

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06672

研究課題名（和文）熱ストレスによるStat3活性化と癌悪性化の可能性

研究課題名（英文）Possible contributions of heat stress-induced Stat3 activation on abnormality of cancer cells

研究代表者

齊藤 洋平（Youhei, Saito）

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ストレス応答は、熱ショックタンパク質（Hsp）の発現を介して細胞の恒常性維持に寄与する。一方、癌細胞において、Hspは温熱や薬剤に対して抵抗性を引き起こすことから治療の妨げとなる。本研究では、熱ストレスによるStat3のリン酸化を介した活性化とその意義として癌細胞における温熱耐性獲得へのStat3のリン酸化やHsp105の関与を明らかにした。さらにStat3活性化は、癌細胞の生存や転移浸潤に寄与することから、熱ストレスが転移浸潤の亢進や上皮間葉転換を誘導する可能性について検討した結果、熱ストレスにより転移細胞数の増加が観察され、この熱による転移能亢進へのStat3の活性化の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、熱ストレスによるStat3活性化の生理的意義として、Stat3の標的遺伝子の発現を介した温熱耐性獲得、細胞転移能亢進などが示唆された。これらは、癌温熱療法や化学療法における治療の妨げや癌悪性化の可能性を示している。熱ストレスにより活性化したStat3を阻害することは治療効果の向上と副作用の低減に有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：The stress response contributes to cellular homeostasis by expressing heat shock proteins (Hsp). However, Hsp causes resistance to heat stress and anticancer drugs in cancer cells. In this study, we showed the involvement of Stat3 and Hsp105 in the acquisition of thermotolerance of cancer cells. Since Stat3 activation contributes to cancer cell survival and metastasis, we investigated how heat stress possibly induces enhanced metastatic invasion and epithelial-mesenchymal transition. Cell migration assay and western blot analysis suggested that heat shock increases the number of migrating cells and the involvement of Stat3 phosphorylation in the heat shock-induced cancer cell migration.

研究分野：生物系薬学

キーワード：熱ストレス Hsp Stat 低酸素 HIF VEGF

## 1. 研究開始当初の背景

熱ストレス応答は、熱ショックタンパク質(Hsp)の発現を介して細胞の恒常性維持に寄与する。一方、癌細胞における Hsp の発現増加は、熱や薬剤に対し抵抗性を引き起こし治療の妨げとなる。Stat3 は固形癌をはじめ多くに癌で活性化しており、転移をはじめとする癌悪性化に寄与するが、熱ストレス時における Stat3 活性化と癌悪性化へ関連は明らかでない。これまでに我々は、哺乳動物細胞の熱ショックタンパク質である Hsp105 がサイトカイン伝達系転写因子 Stat3 を介して Hsp70 を転写誘導することを明らかにしてきた。これは 42°C という比較的温和なストレス条件下において Stat3 が Hsp70 の発現誘導を介して温熱耐性化に寄与する可能性を示唆している。

予備的な検討において、熱ストレスにより Stat3 活性化の指標であるチロシンリン酸化や Stat3 の核内発現が亢進することを見出している。熱ストレスによる Stat3 リン酸化は、Stat3 の上流キナーゼである JAK チロシンキナーゼ阻害剤で抑制されたことから、熱ストレスによる JAK の活性化が示唆された。通常、JAK の活性化はサイトカインレセプターにリガンドが結合することで起こるが、熱ストレスのようなリガンド非依存的な JAK-Stat 経路の活性化は不明である。

熱ストレスは、温熱耐性化を誘導するだけでなく、上皮間葉転換(EMT)を誘導すること、熱ストレスによる EMT 活性化が腫瘍形成を亢進させることが報告されている。しかし、これらに対する Stat3 活性化の関与は不明である。熱ストレスによる Stat3 活性化が癌悪性化に寄与するのであれば、熱ストレスによる Stat3 の活性化とその阻害効果を検証することは、温熱療法をはじめとする癌治療法において新たな視点を与えることができると考え本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

これまでに42°C程度の温和な熱処理によりStat3が一過性に活性化することを明らかにしている。Stat3は、通常、インターフェロンやインターロイキンなどリガンド依存的に活性化されるが、熱ストレスはリガンド非依存的なStat3活性化の可能性がある。熱ストレスによる癌悪性化として、Stat3の標的遺伝子の発現を介したEMT亢進と低酸素環境下におけるVEGF発現を介した血管新生の2つが想定された。これらは、温熱療法における治療の妨げや癌悪性化の可能性を示しており、温熱療法においてStat3を阻害することは治療効果の向上と転移など副次的作用の抑制に有用であると期待される。本研究では、熱ストレス応答として、癌悪性化因子としてのStat3のリン酸化を介した活性化の意義とその抑制の効果を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 熱ストレスによる Stat3 活性化と温熱耐性

細胞には、ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞とその亜株である HeLa S3 細胞、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた。熱処理はウォーターバスあるいはインキュベーター内で行った。Stat3 活性化は抗リン酸化 Stat3(Tyr705)抗体を用いたウエスタンブロット法および蛍光検疫染色法により解析した。温熱耐性実験は細胞を 42 で短時間処理し、37 で数時間培養後、致命的な温度である 45 で処理した。処理後の細胞の生存をニュー

トラルレッド法や細胞形態変化により評価した。

#### (2) 熱ストレスによる HIF-1 $\alpha$ の蓄積と HIF-1 標的遺伝子の発現変化

HeLa細胞、ヒト網膜色素上皮由来RPE-1細胞(hTERT不死化細胞)、あるいはヒト乳癌由来MCF-7細胞を、37°Cまたは42°Cにおいて塩化コバルトあるいはプロテアソーム阻害剤MG132で6時間処理した。低酸素処理(1% O<sub>2</sub>)はマルチガスインキュベーター(APM-30D, ASTEC)で行った。HIF-1 $\alpha$ の発現はウエスタンブロット法、HIF-1標的遺伝子の発現はTaqManプローブを使用し、QuantStudio 1リアルタイム PCRシステム(Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。

#### (3) 熱ストレスによる細胞遊走亢進

細胞遊走はトランスウェル(Corning)を用いて評価した。細胞を0.1% BSAを含む無血清培地に懸濁し、トランスウェル上部に播種した。ウェルの下層部には10 ng/mLのEGF含有メディウムを加えて24時間培養した。トランスウェル上部の細胞を取り除いた後、遊走細胞をクリスタルバイオレット染色した。

#### (4) HSP105ファミリータンパク質の発現抑制が抗癌剤感受性に及ぼす影響

Hsp105 あるいは Apg-1 をターゲットとした shRNA 発現プラスミドを作製し、レンチウイルス感染によりノックダウン細胞(HeLa S3/shHsp105, HeLa S3/shApg-1)およびコントロール shRNA 発現細胞(HeLa S3/shCtrl)を樹立した。これらの細胞を用いて、アドリアマイシンおよびパクリタキセル感受性を WST-8 アッセイおよび細胞形態観察により評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 熱ストレスによる Stat3 活性化と温熱耐性への関与

HeLa細胞を42°Cで0.5~4時間処理し、抗リン酸化Stat3(Tyr705)抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、Stat3は0.5~1時間をピークに一過性にリン酸化されることを明らかにした。この熱ストレスによるStat3リン酸化は、JAK阻害剤であるAG490あるいはStat3のリン酸化阻害剤であるStattic処理により低レベルにまで減少した。42°C加温した細胞における熱ショックタンパク質の発現を調べたところ、Hsp105、Hsp70、およびHsp27がタンパク質レベルで増加しており、これらの発現はAG490およびStattic処理により部分的に抑制された。これらStat3のリン酸化阻害は、AG490と比較してStatticにおいて顕著に観察された。

温熱耐性化とStat3の関連が不明であることから、温熱耐性獲得へのStat3活性化阻害の影響について検討した。HeLa細胞あるいはHepG2細胞を42°Cで短時間処理し、37°Cで数時間培養後、致死的な温度である45°Cで処理した。その結果、42°Cで前加温していない細胞と比較して、前加温した細胞において有意な温熱耐性化が観察された。この温熱耐性化は、AG490またはStatticを処理することで有意に抑制された。Hsp105ノックダウン細胞を用いて検討したところ、Hsp105の発現抑制により温熱耐性獲得細胞が減少した。

温熱耐性化には、熱ショック転写因子を介した種々のHspの発現増加が重要である。本研究により、サイトカインシグナル伝達系転写因子であるStat3の関与を明らかにした。Hspの発現亢進による温熱耐性獲得は、温熱療法の問題点である。温熱療法における

Stat3阻害が有用であることが示唆された。

## (2) 熱ストレスによる HIF-1 $\alpha$ 蓄積量の増加と HIF-1 応答遺伝子の発現変化

HeLa細胞を37°Cまたは42°Cにおいて低酸素環境を模倣する塩化コバルトあるいはプロテアソーム阻害剤であるMG132を処理した。通常酸素条件下においてHIF-1 $\alpha$ は発現しなかったのに対して、塩化コバルト処理およびMG132処理においてHIF-1 $\alpha$ の蓄積が観察された。このHIF-1 $\alpha$ の発現は、37°Cと比較して熱処理時に増加した。これら熱ストレスによるHIF-1 $\alpha$ 発現量の増加は、低酸素処理時においても観察され、Stattic処理により一部抑制された。

HIF-1標的遺伝子であるVEGFAの発現変化を調べた結果、これらは低酸素処理により増加した。熱ストレスがHIF-1 $\alpha$ の発現量を増加させることで、下流のVEGFAの発現が亢進することが示唆された。一方、HeLa細胞で観察された熱ストレスによるHIF-1 $\alpha$ 蓄積量の増加とVEGFA誘導は、ヒト正常モデル細胞であるRPE-1/hTERT細胞やヒト乳癌由来MCF-7細胞では一部異なり、細胞特有の反応である可能性が考えられた。

癌微小環境は低酸素状態であり、低酸素依存的なHIF-1 $\alpha$ の蓄積は血管新生を介して癌悪性化に寄与する。以上の結果より、熱ストレスがHIF-1 $\alpha$ の発現増加を介して癌悪性化に寄与する可能性が示唆された。

## (3) 熱ストレスによる細胞遊走亢進と Stat3 の関与

42°Cの熱ストレスは EMT 誘導を介して細胞遊走を亢進する(*Cell Stress Chaperones*, 17, 765-778, 2012)。この論文において著者らは、熱ショック転写因子(HSF1)の関与について検討したが、HSF1 非依存的であると結論付けており、熱ショックによる細胞遊走亢進メカニズムの詳細不明であった。研究成果(1)のとおり、42°Cによる Stat3 リン酸化と阻害剤の効果を明らかにしたことから、Stat3 阻害剤を用いて熱ストレスによる細胞遊走亢進に及ぼす Stat3 の関与を調べた。その結果、熱ストレスは Stat3 のリン酸化を一過性に亢進し、細胞遊走を促進し、このリン酸化および細胞遊走が Stat3 阻害剤である Stattic により阻害されたことから、熱ストレスによる細胞遊走亢進への Stat3 の関与が示唆された。一方、EMT 誘導の指標となる E-カドヘリンおよびビメンチン、熱ショックタンパク質として Hsp70、Hsp105 の発現量をウエスタンブロット解析で確認したが、熱ストレスによる細胞遊走と相関する結果は得られず、他のタンパク質の関与が示唆された。

## (4) Hsp105 ファミリータンパク質の抗癌剤感受性の違い

熱ショックタンパク質 Hsp105 は、癌組織で高発現し、抗アポトーシス作用により薬剤抵抗性に寄与する。Hsp105 の発現抑制はアドリアマイシン(ADR)感受性を増加させる一方、パクリタキセル(PTX)感受性を低下させるが、Hsp105 と高い相同性をもつ Apg-1 が同様の機能を有するかは不明であった。そこで、Apg-1 の発現抑制が細胞増殖や抗癌併用療法剤感受性に及ぼす影響を Hsp105 と比較検討した。Apg-1 ノックダウン(KD)細胞と Hsp105KD 細胞の増殖をコントロール細胞と比較した結果、Apg-1 KD 細胞において細胞増殖の低下が観察され、Hsp105 ではなく Apg-1 の細胞増殖への役割が示唆された。ADR 感受性への Apg-1 KD の影響を調べたところ、Hsp105 KD と同程度に感受性が増加した。一方、PTX 処理において、Apg-1 KD 細胞はコントロール細胞と

同じく生存率が低下し、Hsp105 KD 細胞のような PTX 感受性の低下は観察されなかった。以上の結果、Apg-1 KD は細胞増殖を抑制し、ADR 感受性を高める一方、Hsp105 KD のように PTX 感受性を低下させないことが明らかになった。Apg-1 は精巣以外の正常組織における発現が低く、子宮頸部や肺などの癌組織で高発現している。Apg-1 が高発現している癌において、Apg-1 の発現抑制は微小管作動薬の感受性低下を起こさずに、癌併用療法に利用できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamane Teppei, Saito Youhei, Teshima Hiroko, Hagino Mari, Kakihana Ayana, Sato Saki, Shimada Masashi, Kato Yoshiho, Kuga Takahisa, Yamagishi Nobuyuki, Nakayama Yuji	4. 巻 120
2. 論文標題 Hsp105 suppresses Adriamycin induced cell death via nuclear localization signal dependent nuclear accumulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 17951 ~ 17962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matozaki Masashi, Saito Youhei, Yasutake Ryuji, Munira Sirajam, Kaibori Yuichiro, Yukawa Akihisa, Tada Madoka, Nakayama Yuji	4. 巻 377
2. 論文標題 Involvement of Stat3 phosphorylation in mild heat shock-induced thermotolerance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 67 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teshima Hiroko, Watanabe Hiroko, Yasutake Ryuji, Ikeda Yuki, Yonezu Yukiko, Okamoto Namiko, Kakihana Ayana, Yuki Ryuzaburo, Nakayama Yuji, Saito Youhei	4. 巻 122
2. 論文標題 Functional differences between Hsp105/110 family proteins in cell proliferation, cell division, and drug sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1958 ~ 1967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.30158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田咲希、齊藤洋平、幸龍三郎、中山祐治
2. 発表標題 熱ストレス強度に依存した細胞分裂の進行阻害
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Youhei Saito, Masashi Matozaki, Ryuji Yasutake, Sirajam Munira, Yuichiro Kaibori, Akihisa Yukawa, Madoka Tada, Yuji Nakayama
2. 発表標題 Stat3 contributes to thermotolerance through induction of Hsp105 in mammalian cells
3. 学会等名 The 2019 ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺寛子、齊藤洋平、三上大貴、幸龍三郎、中山祐治
2. 発表標題 熱ストレスによる低酸素誘導因子HIF-1 発現の亢進
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齊藤洋平、的崎雅史、湯川明久、多田円香、中山祐治
2. 発表標題 熱ストレスによるStat3活性化はHsp誘導と温熱耐性獲得に寄与する
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺寛子、齊藤洋平、三上大貴、中山祐治
2. 発表標題 低酸素誘導因子HIF-1 の細胞内発現に及ぼす熱ストレスの影響とHsp105の関与
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田萌々香, 齊藤洋平, 幸龍三郎, 中山祐治
2. 発表標題 熱ストレスが細胞遊走に及ぼす影響
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手島皓子, 渡辺寛子, 安武隆司, 池田有紀, 米津有希子, 岡本菜美子, 柿花采那, 幸龍三郎, 中山祐治, 齊藤洋平
2. 発表標題 Hsp105ファミリータンパクの細胞増殖や抗がん剤感受性への影響は異なる
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Saito Y, Nakayama Y	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 403
3. 書名 HSP70 in Human Diseases and Disorders	

〔産業財産権〕

〔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

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