌細胞におけるHSPの発現量と予後の関連性が報告され、HSPが悪性腫瘍の増殖と転移に強く関与していることが推察されるに至り、HSPは癌治療における新たな標的として期待されている。現在HSPを標的とした癌治療にはHSPを免疫担当細胞の抗腫瘍効果を増強するためのアジュバントとして用いる手法、あるいは阻害剤や遺伝子学的手法を用い、がん細胞のHSPの発現と機能を調節する方法の2通りのアプローチにより研究が進められている。特に後者はHSPの癌細胞での細胞内情報伝達における役割の解明によってその研究が進歩すると予測される分野である。現在、HSP90ではその特異的な阻害剤が発見され、臨床レベルでの実用化に向けた研究が進められている。しかしながら、これらの研究の大半は高分子量HSPを標的にしたものである。高分子量HSPに比べ低分子量HSPの機能は未解明であるた

めに、それらを標的にした癌治療法の研究は、ほとんど進んでいない。

私共は既に、大垣市民病院との共同研究により、53例の肝細胞がんの患者の手術標本を解析した結果、HSP27タンパク質の総発現量に変化はないが、リン酸化型HSP27のレベルが低いほど、肝がんのステージが進んでいることを見出し、HSP27のリン酸化が肝細胞がんの病態に関与していることを世界で初めて報告している。さらに、そのメカニズムの詳細を検討し、リン酸化型HSP27がp44/p42 MAPキナーゼを中心とした肝がん増殖シグナルを抑制することで肝がんの増殖を制御するという、分子機序を明らかにした。また最近、私共はHSP27と同様に、低分子量ストレス蛋白質のHSP20と α Bクリスタリンの総発現量と肝細胞がんの進行度との関連性について解析を進め、HSP20の総発現量と肝がんの進行度の間に負の相関性があることを見出している。また、肝臓がん全体の5-10%に α Bクリスタリン陽性肝臓がん症例が存在することも見いだしており、両者共に肝臓がんにおける新たな治療の標的となる可能性が高いと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝臓がんにおいて低分子量ストレス蛋白質(heat shock protein; HSP)の中でもHSP20および α Bクリスタリンがどのような役割をはたしているのか、その分子メカニズムを同定することで低分子量ストレス蛋白質を標的とした新たながん治療法確立の基礎的検討を行うことである。

3. 研究の方法

- (1) 市販の遺伝子ライブラリからHSP20の遺伝子入手し、ほ乳類細胞での発現用vectorに組み込みこんだ。ヒト肝がん細胞株で発現可能なHSP20の発現vectorを作成し、肝がん細胞株HuH7に導入した。これを用いHSP20の発現の有無による肝がん細胞の増殖等の細胞機能に及ぼす影響を検討した。
- (2) HSP20発現肝がん細胞およびヒト肝がん組織において、肝がんの進展に関わる細胞内情報伝達系(MAPキナーゼスーパーファミリー(p44/p42 MAPキナーゼ、SAPL/JNK)、MEK、c-Jun, Elk-1, AKT, PDK1, GSK3 β , cyclin D1)の総タンパクレベルおよびリン酸化レベルとHSP20の発現との関連をWestern blot法で検討した。
- (3) HSP20の発現による肝がん細胞増殖への影響をWST-1法およびBrdU assayにより検討した。上記(1)~(2)の結果をふまえ、肝がん細胞内でHSP20と相互作用している細胞内情報伝達系に関わるタンパク質の解析を、抗HSP20抗体を用いて免疫沈降法により検討し、その活性を測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝がんのがん部における HSP20 の発現が非がん部と比較して有意に減少し、さらに肝がんのステージが進行するほど発現が減少することを既に報告している。そこで肝がん増殖に深く関与することが報告されている細胞情報伝達系の MAP キナーゼスーパーファミリーおよび AKT と HSP20 との関係について検討した。その結果ヒト肝がん組織において、p44/p42 MAP キナーゼ、SAPK/JNK および AKT の各々の活性化型であるリン酸化体のレベルと HSP20 の発現量とが逆相関することを明らかにした。ヒト肝がんのがん部における HSP20 の発現が非がん部と比較して有意に減少し、さらに肝がんのステージが進行するほど発現が減少することを既に報告している。そこで肝がん増殖に深く関与することが報告されている細胞情報伝達系の MAP キナーゼスーパーファミリーおよび AKT と HSP20 との関係について検討した。その結果ヒト肝がん組織において、p44/p42 MAP キナーゼ、SAPK/JNK および AKT の各々の活性化型であるリン酸化体のレベルと HSP20 の発現量とが逆相関することを明らかにした。

(2) HSP20 蛋白質の発現と肝がんの細胞情報伝達系との関連を検討する為に、まず肝がん細胞株における HSP20 の発現を解析した。Western blot 法による検討の結果、肝がん細胞株では、HuH7 をはじめ HepG2、HLE、HLF、PLC/PRF/5 のいずれの細胞においても HSP20 の発現が認められなかった。そこで、HuH7 細胞株に HSP20 を強制発現させることで、肝がんに対する HSP20 の機能の検討を行った。まず、HSP20 の発現の有無による細胞増殖能の変化を検討した。その結果、HSP20 を発現させた肝がん細胞ではコントロール細胞と比較して細胞数の増加が明らかに低下し、細胞増殖にもなう BrdU の取り込みも有意に抑制されることを明らかとした。

(3) HSP20 を発現させた肝がん細胞における MAP キナーゼスーパーファミリー経路と AKT 経路の構成因子の活性の検討を行った。その結果、TGF α 、HGF によって刺激された肝がん細胞内で、MAP キナーゼスーパーファミリーである p44/p42 MAP キナーゼと、その上流の MEK、下流に位置する c-Jun 及び Elk-1 の活性化、さらに SAPK/JNK の活性化が HSP20 の発現により抑制されることを明らかとした。また、AKT 経路においても、AKT 及びその上流の PDK1、下流の GSK3 β がいずれも HSP20 を発現させた細胞でコントロールの細胞と比較してリン酸化が有意に抑制されることを明らかとした。加えて、これらの経路の下流に位置して細胞増殖に深く関わる cyclinD1 の総タンパクレベルも低くなっていることも明らかとした。HSP20 が肝がん内の細胞増殖に関する情報伝達系を制御することで、ヒト肝がんの増殖を抑制していることが強く示唆された。

(4) 肝がん細胞内で細胞増殖に関わるどのような蛋白質が HSP20 のターゲットとなっているのかを検討するため、免疫沈降法を用いて MAP キナーゼスーパーファミリー経路及び AKT 経路に関わる蛋白質と HSP20 との相互作用の検討を行った。その結果、14-3-3 蛋白質など肝がん細胞以外の系で相互作用の報告がある蛋白質の他、AKT 経路を担う細胞内情報伝達物質の一つとも相互作用をすることを新たに見いだした。現在、その標的蛋白質に対する HSP20 の制御機構について、検討中である。

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 21 件)

- (1) Tokuda H, Kato K, Kasahara S, Matsushima-Nishiwaki R, Mizuno T, Sakakibara S and Kozawa O. Significant correlation between the acceleration of platelet aggregation and phosphorylation of HSP27 at Ser-78 in diabetic patients. *Int. J. Mol. Med.* 査読有 30巻, 2012, 1387-1395. doi: 10.3892/ijmm.2012.1146.
- (2) Kawaguchi J, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Nakashima M, Ohno T, Shimizu M, Yoshioka T, Itani M, Kozawa O and Moriwaki H. Cisplatin and ultra-violet-C synergistically down-regulate receptor tyrosine kinases in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer.* 査読有 11巻, 2012, 45. doi: 10.1186/1476-4598-11-45.
- (3) Kawaguchi J, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Yoshioka T, Itani M, Kozawa O and Moriwaki H. UVC irradiation suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced migration in human pancreatic cancer cells. *Oncol. Rep.* 査読有 27巻, 2012, 935-939. doi: 10.3892/or.2011.1612.
- (4) Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Itani M, Yoshioka T, Matsushima-Nishiwaki R, Hirose Y, Kozawa O and Moriwaki H. Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 査読有 313巻, 2011, 218-225.

doi: 10.1016/j.canlet.2011. 09.008.

(5) Adachi S, Yasuda I, Kawaguchi J, Yamauchi T, Nakashima M, Itani M, Nakamura M, Yoshioka T, Moriwaki H and Kozawa O.

Ultraviolet enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine by activation of 5' AMP-activated protein kinase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 414巻, 2011, 53-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2011. 09.020.

(6) Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Yoshioka T, Yasuda E, Yamagishi Y, Matsuura J, Muko M, Iwamura R, Noda T, Toyoda H, Kaneoka Y, Okano Y, Kumada T and Kozawa O.

Suppression by heat shock protein 20 of hepatocellular carcinoma cell proliferation via inhibition of the mitogen-activated protein kinases and Akt pathways.

J. Cell. Biochem. 査読有 112巻, 2011, 3430-3439. doi: 10.1002/jcb.23270.

(7) Kato K, Tokuda H, Mizutani J, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O and Otsuka T. Role of HSP27 in tumor necrosis factor- α -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts.

Int. J. Mol. Med. 査読有 28巻, 2011, 887-893. doi: 10.3892/ijmm.2011. 762.

(8) Yamauchi T, Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Kawaguchi J, Yoshioka T, Hirose Y, Kozawa O and Moriwaki H. Ultra-violet irradiation induces apoptosis via mitochondrial pathway in pancreatic cancer cells.

Int. J. Oncol. 査読有 39巻, 2011, 1375-1380. doi: 10.3892/ijo.2011. 1188. 95.

(9) Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Kawaguchi J, Shimizu M, Itani M, Nakamura M, Nishii Y, Yoshioka T, Hirose Y, Okano Y, Moriwaki H and Kozawa O.

Ultraviolet irradiation can induce evasion of colon cancer cells from stimulation of epidermal growth factor.

J. Biol. Chem. 査読有 286巻, 2011, 26178-26187. doi: 10.1074/jbc.M111.240630.

(10) Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kawaguchi J, Hanamatsu T, Yoshioka T, Okano Y, Hirose Y, Kozawa O and Moriwaki H.

Inhibition of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase enhances the activation of epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer cells.

Mol. Cancer. 査読有 10巻, 2011, 79. doi: 10.1186/1746-4598-10-79.

(11) Yamauchi T, Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Kawaguchi J, Nishii Y, Yoshioka T, Okano Y, Hirose Y, Kozawa O and Moriwaki H.

UV-C irradiation induces downregulation of EGF receptors via phosphorylation at serine 1046/1047 in human pancreatic cancer cells.

Radiat. Res. 査読有 176巻, 2011, 565-574. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692654>

(12) Kato K, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Natsume H, Katagiri Y, Hirose Y, Mizutani J, Tokuda H, Kozawa O and Otsuka T.

Regulation by heat shock protein 27 of osteocalcin synthesis in osteoblasts. Endocrinology. 査読有 152巻, 2011, 1872-1882. doi: 10.1210/en.2010-1062.

(13) Enomoto Y, Adachi S, Doi T, Natsume H, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Akamatsu S, Tokuda H, Yoshimura S, Otsuka T, Ogura S, Kozawa O and Iwama T. cAMP regulates ADP-induced HSP27 phosphorylation in human platelets. Int. J. Mol. Med. 査読有 27巻, 2011, 695-700. doi: 10.3892/ijmm.2011. 637.

(14) Kato K, Tokuda H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Yamauchi J, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T and Kozawa O.

Role of heat shock protein 27 in transforming growth factor- β -stimulated vascular endothelial growth factor release in osteoblasts.

Int. J. Mol. Med. 査読有 27巻, 2011, 423-428. doi: 10.3892/ijmm.2011. 595.

(15) Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Yoshioka T, Okano Y, Moriwaki H and Kozawa O.

Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 査読有 650巻, 2011, 145-150. doi: 10.1016/j.ejphar.2010. 10.014.

(16) Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Dohi S and Kozawa O.

Phosphorylation status of heat shock protein 27 regulates the interleukin-1 β -induced interleukin-6 synthesis in C6 glioma cells.

Neuroscience. 査読有 170巻, 2010, 1028-1034. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010. 08. 014.

(17) Doi T, Adachi S,

Matsushima-Nishiwaki R, Kato H, Enomoto Y, Natsume H, Kato K, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Akamatsu S, Iwama T, Kozawa O and Ogura S.

Antithrombin III reduces collagen-stimulated granule secretion of PDGF-AB and the release of soluble CD 40 ligand from human platelets.

Int. J. Mol. Med. 査読有 26巻, 2010, 387-392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664955>

(18) Kato K, Tokuda H, Natsume H, Adachi S, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Mizutani J, Kozawa O and Otsuka T.

Rho-kinase regulates prostaglandin D₂-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts.

Exp. Ther. Med. 査読有 1巻, 2010, 579-583. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993579>

(19) Adachi S, Yasuda I, Natsume H, Nakashima M, Moriwaki H and Kozawa O.

HSP90 inhibitors induce down-regulation of EGF receptor via p38 MAPK-mediated phosphorylation at Ser1046/7 in human pancreatic cancer cells.

Oncol. Rep. 査読有 23巻, 2010, 1709-1714. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=kozawa+HSP90+2010>

(20) Yasuda E, Kumada T, Toyoda H, Kaneoka Y, Maeda A, Okuda S, Yoshimi N and Kozawa O.

Evaluation for clinical utility of glypican-3

(GPC3), measured by a commercially available ELISA kit with GPC3 antibody, as a serological and histological marker for hepatocellular carcinoma.

Hepatol. Res. 査読有 40巻, 2010, 477-485. doi: 10.1111/j.1872-034x.2010. 00624.x.

(21) Kato H, Adachi S, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Minamitani C, Akamatsu S, Enomoto Y, Tokuda H, Otsuka T, Iwama T, Kozawa O and Ogura S.

Mechanism of collagen-induced release of 5-HT, PDGF-AB and sCD40L from human platelets: role of HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAPK.

Thromb. Res. 査読有 12巻, 2010, 39-43. doi: 10.1016/j.thromres.2009. 12.003.

〔学会発表〕(計7件)

(1) 小澤 修

肝がんとストレス蛋白質(HSP:Heat Shock Protein):特に低分子量 HSP との関連において

第7回日本肝がん分子標的治療研究会 教育講演

2013年1月19日 岐阜

(2) 小澤 修

骨代謝とストレス蛋白質(HSP):特に骨芽細胞における低分子量 HSP27 において

第27回日本整形外科学会基礎学術集会 ランチョンセミナー

2012年10月27日 名古屋

(3) 中島賢憲、足立政治、安田一朗、河口順二、山内貴裕、森脇久隆、小澤 修
ゲムシタピン作用機序における HSP27 リン酸化の役割

第98回 日本消化器病学会総会

2012年4月21日 東京

(4) 加藤賢治、南谷千帆、夏目英雄、近藤 章、水谷 潤、小澤 修、大塚隆信

骨芽細胞における HSP27 によるオステオカルシン産生制御

第26回日本整形外科学会基礎学術集会

2011年10月20日 前橋

(5) 足立政治、安田一朗、中島賢憲、

山内貴裕、森脇久隆、小澤 修

Heat shock protein 90 阻害剤の肝がん治療への応用

第52回 日本消化器病学会大会

2010年10月15日 横浜

(6) 南谷千帆、小澤 修、徳田治彦、
夏目英雄、加藤賢治、水谷 潤、福岡宗良、
大塚隆信

骨芽細胞における transforming growth
factor- β (TGF- β)による heat shock protein
27 (HSP27)誘導に対する Rho-kinase の役割
第 25 回 日本整形外科学会基礎学術集会
2010 年 10 月 14 日 京都

(7) Seiji Adachi, Ichiro Yasuda, Masanori
Nakashima, Takahiro Yamauchi, Hisataka
Moriwaki and Osamu Kozawa.

Heat shock protein 90 inhibitors as a
possible new candidate for the treatment of
human pancreatic cancer

2010 国際膵臓学会

2010 年 7 月 11 日 福岡

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.gifu-u.ac.jp/pharma/index.
htm](http://www.med.gifu-u.ac.jp/pharma/index.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 修 (KOZAWA OSAMU)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90225417

(2) 研究分担者

足立 政治 (ADACHI SEIJI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤

講師

研究者番号：50467205

(3) 連携研究者

なし