

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870701

研究課題名(和文)腫瘍組織における熱ショックタンパク質Hsp105の発現亢進とその癌悪性化誘導

研究課題名(英文) Novel insights into the expression and function of heat shock protein Hsp105 in tumor tissues and cells

研究代表者

齊藤 洋平 (SAITO, YOUHEI)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90411032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺などの扁平上皮癌組織におけるHsp105の核内高発現を明らかにした。培養細胞レベルの解析により、Hsp105が核内に発現し、癌悪性化に関わるタンパク質の発現や活性化に寄与することが明らかになった。抗癌剤処理によりHsp105の核内発現が増加し、Hsp105の発現抑制により抗癌剤感受性が増加した。今後さらに動物モデルや臨床検体を用いて検証する必要があるが、Hsp105を標的とした治療や診断への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused and analyzed the expression and localization of Hsp105 in tumor tissues. Immunohistochemical analysis revealed the overexpression of Hsp105 in nucleus of some tumor tissues. The findings using cell lines indicated the possibility that Hsp105 localizes in the nucleus and affects the expression and activation of anti-cancer target proteins. Although further studies are needed, these observations will provide novel strategy for the Hsp105-targeted anti-cancer therapy and diagnosis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：熱ショックタンパク質 腫瘍マーカー 核内発現 Hsp105 Hsp70 Stat3 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織の内部環境は、低酸素、低 pH、低グルコース状態などのストレスにさらされており、このようなストレスに対して耐性を獲得した細胞が増殖する。特に、低酸素条件下といった癌微小環境では低酸素誘導因子 HIF の発現に伴う遺伝子発現により、癌細胞の生存や転移能の獲得などの癌悪性化が起る。

一方、細胞は熱ショックをはじめとする種々のストレスにより熱ショックタンパク質 (Hsp) と呼ばれる一群のタンパク質の合成を誘導する。Hsp は細菌から哺乳動物に至るまで多くの生物に存在しており、その構造および分子量によって Hsp105/110、Hsp90、Hsp70、シャペロニンなどのファミリーに分類されている。これら Hsp の多くはタンパク質の凝集抑制作用やアポトーシス抑制作用をもち、ストレスから細胞を防御している。

熱ショックタンパク質 Hsp105/110 ファミリーには、同一の遺伝子から産生される Hsp105 α と Hsp105 β が存在する。Hsp105 α が構成的かつストレス誘導性であるのに対して、Hsp105 β は正常時には発現しておらず 42 程度の熱ショックにより特異的に誘導される。これら Hsp105 は変性タンパク質の凝集を抑制することや、アポトーシスを細胞種によって正または負に制御することで、細胞の恒常性を維持している。

大腸癌をはじめとするヒト腫瘍組織で Hsp105 は高発現し、アポトーシス抵抗性による抗癌剤耐性に寄与することから、Hsp105 は癌治療の標的分子であると考えられている。さらに、Hsp105 は、大腸癌腺種などの発癌初期の組織において発現が低いため、Hsp105 の発現レベルは癌悪性度の指標になると考えられる。その一方で、腫瘍組織における Hsp105 の発現や局在制御についての解析は進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、熱ショックタンパク質 Hsp105 の腫瘍組織における発現亢進、特に、核内での発現の意義を明らかにし、腫瘍組織マーカーとしての利用や治療への応用を目指した基盤的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍組織における Hsp105 の発現

ヒト腫瘍組織マイクロアレイを用いて、免疫組織化学染色法により Hsp105 の発現を調べた。抗体には、当研究室で作製した抗ヒト

Hsp105 抗体 (Biochem. Biophys. Acta, 1999)、抗ラビット正常 IgG 抗体を用いた。免疫組織化学染色は、基質に ImmPACT DAB を使用した VECTASTAIN システム (Vector) により行い、ヘマトキシリンで対比染色した。Hsp105 mRNA 発現は RT-PCR またはリアルタイム PCR にて解析した。

(2) Hsp105 α の核内発現の可能性

Hsp105 の細胞内局在は、抗 Hsp105 抗体を用いた蛍光免疫染色法により観察した。Hsp105 α および Hsp105 β の核移行シグナル (NLS) または核外排出シグナル (NES) 変異体をドキシサイクリンで発現制御できるプラスミドを作製した。EGFP 融合 Hsp105 発現プラスミドを作製し、タイムラプス解析を行った。タイムラプス解析には細胞イメージングシステム (Operatta, PerkinElmer) を使用した。

(3) Hsp105 による Hsp70 発現誘導

細胞内における Hsp70 発現は、ウエスタンブロット法ならびに Hsp70 プロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータージーンアッセイにより評価した。これまでに Hsp105 結合タンパク質として見出していたタンパク質 (Nmi、AF9、SNRPE) と Hsp105 との相互作用をプルダウン法および免疫沈降法で検討した。発現プラスミドおよび siRNA を用いて、これら Hsp105 結合タンパク質の Hsp70 発現誘導への関与を調べた。

(4) 薬剤感受性への Hsp105 の寄与

Hsp105 の翻訳領域あるいは非翻訳領域をターゲットとした shRNA 発現プラスミドを作製し、リポフェクション法あるいはレンチウイルス感染により Hsp105 ノックダウン細胞を作製した (HeLa/sh105、HCT116/sh105)。これらの細胞を用いて、アドリアマイシンなど抗癌剤の感受性について評価した。

(5) Hsp105 による HIF-1 活性化制御

低酸素や塩化コバルト処理により増加する HIF-1 α 発現について、Hsp105 ノックダウンの影響を調べた。HIF-1 α 発現はウエスタンブロット法、HIF-1 転写活性化はレポータージーンアッセイにより評価した。低酸素処理 (1% O₂) は、マルチガスインキュベーター (APM-30D, アステック) で行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍組織における Hsp105 の発現

腫瘍組織マイクロアレイを用いた解析により、胃、大腸、肺、子宮頸部、皮膚、肝臓、膀胱では、正常組織と比較して腫瘍組織において Hsp105 が高発現していることを明らかにした。興味深いことに肺、皮膚、食道などの扁平上皮癌組織において Hsp105 の核内発現が観察された。一方、既に Hsp105 の高発現が報告されている大腸癌や肝臓癌組織では Hsp105 の発現亢進が見られたものの、Hsp105 の明確な核内発現は観察されず、Hsp105 の核内発現が腫瘍組織特異的であることが示唆された。

培養細胞において Hsp105 α が細胞質に局在するのに対して Hsp105 β は核に局在する。免疫組織化学染色法に使用した抗体は、Hsp105 α と Hsp105 β の両方を認識することから、次に、腫瘍組織で発現する Hsp105 の分子種の決定を試みた。

Hsp105 の核内発現が観察された肺癌組織を含む 4 つの組織について Hsp105 mRNA 発現を調べたところ、明確な Hsp105 β の発現は認められなかった。また、正常組織と比較して、腫瘍組織における Hsp105 α mRNA の発現量は大きく変化しておらず、腫瘍組織での Hsp105 の発現亢進は転写レベル以外で制御されている可能性が考えられた。

以上のように、一部の腫瘍組織において Hsp105 が核内に発現することがわかった。本研究の実施期間中に、胃癌における Hsp110 (Hsp105 α) の核内高発現が治療の予後不良と相関することが報告された (Oncotarget 2016)。更なる検討により Hsp105 の核内発現をマーカーとした診断、治療への応用が期待される。

(2) Hsp105 α の核内発現の可能性

Hsp105 α は核移行シグナル (NLS) と核外排出シグナル (NES) が存在する。NES 依存的な核外排出を阻害する LMB を処理すると Hsp105 α は核内に発現する。一方、生理的条件下における Hsp105 α の核内発現はわかっていなかった。HeLa 細胞を種々の薬剤で処理した結果、アドリアマイシン、エトポシドなどの DNA 傷害性抗癌剤や、低酸素状態を模倣する塩化コバルトにより、Hsp105 α の核内発現が増加することが明らかになった。このように、ある種のストレス環境下において Hsp105 α が核内に発現することがわかった。

(3) Hsp105 による Hsp70 発現誘導

核に発現する Hsp105 β は、サイトカインシグナル伝達系転写因子 Stat3 の活性化を介し

て Hsp70 発現を増加させる。Hsp105 核内発現の意義として Hsp105 β による Hsp70 誘導に着目し、Hsp105 β と相互作用する分子の関与について検討した。その結果、Stat 結合タンパク質として報告されている Nmi を同定し、Nmi が Stat3 活性化を介して Hsp70 誘導に関わることを明らかにした。興味深いことに、Nmi を一過性に高発現させた細胞では Hsp105 α の核内発現の増加と、Hsp105 α 依存的な Hsp70 発現増加が観察された。

Nmi 以外にも Hsp105 β による Hsp70 誘導に関与する Hsp105 β 結合タンパク質として急性白血病原因遺伝子の転座パートナータンパク質 AF9、核内低分子リボ核タンパク質 SNRPE を同定した。AF9 と SNRPE は核に局在し、共に Hsp105 による Hsp70 誘導を亢進させた。

(4) 薬剤感受性への Hsp105 の寄与

抗癌剤に対する細胞応答について、Hsp105 α の核内発現に着目し解析した。細胞を種々の濃度のアドリアマイシンで処理すると、ある一定の濃度以上でアポトーシス様の細胞死が観察されたが、Hsp105 の発現抑制は低濃度のアドリアマイシン処理で起こる細胞死が増加させた。この時、Hsp105 α の核内発現は増加したことから、Hsp105 α の核内発現がアドリアマイシン感受性に寄与する可能性が示唆された。

(5) Hsp105 による HIF-1 活性化制御

低酸素誘導因子 HIF-1 は核内で転写因子として機能する。Hsp105 の核内発現の意義として、HIF-1 の機能制御への Hsp105 の関与について検討した。その結果、塩化コバルト処理による HIF-1 α の蓄積と HIF-1 転写活性化が Hsp105 ノックダウンにより抑制されることを明らかにした。塩化コバルト処理により Hsp105 α の核内発現が増加するが、Hsp105 α は、HIF-1 α と相互作用し、HIF-1 α の発現量依存的に核に局在した。これらの結果は、腫瘍組織の低酸素環境下において、Hsp105 α が HIF-1 を介して核内発現し、癌悪性化に寄与する可能性を示唆している。

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3件)

1. Saito Y, Yukawa A, Matozaki M, Mikami H, Yamagami T, Kuga T, Yamagishi N,

Hatayama T, Nakayama Y.
Nmi interacts with Hsp105 β and enhances the Hsp105 β -mediated Hsp70 expression. *Exp. Cell Res.*, 327, 163-170, 2014. 査読有

2. Saito Y, Nakagawa T, Kakihana A, Nakamura Y, Nabika T, Kasai M, Takamori M, Yamagishi N, Kuga T, Hatayama T, Nakayama Y.

Yeast two-hybrid and one-hybrid screenings identify regulators of hsp70 gene expression. *J. Cell. Biochem.*, 117, 2109-2117, 2016. 査読有

3. Mikami H, Saito Y, Okamoto N, Kakihana A, Kuga T, Nakayama Y.

Requirement of Hsp105 in CoCl₂-induced HIF-1 α accumulation and transcriptional activation. *Exp. Cell Res.*, 352, 225-233, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. 山根鉄平、齊藤洋平、島田雅史、加藤圭穂、久家貴寿、山岸伸行、中山祐治: 熱ショックタンパク質 Hsp105 のアドリアマイシンによる核局在化メカニズム. 第 37 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2014.11.

2. Youhei Saito, Akihisa Yukawa, Masashi Matozaki, Hiroki Mikami, Nobuyuki Yamagishi, Takahisa Kuga and Yuji Nakayama: Nmi enhances the Hsp105 β -mediated Hsp70 expression through the Stat signaling pathway: 第 37 回日本分子生物学会年会 (神戸), 2014.11.

3. 齊藤洋平、湯川明久、的崎雅史、三上大貴、山岸伸行、久家貴寿、中山祐治: Nmi による Stat3 活性化を介した Hsp70 発現誘導. 日本薬学会第 135 年会 (神戸), 2015.3.

4. 齊藤洋平、的崎雅史、湯川明久、多田円香、久家貴寿、山岸伸行、中山祐治: 熱ショックによるサイトカインシグナル伝達系転写因子 Stat3 の活性化. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸), 2015.12.

5. 齊藤洋平、的崎雅史、湯川明久、多田円香、久家貴寿、中山祐治: Hsp70 誘導および温熱感受性におけるサイトカインシグナル伝達系転写因子 Stat3 の関与. 日本薬学会

第 136 年会 (横浜), 2016.3.

6. 齊藤洋平、山根鉄平、島田雅史、加藤圭穂、久家貴寿、中山祐治: 抗がん剤抵抗性に及ぼす Hsp105 の核局在化の関与. 第 63 回日本生化学会近畿支部例会 (神戸), 2016.5.

7. 三上大貴、齊藤洋平、久家貴寿、中山祐治: 低酸素誘導因子 HIF-1 の発現および転写活性化における熱ショックタンパク質 Hsp105 の関与. 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (大阪), 2016.10.

8. 齊藤洋平、山根鉄平、島田雅史、加藤圭穂、久家貴寿、中山祐治: 熱ショックタンパク質 Hsp105 α の核局在化と抗がん剤抵抗性への寄与. 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2016.12.

9. 三上大貴、齊藤洋平、久家貴寿、中山祐治: HIF-1 の蓄積および転写活性化には Hsp105 が必要である. 日本薬学会第 137 年会 (仙台), 2016.3.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/seika/saito/homu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 洋平 (SAITO YOUHEI)

京都薬科大学 薬学部 助教

研究者番号: 90411032