

熊本大学学位論文

熱ショックタンパク質を標的にした

温熱増感薬の開発研究

～ナフトキノン誘導体のガン温熱療法併用薬としての可能性について～

2006

熊本大学大学院薬学教育部 分子機能薬学専攻  
遺伝子機能応用学分野

下原 修治

Development of a Hyperthermic Sensitizer  
Targeting Heat Shock Proteins

~ Possibility of Naphthoquinone Derivatives  
as Sensitizers of Hyperthermic Cancer Therapy~

Shuji Shimohara

## **Development of a Hyperthermic Sensitizer Targeting Heat Shock Protein**

~ Possibility of Naphthoquinone Derivatives as Sensitizers of Hyperthermic Cancer Therapy~

**Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,**

**Shuji Shimohara**

There are various strategies to treat the cancers. The most widely-used cancer treatments are surgical procedure, chemotherapy and radiation therapy. They are used alone or in combining them, which are effective for cancer treatment, but sometime induce serious side effects. Hyperthermia, one of the treatments for cancer, has very few side effects because the principle of hyperthermia is based on the feature that tumor tissues are more sensitive to heat than normal ones. However hyperthermia alone has produced limited positive results due to the thermotolerance of cancer cells, therefore much attention has been focused on combining hyperthermia with chemotherapy or radiation and on searching for substances capable of sensitizing cancer cells to hyperthermia-induced damage. Thermotolerance in tumor cells is mediated by cytoplasmic chaperone heat shock proteins (Hsps), especially stress-inducible Hsp72 which causes the refolding of denatured proteins and the inhibiting of apoptosis. Therefore, a drug that can inhibit Hsp72 induction by heat shock could be a good candidate to amplify the effects of hyperthermia. But due to the pleiotropic roles of Hsps, the development of an effective Hsps inhibitor with low toxicity has been difficult and remains a great challenge.

We previously searched the regulator of Hsp72 and found vitamin K<sub>2</sub> (VK<sub>2</sub>) inhibited the expression of Hsp72. Here, we show that VK<sub>2</sub> and VK<sub>1</sub> can act as the sensitizer of hyperthermia by inhibiting the expression of Hsps *in vitro* and *in vivo*. VK<sub>2</sub> and VK<sub>1</sub> inhibited the expression of Hsp72 in HeLa and A549 cells. The chaperone activity of Hsp72 was compromised after heat shock when cells were pre-treated with VK<sub>2</sub>. VK<sub>2</sub> also inhibited the expression of other heat-inducible Hsps, Hsp90, Hsp40 and Hsp27. The suppressions of Hsps were apparently at the protein level because the phosphorylation level of HSF1, Hsps transcriptional factor, and the mRNA expression of Hsp72 were unchanged. VK<sub>2</sub> sensitized A549 cells to heat-shock induced cell death and inhibited the acquisition of thermotolerance

in HeLa cells, while the compounds alone had no effect on cell viability. The effect of VK<sub>2</sub> on Hsp72 suppression, however, was also observed on normal mouse tissues after the mice were subjected to whole body hyperthermia. To eliminate this side effect, local hyperthermia was performed on tumors in mice. The pre-treatment with VK<sub>2</sub> potentiated the effect of local hyperthermia on tumor growth suppression.

The findings here that VK<sub>1</sub> and VK<sub>2</sub> inhibit heat shock-induced Hsp72 suggest their possible use as sensitizer of hyperthermia in cancer therapy

The mutation of p53 was also reported as the factor diminishing the thermosensitivity of cancer cells. But the mechanism how p53 affects the thermosensitivity of cancer cells is unclear. Some researcher said the mutation of p53 affects the expression level of Hsp72 or Hsp27. So we checked whether the expressions of Hsps are influenced by p53 status *in vitro* and *in vivo*. In contrast to our expectation, p53 status didn't affect the expression of Hsps. We also checked the post-translational modification of Hsps by two-dimensional electrophoresis. Only Hsp25 expression pattern in the liver of mice was affected by p53 status, but others were not. These data indicate that the p53-dependent thermosensitivity is not caused by altering the expression of Hsps.

Finally, we examined the effect of VK<sub>2</sub> on thermosensitivity depended on p53 status. VK<sub>2</sub> strongly potentiated the heat-induced cytotoxicity in HCT116/p53<sup>+/+</sup> cells, but not in HCT116/p53<sup>-/-</sup> cells. These data indicate that there may be a p53-dependent factor which regulates the thermosensitivity of cancer cells upstream of the cell death signaling inhibited by Hsps. These studies may provide useful information for searching target of sensitizer for hyperthermia, and more experiments are needed.

In conclusion, the findings shown here that VK<sub>1</sub> and VK<sub>2</sub> inhibit heat shock-induced Hsp72 suggest a possible use of vitamin K or their derivatives as sensitizer for hyperthermia in cancer therapy. And the studies to clarify the mechanisms how cancer cells get the thermoresistance lead to find the new type of sensitizer of hyperthermia, and the effective cancer therapy with lower side effects.

## 略語表

本論文では以下の略号を使用する.

Apaf-1	: apoptotic protease activating factor-1
BCA	: bicinchoninic acid
BPB	: bromophenol blue
BSA	: bovine serum albumin
CHAPS	: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid
CNX	: calnexin
CON	: control
DNA	: deoxyribonucleic acid
DEPC	: diethyl pyrocarbonate
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DTT	: dithiothreitol
ECL	: enhanced chemiluminescence
EDTA	: ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	: high-performance liquid chromatography
HRP	: horseradish peroxidase
HS	: heat shock
Hsc	: heat shock cognate
HSE	: heat shock element
HSF1	: heat shock transcriptional factor 1
Hsp	: heat shock protein
IgG	: immunoglobulin G
IPG	: immobilized pH gradients

IR : infrared  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
LDH : lactate dehydrogenase  
mRNA : messenger ribonucleic acid  
OD : optical density  
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis  
PBS(-) :  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free phosphate buffered saline  
PCR : polymerase chain reaction  
PI : propidium iodide  
PMSF : phenylmethyl-sulfonyl fluoride  
PVDF : polyvinilidene difluoride  
RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
SE : standard error  
Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane  
UV : ultraviolet  
VK : vitamin K

## 目次

第1章 緒論 .....	1
第2章 熱ショックタンパク質とガンの温熱耐性に関する研究.....	11
第1節 Hsp72 抑制薬の探索.....	11
第1項 Hsp72 の発現誘導に対する VK の作用.....	11
第2項 Hsp72 を抑制するナフトキノン誘導体の探索 .....	14
第2節 熱ショックタンパク質の発現および機能に対する VK2 の作用 .....	21
第1項 熱変性タンパク質のリフォールディング活性に対する作用.....	21
第2項 他の HSP ファミリーの熱による発現誘導に対する作用.....	23
第3項 HSF1 の活性化および Hsp72 mRNA の発現に対する作用.....	24
第3節 ガン細胞の熱感受性に対する VK2 の作用 .....	26
第1項 温熱によるガン細胞の細胞死に対する VK2 の作用 .....	26
第2項 ガン細胞の温熱耐性獲得に対する作用.....	28
第3項 温熱処理によるガン細胞のコロニー形成抑制に対する作用.....	30
第4節 <i>In vivo</i> における全身温熱に対する VK2 の作用 .....	32
第1項 全身温熱による正常組織での Hsp72 の発現誘導に対する VK2 の作用.....	34
第2項 全身温熱による腫瘍組織での Hsp72 発現誘導に対する VK2 の作用.....	36
第5節 <i>In vivo</i> における局所温熱に対する VK2 の作用 .....	37
第1項 局所温熱処理による腫瘍での Hsp72 の発現誘導に対する作用.....	37
第2項 局所温熱処理による <i>in vivo</i> 腫瘍抑制実験 .....	39
第6節 考察 .....	41
第3章 p53 とガンの温熱感受性に関する研究.....	45
第1節 温熱による細胞障害性に対する p53 の影響.....	45
第2節 温熱処理による熱ショックタンパク質の誘導に対する p53 の影響.....	47
第1項 熱ショックタンパク質の量的な発現に対する影響.....	47
第2項 熱ショックタンパク質の質的な発現に対する影響.....	50
第3節 VK2 の温熱感受性亢進作用に対する p53 status の影響.....	53

第4節 考察	55
第4章 総括	58
第5章 実験材料及び実験方法	60
第1節 細胞培養	60
第2節 薬液の調製	60
第3節 培養細胞からのタンパク質の回収および Western blot 解析法	61
第1項 培養細胞からのタンパク質の回収	61
第2項 Western blot 解析法	62
第4節 Luciferase chaperone assay	63
第5節 培養細胞からの total RNA の抽出および semi-quantitative RT-PCR	64
第1項 Total RNA の抽出	64
第2項 RT-PCR	64
第6節 <i>In vitro</i> cell death assay	65
第7節 培養細胞を用いた温熱耐性抑制実験および flow cytometry	65
第1項 培養細胞を用いた温熱耐性抑制実験	65
第2項 アポトーシスの検出および flow cytometry	65
第8節 コロニー形成試験	66
第9節 LDH release assay	66
第10節 <i>In vivo</i> 実験	67
第1項 実験動物	67
第2項 ノードマウスへの腫瘍移植	67
第3項 動物への VK2 の投与	67
第4項 遠赤外線を用いた全身温熱処理	67
第5項 動物組織からのタンパク質の回収	68
第6項 VK の定量法	68
第7項 温浴を用いた局所温熱処理	69
第11節 二次元電気泳動法	69
第12節 試薬	70

謝 辞 71

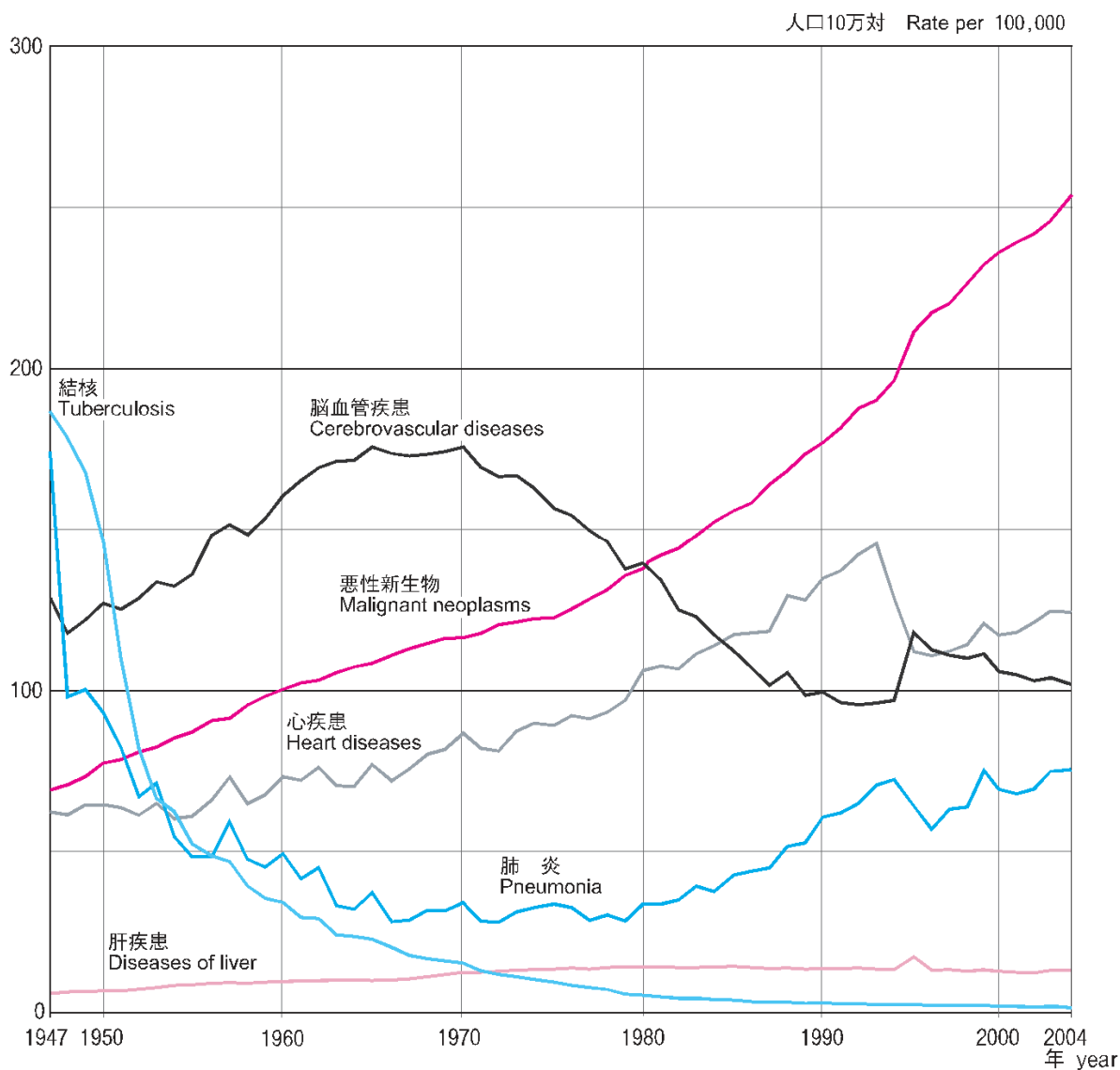
参考文献..... 71



## 第1章 緒論

ガン治療. これは 20 世紀から 21 世紀に持ち越された最大のテーマであるかもしれない. ガンが日本における死亡率第一位になった 1981 年から死亡率第一位の座を走り続け, もうすぐ四半世紀を過ぎようとしている (Fig.1). 世界中の研究者がガン治療に向けて様々な研究を行い, 徐々にその成果が得られてきたが, 依然として罹患率, 死亡率は増加傾向にあり, 画期的な治療法の開発が望まれている.

Fig.1 日本における死亡率の推移



資料：厚生労働省大臣官房統計情報部「人口動態統計」

現在までにガンに対する様々な治療法、治療薬が開発されてきているが、多くのガンではガンの種類や進行度を考えて外科療法、放射線療法、抗悪性腫瘍剤による化学療法のうちのどれかひとつか、またはそれらをあわせた治療法を選択することが最も妥当であると考えられている。これらの方法はそれぞれ大変有効な治療効果を示すが、それぞれにいくつかの欠点を持ち合わせているのも事実である。例えば外科療法では、ある程度大きくなった固形腫瘍を視覚で捕らえながらきれいに摘出できるが、浸潤・転移しているガンには気付けないため、再発を起こす可能性がある。また、外科療法は患者への負担が大きいのも事実である。放射線療法では、体にメスを入れることなくガンを攻撃できるが、正常な組織にもダメージを与えてしまうため、線量や照射部位が適切でないと局所性、あるいは全身性の副作用が生じる。化学療法では、浸潤・転移した視覚で確認できないガンにも効果を示すが、やはり正常な組織へダメージを与えてしまい、重篤な副作用を呈する場合が多い。現在いくつかの分子標的治療薬が開発され、副作用の少ない抗悪性腫瘍剤が出てきているが、ガンの種類が多岐にわたるため、常に一定の効果が得られるとは限らない。この様に、治療効果の高い方法・薬物が開発されている反面、すべてのガンに応用可能な方法は少なく、未だに治療の際の患者への大きな負担が取り除けないのも事実である。

近年、ガン治療法の中でも副作用が小さいものとしてガン温熱療法 (hyperthermia) という方法が注目されてきている。この方法はガン細胞が正常細胞に比べ熱に弱いという性質を利用した方法で、一般に治療は 42~43°C という比較的温和な加温により行われる。現状としては副作用はほとんどなく、一定の治療効果が得られている。

熱をガンの治療に用いる方法は、インドの古い文献である「ラーマーヤナ」にも記述があり、ギリシアのヒポクラテスや、ローマのガレンも支持したと言われている。近代的な意味でのガン温熱療法へのきっかけを作ったのは、ドイツの医師である W. ブッシュであり、1866 年に丹毒による二回の高熱で顔の肉腫が治ったことから、正常体温以上の熱によりガン細胞を殺せるのではないかと提唱した<sup>1</sup>。その後、アメリカの医師である W. B. Coley が細菌毒素を使った人工発熱で癌を治そうと試みたり、温水灌流やチアテルミーによる加温などが散発的に試みられた。また、自然治癒したガンのうち、およそ 1/3 は発熱していたとの報告があり、熱によるガン治療の可能性

が提唱されていた。1960 年後半から欧米で本格的な研究が始まり、1975 年にワシントン D. C. で温熱と放射線による癌治療についての最初の国際シンポジウムが開かれ、これをきっかけに日本において温熱療法が癌治療法の 1 つとして取り上げられるようになった。さらに、1996 年 4 月より、それまで他の治療法と併用することが条件であった温熱療法の健康保険の適用が、単独でも適用となり、温熱療法への理解も少しずつ深まりつつある。

温熱療法の作用機構は、前述したとおり正常組織と腫瘍組織の熱感受性の差を利用した方法である。腫瘍組織は一般に正常組織に比べて血流が悪いが、これは、腫瘍組織の血管系は平滑筋や血管周囲細胞を欠損しており、不完全なものであるためと考えられる。血流は組織から熱を除くラジエーターのような役割も果たすため、血流の少ない腫瘍組織では熱のエネルギーが蓄積しやすい。また、腫瘍組織の細胞には十分に栄養が行き届いておらず、嫌氣的解糖が強く起っているため腫瘍組織の pH は正常組織に比べて低くなっている。一般に温熱処理による細胞へのダメージは pH が低いほど大きくなるので腫瘍組織は正常組織よりも高い温熱感受性を示す<sup>2-5</sup>。

さらに、細胞レベルでもガン細胞は正常細胞に比べて熱に弱いということが示されている。ばらばらの状態の細胞に熱を加えたときには感受性に差がないが、生体内で組織を作るように互いに接触させると、正常細胞は大変熱抵抗性になる。これには細胞間の密な連絡が役立っているものと考えられる。ガンは悪性度が進むほど細胞間の連絡が悪くなるだけでなく、分裂もしばしば異常になるが、ガン細胞の分裂機構は熱に弱く、従ってガン細胞は熱にますます弱くなると考えられる。温度は高ければ高いほど殺腫瘍効果は大きくなるが、42°C という比較的温和な加温でも十分に治療効果が得られる。

ガン温熱療法の利点としては副作用がほとんどないことや、悪性度の高いガンであればあるほど効果的であることが上げられる。また、放射線療法や化学療法などと併用すると、増感効果が得られることなどが上げられる<sup>5-7</sup>。放射線やある種の抗癌剤は細胞の DNA に傷をつけ効果を示すが、細胞自身はこれをかなりの程度修復することが出来る。しかし、42°C 以上になるとこの修復が働かなくなり細胞が死に易くなる

からであると考えられている。また短期間の温熱抵抗性は生じるが、抗癌剤の場合のように抵抗性のために無効になるというようなことはない。従って何度でも繰り返して治療が可能である。さらに、周辺正常組織の適度の加温により免疫能の亢進が認められるため、免疫による殺腫瘍効果も期待できる。

ガン温熱療法の欠点としては、まず、深部の腫瘍を加熱しにくいこと、方法によっては骨や脂肪組織などが異常に加熱されやすいことなど、技術的な問題がある。しかし、近年では技術力の発展により、これらの問題はほぼ克服できている。

また、装置が高価であること、装置の取扱いに熟練を要すること、温熱療法への保険適応が医療機関の収益メリットが少ない適用条件となっているなどの理由により、広く普及するには至っていないという問題がある。しかし普及の問題は、医師や患者が温熱療法についてもっとよく理解していくことで徐々に解決できると思われ、基礎及び臨床研究の蓄積や、研究機関・医療機関・装置メーカーの協力による活動に期待が高まる。

さらに、前述したように温熱療法により一度加温されたガンは温熱耐性を生じ<sup>8</sup>、2、3日後には消失するものの、温熱感受性が著しく低下するため、治療は週1~2回程度と制限を受けている。そのため、ガンの温熱耐性を抑制できれば、ガン温熱療法はより強力な治療効果を発揮することができると考えられる。これまでの様々な研究により、ガンの温熱耐性獲得機構には、熱ショックタンパク質が大きな役割を果たしていることが分かっている。

熱ショックタンパク質とは、細胞に熱ショックをはじめとする種々のストレスがかかったときに、一時的に急激に合成誘導される一群のタンパク質である。そのため広く意味をとってストレスタンパク質ともいわれる。熱ショックタンパク質は、その分子量によっていくつかのファミリーが形成されており、HSP105 ファミリー、HSP90 ファミリー、HSP70 ファミリー、HSP60 (シャペロニン) ファミリー、HSP40 ファミリー、低分子量 HSP ファミリーに分けられる (Table 1)。これらは、細胞内のタンパク質を凝集・変性から防ぎ、修復するという役割を担っている<sup>9-11</sup>。また、タンパク質の生合成、折りたたみ、細胞内輸送、相互作用による活性制御及び分解等の過程において、分子シャペロンとしての役割も果たしている<sup>12-14</sup>。

**Table 1** 熱ショックタンパク質ファミリー

ファミリー	メンバー	主な役割
HSP105	Hsp110, Hsp105 $\alpha$ , Hsp105 $\beta$ など	変性タンパク質の凝集抑制, Hsp70 のシャペロン機能抑制など
HSP90	Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ , gp96 など	転写因子やシグナル伝達系の制御, 変性タンパク質の凝集抑制など
HSP70	Hsp72, Hsc73, BiP, mHsp70 など	HSP40 と共同した ATP 依存的フォールディング, 細胞内輸送, アポトーシスの抑制など
HSP60 (シャペロニン)	Hsp60, TRiC など	低分子 HSP と共同した ATP 依存的フォールディングなど
HSP40	Hsp40, Hsj2 など	HSP70 と共同した ATP 依存的フォールディングなど
低分子 HSP	Hsp27, Hsp10, $\alpha$ B-crystallin など	HSP60 と共同した ATP 依存的フォールディング, アポトーシスの抑制など

種々の病態における熱ショックタンパク質の関与について報告されたものを Table 2 にまとめた。過去の報告において熱ショックタンパク質が減少している病態は極めて少ないため、増加している例のみを示した。これらの病態における熱ショックタンパク質の誘導パターンは大きく三つに分類される。①炎症などの組織障害による細胞環境の変化に対して、二次的に誘導され、組織を守る。②組織の機能や活動が亢進するに伴って増加するタンパク質の品質管理を正常に維持するために誘導される。③急性のストレス後、一過性に末梢の標的組織で誘導され、ストレス耐性能の獲得に寄与する。このような病態において顕著に誘導される代表的な熱ショックタンパク質は Hsp72 である。胃潰瘍、脳梗塞、心筋梗塞、急性肺障害などのモデルにおいて Hsp72 を前もって誘導させておくことにより障害を軽減できることは広く認められている<sup>15-18</sup>。さらに、ミトコンドリアの形態と機能の保持<sup>19-21</sup>、傷害因子によるアポトーシスの抑制作用<sup>22</sup>などが注目され、細胞保護の分子機構も明らかになってきた。

**Table 2 熱ショックタンパク質の発現量の変化している疾患及び症状**

Hsps (分子特定なし)	膵臓ガン, アルコール性肝炎, 胆汁停止, てんかん, パーキンソン病, プリオン脳疾患, 急性耳炎, 歯根膜疾患, サルコイドーシス, 間質性肺疾患, 筋萎縮性側索硬化症, 筋ジストロフィー, 慢性関節リウマチ, 先天性甲状腺機能低下甲状腺腫, Grave's 眼病, アルコール性心筋症, 不整脈, 巣状虚血, 頭蓋内外動脈硬化, 脳損傷, 口扁平苔蘚, 急性耳炎中脈, 分裂病, 原発性, 胆汁硬変症, 潰瘍性大腸炎, 口部苔蘚, 心脈管疾患, ガン温熱療法, 低酸素ストレス, 冠動脈閉塞, ベンゼン中毒, 心欠陥, 嚢胞性線維症, 関節炎, 骨関節炎軟骨, 膵炎, 拡張性心筋症, 喘息, 原発性硬化胆管炎—原発性胆管硬変
Hsp90	急性ゲンタマイシン腎症, ホドキンズ病, 筋原腫, SLE, 肥大心筋症, 造血細胞腫, クロウン病, 潰瘍性大腸炎
Hsp70	卵巣ガン, メラノーマ, 脳虚血, 脳梗塞, 甲状腺関連眼病, 腎炎, 高血圧, うつ病, くも膜下出血, 喘息, 慢性気管支炎, ホドキンズ病, 心臓手術, 加齢, Sepsis, アルツハイマー病, 痴呆, 中枢神経系損傷, 神経損傷疾患, SLE, 慢性関節リウマチ, 心筋梗塞, ARDS, ベーチェット病, GVHD, 口形成異常, 側頭鱗細胞腫, 大腸疾患
Hsp60	肝炎, 眼疾患, ホドキンズ病, EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) の虹彩炎, 川崎病, 動脈硬化症, 橋本甲状腺炎, クロウン病, Lyme 病, 拡張性心筋症, 動脈アテローム
Hsp47	腎炎, 肺線維症, 糖尿病性 IgA 腎症, 片側輸尿管閉塞
Hsp27, Hsp28, αB-crystallin, αA-crystallin	腎炎, ホドキンズ病, 中枢神経系損傷, アルツハイマー病, アレキサンダー病, 白内障, 星状細胞腫 (中間系フィラメント), 緑内障
BiP/GRP78	眼病

熱ショックタンパク質は、ガンと関連した報告が多い。例えば、多くの腫瘍細胞で、Hsp72 が高発現しており<sup>23</sup>、マウスの線維肉腫細胞の Hsp72 発現レベルと腫瘍増殖能は相関し、乳ガンの Hsp72 発現量は予後の良し悪しを左右するという<sup>24,25</sup>。さらに、Hsp72 のトランスジェニックマウスは T 細胞リンパ腫を発症するという<sup>26</sup>。

また、ガンの温熱耐性と熱ショックタンパク質についても多くの報告がなされている。例えば、Hsp72, Hsp27 あるいは  $\alpha$ B-crystallin 等を高発現させた細胞では、温熱抵抗性を獲得すること<sup>8,27,28</sup>、Chinese hamster fibroblast の温熱耐性を示す変異株では、熱ショックタンパク質を恒常的に高発現していること<sup>29</sup>、Hsp72 のアンチセンスを細胞内に導入することで、細胞の温熱耐性獲得を阻止すること<sup>30</sup>、Hsp72 の遺伝子レベルでの誘導を正に制御する HSF1 の遺伝子ノックアウトにより温熱耐性の誘導が阻害されること<sup>31</sup>、抗 Hsp72 抗体を線維芽細胞にマイクロインジェクションすると、温熱処理に対して高感受性になることなどである<sup>32</sup>。近年、温和な熱ショックにより細胞にアポトーシスが誘導され、また温熱耐性細胞においてはこのアポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。温熱によるアポトーシスは p38 や JNK といったストレスキナーゼの活性化によって起こるとされているが<sup>33-36</sup>、熱ショックタンパク質はこのストレスキナーゼカスケードの様々なステップにおいてシグナル伝達を阻害し、アポトーシスを抑制する<sup>37,38</sup>。また、熱ショックタンパク質はミトコンドリアからのチトクローム c の遊離を介したアポトーシスも抑制する<sup>38</sup>。従って、強いストレスを与える前にマイルドなストレスを与えておくと、マイルドなストレスにより誘導された熱ショックタンパク質が、強いストレスにより誘導されるアポトーシスを抑制する、つまり、耐性を生じるようになると考えられている<sup>8,37-49</sup>。

これらのことから、熱ショックタンパク質の発現および機能を抑制する薬物は、ガンの温熱耐性獲得を抑制し、温熱感受性を増感させるため、ガン温熱療法の有用な併用薬となりうると考えられている<sup>50,51</sup>。



熱感受性に影響を与える他の要因として、前述した熱ショックタンパク質以外に p53 status (p53 が変異または欠失しているか否か) が報告されている<sup>52</sup>。p53 遺伝子は第 17 染色体短腕 13 上にあり、その遺伝子産物は、正常細胞において、DNA 複製調節、分化誘導、細胞周期制御、DNA 修復、アポトーシスの誘導などに関与することが分かっている。p53 は、1979 年に SV40 によって形質転換した細胞において高発現するタンパク質として発見され、その後しばらくは、癌遺伝子産物の一つとして考えられていたが、1989 年に、この遺伝子は多数の癌において変異あるいは欠失している事が明らかとなり、癌抑制遺伝子であることが判明した。p53 は、細胞が様々なストレスによって DNA に損傷を受けると、DNA 損傷シグナルを受けて細胞内で増加・活性化し、p21 遺伝子の転写亢進などにより、細胞周期を遅延させると共に、損傷部の修復を行う。しかし、細胞の状況によっては、修復を行わずにアポトーシスを誘導し、DNA が変異した細胞を残さないように働いている。このように、p53 は遺伝情報の維持のために非常に重要な働きを担っており、ゲノムの守護神 (Guardian of Genome) と呼ばれてきた。それゆえ p53 遺伝子の変異は、ゲノムの不安定化を引き起こし、発癌の確率を上げる。逆に、多くの癌において p53 遺伝子の変異が報告されている。

p53 に変異がある癌細胞は、野生型 p53 を有する癌細胞より温熱抵抗性が高いということが分かっている<sup>52</sup>。その機序として、野生型 p53 が細胞内で Hsp72 の発現を抑制しているからであると考えられてきた<sup>53,54</sup>。しかしながら、p53 status によってほとんど Hsp72 の発現に影響がないという報告もあり<sup>55</sup>、未だその詳細は明確でない。前述したとおり、多数のガンにおいて p53 の変異が報告されているため、p53 変異による温熱抵抗性の増大機構を明らかにすることは、多数のガンにおける温熱療法の効果を上昇させることにつながるかもしれない。

そこで本研究では、ガンの温熱感受性を左右する、熱ショックタンパク質及び p53 に注目し、ガンの温熱感受性を増大させることでガン温熱療法の治療効果を増強させるガン温熱療法併用薬の開発を目的に研究を行った。

第2章では、Hsp72 の発現を抑制する薬物をスクリーニングし、熱ショックタンパク質抑制薬のガン温熱増感薬としての可能性について検討を行った。

第3章では、p53 が変異または欠失したガンの温熱感受性低下の機序解明を目的とし、p53 status による、熱ショックタンパク質の発現への影響について検討を行った。また、p53 status による、温熱感受性の差異に対する熱ショックタンパク質抑制薬の効果について検討を行った。

以下、各章で得られた知見を詳述する。

## 第2章 熱ショックタンパク質とガンの温熱耐性に関する研究

### 第1節 Hsp72 抑制薬の探索

ガンの温熱療法における問題点の一つは、ガン細胞の温熱耐性の獲得である。この耐性獲得のメカニズムにおける重要なステップは、温熱による Hsp72 をはじめとする熱ショックタンパク質の誘導である。Hsp72 は中でも重要な働きを担っていると考えられている。従って、温熱誘導型の Hsp72 の発現上昇を抑制する薬物は、ガンの温熱療法における有用な併用薬になる。以前から本研究室では、Hsp72 の発現を調節する化合物を、Western blot 解析法を用いた Hsp72 発現スクリーニングを行ってきた。このスクリーニングには熱ショックタンパク質の実験で汎用性の高い HeLa 細胞を用いた。その中で、vitamin K<sub>2</sub> (VK2) が Hsp72 の発現を抑制する活性をもつことがわかったため、以下で種々の検討を行った。

#### 第1項 Hsp72 の発現誘導に対する VK の作用

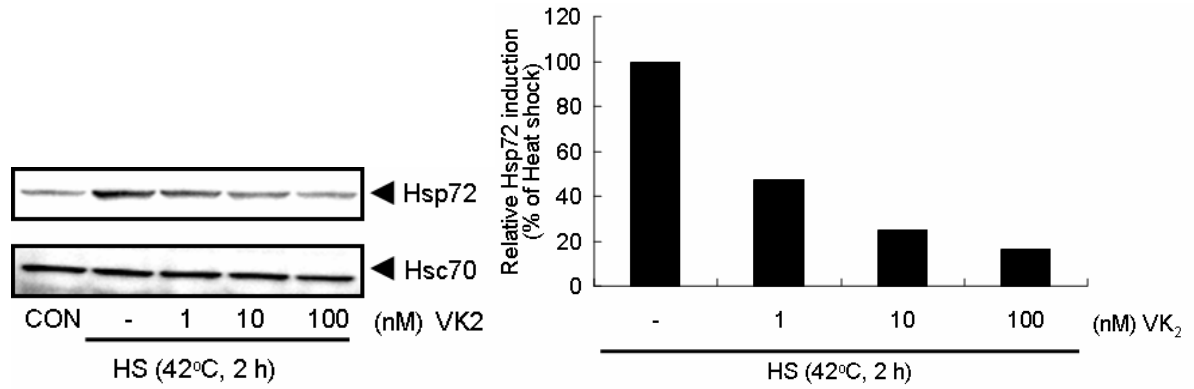
まず、VK2 が濃度依存的に Hsp72 を抑制できるか否かを、HeLa 細胞及び A549 細胞で検討した。

サブコンフルエント状態にある HeLa 細胞及び A549 細胞を、37°C、2 時間、各濃度の VK2 で前処置した。次に、42°C (HeLa 細胞) または 43°C (A549 細胞) で 2 時間の熱ショックを加えた後、37°C で 5 時間培養した。その後、細胞溶解液を用いてタンパク質を回収し、Hsp72 抗体を用いて Western blot 解析を行った。Hsc70 の発現は内部標準として調べた。その結果、VK2 はどちらの細胞においても、熱ショックによる Hsp72 の発現誘導を 10 ~ 100 nM という低濃度で抑制することが分かった (Fig.2A, B)。

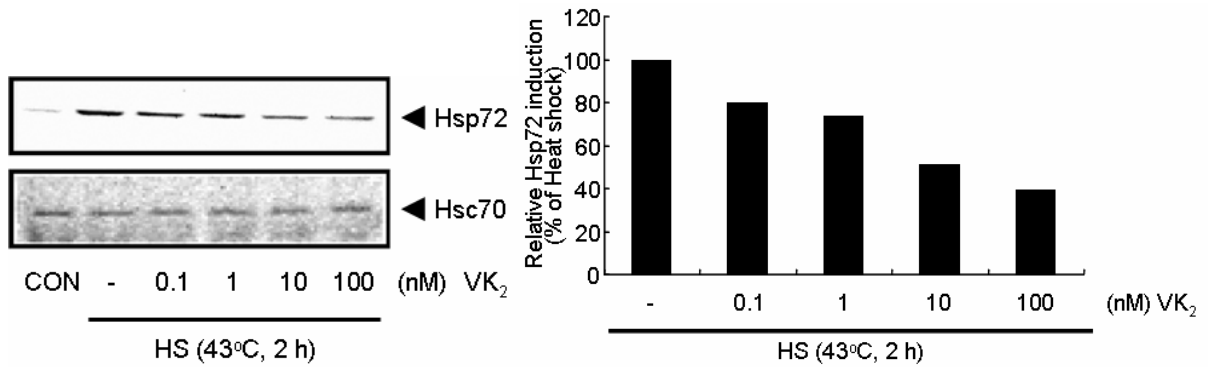
次に、VK2 の類似化合物である vitamin K<sub>1</sub> (VK1) 及び vitamin K<sub>3</sub> (VK3) は、構造上 VK2 に非常に良く似ていることから、VK1 及び VK3 も VK2 同様に Hsp72 発現抑制活性を示すかを Western blot 解析を用いて検討した。サブコンフルエント状態にある A549 細胞を、37°C、2 時間、各濃度の薬物で前処置し、Fig.2B と同様に熱ショックを与え、細胞溶解液を用いてタンパク質を回収し、Hsp72 抗体を用いて Western blot 解析を行った。

Hsp72 の発現は、熱ショックをかけない細胞 (CON) においてはほとんど検出されなかったが、43°C、2 時間の熱ショックによって、細胞内における Hsp72 のタンパク発現は顕著に上昇した。一方、VK1 を前処置した細胞においては、VK2 と同様に 100 nM で Hsp72 の発現上昇を抑制したが、VK3 は抑制できなかった (Fig.2C)。これらの結果より、VK2 は A549 細胞においても熱ショックによって誘導される Hsp72 の発現上昇を 100 nM という低濃度で抑制することがわかった。また、VK1 も VK2 と同様に Hsp72 の発現上昇を抑制するが、VK3 は抑制できないことがわかった。

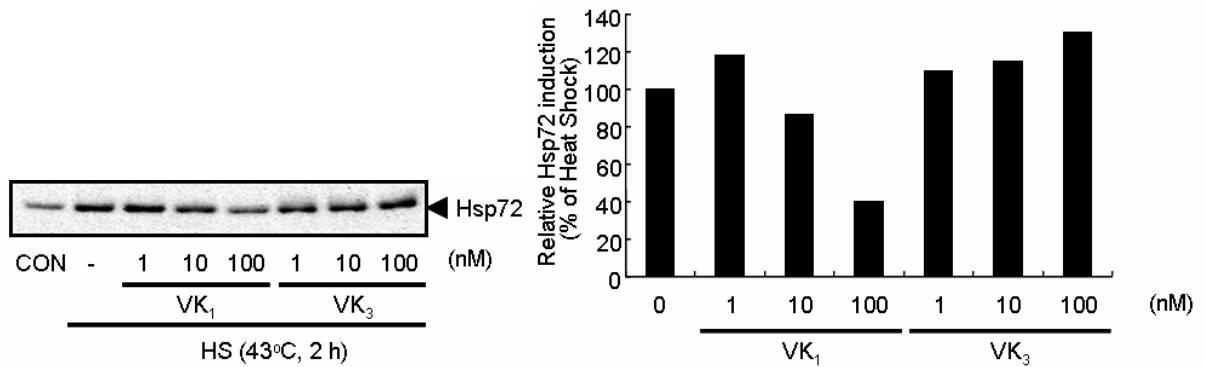
(A) HeLa cell



(B) A549 cell



(C) A549 cell

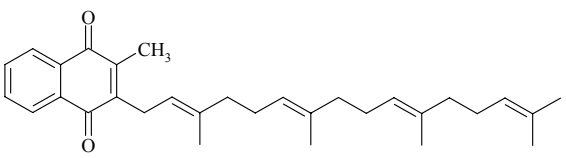
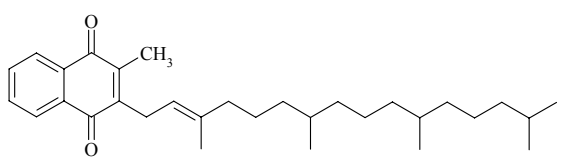
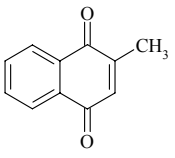


**Fig.2 VK<sub>2</sub> and VK<sub>1</sub> but not VK<sub>3</sub> suppressed the induction of Hsp72 after heat shock *in vitro*.** (A) HeLa cells were treated with the indicated concentrations of VK<sub>2</sub> 2 h before heat shock and lysates were blotted onto the membranes. Hsp72 was detected with anti-Hsp72 antibody. (B), (C) Cell lysates from A549 cells untreated or pre-treated with the indicated concentrations of (B) VK<sub>2</sub>, (C) VK<sub>1</sub> and VK<sub>3</sub> for 2 h before heat shock were blotted and reacted with anti-Hsp72 antibody. Hsc70 was used as control.

## 第2項 Hsp72 を抑制するナフトキノン誘導体の探索

Fig.2 で見られたように, VK2, VK1 は Hsp72 の発現を 100 nM で抑制したが, VK3 は抑制できなかった. Table 3 を見ると分かるように, VK3 はナフトキノン骨格構造を持ち, VK2, VK1 にはそれに炭素数 20 からなる側鎖を持った構造をしている. また, VK2 の側鎖であるゲラニルゲラニル基には Hsp72 を誘導する活性があると報告されていることから<sup>56</sup>, VK による Hsp72 の抑制には, ナフトキノン骨格にある種の側鎖が必要であると考えられる. そこで, VK2 より強力な Hsp72 抑制薬の開発を目的にナフトキノン骨格を有する化合物を HeLa 細胞を用いた Western blot 解析によりスクリーニングし, Hsp72 の発現に対する作用を調べた. 化合物は 10  $\mu$ M 処理した. その結果を Table 4 に示す. わずかに抑制作用を示したものを  $\downarrow$ , コントロールレベルまで抑制したものを  $\downarrow\downarrow$ , コントロール以下まで抑制したものを  $\downarrow\downarrow\downarrow$  で示した. 90 種類以上のナフトキノン誘導体中, 31 種類に Hsp72 発現抑制活性が見られたものの, VK2 のように低濃度 (10 ~ 100 nM) で強い活性を示すものはなかった. しかし, Hsp72 の抑制作用を示す化合物は報告が少ないため, 今回の検討により, 多くの Hsp72 抑制作用を持つものを見出せたことは, 今後 Hsp72 に関する研究を行う上で有用な知見となるであろう.

**Table 3 The structure of vitamin K.**

	Structure	備考
Vitamin K <sub>2</sub>		微生物によって合成される脂溶性のビタミン
Vitamin K <sub>1</sub>		主に植物の葉緑体でつくられる脂溶性のビタミン
Vitamin K <sub>3</sub>		抗凝血作用を示す合成化合物

**Table 4 The effect of naphthoquinone compounds on the expression of Hsp72 in HeLa cells.**

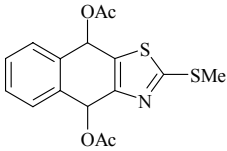
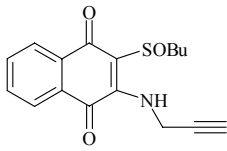
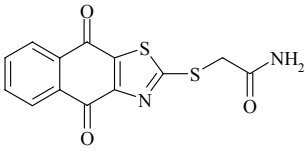
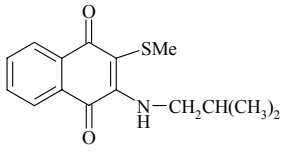
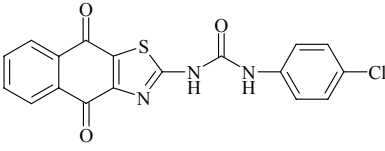
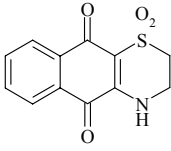
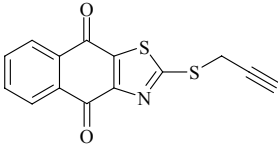
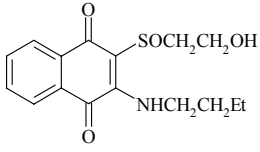
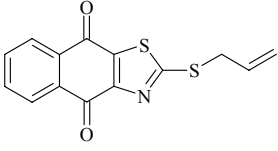
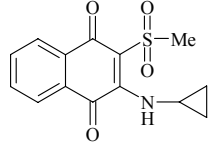
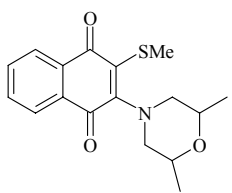
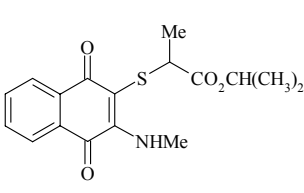
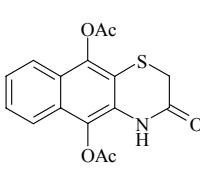
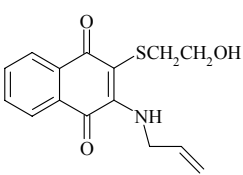
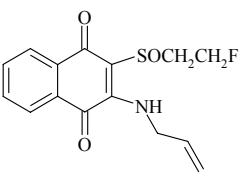
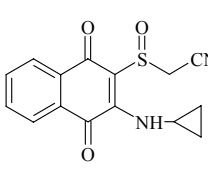
化合物	構造	Hsp72	化合物	構造	Hsp72
KM001		→	KM012		→
KM003		↓↓	KM013		→
KM004		↓	KM014		→
KM005		↓	KM015		→
KM007		→	KM016		↓
KM009		→	KM017		↓
KM010		→	KM018		→
KM011		→	KM019		↓

Table 4 (continued)

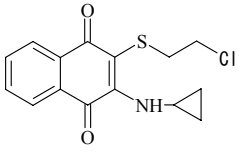
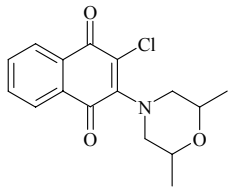
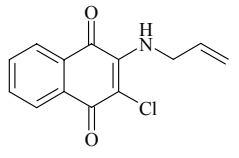
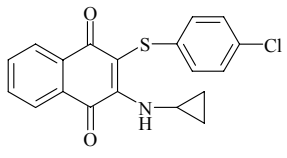
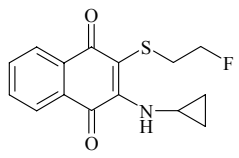
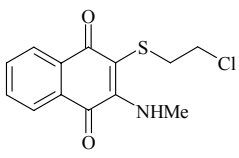
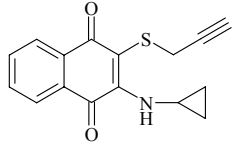
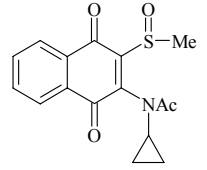
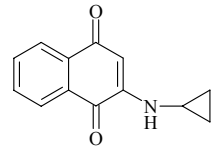
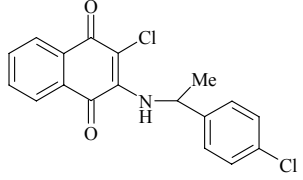
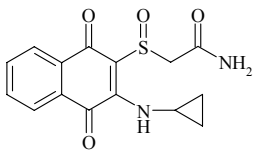
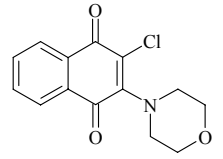
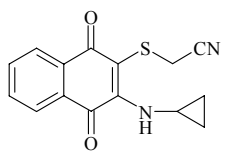
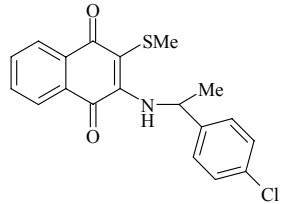
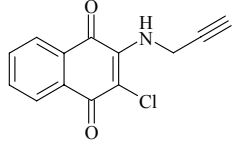
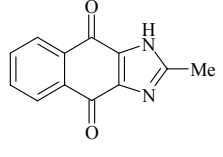
化合物	構造	Hsp72	化合物	構造	Hsp72
KM020		↓	KM028		↑↑
KM021		→	KM029		↑
KM022		↑↑	KM030		↑
KM023		↓↓↓	KM031		↑↑
KM024		→	KM032		↑↑
KM025		↓↓	KM033		↓↓
KM026		→	KM034		↑↑
KM027		→	KM035		↑↑



Table 4 (continued)

化合物	構造	Hsp72	化合物	構造	Hsp72
KM036		↑↑	KM045		↓
KM037		↑↑	KM046		↓
KM038		↑↑	KM047		↓
KM039		→	KM048		→
KM041		↓	KM049		↓
KM042		→	KM050		→
KM043		↓	KM051		→
KM044		↓	KM052		↓↓↓

Table 4 (continued)

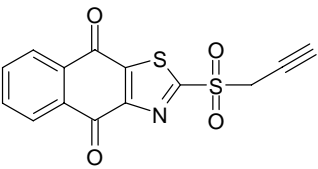
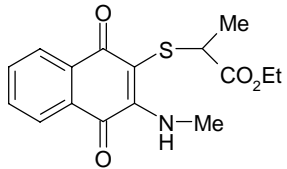
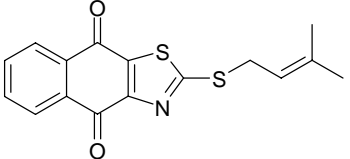
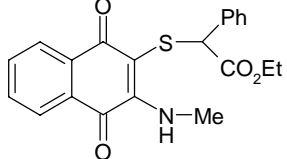
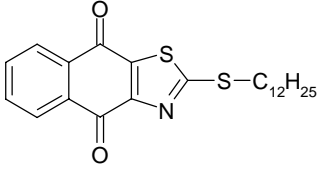
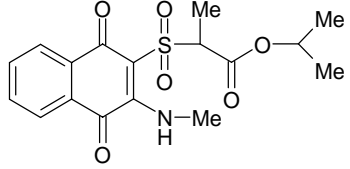
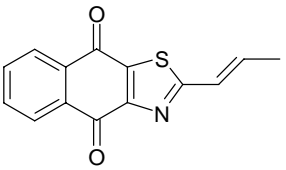
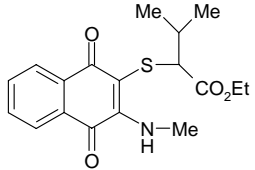
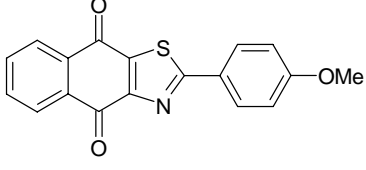
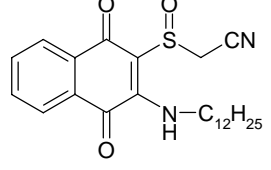
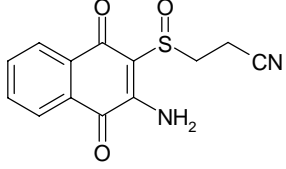
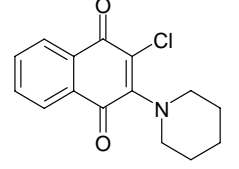
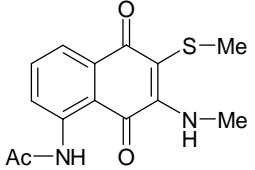
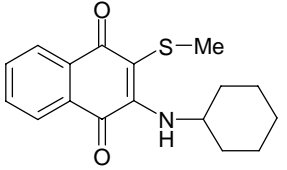
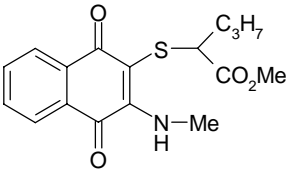
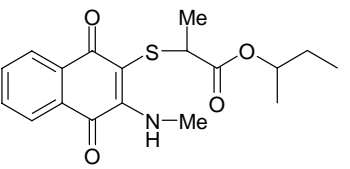
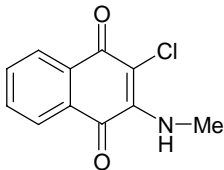
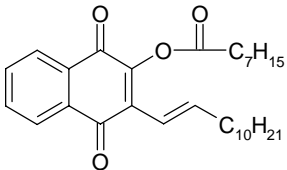
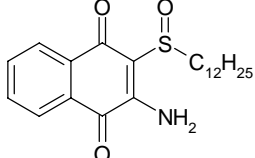
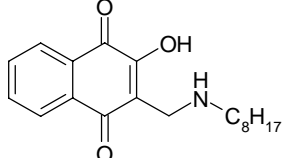
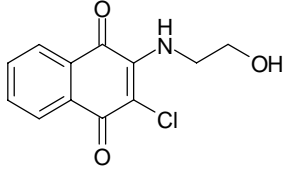
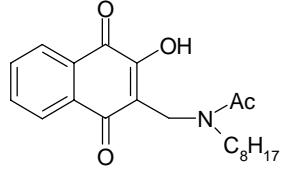
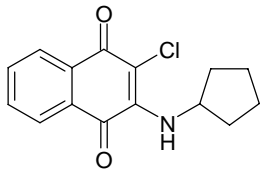
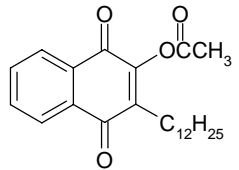
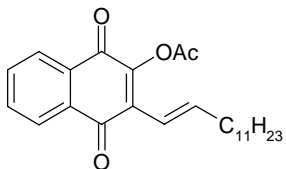
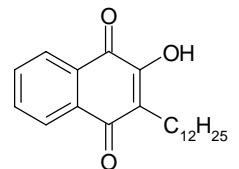
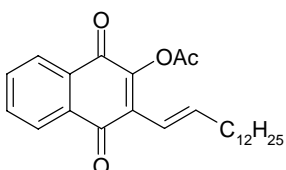
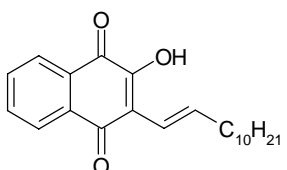
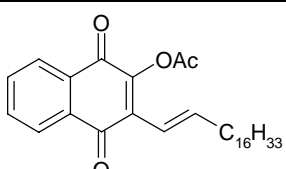
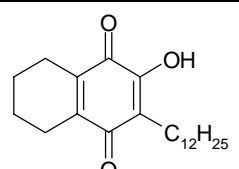
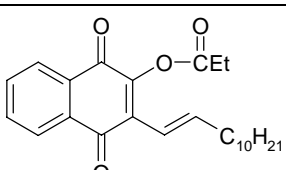
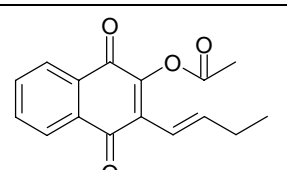
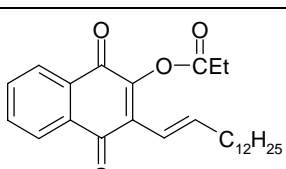
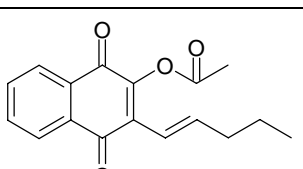
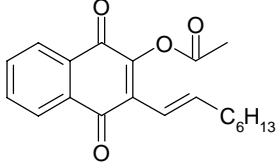
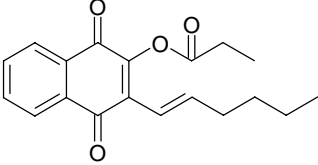
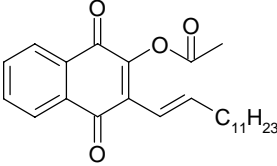
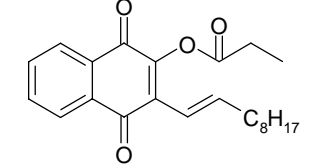
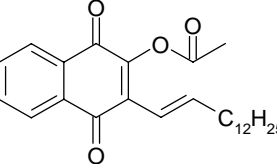
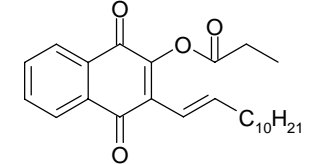
化合物	構造	Hsp72	化合物	構造	Hsp72
KM053		→	KM061		↓
KM054		↓	KM062		→
KM055		×	KM063		→
KM056		↓↓↓	KM064		↓
KM057		×	KM065		↓↓
KM058		→	KM066		→
KM059		→	KM067		↑
KM060		→	KM068		→

Table 4 (continued)

化合物	構造	Hsp72	化合物	構造	Hsp72
KM069		→	KM078		→
KM070		↑	KM079		→
KM071		→	KM080		↓
KM072		→	KM081		→
KM073		↓	KM082		→
KM074		↓	KM083		→
KM075		×	KM084		→
KM076		→	KM085		→
KM077		×	KM086		→

**Table 4 (continued)**

化合物	構造	Hsp72	化合物	構造	Hsp72
KM087		→	KM090		↓
KM088		↓↓	KM091		↓↓
KM089		↓	KM092		↓↓

HeLa cells were treated with these compounds for 2 hours and heat-shocked at 42°C for 2 hours in water bath. After heat shock, cells were incubated at 37°C for 5 hours. Whole cell lysates were subjected to Western blot analysis using anti-Hsp72 and -calnexin (CNX) antibodies. CNX was used as the loading control. × means that the compound was not dissolved in DMSO.

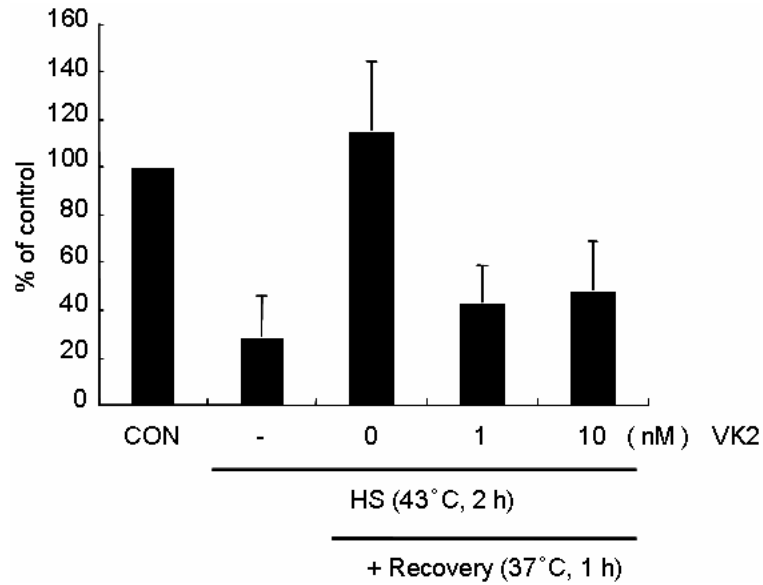
## 第2節 熱ショックタンパク質の発現および機能に対する VK2 の作用

### 第1項 熱変性タンパク質のリフォールディング活性に対する作用

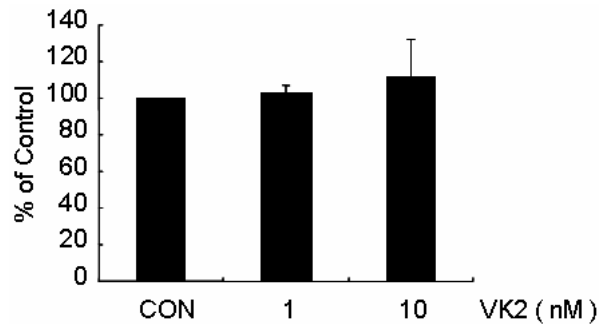
前節におけるスクリーニングの結果から、ナフトキノン誘導体の中でもっとも低濃度で強い作用を示し、かつ現在臨床でも止血薬及び骨粗鬆症治療薬として使われている VK2 を中心に機能解析を行った。

本項では、熱ショックによって誘導される熱ショックタンパク質の細胞内シャペロン活性に対して VK2 がどのように影響を与えるかを、ルシフェラーゼリフォールディングアッセイを用いて検討した。まず、pRL-CMV プラスミドを Trans IT-LT1® を用いて導入し、レニラルシフェラーゼを細胞質に強制発現させた。このレニラルシフェラーゼは、細胞内で転写・翻訳され、Hsp70 family を代表とする細胞内シャペロンによってフォールディングを受けて機能的なタンパク質となるため、その活性をルミノメーターで測定することで細胞内のシャペロン活性を評価した。レニラルシフェラーゼを強制発現させた細胞に 43°C、2 時間の熱ショックを与え、細胞内に発現したレニラルシフェラーゼを変性させ、その活性を低下させた。その後、細胞を 37°C で 1 時間インキュベートし、熱ショックによって誘導された熱ショックタンパク質によって変性ルシフェラーゼをリフォールディングさせ、再活性化させた。その結果、熱ショックによってルシフェラーゼの活性は 30% 前後まで減少するが、その活性はその後の 37°C で 1 時間のインキュベートで完全に回復した。これは、熱ショックによって誘導された熱ショックタンパク質によって、ルシフェラーゼがリフォールディングされたことを意味している。しかし興味深いことに、VK2 を前処理しておくことこのルシフェラーゼのリフォールディング活性が抑制された (Fig.3A)。同様に、細胞内に恒常的に発現しているシャペロンの機能に VK2 が影響を及ぼすかを検討したところ、VK2 は細胞内に恒常的に発現しているシャペロンの機能には影響を及ぼさなかった (Fig.3B)。すなわち、VK2 は熱ショックにより誘導されるシャペロンの機能を 1 nM, 10 nM という低濃度で抑制することが明らかになった。以上の検討から、VK2 は非熱ショック時に細胞内に発現しているシャペロンの機能には影響しないが、熱ショックによって誘導されるシャペロンの機能を特異的に阻害することが分かった。

(A)



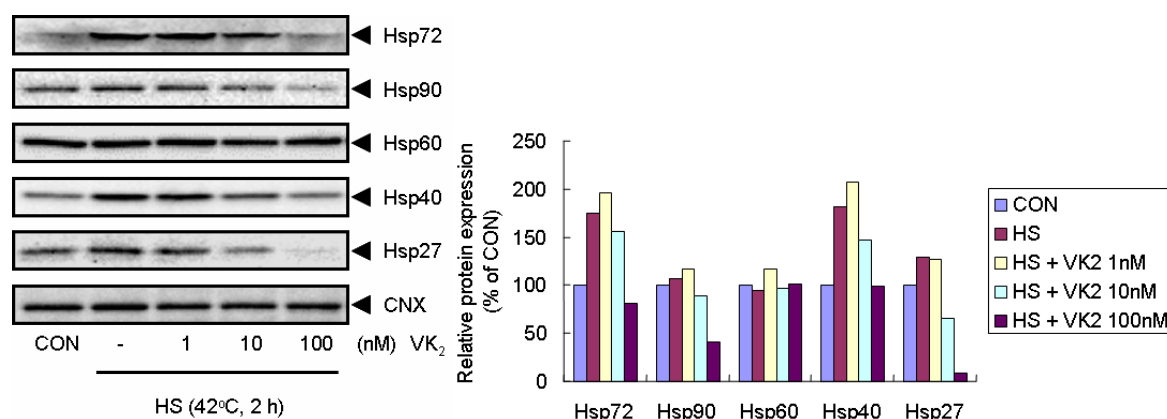
(B)



**Fig.3 VK<sub>2</sub> suppressed the chaperone activity of Hsp72 after heat shock.** (A) pRL-CMV plasmid was transiently transfected into A549 cells. Thirty-six hours after transfection, cells were treated with ethanol or VK<sub>2</sub> at the indicated concentrations and subjected to heat shock (43°C, 2 h) to inactivate the luciferase. The cells were re-incubated for 1 h at 37°C to allow reactivation of the luciferase. The luciferase activity was assessed. Data are normalized to that of the non-heat shocked control. Values are the means  $\pm$  SE of four determinants for a representative experiment. (B) A549 cells were transiently transfected with pRL-CMV and treated with ethanol or VK<sub>2</sub> for 2 hours before assay. At 42 h after transfection, cells were harvested for luciferase assay.

## 第2項 他の HSP ファミリーの熱による発現誘導に対する作用

Fig.3 より, VK2 は熱によって誘導される熱ショックタンパク質のシャペロン活性を抑制することが分かった. これは VK2 が Hsp72 の発現誘導を抑制したことが大きく寄与していると思われる. また, 熱誘導型の他の熱ショックタンパク質への VK2 の関与も考えられる. そこで, VK2 によって他の HSP ファミリーが受ける影響について検討した. サブコンフルエント状態にある HeLa 細胞を各濃度の薬物で前処置した. 37°C で 2 時間前処置した後, 42°C, 2 時間の熱ショックを加え, 37°C に戻した. 5 時間後, 細胞溶解液を用いてタンパク質を回収し, Hsp72, Hsp90, Hsp60, Hsp40, Hsp27 及び calnexin 抗体を用いて Western blot 解析を行った. CNX の発現は内部標準として調べた. その結果, やはり VK2 は, 10 nM, 100 nM という低濃度において, Hsp72 と同様に, 熱誘導型の Hsp90, Hsp40 及び Hsp27 の発現を抑制した. 恒常的な発現を示す Hsp60 には影響しなかった. 以上の結果から, VK2 は熱ショックによって誘導される熱ショックタンパク質の発現を低濃度にて抑制することが分かった.



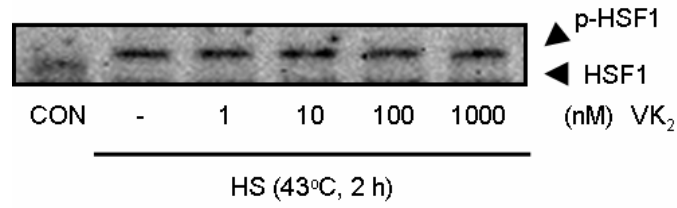
**Fig.4 VK<sub>2</sub> inhibited heat-induced HSPs expression in HeLa cells.** Cell lysates from HeLa cells untreated or pre-treated with the indicated concentrations of VK<sub>2</sub> for 2 h before heat shock were blotted onto the membranes. Each Hsp was detected with anti-Hsp72, Hsp90, Hsp60, Hsp40, and Hsp27 antibodies. Anti-Calnexin antibody was used as a control.

### 第3項 HSF1 の活性化および Hsp72 mRNA の発現に対する作用

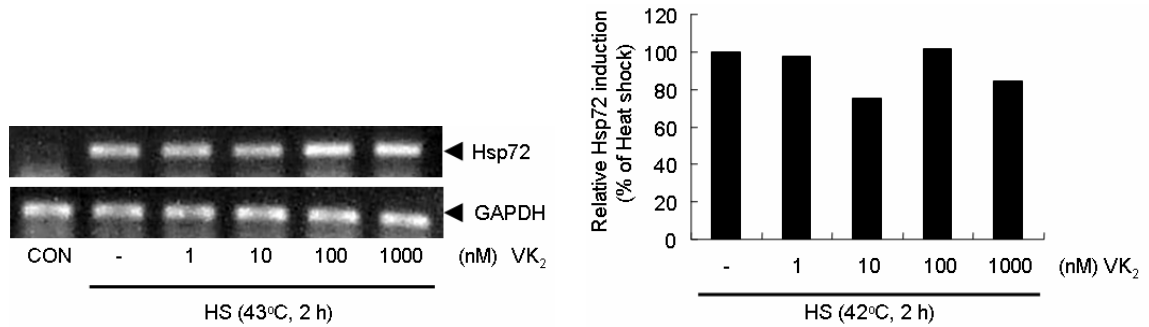
Fig.4 で, VK2 は熱ショックによって誘導される HSP ファミリー (Hsp90, Hsp72, Hsp40 及び Hsp27) の発現を抑制することが分かった. これらのタンパク質は, 熱ショック時にリン酸化され, 活性化される HSF1 という転写因子の働きにより誘導される. VK2 の発現抑制はこの HSF1 による転写を抑制することで起こっている可能性があるため, VK2 の HSF1 の活性化に対する影響を検討した. まず, サブコンフルエント状態にある A549 細胞を各濃度の VK2 を含む培養液で置換し, 37°C で 2 時間前処置した. 次に, 43°C, 2 時間の熱ショックを加え, 37°C で 1 時間培養した後, タンパク質を回収し, 抗 HSF1 抗体で Western blot 解析を行った. Fig.5A に示すように, 熱ショックによって HSF1 はリン酸化され, 10 kDa ほどシフトアップしたバンドが観察された. しかし, VK2 は 10 nM から 1000 nM 範囲での HSF1 の発現量およびリン酸化に影響を与えなかった. つまり, 熱ショックタンパク質の転写レベルには作用しないと考えられる. そこで, Hsp72 mRNA の発現への影響を検討し, VK2 が転写レベルには作用しないことを確認した. サブコンフルエント状態にある A549 細胞を各濃度の VK2 を含む培養液で置換し, 37°C で 2 時間前処置した. 次に, 43°C, 2 時間の熱ショックを加え, その後, 直ちに RNA を回収し, semi-quantitative RT-PCR を行った. Hsp72 および内部標準として GAPDH の発現を, それぞれに特異的なプライマーを用いて検出した. その結果, 43°C, 2 時間の熱ショックで, Hsp72 mRNA は顕著に誘導されが, VK2 は その mRNA の発現誘導には影響を与えなかった (Fig.5B). また, HeLa 細胞を用いて VK2 が 熱ショック後の Hsp72 mRNA 発現に影響を与えるかを検討した. サブコンフルエント状態にある HeLa 細胞を 100 nM の VK2 を含む培養液で置換し, 37°C で 2 時間前処置した. 次に, 42°C, 2 時間の熱ショックを加え (HS), 37°C に戻した. 0, 3, 5 時間後, それぞれ RNA を回収し, semi-quantitative RT-PCR を行った. その結果, A549 細胞と同様に HeLa 細胞においても VK2 は Hsp72 の mRNA の発現には影響を与えなかった (Fig.5C). 以上の結果より, VK2 による熱ショックタンパク質の発現抑制作用は, 遺伝子発現調節を抑制するのではなく, post-transcriptional なメカニズムで抑制していることが示された.



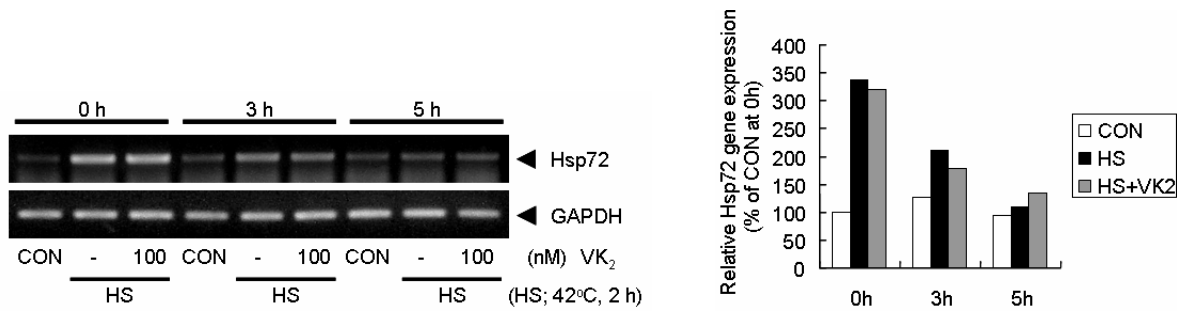
**(A) Western blot analysis**



**(B) Semi quantitative RT-PCR**



**(C) Semi quantitative RT-PCR**

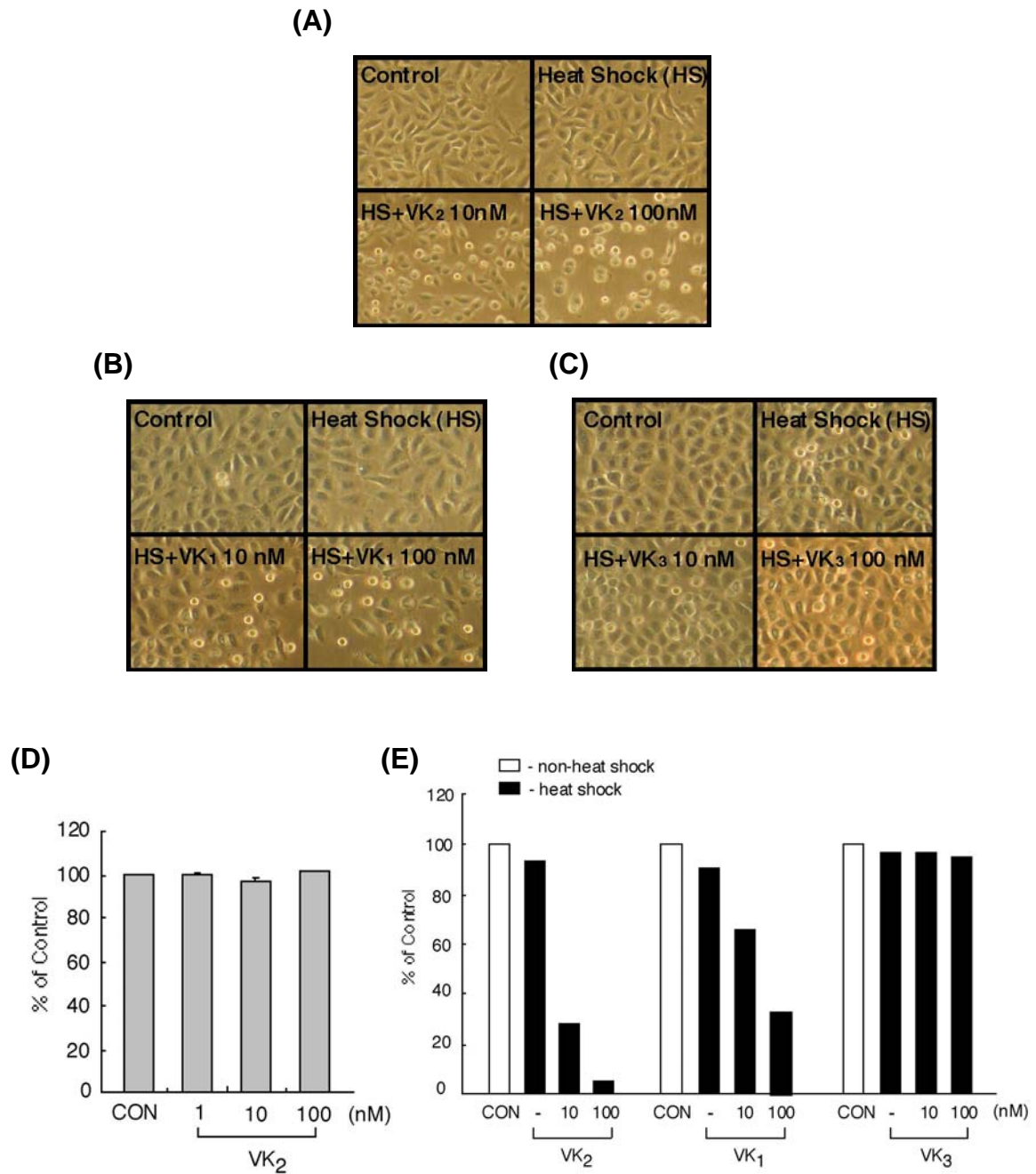


**Fig.5 VK<sub>2</sub> does not affect the induction and kinetics of Hsp72 mRNA.** (A) A549 cells were untreated or treated with VK<sub>2</sub> and heat shock, in a similar manner as above. Protein lysates were recovered with hot electrophoresis sample buffer and analyzed by Western blotting using anti-HSF1 antibody. (B) Total RNA were extracted from A549 cells treated for 2 h with the indicated concentrations of VK<sub>2</sub> and heat-shocked at 43°C for 2 h. One  $\mu$ g of total RNA was used as template for semi quantitative RT-PCR to detect Hsp72. GAPDH was used as an internal control. (C) HeLa cells were treated with VK<sub>2</sub> (100 nM) or control diluent for 2 h followed by heat shock at 42°C for 2 h. After heat shock, cells were incubated at 37°C for 0, 3, 5 h. Total RNA was extracted and subjected to semi quantitative RT-PCR to detect Hsp72 mRNA. GAPDH was used as an internal control.

### 第3節 ガン細胞の熱感受性に対する VK2 の作用

#### 第1項 温熱によるガン細胞の細胞死に対する VK2 の作用

これまでの結果より, VK2, VK1 に Hsp72 の発現を抑制した. 熱ショックによる熱ショックタンパク質の発現を抑制することは, ガンの温熱耐性獲得を抑制し, ガンの温熱感受性を亢進することが期待できる. そこで本項では, 熱ショックによる細胞死を VK2, VK1 が促進できるか否か検討した. まず, サブコンフルエント状態にある A549 細胞を各濃度の薬液を含む培養液で置換し, 37°C で 2 時間前処置した. 次に, 44°C の恒温槽中に 45 分浸漬して熱ショックを加え, 37°C で 4 時間 15 分培養した. その結果, Fig.6 に示すように, 44°C, 45 分の熱ショックにおいては, 外見上に判断できる細胞死は観察されなかった. しかし, 熱ショックと VK2 を併用すると, VK2 は 10 nM から 100 nM という低濃度で濃度依存的に熱ショックによる細胞死を促進した (Fig.6A, E). VK2 のみの処理ではほとんど影響はなかった. また, VK1 でも同様に 10 nM, 100 nM で濃度依存的な細胞死が見られた (Fig.6B, E). 一方, Hsp72 の発現抑制が見られなかった VK3 では, 熱ショックによる細胞死を促進できなかった (Fig.6C, E). これらの結果より, VK2, VK1 は *in vitro* で熱ショック誘導性の細胞死を促進することが明らかになった.



**Fig.6 VK<sub>2</sub> treatment sensitized A549 and HeLa cells to heat shock.** A549 cells, plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks, were allowed to grow to 70% confluent. Cells were treated with ethanol (Control), 10 or 100 nM (A) VK<sub>2</sub>, (B) VK<sub>1</sub> or (C) VK<sub>3</sub> for 2 hours. Heat shock was performed for 45 min at 44°C and then cells were re-incubated at 37°C. Phase-contrast micrography was carried out at 3 h 15min after heat shock. (D) The number of attached cells was counted and represented as % of control. (E) A549 cells were treated with ethanol or the indicated concentrations of VK<sub>2</sub> for two hours. The number of cells was counted and represented as % of control. VK<sub>2</sub>-treated cells without heat shock were viable.

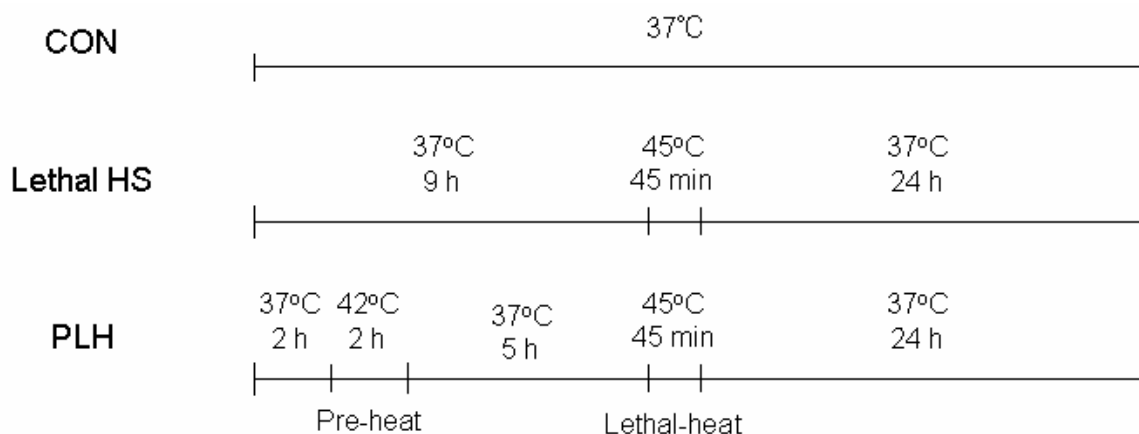
## 第2項 ガン細胞の温熱耐性獲得に対する作用

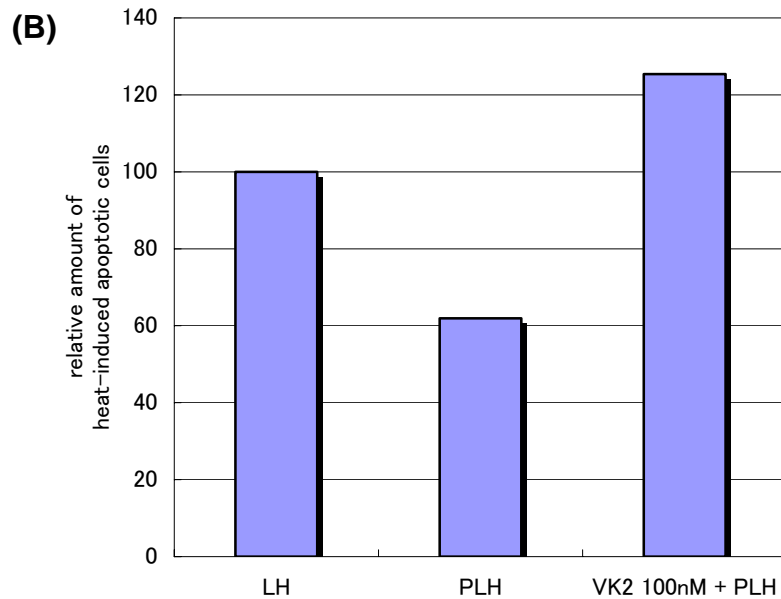
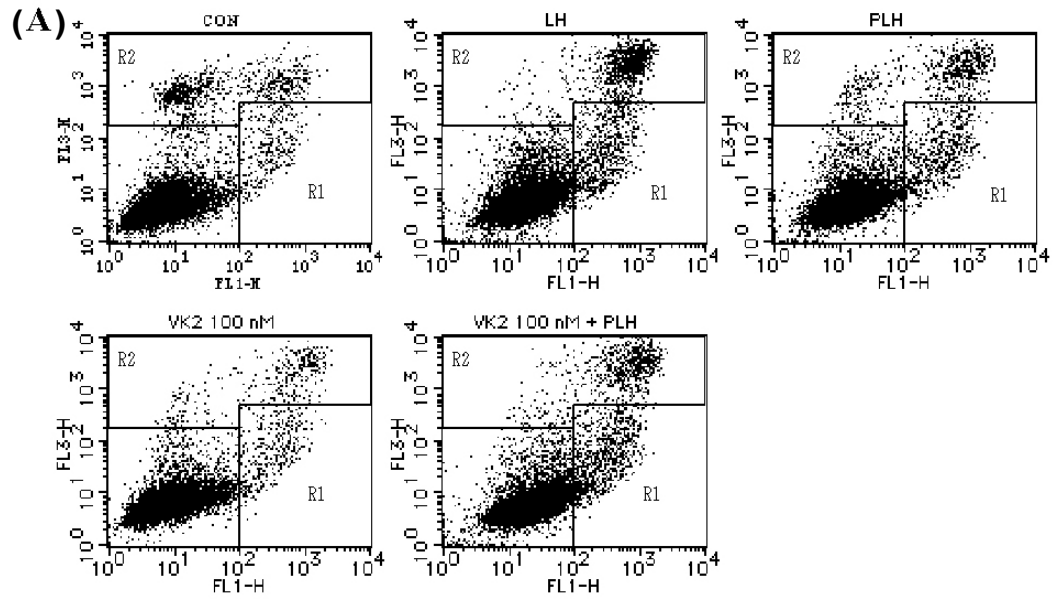
次に、前項で見られた熱ショックによる細胞死の VK2 による増強作用は、ガン細胞の温熱耐性獲得を抑制することによるか否かを検討した。細胞は熱ショックによりアポトーシスを誘導するため、温熱耐性抑制実験はアポトーシスを検出する propidium iodide (PI)/Annexin V の二重染色法を行い、Flow Cytometry にて解析を行った。

VK2 で前処理した HeLa 細胞に 42°C, 2 時間の軽い熱ショック (PH : pre-heat shock) を与え、5 時間後、45°C, 45 分の強い熱ショック (LH : lethal heat shock) を与えた (Table 5)。その後、FITC-Annexin V 及び PI で細胞を標識後、Flow Cytometry にて細胞死の解析を行った。その結果を Fig.7 示す。ここで、領域 1 (R1) にある細胞群 (FITC+, PI-) は、アポトーシスを起こしている細胞群を示す。

その結果、LH のみを処理した細胞と比べ、PH を前処理しておいた細胞 (PLH) では、PH により R1 の細胞数はある程度減少した。この減少が温熱耐性の程度を表す。ところが、これに VK2 を前処理しておく (VK2 100 nM + PLH)、PH による R1 の細胞数の減少はみられず、むしろ増加していた (Fig.7)。これらの結果より、VK2 はガン細胞による温熱耐性の獲得を抑制し、アポトーシスを促進することがわかった。また、VK2 処理のみで熱ショックを与えないとき、R1 の細胞数は、コントロール (CON) と変わらなかった。このことから、VK2 単独で処理しても、この濃度ではアポトーシスは誘導されないということがわかった。以上を小括すると、VK2 はそれ自身がアポトーシスを促進する作用は持たず、あくまで熱ショックによるアポトーシスを促進する役割を果たしているということが示唆された。

**Table 5 Time table of heat treatment.**



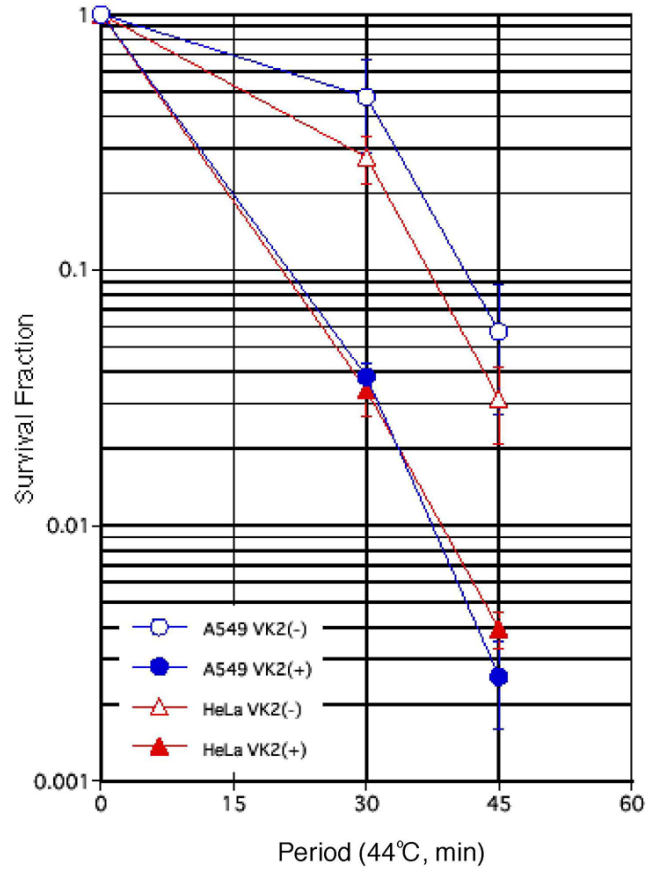


**Fig.7 VK<sub>2</sub> reduces thermotolerance of HeLa cells.** (A) HeLa cells were treated with VK<sub>2</sub> (100 nM) or control diluent for 2 h followed by heat shock at 42°C for 2 h. After heat shock, cells were incubated at 37°C for 5 h followed by heat shock at 45°C for 45 min. After 45°C heat-shock, cells were incubated at 37°C for 24 h. Cells were labeled with Annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. (B) The relative amounts of apoptotic cells were quantified by cell quest.

### 第3項 温熱処理によるガン細胞のコロニー形成抑制に対する作用

さらに、温熱処理による細胞増殖能の抑制に VK2 が影響を与えるかについて、コロニー形成試験法を用いて検討した。A549 細胞および HeLa 細胞を各濃度の VK2 を含む培養液で置換し、37°C で 2 時間前処置した。次に、44°C の恒温槽中に 45 分浸漬して熱ショックを加えた。その後すぐにトリプシン処理し、100 mm のプラスチック培養皿に再播種した。2 週間後、細胞をメタノールで固定し、2% ギムザ溶液で染色し、50 以上の細胞からなるコロニー数をカウントし、コントロールと比較することで増殖能の抑制を評価した。

その結果を Fig.8 に示す。A549 細胞, HeLa 細胞のどちらにおいても、44°C, 45 分の熱ショックにより、コントロール細胞と比べ、コロニー数は 1/10 以下に減少した。しかし、VK2 を前処理しておくことで、熱ショックによるコロニー数よりもさらに 1/10 以下に減少した。以上より、VK2 は、ガン細胞の熱ショックによる増殖能の抑制を増強することが明らかになった。

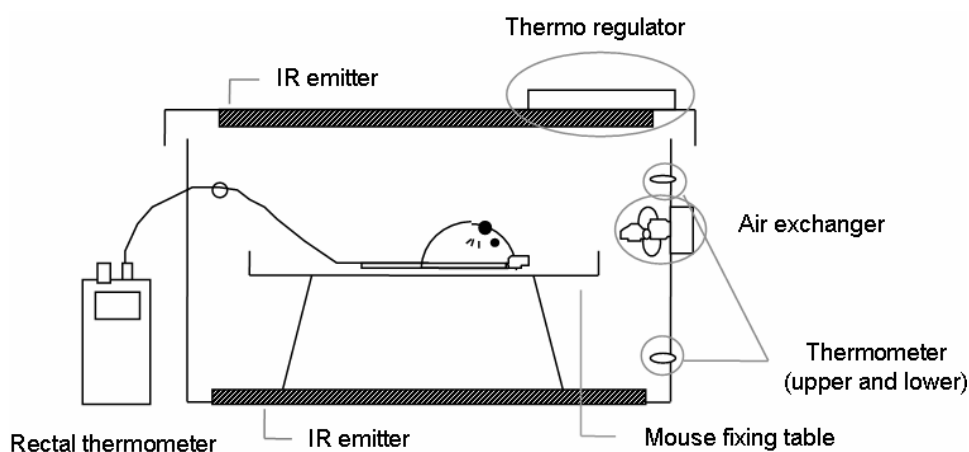
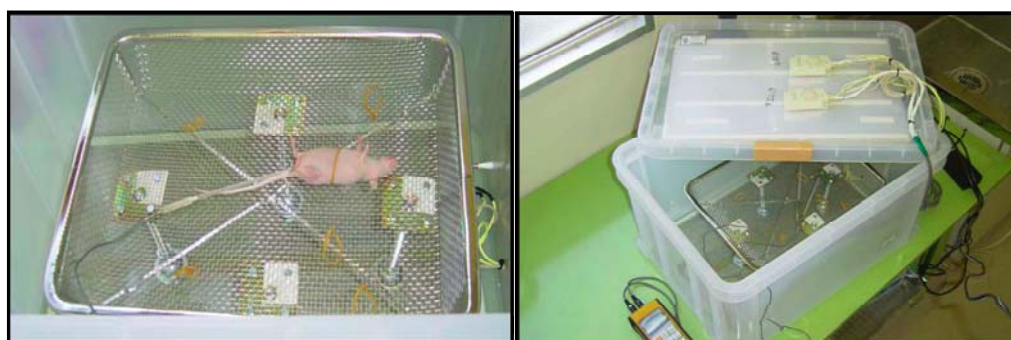


**Fig.8 VK<sub>2</sub> treatment sensitized A549 and HeLa cells to heat shock.** A549 and HeLa cells in 25-cm<sup>2</sup> flasks, pre-treated or untreated with 100 nM VK<sub>2</sub> (2 h) and heat shocked for the indicated time period, were trypsinized and replated onto 100-mm dishes. The surviving fractions were determined by colony forming assay at 37°C after 2 weeks. Colonies were fixed with methanol and stained with 2% Giemsa solution. Two replicate flasks were employed and three independent experiments were repeated for each survival point.

#### 第4節 *In vivo* における全身温熱に対する VK2 の作用

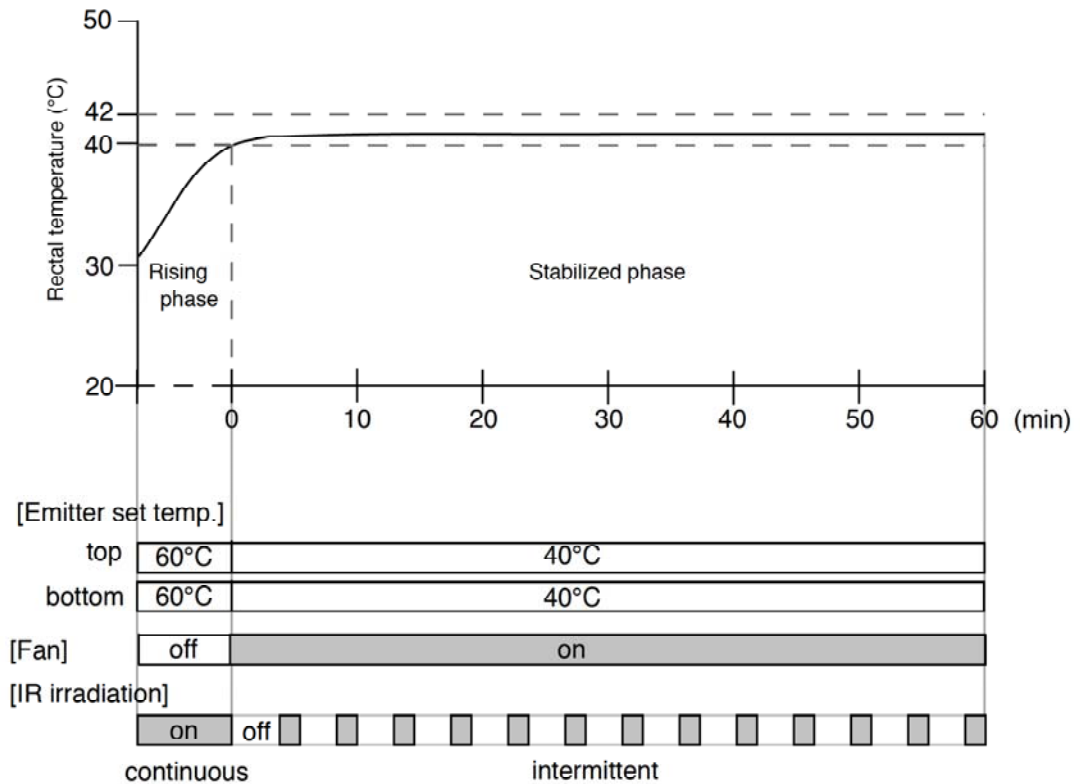
*In vitro* における検討の結果、VK2 が熱ショックによって誘導される Hsp72 の発現を抑制すること、また熱ショックにより誘導される細胞死を促進することが分かった。そこで本節からは、*in vivo* 実験における VK2 の作用について検討を行った。

本研究では、より臨床に近い条件で実験を行うために、ブラスト (株) の協力を得て、上下から遠赤外線を輻射することができるマウス全身温熱療法用遠赤外線照射装置を試作した (Fig.9)。遠赤外線ハイパーサーミアは、遠赤外線を全身に輻射し、皮下 0.5 mm 程度まで浸透したところで初めて熱として吸収され、その熱が血流により全身に運ばれることで、全身が加温されるという方法である。



**Fig.9 Mouse heat shock box using infrared rays (IR box)**





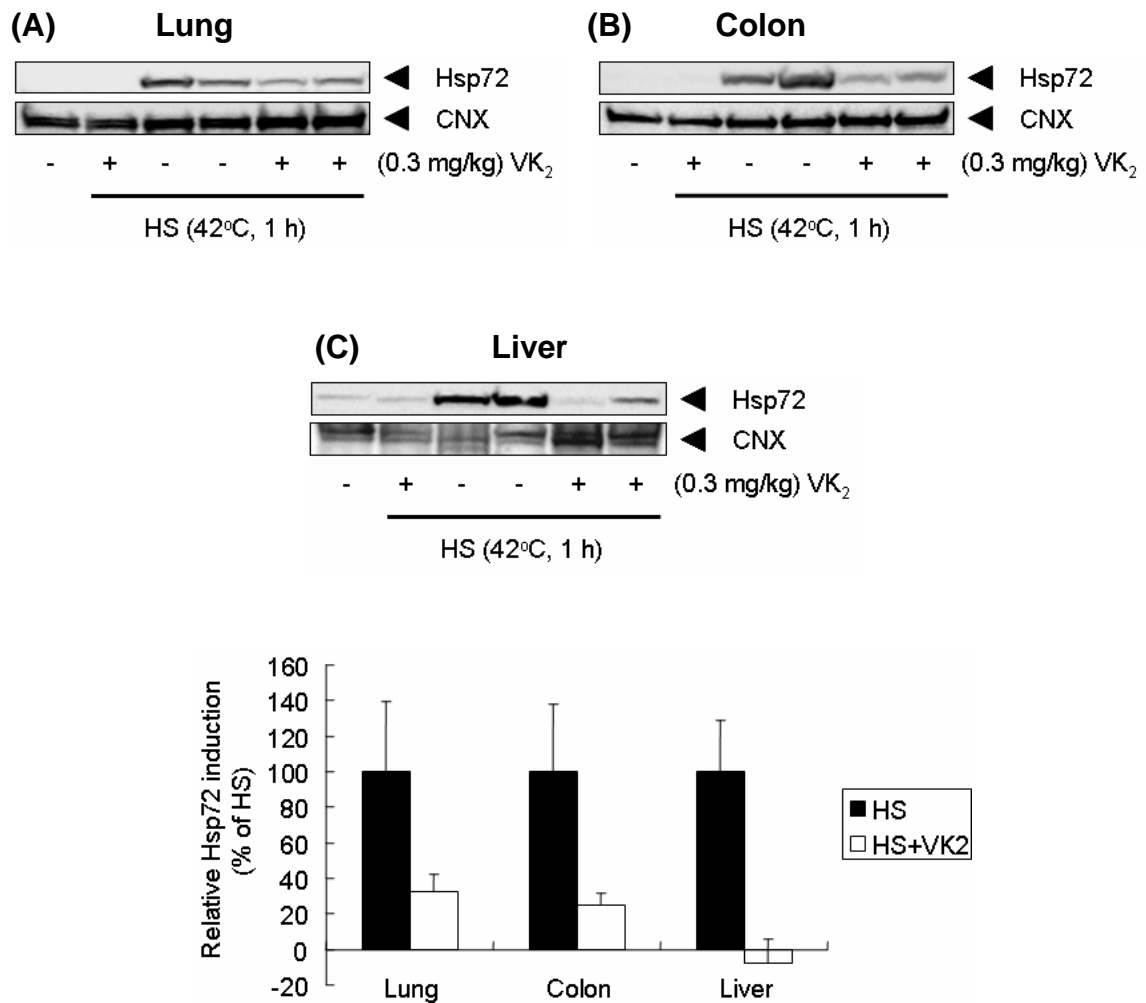
**Fig.10 IR box setting for hyperthermia**

この全身温熱療法用遠赤外線照射装置を用いた遠赤外線ハイパーサーミアによって、マウスの各組織内（肝臓、肺及び大腸）で Hsp72 の発現量の増加がおこるか否かについて検討した。マウスはペントバルビタール（65 ~ 80 mg/kg）で麻酔してボックス内の台に固定した。加温中の温度調節法を Fig.10 に示す。まず直腸温度が 40°C に達するまで連続的に IR を照射した。直腸温度が 40°C に達したら、断続的に IR を照射し、直腸温度を 40 ~ 42°C に 1 時間保つことで、温熱処理を行った。必要に応じて、加温中に追加麻酔（30 ~ 40 mg/kg）を行った。温熱処理後、5 時間後にマウスから各組織を摘出し、ホモジネートを調製した。Western blot 解析法により、これらの組織中の Hsp72 の発現量を調べた。その結果、遠赤外線温熱処理 1 時間で、肝臓、肺及び大腸の全ての組織内において、Hsp72 の発現量の増加が確認された (Fig.11)。このことは、各臓器に熱が十分にいきわたっている事を示唆している。すなわち、この IR-Box は、各組織における腫瘍の温熱治療に有効である事を示している。

## 第1項 全身温熱による正常組織での Hsp72 の発現誘導に対する VK2 の作用

IR-Box を用いた全身温熱処理により、各正常組織で Hsp72 が誘導されてくることがわかった。そこで、この正常組織における Hsp72 の誘導に VK2 が作用するか否かを検討した。ヌードマウスに臨床適用量 (0.3 mg/kg) の VK2 を腹腔内投与し、2 時間後に麻酔をして、IR-Box を用いて全身温熱処理を行った。5 時間後、マウスから各組織 (肝臓、肺及び大腸) を摘出し、ホモジネートを調製した。これを試料とし、組織中の Hsp72 の発現量は Western blot 解析法を用いて調べた。

その結果、肝臓、肺、大腸のいずれにおいても、Hsp72 は温熱処理により発現量が増加した (Fig.11)。一方、VK2 を前処理しておいたマウスでは、肝臓、肺、大腸のいずれにおいても全身温熱による Hsp72 の発現は抑制されていた。以上の結果より、VK2 は、温熱処理による正常組織での Hsp72 の発現誘導をも抑制してしまうことが示唆された。すなわち、正常細胞での温熱に対する感受性が上がってしまう可能性がある。そこで、第5節からは局所温熱を用いることで正常細胞への傷害をさけた。

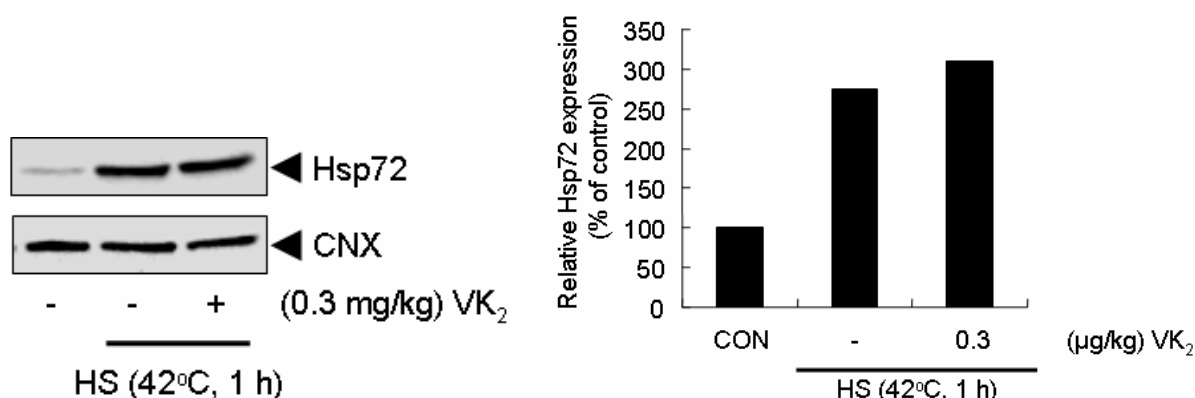


**Fig.11 VK<sub>2</sub> suppressed the induction of Hsp72 in mice tissues after whole body hyperthermia.** Mice were administered with vehicle or VK<sub>2</sub> (0.3 mg/kg) intraperitoneally. Two hours after administration, mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and subjected to heat-shock for 1 hour while monitoring rectal temperature to keep at 40 ~ 42°C. Mice tissues (A) lung, (B) colon and (C) liver were isolated from mice at 5 hours after heat shock. Tissue lysates (50 µg) were subjected to Western blot analysis using anti-Hsp72 and -calnexin (CNX) antibodies. CNX was used as the loading control.

## 第2項 全身温熱による腫瘍組織での Hsp72 発現誘導に対する VK<sub>2</sub> の作用

次に、皮下に形成させた腫瘍組織での、全身温熱による Hsp72 の誘導及び VK<sub>2</sub> による作用について検討した。担ガンヌードマウスに臨床適用量 (0.3 mg/kg) の VK<sub>2</sub> を腹腔内投与し、2 時間後にペントバルビタール (65 ~ 80 mg/kg) で麻酔をして、IR-Box を用いて全身温熱処理を行った。5 時間後、マウスから腫瘍組織を摘出し、ホモジネートを調製した。これを試料とし、腫瘍組織中の Hsp72 の発現量を Western blot 解析法を用いて調べた。

その結果、全身温熱処理により、腫瘍組織中の Hsp72 の発現量は増加した (Fig.12)。しかし、腫瘍組織での熱ショックによる Hsp72 の発現を VK<sub>2</sub> は抑制できなかった。以上の結果から、VK<sub>2</sub> は腫瘍組織の温熱耐性獲得を抑制できないことが示唆された。これは腹腔内に 0.3 mg/kg 投与するだけでは腫瘍中の VK<sub>2</sub> が十分量に達しなかったためだと考えられるため、第5節では投与量を増やして検討を行った。



**Fig.12 VK<sub>2</sub> didn't suppress the induction of Hsp72 in mice tumor tissue after whole body hyperthermia.** Mice were administered with vehicle or VK<sub>2</sub> (0.3 mg/kg) intraperitoneally. Two hours after administration, mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and subjected to heat-shock for 1 hour while monitoring rectal temperature to keep at 40 ~ 42°C. Tumor tissues were isolated from mice at 5 hours after heat shock. Tissue lysates (50 µg) were subjected to Western blot analysis using anti-Hsp72 and -calnexin (CNX) antibodies. CNX was used as the loading control.

## 第5節 *In vivo* における局所温熱に対する VK2 の作用

### 第1項 局所温熱処理による腫瘍での Hsp72 の発現誘導に対する作用

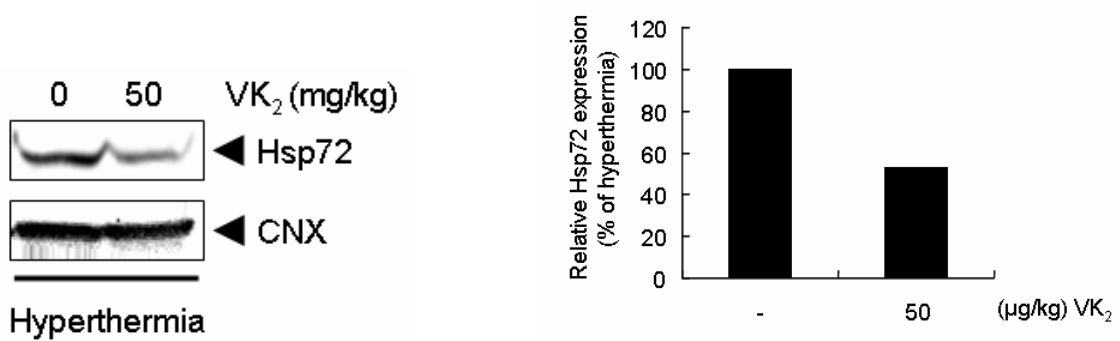
前節の結果から、VK2 は正常組織においても熱により誘導される熱ショックタンパク質を抑制することがわかった。これは、VK2 が正常組織の熱に対する防御機構をも破壊し、障害を与え、副作用が発現することが考えられる。また、腫瘍の Hsp72 を抑制できなかったことから、腫瘍への温熱増感効果は得られないことが示唆された。これは、腹腔内に 0.3 mg/kg 投与するだけでは腫瘍中の VK2 が十分量に達しなかったためだと考えられる。そこで、本項では腹腔内に 50 mg/kg の VK2 を投与し、HPLC を用いて投与後各時間における腫瘍中の VK2 の濃度を測定した。その結果、VK2 50 mg/kg 投与後 5 時間後において、腫瘍内の濃度が 100 nM に到達した (Fig.13A)。この濃度は、*in vitro* における検討により VK2 の Hsp72 抑制効果が得られた濃度である。そこで、この濃度の VK2 の、腫瘍への局所温熱処理による Hsp72 の発現誘導に対する作用を検討した。まず、50 mg/kg の VK2 または溶媒をマウスの腹腔内に投与し、30 分後マウスの脚部を 42°C の温浴に 5 分間浸漬して温熱療法を行った。5 時間後、マウスから腫瘍を摘出し、ホモジネートを調製した。これを試料とし、腫瘍中の Hsp72 の発現量を Western blot 解析法を用いて調べた。

その結果、溶媒を前処理し、局所温熱を施したマウスから摘出した腫瘍では、顕著な Hsp72 の発現誘導が見られた。一方、VK2 を前処理し、局所温熱を施したマウスから摘出した腫瘍では、Hsp72 の発現は抑制されていた (Fig.13B)。

(A)

Time after Administration (h)	Average of VK2 conc. (nM, means $\pm$ S.E.)
0	12.15 $\pm$ 12.15
2	61.79 $\pm$ 5.05
5	131.85 $\pm$ 50.79

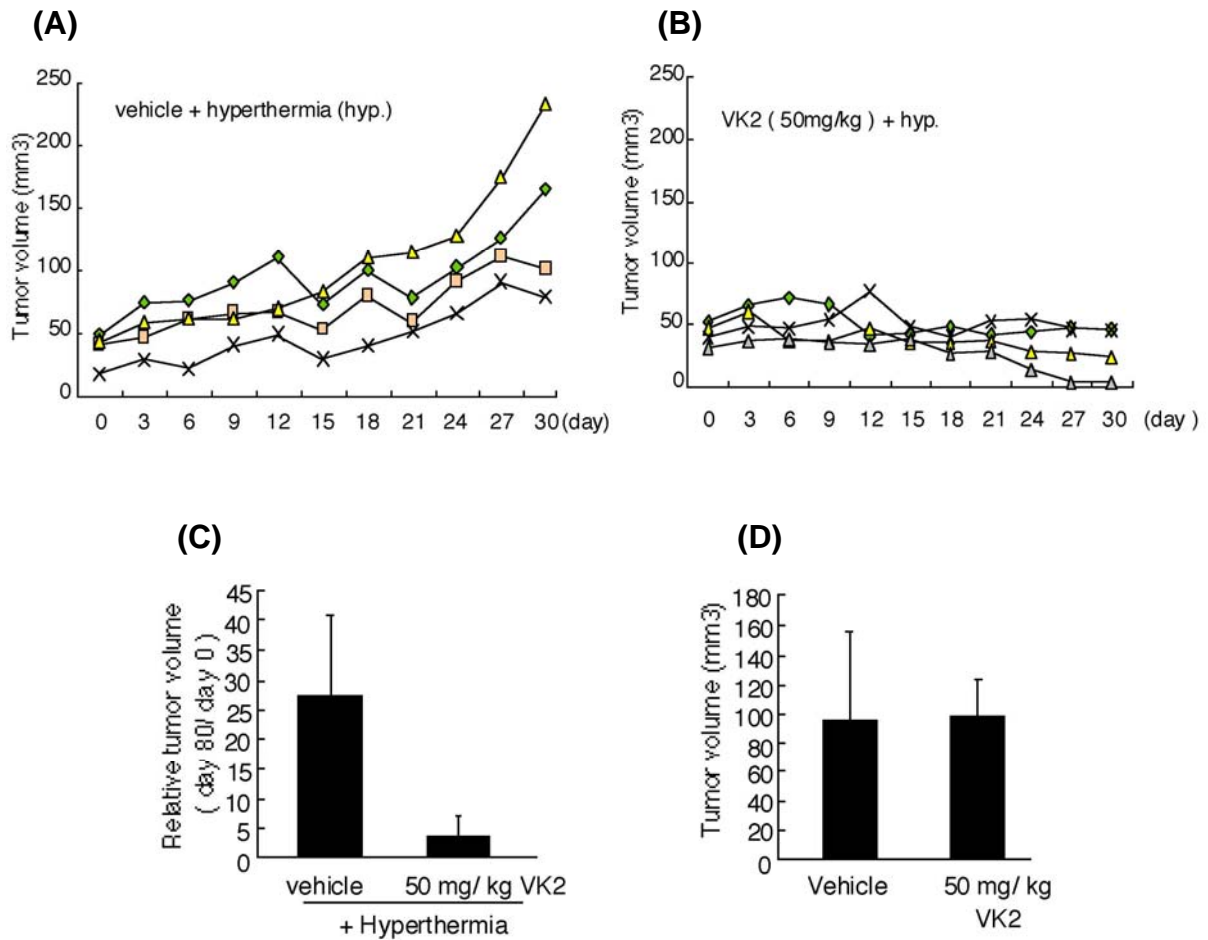
(B)



**Fig.13 VK<sub>2</sub> inhibits the induction of Hsp72 after local hyperthermia.** (A) Mice were administered with VK<sub>2</sub> (50 mg/kg) intraperitoneally and sacrificed at indicated time points. The concentrations of VK<sub>2</sub> were determined by HPLC analysis. Each value represents the average of triplicate samples. (B) Mice were administered with vehicle or VK<sub>2</sub> (50 mg/kg) intraperitoneally. Thirty minutes after administration, mice were subjected to heat-shock for 5 minutes at 42°C. Tumor tissues were isolated from mice at 5 hours after heat shock. Protein lysates from tumor tissues were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis using anti-Hsp72 and anti-calnexin antibodies.

## 第2項 局所温熱処理による *in vivo* 腫瘍抑制実験

Fig.13B より, 腫瘍における Hsp72 の発現抑制作用が得られた. そこで, 腫瘍抑制実験を行い, VK2 が腫瘍の増大を抑制できるか否かを検討した. まず, 50 mg/kg の VK2 または溶媒をマウスの腹腔内に投与し, 30 分後マウスの脚部を 42°C の温浴に 5 分間浸漬して温熱療法を行った. この治療を 1 週間に 1 度, 計 5 回行い, 3 日毎に腫瘍径を測定して腫瘍体積を算出し, 治療効果を判定した. その結果, 温熱療法単独に比べ, VK2 と温熱療法の併用では, 腫瘍の増殖を抑制し, (Fig.14B). さらに, 治療終了後 50 日目に腫瘍体積を測定し, 治療開始日との比較を行ったところ, VK2 と温熱療法による腫瘍抑制効果は治療終了後も持続していた (Fig.14C). また, VK2 は単独では抗腫瘍効果を示さなかった (Fig.14D). 以上の結果を小括すると, VK2 は *in vivo* で局所温熱療法との併用により顕著な腫瘍増殖抑制効果を持つことが明らかとなった. このことは, VK2 が臨床応用可能な Hsp72 阻害性温熱療法併用剤になりうることを示唆している.



**Fig.14 VK<sub>2</sub> and hyperthermia suppressed tumor growth *in vivo*.** A549 cells were implanted into a hind leg of mice and three weeks after, the mice were treated with local hyperthermia alone (A) or VK<sub>2</sub> and hyperthermia (B). Treatments were carried out once a week for 4 weeks. Tumor volume was measured once every 3 days. Four mice were used in each treatment group. (C) Quantitative representation of tumor volume in control and VK<sub>2</sub> treated mice subjected to hyperthermia. Tumor growth was still suppressed at 80 days after starting hyperthermia treatment. (D) Quantitative representation of tumor volume in control and VK<sub>2</sub> treated mice without hyperthermia. VK<sub>2</sub> alone did not suppress the tumor growth.



## 第6節 考察

ガンの温熱療法は、ガン組織が正常組織よりも熱に対する感受性が高いことを利用して、ガンを治療しようとする方法であり、副作用も少ない優れた治療法であるといえる。しかし、ガン細胞の温熱耐性獲得により、治療効果が制限されている。ガンの温熱耐性獲得には、熱ショックタンパク質、特に Hsp72 が大きな働きを担っていることが分かっている。つまり、Hsp72 の発現及び機能を抑制するような薬物はガンの温熱耐性獲得を抑制し、ガン温熱療法の治療効果を上昇させることが期待される。

Hsp72 を抑制する薬物として、quercetin, KNK437 などが報告されている。Quercetin は、主に柑橘系の植物に含まれるフラボノイドの一種である。主に抗酸化作用の面でガン抑制の研究がなされてきたが、1990年に京都大学の細川らによって Hsp72 の抑制作用が発見され<sup>57</sup>, *in vitro* および *in vivo* において現在にまでに様々な報告がなされてきた。KNK437 は 2000年に鐘淵化学工業の横田らにより報告された新規化合物である<sup>58</sup>。どちらの薬物も温熱療法併用薬として有効であろうとされているが、効果を示すのに高用量 (50~200  $\mu\text{M}$ ) を要するため、臨床への適用に問題点が残る。Hsp72 の阻害剤はその他にいくつか報告されているが、いずれも、高濃度が必要であり、その臨床応用は困難である。

本研究では、vitamin K2 (VK2) が、Hsp72 の発現を抑制することを明らかにした。VK2 は既に臨床で適用されており、安全性については多くの報告が蓄積しているため、臨床試験を phase II から開始できるという利点がある。そこで、VK2 がガン温熱療法の有効な増感薬となりうるか否かを検討した。

今回の検討の結果、A549 細胞及び HeLa 細胞にて、VK2 は濃度依存的に 10 ~ 100 nM という低濃度において Hsp72 の発現を抑制することが分かった (Fig.2A, B)。また、VK2 の類似薬物である、VK1 も同様に Hsp72 を抑制するが、VK3 抑制できないことが分かった (Fig.2C)。

VK は、それだけでも抗ガン効果を示すことが報告されているが、その作用機序についてはまだ明らかになっていない<sup>59</sup>。そのモデルの一つとして、VK は p53 非依

存的に p21 を誘導し, cyclin dependent kinases のリン酸化を抑制したり<sup>60</sup>, c-Myc や c-Fos などの転写因子を調節したりすることで, 細胞周期を停止する事が考えられている<sup>61,62</sup>. しかし, VK1, VK2 が抗ガン効果を示すためには, 臨床適用量よりかなり高濃度が必要となる<sup>63,64</sup>.

Table.3 を見ると分かるように, VK はナフトキノン骨格構造を基本骨格とし, VK1, VK2 はそれぞれ脂溶性の側鎖を持っており, 対して VK3 は側鎖を持っていない. また, VK2 の側鎖であるゲラニルゲラニル基には, Hsp72 を誘導する薬物として報告されている<sup>17</sup>. つまり, VK が Hsp72 発現抑制作用を示すためには, ナフトキノン骨格に脂溶性の側鎖が付加されてあることが重要であるように思われる. そこで我々は, VK2 より強力な Hsp72 抑制薬の開発を目的にナフトキノン骨格を有する化合物を HeLa 細胞を用いた Western blot 解析によりスクリーニングし, Hsp72 の発現に対する作用を調べた. VK2 のように低濃度で強い活性を示すものはなかったものの, 90 種類以上のナフトキノン誘導体中, 31 種類もの化合物に Hsp72 発現抑制活性が見られた. 構造 - 活性の相関は得られなかったが, やはりいくつかの化合物については, VK2, VK1 の様に脂溶性の高い直鎖状の側鎖を持っていた. 今後は, VK2 及び VK1 の側鎖を中心に, ナフトキノン骨格側を変化させてスクリーニングを行ってみたい.

VK2 は, Hsp72 のみならず, 他の熱誘導型の熱ショックタンパク質 (Hsp90, Hsp40 及び Hsp27) の発現も抑制し (Fig.4), 細胞が持つシャペロン活性を大きく抑制することが分かった (Fig.3). 特に, Hsp72, Hsp27 は, ガンの温熱耐性獲得に大きく寄与していることが報告されているため, ガン温熱増感薬としての有効性が高いことが示唆される.

このように VK2 は熱誘導型熱ショックタンパク質を抑制したことから, その作用機序として, 熱ショック転写因子 HSF1 による転写レベルからの抑制が考えられた. 熱によって誘導される熱ショックタンパク質は, その遺伝子のプロモーター領域に熱ショックエレメント (HSE) と呼ばれる配列を持っている. ストレス時には, リン酸化・三量体化された HSF1 がこの HSE に結合し, 転写活性化を引き起こす. そして, 種々の熱ショックタンパク質をコードした mRNA を誘導するのである. 熱ショ

ックタンパク質抑制薬として報告されている quercetin 及び KNK437 も, HSF1 の活性化を抑制し, mRNA の発現から抑制することが分かっている<sup>58,65-68</sup>.

しかし, VK2 は HSF1 の活性化 (リン酸化) には何ら影響を与えなかった (Fig.5A). また, Hsp72 mRNA の発現, 及び熱ショック後の経時的な発現量の変化にも VK2 は影響しなかった (Fig.5B, C).

これらの結果から, VK2 は post translational に影響していると考え, 現在は, 分解, 分泌という点について検討を行っている. 熱ショックタンパク質の分解についてはこれまであまり報告がないが, 最近, 植物由来の avicin という化合物が, Hsp72 のユビキチン化を引き起こし, Hsp72 を分解して抑制する, という報告があるため<sup>69</sup>, 本研究室においてもユビキチン化に注目し, 検討を行っている. また, いくつかの細胞質及び小胞体局在熱ショックタンパク質は, 膜近傍にも存在しており<sup>70</sup>, メカニズムは明らかになっていないが, そこから分泌されていることが報告されている<sup>71</sup>. 分泌された熱ショックタンパク質は, ガン免疫を活性化する働きがあるという報告もある<sup>72-75</sup>. VK2 が熱ショックタンパク質の細胞外分泌を促進することで細胞内の発現量を減少させているとしたら, ガンの温熱感受性亢進, ガン免疫の活性化と, ガン治療において非常に有効であるといえるであろう.

VK2 は, *in vitro* 及び *in vivo* において, ガンの温熱に対する感受性を増大させた (Fig.6~8, 14). しかしながら VK2 は, 全身温熱との併用により, 正常組織における熱ショックタンパク質の誘導についても抑制した (Fig.11). 熱ショックタンパク質は正常組織においても重要な働きを担っているため, 正常組織にダメージを与えてしまう恐れがある.

これらの結果から, 熱ショックタンパク質抑制薬は, 腫瘍組織の温熱感受性を亢進するが, 全身温熱との併用によっては, 正常組織にも影響を与えてしまう恐れがある. また, 全身温熱では腫瘍組織における熱ショックタンパク質の発現を誘導することにより, ガン免疫を増強させることが報告されているため, ガン温熱療法時には熱ショックタンパク質を抑制するべきではない, という意見もある. このことは, ガン温熱療法併用薬としては必ずしも熱ショックタンパク質の発現を抑制することが良いのではなく, 状況に応じて使い分けねばならないということを示している. 本研究では, VK2 は局所温熱との併用により温熱による腫瘍抑制効果を亢進したことから

(Fig.14), 局所温熱との併用であれば副作用もなく, 顕著な腫瘍抑制効果が得られることが示唆された.

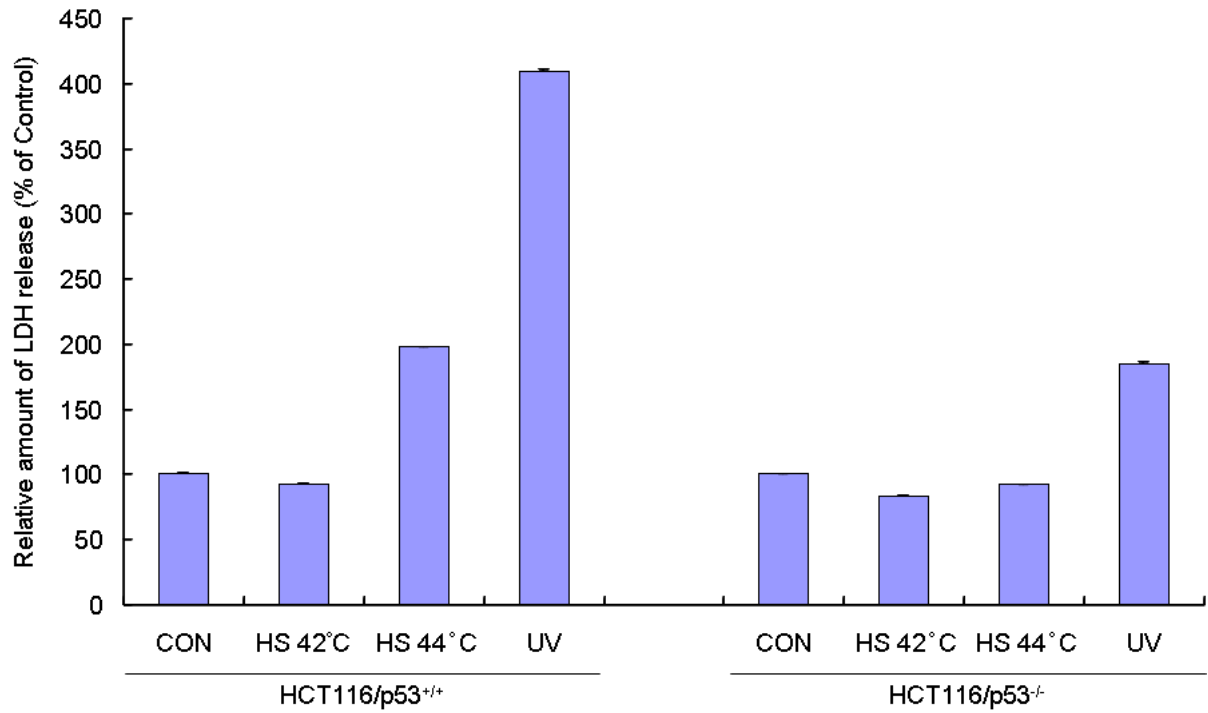
また, VK2 の臨床適用量 (0.3 mg/kg) では, 皮下に打ち込んだ腫瘍の Hsp72 を抑制することはできなかった (Fig.12). これは, VK2 の投与経路が今回腹腔内だったために, 血中への移行が悪く, さらに腫瘍が VK2 の体内分布が低い皮下にあったため, 腫瘍中の VK2 濃度が不十分であったと考えられる. 実際, 50 mg/kg という高用量を腹腔内に投与したところ, 腫瘍中での VK2 の濃度は 100 nM に到達し (Fig.13A), 温熱処理による Hsp72 の発現を抑制した (Fig.13B). つまり臨床で使用する時と同様に静脈内に投与した場合は各臓器における VK2 の分布がより高くなると考えられるため, 50 mg/kg より低用量での効果が期待できる. また, 他の臓器, 特に肝臓への VK2 の移行は皮膚に比べると, 投与一時間後で約 40 倍多く分布するため, 肝臓ガンなどへの適用がより効果的であると予測できる.

以上の結果から, VK2 及び VK1 は, 熱ショックタンパク質の発現を抑制することで, ガンの温熱耐性獲得を抑制し, 温熱感受性を増大させ, 癌温熱療法の治療効果を亢進することが分かった. 本研究は, ガンの温熱療法にとって大変有益なものとなるであろう.

### 第3章 p53 とガンの温熱感受性に関する研究

#### 第1節 温熱による細胞障害性に対する p53 の影響

ガンの温熱抵抗性を調節しているものとして、p53 status (p53 が変異または欠失しているか否か) が報告されている<sup>52</sup>。すなわち、p53 に変異があるガン細胞は、熱に対する抵抗性が高くなるという。そこで本研究では、まず、HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞で温熱感受性に差異があるかを調べた。サブコンフルエント状態にある HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞の培養液を取り除き、アッセイメディウムに置換し、42°C, 2 時間の熱ショック, 44°C, 45 分の熱ショックまたは UV 照射を 15 秒処理し、37°C で 24 時間培養した。その後、アッセイメディウムを回収し、細胞に 2% Triton X-100 を含むアッセイメディウムを添加した。アッセイメディウム中に分泌された LDH 及び細胞中の LDH を測定することにより、LDH の分泌率を求めた。UV 処理は、強く DNA を傷害し、DNA 傷害反応 (DDR) を引き起こすことでアポトーシスを誘導することが知られている。また、DDR により誘導されるアポトーシスは、p53 status により大きく影響を受けることが分かっているため、ポジティブコントロールとして用いた。その結果、42°C, 2 時間の熱ショックでは、p53 status に関わらず、コントロールと同程度であった。ところが、44°C, 45 分の熱ショックにより、HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞では、LDH の分泌率が約 2 倍になった。同じ条件では、HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞の LDH 分泌率には影響がなかった。これらの結果から、過去の報告の通り、p53 を欠失したガン細胞は、野生型 p53 を持つガン細胞よりも熱抵抗性が高いことが分かった。



**Fig.15 HCT116/p53<sup>+/+</sup> cells were more sensitive to heat shock than HCT116/p53<sup>-/-</sup> cells.**

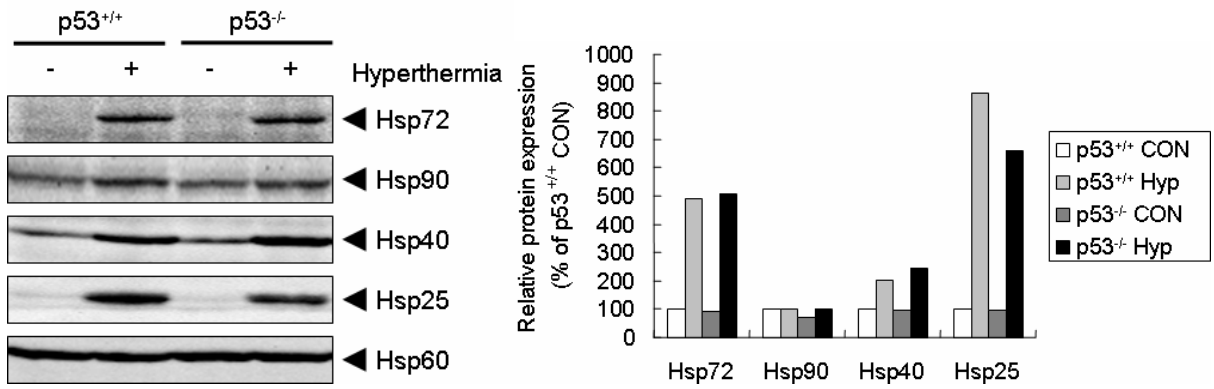
HCT116 cells, plated on 35 mm dishes, were allowed to grow to 70% confluent. Heat shock was performed for 2 h at 42 °C, or for 45 min at 44°C. Cells were re-incubated at 37°C. LDH release assay was carried out at 24 h after heat shock.

## 第2節 温熱処理による熱ショックタンパク質の誘導に対する p53 の影響

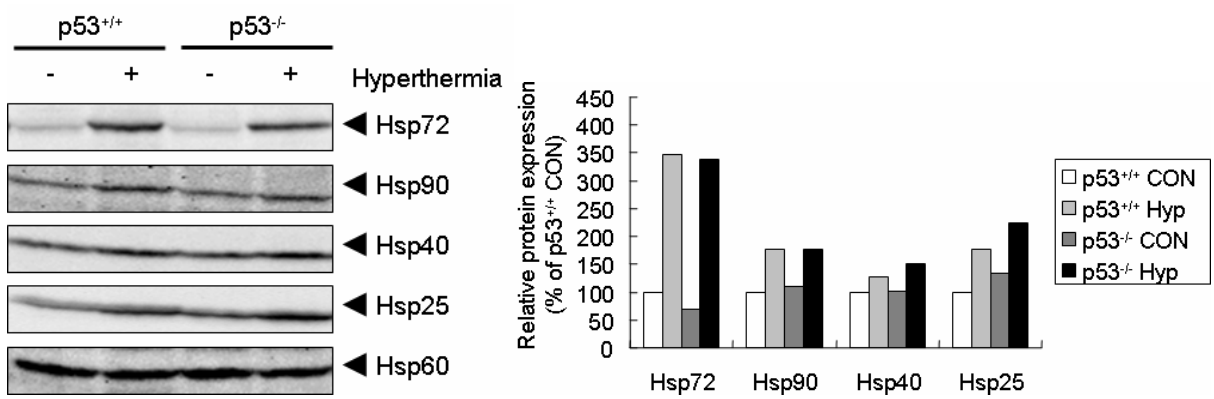
### 第1項 熱ショックタンパク質の量的な発現に対する影響

Fig.15 より, p53 の欠失により, 温熱感受性に差があることが分かった. これは p53 の欠失により熱ショックタンパク質の誘導に差が生じている可能性が考えられる. そこで, p53 status により熱ショックタンパク質の発現に差が生じるか否かを, p53 ノックアウトマウスを用いて検討した. 野生型及び p53 ノックアウトマウスを麻酔し, IR-Box を用いて 40~42°C で 1 時間温熱処理を行い, 5 時間後にマウスから各臓器を摘出した. その後, ホモジネートを調製し, Western blot 解析法により, これらの組織中の Hsp72, Hsp90, Hsp40, Hsp25, 及び Hsp60 の発現量をそれぞれに特異的な抗体を用いて調べた. 過去の報告に沿って, Hsp72, Hsp25 に注目してみると, 一部の組織では p53 ノックアウトマウスにおける Hsp25 の発現量が高いものもあったが(Fig.16, Lung, Hsp25), 有意な差は見られなかった. また, Hsp72 に関しても, ほとんど差は見られず, むしろ温熱感受性の低い p53 ノックアウトマウスの方が発現量は低かった (Fig.16, Hsp72). Hsp90, Hsp40 に関しても, 臓器によって発現量が異なり, p53 の有無による温熱感受性の違いを説明するに十分な発現量の違いは観察されなかった.

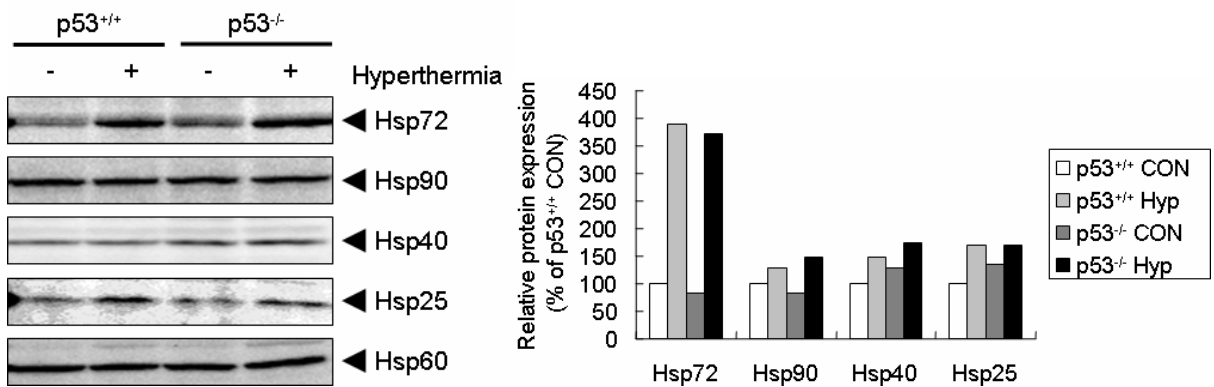
## Liver



## Lung

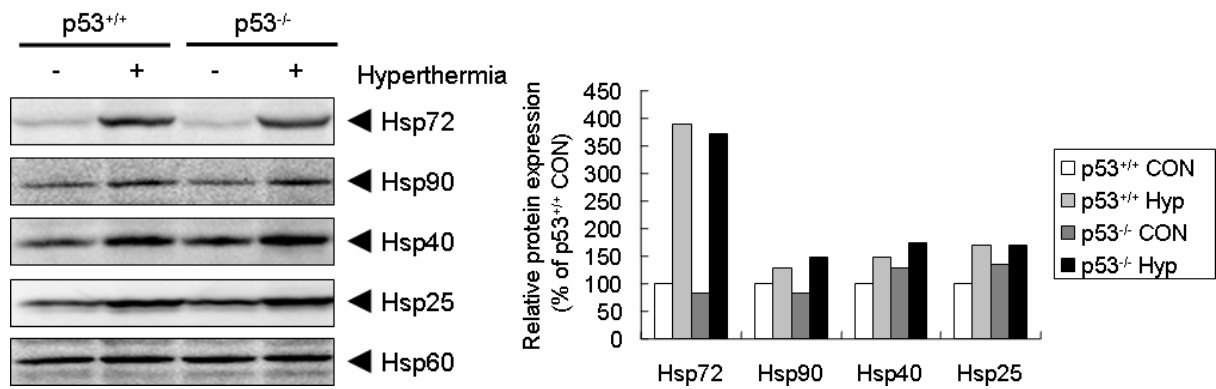


## Heart

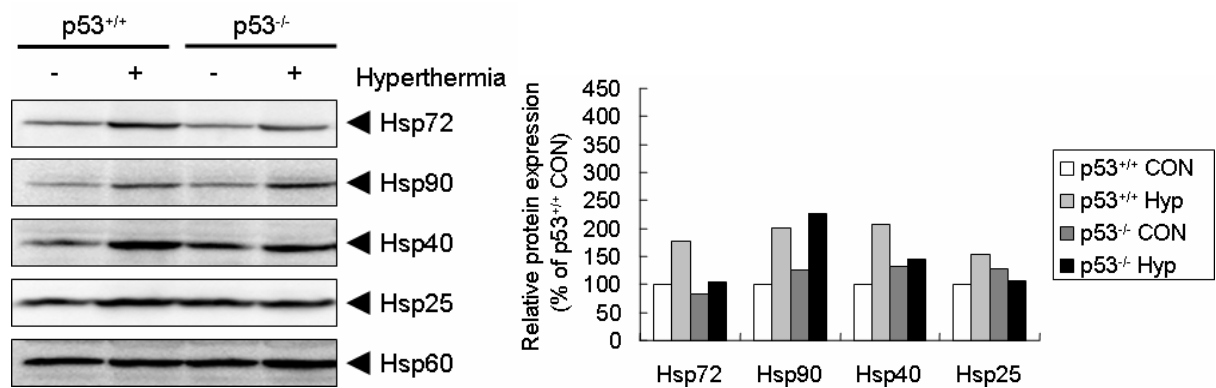




## Colon



## Brain

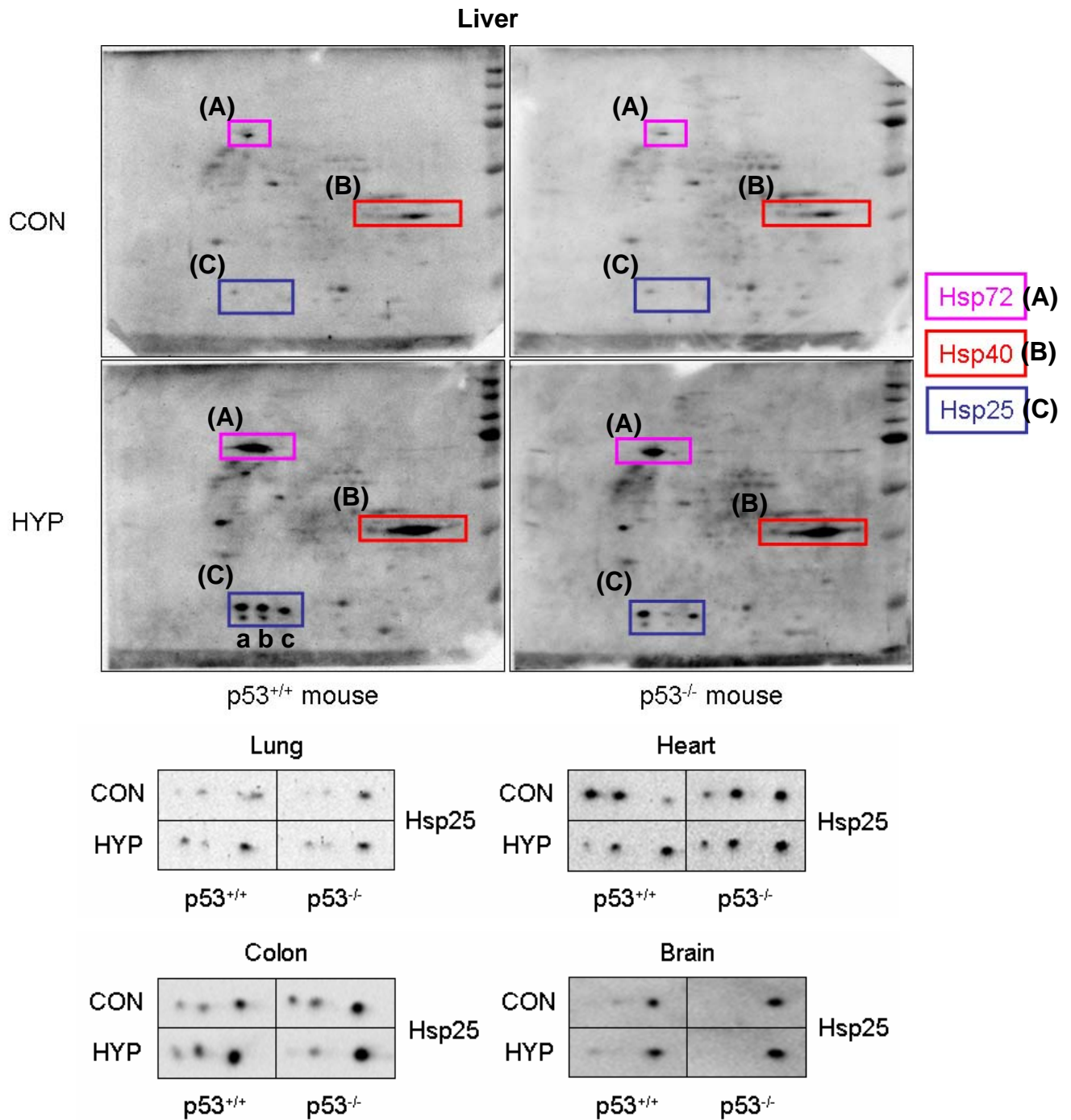


**Fig.16 Comparison of the expression level of heat shock proteins in p53<sup>+/+</sup> and p53<sup>-/-</sup> mice tissues.** Mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and heat-shocked using IR-Box for 1 hour monitoring rectal temperature to keep it at 40 ~ 42°C. Mice tissues were isolated from mice at 5 hours after heat shock. Tissue lysates (50 µg) were subjected to Western blot analysis with anti-Hsp72, -Hsp90, -Hsp40, -Hsp25 and -Hsp60 antibodies. Anti-Hsp60 antibody was used as the loading control.

## 第2項 熱ショックタンパク質の質的な発現に対する影響

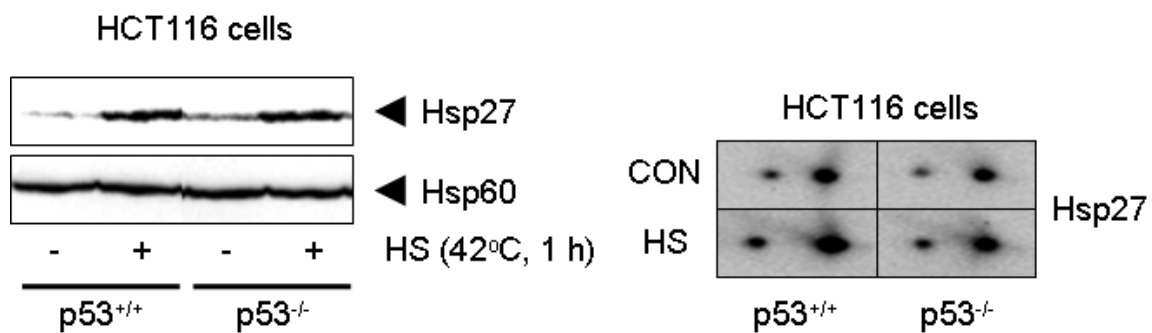
いくつかの熱ショックタンパク質では、リン酸化などの翻訳後修飾を受けることが分かっている。また、その修飾はタンパク質の活性に影響するといわれている。そこで、Fig.16 で得られたマウスの肝臓のホモジネートを、二次元電気泳動法を用いて展開し、Western blot 解析法を用いて熱ショックにより誘導される熱ショックタンパク質の質的な変化を検討した。その結果、熱ショック前では p53 の有無に関わらず、熱ショックタンパク質の発現パターンにほとんど差異は見られなかった (Fig.17)。熱ショックにより、どちらのマウスの肝臓とも熱ショックタンパク質を誘導したが、野生型 p53 を持つマウスの肝臓サンプルと p53 ノックアウトマウスの肝臓サンプルで、Hsp72 (Fig.17A)、Hsp40 (Fig.17B) の発現パターンに差は見られなかった。しかし、Hsp25 (Fig.17C) の発現パターンに差異が生じた。スポット a, c については、p53 の有無に関係なく、熱ショックにより発現が上昇したが、スポット b は、野生型 p53 を持つマウスの肝臓では強く発現したものの、p53 ノックアウトマウスの肝臓では、スポット b の発現は顕著に抑制された。Hsp25 はリン酸化サイトが三つあり、熱ショックによりリン酸化が行われることが分かっているため、これはリン酸化に差異が生じた結果であろうと推測できる。

他の臓器についても、肝臓と同様に二次元電気泳動法を用いて展開し、Western blot 解析法により、p53 の有無による Hsp25 の質的な変化に対する影響を調べた。心臓のサンプルにおいては、熱ショック前に発現パターンに差異があったが、熱ショック時の Hsp25 の発現パターンに差異は見られなかった。その他のサンプルに関しては、p53 の有無及び臓器の種類に関わらず、Hsp25 の発現パターンに差異は見られなかった。以上の結果から、p53 の有無による温熱抵抗性の差異に、熱ショックタンパク質は関与していないことが示唆された。



**Fig.17 Comparison of the Hsp25 expression patterns in p53<sup>+/+</sup> and p53<sup>-/-</sup> mice tissues separated by two-dimensional electrophoresis.** Mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) and heat-shocked using IR-Box for 1 hour monitoring rectal temperature to keep it at 40 ~ 42°C. Lysates were isolated from mice at 5 hours after heat shock. Western blot analysis of lysates (50 µg) separated by two-dimensional electrophoresis were performed with anti-Hsp70, -Hsp40, and -Hsp25 antibodies.

また、HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞における Hsp27 の発現量及び発現パターンも同様に調べた。サブコンフルエント状態にある HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞に、42°C、1 時間の熱ショックを与え、5 時間後に細胞溶解液を用いてタンパク質を回収した。SDS-PAGE 及び二次元電気泳動法によってタンパク質を分離し、Western blot 解析法により Hsp27 の発現を調べた。その結果、どちらの細胞においても熱ショックにより Hsp27 が誘導されてきたが、その発現量及び発現パターンに差異は見られなかった (Fig.18)。なお、データには示していないが、Hsp72 の発現量にも差異は見られなかった。これらの結果から、p53 の有無による温熱抵抗性の差異に、熱ショックタンパク質の発現は関与していないことが示唆された。



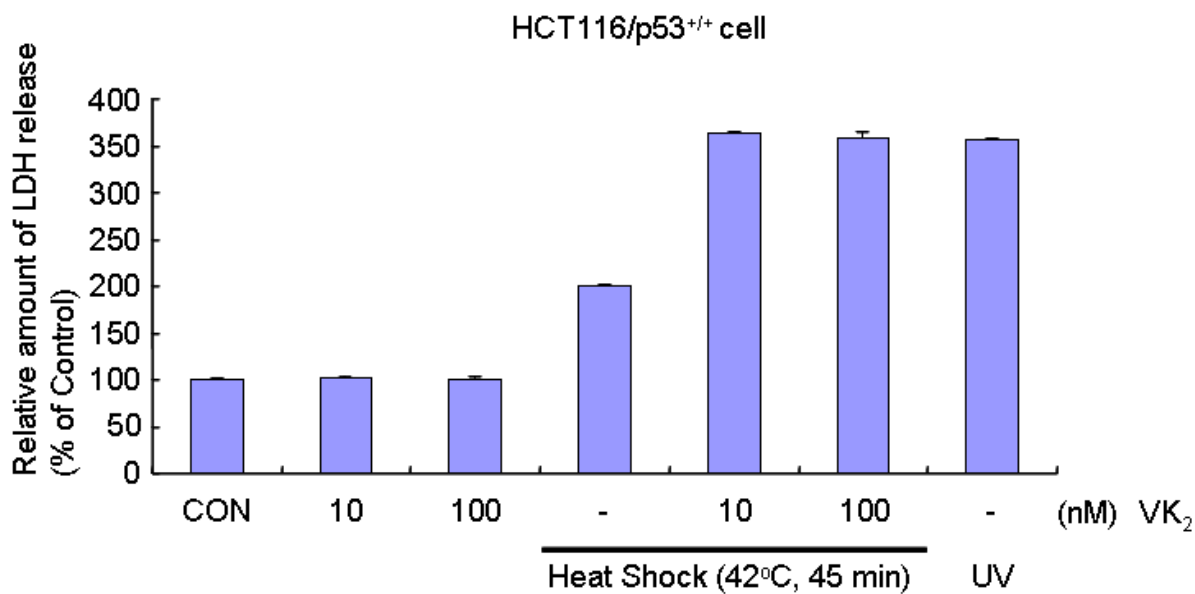
**Fig.18** The expression of Hsp27 in HCT116/p53<sup>+/+</sup> cells and HCT116/p53<sup>-/-</sup> cells. HCT116 cells were heat-shocked for 1 hour at 42°C. Cell lysates were recovered at 5 hours after heat shock. Western blot analysis of lysates (10 µg) separated by SDS-PAGE were performed with anti-Hsp27 and -Hsp60 antibodies. Anti-Hsp60 antibody was used as the loading control. The lysates were also separated by two-dimensional electrophoresis and subjected to Western blot analysis with anti-Hsp27 antibody.

### 第3節 VK2 の温熱感受性亢進作用に対する p53 status の影響

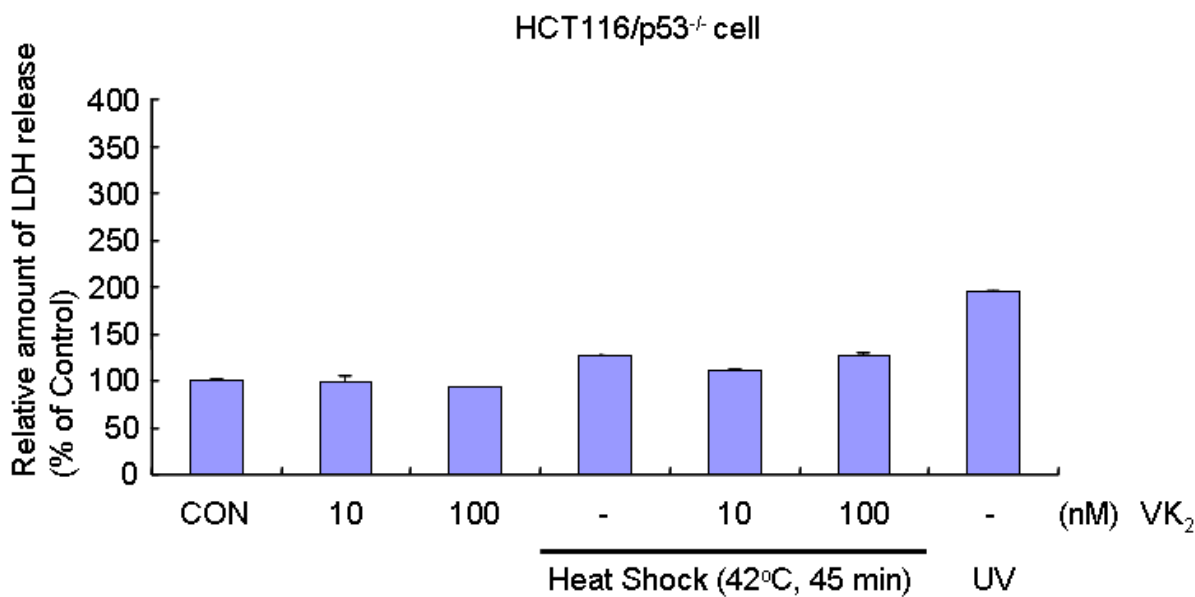
第2章で示したように、vitamin K<sub>2</sub> (VK2) はマウス正常組織、ガン組織、A549 細胞及び HeLa 細胞などの多くの組織や細胞において、温熱誘導性の Hsp72 の発現を抑制した。しかしながら、これらの細胞や組織は野生型の p53 を発現している。そこで本節では、HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞または HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞で、VK2 の Hsp72 抑制効果が影響を受けるか否かを検討した。サブコンフルエント状態にある HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞の培養液を各濃度の薬液を含むアッセイメディウムで置換し、44°C、45 分の熱ショックを与え、37°C で 24 時間培養した。その後、アッセイメディウムを回収し、LDH release assay により、細胞傷害性を調べた。

その結果、Fig.15 と同様に、熱ショックにより HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞の LDH 分泌率は約 2 倍に上がった (Fig.19A)。さらに、VK2 を前処理しておく、10 nM、100 nM において未処理細胞の約 4 倍まで LDH 分泌率が上昇した。これは、UV 処理とほぼ同じ LDH 分泌率であった。一方、HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞では、熱ショック及び熱ショックと VK2 の併用においても、ほとんど LDH の分泌率は影響を受けなかった (Fig.19B)。また、VK2 のみ処理した細胞は、p53 の有無に関わらず、未処理細胞とほぼ同程度であった。以上の結果から、VK2 は、野生型の p53 を持つ細胞で、熱ショックによる細胞傷害性を強く増強することが明らかになった。

(A)



(B)



**Fig.19 The effect of VK<sub>2</sub> on the difference of thermosensitivity depends on p53 status.**

HCT116 cells, plated on 35 mm dishes, were allowed to grow to 70% confluent. Cells were treated with ethanol (CON), 10 or 100 nM of VK<sub>2</sub> for 2 hours. Heat shock was performed for 45 min at 44°C. Cells were re-incubated at 37°C. LDH release assay was carried out at 24 h after heat shock.

#### 第4節 考察

熱ショックタンパク質の他にガンの温熱感受性に関わる重要な分子は、p53 であるが、p53 に変異がある、または欠失しているガンは、野生型 p53 をもつガンよりも熱に対する抵抗性が高いという<sup>52</sup>。その機序として、野生型 p53 が細胞内で Hsp72 の発現を抑制しているからであると考えられてきた<sup>53,54</sup>。しかしながら、p53 status (p53 が変異または欠失しているか否か) によってほとんど Hsp72 の発現に影響がないという報告もあり<sup>55</sup>、未だその詳細は明確でない。そこで本研究では、p53 status による温熱抵抗性の差異に関する機序解明を行うことで、熱ショックタンパク質抑制薬とは違う観点から温熱増感薬を開発することを目的とし、基礎的な検討を行った。

まず、HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いて、p53 の有無により温熱感受性に差異が生じることを確認した。過去の報告どおり、HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞は HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞に比べ、温熱抵抗性があることが示された (Fig.15)。そこで、*in vivo* 実験の条件検討も兼ね、p53 ノックアウトマウスを用いて全身温熱による熱ショックタンパク質の誘導に対する p53 の影響を調べた。その結果、正常組織における熱ショックタンパク質の量的な発現にはほとんど影響がないことが分かった (Fig.16)。

いくつかの熱ショックタンパク質は、熱ショックなどのシグナルにより、リン酸化など、翻訳後修飾されることが報告されている<sup>76-79</sup>。そこで、p53 の有無により、熱ショックタンパク質のリン酸化などの質的な修飾に影響があるか否かを、二次元電気泳動法を用いて検討した。同じ遺伝子から産生されたタンパク質であっても、翻訳後に受ける修飾によって活性や局在などに差異が生じることが報告されているが、修飾による分子量への影響が小さかった場合、SDS-PAGE ではその修飾の差異を検出できない恐れがある。二次元電気泳動法は、分子量と pH というタンパク質の二つの性質を利用して分離する方法であるため、SDS-PAGE では見られなかった差異を検出できる可能性がある。実際、本研究においても二次元電気泳動法により、肝臓における Hsp25 の発現パターンが異なることを見出した (Fig.17C)。Hsp25 は温熱感受性に関与しているという報告も多く、またリン酸化によってシャペロン活性やアポトーシス

抑制活性が影響を受けているという報告もあるために、この発現パターンの差異は p53 status による温熱感受性の差異につながるかと思われた。しかし、他の臓器における Hsp25 の発現パターンや、HCT116 細胞における Hsp27 の発現パターンには影響がなかったため、一般的な p53 status による温熱感受性の差異に対する影響は小さいと思われる。

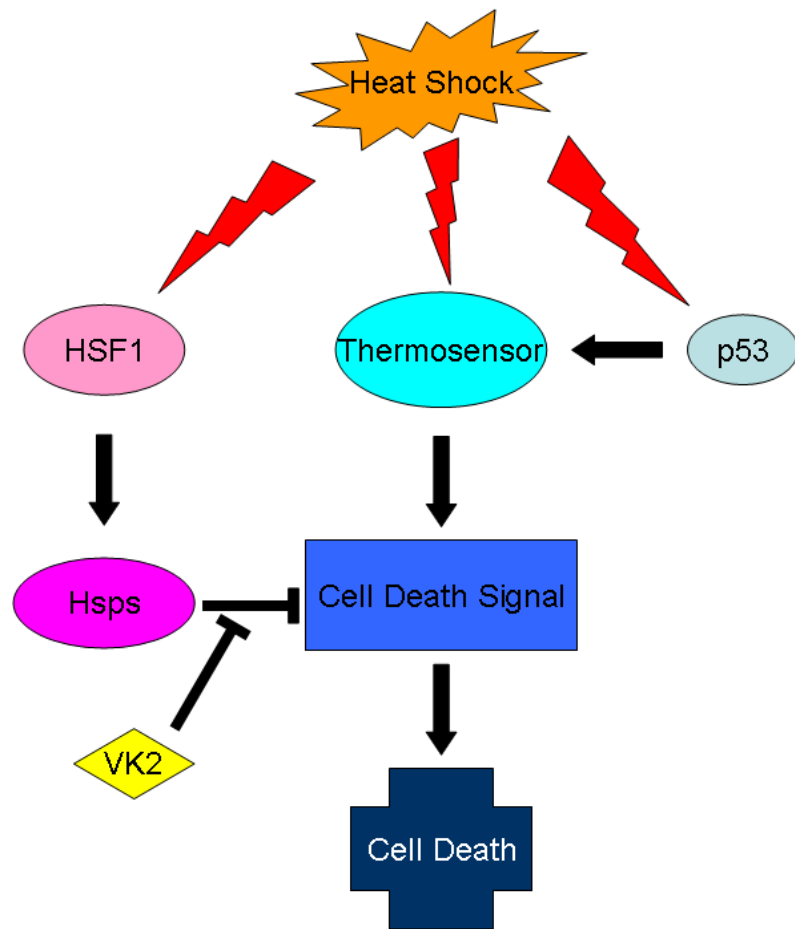
最後に、熱ショックタンパク質の発現を抑制する vitamin K<sub>2</sub> (VK2) を用いて、p53 の有無により、VK2 の熱ショックタンパク質抑制による温熱感受性亢進作用が影響を受けるか否か検討した。その結果、HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞では顕著に VK2 が熱ショックによる細胞障害を亢進したが(Fig.19A)、HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞では、VK2 はほとんど影響を与えなかった (Fig.19B)。これは、p53 の有無による温熱感受性の差異が、やはり熱ショックタンパク質によるものではないこと示唆するものと考えられる。また、本研究の結果より、VK2 をはじめとする熱ショックタンパク質抑制薬を、ガン温熱療法の併用薬として用いる時は、あらかじめ p53 の status を調べ、野生型 p53 を持つガンに対して治療を行うと、より顕著な治療効果が得られるであろう。

以上、本研究の結果を元に、温熱によって引き起こされる細胞死誘導メカニズムに関して以下のような仮説をたてた (Fig.20)。まず熱ショックは、HSF1 の活性化、p53 の活性化及び p53 依存的な熱センサー因子の活性化を引き起こす。熱センサー因子は細胞死へのシグナルを活性化させ、細胞死を誘導するが、HSF1 の活性化により誘導された熱ショックタンパク質によりシグナルは様々なステップで抑制される。また VK2 は、この熱ショックタンパク質による抑制を阻害する。したがって、p53 が変異または欠失した細胞において、VK2 によって熱ショックタンパク質を抑制しても、細胞死シグナル自体が誘導されていないために細胞死誘導効果が弱い、と考えられる。

このモデルを証明するためには、*in vitro*、及び *in vivo* におけるさらなる検討が必要であるが、今回の結果は、熱ショックタンパク質以外の因子にガン細胞の温熱感受性が影響されることを示唆しており、今後、二次元電気泳動法やタンパク質の質量分析法などを用いた網羅的な解析を行うことで、新たな熱感受性因子を同定し、熱ショ



ックタンパク質とは違う観点からのガン温熱増感薬の開発につながっていくと考えられる。



**Fig.20 One of the speculative model of the acquisition mechanism of heat resistance on cancer cells.** Heat shock activates HSF1, p53 and unknown thermosensor which is induced by wild type p53. Thermosensor activates some signal transduction to induce cell death, but Hsps induced by HSF1 suppress this signaling on the various steps. VK<sub>2</sub> inhibits the suppression to inhibit the expression of Hsps. The mutations of p53 fail to induce thermosensor, so the signaling of cell death does not work.

## 第4章 総括

ガンの治療法には様々なものがあるが、ガンの種類や進行度をもとに外科療法、放射線療法、化学療法のうちのいずれかひとつ、またはそれらを組み合わせて行うのが一般的である。ガン温熱療法はガン治療法の一つであり、ガン組織が正常組織より熱に弱いことを利用し、加温によってガン細胞を選択的に殺す方法である。放射線や抗ガン剤などとの併用により相乗的な効果が得られることや、放射線療法や化学療法に比べて副作用が少ないことなど多くの利点がある。しかし、ガン細胞が加温により一時的に温熱耐性になるために、加温中および次の加温による殺細胞効果が減少する、という問題がある。この現象により温熱治療は制約を受け、現在温熱治療の実施は、通常週 1~2 回に限定されている。このガン温熱耐性獲得のメカニズムには、熱ショックタンパク質の発現誘導が大きな働きを担っていることが分かっている。

そこで本研究では、Hsp72 の発現を調節する薬物をスクリーニングし、vitamin K<sub>2</sub> (VK2) が Hsp72 の発現を抑制することを見出した。VK2 がガンの温熱耐性獲得を抑制し、ガンの温熱に対する感受性を増大できるか否かについて検討を行った (第3章)。まず HeLa 細胞及び A549 細胞において、VK2、VK1 が熱ショックタンパク質の発現を 100 nM という低濃度で抑制し、細胞内のシャペロン機能をも抑制することが分かった。VK2 は HSF1 のリン酸化や、mRNA の発現には影響を与えなかったことから、VK2 による熱ショックタンパク質抑制作用は、転写レベルには影響しないことがわかった。さらに VK2 は、ガンの温熱耐性抑制、温熱感受性増大を引き起こすことが明らかになった。In vivo 実験においても、VK2 が腫瘍組織における Hsp72 の発現を抑制し、温熱による腫瘍抑制効果を亢進することが明らかとなった。しかし、VK2 は正常組織においても熱による熱ショックタンパク質の発現を抑制したことから、正常組織へのダメージをなくすため、VK2 は局所温熱との併用が望ましいことが示唆された。本研究により、VK2、VK1 はガンの温熱耐性獲得を抑制し、ガン温熱療法の治療効果を顕著に亢進できる可能性が示唆された。

ガンの温熱感受性に関与する別の因子として、p53 の変異が報告されている。p53

に変異がある, または p53 が欠失したガン細胞は, 野生型 p53 を持つガン細胞より温熱感受性が低いという. そこで本研究では, p53 が変異または欠失したガンの, 温熱抵抗感受性低下の機序解明を目的とし, p53 欠失細胞及び p53 ノックアウトマウスを用いて, 種々の検討を行った (第 4 章). まず, HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞及び HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞を用いて, p53 の有無により温熱感受性に差異が生じるか否かを確認した. p53 の変異により, Hsp72 や Hsp27 の細胞内発現量が上昇しているという報告があるため, 次に, p53 の有無により熱ショックタンパク質の発現量に差異が生じるか否かについて p53 ノックアウトマウス及び p53 欠失細胞を用いて検討した. その結果, 温熱処理前及び温熱処理によって誘導される熱ショックタンパク質の発現量及び翻訳後修飾に, p53 の status はほとんど影響を与えなかった. 興味深い事に, マウスの肝臓においてのみ, 温熱処理によって Hsp25 が受ける翻訳後修飾に, p53 の有無が影響を与えることが明らかになった. さらに, VK2 による温熱感受性亢進に対する p53 status の影響を検討したところ, HCT116/p53<sup>+/+</sup> 細胞では顕著に VK2 が熱ショックによる細胞障害を亢進したが, HCT116/p53<sup>-/-</sup> 細胞では, ほとんど影響がなかった. まだ検討の余地があるものの, これらの結果から p53 依存的な因子の, 温熱感受性への関与が示唆された. また, この因子は, 熱ショックが関与するところよりも上流で機能している可能性が示唆された. 今後, 網羅的な解析を行いこの因子を明らかにしていくことで, ガン温熱増感薬の新たな標的の発見につながるであろう.

以上, 本研究の知見により, VK2, VK1 のガン温熱療法での有効性が明らかになった. また, p53 依存的な因子の, 温熱感受性への関与が示唆された. 本研究による知見は, 今後, ガン温熱療法に関する研究を行う上で大変有用な知見となっていくであろう.

## 第5章 実験材料及び実験方法

### 第1節 細胞培養

培養に用いた器具はすべてオートクレーブあるいは乾熱滅菌を施し、溶液の調製には注射用水あるいは Elix 純水装置システム (MILLIPORE) によって精製した純水を用いた。また、すべての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

本研究には American Type Culture Collection (ATCC) より入手した、ヒト肺胞上皮ガン由来の細胞株 A549 細胞、ヒト子宮頸部ガン由来の細胞株 HeLa 細胞を用いた。また、ヒト大腸ガン由来の細胞株 HCT116 細胞および p53 欠失 HCT116 細胞は、熊本大学 腫瘍医学研究室 佐谷 秀行 教授に譲渡して頂いた。HeLa 細胞の細胞増殖用培養液には MEM (GIBCO) を用いた。A549 細胞の細胞増殖用培養液には DMEM (日水) を用いた。HCT116 細胞の細胞増殖用培養液には DMEM/F12 (GIBCO) を用いた。細胞増殖培養液にはそれぞれ 10% 牛胎仔血清および 1% の抗生物質溶液 (penicillin G 5,000 units/ml, streptomycin 5,000 µg/ml, GIBCO) を添加した。また、細胞は細胞増殖用培養液に  $1 \sim 2 \times 10^6$  cells/ml になるように懸濁し、5% CO<sub>2</sub>, 37°C 下に静置培養した。細胞がサブコンフルエント状態に達したらその都度細胞を 0.25% トリプシン溶液 (0.25% trypsin, 1 mM EDTA) で処理して継代培養を行った。継代回数は 30 代以下のものを実験に用いた。

### 第2節 薬液の調製

それぞれの薬物をエタノールに溶解し、10 mM の薬液を調製する。これを段階希釈して最終濃度の 100 倍濃の薬液を調製し、培養液に添加した。

### 第3節 培養細胞からのタンパク質の回収および Western blot 解析法

#### 第1項 培養細胞からのタンパク質の回収

35 mm のプラスチック培養皿を用い、HeLa 細胞及び A549 細胞は  $1 \sim 1.5 \times 10^5$  cells/dish の割合で、HCT116 細胞及び p53 欠失 HCT116 細胞は  $2 \sim 3 \times 10^5$  cells/dish の割合で播き、約 48 時間後、細胞がサブコンフルエント状態に達した時点で実験を行った。細胞の培養液を各濃度の薬物を含む培養液で置換し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間、前処置した。次に、 $42^\circ\text{C}$ 、2 時間の熱ショックを加え、5 時間、 $37^\circ\text{C}$  で培養し、タンパク質を回収した。タンパク質の回収は、Hot SDS 法または尿素変性法にて回収した。Hot SDS 法は Byrne らの方法に従った。細胞から培地を除き、 $90^\circ\text{C}$  に熱した electrophoresis sample buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 10% v/v glycerol, 2% w/v sodium dodecyl sulfate) を 1 dish あたり 200~500  $\mu\text{l}$  加え、セルスクレイパー (Falcon) で回収した。回収したタンパク質溶液は 5 分間煮沸して、冷却後、protease inhibitor cocktail (Sigma) を 1/100 量加えた。タンパク質濃度は BCA 法を使って定量した。尿素変性法は、以下の通り行った。細胞から培地を除き、100 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$  (終濃度) と、1/100 量の protease inhibitor cocktail (Sigma) を加えた二次元電気泳動用細胞溶解液 (7 M urea, 2 M thiourea, 40 mM Tris base, 0.5% IPG Buffer, 4% CHAPS) を、1 dish あたり 500~600  $\mu\text{l}$  加え、セルスクレイパー (Falcon) で回収した。タンパク質溶液を超音波破碎機を用いて、 $15^\circ\text{C}$  で 5 分間処理した後、27G の注射針に 10 回通し、12,000 xg,  $15^\circ\text{C}$  で 15 分遠心分離した。タンパク質濃度は Bradford 法を使って定量した。

## 第2項 Western blot 解析法

Western blot 解析は常法に従って行った。7.5~10% ポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写 (250 mA, 2.0 h) した。転写した PVDF 膜は 5% スキムミルクを含む 0.1% Tween 20-PBS 中で 4°C, 一晩マスキングした。その後、膜を 0.05% Tween 20-PBS で洗浄後、一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、膜を洗浄し二次抗体反応を行った。二次反応終了後、膜を洗浄し ECL 試薬 (Amersham) により抗体反応を検出した。用いた一次抗体と二次抗体の希釈倍率を Table 6 に示す。

**Table 6 Antibodies.**

Antibody	Dilution ratio	Cat.# & Co.
Mouse Anti-Hsp70 Monoclonal Antibody	1:1,000	SPA-810, Stressgen Biotechnologies
Rabbit Anti-Hsp70 Polyclonal Antibody	1:2,000	SPA-811, Stressgen Biotechnologies
Rabbit Anti-Hsp70 Polyclonal Antibody	1:10,000	SPA-812, Stressgen Biotechnologies
Rat Anti-Hsc70 Monoclonal Antibody	1:5,000	SPA-815, Stressgen Biotechnologies
Mouse Anti-Hsp90 Monoclonal Antibody	1:1,000	SPA-830, Stressgen Biotechnologies
Mouse Anti-Hsp60 Monoclonal Antibody	1:1,000	SPA-806, Stressgen Biotechnologies
Rabbit Anti-Hsp40 Polyclonal Antibody	1:10,000	SPA-400, Stressgen Biotechnologies
Mouse Anti-Hsp27 Monoclonal Antibody	1:1,000	SPA-800, Stressgen Biotechnologies
Rabbit Anti-Hsp25 Polyclonal Antibody	1:10,000	SPA-801, Stressgen Biotechnologies
Rabbit Anti-Calnexin Polyclonal Antibody	1:2,000	SPA-860, Stressgen Biotechnologies
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:5,000	115-035-003, Jackson Immuno Research
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:10,000	111-035-003, Jackson Immuno Research
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	1:10,000	112-035-003, Jackson Immuno Research

#### 第4節 Luciferase chaperone assay

6 well plate に A549 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well の割合で播き (熱ショックが均等に与えられるように端の well のみを使用), 細胞がサブコンフルエント状態に達したところで Trans IT-LT1<sup>®</sup> を用いて細胞内に pRL-CMV vector を導入した. 概要を以下に示す. pRL-CMV vector 0.1  $\mu$ g と pCB6 vector 0.4  $\mu$ g を Trans IT-LT1<sup>®</sup> 溶液と混和し, 全量を Opti-MEM<sup>®</sup> (GIBCO) にて 100  $\mu$ l とした. この反応液を室温で 5 分間反応後, 6 well plate 上の細胞に添加した. 12 時間後, 細胞の培養液を各濃度の薬物を含む培地で置換し, 37°C で 2 時間前処置した. 次に 43°C, 2 時間の熱ショックを加えその直後, および 37°C で 1 時間培養した後に細胞溶解液を回収し, Renilla luciferase assay system (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した. まず, 細胞から培地を除き, 冷 PBS(-) にて 2 回洗浄し, 500  $\mu$ l の細胞溶解液を加え, 室温にて 15 分間穏やかに振盪させた. その後, 細胞溶解液を回収し, この溶液 20  $\mu$ l と発光基質液 100  $\mu$ l を室温で混和し, ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (Lumat LB9507, eg & g berthold) にて測定した.

## 第5節 培養細胞からの total RNA の抽出および semi-quantitative RT-PCR

### 第1項 Total RNA の抽出

60 mm のプラスチック培養皿に A549 細胞または HeLa 細胞を  $3 \times 10^5$  cells/dish の割合で播き、約 48 時間後、細胞がサブコンフルエント状態に達した時点で実験を行った。細胞の培養液を各濃度の薬液を含む培養液で置換し、37°C で 2 時間前処置した。次に、43°C、2 時間 (A549 細胞) または 42°C、2 時間 (HeLa 細胞) の熱ショックを加えその後ただちに total RNA を回収した。Total RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて行った。細胞から培地を除き、PBS(-) にて細胞を洗浄した。これに 1.0 ml/dish の ISOGEN を加えて細胞を可溶化した。この細胞可溶化物に 0.2 ml のクロロホルムを加えよく攪拌し、2 分間室温にて放置した。その後、遠心 (12,000 rpm, 4°C, 15 min) し、水層を別のチューブに移した。この水層に等量の isopropanol を加えて攪拌後、isopropanol 沈殿を行った。得られたペレットを 70% エタノールで洗浄した後、DEPC 処理水に溶解し、以後の実験に用いた。本法で得られた total RNA の収量は UV (260 nm) の吸光度より求めた。また、OD260/OD280 ratio が 1.80 以上であり高純度の RNA が得られていることを確認した。なお、用いた器具および試薬類は全て乾熱滅菌、オートクレーブもしくは DEPC 処理を行った。

### 第2項 RT-PCR

Hsp72 の mRNA の発現を確認するために RT-PCR を行った。RT-PCR には、RNA PCR kit (AMV) ver. 2.1 (TaKaRa) を用い、以下にその方法の概要を示す。RNA 1 µg を鋳型とし、Oligo dT primer を用いて逆転写反応 (42°C for 60 min, 99 °C for 5 min, 5 °C for 5 min) を行った。その後、Maloyan らの方法に従い<sup>80</sup>、Hsp72 sense primer (5'-GCTGACCAAGATGAAGGAGATC-3') 及び Hsp72 antisense primer (5'-GAGTCGATCTCCAGGCTGGC-3') を用いて PCR 反応 (94°C for 2 min, 1 cycle, 94°C for 30 sec, 64°C for 30 sec, 72°C for 1.5 min, 20 cycles) を行った。



## 第6節 *In vitro* cell death assay

A549 細胞を  $25\text{ cm}^3$  フラスコに  $3 \times 10^5$  cells/flask の割合で播き、約 48 時間後、細胞がサブコンフルエント状態に達したところで実験を行った。細胞の培養液を各濃度の薬液を含む培養液で置換し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間前処置した。その後、フラスコの口を閉めてパラフィルムで密封し、 $44^\circ\text{C}$  に設定した恒温槽中に沈めて 45 分間熱ショックを与えた。その後フラスコの口を緩めて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間 15 分培養し、位相差顕微鏡によって形態を観察した。

## 第7節 培養細胞を用いた温熱耐性抑制実験および flow cytometry

### 第1項 培養細胞を用いた温熱耐性抑制実験

HeLa 細胞を  $25\text{ cm}^2$  フラスコに  $3 \times 10^5$  cells/flask の割合で播き、約 48 時間後、細胞がサブコンフルエント状態に達したところで実験を行った。細胞の培養液を各濃度の薬液を含む培養液で置換し、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間前処置した。次に、 $42^\circ\text{C}$ 、2 時間の熱ショックを加え、5 時間、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。次に、フラスコの口を閉めてパラフィルムで密封し、 $44^\circ\text{C}$  に設定した恒温槽中に沈めて 45 分間熱ショックを与え、24 時間後、アポトーシスの検出を行った。

### 第2項 アポトーシスの検出および flow cytometry

アポトーシスの検出は、FITC 標識 Annexin V と propidium iodide (PI) によってアポトーシスを検出する Apoptosis Detection Kit (R&D SYSTEM) を用いた。培養液を除去し、細胞を PBS(-) で洗浄して  $500\ \mu\text{l}$  の 0.25% トリプシン溶液を加え細胞表面に行き渡らせた後、すぐに 0.25% トリプシン溶液を除去した。顕微鏡下にて細胞の形態が丸くなるのを確認したらすぐに培養液で回収した。さらに遠心して培養液を除去し、2% BSA in PBS(-) で 2 回洗浄した。次に、細胞を FITC 標識 Annexin V と PI を含む Annexin V Incubation Regent  $200\ \mu\text{l}$  に懸濁させ、tube をアルミ箔で包んで遮光し、室温で 15 min 反応させた。反応後、 $800\ \mu\text{l}$  の  $1 \times$  binding buffer を加え、すぐに flow cytometry によって解析した。

## 第 8 節 コロニー形成試験

コロニー形成試験は以下の通りに行った。HeLa 細胞及び A549 細胞を 25 cm<sup>2</sup> flask に  $5 \times 10^4$  cells/flask の割合で播き、約 48 時間後、細胞がサブコンフルエント状態に達したところで実験を行った。細胞の培養液を各濃度の薬液を含む培養液で置換し、37°C で 2 時間前処置した。次に、フラスコの口を閉めてパラフィルムで密封し、44°C に設定した恒温槽中に沈めて 30 分または 45 分間熱ショックを与えた。熱ショック後すぐトリプシン処理し、100 mm のプラスチック培養皿に再播種した。その後、37°C で 2 週間置いてコロニーを形成させ、メタノールで固定した。2% Giemsa 溶液で染色し、50 細胞以上からなるコロニーをカウントし、生存細胞とした。1 回の実験で 2 サンプルずつデータをとり、3 回の実験を行った。

## 第 9 節 LDH release assay

細胞毒性の検出は、LDH 活性を測定する Cytotoxicity Detection Kit (Roche) を用いた。HCT116 細胞を 35 mm dish に  $2 \times 10^5$  cells/flask の割合で播き、約 48 時間後、細胞がサブコンフルエント状態に達したところで実験を行った。細胞の培養液を各濃度の薬液を含むアッセイメディウム (1% 血清を含む培養液) で置換し、37°C で 2 時間前処置した。その後、水が入らないようにパラフィルムで密封し、42°C、2 時間または 44°C に 45 分間、それぞれの温度に設定した恒温槽中に沈めることで熱ショックを与えた。UV 処理は、UV 灯を用いて 15 秒処理した。37°C で 24 時間培養した後、アッセイメディウムを回収し、4°C、12,000 xg で 5 分間で遠心分離し、上清をサンプルとした。サンプルを 96 well plate に 100  $\mu$ L ずつ入れ、Reaction Mixture を 100  $\mu$ L ずつ添加して 30 分間遮光して室温で振盪した。その後 LDH 活性を UV (450 nm) の吸光度により求めた。また、細胞は 2% Triton X-100 を含むアッセイメディウムで 1 時間、37°C で振盪し、その細胞溶解液について同様に LDH 活性を UV (450 nm) の吸光度により求めた。LDH release (%) は以下の式より求めた。

$$\text{LDH release (\%)} = \text{Abs.}_{\text{medium}} / (\text{Abs.}_{\text{medium}} + \text{Abs.}_{\text{cell}}) \times 100$$

## 第10節 *In vivo* 実験

### 第1項 実験動物

本研究では 6~50 週齢のヌードマウス (Crj: CD-1 (ICR) -nu/nu SPF/VAF mice; KBT Oriental) を用いた。また、p53 ノックアウトマウスは熊本大学 腫瘍医学研究室 荒木 令江 講師に譲渡して頂いた。

### 第2項 ヌードマウスへの腫瘍移植

サブコンフルエント状態にある A549 細胞をトリプシン溶液で消化し培養液で回収した後、PBS(-) で wash し、 $5 \times 10^6$  cells/ml になるように PBS(-) に再懸濁した。この細胞懸濁液を 6 週齢のヌードマウスの脚部皮下に 200  $\mu$ l ずつ移植した。移植後 3 週間ほどして腫瘍径が 4~5 mm (50 mm<sup>3</sup> 弱) に達したのち実験を行った。腫瘍体積は以下の式より算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} \times \text{高さ (mm)} \times 0.55$$

### 第3項 動物への VK2 の投与

ケイツー<sup>®</sup>(エーザイ) の製剤 (VK2 5 mg/ml) を VK2 50 mg/kg となるように、または製剤を saline で 150 倍希釈 (VK2 30  $\mu$ g/ml) し、VK2 0.3 mg/kg となるようにマウスの腹腔内に投与した。

### 第4項 遠赤外線を用いた全身温熱処理

マウスにネンブタール<sup>®</sup>注射液を腹腔内投与し麻酔した (ペントバルビタール 65~80 mg/kg)。その後マウスを全身温熱療法用遠赤外線照射装置 (ブラスト) 内に固定し、60 分間、直腸温を 40.0~42.0°C に維持することで温熱処理を行った。必要に応じて加温中に追加麻酔 (30~40 mg/kg) を行った。

## 第5項 動物組織からのタンパク質の回収

マウスを頸椎脱臼後、各組織を単離し、glycerol buffer (10% glycerol, 5 mM EDTA, 10 mM Tris / HCl [pH7.4], and 200 mM NaCl) 500  $\mu$ l と終濃度 1 mM となるよう PMSF を加えてホモジナイズ後、20 分間の遠心 (13,000 rpm, 4°C) により得られた上清を試料とした<sup>22</sup>.

二次元電気泳動法用には別の方法を用いてタンパク質を回収した。マウスを頸椎脱臼後、各組織を単離し、100 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> (終濃度) と、1/100 量の protease inhibitor cocktail (Sigma) を加えた二次元電気泳動用組織溶解液 (7 M urea, 2M thiourea, 40 mM Tris base, 0.5% IPG Buffer, 4% CHAPS) を 500 ~ 600  $\mu$ l 加え、ホモジナイズした。その後、20 分間の遠心 (13,000 rpm, 4°C) により得られた上清を試料とした。

なお、温熱処理後の回収の場合、温熱処理終了 5 時間後に組織単離を開始した。

## 第6項 VK の定量法

飼料及び腫瘍はあらかじめ重さを測り、蒸留水を加えて磨砕してホモジネートを調製し、これを試料とした。試料をスピッツロールにとり、蒸留水を加えて 1 ml とし、さらにイソプロパノール 1.5 ml を加えてよく混和した後、n-ヘキサン 5 ml を正確にくわえて密栓し、5 分間激しく振盪し遠心分離 (3000 rpm, 5 min) した。n-ヘキサン層の 4 ml を別の褐色スピッツロールに正確にとり、減圧蒸留により溶媒を完全に留去した。残留物に n-ヘキサン 100  $\mu$ l を正確に加えて溶かした。さらにこれをフィルター過し、得られた溶液を試料とした。試料は同一の条件で HPLC を行い、飼料中、腫瘍中の VK の量を求めた。

HPLC 条件：ポンプ；HITACHI L-6000 Pump, カラム；GL Sciences IAC LiChrosorb SI60-5 (4.6  $\times$  250 mm), 検出器；HITACHI 655A-21, 検出；270 nm, 移動相；酢酸エチル / n-ヘキサン (2 : 98) 混液, 流速；1.0 ml/min の条件下で測定した。

## 第 7 項 温浴を用いた局所温熱処理

50 mg/kg の VK2 または溶媒をマウスの腹腔内に投与し、30 分後マウスの脚部(腫瘍部) を 42°C の温浴に 5 分間浸漬して温熱療法を行った。この治療を 1 週間に 1 度、計 5 回行い、3 日毎に腫瘍径を測定して腫瘍体積を算出し、治療効果を判定した。

## 第 1 1 節 二次元電気泳動法

試料を膨潤バッファー (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 100 mM DTT, BPB 少量; 以上 Nacalai tesque, 0.5% IPG Buffer pH 3-11 NL; Amersham Biosciences) と混合させ、総タンパク質量が 10 µg / 125 µL になるように調製した。サンプルをストリップホルダー (7 cm Strip Holder; Amersham Biosciences) にロードし、一次元目電気泳動用のゲル (Immobiline DryStrip pH 3-11 NL, 7 cm; Amersham Biosciences) を設置した。ゲルをカバー液 (Immobiline Dry Strip Cover Fluid; Amersham Biosciences) で覆い、等電点電気泳動装置 (Ettan IPG Phor II; Amersham Biosciences) に設置し、20°C で 10 h 以上膨潤させた。膨潤が終わったら一次元目の電気泳動を行った (Step1 500 V・30 min, Step2 1000 V・30 min, Step3 5000 V・1 h 40 min)。泳動が終わったらゲルを 15 mL のチューブに移し、4 mL の平衡化バッファー (500 mM Tris-Cl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 100 mM DTT, BPB 少量; 以上 Nacalai tesque) を用いて室温にて 30 min, 平衡化を行った。平衡化後のゲルを SDS-PAGE 用のゲルに設置し、封入用アガロース溶液 (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 0.5% agarose, BPB 少量; 以上 Nacalai tesque) で封入し、二次元目の電気泳動を行った。

## 第 1 2 節 試薬

ISOGEN (ニッポンジーン), IPG Buffer pH 3-11 NL (Amersham), Sodium dodecyl sulfate, dithiothreitol, urea, thiourea, CHAPS (以上, Nacalai tesque), trypsin (Difco), minimum essential medium, 1 kb DNA ladder, penicillin G, streptomycin, DMEM/F12, Opti-MEM<sup>®</sup>, (以上, GIBCO), DMEM (日水), TransIT<sup>®</sup>-LT1 Transfection Regent (Mirus), プロテインアッセイ染色液, Precision Plus Protein Dual Color Standards<sup>™</sup> (Bio-Rad), protease inhibitor cocktail, vitamin K<sub>2</sub>, vitamin K<sub>3</sub>, (以上, Sigma), vitamin K<sub>1</sub>, Tween 20, n-hexane (高速クロマトグラフ用), ethyl acetate (高速クロマトグラフ用) (以上, Wako), ケイツー<sup>®</sup> (エーザイ), KM001 ~ 092 (川崎化成工業)

その他の試薬および無機塩類はすべて市販の特級品を使用した。

## 謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、本稿の作成に多大なる御教示、御援助を戴きました 熊本大学大学院医学薬学研究部 甲斐 広文 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜り、本稿作成にあたり多大なる御教示、御助力を戴きました 熊本大学大学院医学薬学研究部 首藤 剛 助手に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜り、本稿作成にあたり多大なる御教示、御助力を戴きました 熊本大学大学院医学薬学研究部 Marry Ann Suico 助手に深謝致します。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜り、本稿作成にあたり多大なる御教示、御助力を戴きました 熊本大学大学院医学薬学研究部 沖米田 司 博士に深謝致します。

p53 に関する研究に際し、p53 ノックアウトマウスを譲渡していただき、また有益なる御指導、ご助言を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 荒木 令江 講師に深謝致します。

p53 に関する研究に際し、HCT116 細胞および p53 欠失 HCT116 細胞を譲渡していただき、また有益なる御助言を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 佐谷 秀行 教授に深く感謝の意を表します。

本論文作成に際し、有益なる御助言と御校閲を頂きました 熊本大学薬学部 大塚 雅巳 教授、國安 明彦 助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 宮田 健 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 磯濱 洋一郎 助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 有馬 英俊 助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、共同研究者として多くの面で御世話になりました 城野 博史 博士，松尾 純子 修士，森川 麻理 修士，村上 徹 修士に心から感謝の意を表します。

本研究に際し、共同研究者として多大なる御協力を戴きました 中村 秀明 学士，小松 賢生 氏に心から感謝の意を表します。

本研究および私の学生生活に際し、日夜励ましていただきました薬物活性学分野および遺伝子機能応用学分野の諸氏，特に友人として私を支えてくれた原田 一恒 修士，三上 史 修士，吉田 裕樹 修士に心から感謝いたします。

最後に私を今まで支えてくれた友人，家族に心から感謝いたします。



## 参考文献

1. Busch, W. Ueber den Einfluss welchen heftigere Erysipelen zuweilen auf organisierte Neubildungen ausuben. Verhandlungen des Naturhistorischen Vereines der Preussen. *Rheinland und Westphalens* **23**, 28-30 (1866).
2. Kano, E. et al. [Biological basis of thermochemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* **20**, 583-90 (1993).
3. Gerweck, L.E. & Richards, B. Influence of pH on the thermal sensitivity of cultured human glioblastoma cells. *Cancer Res* **41**, 845-9 (1981).
4. Song, C.W., Lyons, J.C., Griffin, R.J., Makepeace, C.M. & Cragoe, E.J., Jr. Increase in thermosensitivity of tumor cells by lowering intracellular pH. *Cancer Res.* **53**, 1599-601 (1993).
5. Matsumoto, H. et al. Suppression of heat-induced HSF activation by CDDP in human glioblastoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **41**, 915-20 (1998).
6. Hahn, G.M. Potential for therapy of drugs and hyperthermia. *Cancer Res.* **39**, 2264-8 (1979).
7. Hamazoe, R., Maeta, M. & Kaibara, N. Intraperitoneal thermochemotherapy for prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer. Final results of a randomized controlled study. *Cancer* **73**, 2048-52 (1994).
8. Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Denis-Larose, C. & Massie, B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5317-27 (1997).
9. Jolly, C. & Morimoto, R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1564-72 (2000).
10. Morimoto, R.I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.* **12**, 3788-96 (1998).
11. Nonaka, T. et al. Changes in the localization of heat shock protein 72 correlated with development of thermotolerance in human esophageal cancer cell line. *Anticancer Res.*

- 23**, 4677-87 (2003).
12. Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K. & Hartl, F.U. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* **370**, 111-7 (1994).
  13. Shi, Y. & Thomas, J.O. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol.* **12**, 2186-92 (1992).
  14. Murakami, H., Pain, D. & Blobel, G. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* **107**, 2051-7 (1988).
  15. Hiratsuka, M., Mora, B.N., Yano, M., Mohanakumar, T. & Patterson, G.A. Gene transfer of heat shock protein 70 protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* **67**, 1421-7 (1999).
  16. Radford, N.B. et al. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**, 2339-42 (1996).
  17. Hirakawa, T., Rokutan, K., Nikawa, T. & Kishi, K. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* **111**, 345-57 (1996).
  18. Yenari, M.A., Giffard, R.G., Sapolsky, R.M. & Steinberg, G.K. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today* **5**, 525-31 (1999).
  19. Matouschek, A., Pfanner, N. & Voos, W. Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* **1**, 404-10 (2000).
  20. Yan, L.J. et al. Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *EMBO J.* **21**, 5164-72 (2002).
  21. Young, J.C., Hoogenraad, N.J. & Hartl, F.U. Molecular chaperones hsp90 and hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor tom70. *Cell* **112**, 41-50 (2003).
  22. Van Molle, W. et al. HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock.

- Immunity* **16**, 685-95 (2002).
23. Wei, Y.Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K. & Uchida, A. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **40**, 73-8 (1995).
  24. Vargas-Roig, L.M., Gago, F.E., Tello, O., Aznar, J.C. & Ciocca, D.R. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer* **79**, 468-75 (1998).
  25. Nylandsted, J. et al. 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* **97**, 7871-6 (2000).
  26. Seo, J.S. et al. T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218**, 582-7 (1996).
  27. Li, G.C. et al. Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 1681-5 (1991).
  28. Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E. & Weber, L.A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell Biol.* **109**, 7-15 (1989).
  29. Laszlo, A. & Li, G.C. Heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **82**, 8029-33 (1985).
  30. Nishimura, R.N., Santos, D., Esmaili, L., Fu, S.T. & Dwyer, B.E. Expression of antisense hsp70 is a major determining factor in heat-induced cell death of P-19 carcinoma cells. *Cell Stress Chaperones* **5**, 173-80 (2000).
  31. McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K. & Benjamin, I.J. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* **273**, 7523-8 (1998).
  32. Riabowol, K.T., Mizzen, L.A. & Welch, W.J. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science* **242**, 433-6 (1988).
  33. Lotem, J. & Sachs, L. Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to

- induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Differ.* **4**, 41-7 (1993).
34. Goto, A. et al. Hyperthermia-induced apoptosis occurs both in a p53 gene-dependent and -independent manner in three human gastric carcinoma cell lines. *Oncol. Rep.* **6**, 335-9 (1999).
  35. Allan, D.J. & Harmon, B.V. The morphologic categorization of cell death induced by mild hyperthermia and comparison with death induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. *Scan. Electron Microsc.*, 1121-33 (1986).
  36. Dyson, J.E. et al. Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia. *Cell Tissue Kinet.* **19**, 311-24 (1986).
  37. Gabai, V.L. et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J. Biol. Chem.* **272**, 18033-7 (1997).
  38. Beere, H.M. & Green, D.R. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **11**, 6-10 (2001).
  39. Nollen, E.A., Brunsting, J.F., Roelofsen, H., Weber, L.A. & Kampinga, H.H. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2069-79 (1999).
  40. Yaglom, J.A., Gabai, V.L., Meriin, A.B., Mosser, D.D. & Sherman, M.Y. The function of HSP72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase activation can be dissociated from its role in prevention of protein damage. *J. Biol. Chem.* **274**, 20223-8 (1999).
  41. Meriin, A.B. et al. Protein-damaging stresses activate c-Jun N-terminal kinase via inhibition of its dephosphorylation: a novel pathway controlled by HSP72. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2547-55 (1999).
  42. Ravagnan, L. et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* **3**, 839-43 (2001).
  43. Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T. & Egeblad, M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* **17**, 6124-34

- (1998).
44. Beere, H.M. et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2**, 469-75 (2000).
  45. Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D. & Alnemri, E.S. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* **2**, 476-83 (2000).
  46. Li, C.Y., Lee, J.S., Ko, Y.G., Kim, J.I. & Seo, J.S. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 25665-71 (2000).
  47. Takayama, S., Reed, J.C. & Homma, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22**, 9041-7 (2003).
  48. Gibbons, N.B., Watson, R.W., Coffey, R.N., Brady, H.P. & Fitzpatrick, J.M. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate* **45**, 58-65 (2000).
  49. Ostapenko, V.V. et al. Increased resistance of the radiosensitive M10 mutant cells of the L5178Y mouse lymphoma cell line to heat-induced apoptosis. *Radiat. Res.* **152**, 321-7 (1999).
  50. Sreedhar, A.S. & Csermely, P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **101**, 227-57 (2004).
  51. Coss, R.A. Inhibiting induction of heat shock proteins as a strategy to enhance cancer therapy. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 695-701 (2005).
  52. Ota, I. et al. Transfection with mutant p53 gene inhibits heat-induced apoptosis in a head and neck cell line of human squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **47**, 495-501 (2000).
  53. Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I. & Wu, B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* **259**, 84-7 (1993).
  54. Tsutsumi-Ishii, Y., Tadokoro, K., Hanaoka, F. & Tsuchida, N. Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell Growth Differ.* **6**, 1-8 (1995).

55. Ohnishi, K., Takahashi, A., Yokota, S. & Ohnishi, T. Effects of a heat shock protein inhibitor KNK437 on heat sensitivity and heat tolerance in human squamous cell carcinoma cell lines differing in p53 status. *Int. J. Radiat. Biol.* **80**, 607-14 (2004).
56. Rokutan, K. et al. Geranylgeranylacetone stimulates mucin synthesis in cultured guinea pig gastric pit cells by inducing a neuronal nitric oxide synthase. *J. Gastroenterol.* **35**, 673-81 (2000).
57. Hosokawa, N. et al. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct. Funct.* **15**, 393-401 (1990).
58. Yokota, S., Kitahara, M. & Nagata, K. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **60**, 2942-8 (2000).
59. Lamson, D.W. & Plaza, S.M. The anticancer effects of vitamin K. *Altern. Med. Rev.* **8**, 303-18 (2003).
60. Zenmyo, M. et al. Transcriptional activation of p21 by vitamin D(3) or vitamin K(2) leads to differentiation of p53-deficient MG-63 osteosarcoma cells. *Hum. Pathol.* **32**, 410-6 (2001).
61. Wu, F.Y. & Sun, T.P. Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase. *Eur. J. Cancer* **35**, 1388-93 (1999).
62. Nishikawa, Y. et al. Growth inhibition of hepatoma cells induced by vitamin K and its analogs. *J. Biol. Chem.* **270**, 28304-10 (1995).
63. Wang, Z., Wang, M., Finn, F. & Carr, B.I. The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. *Hepatology* **22**, 876-82 (1995).
64. Carr, B.I. Phase I/Phase II study of high dose vitamin K (VK) to patients with advanced, inoperable hepatocellular carcinoma (HCC): Interim analysis. *Hepatology* **20**, 278A (1994).
65. Larocca, L.M. et al. Differential sensitivity of leukemic and normal hematopoietic progenitors to the killing effect of hyperthermia and quercetin used in combination: role of heat-shock protein-70. *Int. J. Cancer* **73**, 75-83 (1997).
66. Nakanoma, T., Ueno, M., Iida, M., Hirata, R. & Deguchi, N. Effects of quercetin on

- the heat-induced cytotoxicity of prostate cancer cells. *Int. J. Urol.* **8**, 623-30 (2001).
67. Piantelli, M. et al. Quercetin and tamoxifen sensitize human melanoma cells to hyperthermia. *Melanoma Res.* **11**, 469-76 (2001).
68. Lee, Y.J. et al. Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Mol. Cell Biochem.* **137**, 141-54 (1994).
69. Gaikwad, A. et al. Triterpenoid electrophiles (avicins) suppress heat shock protein-70 and x-linked inhibitor of apoptosis proteins in malignant cells by activation of ubiquitin machinery: implications for proapoptotic activity. *Clin. Cancer Res.* **11**, 1953-62 (2005).
70. Multhoff, G. et al. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* **61**, 272-9 (1995).
71. Broquet, A.H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G. & Bachelet, M. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J. Biol. Chem.* **278**, 21601-6 (2003).
72. Asea, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028-34 (2002).
73. Vabulas, R.M. et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 15107-12 (2002).
74. Young, R.A. & Elliott, T.J. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* **59**, 5-8 (1989).
75. Nicchitta, C.V. Re-evaluating the role of heat-shock protein-peptide interactions in tumour immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 427-32 (2003).
76. Knowlton, A.A., Grenier, M., Kirchhoff, S.R. & Salfity, M. Phosphorylation at tyrosine-524 influences nuclear accumulation of HSP72 with heat stress. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **278**, H2143-9 (2000).
77. Leustek, T., Amir-Shapira, D., Toledo, H., Brot, N. & Weissbach, H. Autophosphorylation of 70 kDa heat shock proteins. *Cell. Mol. Biol.* **38**, 1-10 (1992).

78. Landry, J. & Huot, J. Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem. Soc. Symp.* **64**, 79-89 (1999).
79. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P. & Colombo, R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1624-32 (2001).
80. Maloyan, A., Palmon, A. & Horowitz, M. Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress. *Am. J. Physiol.* **276**, R1506-15 (1999).