

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2008～2009
課題番号：20890036
研究課題名（和文） コネキシン遺伝子の癌抑制機構の解析と治療への応用に関する研究
研究課題名（英文） Anti-tumor effect of connexin gene for cancer therapy
研究代表者
佐藤 洋美 (SATO HIROMI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30506887

研究成果の概要(和文):本研究においては、細胞間結合の構成因子のひとつコネキシン(Cx)のがん抑制作用に着目した。既に有効性が認められている腎細胞癌に対するCx32の増殖抑制作用およびvinblastine耐性改善作用を、脱メチル化薬の5-Aza-2'-deoxycytidineを用いて再現できた。一方で、難治性がんである悪性中皮腫に対してCx43は、化学療法薬cisplatinに対する感受性増強に寄与することが示された。以上より、Cxを難治性がん治療に活用できる可能性が期待された。

研究成果の概要(英文):We have investigated the anti-tumor effect of connexin (Cx) gene, component of intercellular gap junction. Finally 5-aza-2'-deoxyxytidine could induce Cx32 expression in renal cell carcinoma, which exerted not only anti-proliferative effect but also improvement of chemotherapeutic cytotoxicity. On the other hands, Cx43 was found to enhance cisplatin cytotoxicity against mesothelioma. Above all, Cx could be useful for treatment of refractory cancers.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:薬学・医療系薬学

キーワード:がん、薬学、エピジェネティック、薬剤感受性、併用効果、コネキシン遺伝子、脱メチル化薬

1. 研究開始当初の背景

多くの研究から悪性形質転換した細胞と形質転換していない細胞を共培養すると前者の増殖が抑制されることが明らかとなり、このような接触阻害現象の存在から接着因子 *cadherin* や他の細胞間結合タンパク質が着目され、コネクシン (Cx) もその一環として研究されてきた。Cx は骨格筋を除くあらゆる組織細胞にみられる普遍的な分子であるが、一方で約 20 種の分子種が存在し、各々組織特異的に制御され、心臓拍動、感覚受容調節、代謝関連など様々な細胞集団の協調活動維持にあずかっている。がん研究における Cx の作用は細胞増殖抑制に留まらず、原発巣からの離脱・浸潤抑制、血管外遊出の制御、薬物に対する感受性の増強など多くの可能性が見出されている。しかし治療への応用を図るには、未だ詳細が明らかにされていない Cx 遺伝子のがん抑制機能の作用点・作用経路を解明すること、ならびに応用研究としてどのようにして Cx 遺伝子の発現制御を行うのか、その方法について検証することは必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では既に Cx のがん抑制作用が認められているがん腫において、詳細な作用機構および Cx 遺伝子自身の発現制御手段を検討することにより、Cx を利用したがん治療法開発の一助に成ることを目指した。さらに、難治性で早急に新規治療法の開発が求められる悪性中皮腫に対し、新たに Cx の作用を検証することで、適応範囲の拡充が可能であるか検討した。

3. 研究の方法

(1) 脱メチル化薬を用いた Cx32 発現回復による薬物感受性改善作用の検討

転移性ヒト腎細胞癌株 Caki-1 を用いて、脱メチル化薬 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) によって、Cx32 mRNA 発現が回復するかどうかを確認した。次に、5-aza-dC を 72 時間作用させた後、vinblastine (VBL)

を 48 時間添加したときの細胞生存率を MTT assay にて評価した。また作用点の検討として、VBL 耐性で過剰発現が問題となる P 糖タンパク質 (P-gp) への影響を、これをコードする MDR-1 mRNA 発現の解析により確認した (real-time PCR)。さらにヌードマウスに Caki-1 を皮下移植したモデルにおいて、5-aza-dC と VBL を週 1 回、4 週間腹腔内投与して、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

(2) 悪性中皮腫に対する Cx43 の作用に関する検討

ヒト悪性中皮腫株 H28 を用い、Cx 遺伝子としては母体組織で発現し、がん部位で発現低下が報告されている Cx43 を選択し、Cx43 強制発現系を作成した。これを用いて細胞の増殖 (MTT assay)・遊走能の検討 (Boyden chamber assay)、また悪性中皮腫に対して臨床適用となる化学療法薬 cisplatin (CDDP) の殺細胞作用へ及ぼす影響を MTT assay および細胞周期解析から確認した。さらにこの作用について、Cx が細胞間ギャップジャンクション (GJ) の構成因子であることから、GJ を介する作用であるか、これに非依存的な作用であるか、GJ 阻害薬の β -glycyrrhetic acid (GA) を用いて検証した。一方で Cx43 と相互に作用することが知られる増殖因子 Src の関与についても Western blot 法を用いて確認した。

4. 研究成果

(1) 脱メチル化薬による Cx32 発現回復による薬物感受性増強作用

まず *in vitro* において、5-aza-dC によって Cx32 mRNA 発現が増加することが確認された (Fig.1)。

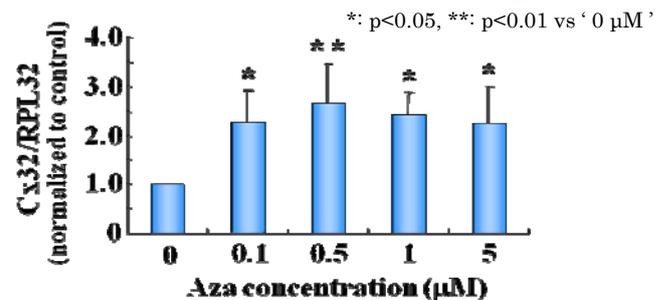


Fig.1 5-aza-dC が Cx32 発現に及ぼす影響

そして VBL の増殖抑制効果が 5-aza-dC の併用により増強された (Fig.2)。

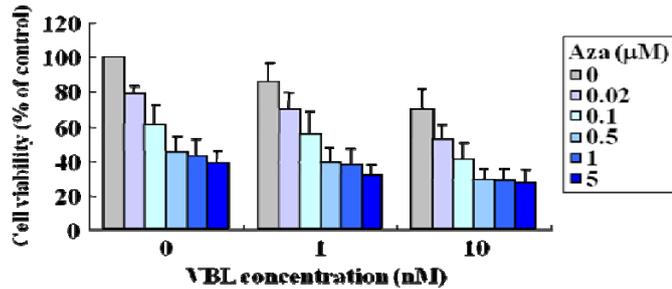


Fig.2 5-aza-dC と VBL の増殖抑制の併用効果

この併用効果の作用機序の検討として MDR-1 mRNA の発現を測定したところ、5-aza-dC によって用量依存的に抑制された (Fig.3)。

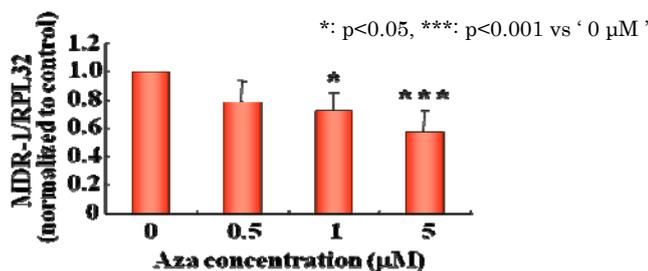


Fig.3 5-aza-dC の MDR-1 発現へ及ぼす影響

またこの MDR-1 抑制効果は、VBL 併用時にも維持されていた (Fig.4)。

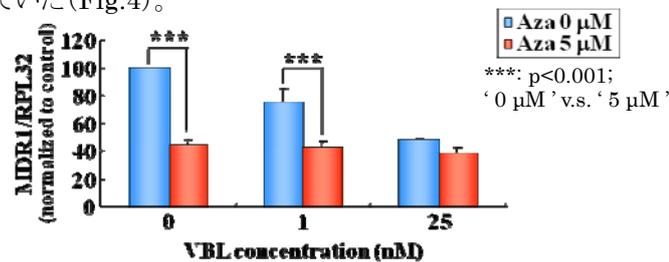


Fig.4 5-aza-dC と VBL の併用による MDR-1 発現への影響

以上より、5-aza-dC の併用により P-gp の発現が抑制され、細胞内 VBL 濃度が上昇したことで VBL の作用が増強した可能性が示唆された。in vivo においては、control 群と比較して 5-aza-dC 単独群で腫瘍増殖がやや抑制されたのに対し、VBL との併用群では増殖が顕著に抑制され、両薬剤の併用効果が認められた (Fig.5)。

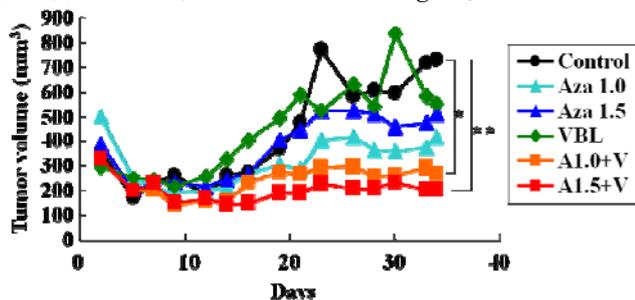


Fig.5 in vivo における 5-aza-dC と VBL の併用効果

(2) 悪性中皮腫に対する Cx43 の効果

Cx43 強制発現株 (H28-T) は親株の H28 およびベクターのみを発現させたコントロール (H28-W) に比べて細胞増殖の抑制傾向がみられた (Fig.6)。

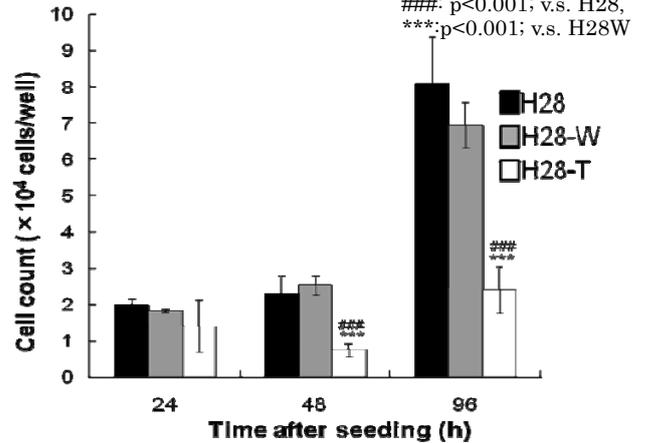


Fig.6 Cx43 の細胞増殖へ及ぼす影響

遊走能への影響はみられなかった。一方、CDDP 添加後の細胞生存活性は、H28 および H28-W で高い生存率を維持したのに対し、H28-T では有意に減少し、CDDP 殺細胞作用が増強されたことが示唆された (Fig.7)。

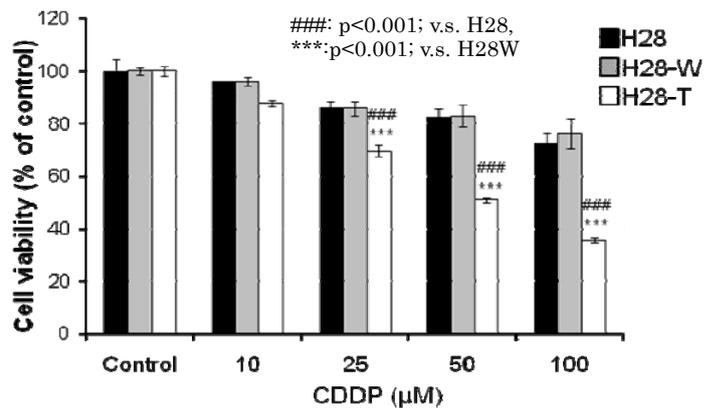


Fig.7 Cx43 の CDDP 殺細胞作用へ及ぼす影響

このとき細胞周期解析からアポトーシスを示す sub-G1 ピークの増加が確認された (Fig.8)。

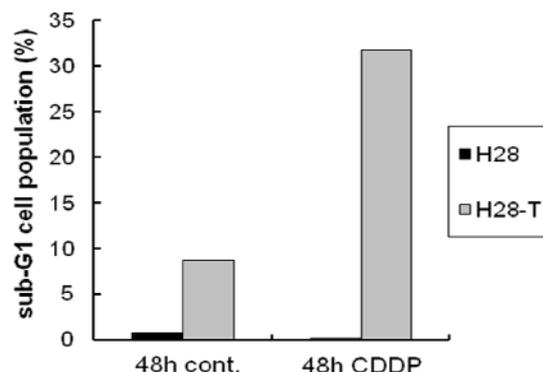


Fig.8 CDDP 添加後のアポトーシス細胞の割合

また、この CDDP 殺細胞作用の増強における GJ 形成の寄与について GJ 阻害薬の GA を用いて確認した結果、ほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった (Fig.9)。

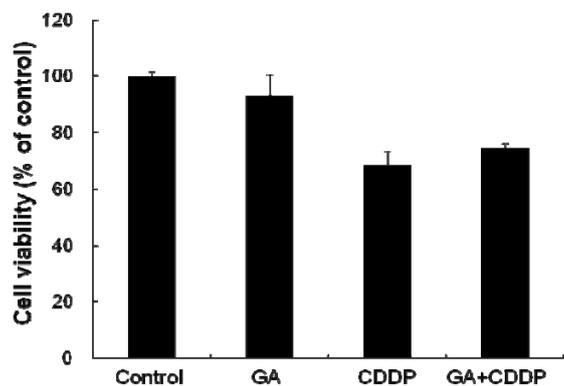


Fig.9 CDDP 殺細胞作用への GJ の関与の確認

さらに増殖因子 Src の発現は H28-T で抑制傾向を示し (Fig.10)、GJ 非依存的な機序の一端を担う可能性が示唆された。

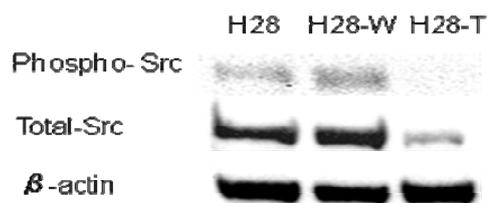


Fig.10 Cx43 が Src 活性へ及ぼす影響

(3)まとめ

本研究より、脱メチル化薬を用いて Cx32 発現を回復することにより、Cx32 の腎細胞癌に対する増殖抑制作用および VBL 殺細胞作用の増強を再現することができた。これは Cx 遺伝子を活用した新規がん治療法の手段の構築に貢献できると考えられた。また、悪性中皮腫に対する CDDP の感受性に関して Cx43 が有効であることが示され、Cx による抗腫瘍作用が期待されるがん腫の幅を広げることができた。今後、より詳細な作用点の追究や期待される作用が発現し得る微細な濃度条件設定等を進めることで臨床への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Sato H, Iwata H, Takano Y, Yamada R, Okuzawa

H, Nagashima Y, Yamaura K, Ueno K, and Yano T. Enhanced effect of connexin 43 on cisplatin-induced cytotoxicity in mesothelioma cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 査読有, 110: 466-475, 2009

2. Takano Y, Iwata H, Sato H, Okuzawa H, Yamada R, Nagashima Y, Yamaura K, Ueno K, and Yano T. Improvement of sensitivity to vinblastine by restoration of connexin 32 gene in renal cell carcinoma cells. *Proc AACR* 査読有, 50, 713, 2009

3. Ikawa Y, Shiba K, Ohki E, Mutoh N, Suzuki M, Sato H, and Ueno K. Comparative study of histamine H4 receptor expression in human dermal fibroblasts. *The Journal of Toxicological Sciences* 査読有, 33: 503-508, 2009

4. Yamaura K, Oda M, Suwa E, Suzuki M, Sato H, and Ueno K. Expression of histamine H4 receptor in human epidermal tissues and attenuation of experimental pruritus using H4 receptor agonist. *The Journal of Toxicological Sciences* 査読有, 34: 427-431, 2009

5. Sato H, Hagiwara H, Senba H, Fukumoto K, Nagashima Y, Yamasaki H, Ueno K and Yano T. The inhibitory effect of connexin 32 gene on metastasis in renal cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* 査読有, 47: 403-409, 2008

[学会発表] (計 14 件)

1. 岩田 紘樹、佐藤 洋美、山田 遼太、一之宮 紗紀、柳原 碧、山浦 克典、矢野 友啓、上野 光一. 脱メチル化薬による腎細胞癌のビンブラスチン感受性増強作用. 第 130 回日本薬学会年会 2010 年 3 月 28 日, 岡山

2. 柳原 碧、山田 遼太、佐藤 洋美、岩田 紘樹、熊本卓哉、一之宮 紗紀、山浦 克典、矢野 友啓、石川 勉、上野 光一. ミカン科植物由来成分全合成中間体の癌細胞増殖抑制作用の検討. 第 130 回日本薬学会年会 2010 年 3 月 28 日, 岡山

3. 一之宮 紗紀、佐藤 洋美、中島 啓介、岩田 紘樹、山田 遼太、柳原 碧、山浦 克典、矢野 友啓、上野 光一. 悪性中皮腫細胞における γ -トコトリエノール (γ -T3) とスタチンの併用効果. 第 130 回日本薬学会年

会 2010 年 3 月 28 日, 岡山

4. Ryota Yamada, Hiromi Sato, Hiroki Iwata, Midori Yanagihara, Saki Ichinomiya, Tomohiro Yano, Katsunori Yamaura, Koichi Ueno Anti-tumor activities of *p*-quinone monooximes obtained from the synthetic pathway of natural product, macarpine. 第 83 回日本薬理学会年会 2010 年 3 月 17 日, 大阪
5. Hiromi Sato. The tumor suppressive effect of connexin gene. JSPS 拠点交流事業セミナー(R-1), 2009 年 12 月 1 日, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
6. 山田 遼太, 佐藤 洋美, 岩田 紘樹, 一之宮 紗紀, 柳原 碧, 山浦 克典, 矢野 友啓, 上野 光一. コネキシン 43 導入による悪性中皮腫細胞の薬物感受性の改善作用について, 第 121 回 日本薬理学会関東部会 2009 年 10 月 10 日, 東京
7. Hiroki Iwata, Hiromi Sato, Tomohiro Yano Koichi Ueno. Anti-tumor activities of *p*-quinone monooximes obtained from the synthetic pathway of natural product, macarpine. 第 68 回 日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 3 日, 横浜
8. Hiromi Sato, Hiroki Iwata, Tomohiro Yano Koichi Ueno. Combination effect of a HDAC inhibitor and sunitinib against renal cell carcinoma. 第 68 回 日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 3 日, 横浜
9. Yasuyuki Takano, Hiroki Iwata, Hiromi Sato, Tomohiro Yano Koichi Ueno. Induction of connexin 32 by 5-Aza-2'-deoxycytidine can enhance vinblastine-induced cytotoxicity in renal cell carcinoma. 第 68 回 日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 1 日, 横浜
10. Yasuyuki Takano, Hiroki Iwata, Hiromi Sato, Hiroko Okuzawa, Ryota Yamada, Yoji Nagashima, Katsunori Yamaura, Koichi Ueno, Tomohiro Yano. Improvement of sensitivity to vinblastine by restoration of connexin 32 gene in renal cell carcinoma cells. 米国癌学会議 (AACR) 100th Annual Meeting, 2009 年 4 月 19 日, Denver, CO, USA
11. Hiromi Sato, Yasuyuki Takano, Hiroki Iwata, Hiroko Okuzawa, Ryota Yamada, Katsunori

Yamaura, Koichi Ueno, Tomohiro Yano. Improvement of chemosensitivity by restoration of connexin 32 gene. 第 82 回 日本薬理学会年会 2009 年 3 月 18 日, 横浜

12. 佐藤 洋美, 岩田 紘樹, 高野 泰幸, 奥澤 紘子, 山田 遼太, 山浦 克典, 上野 光一, 矢野 友啓. コネキシン遺伝子の薬物感受性改善作用に関する研究. 第 19 回 細胞間ジャンクション研究会 2009 年 1 月 17 日, 東京
13. Hiromi Sato, Tomohiro Yano, Hiroki Iwata, Yasuyuki Takano, Hiroko Okuzawa, Ryota Yamada, Hiromi Hagiwara, Koichi Ueno. The tumor suppressive effect of connexin 32 gene. 第 2 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2008 年 12 月 20 日, 京都
14. Hiromi Sato, Tomohiro Yano, Yasuyuki Takano, Hiroki Iwata, Koichi Ueno. Connexin 43 potentiates cisplatin-induced cytotoxicity in malignant mesothelioma cells. 第 67 回 日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日, 名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/koreisha/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 洋美 (SATO HIROMI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号:30506887

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし