

学位論文
Doctor's Thesis

Heat shock protein 105 を標的とした
siRNA による癌細胞アポトーシスの誘導

**(Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105
induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*)**

保坂 征司

Seiji Hosaka

指導 : 西村 泰治 教授

川筋 道雄 教授

馬場 秀夫 教授

2006 年 3 月

目次	1
1 要旨	3
2 発表論文リスト	6
3 謝辞	7
4 略語一覧	8
5 研究の背景と目的	9
5-1) 癌特異抗原の同定	9
5-2) SEREX 法の特徴	10
表1 これまでに SEREX 法にて同定された主な腫瘍抗原	11
表2 膵癌細胞株 CFPAC-1 より SEREX 法により同定された 18種の腫瘍抗原遺伝子	12
5-3) Heat shock protein 105 (HSP105)	13
5-4) 癌細胞におけるアポトーシスの制御	14
表3 アポトーシスに関与する癌関連の遺伝子群	14
5-5) RNA interference (RNAi)	15
5-6) 研究の目的	15
図1 HSP105 の多様な癌や腫瘍組織における高発現	16
図2 RNA 干渉 (RNAi) による特定の遺伝子の発現抑制機序	17
6 実験方法	18
6-1) 使用細胞株とマウス	18
6-2) プラスミド構築と導入	18
6-3) reverse transcription-PCR (RT-PCR)	18
6-4) アポトーシスの検出	19
6-5) 免疫沈降およびウエスタンブロッティング	19
6-6) RNAi による HSP105 蛋白発現の抑制	20
6-7) in vivo での siRNA を用いた腫瘍増殖抑制実験	20
表4 RT-PCR に用いたプライマー	21
7 実験結果	22
7-1) HSP105 の抗アポトーシス作用の解析	22
図3 マウス HSP105 高発現 NIH3T3 細胞株における HSP105 蛋白の発現解析	23
図4 熱ストレス後の早期細胞アポトーシスの解析	24
図5 Doxorubicin 添加後の早期細胞アポトーシスの解析	25
図6 Doxorubicin 添加後の晚期細胞アポトーシスの解析	26
7-2) 様々なヒト癌細胞株に対する HSP105-siRNA の効果	27
図7 ヒト正常大腸粘膜およびヒト大腸癌細胞株の RT-PCR による HSP105 mRNA の発現解析	28
図8 ヒト大腸癌細胞株 HCT116 への HSP105-siRNA 導入後の 光学顕微鏡写真と早期細胞アポトーシスの解析	29
図9 ヒト大腸癌細胞株 HCT116 および SW620 への HSP105-siRNA 導入後の HSP105 蛋白発現量と早期細胞アポトーシスの解析	31
図10 様々なヒト癌細胞株への HSP105-siRNA 導入後の HSP105 蛋白発現量と早期細胞アポトーシスの解析	31

7-3)	ヒト正常線維芽細胞株における HSP105-siRNA の効果	3 2
図 1 1	ヒト正常線維芽細胞株と種々のヒト癌細胞株における HSP105 蛋白発現の解析	3 3
図 1 2	ヒト正常線維芽細胞株 TURU における HSP105-siRNA 導入による形態学的変化	3 4
図 1 3	ヒト正常線維芽細胞株への HSP105-siRNA 導入後の HSP105 蛋白発現と細胞アポトーシスの解析	3 5
7-4)	in vivo 生着腫瘍に対する HSP105-siRNA の効果	3 6
図 1 4	in vivo における HSP105-siRNA の腫瘍増殖抑制効果	3 7
7-5)	HSP105-siRNA と熱ショックまたは抗癌剤との併用による ヒト癌細胞株に対するアポトーシス誘導における相乗効果	3 8
図 1 5	ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に対する HSP105-siRNA と doxorubicin の併用効果	3 9
図 1 6	ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に対する HSP105-siRNA と 熱ストレスの併用効果	4 0
7-6)	HSP105-siRNA によるアポトーシス経路の解析	4 1
図 1 7	HSP105-siRNA により誘導される PARP cleavage に対する caspase inhibitor の効果	4 2
図 1 8	HSP105-siRNA により誘導されるアポトーシス に対する caspase inhibitor の効果	4 3
図 1 9	HCT116 細胞株における免疫沈降法による HSP105 蛋白と p53 蛋白との会合に関する解析	4 4
図 2 0	HCT116 細胞株における HSP105-siRNA の p53 蛋白活性化に及ぼす影響の解析	4 5
図 2 1	HSP105-siRNA 処理された HCT116 細胞株における p53 蛋白により転写制御を受ける分子の mRNA 発現解析	4 6
8	考察	4 7
9	おわりに	5 0
1 0	参考文献	5 1

1 要旨

【目的】 我々は膵癌患者の血清を用いた膵癌細胞株 cDNA 発現ライブラリーのスクリーニングにより、膵癌抗原として同定した HSP105 が、膵癌に高発現していることを見出した。さらに、免疫組織染色法により HSP105 が、様々なヒトの癌において高発現していること、ならびに正常組織においては成人精巣に高発現しているが、他の組織における発現は少ないことを発見した。本研究は癌細胞における HSP105 の生物学的役割を解明するとともに、HSP105 を標的とした癌治療の可能性について検討することを目的とした。

【方法】 マウス HSP105 を過剰発現させた NIH3T3 細胞株を樹立し、この細胞株に熱ストレスや doxorubicin を負荷し、Annexin V 染色または propidium iodide(PI) による DNA 染色をおこない細胞のアポトーシスをフローサイトメトリーを用いて解析した。また、HSP105 を高発現しているヒトの様々な腫瘍細胞株に対して、siRNA を用いて HSP105 の発現を抑制し、癌細胞のアポトーシスに及ぼす影響を検討した。さらに、NOD SCID マウスの背部皮下に移植したヒト胃癌細胞株 KATO-3 に対して HSP105-siRNA 投与を行い、腫瘍縮小効果についても検討した。

【結果】 HSP105 を過剰発現した NIH3T3 細胞株において、熱ストレスや doxorubicin により誘導されるアポトーシスが著明に抑制された。siRNA を用いて HSP105 の発現を抑制すると、種々のヒト癌細胞株でアポトーシスが誘導されたが、ヒト正常線維芽細胞ではアポトーシスは誘導されなかった。さらに HSP105-siRNA を熱ストレスや doxorubicin と併用することにより、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に相乗的に強いアポトーシスが誘導された。in vivo においても NOD SCID マウスの背部に生着したヒト胃癌細胞株 KATO-3 への HSP105-siRNA 局所投与は、腫瘍の増殖を有意に抑制した。非ストレス状態の HCT116 細胞株において、HSP105 蛋白は p53 蛋白と結合していたが、HSP105-siRNA により誘導されるアポトーシスは、p53 非依存性かつ caspase 依存性であることが分かった。

【考察】 癌細胞株において HSP105 は抗アポトーシス作用を有し、癌細胞の不死化に関わっていると考えられた。HSP105-siRNA により誘導される様々な癌細胞株のアポトーシスの機序については、カスパーゼの上流にある分子の同定が今後の課題ではあるが、これまでの報告を考慮すると、異常蛋白または過剰蛋白の凝集により惹起される ER stress によるアポトーシスの誘導に HSP105 が抑制的に関与している可能性が考えられる。また、ヒト正常線維芽細胞は HSP105-siRNA によりアポトーシスへと誘導されないこと、siRNA は生体内においても遺伝子内に組み込まれないことを考慮すると、HSP105 を標的とした siRNA は安全な治療法になりうると考えられた。さらに doxorubicin や熱ショックの併用が HSP105-siRNA のアポトーシス誘導効果を増強することは、既存の薬剤との併用により、より強い臨床効果が得られる可能性も示唆された。

【結論】 癌細胞に高発現している HSP105 は抗アポトーシス作用を有し、癌細胞の不死化に関与していると考えられ、HSP105 は新たな癌治療の標的となりうる分子であると考えられた。siRNA を用いた HSP105 蛋白の発現抑制は、新たな癌の治療法の候補となり得ると考えられた。

Summary

We previously reported that the heat shock protein 105 (HSP105), identified by a serological analysis of the recombinant cDNA expression library (SEREX) using the serum from a pancreatic cancer patient, was overexpressed in various human tumors and the testis of adult men by immunohistochemical analysis. In the present study, to elucidate the biological function of HSP105 protein in cancer cells, we first established NIH3T3 cells overexpressing murine HSP105 (NIH3T3-HSP105). The NIH3T3-HSP105 cells acquired resistance to apoptosis induced by heat shock or doxorubicin. The small interfering RNA (siRNA)-mediated suppression of HSP105 protein expression induced apoptosis in human cancer cells but not in fibroblasts. By a combination of siRNA introduction and doxorubicin or heat shock treatment, apoptosis was induced synergistically in a human colon cancer cell line, HCT116 cells. *In vivo*, siRNA inoculation into the human gastric cancer cell line KATO-III established in the flank of an NOD SCID mouse suppressed the tumor growth. This siRNA-induced apoptosis was mediated through caspases, but not the p53 tumor suppressor protein, even though the HSP105 protein was bound to wild type p53 protein in HCT116 cells. These findings suggest that the constitutive overexpression of HSP105 in cancer cells is involved in malignant transformation by protecting tumor cells from apoptosis. HSP105 may thus be a novel target molecule for cancer therapy and a treatment regimen using synthetic siRNA to suppress the expression of HSP105 protein may provide a new strategy for cancer therapy.

2 発表論文リスト

1. Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, Hatayama T, Baba H, Nishimura Y. :
Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein
105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*.
Cancer Science, 97(7): 623-32, 2006.
2. Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, Senju S, Monji M, Hosaka S,
Komori H, Yoshitake Y, Motomura Y, Minohara M, Kubo T, Ishihara K,
Hatayama T, Ogawa M, Nishimura Y.:
DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer
and melanoma in mice through activation of both CD4⁺ T cells and CD8⁺
T cells.
Cancer Science, 96(10): 695-705, 2005.
3. Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, Senju S, Matsuyoshi H,
Tsukamoto H, Hosaka S, Komori H, Fukuma D, Ikuta Y, Katagiri T,
Furukawa Y, Ito H, Shinohara M, Nakamura Y, Nishimura Y.:
Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal
cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary
DNA microarray analysis. **Clinical Cancer Research**, 10(19): 6437-48, 2004.
4. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y,
Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T,
Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y.:
Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma,
is a novel tumor marker.
Biochem Biophys Res Commun, 306(1): 16-25, 2003.

3 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導を下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫識別学分野の西村泰治教授に深く感謝いたします。また、研究方法に関して直接御指導を頂いた千住覚助教授及び中面哲也助手に深く感謝いたします。また、西村教授のもとで研究する機会を与えて頂いた熊本大学大学院医学薬学研究部・旧第一外科学の川筋道雄教授および消化器外科学の馬場秀夫教授に深く感謝いたします。

ヒト肝癌細胞株 SK-Hep1、ヒト大腸癌細胞株 SW620、ヒト胃癌細胞株 KATO-3、MKN28 を御供与頂いた、久留米大学免疫学教室の伊東恭悟教授、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 を御供与頂いた、Johns Hopkins University の B. Vogelstein 教授、健康人線維芽細胞株 Turu、Mori を御供与頂いた、熊本大学発生医学センターの山泉克教授、NOD SCID マウスを御供与頂いた、熊本大学エイズ学研究センターの岡田誠治教授、ならびにマウスおよびヒト HSP105 の発現ベクターを御供与頂いた、京都薬科大学生化学教室の畑山巧教授に深く感謝いたします。

4 略語一覽

ADP; adenosine diphosphate

ATP; adenosine triphosphate

cDNA; complementary DNA

DNA; deoxyribonucleic acid

ER; endoplasmic reticulum

ERAD; ER-associated degradation

HSP; heat shock protein

mRNA; messenger ribonucleic acid

PARP; poly ADP-ribose polymerase

RNAi; RNA interference

RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction

SEREX; serological analysis of recombinant cDNA expression libraries

siRNA; small interfering RNA

UPR; unfolded protein response

5 研究の背景と目的

5-1) 癌特異抗原の同定

我々は癌免疫療法の標的となる癌特異抗原を同定する過程で HSP105 を発見し、その免疫療法への応用のみならず、分子標的治療にも応用可能であることを明らかにした。そこでまず、癌特異抗原の同定に関する研究の背景について述べることにする。

科学的基盤に立った癌の免疫療法を確立するための第一のステップは、ターゲットとなる腫瘍抗原を同定することである。このために、20 世紀初めよりヒトや実験動物に発生した種々の癌を用いて多大な努力がなされてきた。しかし、腫瘍抗原の存在をヒトの癌で実証することはむずかしく、長いあいだその存在すら疑われていた。地道な研究が実を結び、ヒトの腫瘍抗原が分子レベルで明らかにされたのは、1991 年であった。Ludwig 癌研究所 (Brussels Branch) の Boon らのグループ (1) は、メラノーマ患者の細胞傷害性 T 細胞が認識する腫瘍抗原、MAGE の遺伝子クローニングに成功した。彼らの論文が、ヒトの腫瘍抗原に科学的根拠を与え、また腫瘍抗原の同定方法も確立させた最初の報告であった。Boon の発表後、癌患者由来の CTL が認識するメラノーマやほかの癌の腫瘍抗原が、分子生物学的方法、もしくは生化学的方法を用いて同定されている (2-6)。1995 年にドイツ・Saarland 大学の Pfreundschuh ら (7) により、癌患者が自己の癌に反応して産生する抗体が認識する腫瘍抗原を遺伝子の発現クローニングの手法を取り入れて同定する方法、SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) が確立された。SEREX 法は、腫瘍抗原の同定を加速的に進展させており、すでに SEREX 法により同定された多数の腫瘍抗原がデータベース化されている。

近年においては cDNA マイクロアレイを始めとした新たな手法を用いて発癌・悪性化に関わる様々な遺伝子産物が同定され、これらの分子を標的とした分子標的治療薬の開発が進んでいる。

5-2) SEREX 法の特徴

癌患者の血清中の抗体と同一患者由来の癌細胞との反応を検索し、腫瘍抗原を同定しようという試みが Old ら (8) によって、1970 年代半ばより開始された。またそれ以前にも、わが国の吉田孝人ら (9) により、癌患者が産生する抗体の癌細胞に対する反応性の検索がおこなわれている。このようないわゆる「Autologous Typing 法」により、糖鎖抗原などの重要な腫瘍抗原が同定された。しかし、当初は細胞表面に発現する腫瘍抗原に検索をかぎっていたため、また当時はまだ各種の分子生物学的方法も確立されておらず、得られた成果は限られたものであった。

Autologous Typing 法に遺伝子発現クローニングを取り入れて開発されたのが SEREX 法である。腫瘍抗原同定における SEREX 法の最大の利点は、その簡便性にある。つまり SEREX 法では、癌細胞の培養株の樹立を必要とせず、T 細胞培養株の樹立も必要としないため、あらゆる癌での腫瘍抗原の検索に応用が可能である。さらに、癌患者の血清中の抗腫瘍抗体を利用するため、あらかじめ *in vivo* において抗腫瘍免疫を誘導することがわかった抗原を同定できるという特色がある。また、抗原の同定と遺伝子の同定が直結しており抗原の一次構造を直ちに決定できることも利点のひとつである。したがって、抗原の種々の正常あるいは癌組織における発現を調べることも容易である。

SEREX 法は患者血清と摘出した癌組織あるいはすでに樹立されたアロ腫瘍細胞株があれば、腫瘍細胞株の樹立を一切必要とせず、あらゆる腫瘍で腫瘍抗原の同定に利用が可能である。

メラノーマを対象におこなった SEREX 法による腫瘍抗原の最初の検索で、新しい抗原に加えて CTL で同定された MAGE-1 や tyrosinase の抗原も SEREX 法で検出できることが報告され、その実用性が示された (7)。その後、胃癌、腎癌、食道癌、大腸癌、肺癌、乳癌など種々の癌において、SEREX 法による腫瘍抗原の同定の試みが開始され (10、11)、これまでに SEREX 法で同定された主な抗原は、1) Cancer-testis(CT) 抗原、2) 分化抗原、3) 遺伝子増幅/過剰発現抗原、4) 突然変異抗原、5) 融合蛋白抗原、6) スプライシング異常により産生された抗原、7) レトロウイルス抗原の 7 グループに分類されている (表 1)。

我々が、膀胱癌細胞株 CFPAC-1 由来の cDNA ライブラリーを、膀胱癌患者血清中の IgG 抗体を用いてスクリーニングすること (SEREX 法) によって同定した腫瘍抗原遺伝子 (26) を以下に示す (表 2)。

表 1

これまでに SEREX 法で同定された主な抗原
(Nakatsura et al. BBRC: 2001;281:936-44 (25) より引用)

抗原の特徴	抗原名	発現する腫瘍
CT 抗原	NY-ESO-1	食道癌
	SSX-2(HOM-MEL-40)	メラノーマ
	CT7	メラノーマ
分化抗原	tyrosinase	メラノーマ
	galectin4	大腸癌
増幅/過剰発現した 遺伝子産物	AKT	胃癌
	carbonic anhydrase XII	腎癌
	KOC	メラノーマ、肝癌
突然変異抗原	p53	大腸癌
融合蛋白	E-cadherin/novel gene	胃癌
スプライシング異常 に由来する分子	NY-CO-37/38	大腸癌
	Restin	Hodgkin リンパ腫
レトロウイルス抗原	HERV-K10	腎癌

表 2

膵癌細胞株 CFPAC-1 より SEREX 法により同定された

18種の腫瘍抗原遺伝子

(Nakatsura et al. BBRC: 2001;281:936-44 (25) より引用)

腫瘍抗原遺伝子	相同性を示す遺伝子
KM-PA- 1	apg-2 (heat shock protein 110 family)
KM-PA- 2	EST (KIAA0124)
KM-PA- 3	β -actin
KM-PA- 4	coactosin-like protein (CLP)
KM-PA- 5	HALPHA44 (alpha-tubulin)
KM-PA- 6	unknown
KM-PA- 7	CDC-like kinase (CLK3)
KM-PA- 8	cytokeratin 18
KM-PA- 9	polyA binding protein
KM-PA-10	very-long-chain-acyl-CoA-dehydrogenase (VLCAD)
KM-PA-11	unknown
KM-PA-12	HLA-Cw heavy chain (MHC Class I)
KM-PA-13	unknown
KM-PA-14	CGI 55 protein
KM-PA-15	glycosylation-inhibiting factor (GIF)
KM-PA-16	unknown
KM-PA-17	DNA binding protein A (dbpA)
KM-PA-18	heat shock protein 105 (KIAA0201)

5-3) Heat shock protein 105 (HSP105)

Heat shock protein 105 (HSP110 と同義) (12) は HSP105/110 family に属するストレス蛋白であり、ほとんどの組織において軽度の発現を認め、マウスやラットの脳組織では mRNA レベルで高発現していることが知られている。また、蛋白質レベルでは、マウスの脳組織に高発現していることが知られている (12-15)。他の heat shock protein と同様に、HSP105 は生理的な状況でシャペロンとしての重要な役割を担っている。また、HSP105 は様々なストレスにより誘導され、それらのストレスにより引き起こされる細胞死から細胞を守る役割を果たしている。HSP105 は他の HSP70 ファミリー蛋白質と同様に ATP-binding domain、 β -sheet、loop ならびに α -helix domain から成り、 β -sheet ドメインで異常蛋白質と結合し、その凝集を妨げている (13, 16-18)。

マウス HSP105 を過剰発現させたラット神経細胞株 PC12 では、さまざまなストレスにより誘導されるカスパーゼ依存性のアポトーシスが抑制されている (19)。また、神経変性疾患である spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) の細胞モデルとして、COS-7 や SK-N-SH 細胞にポリグルタミン鎖を有するアンドロゲンレセプターを発現させると、ポリグルタミンの凝集を引き起こし、アポトーシスが誘導される。一方、アンドロゲンレセプターと HSP105 を共に発現させた細胞ではポリグルタミンの凝集は抑制され、その結果アポトーシスも抑制されたという報告がある (20)。さらに HSP105 は、マウスの胚形成期においては、アポトーシスの誘導効果があることが証明されている (21-24)。これらの報告は、HSP105 がアポトーシスの制御に関わっていることを示唆している。

我々は、これまでに膵癌細胞株由来の cDNA ライブラリーを、膵癌患者血清中の IgG 抗体を用いてスクリーニングすること (SEREX 法) によって同定した HSP105 蛋白 (表 2) が、大腸癌を含めた種々のヒト腫瘍において高発現していることを発見した (26)。さらに、大腸腺腫では高発現しておらず、HSP105 の過剰発現が大腸癌の発癌過程の後期に起こっているであろうことを報告してきた (25, 26)。最近の報告でも、転移能が高い大腸癌細胞株において HSP105 蛋白発現が増加しており、ヒト大腸癌組織を用いた免疫組織化学的検索において、臨床的進行度及びリンパ節の転移とも相関していることが報告されている (27)。

5-4) 癌細胞におけるアポトーシスの制御

細胞が癌化するためには、①異常に強い増殖能を獲得し、②アポトーシスによる細胞死から逃れることが必要である。多くの癌において、細胞周期や DNA 障害チェックポイントの中心をなす、2つの経路に変異が起こっていることが明らかにされている。それはRB 経路と p53 経路であり、前者は①に、後者は②に深く関与している。また、この両経路とアポトーシスをつなぐ分子の実態も徐々に解明されつつある。癌細胞においては、アポトーシス誘導因子や抑制因子の発現異常や変異が認められる。表3にアポトーシスに関与することが示された外来性因子や癌遺伝子の例をあげる。

表3 アポトーシスに関与する外来性因子と癌関連遺伝子群

外来性因子		遺伝子
アポトーシス 誘導因子	サイトカインや増殖因子の 除去	野生型p53 c-myc
	TNF、TGF- β	c-fos
	ステロイドホルモン	bcl-xs、bax
	抗Fas抗体、抗CD3抗体	Adenovirus E1A
	抗癌剤	
	ウイルス	
	熱ショック	
アポトーシス 抑制因子		変異型p53
	サイトカインや増殖因子 TPA	bcl-2、bcl-xl v-abl、c-fes EBV (LMP-1、EBNA-2) Adenovirus E1B

5-5) RNA interference (RNAi)

RNAi は機能阻害したい遺伝子の特定領域と相同な sense RNA と antisense RNA からなる二本鎖 RNA が、標的遺伝子の転写産物である mRNA の相同部分を干渉破壊するという現象で、1998 年に Fire らによって線虫を用いた実験で初めて発見された (28)。その後、RNAi は線虫をはじめ、ショウジョウバエ、原生動物、脊椎動物そして植物と、さまざまな生物種で観察される現象であることが明らかとなった。哺乳動物においても 2001 年、Elbashir らが化学合成した短い二本鎖 RNA を直接哺乳動物細胞内に導入することにより、RNAi を誘導できることを証明した (29)。

dsRNA が細胞内に侵入すると、dsRNA は Dicer と呼ばれる RNaseⅢに属する酵素によって、small interfering RNA (siRNA) とよばれる 21~23 nucleotide の短い dsRNA に切断される。この siRNA は RISC (RNA-Induced Silencing Complex) という RNAi の実行因子に取り込まれ、RNA-蛋白複合体を形成する。この複合体は、siRNA に相補的な配列を有する RNA を次々と特異的に切断する。RNAi の生理的意義については未だ詳細は解っていないが、細胞内に長い dsRNA が生じるとインターフェロン応答の活性化が起これ、細胞がアポトーシスへと誘導されることから、抗ウイルス反応と密接な関係があると考えられている。

これまで核酸を用いた遺伝子抑制技術として、アンチセンス法やリボザイム法などが利用されてきた。しかし、技術的な問題などにより、広く臨床にまで応用されるには至っていないのが現状である。RNAi は細胞内に二本鎖 RNA を導入するだけという簡便さと高い特異性、そして強力な抑制効果により細胞生物学の分野において革命的な技術となっている。現在、ウイルスベクターを含めて、より効率的に細胞内へと RNA を導入する技術の開発も活発になされている。現状では治療困難な疾患に対する新たな遺伝子治療法として医療分野への応用も期待され、すでに治療的な応用として実験動物において肝炎、ウイルス感染、癌の制御における有効性も報告されている (30-32)。また、VEGF や sphingosine 1-phosphate receptor-1 を標的とした siRNA の腫瘍内への局所投与により、腫瘍の血管新生や腫瘍増殖が抑制されたという報告もある (33, 34)。

5-6) 研究の目的

癌細胞における HSP105 の機能に関しては、未だに解明されていない。本研究では HSP105 の機能を調べ、さらに HSP105 の発現抑制がヒトの癌細胞や正常細胞にどのような影響を与えるかを *in vitro* および *in vivo* で探ることを目的とする。さらに、その成果を癌の治療法の開発に資することを目指す。

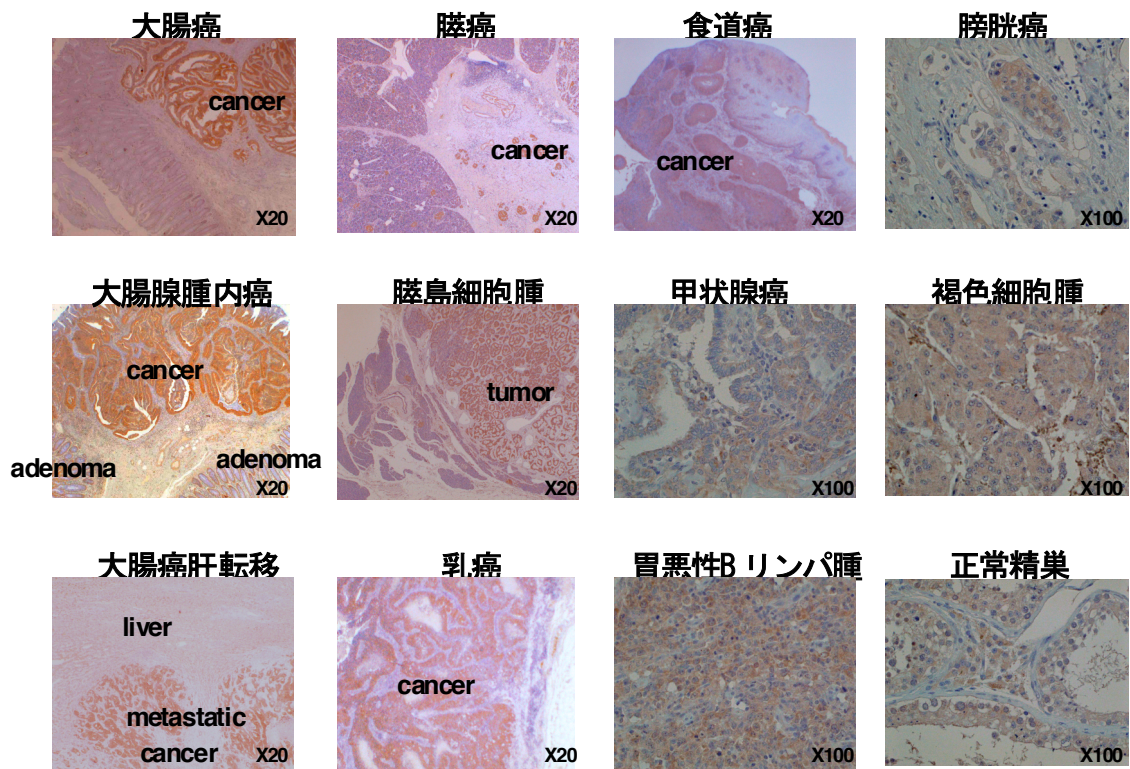


図 1 HSP105の多様な癌や腫瘍組織における高発現

(Kai M et al. Oncol rep 10: 1777-82; 2003 (26) より引用)

HSP105蛋白は、多様なヒトの腫瘍細胞で高発現している。正常組織においては精巣にのみ高発現していた。また大腸腺腫においては、高発現していなかった。

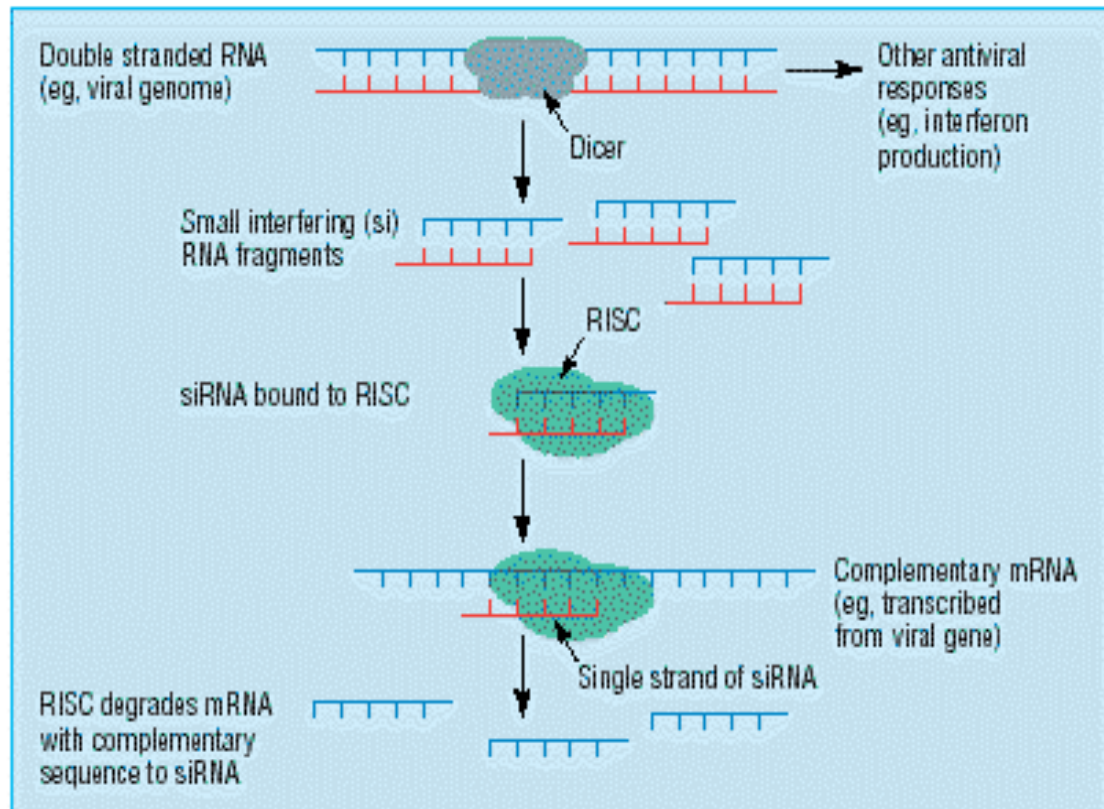


図2 RNA干渉（RNAi）による特定の遺伝子の発現抑制機序

(Downward J. ,Clinical review / BMJ vol 328: 1245-1248, 2004 (35) より引用)

細胞内に導入されたdsRNAは、Dicerによって21塩基程度のsiRNAに切断される。siRNAはRISCに取り込まれ、標的RNAの認識に用いられる。RISCは、siRNAと完全に相補的な配列をもつRNAを特異的に切断する。切断後、RISCはまた次の標的を認識し切断する。このように、siRNAは特異的な遺伝子の発現を、mRNAの破壊により抑制する。

6 実験方法

6-1) 使用細胞株とマウス

ヒト膀胱癌細胞株 PK8、マウス線維芽細胞 NIH3T3 は、東北大学加齢医学研究所より供与頂いた。ヒト肝癌細胞株 SK-Hep1、ヒト大腸癌細胞株 SW620、ヒト胃癌細胞株 KATO-3、MKN28 は、久留米大学免疫学教室の伊東恭悟教授より供与頂いた。ヒト大腸癌細胞株 HCT116 は、Johns Hopkins University の B. Vogelstein 先生より供与頂いた。健常人線維芽細胞株 Turu、Mori は、熊本大学発生医学センターの山泉教授より供与頂いた。NOD SCID マウスは、熊本大学エイズ学研究センターの岡田教授より供与頂いた。

6-2) プラスミド構築と導入

哺乳動物細胞の発現ベクター pCAGGS に、IRES およびネオマイシン耐性遺伝子である neo-R を含む DNA 断片を挿入し pCAGGS-IRES-neo-R ベクターを得た。さらにマウス HSP105 をコードする cDNA を挿入し、HSP105 発現ベクターを構築した。細胞内への導入は、lipofectamine 2000 を用いて 6 穴プレートで行った。90% confluent の付着細胞に 4 μ g の DNA ベクターと 10 μ l の lipofectamine 2000 の混合液を加え、48 時間後に細胞をいったん回収し、G418 500 μ g/ml 存在下で 1 週間さらに培養して、目的の HSP105 過剰発現細胞株を得た。

6-3) Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

TRIZOL reagent または RNeasy スピンカラムキット (Qiagen)を用いて、様々な細胞株から total RNA を抽出した。正常大腸組織の total RNA は、クロンテック社から購入した。各 1 μ g の total RNA からランダムヘキサマープライマーを用いて、Superscript reverse transcriptase (インビトロジェン社)により各 cDNA を合成した。RT-PCR の各遺伝子特異的プライマーを作成し、PCR 反応は 94°C 1 分間、58°C 1 分間、72°C 1 分間で 24~33 サイクル行い、PCR 産物を 2% アガロースゲルで分離してエチジウムブロマイドで染色し、特異的バンドを検出した。比較対照のため、 β アクチン特異的なプライマーも同時に用いた (36)。各プライマーのシークエンスは、表 4 に示す通りである (表 4)。

6-4) アポトーシスの検出

細胞の早期アポトーシスの検出には、早期アポトーシスの特異的マーカーであるフォスファチジルセリンに結合するアネキシン V の染色キット (BioVision 社) を用いた。コントロール NIH3T3 細胞と HSP105 高発現 NIH3T3 細胞を 45°C 90 分、または 200 ng/ml のアドリアマイシンで処理した。また、種々の癌細胞に対して 100 nM または 200 nM の siRNA、または 100 nM の siRNA と 200 ng/ml アドリアマイシンで同時に処理した。これらの細胞を適宜採取し、FITC 標識された annexinV で染色の後、フローサイトメトリーにて解析した。カスパーゼ阻害実験においては、100 μ M の Z-VAD-FMK (Sigma) を siRNA 導入の 1 時間前に添加した。

晩期アポトーシスは、細胞の DNA 断片化を PI 染色とフローサイトメトリーにて検出した。アドリアマイシン処理されたコントロール NIH3T3 細胞と HSP105 高発現 NIH3T3 細胞を回収し、冷却した 70%エタノールで固定して -20°C に保存、さらに室温で 30 分間 100 μ g/ml の RNase で処理し 25 μ g/ml の PI にて染色し、フローサイトメトリーにて解析した。データは、CellQuest ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。

6-5) 免疫沈降およびウエスタンブロッティング

目的の細胞を lysis buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH7.4, 1% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate (WAKO, Osaka, Japan), 10% glycerol, protease inhibitor tablet (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) で溶解した。HSP105 蛋白はウサギポリクローナル抗 HSP105 抗体にて、p53 蛋白はマウスモノクローナル抗 p53 抗体 (DO-1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) にて、プロテイン A ビーズ (Pierce, Rockford, IL) を用いて共沈した。各サンプルをアガロースゲルで電気泳動し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。検出には上述した HSP105 抗体、ウサギポリクローナル抗 PARP 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、上述の DO-1 または Mini-biotin-XX Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Eugene, OR) にて精製したビオチン化 DO-1 抗体、ウサギポリクローナル抗 p53 (Ser46 リン酸化) 抗体、およびマウスモノクローナル抗 p53 (Ser15 リン酸化) 抗体 (New England Biolabs, Beverly, MA) を 1 次抗体として使用した。HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体、または HRP 標識ロバ抗ウサギ抗体 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を 2 次抗体として使用した。

6-6) RNAi による HSP105 蛋白発現の抑制

HSP105 の蛋白発現を RNAi (RNA interference) により抑制するために、siRNA (small interfering RNA) を設計した。HSP105 の発現を抑制できた配列は、HSP105-siRNA : UUGGCUGCAACUCCGAUUGTT (Dharmacon Research)、HSP105-siRNA-2 : UGUACAUAUACCUUUAUUCCAACUCC (Invitrogen) であった。細胞内への導入は Oligofectamine (Invitrogen) を用いて 6 穴 plate で行った。100 pmol の siRNA と 4 μ l の Oligofectamine を、それぞれ Opti-MEM で溶解し混合して total 200 μ l としたのち、800 μ l の Opti-MEM で満たされた各 well に添加し 4 時間培養した後、FCS を 300 μ l 加えた。蛋白発現抑制の確認は、Western blotting にて行った。

6-7) in vivo での siRNA を用いた腫瘍増殖抑制実験

ヒト胃癌細胞株 KATO-3 (2×10^6) を 100 μ l の HBSS solution (Gibco) に浮遊して NOD SCID マウスの背部皮下に移植し、長径 5~7mm になった時点で、3 日毎に 5% ブドウ糖液に溶解した 1 nmol の siRNA と 20 μ l の Oligofectamine の溶液を腫瘍局所に注入した。腫瘍の大きさは、以下の式にて計算した。

$$\text{腫瘍の大きさ} = (\text{腫瘍長径} \times \text{腫瘍幅}^2) \times 0.5$$

表 4

RT-PCR に用いたプライマー

標的分子		プライマーの塩基配列
HSP105	sense	5'-ATGAAGTGATGGAATGGATG-3'
	antisense	5'-TTTGGTTTCGGTTGTGTTAC-3'
Noxa	sense	5'-AGATGCCTGGGAAGAAG-3'
	Antisense	5'-AGTCCCCTCATGCAAGT-3'
PUMA	sense	5'-TGTAGAGGAGACAGGAATCCACGG-3'
	antisense	5'-AGGCACCTAATTGGGCTCCATCTC-3'.
BAX	sense	5'-AGCGGCGGTGATGGACGGGTC-3'
	antisense	5'-TCCAAGGCAGCTGGGGCCTCA-3'.
p53	sense	5'-CCATGGCCATCTACAAGCAG-3'
	antisense	5'-AGGGTGAAATATTCTCC-3'.

7 実験結果

7-1) HSP105 の抗アポトーシス作用の解析

癌細胞における HSP105 の生物学的機能を調べるために、我々は前癌状態にあるとされるマウス胎児性線維芽細胞 NIH3T3 に HSP105 遺伝子を過剰発現させ（図 3）、45°C, 90 min の熱ショックや、doxorubicin 200 ng/ml によるストレスを負荷し、細胞のアポトーシス誘導について検討した。熱ショックにより誘導されるアポトーシスは HSP105 を過剰発現させた NIH3T3 細胞において有意に抑制された（図 4）。さらに、doxorubicin を暴露した場合にも、コントロール細胞の大部分では 12 時間以降アポトーシスが誘導されたのに対し、HSP105 を過剰発現させた NIH3T3 細胞は、36 時間経過してもアポトーシスの誘導が有意に抑制された（図 5）。さらに、DNA の断片化を検討したところ、HSP105 を過剰発現させた NIH3T3 細胞では、有意に断片化が抑制されていた（図 6）。つまり HSP105 を過剰発現させた NIH3T3 細胞では、早期および晩期のアポトーシス抑制が確認された。

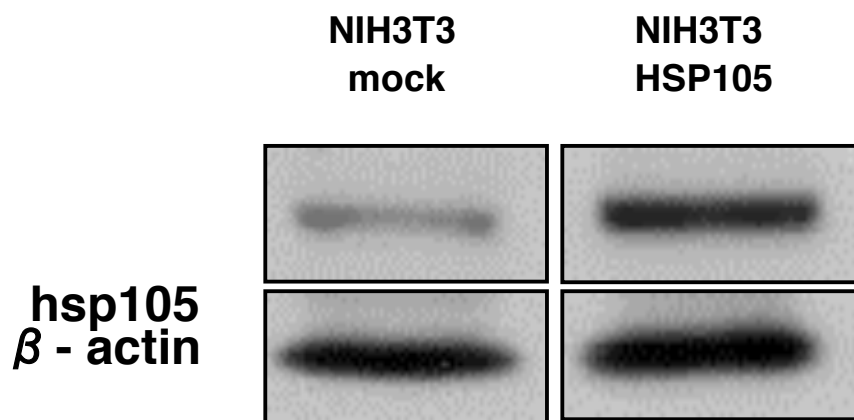


図 3 マウス HSP105 高発現 NIH3T3 細胞株における HSP105 蛋白の発現解析

NIH3T3 細胞株に pCAGGS-IRES-neo-R vector、または pCAGGS-IRES-neo-R-mHSP105 vector を Lipofectamine2000 を用いて遺伝子導入した。48 時間後に G418 を添加して、それぞれの細胞株を樹立し、サンプルを調整してウェスタンブロッティングを行った。コントロールとして β -actin を使用した。

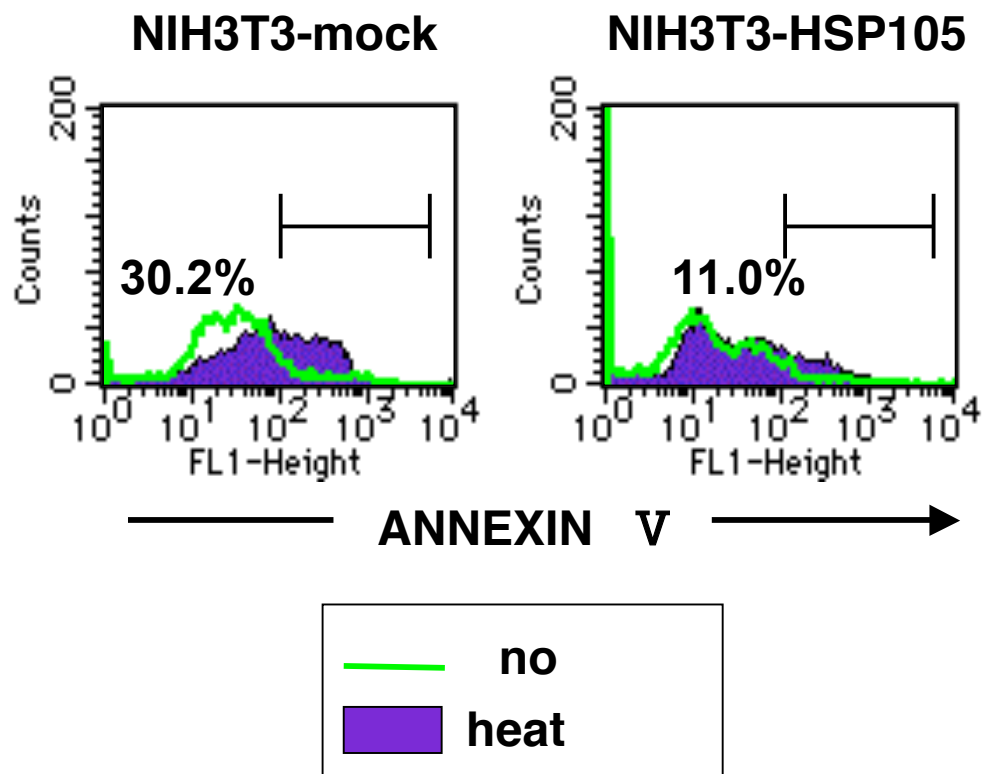


図 4 NIH3T3細胞におけるHSP105の強制発現による熱ストレス後の初期アポトーシスの抑制

コントロールベクターを遺伝子導入したNIH3T3細胞(NIH3T3-mock)および HSP105を過剰発現させたNIH3T3細胞(NIH3T3-HSP105)を45℃、90分処理し、細胞を回収、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色しフローサイトメトリーにて解析した。%はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。

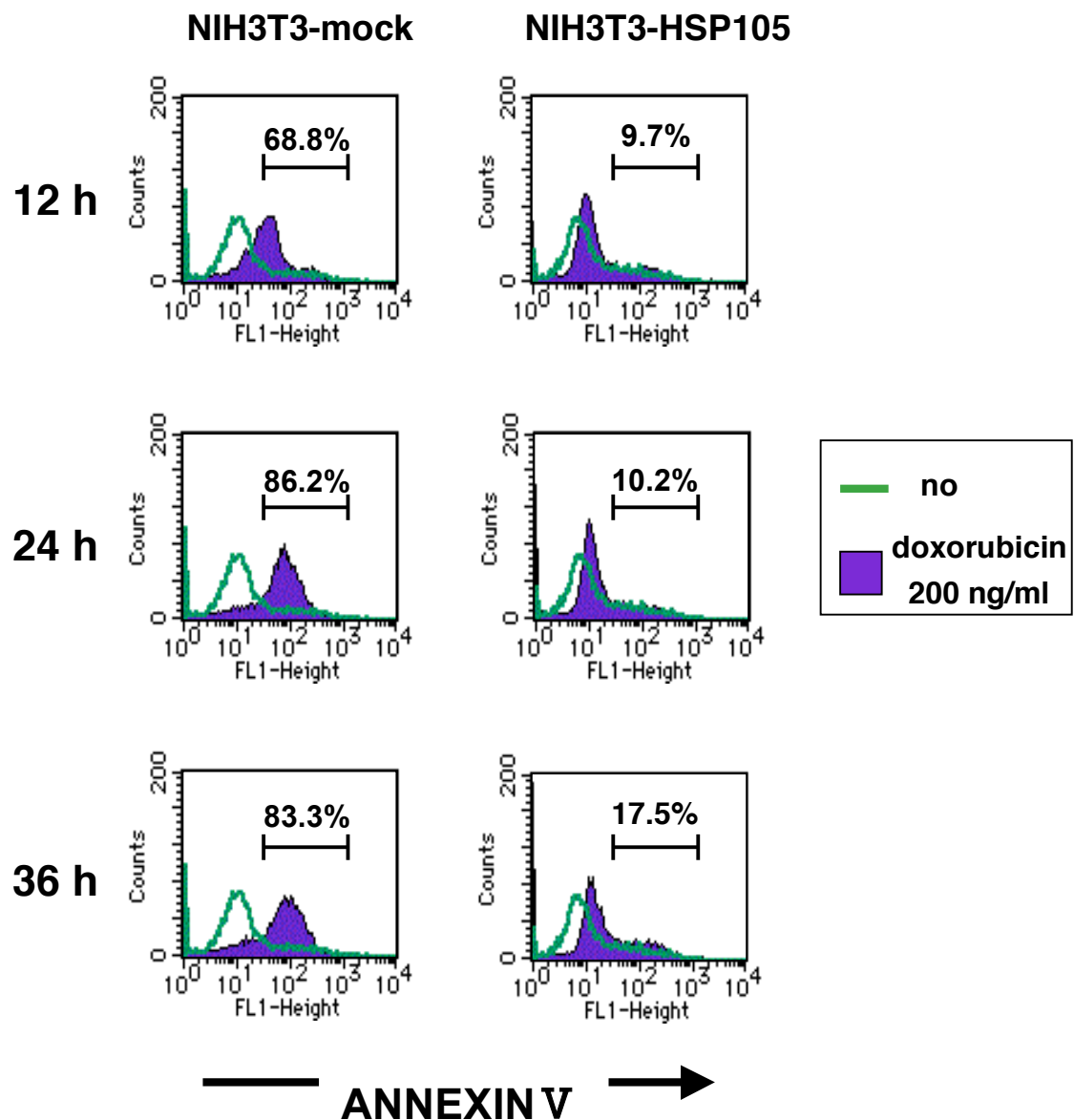


図5 NIH3T3細胞におけるHSP105の強制発現による doxorubicin添加後の初期アポトーシスの抑制

NIH3T3-mock細胞および NIH3T3-HSP105細胞を200 ng/ml のdoxorubicin存在下に培養し、経時的に細胞を回収して、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色してフローサイトメトリーにて解析した。%はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。

Doxorubicin 200ng/ml

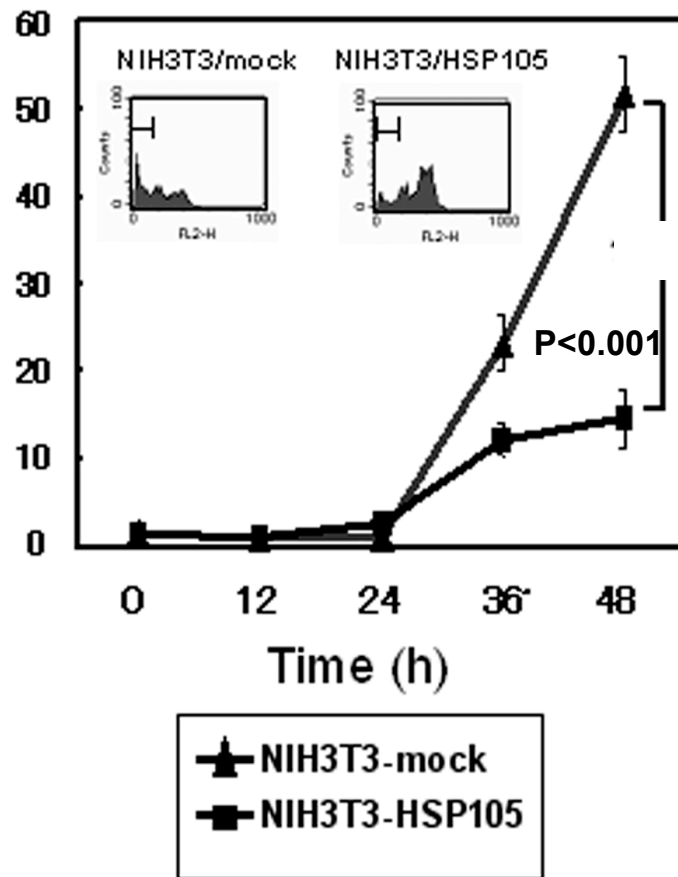


図 6 NIH3T3細胞におけるHSP105の強制発現による doxorubicin添加後の晩期アポトーシスの抑制

NIH3T3-mock細胞および NIH3T3-HSP105細胞を200 ng/mlのdoxorubicin存在下に培養し、経時的に細胞を回収して、PI染色を行い、フローサイトメトリーにて%subG1分画を測定し、DNAの断片化を評価した。

7-2) 様々なヒト癌細胞株に対する HSP105-siRNA の効果

我々は癌細胞における HSP105 の機能を調べるために、siRNA を用いてその発現を抑制することにした。まずヒト大腸癌細胞株 HCT116 及び SW620 について検討した。ヒト正常大腸粘膜組織と比較し、これらの細胞株においては HSP105 mRNA の発現は明らかに高かった (図 7)。HSP105-siRNA 処理を行うと、付着細胞である HCT116 は、24 時間後に plate から剥れ始め 48 時間後には、ほとんどの細胞が浮遊し死滅したのに対し、control として用いた Luciferase-siRNA 処理群では細胞は増殖した (図 8)。Western blotting により HSP105 蛋白の発現を検討すると、HSP105-siRNA 処理群では経時的にその発現が抑制され、さらに FACS を用いて Annexin-V 染色による癌細胞アポトーシスを検出すると、その発現抑制に比例してアポトーシスが誘導された (図 8、図 9)。同様に、SW620 細胞株においては、HSP105-siRNA 処理 24 時間後に最も HSP105 蛋白の発現が抑制されており、24 時間後に最も多くの細胞がアポトーシスに陥った。また、siRNA の濃度を 2 倍にしたところ、蛋白発現は、より著明に抑制され、より多くの細胞にアポトーシスが誘導された (図 9)。さらに、ヒト肝癌細胞株 SK-Hep1、膵癌細胞株 PK8、胃癌細胞株 KATO-3 や MKN28 においても、同様の結果が得られた (図 10)。

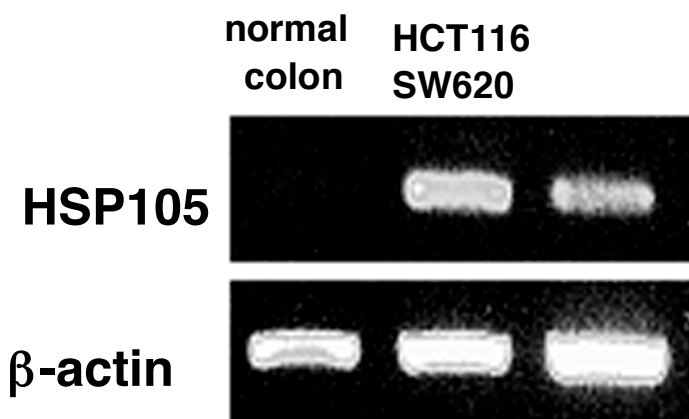
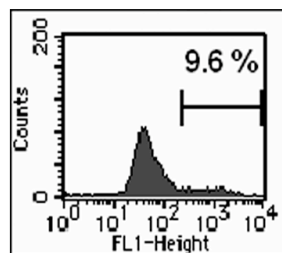
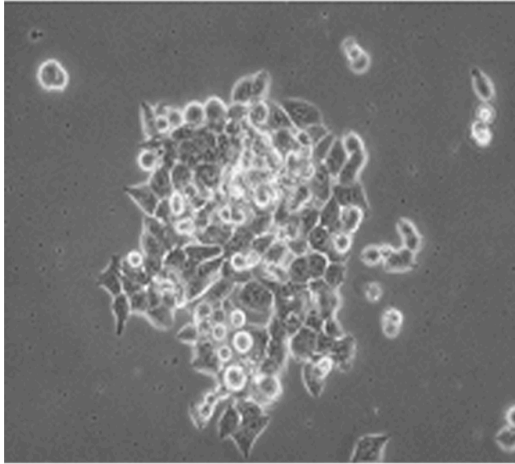


図 7 ヒト正常大腸粘膜およびヒト大腸癌細胞株の RT-PCR による HSP105 mRNA の発現解析

ヒト大腸癌細胞株 HCT116、SW620 および正常大腸粘膜の cDNA を用いて、HSP105 mRNA の発現を解析した。RNA 量のコントロールとして β-actin の RT-PCR も行った。

〈HCT116〉

Luciferase-siRNA



HSP105-siRNA

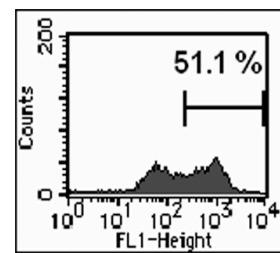
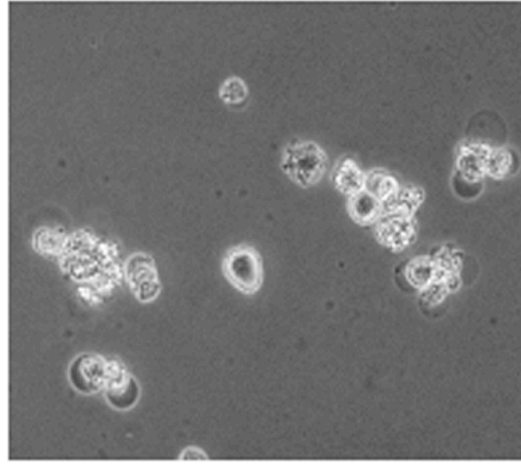


図8 ヒト大腸癌細胞株HCT116へのHSP105-siRNA導入後の細胞アポトーシス誘導

ヒト大腸癌細胞株HCT116にHSP105-siRNA、およびコントロールとしてLuciferase-siRNAを導入し、48時間後に細胞の形態を観察した。また、それぞれの細胞を回収し、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにて早期のアポトーシス変化について解析した。％はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。

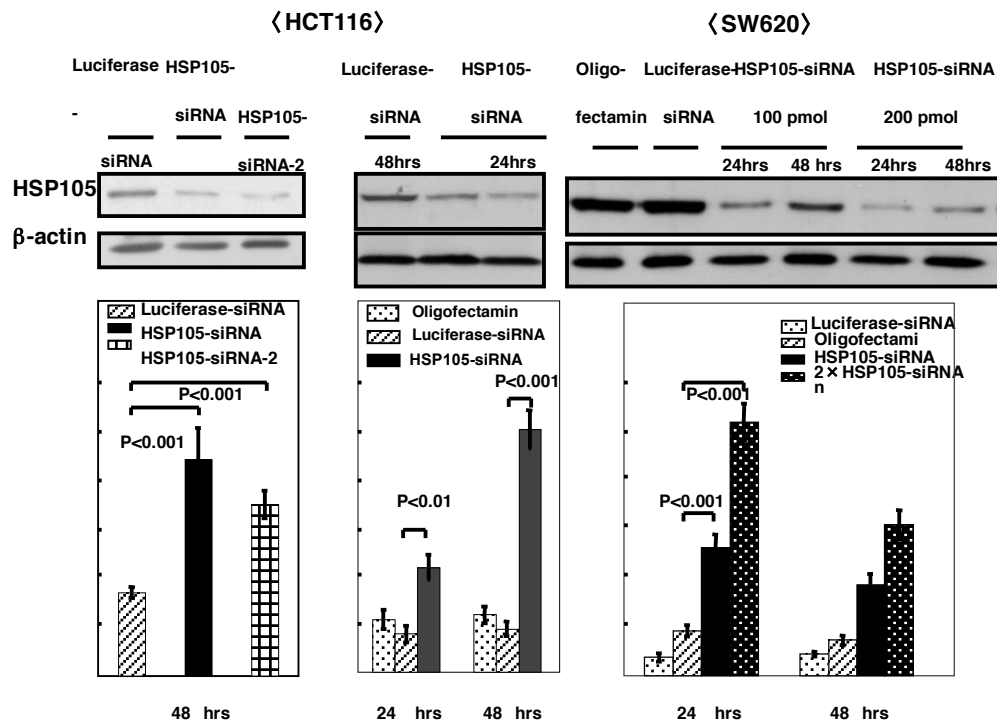


図9 ヒト大腸癌細胞株HCT116およびSW620へのHSP105-siRNA導入後のHSP105蛋白発現量の減少と細胞アポトーシス（早期変化）の促進

ヒト大腸癌細胞株HCT116およびSW620に、HSP105-siRNA (100 nMまたは200 nM) またはHSP105-siRNA-2およびコントロールとしてLuciferase-siRNAを導入し、24時間後または48時間後に細胞を回収して、ウェスタンブロッティングによりHSP105蛋白の発現量を確認した。また、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにてアポトーシスの早期変化について解析した。％はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。ウェスタンブロッティングにおいては、β-actinを蛋白量のコントロールとして検出した。

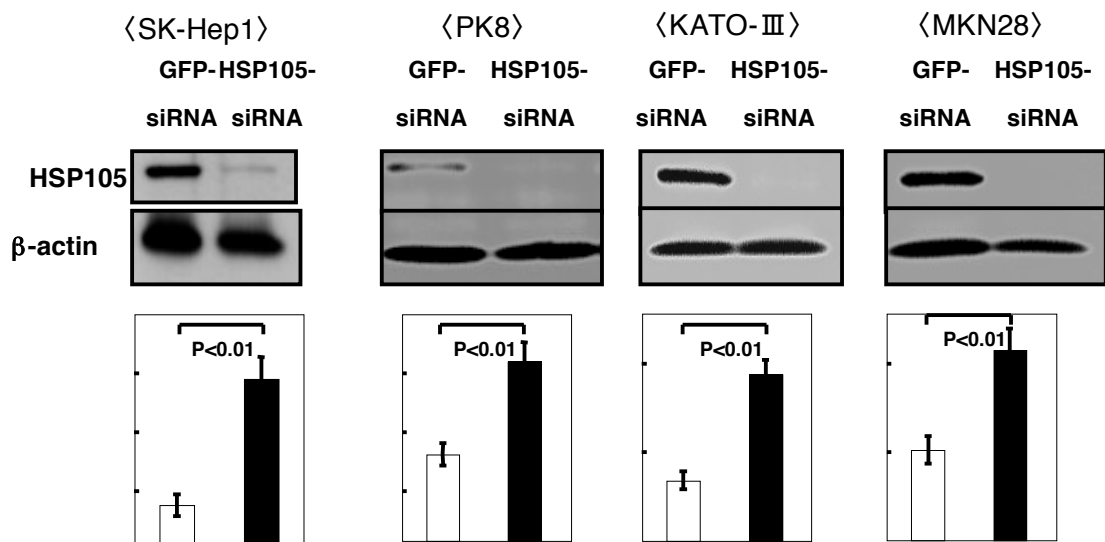


図 1 0 様々なヒト癌細胞株へのHSP105-siRNA導入後のHSP105蛋白発現量の減少と細胞アポトーシス（早期変化）の促進

ヒト肝癌細胞株SK-Hep1、膵癌細胞株PK8、胃癌細胞株KATO-IIIおよびMKN28に、HSP105-siRNAおよびコントロールとしてGFP-siRNAを導入し、48時間後に細胞を回収して、ウエスタンブロッティングによりHSP105蛋白の発現量を確認した。また、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにて早期アポトーシスについて解析した。％は、ANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。ウエスタンブロッティングにおいては、β-actinを蛋白量のコントロールとして検出した。

7-3) ヒト正常線維芽細胞株における HSP105-siRNA の効果

次に、健常人由来の線維芽細胞株 Turu および Mori に対する HSP105-siRNA の影響を検討した。線維芽細胞株の HSP105 蛋白の発現量は、癌細胞株に比べて低かった（図 1 1）。これらの細胞株を HSP105-siRNA 処理すると HSP105 蛋白の発現は抑制され、細胞の形態が紡錘状から球状へと変化した。しかし、この効果は一過性であり、siRNA の効果が消失する約 10 日後には、HSP105 蛋白発現の回復とともに細胞の形態も紡錘状へと回復した。全経過中、細胞は生存しておりアポトーシスが誘導されることはなかった（図 1 2、図 1 3）。

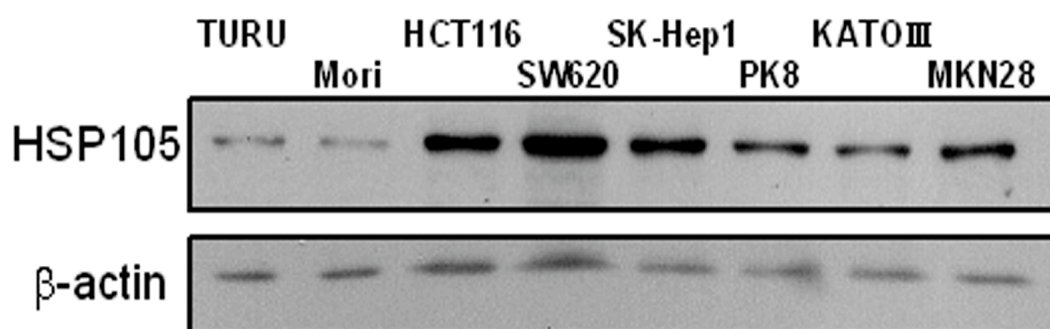


図 1 1 ヒト正常線維芽細胞株と種々のヒト癌細胞株における
HSP105蛋白発現の解析

ヒト正常線維芽細胞株TURUおよびMoriと様々なヒト癌細胞株の細胞を回収し、ウエスタンブロッティングによりHSP105蛋白の発現量を確認した。ウエスタンブロッティングにおいては、蛋白量のコントロールとしてβ-actinも検出した。

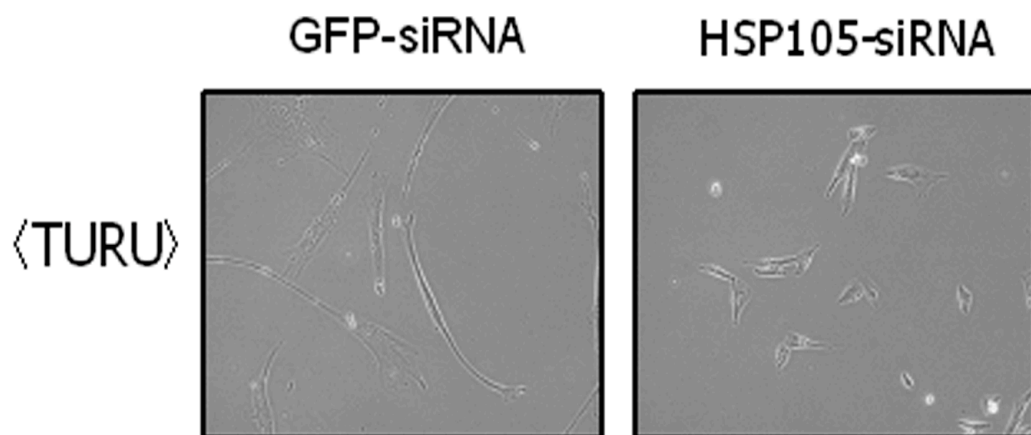


図 1 2 ヒト正常線維芽細胞株TURUにおけるHSP105-siRNA導入
による形態学的変化

ヒト正常線維芽細胞株TURUを100 nMのHSP105-siRNA、またはコントロール
としてGFP-siRNAで処理し、72時間後に光学顕微鏡にて観察した。

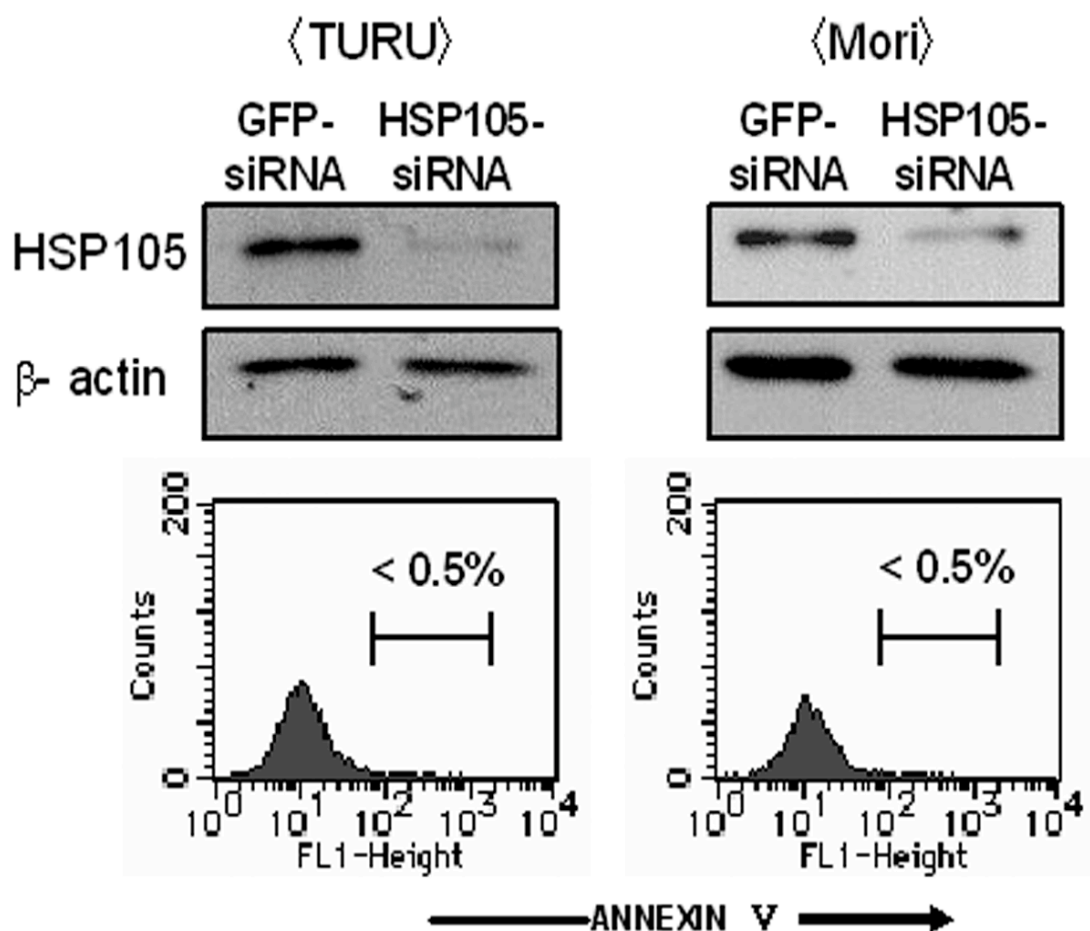


図 1 3 ヒト正常線維芽細胞株へのHSP105-siRNA導入後の
HSP105蛋白発現量の減少と細胞アポトーシスの促進

ヒト正常線維芽細胞株TURUおよびMoriに100 nMのHSP105-siRNA、またはコントロールとしてGFP-siRNAを導入して72時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングによりHSP105蛋白の発現量を確認した。また、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにて早期アポトーシスについて解析した。％はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。ウェスタンブロッティングにおいては、β-actinを蛋白量のコントロールとして検出した。

7-4) in vivo 生着腫瘍に対する HSP105-siRNA の効果

Liposome を用いた siRNA の細胞内導入が、in vivo での腫瘍増殖を抑制するという報告がある (34, 37)。そこで、我々も生体に生着した腫瘍塊に対する HSP105-siRNA の効果を検討した。NOD SCID マウスの背部皮下にヒト胃癌細胞株 KATO-3 を移植し、腫瘍が 5～7mm に増大した時点から 3 日毎に HSP105-siRNA を腫瘍内に投与したところ、コントロールとして用いた Luciferase-siRNA 投与群においては腫瘍は増大し続けたのに対し、HSP105-siRNA 投与群では有意に腫瘍の増殖が抑制された (図 1 4)。また、経過中、マウスに異常行動や神経学的異常は認められなかった。

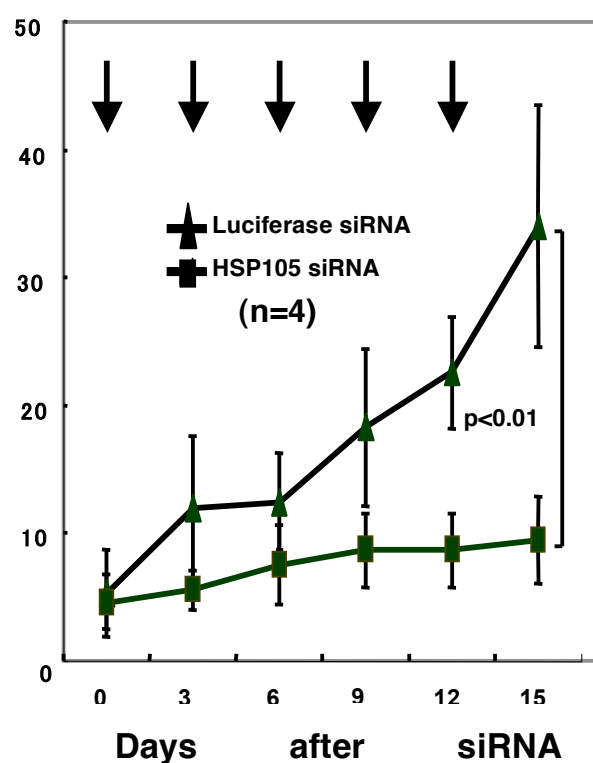


図 1 4 in vivoにおけるHSP105-siRNAの腫瘍増殖抑制効果

NOD SCIDマウスの背部皮下に 2×10^6 個のヒト胃癌細胞株KATO-IIIを移植し、最大腫瘍径が5～7mmになった時点で、3日毎にHSP105-siRNAまたはコントロールとしてLuciferase-siRNAを腫瘍内に局所注入し、腫瘍径から腫瘍の体積を算定した。

7-5) HSP105-siRNA と熱ショックまたは抗癌剤との併用による、ヒト癌細胞株に対するアポトーシス誘導における相乗効果

HSP105-siRNA と従来の癌に対する治療法である抗癌剤や熱ストレスとの併用により、より効果的に癌細胞をアポトーシスへと誘導できるか否かを検討した。ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に対し、doxorubicin 単独または HSP105-siRNA 単独投与または併用投与を行った。いずれの単独投与よりも併用投与を行った場合の方が、相乗的に癌細胞をアポトーシスへと誘導した(図 1 5)。同様に 45℃、30 分の熱ショックを与えた場合においても、相乗的に癌細胞のアポトーシスが誘導された(図 1 6)。

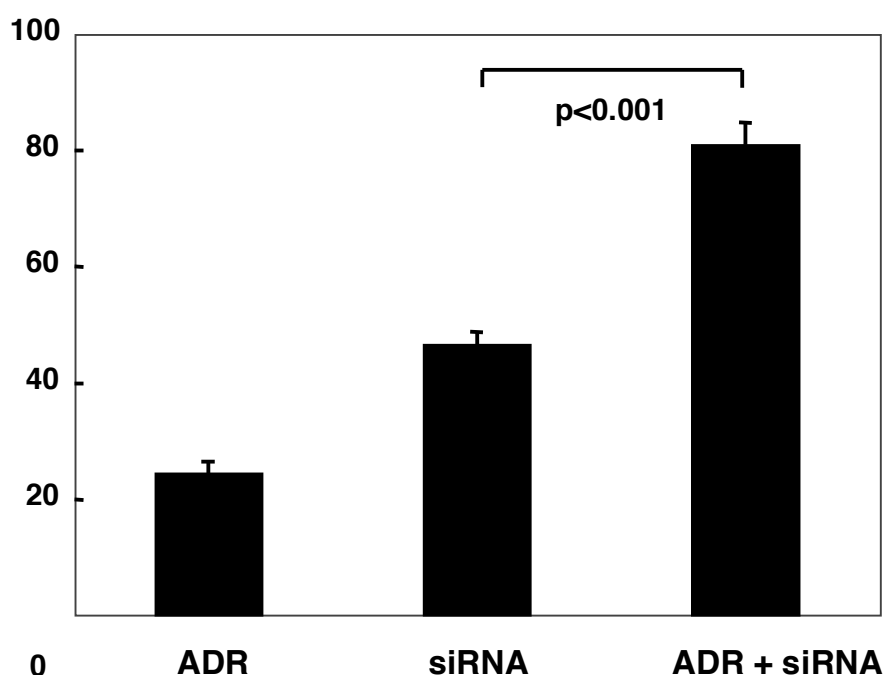


図 1 5 ヒト大腸癌細胞株HCT116に対するHSP105-siRNAとdoxorubicinの併用によるアポトーシス誘導の増強

ヒト大腸癌細胞株HCT116を100 nMのHSP105-siRNA、200 ng/mlのdoxorubicinまたはHSP105-siRNAで処理して12時間後にdoxorubicinを添加し、48時間後に細胞を回収し、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにてアポトーシスを解析した。縦軸はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。

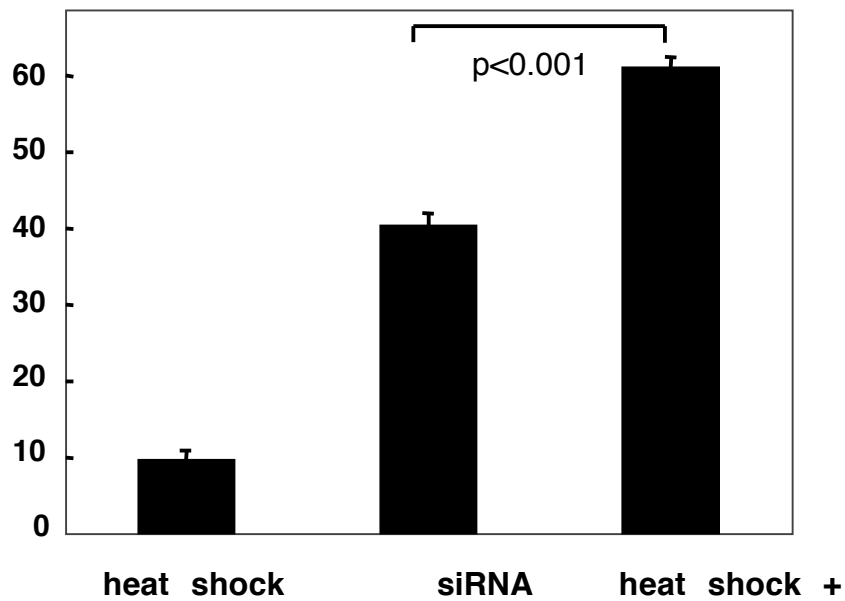


図 1 6 ヒト大腸癌細胞株HCT116に対するHSP105-siRNAと熱ストレスの併用によるアポトーシスの増強

ヒト大腸癌細胞株HCT116を100 nMのHSP105-siRNA、45℃、30分の熱ストレスまたはHSP105-siRNAで処理し12時間後に45℃、30分の熱ストレスを加え、48時間後に細胞を回収して、FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにてアポトーシスを解析した。縦軸はANNEXIN V染色陽性細胞の割合を示す。

7-6) HSP105-siRNA によるアポトーシス経路の解析

HSP105 RNAi によるアポトーシス誘導に、カスパーゼが関わっているかどうかを HCT116 細胞株を用いて検討した。カスパーゼ 3 の基質である PARP の分解を Western blotting で確認すると、HSP105-siRNA 処理をすると PARP の分解が認められ、caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK で前処理しておく、この分解は観察されなくなった (図 17)。Annexin-V 染色によりアポトーシスを検討したところ、Z-VAD-FMK の前処理により HSP105-siRNA によるアポトーシスの誘導がほぼ完全に阻害された (図 18)。さらに、p53 がカスパーゼカスケードの上流にあり、HSP70 や HSP90 が p53 と関わっているという既知の情報 (38) をもとに、このアポトーシスが p53 蛋白と関わっているかどうかを調べてみた。HCT116 細胞株において、免疫沈降を行うと HSP105 蛋白質と p53 蛋白が結合していることが確認された (図 19)。しかし、HSP105-siRNA 処理を行うと、p53 蛋白の発現量は HSP105 蛋白と同様に減少し、さらに p53 の活性化の指標となる Serine protease 15 および 46 のリン酸化も観察されなかった (図 20)。実際に p53 蛋白によるアポトーシス誘導の下流に位置する、Bax、Noxa および Puma の mRNA の発現も増加せず、むしろ減少しており (図 21)、HSP105-siRNA によるアポトーシス誘導に、p53 経路は関わっていないと考えられた。

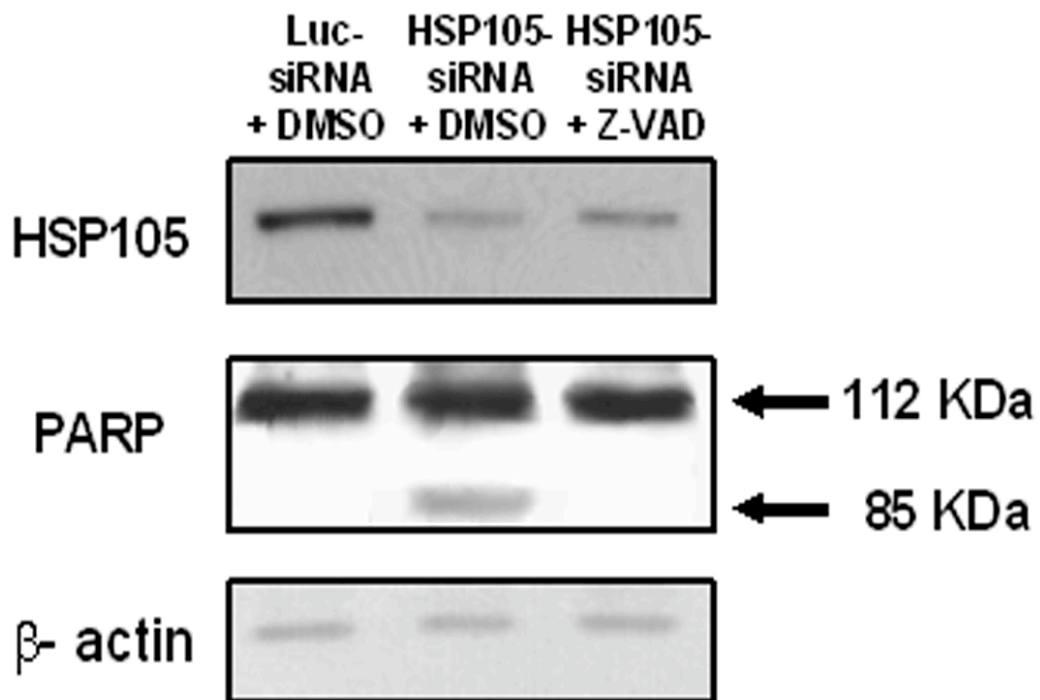


図 1 7 Caspase阻害剤は、HSP105-siRNAにより誘導される PARP の分解を阻害する

ヒト大腸癌細胞株HCT116を100 nM Luciferase-siRNA+ 100 mM DMSO100 nM HSP105-siRNA+ 100 mM DMSOまたは100 nM HSP105-siRNA+100mM Z-VAD-FMK (DMSO)存在下で培養し、48時間後に細胞をそれぞれ回収してウエスタンブロッティングによりHSP105およびPARPを検出した。また、β-actinを蛋白量のコントロールとして検出した。

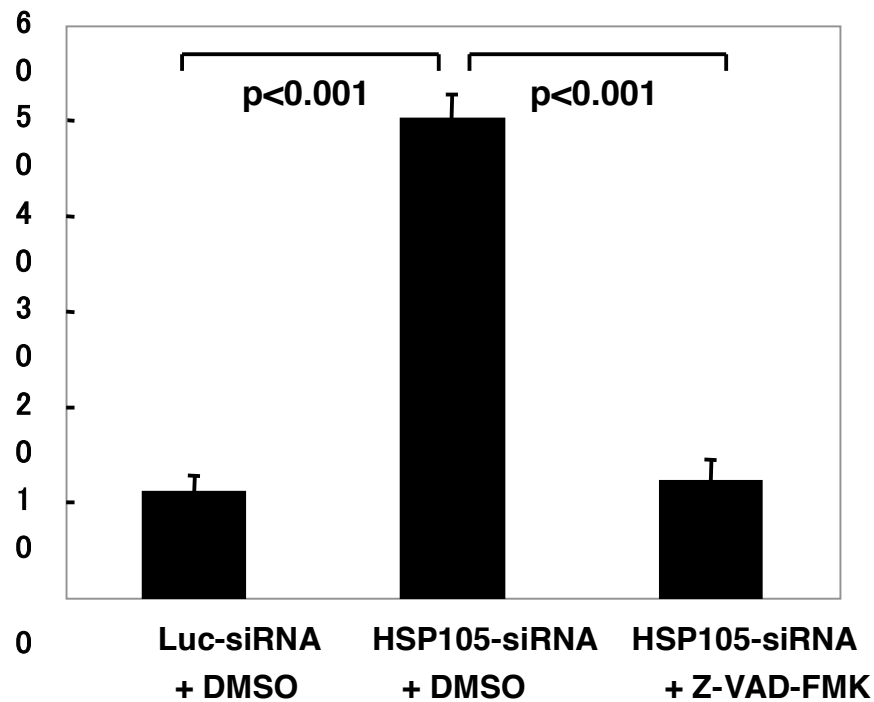


図 1 8 HSP105-siRNAにより誘導されるアポトーシスの caspase 阻害剤による抑制

ヒト大腸癌細胞株HCT116を100 nM Luciferase-siRNA+ 100 mM DMSO、100 nMHSP105-siRNA+ 100 mM DMSOまたは100 nM HSP105-siRNA+100mM Z-VAD-FMK (DMSO) 存在下で培養し、48時間後に細胞をそれぞれ回収して FITCでラベルされたANNEXIN Vで染色し、フローサイトメトリーにてアポトーシスを解析した。縦軸は、ANNEXIN V染色陽性細胞の割合(%)を示す。

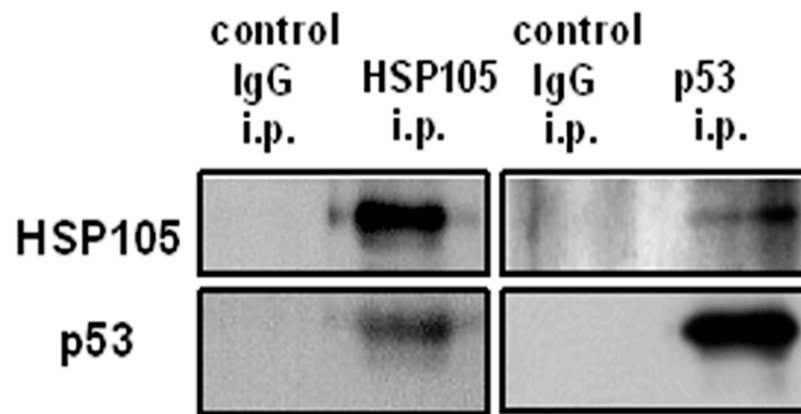


図 1 9 HCT116細胞株における、HSP105蛋白とp53蛋白との会合

ヒト大腸癌細胞株HCT116を回収し、抗HSP105抗体または抗p53抗体にて免疫沈降を行い、抗HSP105抗体およびビオチンラベルした抗p53抗体にてウエスタンブロッティングにより検出した。抗HSP105抗体のnegative controlとしてrabbit polyclonal IgGにて共沈したサンプルを、また抗p53抗体のnegative controlとしてmouse monoclonal IgG2aにて共沈したサンプルを使用した。

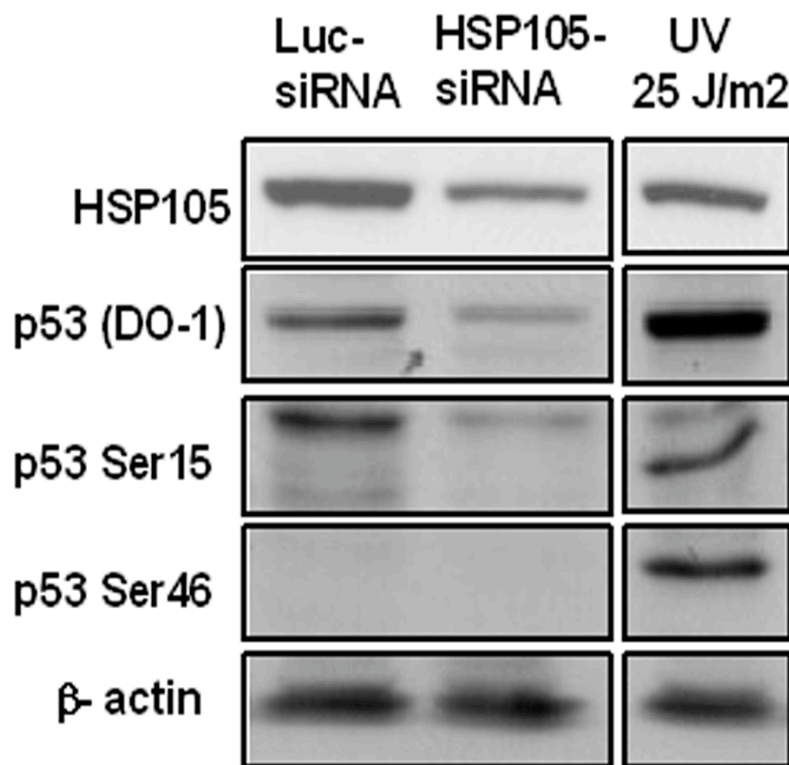


図 2 0 HCT116細胞株において、HSP105-siRNAによるHSP105蛋白の減少は、p53蛋白の活性化を伴わない

ヒト大腸癌細胞株HCT116にHSP105-siRNAまたはコントロールとしてLuciferase-siRNAを導入し、48時間後に細胞を回収してウェスタンブロットティングを行った。検出は抗HSP105抗体、抗p53抗体(DO-1)、p53-Ser15リン酸化抗体p53-Ser46リン酸化抗体および蛋白量のコントロールとして抗β-actin抗体にて行った。また、p53リン酸化のpositive controlとして、UV照射したHCT116細胞株のサンプルを使用した。

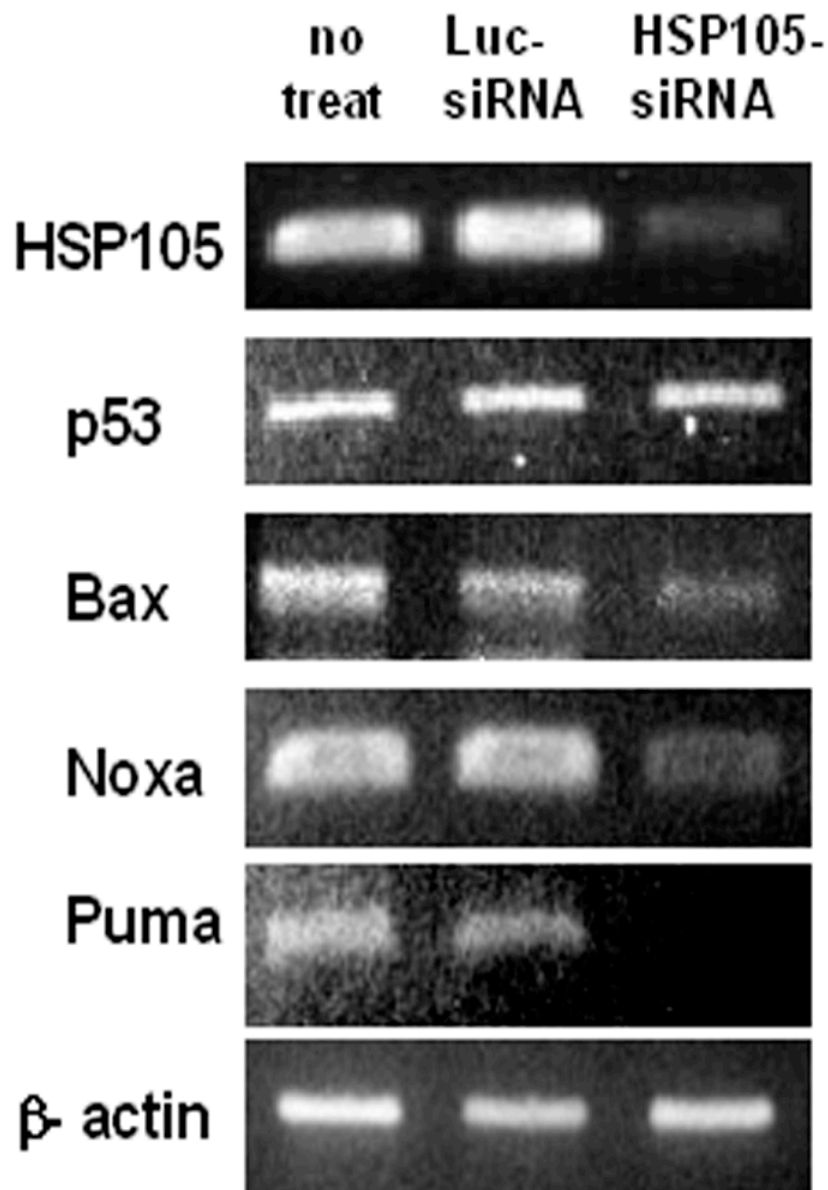


図 2 1 HSP105-siRNA処理されたHCT116細胞株において、p53蛋白により転写制御を受けているアポトーシス誘導遺伝子のmRNAの発現は促進されていない

ヒト大腸癌細胞株HCT116にHSP105-siRNAまたはコントロールとしてLuciferase-siRNAを導入し、24時間後に細胞を回収してcDNAを調整した。HSP105、p53、BAX、Noxa、PumaについてRT-PCRを行った。RNA量のコントロールとして β -actinのRT-PCRも行った。未処理のHCT116細胞株のcDNAもnegative controlとして使用した。

8 考察

癌の分子標的治療における標的分子・遺伝子の選択に際して、癌特異的に発現あるいは高発現している分子・遺伝子を選定することが望ましい。我々は様々なヒト腫瘍において高発現している分子である、HSP105 を標的遺伝子とした。HSP105 は正常組織においてもわずかに発現している蛋白であるが、精巣および腫瘍においてはその発現は非常に高い。また、最近の研究から、腫瘍発生に関与し、癌細胞をアポトーシスから保護する機能を担っていると考えられている。我々の、マウスの前癌状態細胞と考えられている NIH3T3 への HSP105 の過剰発現実験により得られた結果は、PC12 神経細胞に HSP105 を過剰発現させると細胞増殖には影響を及ぼさないが、様々なストレスにより誘導されるアポトーシスを抑制する、という最近の報告と一致するものである (19, 25, 26)。

Heat shock protein の中でも HSP70 は最も解析がなされている蛋白質である。HSP105 は HSP70 と共通の機能を有している。例えば HSP70 も様々なストレスにより誘導されるアポトーシスを抑制する (39-41) ことが示されており、さらに HSP70 は、ヒト乳癌において高発現していることが知られている (42-45)。これらの蛋白質の機能の相違の一つは、HSP105 の方が HSP70 に比べて変性蛋白質の結合能が大きいという点である (46)。さらに、HSP70 が ATP 存在下で変性蛋白質の凝集を抑制するのに対し、HSP105 は ADP 存在下でその機能を果たすと考えられている (18)。乳癌細胞株における antisense を用いた HSP70 の発現抑制により、乳癌細胞株はカスパーゼ非依存性にアポトーシスへに陥る (47)。しかし、本研究では HSP105-siRNA 処理にて誘導されるアポトーシスは、カスパーゼ依存性であり、この点においても HSP105 は HSP70 とは異なった機能を有していると考えられる。

本研究において HSP105-siRNA は、様々な癌腫をアポトーシスへと導いたが、その機序について我々は、まず p53 蛋白との関わりを調べてみた。HSP70 や HSP90 といったシャペロン蛋白は、様々な腫瘍において高発現し (48)、野生型または変異型の p53 蛋白と結合していることが知られている。これらの heat shock protein は p53 蛋白の安定化・細胞質内の蓄積・局在を司っている (49, 50)。本研究においても HSP105 蛋白と p53 蛋白は結合していることが確認され、siRNA を用いて HSP105 蛋白の発現を抑制すると p53 蛋白の発現量が減少し、HSP105 が p53 の安定化に関与していることが示唆された。しかし、HSP105-siRNA により誘導されるアポトーシスに p53 は関与していないと考えられた。実際に、今回使用したヒト癌細胞株は野生型 p53 を有するもの、変異型 p53 を有するもの、または p53 を発現していない細胞株を含んでいたが、いずれの細胞株も HSP105-siRNA によりアポトーシスが誘導されたことは、これを裏

付けていると考えられた。

もうひとつの機序として、我々は ER ストレスの関与を考えた。heat shock protein は様々な蛋白質の folding や degradation といった機能に関与している。一方で、unfolded protein の凝集により生じる ER ストレスは UPR (unfolded protein response) すなわち、シャペロン蛋白質の誘導、翻訳停止、ERAD (ER-associated degradation) を誘導する。しかし、これらの反応が不十分で、ER ストレスが持続した場合、カスパーゼを含めたアポトーシスの経路が活性化され、細胞にはアポトーシスが誘導される (51-53)。異常蛋白質の凝集は Alzheimer 病や Parkinson 病などの多くの神経変性疾患の原因であると考えられており、Alzheimer 病の脳においては HSP90 が amyloid-beta の除去に関わっていることが知られている (54)。これらのことを考慮し、我々は HSP105-siRNA の投与による HSP105 蛋白質の減少が unfolded protein の凝集を促進して ER-stress を導き、最終的に細胞にアポトーシスを誘導したと推察した。特に、異常蛋白質や癌関連蛋白質の過剰発現を伴う癌細胞においては、より HSP105 の減少が蛋白の凝集を起こしやすいであろうと考えた。熱変性蛋白の凝集を HSP105 が抑制したという最近の報告 (17) や、先にも述べた SBMA モデルの結果 (20) は、我々の推察と一致する。さらに、神経細胞 PC12 の実験で、HSP105 を過剰発現させた細胞では、様々なストレスにより誘導されるアポトーシスが抑制され、その際 PARP の分解が抑制されていたという報告 (19) があり、これはアポトーシスのカスパーゼ依存性に関しても我々の結果と一致する。

癌細胞はしばしば、増殖し続けるため、あるいはアポトーシスから逃れるために必要な遺伝子を過剰発現したり変異遺伝子を発現している。したがって、このような遺伝子を標的とした RNAi は新たな癌治療として期待できる。実際に、大腸癌に対し β カテニン (55)、膵臓癌に対し変異型 K-ras (56)、慢性骨髄性白血病に対し BCR/ABL 遺伝子 (57) を標的とした siRNA を用いた、効果的な癌細胞増殖抑制や癌細胞のアポトーシス誘導が最近報告されている。今回、われわれの実験で示された結果で重要なのは、HSP105-siRNA は癌細胞にアポトーシスを誘導するのに対して、正常細胞にはアポトーシスを誘導しない点である。現在臨床で使用されている抗腫瘍薬の多くが正常細胞に対しても副作用を有しており、その点において HSP105 を標的とした siRNA による治療は、より安全であることが期待される。実際に今回使用したヒト正常線維芽細胞には、doxorubicin によりアポトーシスが誘導されたが、HSP105-siRNA ではアポトーシスは誘導されなかった。また、NOD SCID マウスを用いた in vivo 実験においても、背部皮下に生着した腫瘍に対する siRNA の腫瘍内投与はマウスに神経学的異常や腫瘍臓器の障害、そして局所に明らかな副作用を起こすことなく腫瘍の増殖を有意に抑制できた。我々が得たこれらの結果は、HSP105-siRNA を用いた

治療法が、強い副作用を示すことなく様々な癌に対して有効であることを示唆している。

進行癌または転移巣を有する癌患者に対しては、いくつかの抗癌剤や放射線治療を組み合わせた集学的治療が施されている。我々は siRNA とは作用機序が異なる DNA 障害性の doxorubicin を HSP105-siRNA と併用することにより、相乗的に癌細胞をアポトーシスへと誘導できることを確認した。また、HSP105 が熱ストレスに対する細胞保護機能において重要な役割を果たしている (19) という観点から熱ストレス (温熱療法) を同時に加えることでより HSP105-siRNA の効果が期待できると考え、熱ストレスを併用したところ予想通りに相乗的に癌細胞にアポトーシスを誘導できた。これらの結果は、HSP105-siRNA を既存の薬剤と併用することにより、これまで以上の抗腫瘍効果が期待できることを示唆している。

9 おわりに

今回我々が示したデータは、HSP105 が癌細胞をアポトーシスから護ることでより癌細胞の不死化に関わっており、HSP105 の過剰発現が様々な癌細胞の生存に不可欠であることを示唆している。さらに、HSP105-siRNA のアポトーシス誘導効果は癌特異的であり、HSP105-siRNA による癌治療が様々な癌患者に対して新たな治療法のひとつとなり得る可能性を示した。効果的な drug delivery system を使用し、既存の薬剤と併用することにより、その効果がより増強されると期待される。

10 参考文献

1. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. and Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
2. van den Eynde, B. J. and van der Bruggen, P. T cell defined tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 684-693, 1997
3. Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C. H., Robbins, P. F., Rivoltini, L., Topalian, S. L., Miki, T. and Rosenberg, S. A. Cloning of the gene for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cell infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3515-3519, 1994
4. Kawakami, Y. and Rosenberg, S. A. Human tumor antigens recognized by T cells. *Immunol. Res.* 16: 313-339, 1997
5. Cox, A. L., Skipper, J., Chen, Y., Henderson, R. A., Darrow, T. L., Shabanowitz, J., Engelhard, V. H., Hunt, D. F. and Slingsluff, C. L. Identification of a peptide recognized by five melanoma specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264: 716-719, 1994
6. Shichijo, S., Nakao, M., Imai, Y., Takasu, H., Kawamoto, M., Niiya, F., Yang, D., Toh, Y., Yamana, H. and Itoh, K. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187: 277-288, 1998
7. Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I. and Pfreundschuh, M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 11810-11813 , 1995.
8. Old, L. J. Cancer immunology : the search for specificity-G.H.A.Lowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 41: 361-375, 1981
9. Utsumi, K. R., Yoshida, T. O., Sekikawa, M. and Klein, G. Antibodies to cell iraganooids in the sera of nasopharyngeal carcinoma patients. *Scand. J. Immunol.* 2: 159-171, 1973
10. Sahin, U. Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 709-716, 1997
11. Tureci, O., Sahin, U. and Pfreundschuh, M. Serological of human tumorantigens : molecular definition and implications. *Mol. Med. Today* 3: 342-349, 1997

12. Lee-Yoon D, Easton D, Murawski M, Burd R, Subjeck JR. Identification of a major subfamily of large hsp70-like proteins through the cloning of the mammalian 110-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 1995;270:15725-33.
13. Yasuda K, Nakai A, Hatayama T, Nagata K. Cloning and expression of murine high molecular mass heat shock proteins, HSP105. *J Biol Chem* 1995;270:29718-23.
14. Wakatsuki T, Hatayama T. Characteristic expression of 105-kDa heat shock protein (HSP105) in various tissues of nonstressed and heat-stressed rats. *Biol Pharm Bull* 1998;21:905-10.
15. Satoh J, Yukitake M, Kuroda Y. Constitutive and heat-inducible expression of HSP105 in neurons and glial cells in culture. *Neuroreport* 1998;9:2977-83.
16. Ishihara K, Yasuda K, Hatayama T. Molecular cloning, expression and localization of human 105 kDa heat shock protein, hsp105. *Biochim Biophys Acta* 1999;1444:138-42.
17. Yamagishi N, Nishihori H, Ishihara K, Ohtsuka K, Hatayama T. Modulation of the chaperone activities of Hsc70/Hsp40 by Hsp105alpha and Hsp105beta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:850-5.
18. Yamagishi N, Ishihara K, Saito Y, Hatayama T. Hsp105 but not Hsp70 family proteins suppress the aggregation of heat-denatured protein in the presence of ADP. *FEBS Lett* 2003;555:390-6.
19. Hatayama T, Yamagishi N, Minobe E, Sakai K. Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:528-34.
20. Ishihara K, Yamagishi N, Saito Y et al. Hsp105alpha suppresses the aggregation of truncated androgen receptor with expanded CAG repeats and cell toxicity. *J Biol Chem* 2003;278:25143-50.
21. Hatayama T, Takigawa T, Takeuchi S, Shiota K. Characteristic expression of high molecular mass heat shock protein HSP105 during mouse embryo development. *Cell Struct Funct* 1997;22:517-25.
22. Evrard L, Vanmuylder N, Dourov N, Glineur R, Louryan S. Cytochemical identification of HSP110 during early mouse facial development. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1999;19:24-32.
23. Yamagishi N, Ishihara K, Saito Y, Hatayama T. Hsp105alpha enhances stress-induced apoptosis but not necrosis in mouse embryonal F9 cells. *J Biochem (Tokyo)* 2002;132:271-8.
24. Yamagishi N, Saito Y, Ishihara K, Hatayama T. Enhancement of oxidative

- stress-induced apoptosis by Hsp105alpha in mouse embryonal F9 cells. *Eur J Biochem* 2002;269:4143-51.
25. Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M, Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:936-44.
 26. Kai M, Nakatsura T, Egami H, Senju S, Nishimura Y, Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncol Rep* 2003;10:1777-82.
 27. Hwang TS, Han HS, Choi HK et al. Differential, stage-dependent expression of Hsp70, Hsp110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:690-700.
 28. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
 29. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.
 30. Yang G, Thompson JA, Fang B, Liu J. Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer. *Oncogene* 2003;22:5694-701.
 31. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* 2003;9:1408-12.
 32. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2783-8.
 33. Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 2004;64:3365-70.
 34. Chae SS, Paik JH, Furneaux H, Hla T. Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J Clin Invest* 2004;114:1082-9. Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004;22:1245-48.
 35. Monji M, Senju S, Nakatsura T et al. Head and neck cancer antigens recognized by the humoral immune system. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:734-41.

36. Nogawa M, Yuasa T, Kimura S et al. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005;115:978-85.
37. King FW, Wawrzynow A, Höhfeld J, Zylicz M. Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *EMBO J* 2001;20:6297-305.
38. Jäättelä M, Wissing D, Bauer PA, Li GC. Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J* 1992;11:3507-12.
39. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997;17:5317-27.
40. Jäättelä M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* 1998;17:6124-34.
41. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-4.
42. Lazaris A, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis B. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res Treat* 1997;43:43-51.
43. Vargas-Roig LM, Fanelli MA, López LA et al. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect Prev* 1997;21:441-51.
44. Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer* 1998;79:468-75.
45. Oh HJ, Chen X, Subjeck JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem* 1997;272:31636-40.
46. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7871-6.
47. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 2000;33:341-65.

48. Walerych D, Kudla G, Gutkowska M et al. Hsp90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2004;279:48836-45.
49. Whitesell L, Sutphin PD, Pulcini EJ, Martinez JD, Cook PH. The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol* 1998;18:1517-24.
50. Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr* 1999;7:293-300.
51. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;403:98-103.
52. Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 2004;28:101-5.
53. Kakimura J, Kitamura Y, Takata K et al. Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J* 2002;16:601-3.
54. Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:1291-300.
55. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002;2:243-7.
56. Wilda M, Fuchs U, Wössmann W, Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002;21:5716-24.