

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関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品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 讓 …… 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  
研究期間 平成 16 年 4 月～平成 19 年 3 月

### 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が確立され、この方法により迅速に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

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的とした。

## B. 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 の機能を解析するために AP26 に対する SiRNA 発現ベクターや Cx26 の internal domain 発現ベクターを構築し、AP26 の発現や結合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 法で定量した。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転移性腎癌細胞を樹立し、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。また、microarray 解析により、新たな Cx32 の腎臓癌抑制に関与するシグナル分子の特定を行った。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。また、スクリーニングした遺伝子の機能を免疫沈降、siRNA 法等を用い解析し、Cx43 に結合し、機能する新規タンパク特定を行い、その機能を解析した。

Cx 遺伝子の癌抑制機構の in vivo での解析：子宮内膜癌や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、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、ノードマウス腫瘍移

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。また、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 ΔTg)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 ΔTg と同腹の non-Tg を用い、各発癌過程における Cx32 の効果を評価した。

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 と suicide gene (HSV-tk) を発現させた複合細胞系を樹立し、その効果を MTT 及び FACS で評価した。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、vinblastine (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。また、epigenetic factor 制御 (DNA メチル化解除) による内因性の Cx32 遺伝子の発現回復に基づく転移性腎臓癌に対する治療法構築の可能性をマウス移植モデルを用いて探った。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、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。

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の妥当性を検討した。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

- 1) Cx26 と相互作用しその癌抑制機能を制御する AP26 について、安定して発現する AP26siRNA および Cx26 の internal domain を使い解析した結果、AP26 が発現し、Cx26 の細胞質内ループドメインに結合して裏打ち蛋白質の役割を果たすことが、Cx26 の癌抑制作用に必要不可欠であることが判明した。また、Cx26 はループドメインに結合するタンパクを介して細胞接着因子 (cadherin 群) 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。 実際、子宮内膜癌を用いた解析からも、細胞の癌化および悪性化抑制には、Cx26 の発現だけでは不十分で、AP26 が発現し、Cx26 の裏打ちタンパクとして働くこと、Cx26 が裏打ちタンパクを介して cadherin と相互作用することが重要である事が確認された。
- 2) 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 AP26 により制御されている Cx26 の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。さらに retinoid を用いて内因的に Cx26 の機能を回復させ、臨床的に適用できる Cx26 の癌抑制機能に立脚した子宮内膜癌に対する治療法を確立した。
- 3) Cx32 遺伝子の C-terminal domain 部分を欠損させた deleted mutant を発現させた腎臓癌細胞を用いて解析した結果、Cx32 はその C-terminal domain を介して Src を不活性化し、Src によって引き起こされる癌悪性形質の発現を抑制することが示された。また、Cx32 は Src 活性化抑制を介して線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。in vivo の解析では、Cx32 が Src 不活性化を介して血管新生因子 (VEGF) の産出を抑制し、最終的に腫瘍組織の著しい壊死と自然退縮を引き起こすことが判明した。さらに、新たに作成した転移モデルを用いた解析では、Cx32 が腎臓癌細胞の肺や肝臓への転移を顕著に抑制する事が明らかとなった。この Cx32 による浸潤・転移抑制作用には、TCA 回路に位置する fumarate hydratase (FH) の活性化による低酸素分圧条件への癌細胞の適応阻害が関与していることが明らかになった。また、DNA メチル化解除剤により、比較的選択的に in vivo で腎臓癌細胞に Cx32 の発現・機能回復が引き起こされ、主に Cx32 の誘導が腎臓癌細胞増殖抑制に寄与していることが確認された。従って、Cx32 をターゲットにした転移性腎臓癌の治療法の実現性が高いことが最終的に示された。さらに、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。この作用は、腫瘍移植モデルでも確認されたので、Cx32 の機能をベースにした既存の化学療法の効果を高める治療戦略が、臨床的に使える目処がたった。
- 4) 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、肝臓癌に対する Cx32 の抑制効果

を検討したところ、ヒト腎臓癌移植モデルを用いて検討した結果と同様に、Cx32は肝臓癌の増殖、浸潤、転移のすべての段階に抑制的に働くことが認められ、Cx32が癌抑制遺伝子と作用する複数の臓器において、非常に有用な癌予防・治療ターゲットになることが確認された。

- 5) Cx43の細胞質内ループドメインを 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。これらの遺伝子を 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。また、Semaphorin3F の SiRNA 等を使って、Semaphorin3F による Cx43 の機能制御作用が最終的に確認され、Semaphorin3F/Cx43 complex 形成が Cx43 の発癌抑制作用に不可欠であることが確認された。
- 6) 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、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にのみ認められ、Cx43 が犬乳腺癌の悪性化抑制因子として重要であることが示されると同時に、犬乳腺癌発生系が Cx43 をターゲットにしたヒト乳癌予防・治療モデルとして有用であることが示された。
- 7) *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。この方法を用いていくつかの作用機構が未解明な抗癌物質をスクリーニングしたところ、大豆由来の機能性成分 BBI に Cx43 の持つ GJIC 機能回復が認められ、マウス腫瘍移植モデル系を用いて BBI の作用を解析したところ、BBI は腫瘍組織に 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。今後、この方法を用いて、Cx 遺伝子を標的にした安全性の高い癌予防・治療物質をスクリーニングできることが最終的に確認された。

- 8) *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 の癌抑制機能およびそれに立脚した癌予防・治療法構築に関する研究：Cx26 結合蛋白 AP26 が Cx26 の癌抑制機能 (Cx26 による GJIC 機能維持や細胞内ループドメイン構造を介した細胞接着因子 (cadherin) との機能的相互作用) の制御に必要不可欠であることが明らかとなり、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示された。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、最終的に薬物治療 (retinoid) による Cx26 ならびに AP26 の機能維持が、子宮内膜癌の治療法として臨床応用に重要であることが示された。

Cx32 の癌抑制機能およびそれに立脚した癌予防・治療法構築に関する研究：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 の腎臓癌に対する抑制機能の一翼を担っていることが明らかとなり、Cx32 の癌抑制機能が腎臓の原発癌か

ら進行・転移癌まで幅広く有効であり、特にその機能を使った悪性度の高い転移性腎臓癌の治療の可能性が示された。この可能性は、Cx32がFHの活性化を介して癌の嫌気適応を阻害し、腎臓癌の浸潤・転移を抑制することからも確認された。また、*in vivo*で現在臨床試験中のDNA脱メチル化剤によってCx32のpromoter領域のメチル化解除によるCx32の発現・機能回復が確認され、そのことが腎臓癌の抑制につながっていることが判明した。従って、この方法が腎臓癌の治療法として臨床応用可能と考えられた。一方、トランスジェニックラットを用いて解析では、Cx32遺伝子の肝臓癌の増殖・浸潤・転移抑制に寄与していることが示されたので、Cx32を標的にした癌予防・治療戦略が複数の臓器において有効であることが示された。

Cx43の癌抑制機能およびそれに立脚した癌予防・治療法構築に関する研究：Cx43の細胞質内ルーブドメインと結合し、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。本研究でCCx43/Semaphorin3F複合体による新たな癌抑制作用が明らかになったことから、Cx43の癌抑制機能およびそれに立脚した癌予防・治療法構築のためにこの複合体の重要性が明らかになった。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、この成分が有効成分として特定された。

Cx遺伝子の発現・機能を指標にしたスクリーニング法の確立：*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、新たな各Cx遺伝子の持つ特異的な癌抑制機能が明らかにされた。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、その臨床応用の有用性が確認された。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った。以上、本研究プロジェクト終了に際し、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された。

## 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)

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)

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)

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)

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)

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.*, 65, 1519-1520 (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)

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

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クシン 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. 特許出願

出願番号、特願 2004-96207

発明名称、腎臓癌治療剤

発明者、矢野友啓

---

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