

ヒト膵臓がん細胞の抗がん剤耐性に関する研究

氏名 徳永 雅之

所属 山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 システムズ再生・病態医化学

平成 31 年 1 月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2-3
3. 目的	4
4. 材料および方法	
(1) 材料	4
(2) 方法	4-6
(3) 統計解析	6
5. 結果および図表	
(1) 結果	7-9
(2) 図表	10-19
6. 考察	20-22
7. 結語	23
8. 謝辞	23
9. 参考文献	24-29

1. 要旨

膵臓がんは、最も予後の悪いがんの一つで、日本における 5 年生存率は 8%未満である。抗がん剤のゲムシタビンは、膵がんの標準治療薬である。ほとんどの症例で抗がん剤耐性のがん細胞が出現することが、予後が悪い原因のひとつである。当研究室では、抗がん剤耐性ヒト膵臓がん細胞株 KLM1-R において、熱ショックタンパク質 HSP27 が、ゲムシタビン耐性に関与することを報告している。また最近、転写共役因子である YAP の過剰な発現が、がん細胞の抗がん剤代謝を低下させることが報告された。しかし、KLM1-R において HSP27 の上流分子の HSF1 の発現の挙動は不明である。また、抗がん剤耐性獲得と YAP および YAP を制御する Hippo 経路分子の発現の挙動の関係については不明である。さらに当研究室では、Active Hexose Correlated Compound (AHCC®)が、KLM1-R において、HSP27 の発現を抑制し、ゲムシタビンの細胞傷害効果を増強することを報告している。しかし、AHCC®がどのようにしてゲムシタビンの細胞傷害効果を増強するのか不明である。

そこで本研究では、ゲムシタビン感受性ヒト膵臓がん細胞株 KLM1 と耐性株 KLM1-R を用いて、抗がん剤耐性獲得機序の解析と AHCC®が与える抗がん剤の細胞傷害増強効果の作用機序の解明を行った。KLM1-R は、KLM1 と比較して HSF1 の発現が上昇していた。また、Hippo 経路分子の LATS1 が活性化し、YAP 転写活性が減少していた。同時に、ゲムシタビンの代謝に重要な CDA 遺伝子の発現が上昇していた。また AHCC®処理は、KLM1-R において HSF1 と YAP の発現および CDA の発現を減少させた。

以上の結果より、ヒト膵臓がん細胞は、ゲムシタビンに暴露されることで、HSF1 の発現が上昇し、YAP の転写活性が減少するために、HSP27 の発現上昇とゲムシタビン代謝が亢進する結果、ゲムシタビン耐性を獲得する可能性がある。今後、YAP-Hippo 経路や HSF1-HSP27 経路が、がん細胞の抗がん剤耐性獲得にどのように寄与しているのかさらに解析する必要がある。また AHCC®は抗がん剤耐性獲得を抑制するため、AHCC®とゲムシタビンとの併用療法は、有効な治療候補であると考えられる。

2. 研究の背景

膵臓がんは、最も予後の悪いがんの一つで、日本における 5 年生存率は 8%未満である (1-3)。根治的治療のためには外科的切除が必要であるが、膵臓がんは早期発見が難しく、約 8 割が進行した切除不可能なステージで発見される (4)。約 2 割の患者が切除可能と診断されるが (5)、その後の 2/3 が再発し 5 年生存率は 25%である (3)。しかし今のところ早期発見のための有用なバイオマーカーは存在しない。外科的治療以外の治療選択として、放射線治療や化学療法がある。抗がん剤の一つであるゲムシタビン (2', 2'-difluorodeoxycytidine, dFdC)は膵がん患者のための標準治療薬である (6)。しかしながら、抗がん剤耐性のがん細胞の出現により、抗がん剤治療の効果が十分に得られないことが問題となっている (7)。

抗がん剤耐性は主に自然耐性と獲得耐性の二つに分けられる (8)。自然耐性とは、がん細胞がもともと抗がん剤耐性を持っていることである。一方で、獲得耐性とは、感受性のがん細胞が抗がん剤に暴露されることで、遺伝子の変異やエピジェネティクスな変化による獲得する耐性である。加えて、がん組織はヘテロな集団から構成されており、抗がん剤に暴露されることで抗がん剤耐性の少数の細胞が選択される結果、抗がん剤耐性が現れる (9)。獲得耐性では、抗がん剤の分子標的やその分子標的の下流のシグナルに変異が入ることで抗がん剤耐性になる (10)。また、抗がん剤の代謝や細胞外への排出機構も抗がん剤耐性の一因である (11)。シチジンデアミナーゼ (CDA)はゲムシタビンの代謝に重要である。細胞内に取り込まれたゲムシタビンは、リン酸化修飾を受けることにより活性体となる (2', 2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate, dFdCTP)。一方で、CDA により不活性体であるウラシル体 (2', 2'-difluorodeoxyuridine, dFdU)に代謝されると細胞外に排出される (図 1, 12, 13)。しかしながら、抗がん剤耐性獲得の詳細な分子メカニズムは明らかとなっていない。

転写共役因子である YAP とそのパラログ遺伝子 TAZ は多くのがんで発現上昇している (14)。YAP は核内で TEAD 等の転写因子と結合し標的遺伝子の転写を活性化する。YAP の転写活性は主に上流の Hippo 経路による翻訳後修飾により制御されている (図 2, 15)。Hippo 経路分子の一つである LATS1 または LATS2 は、リン酸化され活性化すると、下流の YAP をリン酸化する。リン酸化された YAP が核外に保持または分解されるために核内の YAP 量が減少し、YAP の活性が抑制される (図 3, 16)。YAP は細胞増殖、細胞死や再生および組織サイズの制御や 3 次元臓器の立体構築に必要である (図 4, 17-20)。しかし一方で、YAP の異常な活性化はがんを生じさせる (図 4, 21)。さらに Hippo-YAP 経路は抗がん剤耐性に寄与すると報告がある (図 4, 22)。Hippo 経路の不活性化や YAP の過剰な発現による細胞増殖の増加や細胞死の抑制の結果、抗がん剤耐性を獲得すると考えられている (23)。従って YAP は、がんの重要な分子標的である (24)。しかしながらこれまでに、YAP の活性化により抗がん剤の代謝や細胞外への排出が亢進した報告はない。

当研究室では、ゲムシタビン耐性ヒト膵臓がん細胞において発現上昇しているタンパク質を多数同定している。ゲムシタビン感受性ヒト膵臓がん細胞株 KLM1 と、KLM1 細胞から樹立されたゲムシタビン耐性ヒト膵臓がん細胞 KLM1-R を用いて抗がん剤耐性獲得機序について解析を行ってきた。KLM1 細胞と KLM1-R 細胞の発現タンパク質を、2次元電気泳動法を用いて比較解析することにより、KLM1-R 細胞で発現上昇しているタンパク質の一つとして、熱ショックタンパク質 27 (HSP27)が同定されている (25, 26)。さらに、KLM1-R 細胞において、HSP27 の発現低下はゲムシタビンの細胞毒性作用を高めることから、HSP27 がゲムシタビン耐性に関与することを報告してきた (27-29)。

Heat shock factor 1 (HSF1)は HSP27 を含む熱ショックタンパク質の転写調節因子である (30)。最近、HSF1 が多くのヒトのがんにおいて増加しており、がん細胞の増殖のために必要であることが報告されている (21-33)。また、HMGB1 も HSP27 の調節因子の一つであり (34)、当研究室では、ゲムシタビン耐性膵臓がん細胞株 KLM1-R において HMGB1 が上昇していることを報告している (35)。また、HMGB1 の欠失は抗がん剤感受性を高めることが報告されている (36, 37)。しかし、KLM1-R 細胞において、HSF1 が上昇しているか否かについての報告はこれまでにない。

また、当研究室では Active Hexose Correlated Compound (AHCC®)による、ヒト膵臓がん細胞に対するゲムシタビンの細胞傷害効果の増強に関する研究を行ってきた。AHCC®は *Lentinula edodes mycelia* の抽出物である。その成分としては、多糖類、アミノ酸、脂質、ミネラルが含まれており、オリゴ糖および α 1,4-グルカンが大部分を占める。AHCC®は、免疫調節作用および抗腫瘍作用が報告されている (38)。当研究室では以前、AHCC®がゲムシタビン耐性に関与する HSP27 を低下させることを示した。同時に、AHCC®が、ゲムシタビン耐性ヒト膵臓がん細胞に対して、ゲムシタビンの細胞傷害効果を増強することを報告した (39)。しかし、AHCC®がどのようにして HSP27 の発現を低下させるのかは明らかではない。また、AHCC®がゲムシタビンの細胞傷害効果をどのようにして増強させるのかその詳細は不明である。

そこで本研究では、ゲムシタビン感受性ヒト膵臓がん細胞株 KLM1 とゲムシタビン耐性細胞株 KLM1-R を用いて、抗がん剤耐性獲得機序の解析と AHCC®が与える抗がん剤の細胞傷害増強効果の作用機序の解明を行った。

3. 目的

ヒト膵臓がん細胞株を用いて、膵臓がん細胞における抗がん剤耐性獲得機序の解析と AHCC®が与える抗がん剤の細胞傷害増強効果の作用機序の解明を行う。

4. 材料および方法

(1) 材料

以下の四つの膵臓がん細胞株を用いた。抗がん剤感受性細胞株として、KLM1 および Panc1 を用いた。耐性細胞株として、KLM1-R および PK45p を用いた。培養細胞株は、RPMI-1640 培地 (189-02025, Wako) に 10% FBS とペニシリンーストレプトマイシン溶液 (168-23191, Wako)を加えたものを使用した。KLM1-R 細胞は九州大学大学院消化器・総合外科から分与していただいた。KLM1-R 細胞は、KLM1 細胞をゲムシタビン処理することにより樹立された株である (40)。

担子菌抽出物 AHCC®は、株式会社アミノアップ化学 (札幌, 日本)から分与を受けた。RPMI-1640 培地に 10 mg/mL になるように溶解し、Millex®-GS 0.22 μm (SLGV033RS, Merck)を用いて滅菌処理を行った。

(2) 方法

(2.1) タンパク質抽出液の調整法

タンパク質は、細胞溶解液として RIPA buffer [0.5% sodium deoxycholate, 1% nonyl phenoxypolyethoxyethanol-40 (NP-40), 150 mM NaCl, 0.01% SDS, 50 mM Tris-HCl, 10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin]を用いて抽出した。培地を吸引後 PBS (-)で一度洗浄した。その後、PBS (-)をすべて除去し、RIPA buffer を加えセルスクレーパーで細胞をこそぎ落とし、1.5 mL チューブにすべて移した。超音波処理 (15%, 10sec x 2回)を行った後、21,500 x g で 4°C、20 分間遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移したものをサンプルとした。または、培養した細胞を Trypsin-EDTA で剥離し、すべて 50 mL の遠沈管に移し、2000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清をすべて取り除き溶解緩衝液 [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 165 mM sodium chloride, 10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 10 mM ethylenediaminetetraacetic-acetic acid, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, and 1% NP-40]を加えた。懸濁液を 1 時間、4°C で攪拌しながら溶解した後、21,500 x g で 4°C、20 分間遠心分離した。上清新しい 1.5 mL チューブに移したものをサンプルとした。サンプルは解析まで -80°C で保管した。サンプル内の総タンパク質の濃度は、Lowry protein assay で測定した (41)。

(2.2) イムノブロット法

タンパク抽出溶液 15 μg を、SuperSeq™ Ace, 5-20%, 13well (197-15011, Wako)を用いて SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)により分離した。SDS-PAGE により分離したタンパク質を 0.45 μm PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride; Immobilon®-P membrane, IPVH00010, Millipore)に転写した。メンブレンは、室温で1時間のブロッキング (5% skim milk / TBS)を行った。0.02% Tween-20 を含む TBS で洗浄後、一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。二次抗体として、Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories)を用いた。ImmunoStar LD (290-69904, Wako)または ImmunoStar Zeta (295-72404, Wako)を用いて化学発光を、LAS-1000 system (Fuji Film)または Amersham Imager (GE healthcare)で検出した。各バンドの強度は ImageQuant TL (GE Healthcare)を用いて解析した。内部標準として Actin または GAPDH を用いた。用いた1次抗体は表1に示す。

(2.3) 細胞免疫蛍光染色法

培養細胞を、4% PFA (paraformaldehyde, Wako)を用いて固定した。固定された細胞を 0.1% Triton X-100 により透過処理を行った。5% Normal Goat Serum [10% Normal Goat Serum (50062Z, Invitrogen)を 1xPBS (-)で希釈した]でブロッキングを行った。一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11008, Invitrogen)を用い、室温、遮光下で1時間反応させた。対比染色として 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 045-30361, Wako)で核染色を行った。像は、BZ-9000 series (BIOREVO, Keyence)、BZ-II Viewer software (Keyence)で撮影した。用いた1次抗体は表1に示す。

(2.4) リアルタイム逆転写 PCR 法

培養細胞からの総 RNA は FastGene™ RNA Basic Kit (FG-80250, Nippon Genetics)を用い、常法に従い精製した。培養した細胞の培地をすべて除去し PBS (-)で一度洗浄した。その後、PBS (-)を完全に除去し、細胞を溶解しカラムを用いて RNA を精製した。RNA の濃度は Nanodrop を用いて測定した。cDNA は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301, TOYOBO)を用いて合成した。Real-time polymerase chain reaction (PCR) assay は、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (A25742, applied biosystems)を用い StepOnePlus™ (applied biosystems)で行われ、StepOne software (ver. 2.3, applied biosystems)で解析した。使用したプライマー配列は表2に示す。

(2.5) クリスタルバイオレット染色法

培養細胞を 96 well プレートに 1 well あたり 4.0×10^3 cells になるように播種した。培養3日後に AHCC®を 10 mg/ mL、5 mg/ mL、2mg/ mL または 0 mg/ mL になるように加

えた。AHCC®処理 48 時間後、培地をすべて吸引し PBS (-) で 2 回洗浄した。その後、クリスタルバイオレット溶液 [クリスタルバイオレットを終濃度 0.05% で 20% エタノールに溶解] を 50 μ L 加え室温で静置した。5 分後に PBS (-) で洗浄後、室温で乾燥させた。次の日、33%酢酸を 100 μ L 加え、マイクロプレートリーダー Model 550 (BIO-RAD) で吸光度 595 nm を測定した。

(3) 統計解析

データは、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error of the mean; SE) で示した。2 群間比較は、Student's *t*-test (両側) を行った。有意水準は 5% とした。

5. 結果および図表

(1) 結果

(1.1) リアルタイム逆転写 PCR 法における内部標準遺伝子の決定 (図 5)

最初に、リアルタイム逆転写 PCR 法に使用する内部標準遺伝子を決定するために、4 種類または 7 種類のハウスキーピング遺伝子の発現を、リアルタイム逆転写 PCR 法で比較した。KLM1 細胞または KLM1-R 細胞を 6 well プレートに 1 well あたり 2×10^5 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 2 日間培養後、全 RNA を抽出し、リアルタイム逆転写 PCR を行った。KLM1-R のおける、それぞれの遺伝子の発現は KLM1 と比較して、18S rRNA が 1.30 倍、*GAPDH* が 1.25 倍、*β-actin1* が 1.15 倍、*β-actin2* が 1.12 倍および *HPRT* が 1.08 倍であった。この結果より、KLM1 細胞と KLM1-R 細胞においては、*HPRT* 遺伝子が最も発現の差が少なかった。次に、KLM-R 細胞を 6 well プレートに 1 well あたり 2×10^5 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 1 日間培養後、AHCC®を 10 mg/mL (AHCC®処理群)または 0 mg/mL (無処理群)処理し、処理 12 時間後に全 RNA を抽出し、リアルタイム逆転写 PCR を行った。無処理群における、それぞれの遺伝子の発現は AHCC®処理群と比較して、18S rRNA が 1.33 倍、*GAPDH* が 2.91 倍、*RPL13A* が 2.01 倍、*B2M* が 2.15 倍、*TBP* が 2.83 倍、*β-actin1* が 2.01 倍、*β-actin2* が 2.15 倍および *HPRT* が 2.22 倍であった。この結果より、AHCC®処理群と無処理群間では、18S rRNA が最も差が少なかった。以上の結果より KLM1 細胞と KLM1-R 細胞間の遺伝子発現比較には *HPRT* 遺伝子を使用し、AHCC®処理群と無処理群間の比較には 18S rRNA を使用することとした。

(1.2) 抗がん剤耐性膵臓がん細胞において HSF1 が上昇している (図 6A)

ゲムシタビン耐性ヒト膵臓がん細胞株 KLM1-R は、感受性細胞株 KLM1 と比較して HSP27 の発現が増加している。そこで HSP27 の発現を制御する HSF1 のタンパク質量を測定した。KLM1 細胞または KLM1-R 細胞を 6 well プレートに 1 well あたり 2×10^5 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 2 日間培養後、KLM1 細胞および KLM1-R 細胞から、全タンパク質を抽出し、イムノブロットングを行った。その結果、KLM1-R 細胞は、KLM1 細胞と比較して HSF1 と HSP27 のタンパク質量が有意に増加していた。この結果より、KLM1-R 細胞において、HSF1 が発現上昇することで、下流の HSP27 の発現が上昇している可能性がある。

(1.3) 抗がん剤耐性膵臓がん細胞において YAP 活性が抑制されている (図 6A, B)

続いて、抗がん剤耐性獲得における Hippo-YAP 経路分子の挙動を解析するために、KLM1 細胞と KLM1-R 細胞において、YAP、リン酸化 YAP、LATS1、リン酸化 LATS1 および CYR61 のタンパク質の発現量を測定した。KLM1 細胞または KLM1-R 細胞を 6

well プレートに 1 well あたり 2×10^5 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 2 日間培養後、全タンパク質を抽出し、イムノブロットングを行った。その結果、KLM1-R 細胞は、KLM1 細胞と比較して YAP のタンパク質量が有意に低下していた。また、YAP の上流の Hippo 経路の分子の一つである LATS1 のリン酸化が有意に上昇していた。LATS1 の発現量には有意な差が認められなかったが、全 LATS1 タンパク質量に対するリン酸化 LATS の量は有意に上昇していた。一方、YAP の不活性化の指標であるリン酸化 YAP のタンパク質量は、KLM1-R 細胞において KLM1 細胞と比較して有意に減少していた。しかし、全 YAP に対するリン酸化 YAP の量には有意な差が認められなかった。

次に、YAP の標的遺伝子である *CYR61* と *CTGF* およびゲムシタビン代謝に重要な *CDA* 遺伝子の発現量を比較した。KLM1 細胞または KLM1-R 細胞を 6 well プレートに 1 well あたり 2×10^5 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 2 日間培養後、全 RNA を抽出し、リアルタイム逆転写 PCR 法を行った。その結果、KLM1-R 細胞は、KLM1 細胞と比較して *CYR61* と *CTGF* の発現が有意に低下していた。逆に、*CDA* の発現は有意に上昇していた。以上の結果より、KLM1-R 細胞は KLM1 細胞と比較して YAP 活性が抑制されている、一方でゲムシタビン代謝に重要な *CDA* の発現が上昇していた。リン酸化 YAP のタンパク質量が、KLM1-R 細胞のリン酸化 YAP のタンパク質量が KLM1 細胞と比較して減少していたのは、リン酸化された YAP が速やかに分解されている可能性が考えられる。

(1.4) YAP と HSF1 の細胞内局在 (図 6C)

次に、YAP と HSF1 は核内で機能する分子である。そこでこれら分子の細胞内局在を KLM1 細胞と KLM1-R 細胞間で比較した。KLM1 細胞または KLM1-R 細胞を 48 well プレートに 1 well あたり 1×10^4 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 2 日間培養後、4% PFA で細胞を固定した。固定した KLM1 細胞および KLM1-R 細胞に対して YAP 特異的抗体または HSF1 特異的抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、YAP は、KLM1-R 細胞と KLM1 細胞の両方の細胞において核に局在していた。同じく、HSF1 も KLM1-R 細胞と KLM1 細胞の両方の細胞において核に局在していた。この結果より、KLM1-R 細胞と KLM1 細胞の間で、YAP と HSF1 の細胞内局在に差が認められなかった。KLM1-R 細胞において、YAP と HSF1 は核局在しているにもかかわらずその転写活性が抑制されている可能性がある。

(1.5) AHCC®は HSF1 の発現を低下させる (図 7)

次に、当研究室は以前、KLM1-R 細胞において AHCC®が HSP27 の発現を低下させることを報告した。そこで AHCC®が、HSP27 の発現を制御する HSF1 および HMGB1 の発現を抑制するか解析した。KLM1-R 細胞に AHCC®を処理し、AHCC®処理 48 時間後

にタンパク質を抽出し、イムノブロッティングを行った。AHCC®処理群は無処理群と比較して HSF1 のタンパク質量が有意に減少した。一方、HMGB1 の発現量に有意な差は認められなかった。この結果より AHCC®処理により HSF1 の発現が低下するため、HSP27 の発現が抑制される可能性がある (42)。

(1.6) AHCC®は CDA の発現を低下させる (図 8)

次に、当研究室は以前、AHCC®が、ゲムシタビン耐性ヒト膵臓がん細胞に対して、ゲムシタビンの細胞傷害効果を増強することを報告した。そこで AHCC®が、抗がん剤耐性に関与する Hippo-YAP 経路分子とゲムシタビン代謝に重要な CDA の発現に影響を与えるか解析した。KLM1-R 細胞を 6 well プレートに 1 well あたり 2×10^5 cells になるように播種した。37°C、5% CO₂ 条件下で 1 日間培養後、KLM1-R 細胞に 10 mg/ mL の AHCC®を処理し、12 時間後にタンパク質と RNA を抽出し、イムノブロッティングとリアルタイム逆転写 PCR をそれぞれ行った。AHCC®処理群において無処理群と比較して YAP、LATS1、リン酸化 LATS1 および HSF1 のタンパク質量が有意に減少していた。また、YAP 標的遺伝子である *CYR61* 遺伝子の発現も有意に減少していた。同時に、CDA 遺伝子の発現も有意に減少していた。この結果より、AHCC®処理は、細胞増殖や細胞死抑制に関わる YAP 活性を抑制するだけでなく、ゲムシタビン代謝に重要な CDA の発現も抑制する可能性がある。

(1.7) AHCC®は抗がん剤耐性膵臓がん細胞により強く細胞傷害を与える (図 9)

最後に、AHCC®が与える細胞傷害が、抗がん剤耐性株と感受性株において差があるか解析した。抗がん剤耐性細胞株 KLM1-R と PancI および感受性株 KLM1 と PK45p に AHCC®を処理した。AHCC®処理 48 時間後にクリスタルバイオレット染色法により生細胞を測定することで、AHCC®が与える細胞傷害を比較した。その結果、抗がん剤耐性株は感受性株と比較して、AHCC® 10 mg/ mL を処理した群において有意に生細胞が少なかった。この結果より、AHCC®は抗がん剤感受性膵臓がん細胞よりも、耐性膵臓がん細胞により強く細胞傷害を与える可能性がある。

(2) 図表

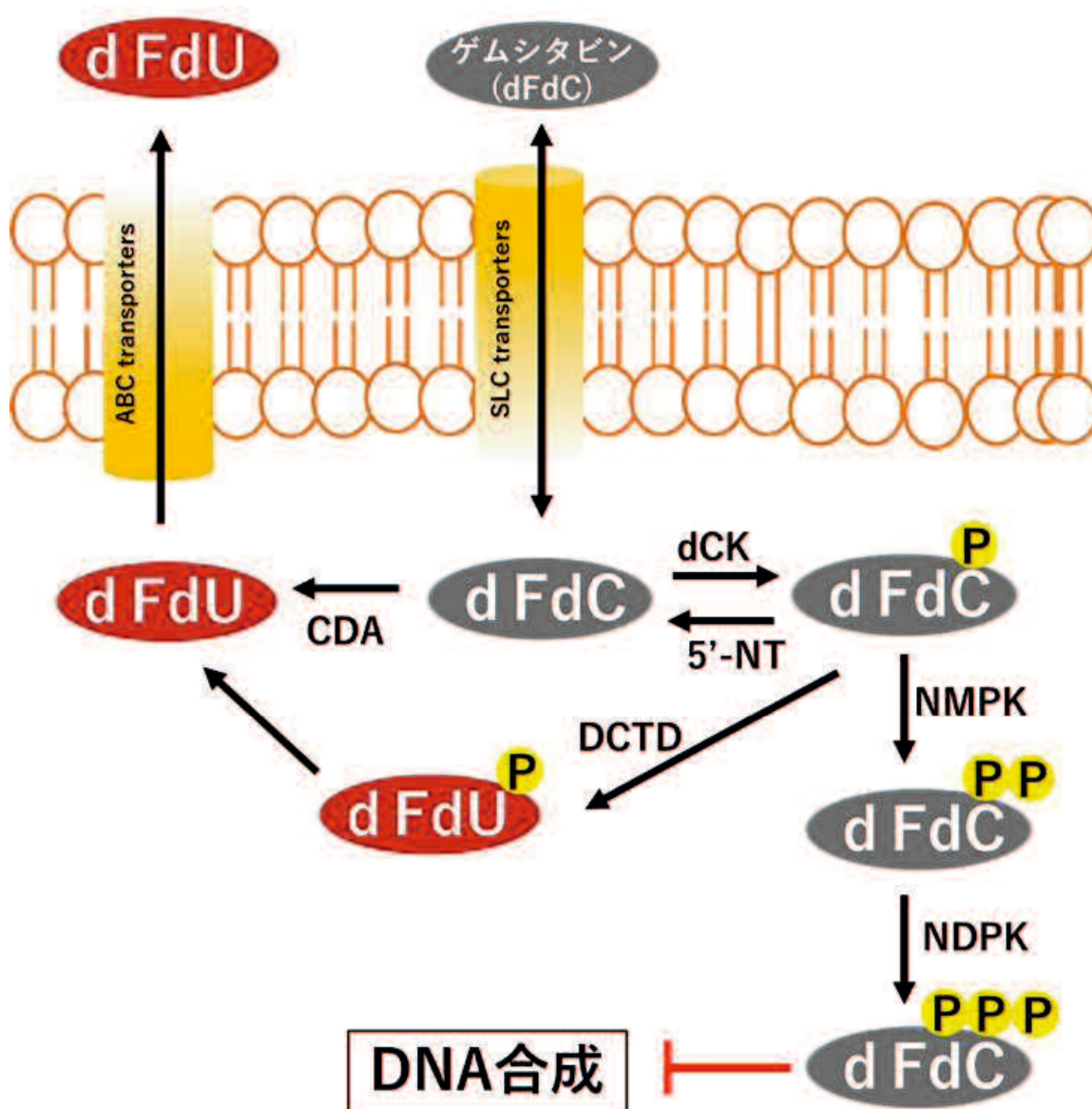


図1 ゲムシタビンの薬物動態

ABC transporters: ATP binding cassette transporters, dFdU: 2',2'-difluorodeoxyuridine,

CDA: cytidine deaminase. SLC transporters: Solute carrier transporters dFdC:

2',2'-difluorodeoxycytidine, dCK: deoxycytidine kinase, 5'-NT: 5'-nucleotidase. NMPK:

nucleoside monophosphate. NDPK: nucleoside diphosphate kinase.



図 2 YAP のドメインと主要な翻訳後修飾部位

YAP は主に LATS1 により、S61、S109、S127、S164 および S381 のセリンがリン酸化されることにより不活性化する。また、CBP/p300 により K494 と K497 のリシンがアセチル化される。

TEAD bd: TEAD binding domain, WW: WW domain, SH3 bm: SH3 domain binding motif, TAD: transcriptional activation domain, PDZ bm: PDZ domain-binding motif.

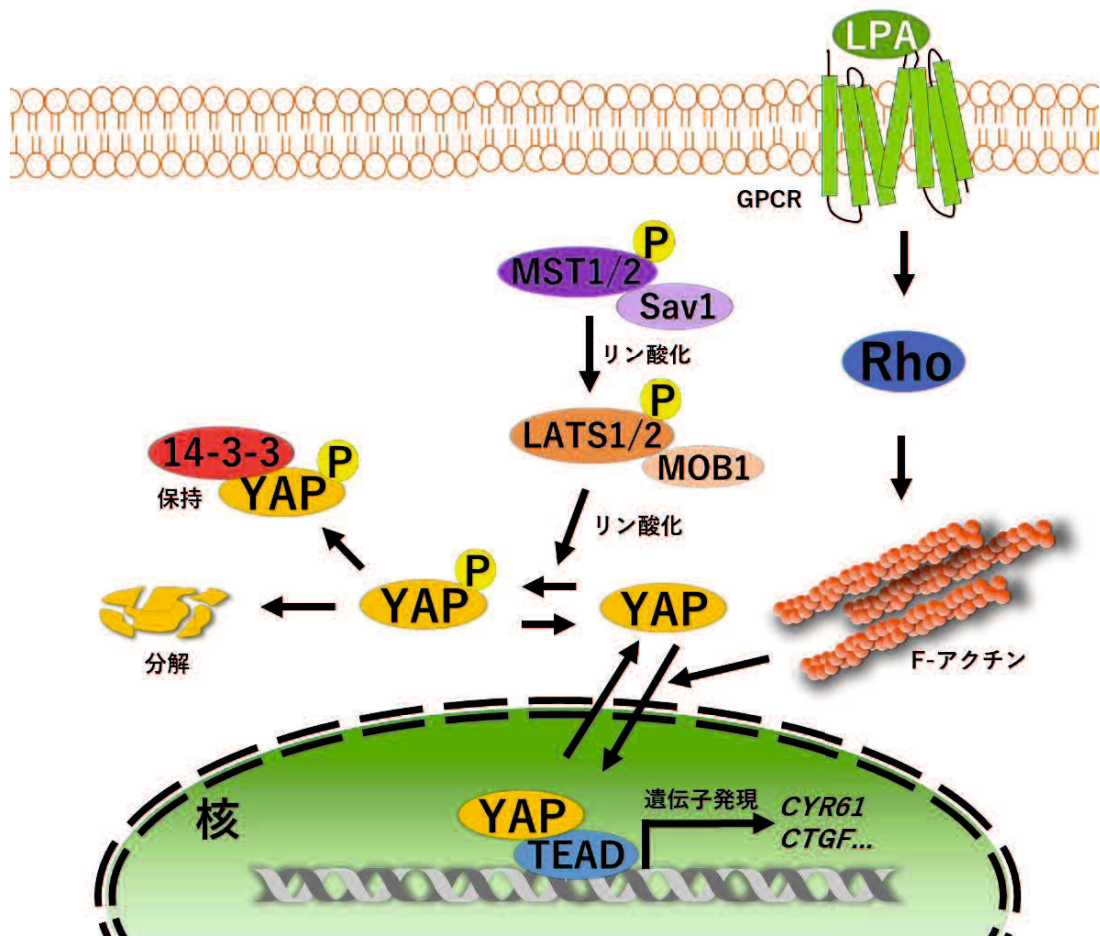


図3 哺乳類の Hippo 経路図

YAP は、核内で TEAD 等の転写因子と結合し標的遺伝子の転写を活性化する転写共役因子である。YAP は主に上流の Hippo 経路分子によりリン酸化される。リン酸化された YAP は 14-3-3 に保持されて細胞質に留まるか、プロテアソームにより分解される。また、血清中に含まれるリゾホスファチジン酸 (LPA) は、G タンパク質共役受容体 (GPCR) を刺激することで、Rho が活性化する。活性化した Rho はアクチン重合を促進し、YAP を活性化する。

- **がん**



- **臓器拡大と幹細胞**

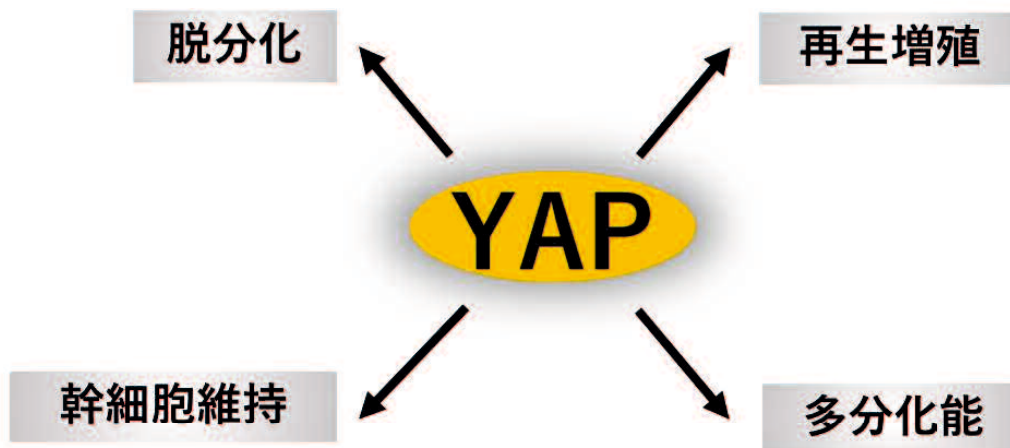


図 4 がんおよび臓器拡大と幹細胞における YAP の機能
EMT: epithelial to mesenchymal transition.

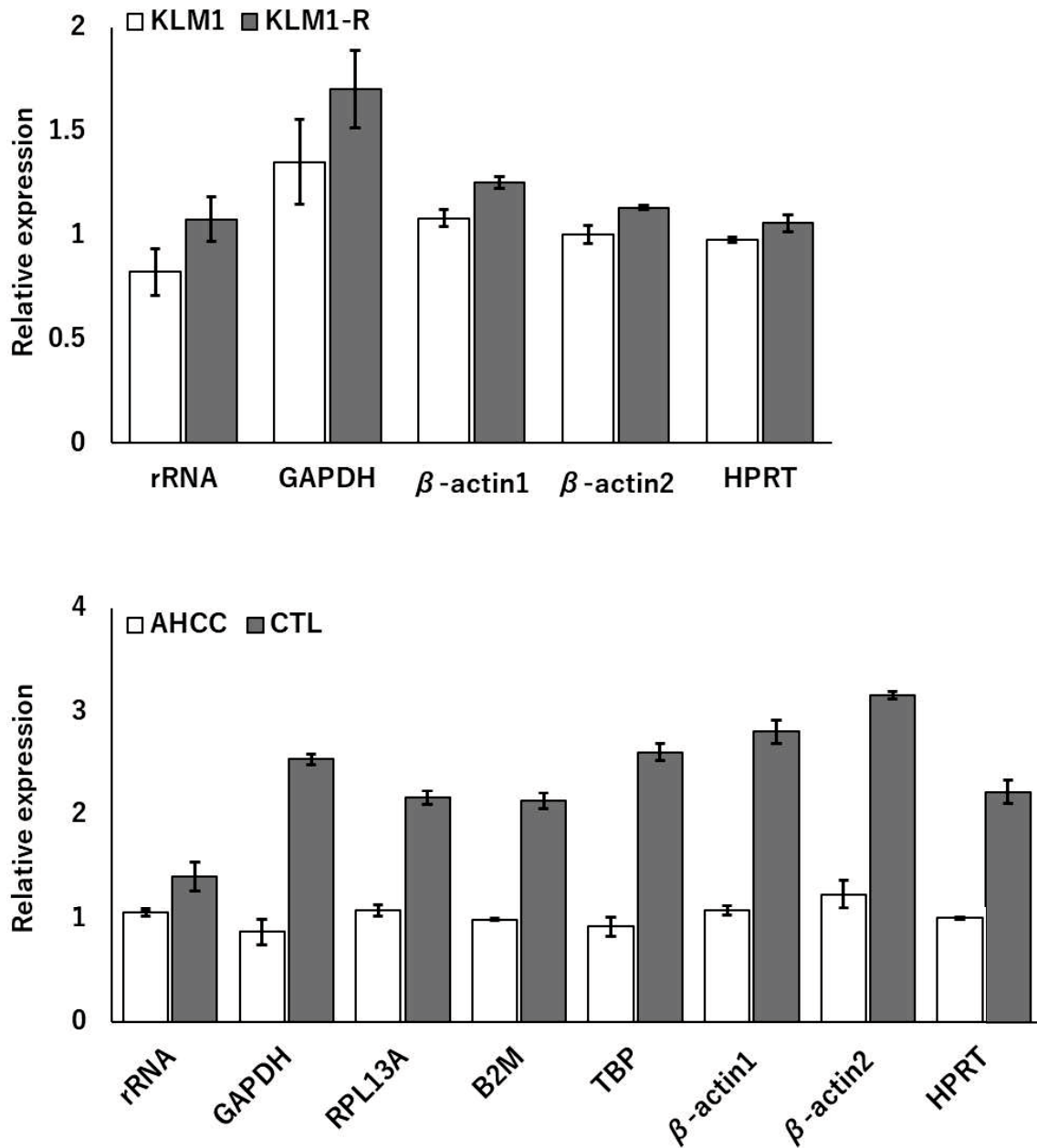


図5 リアルタイム逆転写PCR法における内部標準の決定

リアルタイム逆転写PCR法で使用する内部標準遺伝子を決定するために、4種類または7種類のハウスキーピング遺伝子の発現量を測定した (n = 3)。上のグラフが KLM1 細胞と KLM1-R 細胞間の比較、下のグラフが AHCC®処理群と無処理群の比較。縦軸が KLM1 細胞または AHCC®処理群を 1 とした時の相対値を示す。この結果より KLM1 細胞と KLM1-R 細胞の比較には *HPRT* 遺伝子を内部標準として使用し、AHCC®処理群と無処理群の比較では 18S rRNA を使用することとした。

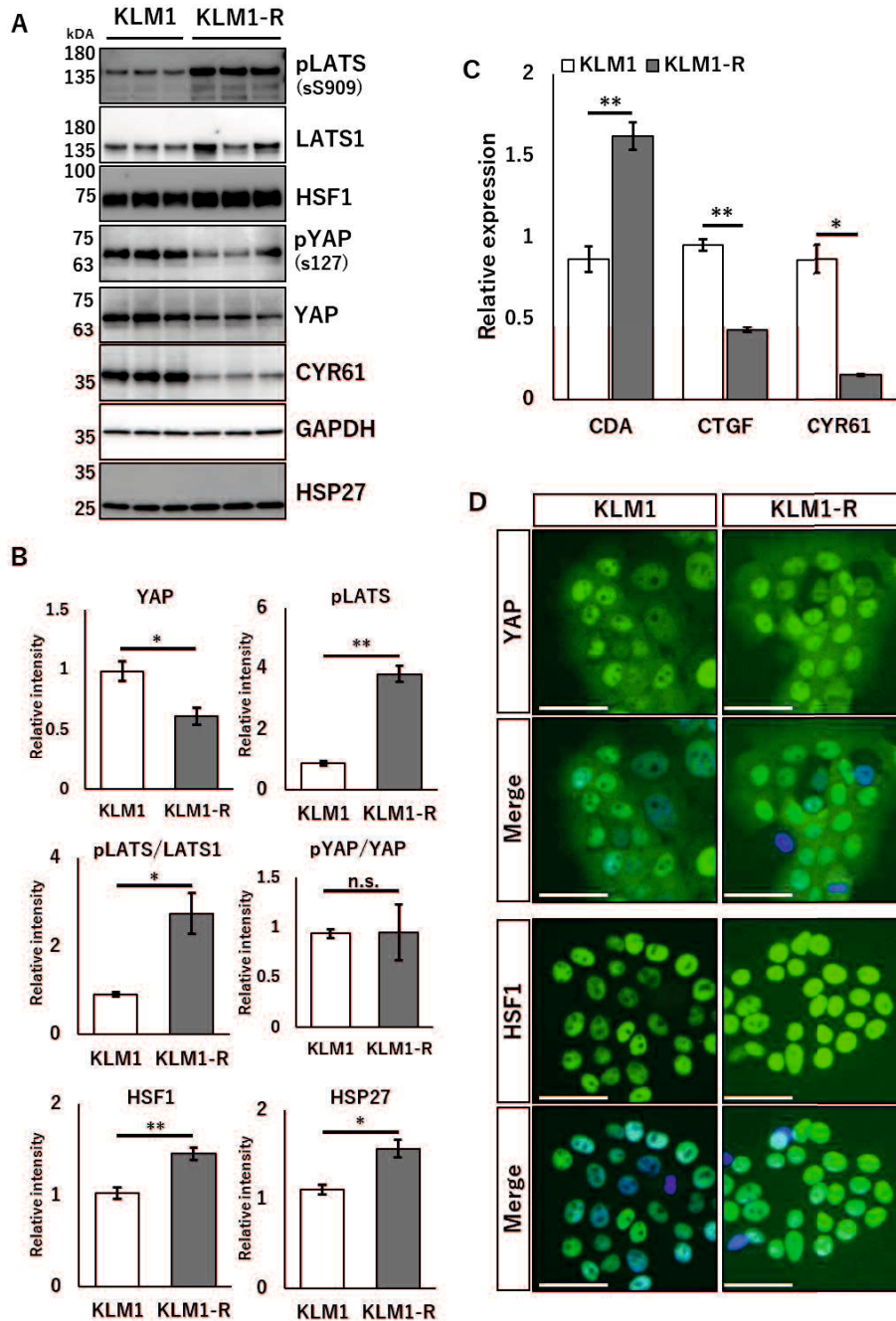


図 6 KLM1-R 細胞は YAP 転写活性が抑制されている

(A) KLM1 細胞と KLM1-R 細胞におけるイムノブロッティングによる Hippo-YAP 経路分子および HSF1 と HSP27 の発現の比較。(B) (A) の定量結果。縦軸は KLM1 細胞の値を 1 とした相対値を示す。(C) YAP の標的遺伝子 *CTGF* と *CYR61* 遺伝子および *CDA* 遺伝子の発現解析。内部標準として *HPRT* を用いた。(D) YAP と HSF1 の細胞内局在。スケールバーは 50 μm 。P 値は Student's *t*-test ($n = 3$) で算出した。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 、n.s.: 非有意。

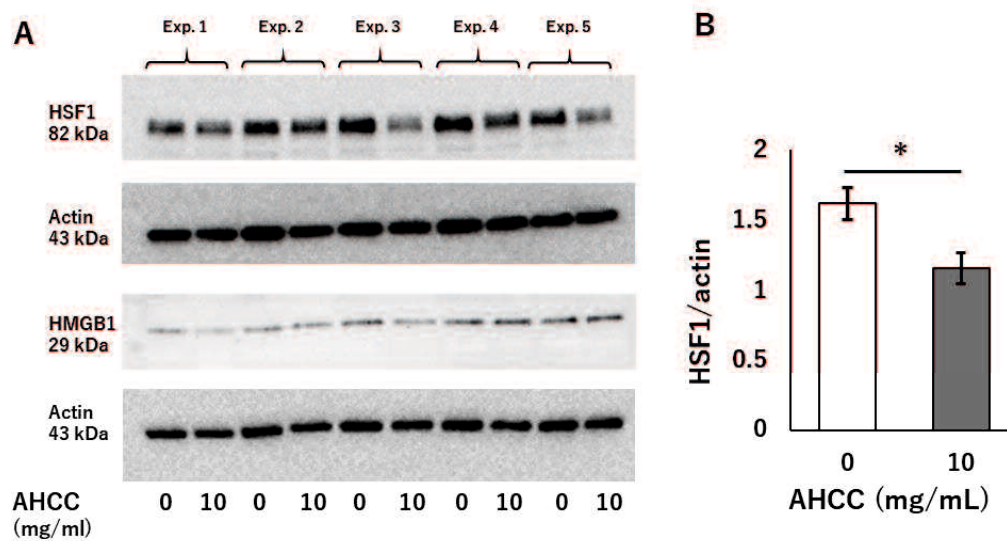


図 7 AHCC®は HSF1 タンパク質の発現を低下させる

ゲムシタビン耐性ヒト膵臓がん細胞株 KLM1-R における AHCC®処理群 (10 mg/mL) または無処理群 (0 mg/mL)間の HSF1、HMGB1 および Actin のタンパク質発現の比較 (A)および定量結果 (B)。AHCC®処理により HSF1 の発現が有意に低下した。一方で、HMGB1 と Actin の発現は有意な差は認められなかった。P 値は Student's *t*-test (n = 3) で算出した。*: $P < 0.05$ 。

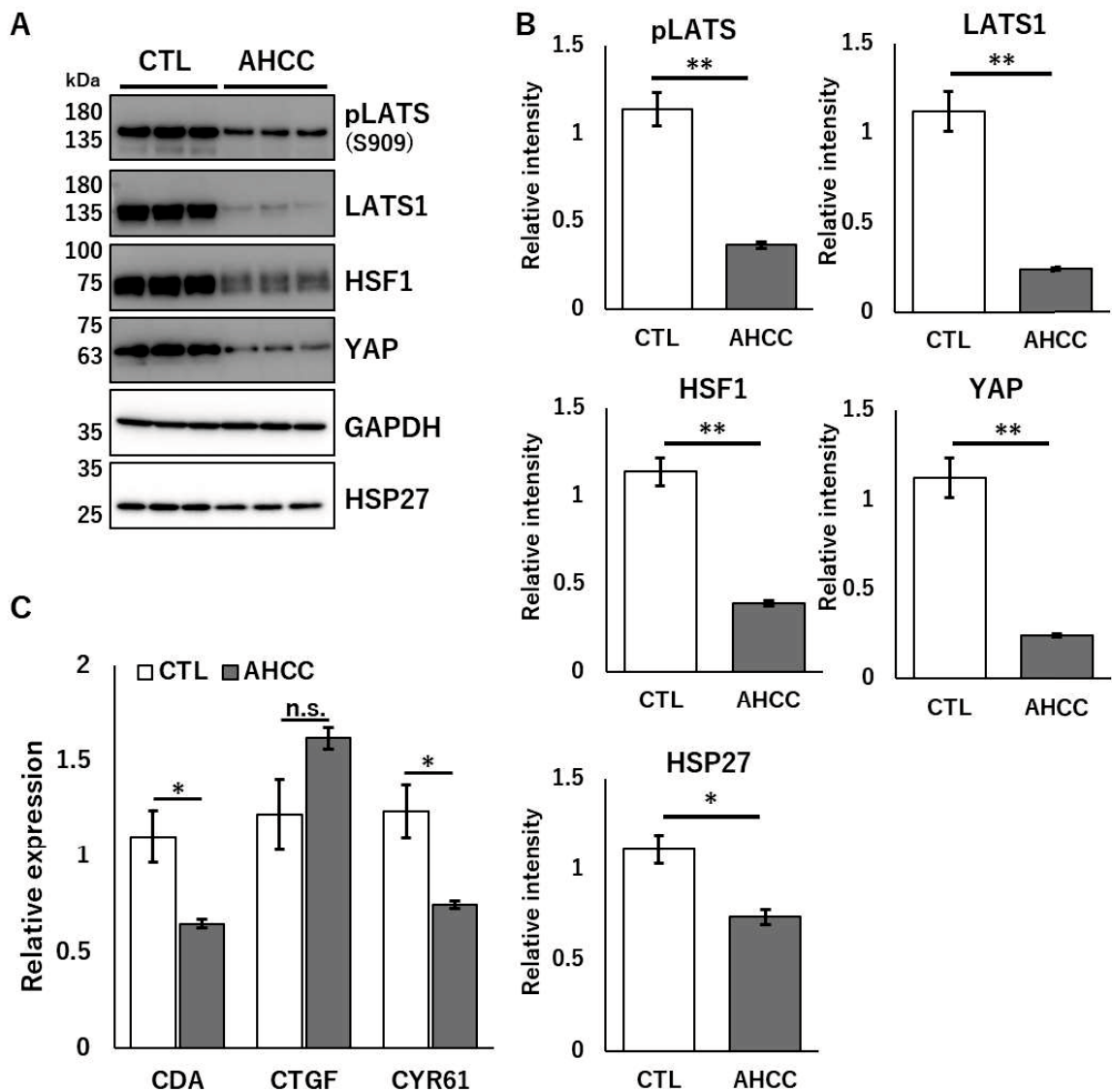


図 8 AHCC®は CDA と YAP 活性を低下させる

(A) Hippo-YAP 経路分子と HSF1 のタンパク質発現の比較。(B) (A)の定量結果。縦軸は無処理群 (CTL)を 1 とした相対値を示す。内部標準として GAPDH を用いた。(C) YAP の標的遺伝子 *CTGF* と *CYR61* および *CDA* 遺伝子の mRNA 発現量の比較。縦軸は無処理群 (CTL)を 1 とした相対値を示す。内部標準として 18S rRNA を用いた。P 値は Student's *t*-test (n = 3)で算出した。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ 。

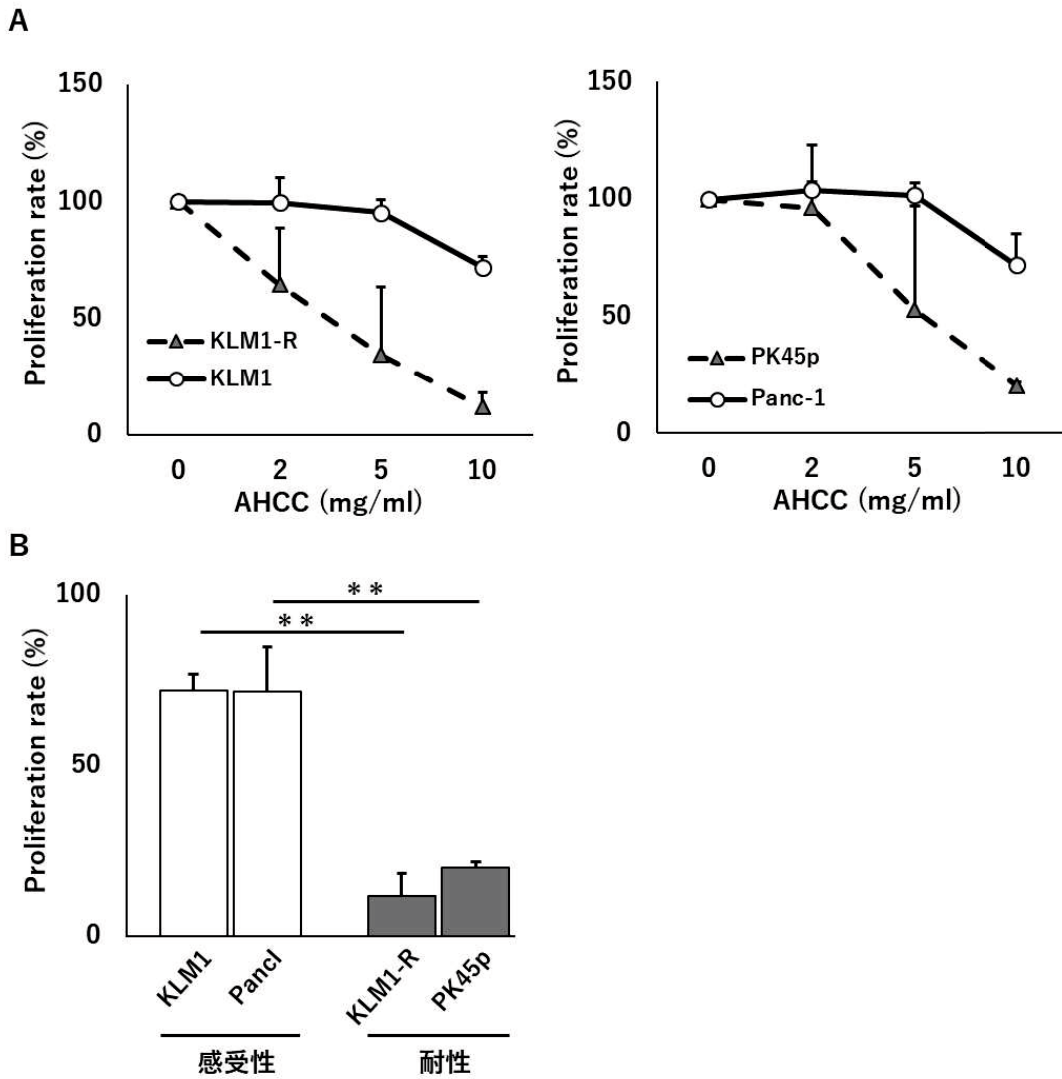


図 9 AHCC®処理は抗がん剤耐性ヒト膵がん細胞株により強く細胞傷害を与える
 クリスタルバイオレット染色法による細胞生存率 **(A)**および 10 mg/mL AHCC®処理群
 における比較 **(B)**。それぞれの 0 mg/mL AHCC®処理群を 100%とした相対値を示す。*P*
 値は Student's *t*-test (*n* = 9)で算出した。**: *P* < 0.01。

表 1 使用した抗体の一覧

Anti-YAP	CST	#4912	IB (1:2000)
Anti-YAP	CST	#14074	IF (1:200)
Anti-phospho-YAP (S128)	CST	#4911	IB (1:1000)
Anti-HSF1	CST	#12972	IB (1:2000), IF (1:200)
Anti-HSP27	CST	#95357	IB (1:2000)
Anti-HMGB1	CST	#3935	IB (1:1000)
Anti-GAPDH	CST	#5174	IB (1:2000)
Anti-Phospho-LATS1 (S909)	CST	#9157	IB (1:1000)
Anti-LATS1	CST	#3477	IB (1:2000)
Anti-CYR61	CST	#14479	IB (1:2000)
Anti- β actin	Santa Cruz	sc-1616	IB (1:2000)

IB; Immunoblotting, IF; Immunofluorescence. カッコ内は希釈倍率を示す。

表 2 使用したプライマーの一覧

<i>Gene</i>	5'-Forward-3'	5'-Reverse-3'
<i>HsCYR61</i>	AGCCTCGCATCCTATAACAACC	TTCTTTCACAAGGCGGGCACTC
<i>HsCTGF</i>	CCAATGACAACGCCTCCTG	TGGTGCAGCCAGAAAGCTC
<i>HsGAPDH</i>	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
<i>Hs18SrRNA</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
<i>HsCDA</i>	CTGAAGCCTGAGTGTGTCCA	TGCCCTGAAATCCTTGTACC
<i>HsRPL13A</i>	CCGCCCTACGACAAGAAAAAG	TACTTCCAGCCAACCTCGTG
<i>HsB2M</i>	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT
<i>HsTBP</i>	CACGAACCACGGCACTGATT	TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC
<i>HsACTB-1</i>	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>HsACTB-2</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
<i>HsHPRT</i>	AGAATGTCTTGATTGTGGAAGA	ACCTTGACCATCTTTGGATTA

6. 考察

がんの治療において、がん細胞の抗がん剤耐性獲得機序の解明は最重要課題の一つである (7)。本研究において、ゲムシタビン耐性ヒト膀胱がん細胞株 KLM1-R 細胞は、感受性株 KLM1 細胞と比較して、ゲムシタビン代謝に重要な *CDA* 遺伝子の発現が上昇していた。さらにゲムシタビン耐性に関与する *HSP27* の発現を制御する *HSF1* の発現が上昇していた (図 6A-C)。KLM1-R 細胞は KLM1 細胞にゲムシタビン処理することで樹立された (40)。以上より、膀胱がん細胞は、ゲムシタビンに暴露されることで、*HSF1* の発現が上昇し、*HSP27* の発現上昇とゲムシタビン代謝が亢進することにより、ゲムシタビン耐性を獲得する可能性がある。しかし、*HSF1* と *HSP27* の発現上昇により、*CDA* 発現増加が生じているのかについてさらに研究を行う必要がある。またゲムシタビンの暴露により、KLM1 細胞の *HSP27* や *CDA* の発現制御に変異が生じた結果、耐性を獲得したのか、あるいは KLM1 細胞に存在する少数のゲムシタビン耐性細胞が選択されることにより、耐性を獲得したのかについて明らかにする必要がある。本研究により、ヒト膀胱がん細胞の抗がん剤耐性獲得機序の一端を明らかにすることができた。

今回の実験では、リアルタイム逆転写 PCR の内部標準として実験ごとに異なる遺伝子を使用した。KLM1 と KLM1-R 間の比較には、*HPRT* 遺伝子を用い、AHCC®処理と無処理群の比較には *18S rRNA* を用いた。*HPRT* 遺伝子の発現は、KLM1 と KLM1-R 間で差が認められなかったが、AHCC®処理により、発現が大きく変動した (図 5)。また、内部標準としてよく使用される *GAPDH* 遺伝子の KLM1-R における発現は、KLM1 と比較して有意差は認められなかったが、1.25 倍上昇していた。リアルタイム逆転写 PCR の内部標準遺伝子は、比較するサンプル間で一定量存在し、発現が一定である必要がある。この結果は、リアルタイム逆転写 PCR に用いる内部標準遺伝子を実験系毎に検討する必要があることを示している。

YAP は様々ながんの悪性化に関与していることが報告されている (14)。また過剰な活性化によりがん悪性化や抗がん剤耐性に寄与していると報告されている (21, 23)。従って、*YAP* の不活性化はがん治療の重要な標的として見なされている (24)。一方で最近、膀胱がん細胞において *YAP* の過剰な活性化により抗がん剤耐性が低下する研究が報告された。がん細胞株に恒常的活性化型 *YAP* を過剰発現することにより、ゲムシタビンの代謝に重要な *CDA* や *ABC* 多剤トランスポーターの発現が抑制された (43)。この結果から、ゲムシタビン耐性がん細胞において *Hippo* 経路の活性化や、*YAP* 転写活性の低下が予想される。しかしながらこの研究では、ゲムシタビン耐性膀胱がん細胞において上流の *Hippo* 経路の活性化や *YAP* 活性の低下を示していない。本研究では、ゲムシタビン感受性ヒト膀胱がん細胞株 KLM1 と KLM1 細胞から樹立したゲムシタビン耐性細胞株 KLM1-R を用いることで、ヒト膀胱がん細胞が、ゲムシタビン耐性獲得の結果、*Hippo* 経路の活性化とそれに続く *YAP* の転写活性の低下が生じることを初めて示した。また、KLM1-R 細胞において、KLM1 細胞と比較して、ゲムシタビンの代謝に重要な

CDA の発現が上昇していることを明らかにした。YAP による *CDA* 遺伝子の発現抑制についての詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。しかしながら近年、YAP が転写共役リプレッサーとして機能する報告がなされた (44)。YAP-TEAD 複合体は、ヌクレオソーム再構築デアセチラーゼ複合体 NuRD (nucleosome remodeling and deacetylase) を標的遺伝子の転写調節領域に、リクルートする。その結果、標的遺伝子の転写が抑制される。また、KLM1-R 細胞において、YAP の不活性化の指標の一つであるリン酸化 YAP のタンパク質量が、KLM1 細胞と比較して低下していたのは、リン酸化された YAP が速やかに分解されている可能性が考えられる。今後、YAP がどのようにして *CDA* の転写を抑制し、抗がん剤耐性獲得に寄与しているかさらなる検討が必要である。YAP は、がんの重要な分子標的である一方で、YAP の不活性化により、抗がん剤耐性が増加する可能性が考えられる。

HSP27 は、Hippo 経路を抑制し YAP を活性化する報告がある。HSP27 は、Hippo 経路分子の LATS1 をリン酸化する因子である MST1/2 の分解を促進し、LATS1 の活性を抑制することで YAP の核移行を上昇させる (45)。一方で本研究では、KLM1-R 細胞において、HSP27 の発現が上昇しているにもかかわらず、LATS1 が活性化し YAP のタンパク質量が減少していた。しかしながら、KLM1-R 細胞と KLM1 細胞間において YAP の局在には差がなかった。LATS1 によりリン酸化された YAP はプロテアソームにより分解される。これら結果より、KLM1-R 細胞においては、活性化した LATS1 によりリン酸化された YAP は速やかに分解される。一方で、リン酸化修飾を受けていない YAP の核移行は抑制されていないことが考えられる。しかし、KLM1-R 細胞における YAP の転写活性は KLM1 細胞と比較して低かった。以上より、KLM1-R 細胞において、YAP は翻訳後修飾により転写因子への結合や転写活性化能が抑制されている可能性がある。実際、YAP は核内においてアセチル化修飾を受けることにより、YAP の転写活性が変化することが報告されている (46)。

AHCC®とゲムシタビン併用療法は、抗がん剤耐性ヒト膵臓がん細胞に対する有効な治療候補とで考えられる。本研究において、AHCC®処理は KLM1-R 細胞において、HSF1 の発現が有意に減少させた。HSF1 の高発現は、乳がんの予後不良と関与することが報告されている (47)。HSF1 は熱ショックタンパク質 (HSPs) の転写を制御する転写因子である。がん細胞において、HSPs は抗アポトーシスおよび抗がん剤に対する耐性に関与している。従って HSPs は、抗がん治療の標的分子として見なされている (48, 49)。当研究室においても、HSP27 がゲムシタビン耐性に関与することを報告した (27)。さらに、interferon- γ および HSPs 合成阻害剤である KNK437 が、ヒト膵臓がん細胞 KLM1-R において、HSP27 の発現を低下させ、ゲムシタビン感受性を高めることを報告した (28, 29)。加えて、同じく HSF1 によって転写制御される HSP90 も膵臓がん治療の分子標的である (50, 51)。しかしながら、ゲルダナマイシンなどの HSP90 阻害剤は、熱ショック応答を誘発し、その結果、HSF1 活性化し HSP27 発現を増加させる (52)。その

ため、HSP90 は標的とする薬剤は臨床応用に至っていない。つまり、HSPs の発現を制御する HSF1 を標的とする薬剤が必要である。実際、HSF1 はがん治療の標的になりうる (53)。siRNA による HSF1 のノックダウンは、膵臓がん細胞株にアポトーシスを誘導する (54)。また、トリアゾールヌクレオシド類似体は、HSF1 と HSPs の発現を低下させ、膵臓がん細胞株の腫瘍形成を阻害する (55)。従って、AHCC®は、HSF1 の発現を抑制し、ゲムシタビン代謝に重要な *CDA* 遺伝子の発現も減少させた (図 4)。この結果は、ゲムシタビンとの併用療法の選択肢の一つになりうることを示している。実際、AHCC®+UFT 処理は、腺癌細胞のラット乳腺の転移を減少させることが報告されている (56)。また、AHCC®は免疫療法薬として使用されており (57, 58)、抗腫瘍薬の副作用を軽減することも報告されている (59, 60)。

AHCC®は、ゲムシタビン感受性細胞と比較して、ゲムシタビン抵抗細胞により強く細胞傷害を与えた。Ras が遺伝子変異により活性化したがん細胞では、マクロピノサイトーシスが活性化している (61)。マクロピノサイトーシスとは、エンドサイトーシスの一種である。この機構により細胞は、1 μm を超える大きさの細胞外液を細胞内に取り込むことができる。従って、マクロピノサイトーシスの促進により、細胞外の栄養分を効率的に取り込むことができる。ゲムシタビン耐性細胞株では、この機構が促進しているために、AHCC®により強く細胞傷害を受けた可能性が考えられる。今後 AHCC®が、HSF1 やゲムシタビン代謝を抑制する分子メカニズムおよび細胞傷害を与える分子メカニズムについてさらなる解明が必要である。また AHCC®は、粗生成物である。有効成分画分を得られることができれば詳細な解析やより効果的な治療が期待できる。

上記の通り、YAP の恒常的活性化により抗がん剤耐性が低下することが報告されている。しかし、siRNA による YAP の抑制ではゲムシタビン耐性は変化しない (43)。Hippo 経路分子の一つ LATS2 は YAP の標的遺伝子であり (62)、YAP の過剰発現により LATS2 の発現上昇が予想できる。本研究において AHCC®は YAP とリン酸化 LATS の量を低下させ、*CDA* の発現を減少させた。以上より、*CDA* の発現を抑制しているのは LATS である可能性も考えられる。KLM1-R 細胞は Hippo 経路が活性化しているにもかかわらず、YAP は核に局在していた。これらの結果は、KLM1-R 細胞は、Hippo 経路を活性化し *CDA* の発現を抑制する一方で、YAP の細胞質移行を抑制することで抗がん剤耐性と細胞増殖を両立させている可能性がある。従って、KLM1-R 細胞において、Hippo 経路を抑制し *CDA* の発現やゲムシタビン耐性が抑制されるか解析する必要がある。

また本研究は、培養細胞株を用いた実験である。継代を重ねた培養細胞は、形質が変化する (63)。またプラスチックシャーレ上で行う培養は人工的である。プラスチックシャーレは、細胞外環境として生体内と比べ非常に硬い。細胞外環境は、YAP の活性を変化させることが報告されている (64)。従って、培養細胞株を用いた本研究の結果が、実際に生体内で起こっているか確かめる必要がある。具体的には、膵臓がんモデルマウスや臨床検体を用いて、Hippo 経路分子や *CDA* の発現の挙動を解析する必要がある。

7.結語

抗がん剤耐性膵臓がん細胞株 KLM1-R は、感受性膵臓がん細胞株 KLM1 と比較して、HSF1 タンパク質が発現上昇し、その結果 HSP27 の発現が上昇する可能性を示した。また、KLM1-R 細胞において、Hippo 経路分子の LATS1 が活性化し、YAP タンパク質量が減少すると同時に、YAP 標的遺伝子 *CYR61* と *CTGF* の発現が減少していることを示した。一方で、抗がん剤耐性に関与する *CDA* の発現が上昇していることを示した。以上より本研究の結果、KLM1-R 細胞のゲムシタビン耐性獲得機序の一端を明らかにすることができた。

KLM1-R 細胞に AHCC®処理すると無処理群と比較し、HSF1 の発現が減少すると同時に、HSP27 の発現が減少することを示した。また、AHCC®処理は、KLM1-R 細胞において、YAP の発現と YAP の標的遺伝子 *CYR61* およびゲムシタビン耐性に重要な *CDA* の発現を減少させることを示した。以上より本研究の結果、AHCC®がゲムシタビン耐性の細胞傷害効果を増強する作用機序の一端を明らかにした。また、AHCC®は、抗がん剤耐性膵臓がん細胞に、感受性細胞株よりも強く細胞傷害を与えた。これらの結果から、AHCC®とゲムシタビン併用療法は、抗がん剤耐性ヒト膵臓がん細胞に対する有効な治療候補の一つであると考えられる。

今後、膵臓がんにおいて、Hippo-YAP 経路や HSF1-HSP27 経路がどのようにして抗がん剤耐性を与えているのかをさらに追求する必要がある。研究を進めていくことで、がん細胞の抗がん剤耐性獲得機序に対する理解が深まると考えられる。

8.謝辞

本研究の遂行にあたりご指導いただきました山口大学大学院医学系研究科システムズ再生・病態医化学講座 古谷-清木 誠教授並びに北海道医療大学がん予防研究所 藏満 保宏教授に深く感謝申し上げます。また山口大学医学部大学院システムズ再生・病態医化学講座の北川孝雄先生、Malta 大学の Byron Baron 博士並びに、当教室員の皆様にはご協力、ご支援をいただき感謝申し上げます。

本論文に開示すべき利益相反に相当する事項はない。AHCC®は、アミノアップ社、札幌、日本の商標である。

9. 参考文献

- 1 国立がん研究センターがん情報サービス「がん登録・統計」
- 2 Kuroda T, Kumagi T, Yokota T, Seike H, Nishiyama M, Imai Y, Inada N, Shibata N, Imamine S, Okada S-I, Koizumi M, Yamanishi H, Azemoto N, Miyaike J, Tanaka Y, Tatsukawa H, Utsunomiya H, Ohno Y, Miyake T, Hirooka M, Furukawa S, Abe M, Ikeda Y, Matsuura B, Hiasa Y and Onji M: Improvement of long-term outcomes in pancreatic cancer and its associated factors within the gemcitabine era: a collaborative retrospective multicenter clinical review of 1,082 patients. *BMC Gastroenterol.* 13: 134, 2013.
- 3 Siegel RL, Miller KD, Jemal A: Cancer Statistics , 2017. *CA Cancer J Clin.* 67: 7–30, 2017.
- 4 Wolfgang CL, Herman JM, Laheru D a, Klein AP, Erdek M a, Fishman EK and Hruban RH: Recent progress in pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin.* 63: 318–348, 2013.
- 5 Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. 7: e1000267
- 6 Burris H and Moore M: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol.* 15: 2403–2413, 1997.
- 7 Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H and Büchler 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.
- 8 Holohan C, Van schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG: Cancer drug resistance: and evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* 73: 714-726, 2013.
- 9 Swanton C: Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancere Res.* 72: 4875-4882, 2012.
- 10 Longley DB and Johnston PG: Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 105: 275-292, 2005.
- 11 Szakács G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN, Gottesman MM: Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell.* 6: 129-137, 2004.
- 12 Heineman V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W: Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2', 2'-difluorodeocytidine and 1-beta-D-arabionfuranosylcytosine. *Cancer Res.* 15: 4024-4031, 1988.

- 13 Veltkamp SA, Pluimm D, van Eijndhoven MA, Bolijin MJ, Ong FH, Govindarajan R, Unadkat JD, Beijinen JH, Schellens JH: New insights into the pharmacology and cytotoxicity of gemcitabine and 2', 2-difluorodeoxyuridine. *Mol Cancer Ther.* 7: 2415-2425, 2008.
- 14 Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S: YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell.* 29: 783-803, 2016.
- 15 Sudol M, Shields DC, Farooq A: Structures of YAP protein domains reveal promising targets for development of new cancer drugs. *Semin Cell Dev Biol.* 23: 827-833, 2012.
- 16 Meng Z, Moroishi T, Guan KL: Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 30: 1-17, 2016.
- 17 Johnson R, Halder G: The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 13: 63-79, 2014.
- 18 Camargo FD, Gokihale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, Brummelkamp TR: YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol.* 17: 2054-2060.
- 19 Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, Chinnaiyan A, Israel MA, Goldstein LS, Abujarour R, Ding S, Guan KL: The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 24: 1106-1118, 2010.
- 20 Porazinski S, Wang H, Asaoka Y, Behrndt M, Miyamoto T, Morita H, Hata S, Sasaki T, Krens SFG, Osada Y, Asaka S, Momoi A, Linton S, Miesfeld JB, Link BA, Senga T, Shimizu N, Nagase H, Matsuura S, Bagby S, Kondoh H, Nishina H, Heisenberg CP, Furutani-Seiki M: YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature.* 521: 217-221, 2015.
- 21 Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, Gayyed MF, Anders RA, Maitra A, Pan D: Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell.* 130: 1120-1133, 2007.
- 22 Song R, Gu D, Zhang L, Zhang X, Yu B, Liu B, Xie J: Functional significance of Hippo/YAP signaling for drug resistance in colorectal cancer. *Mol Carcinog.* 57: 1608-1615, 2018.
- 23 Zhao Y, Yang X: The Hippo pathway in chemotherapeutic drug resistance. *Int J Cancer.* 137: 2767-2773.
- 24 Stanger, B Z: Quit your YAPing: a new target for cancer therapy. *Genes Dev.* 26: 1263-1267, 2012.
- 25 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.

- 26 Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Mikuria K, Fujimoto M, Maehara SI, 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.
- 27 Kuramitsu Y, Wang Y, Taba K and Suenaga S: Heat-shock protein 27 plays the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 32: 2295–2299, 2012.
- 28 Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Yoshida K, Tanaka T, Mori-Iwamoto S, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I and Nakamura K: KNK437 downregulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and enhances the cytotoxic effect of gemcitabine. *Chemotherapy.* 57: 12–16, 2011.
- 29 Mori-Iwamoto S, Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Okita K, Nakamura K and Sakaida I: Interferon-gamma down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine. *Pancreas.* 38: 224–226, 2009.
- 30 De Thonel A, Le Mouël A and Mezger V: Transcriptional regulation of small HSP - HSF1 and beyond. *Int J Biochem Cell Biol.* 44: 1593–1612, 2012.
- 31 Dai C, Whitesell L, Rogers AB and Lindquist S: Heat shock factor 1 Is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell.* 130: 1005–1018, 2007.
- 32 Meng L, Gabai VL and Sherman MY: Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis. *Oncogene.* 29: 5204–5213, 2010.
- 33 Min J-N, Huang L, Zimonjic DB, Moskophidis D and Mivechi NF: Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene.* 26: 5086–5097, 2007.
- 34 Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, Lotze MT and Tang D: Metabolic regulation by HMGB1-mediated autophagy and mitophagy. *Autophagy.* 7: 1256–1258, 2011.
- 35 Kuramitsu Y, Wang Y, Kitagawa T, Tokuda K, Akada J, Tokunaga M, Nakamura K: High-mobility Group Box 1 and Mitogen-activated Protein Kinase activated Protein Kinase-2 Are Up-regulated in Gemcitabine-resistant Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 35: 3861-3865, 2015.
- 36 Ito N, DeMarco R a, Mailliard RB, Han J, Rabinowich H, Kalinski P, Stolz DB, Zeh HJ and Lotze MT: Cytolytic cells induce HMGB1 release from melanoma cell lines. *J Leukoc Biol.* 81: 75–83, 2007.
- 37 Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas a, Loughran P, Bierhaus a, Lotze MT and Zeh HJ: The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains

- autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ.* 17: 666–676, 2010.
- 38 Kidd PM: The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Altern Med Rev.* 5: 4–27, 2000.
- 39 Suenaga S, Kuramitsu Y, Kaino S, Maehara S-I, Maehara Y, Sakaida I and Nakamura K: Active hexose-correlated compound down-regulates HSP27 of pancreatic cancer cells, and helps the cytotoxic effect of gemcitabine. *Anticancer Res.* 34: 141–146, 2014.
- 40 Maehara SI, 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.
- 41 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Readings.* 193: 265–275, 1951.
- 42 Tokunaga M, Baron B, Kitagawa T, Tokuda K, Kuramitsu Y: Active Hexose-correlated Compound Down-regulates Heat Shock Factor 1, a Transcription Factor for HSP27, in Gemcitabine-resistant Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* 35: 6063-6067, 2015
- 43 Gujral TS, Kirschner MW: Hippo pathway mediates resistance to cytotoxic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: E3729-E3738, 2017.
- 44 Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim DS: Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell Rep.* 11: 270-282, 2015.
- 45 Vahid S, Thaper D, Gibso KF, Bishop JL, Zoubeidi A: Molecular chaperone Hsp27 regulates the hippo tumor suppressor pathway in cancer. *Sci Rep,* 6: 31842, 2016.
- 46 Hata S, Hirayama J, Kajiho H, Nakagawa K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H: A novel acetylation cycle of transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J Biol Chem.* 287: 22089-22098, 2012.
- 47 Santagata S, Hu R, Lin NU, Mendillo ML, Collins LC, Hankinson SE, Schnitt SJ, Whitesell L, Tamimi RM, Lindquist S and Ince TA: High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 18378–18383, 2011.
- 48 Ciocca DR and Calderwood SK: Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 10: 86–103, 2005.
- 49 Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E and Kroemer G: Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* 5: 2592–2601, 2006.

- 50 Metchat A, Akerfelt M, Bierkamp C, Delsinne V, Sistonen L, Alexandre H, Christians ES: Mammalian Heat Shock Factor 1 Is Essential for Oocyte Meiosis and Directly Regulates Hsp90 α Expression. *J Biol Chem.* 284: 9521-9528, 2009.
- 51 Zhang T, Hamza A, Cao X, Wang B, Yu S, Zhan C-G and Sun D: A novel Hsp90 inhibitor to disrupt Hsp90/Cdc37 complex against pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 7: 162-170, 2008.
- 52 Kim HR, Kang H sung and Kim H Do: Geldanamycin induces heat shock protein expression through activation of HSF1 in K562. *IUMBMB Life.* 48: 429-433, 1999.
- 53 Westerheide SD and Morimoto RI: Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem.* 280: 33097-33100, 2005.
- 54 Dudeja V, Chugh RK, Sangwan V, Skube SJ, Mujumdar NR, Antonoff MB, Dawra RK, Vickers SM and Saluja AK: Prosurvival role of heat shock factor 1 in the pathogenesis of pancreatobiliary tumors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300: G948-G955, 2011.
- 55 Xia Y, Liu Y, Rocchi P, Wang M, Fan Y, Qu F, Iovanna JL and Peng L: Targeting heat shock factor 1 with a triazole nucleoside analog to elicit potent anticancer activity on drug-resistant pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 318: 145-153, 2012.
- 56 Matsushita K, Kuramitsu Y, Ohiro Y, Obara 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: 343-50, 1998.
- 57 Ghoneum M, Wimbley M, Salem F, Mcklain A, Attallah N and Gill G: Immunomodulatory and anticancer effects of active hemicellulose compound (AHCC). *Int J Immunother.* 1: 23-28, 1995.
- 58 Terakawa N, Matsui Y, Satoi S, Yanagimoto H, Takahashi K, Yamamoto T, Yamao J, Takai S, Kwon A-H 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.
- 59 Shigama K, Nakaya A, Wakame K, Nishioka H and Fujii H: Alleviating effect of active hexose correlated compound (AHCC) for anticancer drug-induced side effects in non-tumor-bearing mice. *J Exp Ther Oncol.* 8: 43-51, 2009.
- 60 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.
- 61 Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, Grabocka E, Nofal M, Drebin JA, Thompson CB, Rabinowitz JD, Metallo CM,

- Vander Heiden MG, Bar-Sagi D: Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*. 497: 633-637, 2013.
- 62 Moroishi T, Park HW, Qin B, Chen Q, Meng Z, Plouffe SW, Taniguchi K, Yu FX, Karin M, Pan D, Guan KL: A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev*. 29: 1271-1284, 2014.
- 63 Kwist K, Bridges WC, Burg KJ: The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology*. 68: 1661-1667, 2016.
- 64 Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S: Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 474: 179-183, 2011.