

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 熱休克蛋白 90 抑制劑對乳癌幹細胞致癌性的影響
* 名 稱
* *****

執行計畫學生：張毓尹
學生計畫編號：NSC 99-2815-C-040-001-B
研究期間：99年07月01日至100年02月28日止，計8個月
指導教授：張文瑋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 100年03月07日

一、摘要

在許多癌症中，熱休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)會有過度表現的情形發生。熱休克蛋白與癌症的發展，如腫瘤的生存和轉移、以及癌症之預後有著密切的關係¹。Hsp90 的客戶蛋白(Client proteins)中，有許多和訊號傳導、細胞週期、細胞增生及轉移能力之調控有關，可表示 Hsp90 在腫瘤的發展過程裡扮演著相當重要的角色²。但是 Hsp90 抑制劑在癌症幹細胞的作用和影響目前卻尚未明瞭。過去實驗利用 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin)處理自乳癌幹細胞建立之乳癌細胞株 AS-B145，發現低濃度下並不能有效抑制 ALDH+乳癌幹細胞，並且細胞內 Hsp70、Hsp27 有上升的現象。本研究利用自乳癌幹細胞建立之乳癌細胞株 (AS-B145 及 AS-B244)，藉由 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin)抑制 Hsp90，並結合 Hsp27、Hsp70 的抑制劑 Quercetin、KNK-437，合併處理 AS-B145 及 AS-B244 乳癌細胞株，發現對於細胞增生具有加成抑制的效果，此外也可以降低因 Hsp90 抑制劑所誘導上升的 Hsp27、Hsp70 蛋白表現量，最後利用流式細胞儀分析 7-AAD-ALDH+的乳癌幹細胞族群比例，也有加成降低了乳癌幹細胞族群比例。本研究結果指出，合併藥物處理 AS-B145、AS-B244 乳癌細胞株，相較於單獨處理 Hsp90 抑制劑，將可使 Hsp90 抑制劑得以發揮較好的抑制效果。

二、前言

當細胞受到環境刺激下會快速且大量表現熱休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)，如溫度之提高、氧化壓力等。在許多癌症細胞中也有發現到HSPs會有過度表現的情況發生¹。其中特別值得注意的是Hsp90，為ATP依靠性熱休克蛋白，平常的主要功能是幫助Hsp90的客戶蛋白(Client proteins)有正確的摺疊和構形、穩定其結構，使這些客戶蛋白可執行正常的生理功能；但對於癌化的細胞，Hsp90的客戶蛋白裡有許多為致癌基因蛋白(Oncogenic proteins)，與訊號傳導、細胞週期、細胞增生、轉移能力之調控有關，可表示Hsp90在腫瘤的發展過程裡扮演著相當重要的角色²。

癌症幹細胞(Cancer Stem Cell, CSC)，具有自我複製(self-renewal)以及細胞分化(differentiation)的能力，因此被認為有形成腫瘤及發展成癌症的潛力。特別是隨著癌症轉移出去後，產生新型癌症的來源。並且這也是癌症難以根治、會再度復發、擁有較差預後之原因³。在乳癌的研究中，乳癌幹細胞為細胞具有高度細胞內aldehyde hydrogenase活性的細胞群，並且可以用ALDEFLUOR assay加以分離以及分析⁴。

三、研究目的

過去實驗利用 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin)處理自乳癌幹細胞建立之乳癌細胞株 AS-B145，發現低濃度下(0.5 μ M)並不能有效抑制 ALDH+乳癌幹細胞，但處理之細胞其 Hsp70、Hsp27 有上升的現象。因此我們假設若配合一般性 HSP 抑制劑抑制其他 HSPs 的表現，或許能加強 Geldanamycin 或 17-DMAG 在低濃度的抑制效果。本研究利用自乳癌幹細胞建立的乳癌細胞株(AS-B145 及 AS-B244)，藉由 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin 與 17-DMAG)抑制 Hsp90 並結合其

他 HSPs 的抑制，看是否能找出最有效地運用方式以抑制乳癌幹細胞的族群比例。

五、材料與方法

1. 細胞培養

由乳癌細胞建立的乳癌幹細胞株(AS-B145及AS-B244)，以MEM培養基(含10%胎牛血清、10 μ g/ml insulin、1X penicillin/streptomycin、1mM glutamine、1mM sodium pyruvate)培養於37°C含5% CO₂之培養箱。

2. 藥劑

Hsp90 inhibitors (17-AAG及Geldanamycin)、Hsp27 inhibitor(Quercetin)、Hsp70 inhibitor(KNK-437)，以DMSO溶解成高濃度溶液(40mM)，保存於-20°C。

3. 細胞增生/存活檢測

將AS-B145及AS-B244乳癌幹細胞分別以1 \times 10⁴/每孔、2 \times 10⁴/每孔的細胞量種植到96孔盤中培養，並將Hsp90抑制劑分別依不同濃度對細胞作加藥處理(17-DMAG及Geldanamycin; 合併藥物之處理則先加入Quercetin及KNK-437作用1小時，再加入17-DMAG、Geldanamycin)，處理48小時後，在每孔細胞中加入25 μ l之WST-1細胞增生試劑，再利用全波長ELISA分析儀測定波長440nm/650nm之讀值，對細胞的增生數目做檢測分析。

4. Aldefluor 染色

取1 \times 10⁵細胞沖散於50 μ l之Aldefluor assay buffer後，加入Aldefluor受質到工作濃度為1 μ M，對照組則需外加ALDH抑制劑DEAB為濃度15 μ M，放入37°C培養45分鐘後，至回冰上並加入1 μ l之7-AAD，於冰上培養10分鐘後，以3ml PBS清洗一次後，以150 μ l assay buffer回溶細胞，隨後以流式細胞儀檢測細胞螢光表現。細胞分析則以7-AAD陰性細胞(活細胞)為分析樣本群，ALDH+細胞族群界定則以DEAB處理之對照組為界線。乳癌幹細胞則由AS-B244乳癌細胞株進行Aldefluor染色後，以FACSAria細胞分選儀針對7-AAD-ALDH+之細胞族群進行分選。

5. 西方墨點法(Western blot)

取2 \times 10⁵/每孔的細胞種植至6孔盤中，加入選定濃度的藥劑進行培養。同樣處理48小時後將細胞刮下，以NP-40細胞裂解溶液將細胞裂解(lysis)後，定出蛋白的濃度，每個樣品取25 μ g總蛋白量，進行 Western Blot，測蛋白在細胞內含量。

6. 以siRNA抑制Hsp27或Hsp70的表現

Hsp27特異性或Hsp70特異性siRNA以si-Metafectene混和形成複合體後，加入AS-B145或AS-B244，繼續於37°C培養24-72小時，以西方墨點法檢測Hsp27或Hsp70的表現。進行合併處理Hsp90抑制劑的實驗時，則是先將Hsp27特異性或Hsp70特異性siRNA以si-Metafectene混和形成複合體轉染細胞，培養24小時後，再加入Hsp90抑制劑，並於48小時後進行後續實驗。

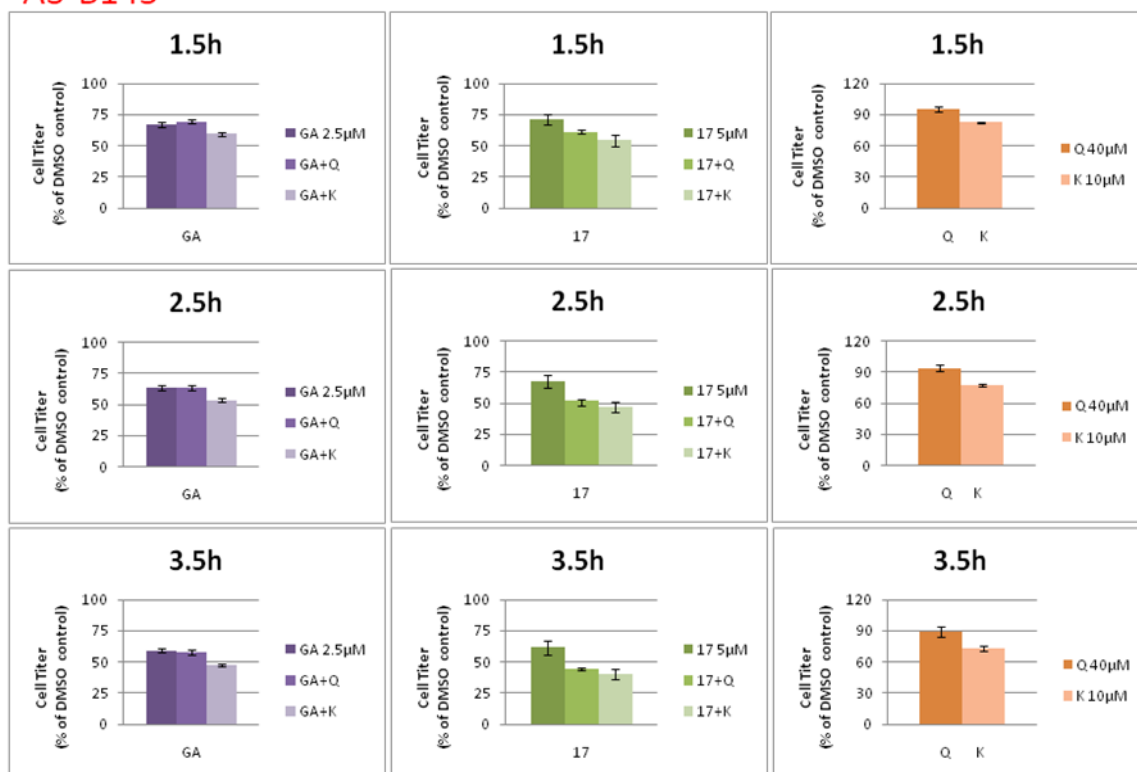
六、結果

1. 合併藥物處理對於細胞增生的影響

經由 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin、17-DMAG)合併藥物 Quercetin、KNK-437 處理 AS-B145 及 AS-B244 細胞，相較於單獨處理 Hsp90 抑制劑，合併藥物之處

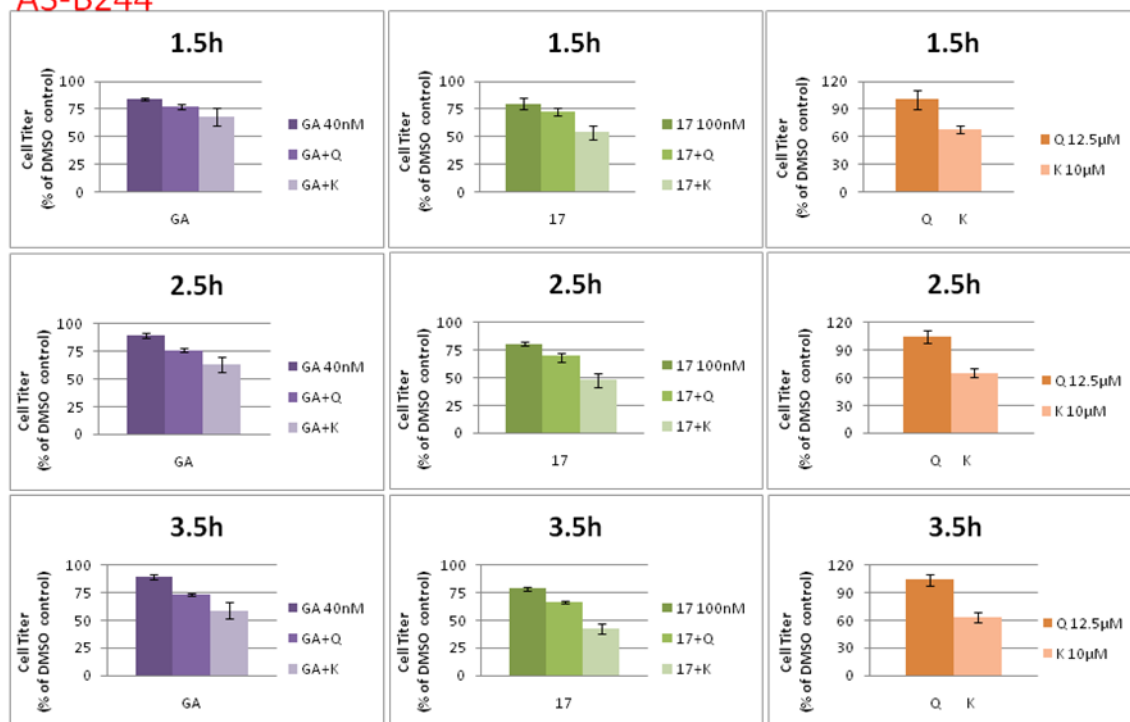
理對於細胞增生具有加成抑制的效果。(圖一、二)

AS-B145



圖一：以 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin: 2.5 μ M, 17-DMAG: 5 μ M)，合併 Quercetin 40 μ M 或 KNK-437 10 μ M 處理 AS-B145 細胞 48 小時後，偵測細胞增生情況。圖例說明: GA, geldanamycin; 17, 17-DMAG; Q, quercetin; K, KNK437。

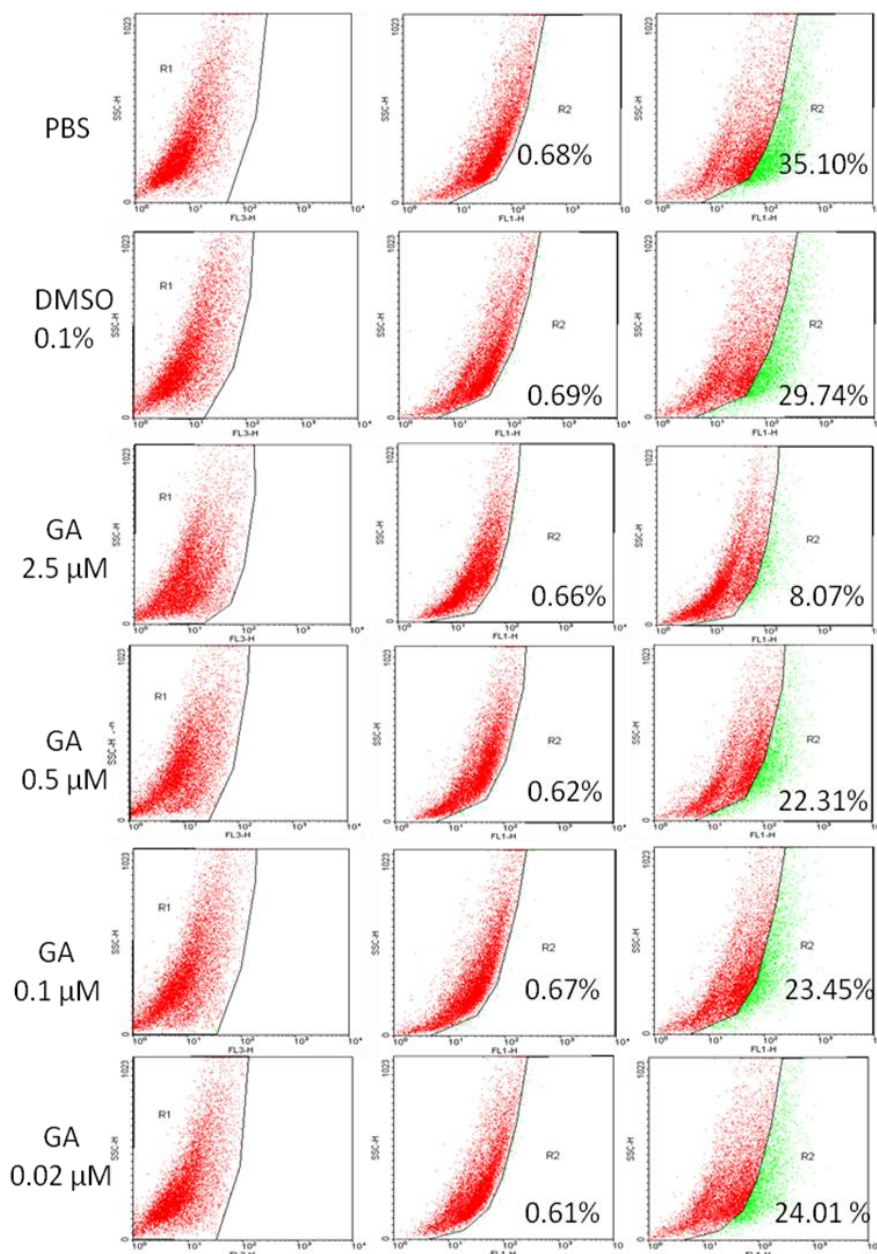
AS-B244



圖二：以 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin:40nM, 17-DMAG:100nM)，合併 Quercetin 12.5 μ M 或 KNK-437 10 μ M 處理 AS-B244 細胞 48 小時後，偵測細胞增生情況。圖例說明: GA, geldanamycin; 17, 17-DMAG; Q, quercetin; K, KNK437。

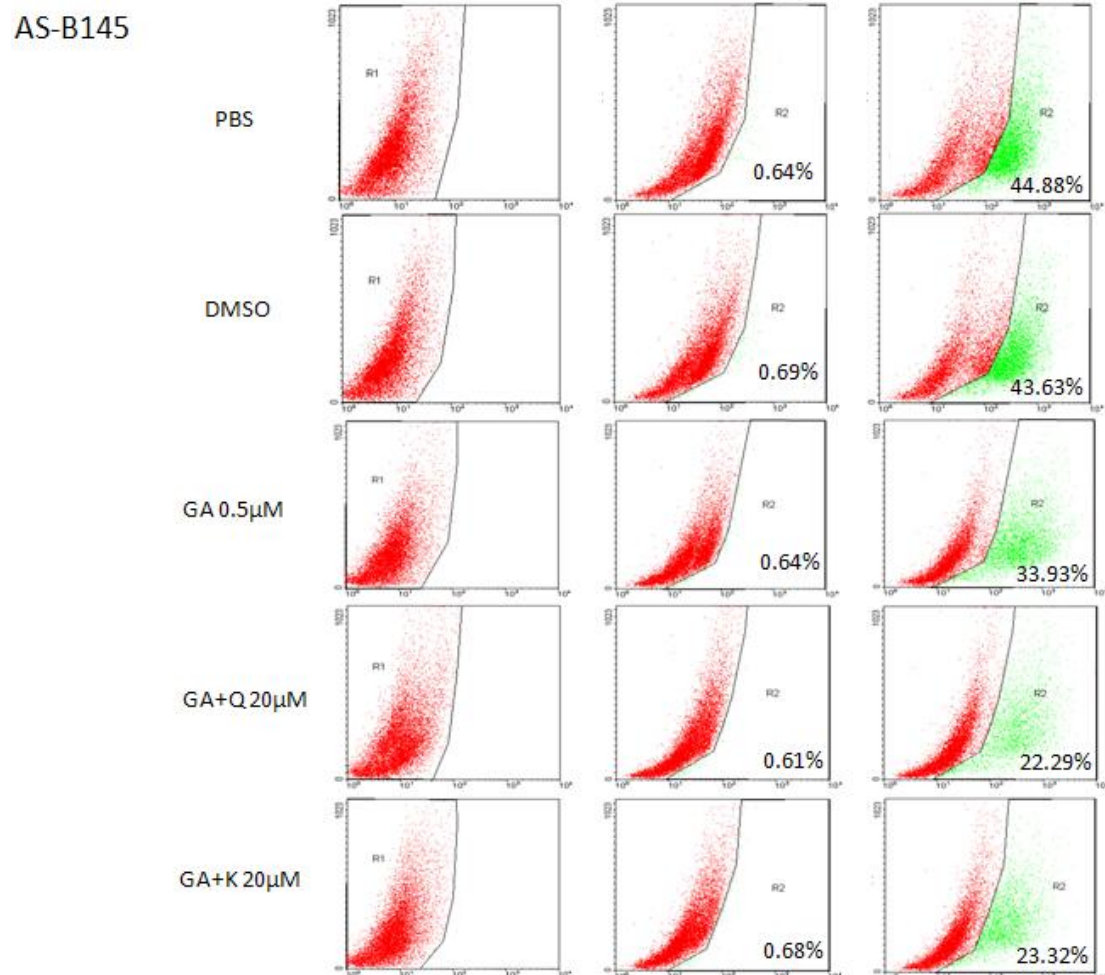
2. ALDH+乳癌幹細胞存留比例

AS-B145乳癌細胞株進行Aldefluor染色後，以流式細胞儀分析 7-AAD-ALDH+之細胞族群，結果顯示(圖三)雖然Geldanamycin在最高濃度2.5 μ M時有抑制ALDH+的族群比例，但也發現Hsp90抑制劑處理細胞後會誘導Hsp70、Hsp27蛋白表現量上升。(圖七、八)



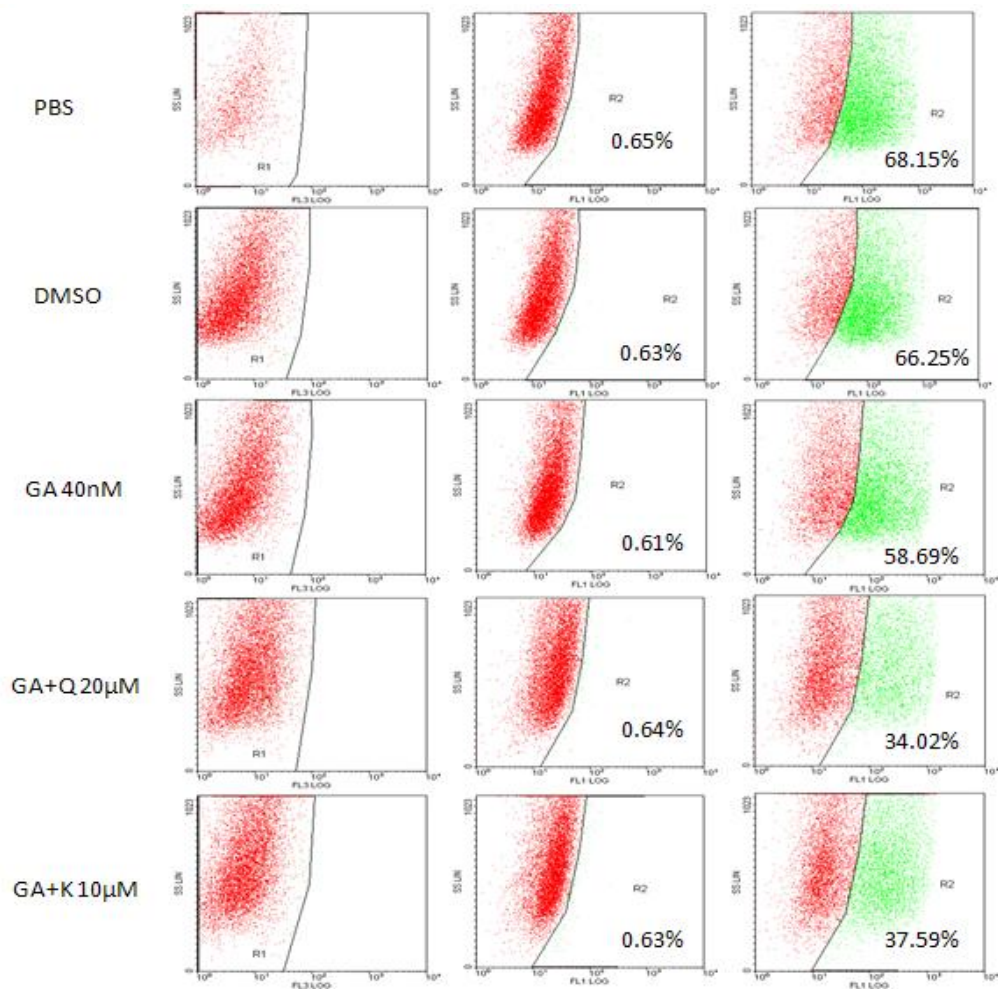
圖三：經由不同濃度的Hsp90抑制劑(Geldanamycin: 2.5, 0.5, 0.1, 0.02 μ M)處理 AS-B145細胞株後的ALDH+乳癌幹細胞之比例。紅色區域代表ALDH陰性細胞，綠色區域代表ALDH陽性細胞。圖例說明: GA, geldanamycin。

因此選用較低濃度的Hsp90抑制劑(Geldanamycin)與Hsp27、Hsp70抑制劑 Quercetin、KNK-437做合併藥物處理。定量結果指出，合併藥物處理AS-B145及 AS-B244細胞，發現對於7-AAD-ALDH+乳癌幹細胞的族群比例具有加成抑制的效果。(圖四、五)



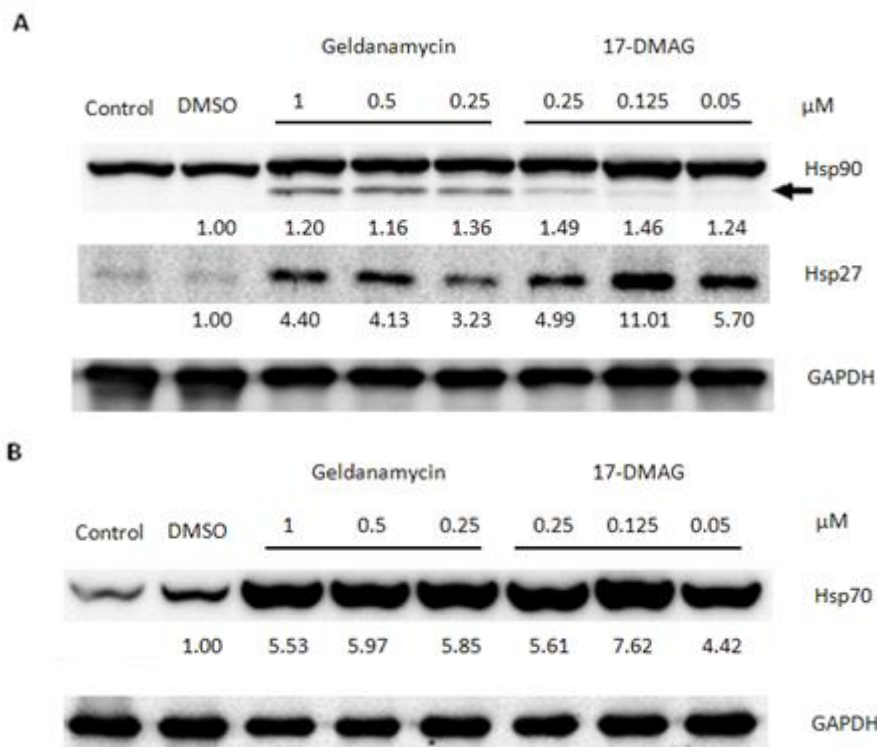
圖四：以 Hsp90 抑制劑 Geldanamycin: 0.5µM，合併 Quercetin: 20µM 或 KNK-437: 20µM 處理 AS-B145 細胞株 48 小時後的 ALDH+乳癌幹細胞之比例。紅色區域代表 ALDH 陰性細胞，綠色區域代表 ALDH 陽性細胞。圖例說明: GA, geldanamycin 0.5; Q, quercetin; K, KNK437。

AS-B244



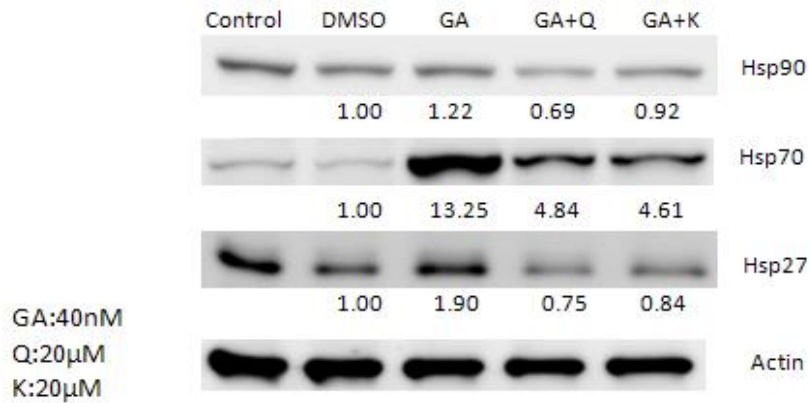
圖五：以 Hsp90 抑制劑 Geldanamycin: 40nM，合併 Quercetin: 20µM 或 KNK-437:10µM 處理 AS-B244 細胞株 48 小時後的 ALDH+乳癌幹細胞之比例紅色區域代表 ALDH 陰性細胞，綠色區域代表 ALDH 陽性細胞。圖例說明: GA, geldanamycin; Q, quercetin; K, KNK437。

圖七：AS-B145細胞株處理Hsp90抑制劑後的HSPs蛋白表現量。不同濃度的Hsp90抑制劑(17-AAG: 20, 10, 5, μM ; Geldanamycin: 10, 5, 2.5 μM)處理AS-B145細胞株後的Hsp90、Hsp27表現量。箭頭指向處為Hsp90產生之斷裂形式。圖下方數字代表Hsp90 或Hsp27 的相對比例，以DMSO處理之細胞為100%。

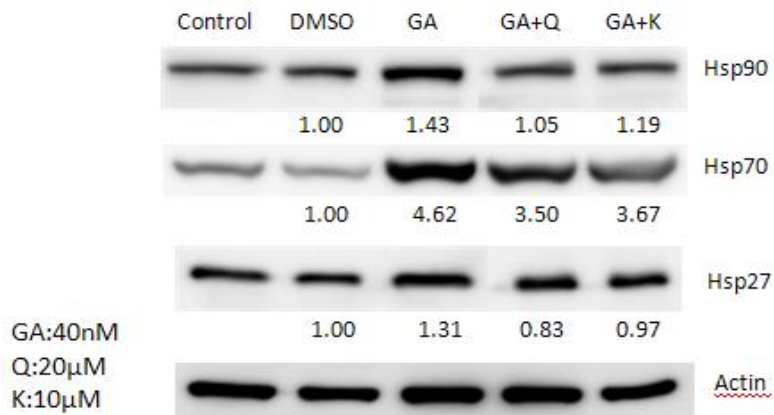


圖八：AS-B244細胞株處理Hsp90抑制劑後的HSPs蛋白表現量。不同濃度的Hsp90抑制劑(Geldanamycin: 1, 0.5, 0.25 μM ; 17-DMAG: 0.25, 0.125, 0.05 μM)處理AS-B244細胞株後(A)Hsp90、Hsp27的表現量。箭頭指向處為Hsp90產生之斷裂形式。圖下方數字代表Hsp90或Hsp27的相對比例，以DMSO處理之細胞為100%。(B)Hsp70的蛋白表現量，圖下方數字代表Hsp70的相對比例，以DMSO處理之細胞為100%。

合併藥物處理 AS-B145、AS-B244 細胞的定量結果指出(圖九、十)，經由Hsp90抑制劑處理細胞所誘導增加的Hsp27、Hsp70，可以藉由合併Quercetin、KNK-437而降低其表現，尤其是針對Hsp27的表現可以抑制到與DMSO控制組相當。

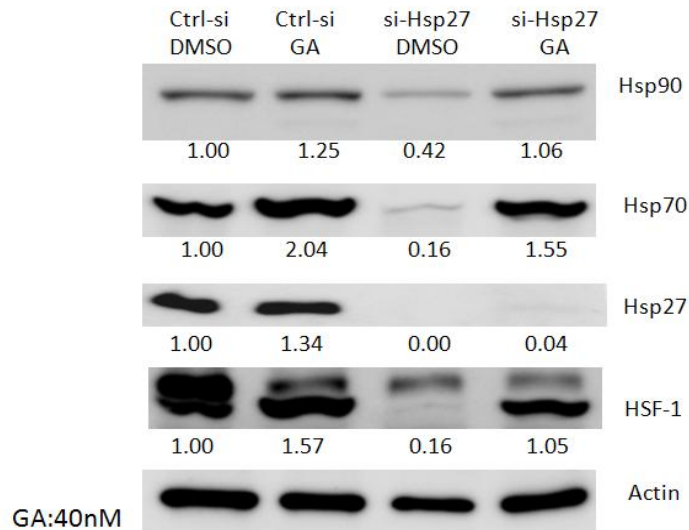


圖九：以 Hsp90 抑制劑 Geldanamycin (GA): 40nM，合併 Quercetin (Q): 20μM 或 KNK-437 (K):20μM 處理 AS-B145 細胞 48 小時後的 HSPs 蛋白表現量。圖下方數字代表以 DMSO 處理之細胞為 100% 下，Hsp90、Hsp70 和 Hsp27 的相對比例。



圖十：以 Hsp90 抑制劑 Geldanamycin (GA): 40nM，合併 Quercetin (Q): 20μM 或 KNK-437 (K):10μM 處理 AS-B244 細胞 48 小時後的 HSPs 蛋白表現量。圖下方數字代表以 DMSO 處理之細胞為 100% 下，Hsp90、Hsp70 和 Hsp27 的相對比例。

以 si-Hsp27 合併 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin)處理 AS-B244 細胞(圖十一)，可發現 Hsp70 和 HSF-1 的量也會受到 si-Hsp27 的影響而降低，這與過去文獻有相符的結果⁶。另外也可發現 Hsp90 抑制劑(Geldanamycin)的處理後，使得 HSF-1 活化，表現量也增加⁷。



圖十一：si-Hsp27 合併 Hsp90 抑制劑 Geldanamycin (GA): 40nM，處理 AS-B244 細胞的 HSPs 蛋白表現量。圖下方數字代表以 Ctrl-si DMSO 處理之細胞為 100% 下，Hsp90、Hsp70 和 Hsp27 的相對比例。

七、討論

在正常細胞狀態，負責生成HSPs的Heat-shock factor 1 (HSF1)轉錄因子會受到Hsp90結合，使HSF1的轉錄作用被抑制。而當Hsp90被抑制劑抑制後，仍有其他的HSPs會與HSF1結合，再進入核內與heat-shock element結合，使得熱休克蛋白基因被表現²。HSF-1可以透過Hsp27或Hsp70來調控其活性，進入核內與heat-shock element結合，製造出更多HSPs，因此在癌化細胞可以發現會有Hsp27、Hsp70的大量表現⁶。

以Hsp90抑制劑處理乳癌細胞株(AS-B145、AS-B244)，經由西方墨點法分析，也可發現到Hsp70及Hsp27的蛋白表現量也會增加。這可能是造成癌症細胞在Hsp90抑制劑作用下，細胞也可走向別的途徑以維持其生存的方式。

經由實驗結果，可以解釋合併藥物處理所觀察到加成抑制7-AAD-ALDH+乳癌幹細胞群的機制，是由於合併藥物處理可抑制細胞內因Hsp90抑制劑所誘導增加的Hsp27與Hsp70，防止細胞利用Hsp27或Hsp70的抑制細胞凋亡能力來逃避Hsp90抑制劑的作用。

因此藉由Hsp90抑制劑(Geldanamycin)抑制Hsp90，並結合si-Hsp27、或是Hsp27、Hsp70的抑制劑(Quercetin、KNK-437)的合併藥物處理乳癌細胞株(AS-B145、AS-B244)，相較於單獨處理Hsp90抑制劑，可使Hsp90抑制劑得以發揮最好的抑制效果。

八、參考文獻

1. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005; 10(2):86-103.
2. Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer* 2009; 100(10):1523-9.

3. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(12):895-902.
4. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 2007; Nov;1(5):485-7.
5. Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, Macias AT, Daniels Z, Geoffroy S, Dopson M, Lavan P, Matassova N, Francis GL, Graham CJ, Parsons R, Wang Y, Padfield A, Comer M, Drysdale MJ, Wood M. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66(3):535-45.
6. Seo HR, Chung DY, Lee YJ, Lee DH, Kim JI, Bae S, Chung HY, Lee SJ, Jeoung D, Lee YS. Heat shock protein 25 or inducible heat shock protein 70 activates heat shock factor 1: dephosphorylation on serine 307 through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem* 2006; 281(25):17220-7.
7. McCollum AK, Lukasiewicz KB, Teneyck CJ, Lingle WL, Toft DO, Erlichman C. Cisplatin abrogates the geldanamycin-induced heat shock response. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(10):3256-64.
8. Beck R, Verrax J, Gonze T, Zappone M, Pedrosa RC, Taper H, Feron O, Calderon PB. Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(3):375-83.
9. Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 2003; 14(8):1169-76.
10. Caldas-Lopes E, Cerchietti L, Ahn JH. et al. Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(20):8368-73.
11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:3983-3988.
12. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24^(-low)/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst* 2006; **98**:1777-1785.
13. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ: Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res* 2006; 12:5615-5621.
14. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, Haluska P, Ingle JN, Hartmann LC, Manjili MH, Radisky DC, Ferrone S, Knutson KL.

Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2009; 69(7):2887-95.