

**Silencing HSF1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in human melanoma cell lines**

(ショートヘアピンRNAによるHSF1のノックダウンはヒトメラノーマ細胞の増殖を抑制し、温熱感受性を増加させる)

中村好貴

山口大学大学院医学系研究科  
情報解析医学系専攻 上皮情報解析医科学領域  
皮膚科学分野

平成22年11月

## 目次

1	要旨	3
2	研究の背景	3
3	目的	4
4	対象および方法	4
1)	細胞培養と処理	4
2)	細胞生死判別	4
3)	細胞周期解析	5
4)	ウエスタンブロット解析	5
5)	アデノウイルスベクター作成	5
6)	統計分析	5
5	結果	5
1)	MeWo、HaCat細胞におけるshRNA発現アデノウイルスによるHSF1のノックダウン	5
2)	HSF1 shRNA発現アデノウイルスの感染により、メラノーマ細胞の増殖は顕著に低下する	6
3)	HSF1のノックダウンはMeWo細胞のG <sub>1</sub> 期での細胞周期停止を起し、アポトーシスを誘導する	6
4)	HSF1のノックダウンは温熱感受性を増加させるが、ダカルバジン単独処置、ダカルバジンと温熱処置の併用処置への感受性に影響を与えない	6
6	考察	7
7	結語	8
8	謝辞	9
9	図の説明	10
10	参考文献	12
11	図表	17

## 1 要旨

熱ショック応答は、進化の過程で保存された普遍的な生体防御機構である。この応答を制御するのが熱ショック転写因子 (Heat shock transcription factor 1 : HSF1) である。HSF1は、構成的ならびに誘導性の熱ショック蛋白質 (Heat shock protein : Hsp) の発現を制御することで、熱ストレスをはじめとする様々なストレスに対する耐性獲得に働いている。

最近の研究から、HSF1は細胞内蛋白質ネットワークを調整することにより腫瘍形成を制御しており、癌の発生や維持において重要な役割を演じていることが報告されている。

今回我々は、ヒトメラノーマ細胞株MeWo、HMV-I、HMV-IIにショートヘアピンRNA発現アデノウイルスを感染させ、HSF1をノックダウンさせた。HSF1をノックダウンしたMeWo細胞は増殖能が低下し、細胞周期の解析からG<sub>1</sub>ブロックが認められた。さらに、HMV-I、HMV-II細胞においても、HSF1ノックダウンにより細胞増殖能の低下を認めた。しかし、正常細胞であるヒトケラチノサイト細胞株HaCatは、HSF1をノックダウンしても細胞増殖能の低下は認められず、癌であるメラノーマ細胞に特異的にHSF1が細胞増殖に重要な役割を演じていることが示された。また、HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞は、温熱処置に対する抵抗性が減弱することが分かった。

これらの結果から、ヒトメラノーマ細胞において、HSF1は増殖能の維持と熱ストレス下での生存に必要な因子であり、HSF1を制御することはヒトメラノーマ治療の有望な標的の1つになりうることが示唆される。

## 2 研究の背景

近年、皮膚メラノーマの発生率は他の癌よりも上昇している。全体的に見て、メラノーマは全ての悪性腫瘍の1~3%の割合を占め、毎年、発生率は6~7%の上昇を続けている<sup>1),2)</sup>。メラノーマは遠隔部位へ広がる前に原発部位を完全に切除すれば、治癒することができる。しかしながら、数十年に及ぶ単純、複雑いずれの治療的アプローチにもかかわらず、転移性メラノーマの治療の進歩はほとんどなく、現在でもStageIV患者の5年生存率は6%しかなく、メディアン生存期間は6ヶ月である<sup>3),4)</sup>。進行したStageの患者のほとんどは全身化学療法を受け、依然としてそれがStageIV患者の治療の中心と考えられている<sup>5),6)</sup>。多数の化学療法薬がメラノーマの治療において多少の効果を示し、その中でも、ダカルバジンが最も広く使用されている。ダカルバジンは非古典的なアルキル化剤であり、一般的にメラノーマの治療において最も効果的であるとされており、アメリカ食品医薬品局にも承認されている<sup>5),7)</sup>。ダカルバジンは核酸のメチル化もしくは直接DNAに傷害をあたえ、細胞増殖停止もしくは細胞死をもたらすことにより、抗腫瘍効果を発揮する。しかしながら、ダカルバジン単独での有効例は10%~25%と低く、そのため、臨床上の完全寛解は5%以下しか認められない。

熱ショック応答は一群の熱ショック蛋白質（Heat shock protein：Hsp）の誘導を特徴とする反応であり、蛋白質ホメオスターシスを維持するために細菌から人間までの全ての生物に備わった基本的生体防御機構である<sup>8),9),10)</sup>。この応答は真核生物では熱ショック転写因子（Heat shock transcription factor：HSF）により主に転写レベルで制御されており、HSFはHsp遺伝子のプロモーター上の熱ショックエレメントに結合する<sup>11)</sup>。HSFファミリー（HSF1-4）の中で、HSF1は細胞や組織が熱に曝された時に、Hspsの誘導を担う<sup>12),13),14)</sup>。このHSF1を介したHspsの誘導は熱耐性の獲得に必要であり<sup>12),13),15)</sup>、神経変性疾患<sup>16),17),18),19)</sup>や他の変性疾患<sup>20),21)</sup>のような様々な病態生理学的状態での細胞防御にも必要である。その一方、HSF1はストレス応答においてプロアポトーシス遺伝子を誘導することにより細胞死を導くこともある<sup>22),23),24)</sup>。さらにHSFsは、配偶子形成や神経形性のような発達過程、感覚器や線毛組織の維持、免疫応答において重要な役割をはたす<sup>25),26)</sup>。

これまでに、様々なタイプの腫瘍でHspsが上昇していることが確認されており<sup>27),28),29)</sup>、ヒト前立腺癌細胞株においてはHSF1の発現が上昇している<sup>30),31)</sup>ことが報告されている。最近の研究では、HSF1は増殖や生存、蛋白質の合成、グルコース代謝といった細胞機能の幅広いネットワークを調整することにより、発癌の過程と癌細胞の維持に関与していることが報告されている<sup>32),33)</sup>。しかしながら、メラノーマにおけるHSF1の役割は知られていない。

### 3 目的

メラノーマにおけるHSF1の役割を明らかにするために、ヒトメラノーマ細胞株（MeWo、HMV-I、HMV-II）にHSF1 short hairpin (sh) RNA発現アデノウイルスを感染させ、HSF1をノックダウンし、細胞増殖能の解析を行った。また、温熱処置単独、ダカルバジン処置単独、温熱処置とダカルバジン処置の併用処置をそれぞれ、HSF1をノックダウンしたヒトメラノーマ細胞に加えることにより、メラノーマ治療における、HSF1の機能欠損の効果を明らかにする。

### 4 対象および方法

#### 1) 細胞培養と処理

MeWo、HMV-I、HaCat細胞は10%ウシ胎児血清を含んだDMEM培地を用いて、37°C設定の5% CO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養した。HMV-II細胞は10%ウシ胎児血清を含んだF12培地で培養した。ダカルバジン（Kyowa Hakko Kirin Co., Tokyo, Japan）は使用する前に、1時間光に曝し活性化させた。温熱処置のため、メラノーマ細胞は1時間42°Cもしくは43°Cに保ち、その後37°Cでリカバリーした。温熱療法とダカルバジン処置の併用処置のため、ダカ

ルバジンを投与2時間後に温熱処置を加えた。

## 2) 細胞生死判別

細胞生死判別はtrypan blue exclusionにて評価した。

## 3) 細胞周期解析

メラノーマ、HaCat細胞にsh RNA発現アデノウイルスを感染させ、72時間、144時間後にトリプシン処理をし、その後、4°Cオーバーナイトで70%エタノールにより固定した。細胞はphosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、propidium iodideで再懸濁し、15分間室温で保った。細胞周期はフローサイトメトリー (Cytomics FC500, Beckman Coulter) にて解析した。

## 4) ウェスタンブロット解析

sh RNA発現アデノウイルスを感染させたメラノーマ、HaCat細胞をNP-40溶解緩衝液 (150 mM NaCl, 1.0% Nonidet p-40, 50 mM Tris(pH 8.0), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin) で溶解し、12,000 X gで10分間遠心分離した。蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後に、ニトロセルロース膜に転写した。βアクチン (AC-15, Sigma) とHsp70 (W27, Santa Cruz) に対するマウス抗体、HSF1 (αHSF1x)、Hsp110 (αHsp110b)、Hsp90 (αHsp90d)、Hsp60 (αHsp60-1)、Hsp40 (αHsp40-1)、Hsp27 (αHsp27a) に対するラビット抗体を用いてニトロセルロース膜をブロットした<sup>34)</sup>。

## 5) アデノウイルスベクター作成

ヒトHSF1に対するshRNAのターゲットシーケンスはBLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen) と以前の報告を基に決定した<sup>33)</sup>。対応センスとアンチセンスのオリゴヌクレオチド (**Table 1**) はアニールし、pCR2.1-hU6のBamHI/HindIIIサイトに挿入した (pCR2.1-hU6-shRNA)。hU6-shRNAを含んだフラグメントをpShuttleベクター (Stratagene) のXhoI/HindIIIサイトに挿入した (pShuttle-hU6-shRNA)。感染アデノウイルスはアデノウイルスDNAをHEK293細胞にトランスフェクトすることにより作成した。ウイルス力価はプラーク形成単位 (plaque forming units : pfu) で決定した。

## 6) 統計分析

データはStudent's *t*-testとANOVAにて解析した。P<0.05を統計的有意差とした。

## 5 結果

### 1) MeWo、HaCat細胞におけるshRNA発現アデノウイルスによるHSF1のノックダウン。

MeWo、HaCat細胞のHSF1発現を抑制するために、2つの特異的19ヌクレオチドのシーケンスを決定し (Table 1)、HSF1に対するshort hairpin (sh) RNA発現アデノウイルスを作成した (HSF1-1、HSF1-2 shRNA)。MeWo、HaCat細胞にHSF1-1、HSF1-2、scramble shRNA発現アデノウイルスを72時間感染させた後に、HSF1、Hsps蛋白質レベルをウェスタンブロットで測定した。HSF1蛋白質レベルはHSF1-1、HSF1-2 shRNAを感染させた細胞では著明に減少していたが、scramble shRNAを感染させた細胞では減少は認められなかった (Fig. 1A, B)。HSF1-1、HSF1-2 shRNAを感染させたMeWo細胞において、Hsp110、Hsp90、Hsp70、Hsp60の蛋白質レベルはわずかに減少していた (Fig. 1A, C)。常に、MeWo細胞のHSF1蛋白質レベルはHaCat細胞の2倍以上であった (Fig. 1B)。

2) HSF1 shRNA発現アデノウイルスの感染により、メラノーマ細胞の増殖能は顕著に低下した。

最近、HSF1は様々なヒト組織由来 (子宮頸部、前立腺、末梢神経鞘、腎、乳腺) の癌細胞の増殖、生存の維持に必要であることが報告されている<sup>33)</sup>。shRNAによりHSF1をノックダウンした細胞の増殖能を検討するために、ウイルス感染後72時間後より毎日細胞数を数えた。驚くべきことに、HSF1 shRNAを感染させたMeWo細胞はscramble shRNAと比較し、著明に細胞増殖能が低下していた (Fig. 2A)。この細胞増殖能の低下はHaCat細胞では認められなかった (Fig. 2B)。他のメラノーマ細胞株HMV-I、HMV-II細胞においても、HSF1のノックダウンにより細胞増殖能の低下を認めた (Fig. 2C, D)。この結果により、HSF1はメラノーマ細胞の増殖能に重要な役割を果たしていることが初めて明らかとなった。

3) MeWo細胞においてHSF1のノックダウンはG<sub>1</sub>期での細胞周期停止を起し、アポトーシスを誘導する。

最近の報告より、HSF1は有糸分裂の制御やゲノムの不安定性に関連していることが示されている<sup>32),35)</sup>。これを明らかにするために、MeWo、HaCat細胞においてHSF1のノックダウンが細胞周期に影響を与えるかどうかを検討した。ウイルス感染後72時間、144時間後に細胞のフローサイトメトリー解析を行った。ウイルス感染後72時間では、MeWo細胞においてHSF1 shRNA (~88.0%) ではscramble shRNA (~80.1%) と比較してよりG<sub>1</sub>期への集積が認められた (Fig. 3A, B)。ウイルス感染後144時間では、MeWo細胞においてHSF1 shRNA (~20.9%) ではscramble shRNA (~5.4%) と比較して大幅にsub-G<sub>1</sub>の細胞増加が認められた (Fig. 3A, B)。HSF1 shRNAはHaCat細胞において、感染後72時間で若干のG<sub>1</sub>期への集積 (~84.4%) を認めたが、感染後144時間でのsub-G<sub>1</sub>の細胞増加は認めなかった (Fig. 3C, D)。これらの結果より、MeWo細胞においてHSF1のノックダウンはG<sub>1</sub>期での細胞周期停止を起し、アポトーシスを誘導することが示された。

4) HSF1のノックダウンは温熱感受性を増加させるが、ダカルバジン単独処置、ダカルバ

ジン処置と温熱処置の併用への感受性に影響を与えない。

次に、HSF1をノックダウンしたMeWo細胞における温熱処置への影響を検討した。HSF1-2、scramble shRNAを感染させたMeWo細胞を42°C1時間の温熱処置を行った後に37°Cでリカバリーした。リカバリー後0、3、6、12時間後に細胞を回収し、ウエスタンブロットによりHSF1、Hsp70、Hsp27の蛋白質レベルを測定した。scramble shRNAを感染させたMeWo細胞においては、温熱処置によりHSF1はリン酸化され、リカバリー3時間後には活性が減弱していた。その一方、HSF1-2 shRNAを感染させたMeWo細胞では温熱処置、リカバリーの間ともHSF1は全く検出されなかった (Fig. 4A)。

MeWo細胞においてHSF1ノックダウンの温熱処置、化学療法への影響を検討するために、ウイルス感染後72時間に温熱処置とダカルバジン処置を行った。細胞生死判別は処置後72時間後にtrypan blue exclusionにて評価した。HSF1ノックダウンは42°C、43°Cの温熱処置への感受性を著明に増加させることが分かった (Fig. 4B)。また、温熱処置への感受性の増加は、他のメラノーマ細胞株HMV-I、HMV-IIにおいても認められた (Supplementary Fig. 1)。しかしながら、HSF1のノックダウンはダカルバジン処置への感受性には全くの影響を与えなかった (Fig. 4C)。さらに、HSF1をノックダウンしたMeWo細胞における、温熱処置と化学療法を併用した温熱化学療法の効果を検討した。42°Cの温熱処置と250µg/mlのダカルバジン処置を併用した温熱化学療法は、scramble shRNAを感染させたMeWoにおいて、温熱処置単独 (生存細胞、約72.9%) と比較して、大きく感受性を増加させた (生存細胞、約50.7%)。過去の報告では、HSF1のノックダウンにより、ヒト子宮頸癌細胞株HeLaは、温熱処置とシスプラチン処置を併用した温熱化学療法の感受性を著明に増加させることが示されているが、今回の実験では、温熱処置単独 (生存細胞、約41.1%)、温熱化学療法 (生存細胞、約36.0%) とほぼ同様の効果が観察された (Fig. 4B, D)。これらの結果より、温熱処置、化学療法、温熱化学療法は、HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞の生存に対してそれぞれ異なったメカニズムで影響を与えることが強く示唆された。

## 6 考察

多くの固形腫瘍の発生率が徐々に減少しているが、皮膚メラノーマの発生率は現在もまだ上昇しており、臨床上の大きな問題となっている<sup>1),2)</sup>。薄い病変で診断できれば、外科的切除により高い確率で治癒することができる。しかしながら、一度転移を生じると致命的となる。転移性メラノーマの標準治療は確定しておらず、様々な治療的アプローチが評価されているが、著明な生存効果は認められていない<sup>3),4)</sup>。抗癌剤ダカルバジンは転移性メラノーマの標準治療薬であるが、長期的な効果が得られる患者はごく少数である<sup>37)</sup>。今でも、メラノーマに対する温熱療法は注目される治療法であるが<sup>38),39)</sup>、温熱療法の効果は温熱により誘導されるHspsの細胞保護作用により減弱される可能性がある<sup>28),29)</sup>。それ故に、Hsps発現

の減少は癌細胞の温熱療法に対する感受性を増加させるかもしれない。ほ乳類において、主要なHspsの発現はHSF1により制御されている<sup>11)</sup>。最近の研究より、HSF1は重要な細胞機能に関わる多くの遺伝子発現を維持していると報告されている。HSF1はストレス状態で単にHspsの発現を増加させるだけでなく、細胞を生存させるために多くの遺伝子発現を制御していることが推測される<sup>34),40)</sup>。このことはHSF1が、生存維持の役割の一環として、腫瘍形成を可能にする細胞機能ネットワーク全体を調整している可能性を示唆しており、それ故にHSF1は抗癌治療の重要なターゲットになるかもしれない<sup>41)</sup>。この仮説を検証するために、shRNAによりHSF1をノックダウンし、温熱療法により誘導されるメラノーマ細胞死の効果を検討した。

MeWo細胞のHSF1蛋白質レベルはHaCat細胞と比較し2倍以上であり、Hsp蛋白質レベルはHSF1 shRNAを感染させたMeWo細胞においてのみ、若干の減少がみられることが確認された (**Fig. 1A, C**)。これらの結果はメラノーマ細胞においてHspの発現はHSF1蛋白質レベルに依存しており、HSF1を高発現する多くの種類の腫瘍が高濃度のHspsを含む理由を説明するものになるかもしれない。

HSF1 shRNAを感染させたMeWo細胞では細胞増殖能が著明に減少したが、これはHaCat細胞には認められないことが明らかとなった (**Fig. 2A, B**)。さらに、他のメラノーマ細胞株HMV-I、HMV-IIにおいても、HSF1のノックダウンにより細胞増殖能の低下を認めた (**Fig. 2C, D**)。これらの結果は以前の他の細胞を用いた報告と一致していた<sup>33)</sup>。また、MeWo細胞においてHSF1のノックダウンはウイルス感染後144時間でアポトーシスを誘導したが、これはHaCat細胞では認められなかった (**Fig. 3**)。以上の結果より、HSF1はメラノーマ細胞の増殖能、生存の維持に必要であるが、正常ヒトケラチノサイトの増殖能、生存にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。

これまでに、HSF1のノックダウンにより、ヒト子宮頸癌細胞株HeLaは、温熱処置とシスプラチン処置を併用した温熱化学療法の影響性を著明に増加させることが示されている<sup>36)</sup>。彼らの報告によれば、HSF1のノックダウンはシスプラチン単独、温熱処置単独の影響性に影響を与えなかったが、温熱処置とシスプラチン処置を併用した温熱化学療法の影響性を著明に増加させることを報告している。対照的にわれわれの研究からは、HSF1のノックダウンは、メラノーマ細胞において、ダカルバジン処置単独の影響性に影響を与えなかったが、温熱処置単独の影響性を顕著に増加させた (**Fig. 4B, C, Supplementary Fig. 1**)。重要なことは、HSF1をノックダウンしたMeWo細胞において、温熱療法とダカルバジン処置を併用した温熱化学療法の影響性は、温熱療法単独の影響性とほとんど違いがないことである。これらの結果より、温熱処置、化学療法、温熱化学療法は、HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞の生存に対してそれぞれ異なったメカニズムで影響を与えることが示唆された。



## 7 結語

我々の研究より、HSF1のノックダウンはメラノーマ細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが初めて明らかとなった<sup>42)</sup>。この結果より、HSF1のノックダウンは温熱処置を組み合わせることにより、メラノーマの有望な治療法となり得ることが示唆された。HSF1のノックダウンは正常ヒトケラチノサイトの増殖や生存に影響を与えず、この治療法はほとんど副作用を示さない可能性がある。

## 8 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を頂きました山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野の武藤正彦教授に深謝いたします。また、研究方法に関して直接ご指導とご支援を頂いた山口大学大学院医学系研究科医化学分野の中井彰教授をはじめ藤本充明講師、林田直樹助教、瀧井良祐助教に深謝いたします。また、MeWo細胞は天理よろづ相談所病院皮膚科部長森田和政先生（前山口大学大学院医学系研究科皮膚科学分野准教授）より、HMV-I、HMV-II細胞は岩手医科大学医学部病理学講座前沢千早教授から恵与されたものであり、ここに深謝します。

## 9 図の説明

**Figure 1 HSF1に対するshort hairpin (sh) RNA発現アデノウイルスによるMeWo、HaCat細胞のノックダウン。**

A MeWo、HaCat細胞にshRNA発現アデノウイルスを感染させた。scramble、HSF1-1、HSF1-2 shRNA発現アデノウイルス感染72時間後に、HSF1、Hsp蛋白質レベルをウエスタンブロットにて測定した。β-アクチンはウエスタンブロットのローディングコントロールとして使用した。

B MeWo、HaCat細胞における、HSF1-1/2 shRNAとscramble shRNAのHSF1蛋白質レベルの比較。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*\*は $P<0.01$ を示す (Student *t*-test)。

C MeWo、HaCat細胞における、HSF1-1/2 shRNAとscramble shRNAのHsp蛋白質レベルの比較。それぞれの蛋白質レベルはβ-アクチン蛋白質で補正している。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*は $P<0.05$ を示す (Student *t*-test)。

**Figure 2 HSF1のノックダウンはメラノーマ細胞の増殖能を低下させる。**

A、B shRNA発現アデノウイルス感染72時間後に、MeWo、HaCat細胞を $1 \times 10^5$ の濃度で培養プレートにまいた。示した時間に細胞数をtrypan blue exclusionにて計測した。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*\*は $P<0.01$ を示す (ANOVA)。

C HMV-I、HMV-II細胞にscramble、HSF1-1、HSF1-2 shRNA発現アデノウイルスを感染させた。感染72時間後にHSF1蛋白質レベルをウエスタンブロットにて測定した。β-アクチンはウエスタンブロットのローディングコントロールとして使用した。

D shRNA発現アデノウイルス感染72時間後に、HMV-IとHMV-II細胞を $1 \times 10^5$ の濃度で培養プレートにまいた。示した時間に細胞数をtrypan blue exclusionにて計測した。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*は $P<0.05$ 、\*\*は $P<0.01$ を示す (ANOVA)。

**Figure 3 HSF1のノックダウンはMeWo細胞のG<sub>1</sub>期での細胞周期停止を起し、アポトーシスを誘導する。**

A、C ウイルス感染72、144時間後に細胞周期をフローサイトメトリーにて解析した。MeWo細胞 (上側)、HaCat細胞 (下側) の生死割合をFacs解析のヒストグラムに示す。

B、D ウイルス感染72、144時間後に細胞周期をフローサイトメトリーにて解析した。MeWo細胞 (上側)、HaCat細胞 (下側) のG<sub>1</sub>期とsub-G<sub>1</sub>の細胞割合を示す。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*は $P<0.05$ 、\*\*は $P<0.01$ を示す (Student *t*-test)。

**Figure 4 HSF1のノックダウンはMeWo細胞の温熱感受性を増加させる。**

A scrambleとHSF1-2 shRNA発現アデノウイルス感染72時間後に、MeWo細胞に42°C1時間の温熱処置 (HS) を加え、その後37°Cでリカバリーした。リカバリーのそれぞれの時間で細胞を回収し、HSF1、Hsp70、Hsp27の蛋白質レベルをウエスタンブロットで測定した。β

-アクチンはウエスタンブロットのローディングコントロールとして使用した。

B ウイルス感染72時間後に、MeWo細胞に42もしくは43°C1時間の温熱処置を加え、37°Cでリカバリーした。処置72時間後に生存した細胞をtrypan blue exclusionにて計測した。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*\*は $P<0.01$ を示す (Student *t*-test)。

C ウイルス感染72時間後に、MeWo細胞に示した濃度のダカルバジン処置を加えた。処置72時間後に生存した細胞をtrypan blue exclusionにて計測した。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。

D ウイルス感染72時間後に、MeWo細胞に250 $\mu$ g/mlのダカルバジン投与し、2時間後に42°C1時間の温熱処置を加えた。処置72時間後に生存した細胞をtrypan blue exclusionにて計測した。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*は $P<0.05$ を示す (Student *t*-test)。

**Supplementary Figure 1 HSF1のノックダウンはHMV-I、HMV-II細胞において温熱感受性を増加させる。**

ウイルス感染72時間後に、MeWo細胞に42もしくは43°C1時間の温熱処置を加え、37°Cでリカバリーした。処置72時間後に生存した細胞をtrypan blue exclusionにて計測した。平均と標準偏差は3回の独立した実験より示した。\*は $P<0.05$ 、\*\*は $P<0.01$ を示す (Student *t*-test)。

## 10 参考文献

- [1] Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG, et al. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:824-842
- [2] Bevona C, Sober AJ. Melanoma incidence trends. *Dermatol Clin* 2002;20:589-595
- [3] Dreiling L, Hoffman S, Robinson WA. Melanoma: epidemiology, pathogenesis, and new modes of treatment. *Adv Intern Med* 1996;41:553-604
- [4] Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-3648
- [5] Crosby T, Fish R, Coles B, Mason MD. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database System Review* CD001215
- [6] Becker JC, Kampgen E, Brocker EB. Classical chemotherapy for metastatic melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25:503-510
- [7] Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in the patients with metastatic melanoma; *J Clin Oncol* 1999;17:2745-2751
- [8] Parsell DA, Lindquist S. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged protein. *Annu Rev Genet* 1993;27:437-496
- [9] Westerheide SD, Morimoto RI. Heat shock response modulators as therapeutic tools for disease of protein conformation. *J Biol Chem* 2005;280:33097-33100
- [10] Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008;319:916-919
- [11] Morimoto RI. Regulation of the heat shock transcription response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998;12:3788-3796

- [12] McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:7523-7528
- [13] Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* 2002;86:376-393
- [14] Inouye S, Katsuki K, Izu H, Fujimoto M, Sugahara K, Yamada S, et al. Activation of heat shock gene is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol Cell Biol* 2003;23:5882-5895
- [15] Tanabe M, Kawazoe Y, Takeda S, Morimoto RI, Nagata K, Nakai A. Disruption of the HSF3 gene results in severe reduction of heat shock gene expression and loss of thermotolerance. *EMBO J* 1998;17:1750-1758
- [16] Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of lifespan and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 2003;300:1142-1145
- [17] Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 2004;15:657-664
- [18] Fujimoto M, Takaki E, Hayashi T, Kitaura Y, Tanaka Y, Inouye S, et al. Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J Biol Chem* 2005;280:34908-34916
- [19] Steele AD, Hutter G, Jackson WS, Heppner FL, Borkowski AW, King OD, et al. Heat shock factor 1 regulates lifespan as distinct from disease onset in prion disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13626-13631.
- [20] Sakamoto M, Minamino T, Tiko H, Kayama Y, Zuo Y, Sano M, et al. Upregulation of heat shock transcription factor 1 plays a critical role in adaptive cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2006;99:1411-1418
- [21] Tanaka K, Namba T, Arai Y, Fujimoto M, Adachi H, Sobue G, et al. Genetic evidence for protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J Biol Chem*

2007;282:23240-23252

[22] Nakai A, Suzuki M, Tanabe M. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J* 2000;19:1545-1554

[23] Izu H, Inouye S, Fuhimoto M, Shiraishi K, Naito K, Nakai A. Heat-Shock Transcription Factor 1 Is Involved in Quality Control Mechanisms in Male Germ Cells. *Biol Reprod* 2004;70:18-24

[24] Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, Tanaka Y, Izu H, Takaki E, et al. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J* 2006;25:4773-4783

[25] Akerfelt M, Trouillet D, Mezger V, Sistonen L. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann NY Acad Sci* 2007;1113:15-27.

[26] Nakai A. Heat shock transcription factors and sensory placode development. *BMB Rep* 2009;42:631-635.

[27] Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1564-1572

[28] Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:761-772.

[29] Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006;31:164-172.

[30] Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC, Rabindran SK, et al. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2000;156:857-864.

[31] Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Wong WH, et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones* 2005;10:46-58

[32] Min JN, Huang L, Zimonjic DB, Moskophidis D, Mivechi NF. Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors.

Oncogene 2007;26:5086-5097

[33] Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell* 2007;130:1005-1018

[34] Fujimoto M, Hayashida N, Katoh T, Oshima K, Shinkawa T, Prakasam R, et al. A Novel Mouse HSF3 Has the Potential to Activate Non-classical Heat Shock Genes during Heat Shock. *Mol Biol Cell* 2010;20:106-116.

[35] Lee YJ, Lee HJ, Lee JS, Jeoung D, Kang CM, Base S, et al. A novel function for HSF1-induced mitotic exit failure and genomic instability through direct interaction between HSF1 and Cdc20. *Oncogene* 2008;27:2999-3009

[36] Rossi A, Ciafre S, Balsamo M, Pierimarchi P, Santoro MG. Targeting the Heat Shock Factor 1 by RNA interference: A Potent Tool to Enhance Hyperthermochemotherapy Efficacy in Cervical Cancer. *Cancer Res* 2006;65:7678-7685

[37] Middleton MR, Lorigan P, Owen J, Ashcroft L, Lee SM, Harper P, et al. A randomized phase III study comparing dacarbazine, BCNU, cisplatin and tamoxifen with dacarbazine and interferon in advanced melanoma. *Br J Cancer* 2000;82:1158-1162

[38] Shellman YG, Howe WR, Miller LA, Goldstein NB, Pacheco TR, Mahajan RL, et al. Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells. *J Invest Dermatol* 2008;128:949-56

[39] Sato M, Yamashita T, Ohkura M, Osai Y, Sato A, Takada T, et al. N-propionyl-cysteaminyphenol-magnetite conjugate (NPrCAP/M) is a nanoparticle for the targeted growth suppression of melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;129: 2233-2241

[40] Page TJ, Sikder D, Yang L, Pluta L, Wolfinger RD, Kodadek T, et al. Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. *Mol Biosyst* 2006;2:627-639

[41] Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:469-478

[42]Nakamura Y, Fujimoto M, Hayashida N, Takii R, Nakai A, Muto M. Silencing HSF1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in human melanoma cell lines. *J Dermatol Sci*;60:187-192

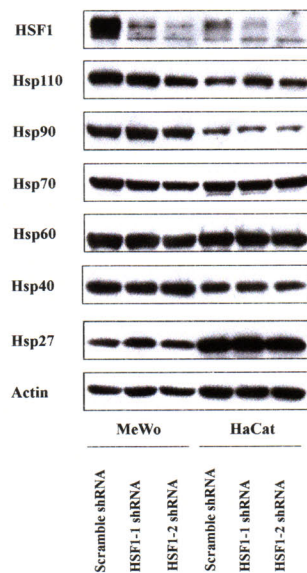


shRNA	Sense strand	Antisense strand
scramble	5'-GATCCATGTA <b>CTGGCGTGGAGACTTCAAGA</b> GAGTCTCCACGGCAGTACATTTCTTTTGGAAA-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAAAGAA <b>TGTA<b>CTGGCGTGG</b></b> AGACTCTCTTGAAGTCTCCACGGCAGTACATG-3'
HSF1-1 (1296-1316)	5'-GATCCAGC <b>CTGGCAAGAA</b> TTCAAGA GAATTTCTTCCAGGCAGGCTACTTTTGGAAA-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAAAGT <b>AGCCTGCCTGGACAA</b> GAA <b>TCTCTTGA</b> AATTTCTTCCAGGCAGGCTG-3'
HSF1-2 (2009-2029)	5'-GATCCAGG <b>TGTT</b> CATAGT <b>CAGAA</b> TTCAAGA GAT <b>TCTGACT</b> ATGAACA <b>ACTGCT</b> TTTGGAAA-3'	5'-AGCTTTTCCAAAAAAG <b>CAGGTTGTT</b> CATAGT <b>C</b> AGAATCTCTTGAAT <b>TCTGACT</b> ATGAACA <b>ACTGCTG</b> -3'

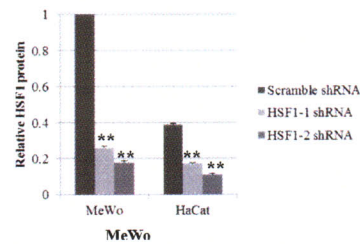
Red, Sense target sequence; Blue, Antisense target sequence

Table 1. Sense and Antisense target sequence

A



B



C

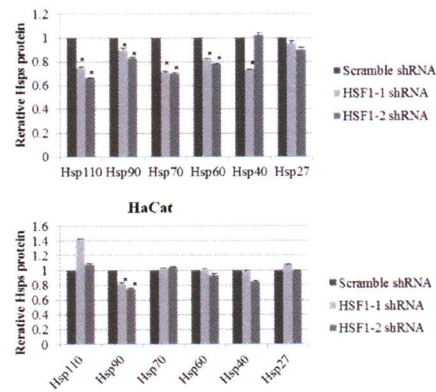


Figure 1

