

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号			
KH11001	バイオフィotonics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	16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司	21
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	30
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	40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に關与するプリン受容体の機能解明	井上和秀	100
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	126
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	144
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	154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫	168
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	181
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	196
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	208
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	221
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	235
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	247
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	262
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	286
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	300
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	310
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	318

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 …… 344
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 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
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 …… 466
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 謙 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 兒 …… 566
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 …… 576

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・治療法の構築がいくつかの癌で可能になった。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、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) 興和創薬(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1,500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した。

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、Cx26 の affinity column を作成し、溶出してきた蛋白の TOF/MAS 解析で最終確認した。

Caki-1 細胞における Cx32 の発現の有無違いによる gene expression profile は Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 GeneChip platform で行った。文献から腎臓癌の悪性化因子を選択し、その選択した悪性化因子に関連した signal pathway に対する Cx32 の影響を網羅的に解析した。新たに Cx32 の siRNA を安定して発現した細胞株を樹立し、*in vitro* で DNA 脱メチル化剤による Cx32 の発現回復の腎細胞癌増殖抑制の寄与を評価した。

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 の癌抑制機能に対する作用を検討した。

Cx 遺伝子の癌抑制機構の *in vivo* での解析：

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、肝臓癌の肺転移に対する Cx32 の抑制作用を検討した。

Cx 遺伝子の機能に立脚した癌予防・治療法の開発：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 の発現を回復させる retinoid を用いて GJIC 機能を回復させ、suicide gene (HSV-tk) を導入した細胞系を樹立し、GCV の殺細胞効果に及ぼす GJIC の影響を評価した。ヌードマウス腎臓癌移植モデルを用いて DNA 脱メチル化剤による Cx32 の発現回復の腎細胞癌増殖抑制の寄与を *in vivo* で行い、Cx32 をターゲットにした転移性腎臓癌の治療法構築の最終確認を行った。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、各 Cx 蛋白の肝臓での局在性と発現レベルを精査した。また、大豆由来機能性成分である BBI を主にした、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(GJIC)を評価するハイスループット法を使って、いくつかの癌化学予防成分の GJIC 機能回復と癌予防効果の関連性を検討した。*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最終的に確立するために、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 clamp 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：TOF/MAS を用いて Cx26 の複合体の解析を行い、最終的に AP26 による Cx26 の細胞質内ループドメインを介した機能が Cx26 の癌抑制機能に必要不可欠であることを確認した。

Microarray 解析により、腎臓癌細胞で Cx32 により活性化される新たなシグナル伝達系として fumarate hydratase (FH) により制御されるシグナル伝達系が特定された。実際、Cx32 発現により FH 活性が有意に上昇していた。

Cx43 の細胞質内ループ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最終に確認され、Semaphorin3F による Cx43 の機能制御が Cx43 の癌抑制機能に必要不可欠であることが判明した。

Cx 遺伝子の癌抑制機構の *in vivo* での解析結果：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 の機能消失と肺転移の関連を解析したところ、Cx32 の機能消失が肝臓癌の肺転移を促進することが明らかになった。

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。今年

度は特に Cx26 の強制発現ではなく、retinoid による Cx26 の発現回復により、子宮内膜癌の suicide gene therapy の治療効果が増強されることが明らかになった。

DNA 脱メチル化剤により *in vitro* および *in vivo* において腎臓癌細胞における Cx32 の発現は、他の癌抑制遺伝子と比較して特異的に引き起こされ、かつ、Cx32 の siRNA を用いた解析から、DNA 脱メチル化剤による腎細胞癌の増殖抑制作用の大部分は Cx32 の誘導に依存していることが示された。

BBI のサプリメントを作成し、マウス腫瘍移植モデル系を用いて Cx43 遺伝子を標的にした癌化学予防の実用化の可能性を最終検討したところ、BBI サプリメントの摂取が Cx43 遺伝子を標的にした癌化学予防に有効であることが示された。

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 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使って、いくつかの癌予防成分候補の GJIC 機能維持能をその抗癌活性と比較したところ、GJIC 機能維持能とその抗癌活性が比例し、ハイスループット法を使った癌予防成分のスクリーニング法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、特に腎臓と肝臓における Cx 遺伝子の変化と発癌の関連性が認められ、これらの臓器における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り、かつその機能に立脚した癌治

療法の構築に必要不可欠であることが示されていた。今年度、実際に子宮内膜癌において、薬物治療（レチノイド）により Cx26 の発現回復に伴った Cx26 の機能発揮に AP26 が不可欠で、Cx26 の機能の1つを使った癌遺伝子治療（bystander effect）の有効性が最終確認された。従って、この薬物療法による Cx26 の発現回復が子宮内膜癌の新たな治療の1つの有効な手段になることが確立された。

トランスジェニックラットを用いて解析では、Cx32 に依存した機能阻害が肝臓癌の肺転移に抑制的に働くことが証明され、ヒト腎臓癌転移モデルを用いた Cx32 の転移抑制効果と同様の抑制効果が肝臓でも認められた。以前の我々の研究グループも含めた報告から、Cx32 が癌抑制遺伝子として作用する複数の臓器において、原発癌の発生・進展抑制のみならず、癌の浸潤・転移を抑制することが証明された。このことは Cx32 を標的にした予防・治療戦略が Cx32 が癌抑制遺伝子として働く臓器において非常に有効であることが明らかになった。実際、現在臨床試験中の DNA 脱メチル化剤を用いて、マウス腎臓癌移植モデルで Cx32 の発現回復が癌細胞の増殖抑制に主に寄与していることが証明されたことから、Cx32 を標的にした癌予防・治療戦略の実現性の高さが最終確認された。

Cx43 の機能を制御する新規タンパクとしてスクリーニングされた Semaphorin3F が Cx43 との結合を介して、Cx43 の癌抑制機能を制御していることが最終確認されたことから、Cx43 の癌抑制機能およびそれに立脚した癌予防・治療法構築の際、Semaphorin3F が重要な手がかりになる。実際、Semaphorin3F がノックアウトされた癌細胞では Cx43 による癌抑制機能が認められなかった。また、大豆由来の BBI を主にしたサプリメントが 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、Cx43 をターゲットにした癌予防・治療法に有効な成分として BBI が最終的に確定された。

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の有効性をいくつかの癌予防成分の癌抑制能と GJIC 機能維持能力との相関で検討したところ、相関関係が認められたことから、このハイスループット法を用いて 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ことが最終的に確認された。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、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最終的に確認された。

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、各 Cx 遺伝子の持つ特異的な癌抑制機能が明らかにされ、各 Cx 遺伝子の癌抑制機能に立脚した癌予防・治療法の構築のための有効な手法がいくつかの癌で確立された。また、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に成功し、このスクリーニング法を用いることにより、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った。以上、本研究プロジェクト終了に際して、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・治療法が構築された。

F. 研究発表

Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T, Sawada N. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol*, 208, 123-132(2006).

Avanzo JL, Mesnil M, Hernandez-Blazquez FJ, da Silva TC, Fukumasu H, Mori CM, Yamasaki H,

Dagli ML. Altered expression of connexins in urethane-induced mouse lung adenomas. *Life Sci*, 79, 2202-2208 (2006).

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*, 78, 2249-2254(2006)

Fujimoto E, Sato H, Shirai S, Nagashima Y, Virgona N, Hagiwara K, Yamasaki H, Negishi E, Ueno K, Yano T. Inhibition of Src activity enhances tumor-suppressive effect of connexin 32 gene in Caki-1 renal cancer cells. *Oncol. Rep.*, 15, 1359-1366(2006)

Gotoh H, Harada K, Suzuki K, Hashimoto S, Yamamura H, Sato T, Fukumoto K, Ishida T, Yamada K, Asano R, Yano T. Expression patterns of connexin 26 and connexin 43 mRNA in canine benign and malignant mammary tumors. *Veterinary J.*, 172, 178-180 (2006)

Hada S, Sato H, Virgona N, Hagiwara H, Saito T, Suzuki K, Asano R, Yano T. Connexin 32 expression reduces malignant phenotype in human A549 adenocarcinoma cells: Implication of Src involvement. *Oncol. Rep.*, 16, 1149-1154 (2006)

Yano T, Fujimoto E, Hagiwara H, Sato H, Yamasaki H, Negishi E, Ueno K. Connexin 32 as an anti-invasive and anti-metastatic gene in renal cell carcinoma. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 1991-1994 (2006)

De Vuyst E, Decrock E, De Bock M, Yamasaki H, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell*. 18, 34-46(2007)

藤本絵里子、矢野友啓、上野光一、腎臓癌抑制遺伝子としてのコネキシン32の機能と効果、*日本薬理学雑誌*、129, 105-109(2007)

Hokaiwado N, Asamoto M, Suzuki S, Ogawa K, Shirai T. Transgenic disruption of gap junctional intercellular communication enhances early but not late stage hepatocarcinogenesis in the rat. *Toxicol Pathol.*, in press.

Sato H, Senba H, Virgona N, Fukumoto K, Ishida T, Hagiwara H, Negishi E, Ueno K, Yamasaki H, Yano T. Connexin 32 potentiates vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma cells. *Molecular Carcinogenesis*, in press.

Sato H, Fukumoto K, Hada S, Hagiwara H, Negishi E, Ueno K, Yano T. Enhancing effect of connexin 32 gene on vinorelbine-induced cytotoxicity in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacol.*, in press.

Saito T, Sato H, Virgona N, Hagiwara H, Kashiwagi K, Suzuki K, Asano R, Yano T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer Lett.*, 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18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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