

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4月1日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590337

研究課題名（和文）HSP27のアセチル化修飾が腫瘍形成能に与える影響の検討

研究課題名（英文）Influence on tumor growth by acetylation state of HSP27

研究代表者

及川 浩樹（OIKAWA HIROKI）

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50285582

研究成果の概要（和文）：HDAC6あるいはNACC1をsiRNAによりノックダウンし、HSP27抗体で免疫沈降すると、HSP27のアセチル化が亢進しているようにみえたが、acetyl-lysine抗体で免疫沈降すると、HSP27のアセチル化の明らかな亢進は認められなかった。HSP27のリジン残基7個を順次アルギニン残基に変換したvectorを作製し、HDAC6をsiRNAでノックダウンあるいはTSA添加し、HSP27のアセチル化状態も検討したが、その明らかな変化は認められなかった。更にHDAC6をsiRNAでノックダウンあるいはTSA添加し、アセチル化部位についてLC-MS/MSで検討したが、アセチル化の生じている部位の特定もできなかった。そこで、腫瘍形成に大きく関わっている β -cateninの細胞内動態にHSP27がどのような影響を及ぼしているかを検討した。その結果、細胞質で共局在を示しており、pull down assayにて直接結合していることが分かった。更にHSP27をsiRNAにてノックダウンすると、 β -cateninのユビキチン化と分解が亢進することが明らかになり、HSP27は β -cateninを細胞内で維持するのに関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using silencing of HDAC6 or NACC1 on MB-231, hyperacetylation of HSP27 was seen by immunoprecipitation of the endogenous proteins with anti-HSP27 antibody, but not with anti-acetyl-lysine antibody. None of serial mutations from lysine to arginine in HSP27 also led to evident change of the acetylation state by treatment with HDAC6 siRNA or TSA (HDAC inhibitor). Additionally, LC tandem mass spectrometric analysis did not detect acetylation sites of HSP27 on treatment with HDAC6 siRNA or TSA. Therefore association between HSP27 and β -catenin was examined. Immunohistochemical analysis indicated colocalization of HSP27 and β -catenin in the cytoplasm of MB-231. The interaction between HSP27 and β -catenin was confirmed by immunoprecipitation using cell lysate of MB-231 and pull down assay using Halo- or Flag-tagged proteins of HSP27 and β -catenin by wheat germ protein expression system. Silencing of HSP27 induced the ubiquitination of β -catenin and the degradation by proteasome system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：HSP27、アセチル化、 β catenin、乳癌

1. 研究開始当初の背景

Heat shock protein 27 (HSP27) は乳癌で発現が亢進しており、化学療法をはじめとする治療に耐性を示す大きな要因となっている。これは、HSP27 が cytochrome c や pro-caspase 3 と結合することにより、apoptosis の経路を抑制的に制御しているためである。また、HSP27 は Akt、あるいは NF- κ B の抑制因子である I κ B と結合することにより、それぞれの経路の活性化を保ち、腫瘍細胞の生存に一役買っている。更に HSP27 は estrogen receptor α 、HER2、 β カテニンと結合し、腫瘍形成に影響を与えている可能性も示唆されている。また、アクチンの再構成を制御する事により、細胞の遊走にも影響を与えているという報告がある。以上のように HSP27 はさまざまな面で乳癌の形成および維持に関与しているおり、この分子の制御は治療に多大な貢献をもたらす可能性がある。

分子が細胞において機能するためには、その発現の調節が最初の一步であるが、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾が発現した分子の機能制御に大きな役割を担っている。最近、ヒストンをはじめ、さまざまな分子がリジン残基のアセチル化修飾（アセチル化および脱アセチル化）により、機能が制御されているという報告が認められる。しかし、HSP27 のアセチル化修飾についての報告は認められず、この修飾がどのように細胞機能に影響を与えるかは不明である。

histone deacetylase 6 (HDAC6) は細胞質に存在する脱アセチル化酵素で、 α -tubulin、cortactin、HSP90 の脱アセチル化を促進し、遊走あるいは分子シャペロンとしての機能を制御している。我々は、BTB/POZ domain family に属する Nucleus accumbens-1 (NACC1) が HDAC6 と結合し、HDAC6 の α -

tubulin の脱アセチル化および細胞の遊走を制御している事を解明した。更に NACC1 が広く HDAC6 の脱アセチル化機構に影響を及ぼしているか検討するため、cortactin と HSP90 について検討した。その結果、cortactin および HSP90 は、HDAC6 と NACC1 の協調的作用により脱アセチル化が制御され、接着斑の形成あるいはレセプターの恒常性の維持が変化する事を確認した。

そこで、我々は、HSP27 にもリジン残基が 7 カ所あることから、いずれかがアセチル化修飾の制御を受けることにより、上記機能に変化を与え、乳癌の腫瘍形成および維持に影響を生じると仮定した。

2. 研究の目的

本研究では、乳癌で発現が亢進している HSP27 について、そのアセチル化修飾が化学療法への耐性および腫瘍形成能にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、そのアセチル化修飾の制御に関して、臨床応用への研究基盤を確立することを目的とする。しかし、当初の目的は上記であったが、HSP27 のアセチル化が明確に証明できなかったため、HSP27 が腫瘍形成に大きく関わっている β -catenin の細胞内動態にどのような影響を与えるかを検討することに目的を変更した。

3. 研究の方法

(1) HSP27 のアセチル化修飾部位の同定

乳癌細胞株である MB-231 を対象とし、以下の実験を行った。

- ① HDAC6 および NACC1 の siRNA でそれぞれをノックダウンし、HSP27 抗体あるいは acetyl-lysine 抗体にて免疫沈降し、アセチル化が生じているか検討した。
- ② リジン残基 7 個をアルギニン残基に

順次変換した HSP27 の発現 vector を作成した（リジン残基をアルギニン残基に変換した時はアセチル化が起こらない状態となる）。

③ HSP27 の wild type あるいは上記 mutation を有す vector と HDAC6 の siRNA をダブルトランスフェクションし、免疫沈降にてアセチル化状態を検討した。同様な検討は HDAC inhibitor である TSA 処理でも行った。

④ 更に LC-MS/MS にて、HSP27 のアセチル化部位について確認する。

(2) β -catenin と Hsp27 の細胞内局在の検討
それぞれの分子について蛍光免疫染色を行い、confocal laser scanning microscopy にて検討した。

(3) β -catenin と Hsp27 の結合の検討
それぞれの内在性タンパクに関して、 β -catenin 抗体あるいは Hsp27 抗体で免疫沈降を行い、検討した。また、小麦発現系でそれぞれのタンパクを発現させ、pull down にて、両者の結合について検討した。

(4) HSP27 による β -catenin の細胞内含有量への影響の検討

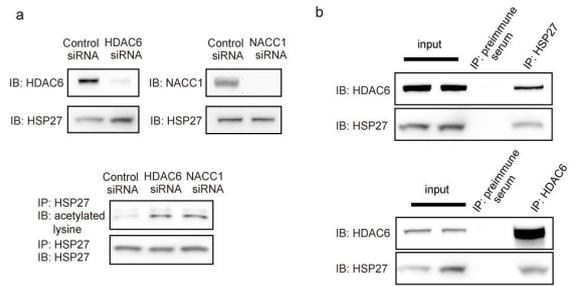
Hsp27 を siRNA でノックダウンした時の β -catenin の細胞内含有量の経時的变化を検討した。また、HSP27 を siRNA でノックダウンし、MG-132 (2.5 μ M) 添加5時間後での β -catenin のユビキチン化およびリン酸化を検討した。

4. 研究成果

(1) HSP27 のアセチル化制御の検討

HDAC6 と NACC1 が HSP27 の脱アセチル化を協調的に制御しているか検討を行うと、脱アセチル化は HDAC6 と NACC1 により協調的に制御

されていることが示唆された。



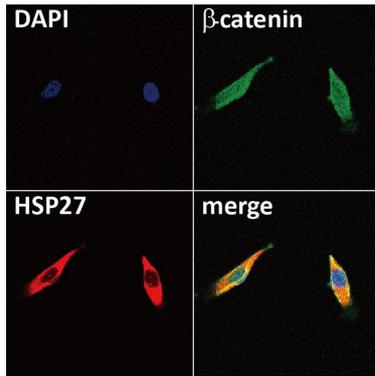
HDAC6 と NACC1 による HSP27 のアセチル化状態の制御. a. HDAC6 あるいは NACC1 を siRNA でノックダウンして得た細胞溶解液を HSP27 抗体で免疫沈降し、acetyl-lysine 抗体で immunoblot した. b. 内在性のタンパクを HSP27 あるいは HDAC6 で免疫沈降し、HSP27 および NACC1 で immunoblot した。

しかし、逆に HDAC6 および NACC1 をノックダウンし、アセチル化抗体で免疫沈降を行うと、アセチル化の亢進を確認することはできなかった。また、HSP27 のリジン残基 7 個を順次アルギニン残基に変換した vector を作製し、HDAC6 を siRNA でノックダウンあるいは TSA 添加し、HSP27 のアセチル化を検討したが、アセチル化状態の明らかな変化は確認できなかった。更に HDAC6 を siRNA でノックダウンあるいは TSA 添加し、LC-MS/MS で HSP27 のアセチル化部位の検討も行ったが、HSP27 のアセチル化部位について明らかな証拠を得ることができなかった。以上の様に、HSP27 のアセチル化修飾について明らかな変化を確認することができなかったため、HSP27 が腫瘍形成に大きく関わっている β -catenin の細胞内動態に寄与しているかを更に検討することにした。

(2) β -catenin と HSP27 の細胞内局在の検討.

MB231 の内在性タンパクに関して、蛍光免疫染色を行い、confocal laser scanning microscopy にて観察した。その結果、2つの分子は、いずれも細胞質にびまん性に分布し

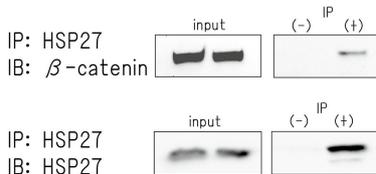
ており、共局在を示していた。



HSP27 と β -catenin の細胞内局在の検討

(3) β -catenin と HSP27 の結合の検討

内在性のタンパクに関して immunoprecipitation を行った。その結果、 β -catenin と HSP27 は細胞内で結合している事が確認された。

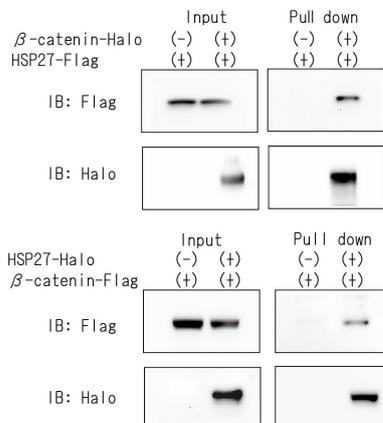


HSP27 と β -catenin の結合の検討.

MB231 の内在性のタンパクを HSP27 抗体で免疫沈降し、

β -catenin および HSP27 について immunoblot を行った。

また、小麦発現系で HSP27 と β -catenin をそれぞれ発現させ pull down assay を行った実験でも両者の結合がみられ、これが直接結合である事が確認された。

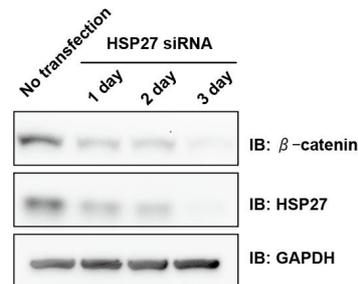


HSP27 と β -catenin の直接結合の検討

小麦発現系で Halo タグあるいは Flag タグを付けた HSP27 および β -catenin を発現させ、pull down assay を行った。

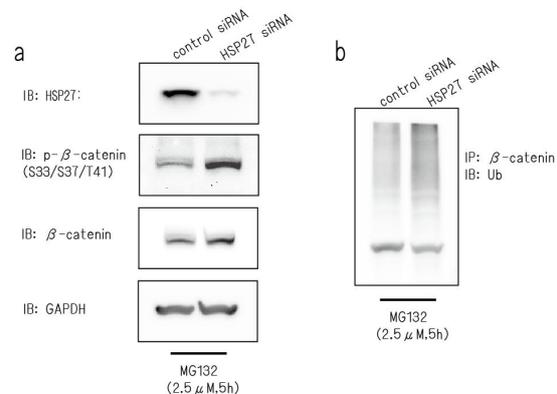
(4) HSP27 による β -catenin の細胞内含有量への影響

HSP27 を siRNA でノックダウンし、 β -catenin の経時的な細胞内含有量を immunoblot で検討した。その結果、Hsp27 の発現抑制に伴い、 β -catenin の細胞内含有量も減少する事が確認された。



HSP27 のノックダウンによる β -catenin の細胞内含有量への影響

更に HSP27 が β -catenin の分解系への移行を抑制しているかを調べるため、siRNA で HSP27 をノックダウンし、タンパクの proteasome 系での分解を抑制する MG132 ($2.5 \mu\text{M}$) を 5 時間反応させ、 β -catenin のリン酸化およびユビキチン化状態を検討した。その結果、HSP27 の発現抑制に伴い、 β -catenin のリン酸化およびユビキチン化が亢進している事が確認された。



HSP27 のノックダウンによる β -catenin の proteasome 系での分解

a. HSP27 を siRNA でノックダウンし、その後 MG132 (2.5 μ M) で 5 時間処理し、immunoblot を行った。b. 上記同様に処理して得た細胞溶解液を β -catenin で免疫沈降を行い、ユビキチン化が生じているかを immunoblot で検討した。

以上より、HSP27 は β -catenin と細胞質で直接結合し、その結合により β -catenin の分解系への移行を抑制し、 β -catenin の安定化を助け、これにより細胞内貯留および核移行を促進させ、腫瘍形成に影響を与えている事が示唆された。

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 14 件)

1. Tsunoda K, Takahashi K, Maeda F, Oikawa H, Akasaka T. A Case of Atypical Fibrous Histiocytoma with Positivity for CD163 and CD44. Acta Derm Venereol, in press (2013). 査読あり。
2. Kanno K, Kanno S, Nitta H, Uesugi N, Sugai T, Masuda T, Wakabayashi G, Maesawa C. Overexpression of histone deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. Oncol Rep 28 (2012) 867-73. 査読あり。
3. Tsunoda K, Satoh T, Akasaka K, Ishikawa Y, Ishida Y, Masuda T, Akasaka T. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: report of two cases. J Clin Exp Hematop 52 (2012) 23-9. 査読あり。
4. Yasuhira S, Saito T, Maesawa C, Masuda T. Sensor and effector kinases in DNA damage checkpoint regulate capacity for homologous recombination repair of fission yeast in G2 phase. DNA Repair 11 (2012) 666-75. 査読あり。
5. Ishikawa Y, Tsunoda K, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. Int J Oncol 41 (2012) 53-60. 査読あり。
6. Shibazaki M, Maesawa C, Akasaka K, Kassai S, Yasuhira S, Kanno K, Nakayama I, Sugiyama T, Wakabayashi G, Masuda T, Mori N. Transcriptional and post-transcriptional regulation of α -tubulin protein expression in relation with cell cycle-dependent regulation of tumor cells. Int J Oncol 40 (2012) 695-702. 査読あり。
7. Akasaka K, Maesawa C, Takahashi K, Masuda T, Akasaka T. Circumscribed palmar or plantar hypokeratosis: two cases and a review of published work. J Dermatol 39 (2012) 314-5. 査読あり。
8. Sakurai E, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Oikawa H, Sato M, Tsunoda K, Ishikawa Y, Watanabe A, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Downregulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells. Int J Oncol 39 (2011) 665-72. 査読あり。
9. Kawamura S, Maesawa C, Nakamura K, Nakayama K, Morita M, Hiruma Y, Yoshida T, Sakai A, Masuda T. Predisposition for borderline personality disorder with comorbid major depression is associated with that for polycystic

- ovary syndrome in female Japanese population. *Neuropsychiatr Dis Treat* 7 (2011) 655-62. 査読あり。
10. Tsunoda K, Oikawa H, Tada H, Tatemichi Y, Muraoka S, Miura S, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Nucleus accumbens-associated 1 contributes to cortactin deacetylation and augments the migration of melanoma cells. *J Invest Dermatol* 131 (2011) 1710-9. 査読あり。
11. Miyamoto A, Akasaka K, Oikawa H, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Immunohistochemical study of HER2 and TUBB3 proteins in extramammary Paget disease. *Am J Dermatopathol* 32 (2010) 578-85. 査読あり。
12. Tatemichi Y, Oikawa H, Maesawa C, Ambo J, Sato M, Koike H, Sata T, Fujioka T, Masuda T. Detection of human papillomavirus in a urothelial carcinoma mimicking urethral caruncle. *Int J Urol* 17 (2010) 189-91. 査読あり。
13. Takahashi T, Takahashi K, Yamashina M, Maesawa C, Kajiwara T, Taneichi H, Takebe N, Kaneko Y, Masuda T, Satoh J. Association of the TNF- α -C-857T polymorphism with resistance to the cholesterol-lowering effect of HMG-CoA reductase inhibitors in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33 (2010) 463-6. 査読あり。
14. Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316 (2010) 940-50. 査読あり。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 浩樹 (OIKAWA HIROKI)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：50285582

(2) 研究分担者

増田 友之 (MASUDA TOMOYUKI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10199698

(3) 連携研究者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10326647

稲葉 亨 (INABA TORU)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：60405800