

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08283

研究課題名(和文) 低分子量ストレスタンパク質群の分子標的タンパク質同定と機能制御システムの解析

研究課題名(英文) Identification of molecular target protein of small heat shock proteins and analysis of their functional regulatory system

研究代表者

西脇 理英 (Nishiwaki, Rie)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90734202

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)：低分子量ストレス蛋白質(HSPB)はヒト肝臓に恒常的に発現しており、肝臓組織でもHSPBのうちHSP20、HSP22、HSP27の発現が高い。これまでに、これらHSPBが肝臓細胞の増殖や転移能に対して抑制的に作用することを明らかとしている。HSPBの機能は、標的タンパク質との結合により制御される。本研究では、ヒト肝臓細胞においてHSPBが結合するタンパク質を検討し、HSP27がHSP20およびHSP22とそれぞれ独立して結合し、複合体を形成していることを明らかとした。さらに、これらの複合体の形成は肝臓細胞癌の進展と逆相関を示し、HSPB複合体が肝臓細胞癌の進展を抑制していることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量ストレス蛋白質(HSPB)による肝臓細胞癌の進展の制御については、私共が世界に先んじてその機構の詳細の検討を行っている。本研究において私共が見出した、肝臓細胞内においてHSP27がHSP20およびHSP22を標的分子として各々と独立に複合体を形成するという結果に加え、これらHSPB複合体の存在と肝臓細胞癌の進展の間には、分化度、大きさ、ステージ、脈管浸潤において逆相関の関係があるという結果は、低分子量ストレスタンパク質を標的とした新たな肝臓細胞癌の治療法の確立に大いに資すると思われた。

研究成果の概要(英文)：Small heat shock proteins (HSPBs) regulate a variety of cellular functions.

We have previously reported that HSP20, HSP22 and HSP27 are highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and that each HSP suppresses the progression of HCC. HSPBs are known to form protein complexes with various molecular target proteins and regulate them. In the present study, we investigated the target proteins to which HSPB binds in HCC. HSP27/HSP20 and HSP27/HSP22 complexes were observed in both HSPB6-overexpressing human HCC derived HuH-7 cells and resected human HCC tumor tissues, but not the HSP20/HSP22 complex. The presence of the HSPB complexes in HCC tissue was inversely correlated with the progression of HCC. Our results strongly suggest that the formation of HSPB complexes plays a suppressive role in HCC progression.

研究分野：肝臓学 腫瘍生物学 細胞生物学 薬理学

キーワード：ストレスタンパク質 低分子量 肝臓細胞癌 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

熱や化学物質などによる種々のストレスに対する生体の応答をストレス反応と呼んでおり、外的環境の変化に対して生体は迅速に反応してストレスタンパク質(heat shock protein; HSP)と称される一群のタンパク質が誘導される。HSPには分子量70 kDaのHSP70(HSPA)や90 kDaのHSP90(HSPC)などの高分子量ストレスタンパク質のほか、分子量が10-30 kDaである低分子量ストレスタンパク質がHSPBと総称され分類されている。低分子量ストレスタンパク質は遺伝子解析により10種存在することが知られており、臓器分布の特性によりClass I及びIIに分類されている。広く様々な臓器に分布して発現することが知られているClass I HSPBのうちHSP27、HSP20及びHSP22はヒト肝臓にも恒常的に発現している。さらに肝臓組織においてもその発現が高いことが認められている。低分子量ストレスタンパク質はストレス応答に際しては、細胞内で分子シャペロンとして作用することが知られているが、近年、シャペロンとしての活性以外に個々の低分子量ストレスタンパク質に固有の作用もあることが明らかにされてきた。種々のがん細胞において低分子量ストレスタンパク質の発現と予後についての報告がなされるようになり、低分子量ストレスタンパク質はがん細胞の増殖及び遊走・浸潤・転移に深く関与していることが明らかとなってきている。低分子量ストレスタンパク質はリン酸化などの翻訳後修飾を受け、その機能が変化すること、それ自身で多量体を形成すること、または他の分子標的となるタンパク質と複合体を形成することで機能を発揮することが知られているが、その詳細はいまだ不明な部分が多い。

肝細胞癌は、ウイルス性肝炎などによる持続する肝臓の炎症を特徴とする肝炎、肝硬変の患者に高率に発症することが知られている。手術などで腫瘍を除去しても再発・転移が高率で生じることからその予後は不良であり、我が国の悪性腫瘍による死亡率の第5位である。最近、インターフェロンフリーの経口治療薬の開発によりウイルス性肝炎の治療法が飛躍的に進歩し、根治が期待できるようになり肝細胞癌の減少が期待されてはいる。しかし近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)による肝細胞癌の発症は増加傾向にあり、メタボリックシンドロームの増加を鑑みれば肝細胞癌の発症・進展の機序を解明し、増殖、遊走・浸潤・転移に対する新たな分子標的治療法の確立や、より確実な予後予測の指標の確立は急務といえる。

私共は、低分子量ストレスタンパク質の肝細胞癌への関与に注目して、大垣市民病院との共同研究を進めており、今までにリン酸化型HSP27とHSP20の蛋白質発現がTNM分類による肝細胞癌のステージ進行に伴い減少することを見出し、低分子量ストレスタンパク質が肝細胞癌の進展に関与していることを世界で始めて報告した。さらにその分子機序の検討を行い、リン酸化型HSP27がERK signaling pathwayを抑制することでcyclin D1の産生を抑制し、肝細胞癌の増殖を制御していること、一方、HSP20はERKおよびPI3 kinase/AKT signaling pathwayを抑制して肝細胞癌の増殖を抑制していることを明らかとしている。さらにHSP20は肝細胞癌細胞内でPI3 kinaseに結合することでその活性を抑制すること、IKKの発現を抑制することでNF- κ Bの活性を抑制すること、Bcl-2 familyの中のBaxと結合することでapoptosisを促進的に制御していることも報告している。またリン酸化型HSP20がTGF β 刺激による肝癌細胞の遊走・浸潤を抑制することも明らかとした。さらにHSP22もPI3 kinaseなどの分子標的と直接結合してその活性を制御していることも報告してきた。肝細胞癌における低分子量ストレスタンパク質の機能解析において、特にHSP20およびHSP22に関しては私共の研究が独走状態である。

近年、低分子量ストレスタンパク質が、がん治療における新たな分子標的となる可能性が示唆されるようになってきており、肝細胞癌においても分子標的としての低分子量ストレスタンパク質が新たな治療の糸口となる可能性は非常に高い。生体内で低分子量ストレスタンパク質は標的分子と複合体を形成し、その活性を制御することが知られている。その複合体ネットワークの形成および機能の肝細胞癌における詳細は未だ不明である。肝臓細胞内において発現が確認されているHSP27、HSP20、HSP22などの低分子量ストレスタンパク質が、どのような分子標的をクライアントとして直接的な相互作用をしているのか、低分子量ストレスタンパク質の複合体がどのように協働して肝臓細胞の機能を制御しているのか、その機構の詳細の検討が求められている。

2. 研究の目的

私共はこれまでに低分子量ストレスタンパク質のうちHSP27、HSP20、HSP22が肝臓細胞の増殖、遊走・浸潤・転移を制御していること、これらの機能発現に翻訳後修飾であるリン酸化が影響していることを明らかとしてきた。またHSP20とHSP22はPI3 kinaseなどの分子標的と直接結合してその活性を制御していることも報告してきた。生体内では低分子量ストレスタンパク質同士でも複合体を形成し標的分子を制御することが知られている。私共は、これまでの低分子量ストレスタンパク質複合体ネットワークの研究の過程において、ヒト肝臓細胞癌の細胞株HuH-7に野生型HSP20を安定的に発現させたヒト肝臓細胞癌のモデル細胞を作成し、このHSP20発現HuH-7細胞内において、HSP27がHSP20と結合して複合体を形成していること、HSP27はHSP22とも複合体を形成しているが、HSP20とHSP22とは結合していないことなどを見出している。しかしながら、これら低分子量ストレスタンパク質複合体ネットワークの形成、および、その機能

の肝細胞癌における詳細は未だ不明である。本研究の目的は低分子量ストレスタンパク質複合体を介した新たな肝細胞癌治療法の確立に資するため、ヒト肝細胞癌における低分子量ストレスタンパク質と分子標的となるタンパク質との複合体形成、およびその機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

肝癌細胞における低分子量ストレスタンパク質の複合体解析：私共は、ヒト肝細胞癌由来細胞株 HuH-7 に HSP20 を強制発現させた肝癌腫瘍部のモデル細胞を用いて、各低分子量ストレスタンパク質を認識する抗体を用いた免疫沈降法によって低分子量ストレスタンパク質 - 分子標的タンパク質複合体を分離し、immunoblot 法により組成を解析する方法を確立している。本研究ではヒト肝癌の手術標本を用い、肝癌モデル細胞株により解析された低分子量ストレスタンパク質複合体のヒト肝癌における存在及び局在を免疫沈降法および immunoblot 法等で確認し、肝癌の分化度、ステージ、腫瘍の個数、腫瘍の大きさ、浸潤の有無などとの関連について、フィッシャーの正確確率検定などの統計学的手法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1)HSP20 と HSP22 との複合体形成解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)の腫瘍部における HSP20 タンパク質と HSP22 タンパク質との複合体形成を、免疫沈降法および immunoblot 法を用いて解析した。その結果、肝癌モデル細胞株における結果と同様に、全例において HSP20 と HSP22 との間には直接の結合が認められなかった。肝細胞癌において HSP20 と HSP22 とは直接には相互作用がないことが強く示唆された。

(2)HSP20 または HSP22 と HSP27 との複合体形成解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)の腫瘍部における HSP20 タンパク質または HSP22 タンパク質と HSP27 タンパク質との複合体形成を、免疫沈降法および immunoblot 法を用いて解析した。その結果、HSP20 と HSP27 および HSP22 と HSP27 との直接結合が認められた。HSP27 と HSP20 および HSP27 と HSP22 の直接結合による複合体は、HSP20/HSP27 と HSP22/HSP27 複合体の両方が存在する症例(n=4)、HSP20/HSP27 複合体は存在するが HSP22/HSP27 複合体は存在しない症例(n=14)、HSP22/HSP27 複合体は存在するが HSP20/HSP27 複合体は存在しない症例(n=2)、どちらの複合体も認められない症例(n=24)がそれぞれ存在することを見出した。HSP20 と HSP22 は、それぞれが独立して分子標的としての HSP27 と結合して複合体を形成することで機能していることが示唆された。

(3)低分子量ストレスタンパク質複合体形成と肝細胞癌の分化度との相関解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)を、高分化度と中～低分化度とに分け、低分子量ストレスタンパク質複合体の存在様式との比較を行ったところ、HSP20/HSP27 と HSP22/HSP27 複合体の両方が存在する症例群とその他の症例群と比較において、中～低分化度の腫瘍がその他の症例群で有意に多い($p=0.0425$)ことが認められた。

(4)低分子量ストレスタンパク質複合体形成と肝細胞癌のステージとの相関解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)の症例を、TNM 分類によるステージ I とステージ II～IV とに分け、低分子量ストレスタンパク質複合体の存在様式との比較を行ったところ、HSP20/HSP27 複合体が存在する症例群とその他の症例群と比較において、ステージ II～IV の症例がその他の症例群で有意に多い($p=0.0079$)ことが認められた。また、HSP20/HSP27 と HSP22/HSP27 複合体の両方が存在する症例群とその他の症例群と比較においても、ステージ II～IV がその他の症例群で有意に多い($p=0.0143$)ことが認められた。

(5)低分子量ストレスタンパク質複合体形成と肝細胞癌の腫瘍の個数との相関解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)の症例を腫瘍個数 1 個と腫瘍個数 2 個以上とに分け、低分子量ストレスタンパク質複合体の存在様式との比較を行ったところ、腫瘍の個数と低分子量ストレスタンパク質複合体の存在様式との間に相関関係は認められなかった。

(6)低分子量ストレスタンパク質複合体形成と肝細胞癌の腫瘍の大きさとの相関解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)を小さいサイズ(≤ 30 mm)の腫瘍とより大きいサイズ(> 30 mm)の腫瘍とに分け、低分子量ストレスタンパク質複合体の存在様式との比較を行ったところ、腫瘍の大きさと低分子量ストレスタンパク質複合体の存在との関係は、HSP20/HSP27 複合体のみが存在する症例群($p=0.0455$)、HSP22/HSP27 複合体のみが存在する症例群($p=0.0450$)、HSP20/HSP27 と HSP22/HSP27 複合体の両方が存在する症例群($p=0.0286$)、HSP20/HSP27 と HSP22/HSP27 複合体のいずれかが存在する症例群($p=0.0396$)のいずれにおいても、その他の症例群との比較において、複合体が存在する症例群で小さいサイズ(≤ 30 mm)の腫瘍が有意に多いことが認められた。

(7)低分子量ストレスタンパク質複合体形成と肝細胞癌の脈管浸潤との相関解析：ヒト肝癌手術標本(n=44)の症例を、脈管浸潤の有無で分け、低分子量ストレスタンパク質複合体の存在様式との比較を行ったところ、HSP20/HSP27 と HSP22/HSP27 複合体のいずれかが存在する症例群とその他の症例群と比較において、脈管浸潤がその他の症例群で有意に多い($p=0.0391$)ことが認められた。

これらの結果により、肝癌細胞内において、低分子量ストレスタンパク質である HSP20 および HSP22 と HSP27 は互いを分子標的としても認識してヘテロ複合体を形成していることが明らかとなった。さらに、この低分子量ストレスタンパク質ヘテロ複合体の形成は肝細胞癌の進展に抑制的に機能していることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kobayashi K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamada N, Migita S, Hioki T, Mizutani D and Kozawa O.	4. 巻 6
2. 論文標題 Heat shock protein 70 positively regulates transforming growth factor- β -induced hepatocellular carcinoma cell migration via the AKT signaling pathway.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada N, Matsushima-Nishiwaki R, Kobayashi K, Takahata S, Toyoda H, Kumada T and Kozawa O.	4. 巻 21
2. 論文標題 Cellular Functions of Small Heat Shock Proteins (HSPB) in Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr. Mol. Med.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1573405617666210204211252.	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 Yamada N, Matsushima-Nishiwaki R, Kobayashi K, Tachi J and Kozawa O.	4. 巻 703
2. 論文標題 GLP-1 reduces the migration of hepatocellular carcinoma cells via suppression of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch. Biochem. Biophys.	6. 最初と最後の頁 108851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108851.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kuroyanagi G, Sakai G, Otsuka T, Yamamoto N, Fujita K, Kawabata T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O and Tokuda H.	4. 巻 16
2. 論文標題 HSP22 (HSPB8) positively regulates PGF2 β -induced synthesis of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor in osteoblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Orthop. Surg. Res.	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13018-021-02209-8.PMID: 33478532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsushima-Nishiwaki R, Yamada N, Hattori Y, Hosokawa Y, Tachi J, Hori T and Kozawa O.	4. 巻 17
2. 論文標題 SERMs (selective estrogen receptor modulator) acting as estrogen receptor agonists in hepatocellular carcinoma cells, inhibit the transforming growth factor- β -induced migration via specific inhibition of AKT signaling pathway.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0262485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0262485.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroyanagi G, Tokuda H, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Kim W, Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H and Kozawa O.	4. 巻 23
2. 論文標題 Upregulation of TGF- β -induced HSP27 by HSP90 inhibitors in osteoblasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet. Disord.	6. 最初と最後の頁 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-022-05419-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroyanagi G, Kawabata T, Tokuda H, Fujita K, Matsushima-Nishiwaki R, Sakai G, Tachi J, Hioki T, Kim W, Iida H, Otsuka T and Kozawa O.	4. 巻 63
2. 論文標題 Attenuation by HSP90 inhibitors of EGF-elicited migration of osteoblasts: involvement of p44/p42 MAP kinase.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Connect Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 359-369.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03008207.2021.1939323.	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 Matsushima-Nishiwaki R, Toyoda H, Maeda A, Kaneoka Y, Kumada T and Kozawa O.	4. 巻 732
2. 論文標題 Correlation between the complex of small heat shock proteins (HSPBs) and the progression in patients with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arch. Biochem. Biophys.	6. 最初と最後の頁 109461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroyanagi G, Tachi J, Fujita K, Kawabata T, Sakai G, Nakashima D, Kim W, Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Otsuka T, Iida H, Kozawa O and Tokuda H.	4. 巻 17
2. 論文標題 HSP70 inhibitors upregulate prostaglandin E1-induced synthesis of interleukin-6 in osteoblasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0279134.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0279134.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西脇理英、山田紀子、小澤 修
2. 発表標題 GLP-1による肝がん細胞遊走の抑制：JNKシグナル伝達経路の阻害
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田紀子、西脇理英、小澤 修
2. 発表標題 ケルセチンは、HGFまたはTGF- α によって刺激されたHCC細胞遊走を抑制する：AKTシグナル伝達経路の減衰
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	高井 光治 (Takai Koji) (70402196)	岐阜大学・大学院医学系研究科・特任教授 (13701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	小澤 修 (Kozawa Osamu) (90225417)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

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