

Active Hexose-correlated Compound Down-regulates HSP27 of Pancreatic Cancer Cells, and Helps the Cytotoxic Effect of Gemcitabine.

GEM 耐性膵癌細胞株における Active Hexose-correlated Compound の HSP27 発現抑制効果と GEM の抗腫瘍効果増強作用

氏名	末永 成之
所属	山口大学大学院医学系研究科 応用分子生命科学専攻 消化器病態内科学分野

平成25年12月28日

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	4
4. 方法	4
(1) 細胞株と培養条件	4
(2) 試薬	4
(3) 試料調製	5
(4) Western blot 分析	5
(5) AHCC の抗腫瘍効果	6
(6) AHCC と GEM 併用による相乗的な抗腫瘍効果	6
5. 結果	6
(1) KLM1-R における HSP27 発現に対する AHCC の効果	6
(2) KLM1-R に対する AHCC の抗腫瘍効果	8
(3) KLM1-R に対する AHCC と GEM 併用効果	8
6. 考察	9
7. 謝辞	10
8. 参考文献	10

1. 要旨

背景:担子菌由来培養抽出物である Active hexose-correlated compound (AHCC : 活性化された多糖類関連化合物) は、化学療法の治療効果増強や副作用軽減を目的とした健康食品として使用されている。我々はこれまでにプロテオーム解析を用いて膵癌細胞株において Heat shock protein 27 (HSP27) の発現上昇がゲムシタビン (GEM) 耐性に関与することを報告してきた。本研究では GEM 耐性膵癌細胞株である KLM1-R において、AHCC の HSP27 発現抑制効果ならびに AHCC と GEM の併用効果について検討を行った。

方法:AHCC 処理を行った KLM1-R に対して、Western blot 分析を用いて HSP27 の発現の変化について検討を行った。また、MTS 法を用いて AHCC と GEM 併用による抗腫瘍効果の検討も行った。

結果:AHCC は KLM1-R の HSP27 の発現を低下させ、抗腫瘍効果を示した。さらに、AHCC と GEM の併用では相乗的な抗腫瘍効果が認められた。

結論:膵癌患者において AHCC と GEM の併用療法が有効である可能性が示唆された。

2. 研究の背景

膵癌は世界における癌死の第 5 位を占めており、また、5 年生存率が 5%以下と非常に予後不良な疾患である (1)。外科治療が唯一治癒を得られる治療方法であるが、診断時に切除不能な状態まで進行している症例がほとんどである。さらに、進行例に対する有効な化学療法がないことも予後不良の一因となっている (2-4)。

ゲムシタビン (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride: GEM) はシタラビンと類似した構造と代謝を示すデオキシシチジン誘導体である。GEM が膵癌患者の生存期間を延ばし QOL を改善することが報告されて以来、多くの膵癌患者の第一選択薬として使用されている (5-8)。しかし、膵癌の GEM に対する自然耐性あるいは獲得耐性が治療の妨げとなっている (9, 10)。

我々はこれまで GEM 感受性あるいは GEM 耐性の膵癌細胞株のプロテオーム解析を行ってきた。GEM 感受性株と GEM 耐性株では多くのタンパク質の発現が異なっており、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) や Western blot 分析を用いて GEM 耐性膵癌細胞株で Heat shock protein 27 (HSP27) の発現が上昇していること同定し報告した (11, 12)。さらに、HSP27 の発現を低下あるいは

ノックダウンした GEM 耐性膵癌細胞株では GEM の抗腫瘍効果が増強されることから、HSP27 は膵癌の GEM 耐性に対して重要な役割を担っていることを示してきた (13-15)。

Active hexose-correlated compound (AHCC) は担子菌 (*Lentinula edodes* : シイタケ) 由来培養抽出物で多糖類やアミノ酸、脂質などから成っている。AHCC の主成分はアシル化 α 1,4-グルカンで、分子量が約 5000 のオリゴ糖である。AHCC は免疫調整作用や抗腫瘍効果を有しており、多くの健康上の効用があると報告されている (16, 17)。臨床研究において AHCC が頭頸部癌や進行肝癌、肺癌患者において予後や QOL を改善し、化学療法に伴う副作用を軽減したという報告がある (18-20)。

3. 目的

これまでに AHCC の HSP27 の発現に対する効果や *in vitro* での膵癌細胞株に与える影響についての報告はなく、GEM 耐性膵癌細胞株である KLM1-R を用いて AHCC の HSP ファミリーの発現に対する効果や AHCC と GEM 併用効果について検討する。

4. 方法

(1) 細胞株と培養条件

GEM 耐性膵癌細胞株 KLM1-R は九州大学大学院消化器総合外科より提供された。KLM1-R は GEM 感受性株の KLM1 に対して繰り返し GEM を暴露することで確立された GEM 耐性株であり (21)、KLM1-R は紡錘形の形態や上皮間葉転換の偽足の形成に関しても KLM1 と同等の形態を示すものである。KLM1-R は 10%ウシ胎仔血清 (56°C、30 分処理し不活化) や 2 mM L-グルタミン、1.5 g/l 重炭酸ナトリウム、10 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) 緩衝液、1mM ピルビン酸ナトリウムを含有した RPMI-1640 培地で 5% CO₂ インキュベータを用いて 37°C で培養を行った。

(2) 試薬

AHCC とシクロデキストリンは株式会社アミノアップ化学 (Sapporo, Japan) より提供された。シクロデキストリンは AHCC の賦形剤であり、対照実験のために使用した。GEM は日本イーライリリー株式会社 (Kobe, Japan) より取得した。

(3) 試料調製

KLM1-R を各濃度の AHCC (0, 1, 5, 10 mg/ml) で 48 時間処理を行った。処理後の細胞を Lysis buffer (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5), 165 mM 塩化ナトリウム, 10 mM フッ化ナトリウム, 1 mM バナジン酸ナトリウム, 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF), 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 10 µg/ml アプロチニン, 10 µg/ml ロイペプチン, and 1% ノニルフェノキシポリエトキシエタノール-40 (NP-40)) を用いて氷上で溶解した。懸濁液を 4°C で 1 時間処理し、遠心分離器 (15,000 ×g, 30 分間, 4°C) で分離した。上清を採取し Lowry 法で蛋白濃度を計測し、Western blot 分析に使用した (22)。試料は各々 3 回調製を行った。

(4) Western blot 分析

調製した蛋白質試料 20 µg を Western blot 分析で使用した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にはプレキャストゲル (12% アクリルアミド; Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用した。電気泳動後のゲルはポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Immobilon-P; Millipore, Bedford, MA, USA) に転写し、5%スキムミルク含有トリス塩酸緩衝液 (TBS) で一晚ブロッキング (4°C) を行った。抗マウス HSP27 モノクローナル抗体 (dilution 1:200, #sc-13132 (F-4); Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗ウサギ HSP60 ポリクローナル抗体 (dilution 1:5000, ab46798; Abcam, Cambridge, MA, USA)、抗ヤギ HSP70 ポリクローナル抗体 (dilution 1:200, #sc-1060 (K-20); Santa Cruz Biotechnology)、抗マウス HSC70 (heat shock cognate 71 kDa protein) モノクローナル抗体 (dilution 1:200, #sc-7298 (B-6); Santa Cruz Biotechnology)、抗ヤギ GRP78 (78 kDa glucose-regulated protein) ポリクローナル抗体、抗ヤギ Actin ポリクローナル抗体 (dilution 1:200, #sc-1616 (I-19); Santa Cruz Biotechnology) を一次抗体として使用した。転写後の PVDF 膜を一次抗体と 4°C で一晚反応させた後に、0.05% Tween-20 含有 TBS で 3 回、TBS で 1 回洗浄し、室温で Horseradish peroxidase 標識二次抗体 (dilution 1:10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) と 1 時間反応させた。HSP27, HSP60, HSC70, GRP78, actin のバンドは増感化学発光試薬 (ImmunoStar Long Detection; Wako, Osaka, Japan) を用いて可視下し、イメージング機器である LAS-1000 Pro (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) を用いて記録した (23-27)。AHCC 処理を行った KLM1-R における HSP27 および actin の発現量はそれぞれのバンドの強度を

Multi Gauge ver3.0 software (Fujifilm Corporation) を用いて測定し定量化した。AHCC 処理を行った KLM1-R の統計学的有意性は一元配置分散分析を用いて検定した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。統計処理には JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用した。

(5) AHCC の抗腫瘍効果

RPMI-1640 培地に浮遊させた KLM1-R を 96 ウェルプレートに 2×10^3 cell/well ずつ入れ 24 時間培養した。各濃度 (0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml) の AHCC あるいはシクロデキストリンを添加し 72 時間培養を行った。培養後、各ウェルに 20 μ l の MTS (テトラゾリウム化合物、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega Co., Madison, WI, USA) を加えた。2 時間反応させ、microtiter plate reader (Model 550 Microplate Reader; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて溶解物質の 490 nm の吸光度を測定した。独立した 3 セットを用いて結果を測定し、再現性を確認した。AHCC あるいはシクロデキストリン処理を行った KLM1-R の増殖率についての統計学的有意性は Student's *t*-test を用いて検定し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

(6) AHCC と GEM 併用による相乗的な抗腫瘍効果

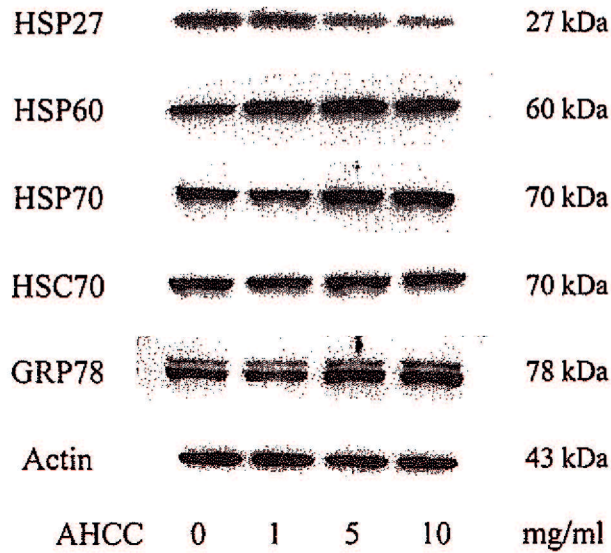
RPMI-1640 培地に浮遊させた KLM1-R を 96 ウェルプレートに 2×10^3 cell/well ずつ入れ 24 時間培養し、各濃度 (0 or 2 mg/ml) の AHCC を添加し 48 時間培養した。その後、各濃度 (0 or 25 ng/ml) の GEM を添加し 72 時間処理を行った。培養後、各ウェルに 20 μ l の MTS を加えて、2 時間後に microtiter plate reader (Model 550 Microplate Reader) で溶解物質の 490 nm の吸光度を測定した。独立した 3 セットを用いて結果を測定し、再現性を確認した。AHCC と GEM 処理を行った KLM1-R の細胞増殖率についての統計学的有意性は一元配置分散分析と二元配置分散分析を用いて検定し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

5. 結果

(1) KLM1-R における HSP27 発現に対する AHCC の効果

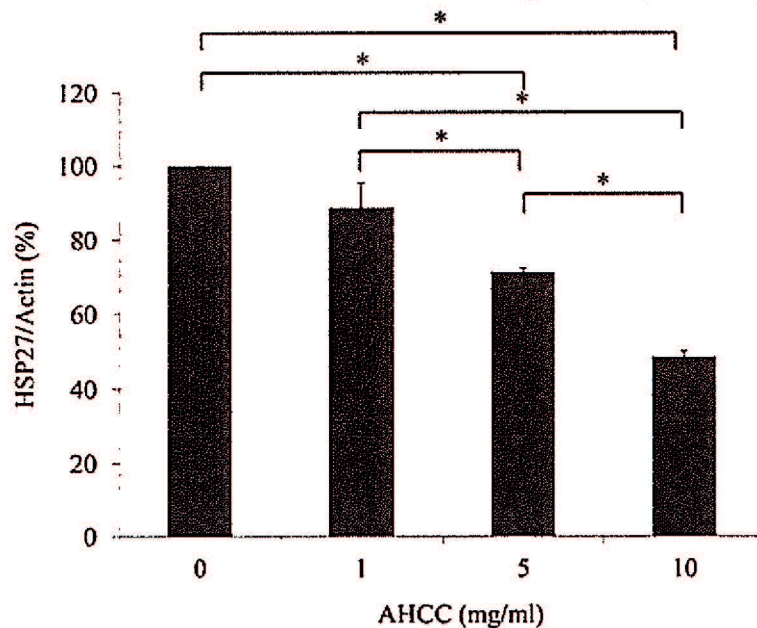
KLM1-R の細胞内タンパク質を HSP27、HSP60、HSP70、HSC70、GRP78、actin に対する一次抗体を用いて Western blot 分析を行った。KLM1-R に対して AHCC 処理を行うことで HSP27 の発現は減少した。一方、HSP60、HSP70、HSC70、GRP78、actin の発現に変化は見られなかった (図 1)。

図1 AHCC処理を行ったKLM1-RにおけるHSPファミリータンパクの発現
KLM1-R



AHCC未処理のKLM1-Rのactinに対するHSP27の発現比(HSP27/actin)を100%とすると、1、5、10 mg/mlのAHCC処理を行ったKLM1-RのHSP27/actinはそれぞれ $88.7 \pm 6.6\%$ 、 $71.5 \pm 0.9\%$ 、 $48.6 \pm 1.6\%$ であった。AHCC処理によって濃度依存的にKLM1-RのHSP27発現を減少させることが示された(図2)。

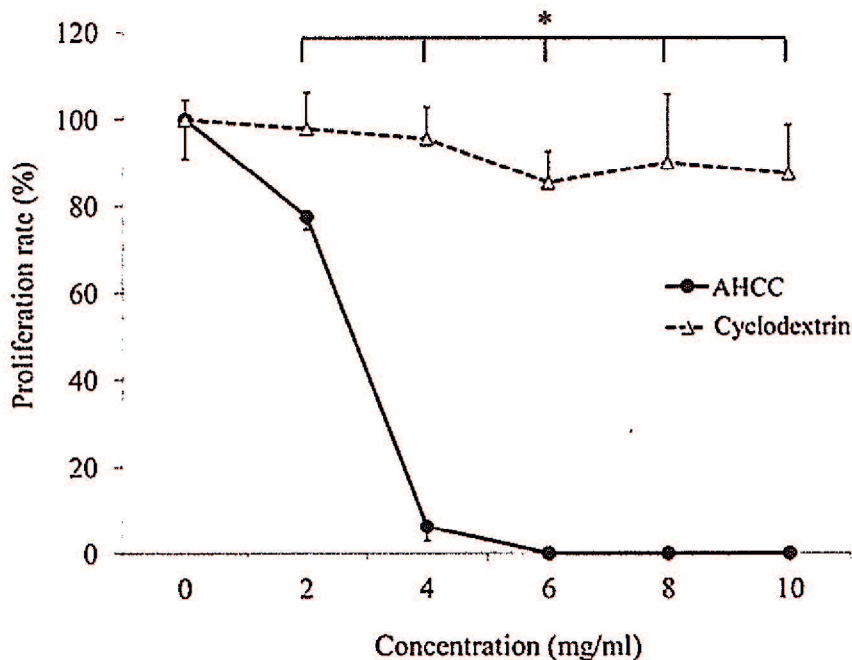
図2 AHCC処理によるHSP27/actinの発現 (* $p < 0.01$ by one-way ANOVA)



(2) KLM1-R に対する AHCC の抗腫瘍効果

AHCC が KLM1-R に対する抗腫瘍効果を有するか評価するために、AHCC あるいはシクロデキストリンを培地に添加し、MTS 法を用いて細胞増殖率を測定した。AHCC あるいはシクロデキストリン未処理の KLM1-R の増殖率を 100% とした。2、4 mg/ml の AHCC で処理を行った KLM1-R の細胞増殖率はそれぞれ $77.5 \pm 2.9\%$ 、 $6.3 \pm 3.4\%$ であり、6、8、10 mg/ml の AHCC では 0% であった。2、4、6、8、10 mg/ml のシクロデキストリン処理を行った KLM1-R の細胞増殖率はそれぞれ $97.9 \pm 8.4\%$ 、 $95.6 \pm 7.3\%$ 、 $85.4 \pm 7.3\%$ 、 $90.2 \pm 15.7\%$ 、 $87.5 \pm 11.3\%$ であった。シクロデキストリンは KLM1-R に対して抗腫瘍効果を示さないのに対して、AHCC が KLM1-R に対して抗腫瘍効果を持つことが示された (図 3)。

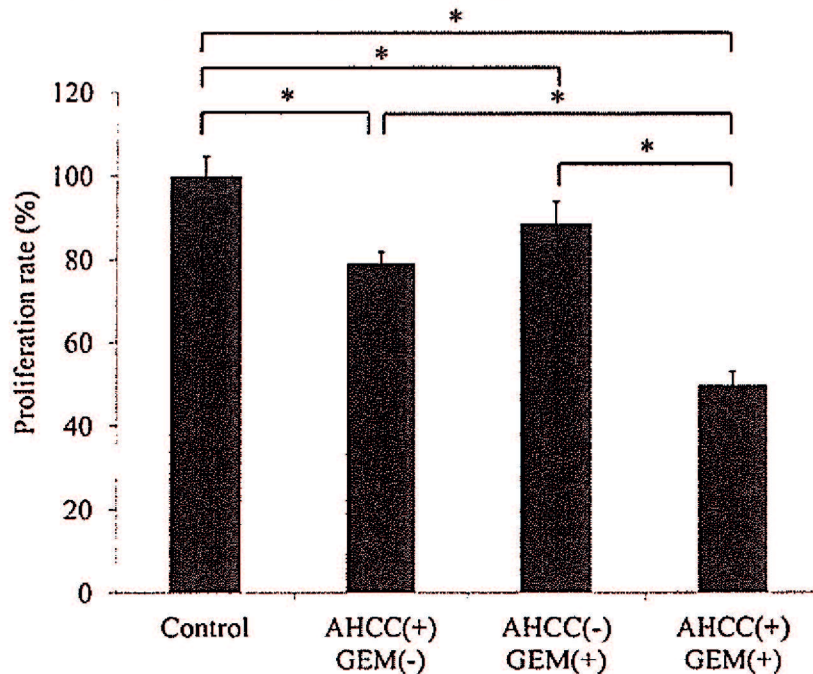
図 3 KLM1-R に対する AHCC の抗腫瘍効果 (* $p < 0.01$ by Student's *t*-test)



(3) KLM1-R に対する AHCC と GEM 併用効果

GEM 耐性膀胱癌細胞株である KLM1-R に対する AHCC と GEM の併用効果を MTS 法を用いて評価した。図 4 に AHCC 単独群、GEM 単独群、AHCC と GEM 併用群、対照群の細胞増殖率を示した。AHCC 単独群あるいは GEM 単独群と比較して AHCC と GEM 併用群は有意に細胞増殖率を低下させ、抗腫瘍効果を示した (一元配置分散分析)。さらに、二元配置分散分析では、AHCC と GEM の併用効果は相乗的であった ($p = 0.0008$)。

図4 KLM1-R における AHCC と GEM 併用による抗腫瘍効果
(AHCC(+):2 mg/ml, GEM(+):25 ng/ml, * $p < 0.01$ by one-way ANOVA)



6. 考察

HSP27 は低分子量熱ショック蛋白のひとつで、分子シャペロン機能を持っており、適切なタンパク質構造の維持や変性したタンパク質のフォールディングを行う作用を持っている (28-30)。また、HSP27 は Akt (プロテインキナーゼ B) や p53、NF- κ B (nuclear factor-kappa B) などを含むアポトーシス経路に作用するタンパク質を調節する機能も持っている (31)。さらに、多くの癌種において HSP27 の過剰発現が薬剤耐性や予後不良に関与すると報告されている (32-40)。我々もこれまでに、GEM 感受性膀胱癌細胞株と比較して GEM 耐性膀胱癌細胞株における HSP27 の発現が上昇していることを報告してきた (11, 12)。Hsu らはケルセチンが肺癌細胞の HSP27 の発現を抑制し、シスプラチンや GEM と併用する事で肺癌細胞の活性を低下させると報告している (41)。また、Heinrich らはプロモビニルデオキシウリジン (RP101) が HSP27 の機能を抑制し、ラット肉腫細胞のシスプラチン耐性を軽減させると報告している (42)。これらの報告は HSP27 の発現低下が化学療法に対する感受性を増強させる可能性を示している。実際、我々もこれまでに IFN- γ や KNK437 (*N*-formyl-3,4-methylenedioxy-benzylidene- γ -butyrolactam) を用いる事で GEM 耐

性膵癌細胞株である KLM1-R の HSP27 の発現を低下させ、GEM の感受性を増強させることを報告してきた(13, 14)。

AHCC の安全性については癌患者や健常者に対して幅広く検討されている (43-45)。AHCC が化学療法に伴う副作用を軽減させるという報告がいくつかあり、Nakamoto らは AHCC が非担癌マウスにおいて GEM による血液毒性が軽減したと報告している (46)。また、Sun らは AHCC がマウスにおいてシタラビンによる脱毛や 6-メルカプトプリンとメトトレキサートによる肝障害を軽減したと報告している (47)。さらに、AHCC はラット乳癌由来細胞 (SST-2) に対するテガシール・ウラシルの効果やマウス大腸癌由来細胞 (Colon-26) に対するシスプラチンの効果を増強させたという報告もある (48, 49)。

本実験では GEM 耐性膵癌細胞株において AHCC が HSP27 の発現を低下させ、GEM と併用することにより相乗的な抗腫瘍効果を有することが示された。現時点では AHCC が HSP27 の発現を低下させる分子メカニズムは不明であるが、AHCC を化学療法と併用することの有効性が示唆された。AHCC の機能に対するさらなる研究が必要であることは明らかであるが、本実験により AHCC と GEM 併用療法が膵癌患者に対する治療上の有用性を持つ可能性が示唆された。

7. 謝辞

本論文は文部科学省科学研究費 (no. 24501352 to Yasuhiro Kuramitsu) による助成を受けたものである。免疫ブロット法では山口大学遺伝子実験施設の LAS-1000 を使用した。本著者に開示すべき利益相反に相当する事項はない。

8. 参考文献

1. Raimondi S, Maisonneuve P and Lowenfels A: Epidemiology of pancreatic cancer. An overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6: 699-708, 2009.
2. Williamson RC: Pancreatic cancer: The greatest oncological challenge. *Br Med J* 13: 445-446, 1988.
3. Gordis L and Gold EB: Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Surg* 8: 808-821, 1984.
4. Nesse A, Michl P, Frese KK, Fieg C, Cook N, Jacobetz MA, Lolkema MP, Buchholz M, Olive KP, Gress TM and Tuveson DA: Stromal biopsy and therapy in pancreatic cancer. *Gut* 60: 861-868, 2011.
5. Burris HA, Moore MJ III, Andersen J, Green MR, Rothernberg ML, Modiano MR,

- Cripps MC, Potenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD and Von Hoff DD: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol* 15: 2403-2413, 1997.
6. Tada M, Arizumi T, Nakai Y, Sasaki T, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Tsujino T, Hirano K, Sasahira N, Isayama H, Kawabe T and Omata M: Efficacy of gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer: Comparison with 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy. *Chemotherapy* 54: 302-308, 2008.
 7. Kim H, Park JH, Shin SJ, Kim MJ, Bang SJ, Park NH, Nah YW, Nam CW, Joo KR and Min YJ: Fixed dose rate infusion of gemcitabine with oral doxifluridine and leucovorin for advanced unresectable pancreatic cancer: A phase II study. *Chemotherapy* 54: 54-62, 2008.
 8. Warsame R and Grothey A: Treatment options for advanced pancreatic cancer: A review. *Expert Rev Anticancer Ther* 12:1327-1336, 2012.
 9. Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H and Buchler MW: Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology* 62: 354-362, 2002.
 10. Carmichael J, Fink U, Russell RC, Spittle MF, Harris AL, Spiessi G and Blatter J: Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1-5, 1996.
 11. Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Mikuriya K, Fujimoto M, Maehara S, Maehara Y, Okita K, Nakamura K and Sakaida I: Proteomics finding heat-shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Int J Oncol* 31: 1345-1350, 2007.
 12. Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Taba K, Fujimoto M, Okita K, Nakamura K and Sakaida I: A proteomic profiling of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cell lines. *Mol Med Rep* 1: 429-434, 2008.
 13. Mori-Iwamoto S, Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Okita K, Nakamura K and Sakaida I: Interferon- γ down-regulates HSP27 of pancreatic cancer cells, and helps the cytotoxic effect of gemcitabine. *Pancreas* 38: 224-226, 2009.
 14. Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Yoshida K, Tanaka T, Mori-iwamoto S, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I and Nakamura K: KNK437 down-regulates heat-shock

- protein 27 of pancreatic cancer cells and enhances the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy* 57: 12-16, 2011.
15. Kuramitsu Y, Wang Y, Taba K, Suenaga S, Ryozaawa S, Kaino S, Sakaida I and Nakamura K: Heat-shock protein 27 plays the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 32: 2295-2299, 2012.
 16. Kidd P: The use of mushrooms glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev* 5: 4-27, 2000.
 17. Shah SK, Walker PA, Moore-Olufemi SD, Kulkarni AD and Andrassy RJ: An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient. *J Parenter Enteral Nutr* 35: 449-458, 2011.
 18. Cowawintaweewat S, Manoromana S, Sriplung H, Khyhaprema T, Tongtawe P, Tapchaisri P and Chaicumpa W: Prognostic improvement of patients with advanced liver cancer after active hexose correlated compound (AHCC) treatment. *Asian Pac J Allergy Immunol* 24: 33-45, 2006.
 19. Parida DK, Wakame K and Nomura T: Integrating complimentary and alternative medicine in form of active hexose correlated compound (AHCC) in the management of head and neck cancer patients. *Int J Clin Med* 2: 588-592, 2011.
 20. Ishizuka R, Fujii H, Miura T, Fukuchi Y and Tajima K: Personalized cancer therapy for stage IV non-small cell lung cancer: Combined use of active hexose correlated compound and genistein concentrated polysaccharide. *Pers Med Univers* 1: 39-44, 2012.
 21. Maehara S, Tanaka S, Shimada M, Shirabe K, Saito Y, Takahashi K and Maehara Y: Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 112: 184-189, 2004.
 22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
 23. Kuramitsu Y, Harada T, Takashima M, Yokoyama Y, Hidaka I, Iizuka N, Toda T, Fujimoto M, Zhang X, Sakaida I, Okita K, Oka M and Nakamura K: Increased expression and phosphorylation of liver glutamine synthetase in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues of patients infected with hepatitis C virus. *Electrophoresis* 27: 1651-1658, 2006.
 24. Tamesa M, Kuramitsu Y, Fujimoto M, Maeda N, Nagashima Y, Tanaka T, Yamamoto S, Oka M and Nakamura K: Detection of autoantibodies against

- cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* 30: 2168-2181, 2009.
25. Kuramitsu Y, Baron B, Yoshino S, Zhang X, Tanaka T, Yashiro M, Hirakawa K, Oka M and Nakamura K: Proteomic differential display analysis shows up-regulation of 14-4-4 protein sigma in human scirrhus-type gastric carcinoma cells. *Anticancer Res* 30: 4459-4465, 2010.
 26. Kuramitsu Y, Hayashi E, Okada F, Tanaka T Zhang X, Ueyama Y and Nakamura K: Proteomic analysis for nuclear proteins related to tumour malignant progression: A Comparative proteomic study between malignant progressive cells and regressive cells. *Anticancer Res* 30: 2093-2099, 2010.
 27. Kuramitsu Y, Takashima M, Yokoyama Y, Lizuka N, Tamesa T, Akada JK, Wang Y, Toda T, Sakaida I, Okita K, Oka M and Nakamura K: Up-regulation of 42 kDa tubulin α -6 chain fragment in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Anticancer Res* 31: 3331-3336, 2011.
 28. Jakob U, Gaestel M, Engel K and Buchner J: Small heat-shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268, 1517-1520, 1993.
 29. Carver JA, Rekas A, Thorn DC and Wilson MR: Small heat-shock proteins and clusterin: Intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB Life* 55, 661-668, 2003.
 30. Bryantsev AL, Kurchashova SY, Golyshev SA, Polyakov VY, Wunderink HF, Kanon B, Budagova KR, Kabakov AE and Kampinga HH: Regulation of stress-induced intracellular sorting and chaperone function of Hsp27 (HspB1) in mammalian cells. *Biochem J* 407: 407-417, 2007
 31. Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR and Klein JB: Heat-shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. *J Biol Chem* 278: 27828-27835, 2003.
 32. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP and Solary E: HSP27 inhibits cytochrome *c*-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J* 13: 2061-2070, 1999.
 33. Hansen RK, Parra I, Lemieux P, Oesterreich S, Hilsenbeck SG and Fuqua SA: HSP27 overexpression inhibits doxorubicin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 56: 187-196, 1999.
 34. Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP and Fitzpatrick JM: Heat-shock

- proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate* 45: 58-65, 2000.
35. Urbani A, Poland J, Bernardini S, Bellincampi L, Biroccio A, Schnölzer M, Sinha P and Federici G: A proteomic investigation into etoposide chemoresistance of neuroblastoma cell lines. *Proteomics* 5: 796-804, 2005.
 36. Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL and Fuqua SA: Biological and clinical implications of heat-shock protein 27,000 (Hsp27): A review. *J Natl Cancer Inst* 85: 1558-1570, 1993.
 37. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, Neoptolemos JP, Ke Y and Foster CS: Heat-shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 60: 7099-7105, 2000.
 38. Romanucci M, Marinelli A, Sarli G and Della Salda L: Heat-shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer* 6: 171, 2006.
 39. Bauer K, Nitsche U, Slotta-Huspenina J, Drecoll E, von Weyherm CH, Rosenberg R, Höfler H and Langer R: High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer. *Cell Oncol* 35: 197-205, 2012.
 40. Kang SH, Kang KW, Kim KH, Kwon B, Kim SK, Lee HY, Kong SY, Lee ES, Jang SG and Yoo BC: Up-regulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing HER2 protein stability. *BMC Cancer* 8: 286, 2008.
 41. Hsu HS, Lin JH, Huang WC, Hsu TW, Su K, Chiou SH, Tsai YT and Hung SC: Chemoresistance of lung cancer stem-like cells depends on activation of Hsp27. *Cancer* 117: 1516-1528, 2011.
 42. Heinrich JC, Tuukkanen A, Schroeder M, Fahrig T and Fahrig R: RP101 (brivudine) binds to heat-shock protein HSP27 (HSPB1) and enhances survival in animals and pancreatic cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 137: 1349-1361, 2011.
 43. Spierings EL, Fujii H, Sun B and Walshe T: A phase I study of the safety of the nutritional supplement, active hexose correlated compound, AHCC, in healthy volunteers. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 536-539, 2007.
 44. Terakawa N, Matsui Y, Satoi S, Yanagimoto H, Takahashi K, Yamamoto T, Yamao

- J, Takai S, Kwon AH and Kamiyama Y: Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: A double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr Cancer* 60: 643-651, 2008.
45. Matsui Y, Uhara J, Satoi S, Kaibori M, Yamada H, Kitade H, Imamura A, Takai S, Kawaguchi Y, Kwon AH and Kamiyama Y: Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: a prospective cohort study. *J Hepatol* 37: 78-86, 2002.
 46. Nakamoto D, Shigama K, Nishioka H and Fujii H: Active hexose correlated compound (AHCC) alleviates gemcitabine-induced hematological toxicity in non-tumor-bearing mice. *Int J Clin Med* 3: 361-367, 2012.
 47. Sun B, Wakame K, Sato E, Nishioka H, Aruoma OI and Fujii H: The effect of active hexose correlated compound in modulating cytosine arabinoside-induced hair loss, and 6-mercaptopurine- and methotrexate-induced liver injury in rodents. *Cancer Epidemiol* 33: 293-299, 2009.
 48. Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, Obata M, Kobayashi M, Li YQ and Hosokawa M: Combination therapy of active hexose-correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer drugs* 9: 343-350, 1998.
 49. Hirose A, Sato E, Fujii H, Sun B, Nishioka H and Aruoma OI: The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 222: 152-158, 2007.