

## コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防 および治療への応用

所 属 国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究系  
研究者 矢野 友啓

### 研究要旨

各 Cx 遺伝子の癌抑制機能解析により、Cx 遺伝子の持つ抑制機能の新しい側面とその機能を利用した癌予防・治療法の有用性が明らかにされつつあり、本研究事業の最終目的である Cx 遺伝子の癌抑制機能に立脚した新しい癌予防・治療法の構築の可能性が高まりつつある。また、Cx 遺伝子の発現・機能を指標にした癌予防物質および非変異原性発癌物質を正確にかつ迅速にスクリーニングできる方法も開発されつつある。

### 分担研究者

- (1) 関西学院大学理工学部 山崎 洋
- (2) 札幌医科大学 斉藤豪
- (3) 名古屋市立大学医学部 朝元誠人
- (4) 日本大学獣医学科 浅野隆司
- (5) 日研化学(株) 医薬品研究所 石橋直人
- (6) (財) 食品農医薬品安全センター 三浦大作
- (7) 日本アムウエー(株) 技術部 栗下昭弘

### A. 研究目的

C型肝炎により誘発される肝臓癌、長期透析患者に多発する腎臓癌、食事の欧米化により増加傾向にある婦人科癌等に対する発癌制御(予防)や有効な治療法の確立は、日本におけるこれらの癌の増加や難治性を考えると癌撲滅を掲げる厚生労働行政の重要課題としての緊急性および必要性は高い。従って、本研究の目的であるコネキシン(Cx)遺伝子の臓器、細胞特異性がある癌抑制の分子機構を解明し、その機能を使って新しい癌の予防および治療法を構築することは上記の行政課題に合致する。

Cx 遺伝子は現在少なくとも20種類の分子種の存在が報告されており、6つのCxがコネクソンと呼ばれる hemichannels を形成し、隣接する細胞の細胞膜に局在するコネキソン同士が

coupling することでギャップ結合が形成される。このギャップ(GJ)結合を通じて分子量1,000以下の親水性分子が重要なシグナルとして細胞間でやり取りされ、隣接する細胞内環境の恒常性が維持される。この細胞間情報伝達の機能を介してコネキシン遺伝子は細胞の分化誘導を行い、癌抑制遺伝子として作用していることが報告されてきた。しかしながら、我々はCx遺伝子の癌抑制機能に臓器、細胞特異性があり、必ずしもギャップ(GJ)結合形成を介した細胞間情報伝達機能が必要ないことを報告し、Cx遺伝子の癌抑制機能の新しい一面を示した。さらに、我々も含めた最近の研究から、Cx遺伝子が各分子種の構造に基づいて相互作用するいくつかの分子が特定され、各Cxのその分子との相互作用を介して、その特異的な

癌抑制機能を発揮している可能性が明らかにされつつある。

これらの知見をもとに、本研究では各臓器・細胞別の Cx 遺伝子の癌抑制機構を解明するために、現在判明している Cx 遺伝子と特異的に結合する蛋白に加え、各 Cx 遺伝子と特異的に結合し、その機能を制御している新たな蛋白を特定し、その蛋白により制御されている下流の癌細胞の悪性化に寄与しているシグナル系（細胞接着機能、生存・増殖、血管新生、浸潤・転移）を解き明かし、Cx 遺伝子の臓器・細胞特異的な癌抑制分子機構を明らかにする。癌予防に関する研究では上記の解析で明らかになった各癌で特異的に抑制遺伝子として働いている Cx 遺伝子の発現や機能を指標にした最適な癌化学予防物質や非変異原性発癌物質のスクリーニング法を確立すると同時に、発癌プロモーション段階での Cx 遺伝子の発現や機能を維持する安全性が高い機能性成分を検索し、実験モデル等でその安全性や機能性を確定し、ヒトの癌化学予防に使える機能性成分を特定する。治療に関する研究では、前回の研究プロジェクトで明らかになった bystander effect に加えて、新たな可能性として、上記の解析で明らかになった Cx 遺伝子により制御されている癌細胞の悪性化に寄与しているシグナル系の律速段階に位置する蛋白を標的にした分子標的薬と Cx 遺伝子を組み合わせた治療法の可能性を探り、その構築を目指す。

## B. 研究方法

### Cx 遺伝子の癌抑制機構の細胞レベルでの解析

Cx26 を発現させた HeLa 細胞を用いて、Cx26 結合蛋白 AP26 の機能を解析するために AP26 に対する RNAi 発現ベクターを構築し、安定して AP26 の発現を阻害した条件下で、Cx26 の発現および機能を免疫染色、microinjection 法、realtime PCR 法で、細胞の悪性度の検討は 1. 軟寒天培地でのコロニー形成能、2. ノードマウスでの造腫瘍性で評価した。

Cx32 の腎臓癌の浸潤・転移に必要な線溶系因子に対する作用機構を解析するために、転移性腎癌細胞株 Caki-1 cell およびヒト原発性腎癌細胞株 Caki-2 cell に Cx32 が発現した細胞株を樹立し、線溶活性を Zymography で、遺伝子発現を realtime PCR で定量した。また、Cx32 による Src 活性化抑制機構を解析するために Cx32 遺伝子の

C-terminal domain 部分を欠損させた deleted mutant を作成し、その遺伝子を発現させた Caki-1 細胞株を樹立し、Src および Src により制御されるシグナル系に対する影響を免疫沈降、immunoblot 法、in vitro kinase 法を用いて解析した。

Cx43 に結合する新規蛋白をクローニングするために、Cx43 の細胞質内 domain loop を bait にして Yeast two hybrid 法でヒト心筋細胞 cDNA library から候補遺伝子をスクリーニングした。

### Cx 遺伝子の癌抑制機構の in vivo での解析

子宮内膜癌の手術材料を用いて、癌の進展および予後における Cx 遺伝子、その裏打ち蛋白および細胞接着因子群の役割を、免疫染色、蛍光抗体法および RT-PCR 法を用いて解析した。

Cx32 の in vivo での腎臓癌の血管新生抑制の機構解析を行うために、ヌードマウス腫瘍移植系を用いて、腫瘍組織における Src およびそのシグナル伝達系と VEGF 産出能の関連を immunoblot 法、免疫染色法、ELISA 法を用いて、腫瘍組織における血管新生能を Matrigel plug implantation assay を用いて行った。

肝臓特異的に Cx32 dominant-negative mutant を発現させたトランスジェニックラットはヘテロの Cx32 ドミナントネガティブ変異体 Tg(Cx32 Δ Tg)の雄と雌の SD ラットとの交配により作出した。実験には雄の Cx32 Δ Tg と同腹の non-Tg を用いた。8 週齢の Cx32 Δ Tg と同腹の non-Tg の肝由来 totalRNA を用い、Microarray により肝臓の遺伝子発現の違いを解析した。Microarray はアマシャムバイオサイエンス株式会社の CodeLink を用いてハイブリダイゼーションを行った。得られた遺伝子発現情報を Cx32 Δ Tg と non-Tg で比較する事により、興味ある変化を示すいくつかの遺伝子を同定し、さらに定量的 RT-PCR や immunoblot 法、免疫染色を用いて検討した。

犬の各乳腺腫瘍手術材料から RNA を抽出し、cDNA を合成し、RT-PCR により各 Cx 遺伝子の発現パターンを解析した。そして、その結果を病理診断と比較検討した。

### Cx 遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の開発

Cx32 の癌抑制機能に立脚した新たな転移性腎臓癌に対する癌化学療法の可能性を探るために、Cx32 が発現した Caki-1 細胞株を用いて、vinblastin (VBL) に対する殺細胞効果およびその機構解析を survival assay, FACS, immunoblot

法、免疫染色法、蛍光 ELISA 法および realtime PCR 法を用いて行った。

WB-F344 細胞を用いて NIK-333 の抗腫瘍効果における Cx の関与を検討するために、Dye transfer assay を用いて GJIC 機能を解析した。

大豆由来機能性成分である BBI を用いて、Cx を標的にした癌化学予防および治療法の構築の可能性を、マウス腫瘍移植系を用いて解析した。各試料から RNA および蛋白を抽出し、RT-PCR および immunoblot 法により Cx 遺伝子の発現および細胞増殖マーカー量を定量した。

Cx 遺伝子の発現・機能を指標にした癌化学予防物質および非変異原性発癌物質のスクリーニング法の開発

In vitro で鋭敏、迅速、簡易に Cx 遺伝子の機能を評価するハイスループット法を確立するために、PKH-26 と Calcein を使った細胞 2 重ラベル法と FACS を組み合わせた新たな評価法を検討した。

In vivo で正確かつ迅速に各臓器の Cx 遺伝子の機能評価法を行うモデル系を確立するために、多臓器同時発癌モデルを使って、realtime PCR により各臓器の Cx 遺伝子の発現と定量を行った。

倫理面への配慮

Cx 遺伝子の取り扱いについては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に従って行い、遺伝子組み替え実験に関しても当該委員会の承認を受けた上で遂行した。動物実験に関しては当該委員会の承認を受けた上で行い、臨床材料の取り扱いは大学当局の倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を受けた上で研究を行った。

## C. 研究結果

Cx 遺伝子の癌抑制機構の細胞レベルでの解析結果

Cx26GFP が安定発現している癌細胞株に AP26RNAi を安定して発現させると、細胞膜に局在している Cx26GFP が減弱し、それと比例して GJIC 機能が低下していた。また、AP26RNAi により AP26 の発現を抑制することにより、Cx26 の癌抑制機能が in vitro および in vivo で消失した。従って、AP26 による Cx26 の機能制御が Cx26 の癌抑制機能に必要な不可欠であることが確認された。

Cx32 遺伝子の C-terminal domain 部分を欠損させた deleted mutant を発現させた細胞 (Caki-1DM)

を用いて解析した結果、Caki-1DM において Src 活性化が抑制されず、かつ Caki-1 細胞の持つ悪性形質に影響を与えなかった。従って、Cx32 はその C-terminal domain と Src との相互作用を介して、Src によって引き起こされる悪性形質の発現を抑制することが示された。また、Cx32 は Caki-1 細胞における線溶系因子の遺伝子発現を有意に抑制していることが示され、Cx32 は線溶系因子の遺伝子発現量を減少させることにより浸潤・転移を抑制する可能性が示された。

Cx43 の細胞質内ループドドメインを bait にして yeast two hybrid system でヒト心筋細胞 cDNA ライブラリーから複数の Cx43 結合蛋白を単離した。これらに遺伝子を HeLa 細胞に発現させたところ、Semaphorin3F のみが細胞膜に局在し、Cx43 の機能を制御する可能性がある新規 Cx43 結合蛋白である可能性が示された。

Cx 遺伝子の癌抑制機構の in vivo での解析結果

子宮内膜においてホルモン依存的に Cx26 の発現が制御されており、その機能は AP26 により制御されている可能性が示され、これらの因子による Cx26 発現・機能制御の乱れが子宮内膜癌の発癌に関与している可能性が示された。また、Cx26 との相互作用が報告されている E-cadherin の発現抑制は子宮内膜癌の浸潤・転移に関係していることが示され、Cx26 の機能の抑制が間接的に子宮内膜癌の浸潤・転移に関与している可能性が推測された。

Cx32 が発現している Caki-1 細胞 (Caki-1T) は Cx32 が発現していない Caki-1 細胞 (Caki-1W) に比べて、移植した腫瘍組織の著しい壊死と自然退縮が認められ、血管新生が抑制されていた。この結果は、Matrigel plug implantation assay の結果とも一致した。また、Cx32 は腫瘍組織での Src 活性化を抑制し、血管新生因子である VEGF の産出を抑制しており、in vivo で Cx32 が Src 活性化抑制を介して、血管新生を抑制することが確認された。また、in vivo での Cx32 の顕著な血管新生抑性能を考えると、Cx32 の Src 活性化抑制に加えた新たな要因 (細胞の低酸素分圧への適応に関連する遺伝子群の抑制等) が Cx32 により制御されるシグナル因子として推測された。

Cx32 dominant-negative mutant を肝臓特異的に発現させたトランスジェニックラットを用いて、肝臓における Cx32 の機能消失の変化を microarray で解析したところ、Best5, IP10,

Stat1 等のサイトカイン誘導関連遺伝子や肝障害関連遺伝子の高発現が特定された。

犬乳腺組織では、ヒト乳腺組織と同様に Cx26 と Cx43 の発現が認められた。いくつかの乳腺腫瘍組織を用いて Cx 遺伝子の発現パターンを解析したところ、腫瘍組織の悪性化に伴って Cx26 の顕著な発現抑制が認められ、Cx 遺伝子の発現パターンの解析から判断すると犬乳腺腫瘍発生系はヒト乳癌発生モデルになり得ると考えられた。

Cx 遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の開発

Cx32 は Caki-1 細胞に対する VBL の殺細胞効果を増強した。その増強効果は、p21 の誘導による G1 check point の回復、anti-apoptotic molecule である Bcl-xL の発現抑制および VBL の能動的薬剤排出に関与している MDR-1 の発現抑制に起因している可能性が示された。

NIK-333 は肝由来 oval cell (肝幹細胞) 様細胞株である WB-F334 細胞に対して、NIK-333 は用量依存的に GJIC 機能促進作用を示すことが明らかになり、この GJIC 促進作用が肝幹細胞や肝臓癌細胞の分化誘導を引き起し、最終的に肝臓癌再発抑制に寄与している可能性が示された。

大豆由来の機能性成分 BBI はマウス腫瘍移植モデル系において、腫瘍組織に Cx43 遺伝子の誘導とそれ引き続いた細胞増殖の顕著な抑制、さらには最終的に腫瘍組織の著しい退縮を引き起こした。それにもかかわらず、BBI の高濃度投与では顕著な毒性は認められなかった。従って、BBI は Cx43 を標的にした安全性の高い癌予防・治療物質になり得ることが示された。

Cx 遺伝子の発現・機能を指標にした癌化学予防物質および非変異原性発癌物質のスクリーニング法の開発

In vitro で Cx の GJIC 機能を指標にした新規癌化学予防物質および非変異原性発癌物質を正確にかつ迅速にスクリーニングするハイスループット法として、Calsein と PKH26 の二重染色法と FACS を組合わせた新たな評価法の検討を行なったところ、その妥当性が示された。

In vivo で各臓器別に Cx 遺伝子の発現・機能を指標にした癌化学予防物質および非変異原性発癌物質のスクリーニング法の確立を目指して、多臓器同時発癌モデルを用いて、主に肝臓と腎臓における各 Cx 遺伝子の発現パターンを解析したところ、ヒトの場合と同様の傾向を示し、このモデル

が in vivo でのスクリーニングに適している可能性が示された。

#### D. 考 察

Cx26 の癌抑制機能に関する解析では、Cx26 結合蛋白 AP26 の Cx26 の癌抑制機能の制御が、恒常的に RNAi で AP26 の発現を抑制することにより最終的に in vitro で確認された。また、子宮内膜癌の手術検体を用いた解析から、Cx26 の発現抑制と並んで AP26 の発現が子宮内膜癌の悪性化に密接に関係していることが推測され、また、Cx26 と機能的に相互作用していることが推測されている E-cadherin に代表される細胞接着因子系の発現・機能消失が子宮内膜癌の浸潤・転移に関与していることが判明した。従って、AP26 が Cx26 の機能制御を介して間接的に E-cadherin の機能制御に関与していることが推測される。それ故、Cx26 遺伝子の癌抑制機能に立脚した癌予防・治療法の構築を考える場合、AP26 の挙動が重要になってくる。例えば、AP26 が発現している癌細胞(例えば、Hela 細胞)に Cx26 を発現させると、Cx 遺伝子の機能を使った癌遺伝子治療 (bystander effect) は可能であるが、AP26 の発現が抑制されると Cx26 の機能は消失し、その治療効果は弱められる可能性がある。また、犬乳腺腫瘍発生系が Cx26 の機能消失に基づく発癌系として、ヒト乳癌発生モデルになることが確認されたので、このモデルが上記の AP26 および Cx26 の機能を使った癌治療法構築のための良い前臨床モデルとして使える可能性がある。また、新規 Cx43 結合蛋白候補として Semaphorin3F がスクリーニングされたが、この蛋白が細胞膜に局在したことから、Cx43 の機能を制御する可能性が示され、今後、この蛋白を介した機能解析を進めることにより、Cx43 の持つ癌抑制機能の新しい側面が明らかになると思われる。

Cx32 の癌抑制機能解析では、以前に主作用点の 1 つとして Src の活性化抑制を報告したが、今回 Cx32 の C-terminal domain を介した Src 活性化抑制機構が明らかになった。この Cx32 deleted mutant 構造は Cx26 と類似しているが、Cx26 が腎臓癌の主たる癌抑制遺伝子でない可能性を考慮すると、Cx32 の C-terminal domain を介した Src 活性化抑制が腎臓癌の Src の活性化に依存している悪性化 (生存・増殖・浸潤・血管新生・薬剤耐性) シグナル系を抑制し、そのことが Cx32 の腎臓

癌特異的な抑制機能の一翼を担っている可能性が推測される。また、腎臓癌以外にも正常組織でCx32が発現しており、かつその癌化がSrcの活性化に依存しているいくつかの癌が報告されているので、もし、腎臓癌で認められたCx32のSrc活性化抑制機構がこれらの癌にも適用できるのであれば、将来的には各癌患者の癌組織のSrc活性化を指標にしたCx32の癌抑制機能に立脚した癌治療のオーダーメイド医療が可能になると思われる。さらに、今回Cx32によるSrc活性化抑制作用に加えて、Cx32が癌細胞の悪性化に寄与する低酸素分圧適応を阻害する可能性が示されたので、今後この適応阻害に関与する遺伝子が特定できれば、新たなCx32遺伝子機能に立脚した癌治療法を構築する際の標的遺伝子が明らかにできる。一方、Cx32 dominant-negative mutantを肝臓特異的に発現させたトランスジェニックラットを用いた解析では、Cx32遺伝子の機能的ノックアウトを補うために、肝臓においていくつかのサイトカイン誘導関連遺伝子や肝障害関連遺伝子の高発現が確認されたが、場合によっては、これらの因子が発癌プロモーターとして働く可能性があり、このことがトランスジェニックラットの高化学肝臓発癌と関連しているかもしれない。今後この可能性が確認できれば、Cx遺伝子の機能抑制による新たな肝臓発癌機構が明らかになり、上記の高発現している遺伝子群を標的にした新たな肝臓癌予防法の構築が可能になるかもしれない。

Cx遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の開発に関する研究では、上記のCx32の癌抑制機能に立脚した転移性腎臓癌に対する化学療法を構築するための可能性を検討したところ、Cx32は転移性腎臓癌において、薬剤耐性機構の獲得に不可欠な重要な因子（能動的薬剤排出機構の亢進、増殖シグナル伝達分子の機能亢進による増殖シグナルの脱制御、P53のような癌抑制遺伝子の機能抑制による細胞周期チェックポイントの脱制御やapoptosisシグナル系の阻害）に網羅的に作用し、薬剤耐性を軽減していることが示された。このCx32が単独で多様な薬剤耐性機構を制御できる事実は、従来の個々の薬剤耐性機構を標的にした治療法よりも、はるかに有効であり、安全性も期待できる。それ故、Cx32の癌抑制機能に立脚した転移性腎臓癌に対する抗がん剤治療は、その薬剤耐性を克服した新たな癌治療法になる可能性がある。また、遺伝子導入というかたちではなく、内

因性のCx遺伝子の発現・機能回復による癌細胞の増殖制御を利用した癌予防・治療法の可能性の検討では、肝臓におけるNIK-333によるGJIC機能促進を介した肝細胞の分化誘導作用とそれに基づいた肝臓癌再発予防効果、BBIによるマウス腫瘍移植系モデルにおけるCx43の発現回復とそれに引き続いた腫瘍組織の退縮といった内因性のCx遺伝子の発現・機能回復による癌予防・治療法の可能性を示す結果が得られた。従って、今後各癌に特異的に働くCx遺伝子の発現・機能抑制を解除するtreatment protocolが各癌別に実現できれば、本研究事業の最終目的であるCx遺伝子の癌抑制機能に立脚した新しい癌予防・治療法の構築実現の可能性が高まる。また、現在進行中のin vitroおよびin vivoで正確かつ迅速にCx遺伝子の発現・機能を指標にした癌化学予防物質および非変異原性発癌物質のスクリーニング法が完成すれば、上記の癌予防・治療法に使える新規薬剤の供給に要する期間が大幅に短縮されると同時に、現在発癌への関与が疑われながら、最適なスクリーニング法が無いために野放しにされている非変異原性発癌物質による発癌リスクが的確に評価され、その結果、非変異原性発癌物質による発癌リスクが大幅に軽減され、癌予防戦略が大幅に前進する事になる。

## E. 結論

各Cx遺伝子（Cx26, Cx32およびCx43）と相互作用する蛋白とそれらにより制御される下流のシグナル伝達系を解析し、現在までにいくつかのCx遺伝子と相互作用する分子が特定され、その下流に位置する癌の悪性化に関与するシグナル伝達系も明らかにされつつあり、Cx遺伝子の癌抑制機能の新たな一面が示された。今後これらの解析が進めば、Cx遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法を構築する際の新たな分子標的が明らかとなり、より効果的な癌予防・治療法が実現すると予測される。また、Cx遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法を確実に実現するために、内因性のCx遺伝子の発現・機能回復による癌細胞の増殖制御を利用した癌予防・治療法の可能性を示す結果が得られた。さらに、新たなCx遺伝子の発現・機能を指標にした癌化学予防物質および非変異原性発癌物質のスクリーニング法の開発を進めており、このスクリーニング法が完成すれば、Cx遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の実現性が高まる。

## F. 研究発表

Saito T., Tanaka R., Wataba K., Kudo R. & Yamasaki H. Overexpression of estrogen receptor- $\alpha$  gene suppresses gap junctional intercellular communication in endometrial carcinoma cells. *Oncogene* 23, 1109-1116 (2004).

Dagil M.L., Yamasaki H., Krutovskikh V. & Omori Y. Delayed liver regeneration and increased susceptibility to chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of connexin 32 only in the liver. *Carcinogenesis* 25, 483-492 (2004)

Ito F., Morita N., Miura D., Koma Y., Kataoka TR., Yamasaki H., Kitamura Y., Kita Y. & Nojima H. A derivative of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. *Carcinogenesis* 25, 2015-2022 (2004)

Avanzo JL., Mesnil M., Hernandez-Blazquez FJ., Mackowiak II., Mori CM., da Silva TC., Oloris SC., Garate AP., Massironi SM., Yamasaki H. & Dagli ML. Increased susceptibility to urethane-induced lung tumors in mice with decreased expression of connexin 43. *Carcinogenesis* 25, 1973-1982 (2004)

Tanaka R, Saito T., Shijudo N, Takehara M, Yamada G, Kawabata I, Itoh Y, Kudo R. Expression of uteroglobin in normal and carcinogenic endometrium and influence of hormone replacement therapy. *Int J Cancer* 109, 44-48 (2004)

Saito T., Mizumoto H, Tanaka R, Satohisa S, Adachi K, Horie M, Kudo R. Overexpressed progesterone receptor form B inhibits invasive activity suppressing matrix metalloproteinases in endometrial carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 209, 237-243 (2004)

Adachi K, Toyota M, Sasaki Y, Yamashita T, Ishida S, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Hinoda Y, Saito T., Imai K, Kudo R, Tokino T. Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. *Oncogene* 23, 7791-7798 (2004)

Asamoto M., Hokaiwado N., Murasaki T. & Shirai T. Connexin 32 dominant-negative mutant transgenic rats are resistant to hepatic damage by chemicals. *Hepatology* 40, 205-210 (2004)

Suzuki S, Asamoto M., Tsujimura K, Shirai T. Specific differences in gene expression in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue. *Carcinogenesis* 25, 439-443 (2004)

Yano T., Ito F, Yamasaki H., Hagiwara K., Ozasa H., Nakazawa H. & Toma H. Epigenetic inactivation of connexin 32 in renal cell carcinoma from hemodialysis patients. *Kidney Int.* 65, 1519 (2004)

Fujimoto E., Satoh H., Ueno K., Nagashima Y., Hagiwara K., Yamasaki H. & Yano T. Negative growth control of renal cell carcinoma cell by connexin 32: possible involvement of Her-2. *Mol Carcinogenesis* 40, 135-142 (2004)

Yano T., Ito F, Kobayashi K., Yonezawa Y., Suzuki K., Asano R., Hagiwara K., Nakazawa H., Toma H. & Yamasaki H. Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinoma from hemodialysis patients. *Cancer Lett.* 208, 137-142 (2004)

Ogawa K, Asamoto M., Suzuki S, Tsujimura K, Shirai T. Down regulation of apoptosis revealed by laser microdissection and cDNA microarray analysis of related genes in rat liver preneoplastic lesions. *Med. Electron microscopy*, in press.

Fujimoto E., Sato H., Shirai S., Nagashima Y., Fukumoto K., Hagiwara H., Negishi E., Ueno K., Omori Y., Yamasaki H., Hagiwara K. & Yano T. Connexin 32 as a tumor suppressor gene in a metastatic renal cell carcinoma cell line. *Oncogene* in press.

Fujimoto E., Sato H., Nagashima Y., Negishi E., Shirai S., Fukumoto K., Hagiwara H., Hagiwara K., Ueno K. & Yano T. A Src family inhibitor (PP1) potentiates tumor-suppressive effect of connexin 32 gene in renal cancer cells. Life Sci., in press.

Fujimoto E., Yano T., Sato H., Hagiwara K., Yamasaki H., Shirai S., Fukumoto K., Hagiwara H., Negishi E. & Ueno K. Cytotoxic effect of Her-2/Her-1 inhibitor PKI-166 on renal cancer cells expressing connexin 32 gene. J. Pharmacol. Sci., in press.

Shirai S, Hagiwara H., Fukumoto K, Sato H, Yamasaki H., Seki T, Ariga T, Hagiwara K, Yano T. Prevention of renal cell carcinoma from hemodialysis patients by regulating epigenetic factors. Kidney Int., in press.

Yonezawa Y, Nagashima Y, Sato H, Virgona N, Fukumoto K, Shirai S, Hagiwara H., Seki T, Ariga T,

Senba H, Suzuki K., Asano R., Hagiwara K, Yano T. Contribution of the Src family of kinases to the appearance of malignant phenotypes in renal cancer cells. Mol Carcinogenesis in press.

Goth H, Harada K, Suzuki K., Hashimoto S, Yamamura H, Sato T, Fukumoto K, Hagiwara H., Ishida T, Yamada K, Asano R., Yano T. Expression patterns of connexin 26 and connexin 43 mRNA in canine benign and malignant mammary tumours. Veterinary J., in press.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他

特許出願：出願番号、特願 2004-96207

発明名称、腎臓癌治療剤