

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	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	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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が明らかにされ、その機能を利用した癌予防・治療法の試みが行なわれ、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確立されつつあり、この方法によりいくつかの有望な癌予防成分のスクリーニングが可能になってきた。

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 齊藤豪
- (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。

コネキシン(Cx)は connexon と呼ばれる6量体からなる hemichannel を形成し、隣接する細胞の細胞膜に局在する。Connexon 同士が coupling することでギャップ結合(GJ)が形成する。Cx 遺伝子はこのGJを通じて分子量1,000以下の親水性分子を重要なシグナルとして細胞間でやり取りさせ、隣接する細胞内環境の恒常性を維持することで細胞の脱分化(癌化)を抑制することが報告されてきた。しかし、いくつかの研究報告からはCx遺伝子の癌抑制機能は、GJ形成能とは無関係とされ、長年にわたって、癌抑制遺伝子としてのCx遺伝子の詳しい機能は明らかにされなかった。一方、近年

になって、各臓器特異的に Cx 遺伝子が発現しており、各臓器によってその正常機能維持に必要なとされる Cx 遺伝子に大きな違いが存在することが明らかになってきたが、現状では、Cx 遺伝子の臓器特異的な機能はほとんど明らかにされていない。さらに、Cx 遺伝子の癌抑制機能は原発癌においては認められるが、転移癌においては矛盾する結果が報告され、明らかになっていない。

そこで、本研究事業では Cx 遺伝子の臓器特異的な癌抑制分子機構を細胞レベルで解析するグループ、Cx 遺伝子の癌抑制機構を臨床材料や病態モデルを用いて *in vivo* で解析するグループ、Cx 遺伝子を標的とした癌化学予防・治療法の構築の可能性を探るグループ、Cx 遺伝子の発現や機能を指標にした癌化学予防物質や非変異原性発癌物質の鋭敏で特異性の高いスクリーニング法を開発するグループの 4 グループを構成し、互いに密に情報を交換し、機能的な研究を遂行し、最終的に Cx 遺伝子の特異的な癌抑制機能を使った臓器別および転移癌に対する予防・治療法を構築することを目指す。

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 結合蛋白 AP26 の Cx26 との相互作用を最終的に確認するために、Cx26 の affinity column を作成し、溶出してきた蛋白の TOF/MAS 解析をおこなった。Cx26 の機能制御に必要な細胞内ループドメインを特定するために、そのドメインに変異させた Cx26 変異体の機能を解析した。さらに、低カルシウム条件下で培養することで、Cx26 の局在におけるカドヘリンの役割を確認した。*In vitro* で生体内の低酸素条件を再現するために、嫌気培養用 chamber と脱気剤 (AnaeroPack) を組み合わせ、低酸素分圧条件を作成した。この低酸素培養条件下で細胞培養 (最大 48 時間) 行い、低酸素分圧適応に関与する key molecule (HIF, Src) の変動を realtime PCR および immunoblot で解析すると同時に、低酸素分圧条件下で Boyden Chamber を用い

て Cx32 の浸潤能を測定した。Cx43 に結合する新規蛋白 Semaphorin3F による Cx43 の機能制御を解析するために、siRNA や Semaphorin3F の C 末端ドメインを使って Cx43 の局在性に与える影響を評価した。

Cx 遺伝子の癌抑制機構の *in vivo* での解析：犬乳腺腫瘍の手術材料を用いて、癌の進展および予後における Cx 遺伝子の特定を免疫染色および realtime PCR 法を用いて解析した。NK 活性をノックアウトした転移 scid マウスモデルを構築し、腎臓癌細胞の転移に対する Cx32 の抑制作用の解析を行った。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。このラットを用いて発癌実験を行い、発癌過程 (イニシエーションおよびプログレッション) における GJ intercellular communication (GJIC) の阻害の影響を評価した。

Cx 遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の開発：子宮内膜癌における Cx26 の癌抑制機能に立脚した新たな治療法を構築するために、Cx26 が発現し、GJIC が機能している suicide gene (HSV-tk) を発現させた細胞系を樹立し、GCV の殺細胞効果に及ぼす GJIC の影響を評価した。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 が発現した転移性腎細胞を用いて、癌細胞における Vinblastine (VBL) に対する耐性を規定する薬剤耐性関連分子 (MDR-1 等) に対する Cx32 の影響を解析するために、realtime PCR および immunoblot を用いてその分子の発現レベルを解析すると同時に、Cx32 の siRNA を用いて Cx32 の薬剤耐性関連分子に対する影響を確認すると同時に、Cx32 による薬剤耐性関連分子に対する影響を制御しているシグナル分子を推測した。肝細胞癌を用いて

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、Cx43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。

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法により各臓器のCx遺伝子の発現と定量を行い、そのCxの機能を免疫染色法やpatch clump法で解析を行った。

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：Cx26の細胞質内ルーブドメインの変異体を使い解析した結果、Cx26の細胞質内ルーブドメインを介した機能がCx26の機能に必要な不可欠であることが明らかになり、さらに、Cx26はルーブドメインに結合するタンパクを介して細胞接着因子(cadherin類)と相互作用し、互いの機能を制御する事がCx26の持つ細胞特異的な癌抑制機構に関与していることが示された。現在、最終的にこの複合体の存在をTOF/MASで解析中であ

る。転移抑制遺伝子としてのCx32の作用機構を探るために、低酸素分圧適応に関するkey molecule(HIF, Src)を解析した。その結果、低酸素分圧条件下で活性化されるSrcの活性化や誘導されるHIF-2 α について、その活性化および誘導をCx32は抑制することが示され、Cx32による癌細胞の低酸素分圧への適応阻害が転移抑制の作用機構の1つとして推定された。実際、低酸素分圧条件下での癌細胞の浸潤能はCx32により抑制された。Cx43の細胞質内ルーブドメインへ結合する可能性があるSemaphorin3FがCx43の局在・機能を制御することが示され、また、Cx43の局在を局在するのに必要な細胞質内ルーブドメインが特定された。

Cx遺伝子の癌抑制機構のin vivoでの解析結果：新たに作成した転移モデルを用いた解析では、Cx32が転移抑制遺伝子として作用することが明らかになった。肝臓におけるCx32の癌抑制機能を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の機能消失と発癌の関連を解析したところ、発癌のイニシエーションおよびプログレッションの両段階の促進とCx32に依存したGJIC機能抑制の関連が認められた。また、犬乳腺組織では、いくつかの乳腺腫瘍組織を用いてCx遺伝子の発現量をrealtime PCRで定量したところ、Cx26が発癌初期段階で発現抑制され、Cx43の発現抑制は浸潤・転移を示す悪性度が高い腫瘍組織で抑制傾向が認められた。

Cx遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の開発：Cx26の癌抑制機能に立脚した子宮内膜癌に対する治療法として、Cx遺伝子が共通して持つGJIC機能によるsuicide gene(HSV-tk)によって誘導される殺細胞効果の増強作用(bystander killer effect)とCx26の持つ細胞特異的な癌抑制作用の組み合わせが有効であることが示された。Cx32は抗癌剤耐性を示す腎臓癌細胞に対する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 の発現抑制や GJIC 機能に基づく bystander effect に起因している事が示された。このことはマウス移植モデルで確認された。

マウス腫瘍移植モデル系を用いて BBI の作用機構を解析したところ、BBI は腫瘍組織のうちに正常腫瘍組織と壊死を起こした組織の境界にあたる腫瘍組織の壊死の前段階にあたる部分にのみ Cx43 遺伝子が誘導され、最終的に Cx43 の誘導が腫瘍組織の著しい退縮を引き起こしていることが判明した。

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 Cx 遺伝子の GJIC 機能を指標にした癌化学予防物質を正確かつ迅速にスクリーニングするハイスループット法を構築し、その妥当性をいくつかの既知の抗癌物質でその妥当性を評価したところ、その妥当性が認められた。*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、発癌プロモーション段階での各 Cx 遺伝子の発現パターンおよびその GJIC 機能を解析したところ、各臓器別に発現抑制される Cx 遺伝子および GJIC 機能が報告されているヒトの場合とほぼ一致したので、モデル動物を用いた Cx 遺伝子の発現・機能を指標にした非変異原性発癌物質のスクリーニング法の妥当性が示された。

D. 考察

Cx26/AP26 complex の形成が Cx26 の癌抑制機能発揮に重要であることが推測されていたが、今回 AP26 の結合ドメインと予測される Cx26 の細胞質内ループドメインが Cx26 の機能制御に重要であることが示され、上記の推測が確認された。今後、この complex 形成により制御される下流のシグナル伝達系を特定することが詳細

な Cx26 の持つ癌抑制機能の解明につながると思われる。また、今回子宮内膜癌の新たな治療として、Cx26 の機能を使った癌遺伝子治療 (bystander effect) の可能性が示されたが、予備的検討で薬物治療 (レチノイド) により Cx26 の機能維持が可能であることが示されたので、この薬物療法が子宮内膜癌の遺伝子治療を増強する可能性が推測された。

Cx32 が癌細胞の低酸素分圧への適応阻害により、悪性度の高い転移性腎臓癌の浸潤・転移を抑制し、また、抗癌剤の薬剤耐性を軽減したところから、Cx32 の抑制機能に立脚した新たな転移性腎臓癌に対する治療の可能性が示された。一方、トランスジェニックラットを用いて解析では、Cx32 に依存した GJIC の阻害がイニシエーションのみならずプログレッションの促進につながり、Cx32 の発現回復が肝臓癌の予防・治療に役立つことが明らかになり、昨年度明らかになった Cx32 の機能抑制に伴った肝臓における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との関連が明らかになれば、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、薬物 (NIK-333 等) による Cx32 発現回復・維持に加えて、上記の高発現している遺伝子群を標的とした新たな肝臓癌予防・治療法の構築が可能になるかもしれない。

Cx43 の細胞質内ループドメインと結合し、Cx43 の機能を制御する新規タンパクとして Semaphorin3F をスクリーニングしたが、このタンパクは axon guidance molecule として癌抑制遺伝子として機能していることが報告された。今回、Semaphorin3F が結合すると予測される Cx43 の細胞質内ループドメインが Cx43 の機能制御する可能性があひめされたので、今後の解析で Cx43/Semaphorin3F 複合体による新たな癌抑制機構が明らかになれば、Cx43 の癌抑制機能およびそれに立脚した癌予防・治療法構築の重要な手がかりになる。また、ヒト乳癌モデルと考えられる犬乳腺腫瘍を用いた解析から、Cx43 がヒトの場合と同様に乳腺腫瘍の浸潤・転移抑制に関与している

可能性が示されたので、今後このモデルを使って Cx43 をターゲットにした乳癌の転移を抑制する活性成分のスクリーニングが可能になる。特に今回のスクリーニングで大豆由来の BBI が Cx43 の発現・機能を回復させることで癌抑制効果を示したことから、この成分が第一候補として有力である。

in vitro で Cx 遺伝子の GJIC 機能を指標にした癌化学予防物質を正確かつ迅速にスクリーニングするハイスループット法を構築し、BBI による Cx43 誘導とその癌抑制作用の特定のように、このハイスループット法を適切な in vivo のモデル系と組み合わせることにより、Cx 遺伝子の機能回復をターゲットにした各癌別に有効な癌予防物質のスクリーニングが迅速かつ正確に行える可能性が示された。また、現在非変異原性発癌物質の検出方法には簡便・短期間の検出方法は確立されていないが、今回の結果から、適切な動物モデルを用いて各臓器で癌抑制遺伝子として特定された Cx 遺伝子の発現および機能を発癌過程で評価することにより、比較的短期間で正確に各臓器別に非変異原性発癌物質の特定が可能になる事が推測された。

E. 結論

代表的な各 Cx 遺伝子 (Cx26, Cx32, Cx43) の癌抑制機構の解析を通じて、Cx 遺伝子の癌抑制機能を制御する新規結合蛋白のスクリーニングや Cx 遺伝子によって抑制される癌の悪性化に関与するシグナル伝達系が特定され、各 Cx 遺伝子の持つ特異的な癌抑制機能が徐々に明らかにされてきた。また、いくつかの癌では、明らかにされた Cx 遺伝子の癌抑制機能に立脚した癌治療の有効性が証明された。さらに、Cx 遺伝子の発現・機能を指標にしたスクリーニング法の開発が進展し、このスクリーニング法を適切なモデル動物系と組み合わせることにより、今までよりも迅速かつ正確に各癌別に有効な癌予防物質や臓器別に発癌性を示す非変異原性発癌物質の特定が可能になる。以上、現在までに各研究グループの研究成果が融合しあって順調に研究成果があがっており、本研究プロジ

ェクト終了時にはいくつかの癌において、Cx 遺伝子の特異的な癌抑制機能を使った臓器別および転移癌に対する予防・治療法を構築するという本研究の目的が達成可能と思われる。

F. 研究発表

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*, 24, 3684-3690 (2005)

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.*, 76, 2711-2720 (2005)

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.*, 97, 294-298 (2005)

Suzuki K, Yano T., Sadzuka Y, Sugiyama T, Seki T, Asano R. Restoration of connexin 43 by Bowman-Birkprotease inhibitor in M5076 bearing mice. *Oncol Rep.*, 13, 1247-1250 (2005)

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*, 43, 188-197 (2005)

Shirai S, Hagiwara H, Sato H, Fukumoto K, Kobayashi S, Seki T, Ariga T, Hagiwara K, Yamasaki H, Yano T. Prevention of renal cell carcinoma from hemodialysis patients by regulating epigenetic factors. *Kidney Int.*, 67, 2506-7 (2005)

Hokaiwado N, Asamoto M, Ogawa K, Shirai T. Transgenic disruption of gap junctional intercellular communication enhances early but not late stage hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol Pathol.*, 33, 695-701 (2005)

Satohisa S, Saito T, et. al., Behavior of tight-junction, adherens-junction and cell polarity proteins during HNF-4alpha-induced epithelial polarization. *Exp Cell Res.*, 310, 66-78

Terasawa K, Saito T, et. al., Hyperstimulation and a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Modulate Ovarian Vascular Permeability by Altering Expression of the Tight Junction Protein Claudin-5. *Endocrinology*, 147, 694-699.

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.

Hagiwara H, Sato H, Shirai S, Kobayashi S, Fukumoto K, Ishida T, Seki T, Ariga T, Yano T. Connexin 32 down-regulates the fibrinolytic factors in metastatic renal cell carcinoma cells. *Life Sci.*, 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 無

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社