

腎臓癌抑制遺伝子としてのコネキシン 32 の機能と効果

藤本 絵里子^{1) 2)}, 矢野 友啓²⁾, 上野 光一¹⁾

要約: 腎臓癌は手術療法以外の有効な治療法がないため、転移例や進行性腎臓癌の治療は免疫療法 (IFN- α , IL-2) が中心である。しかし、その奏効率は概ね 15% 前後と低く、決して満足できるものではない。したがって、これまでとは全く機序を異にする治療法の開発が望まれている。そこで我々が注目したのがコネキシン (Cx) 遺伝子である。Cx 遺伝子は細胞特異的に発現し、ギャップ結合を形成、GJIC (gap junctional intercellular communication) の機能を介して細胞の分化誘導を行い、癌抑制遺伝子として機能していることが報告されている。また、近年、Cx 遺伝子は GJIC に非依存的な癌抑制作用も併せ持つことが明らかとなった。そこで我々は、Cx 遺伝子の転移性腎臓癌における癌抑制機能を解明し、Cx 遺伝子の癌抑制機能に立脚した転移性腎臓癌に対する新たな治療法確立の可能性を探ることを目的として、種々の検討を行った。その結果、腎臓癌発生に伴って特異的に発現抑制される Cx 遺伝子として、Cx32 が特定された。また、Cx32 は、Src-STAT3-VEGF 経路を阻害することにより腎臓癌の進行・転移に関わる悪性形質を制御し、転移性腎臓癌において癌抑制遺伝子として機能することが示唆された。さらに、腎臓癌における Cx32 の発現抑制は、Cx32 遺伝子のプロモーター領域にある CpG アイランドのメチル化に起因することが示された。以上のことから、Cx32 遺伝子の導入または DNA 脱メチル化剤による Cx32 の再発現は、転移性腎臓癌における新たな治療法の確立へとつながる可能性が示唆された。

はじめに

コネキシン (Cx) 遺伝子は現在少なくとも 21 種類

の分子種の存在が報告されている。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クソン同士がカップリングすることでギャップ結合が形成される。このギャップ結合を通じて分子量 1,500 以下の親水性分子 (例えば、カルシウムイオン) が重要なシグナルとしてある選択性を持っ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ている (1) (図 1)。この細胞間情報伝達 (GJIC) の機能を介して Cx 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可能性が指摘されてきた (2)。実際、ほとんど全ての細胞の癌化過程において、Cx 遺伝子の発現抑制あるいは機能阻害が起きていることが知られており、Cx 遺伝子の機能消失と癌化に密接な関係があることが報告されている (3)。また、Cx 遺伝子導入による癌細胞の GJIC 機能の回復により癌細胞の増殖抑制が認められ、GJIC に依存した Cx 遺伝子の癌抑制機能が証明されている (4, 5)。一方、最近の研究から Cx 遺伝子の癌抑制機能には GJIC 依存性と非依存性の部分があり、さらに、臓器・細胞特異性があることが報告され、Cx 遺伝子の癌抑制機能の新しい一面が明らかになってきた (6, 7)。

以前から、発癌プロモーション段階での GJIC の機能消失が発癌の律速段階になることが知られており、食品機能成分による GJIC 機能回復・維持による発癌予防の可能性について検討されてきた。また、GJIC により隣接する細胞間で death signal がやり取りされ、薬剤の殺細胞性が高められるいわゆる bystander effect を使った癌遺伝子治療の可能性が検討され、実験レベルでは Cx 遺伝子の持つ GJIC 機能を使った癌予防・治療の可能性が示されている (8, 9)。この可能性

キーワード: コネキシン 32 遺伝子, 転移性腎臓癌, メチル化, Src, 血管新生

¹⁾ 千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 (〒260-8675 千葉市中央区玄鼻 1-8-1)

²⁾ 独立行政法人国立健康・栄養研究所補完成分プロジェクト (〒162-8636 東京都新宿区戸山 1-23-1)

e-mail: kueno@p.chiba-u.ac.jp 原稿受領日: 2006 年 10 月 31 日, 会誌編集委員会依頼原稿

Title: Connexin32 as a tumor suppressor gene in renal cell carcinoma. Author: Eriko Fujimoto, Tomohiro Yano, Koichi Ueno

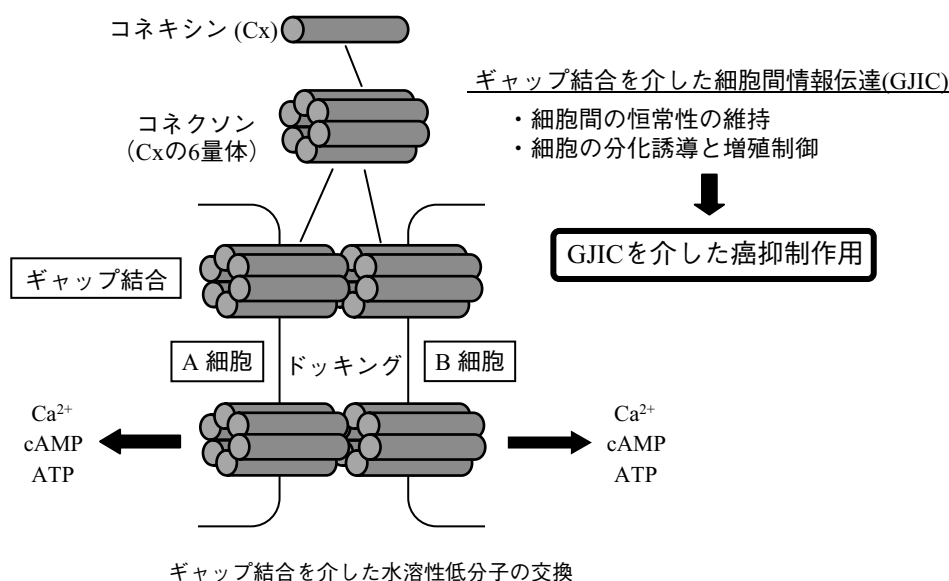


図1 コネクシン遺伝子より構成されるギャップ結合の構造とその機能

に加え Cx 遺伝子の癌抑制機能には細胞特異性があるため、細胞特異的な Cx 遺伝子の癌抑制機能を上手く利用することにより、各癌に選択性のある有効な癌予防・治療法の構築が可能になると思われる(10)。さらに、Cx 遺伝子を癌予防・治療のターゲットにする利点として、p53 のような他の代表的な癌抑制遺伝子とは異なり、現在までに解析された癌組織において Cx 遺伝子のゲノムレベルでの変異は非常に稀であり、薬物療法等により癌組織における内因性の Cx 遺伝子の発現・機能回復が直接癌抑制につながる可能性がある(11, 12)。したがって、各臓器特異的に癌抑制遺伝子として働く Cx 遺伝子を特定し、その癌抑制機能を解明することは、Cx 遺伝子の癌抑制機能に立脚した新たな癌予防・治療法の構築につながる可能性が推測される。

本稿では、我々が行った腎臓癌において癌抑制遺伝子として作用する Cx 遺伝子分子種の特定およびその機能解明、さらにはその Cx 遺伝子の癌抑制遺伝子としての機能を活かした新たな腎臓癌治療法構築の可能性について紹介する。

1. ヒト腎臓癌において発現抑制される Cx 遺伝子の特定と原発腎臓癌における癌抑制機能の確認

現在, Cx 遺伝子の細胞増殖抑制作用(細胞周期制御)は既に原発癌において確立されているが、進行性転移癌においてはその役割が明らかになっていない(13)。そのため、進行性転移癌における各 Cx 遺伝子分子種の持つ細胞特異的な癌抑制機能や分化誘導機能に関与

するシグナル分子を特定し、各 Cx 遺伝子分子種の持つ特異的な癌抑制機能を解明することは価値あるものと考えた。また、固形癌の進行性癌の中で進行性腎臓癌の悪性度が高いことが知られており(14)、毎年増加を続ける長期腎透析患者に腎臓癌が多発していることから(15)、腎臓癌の発癌制御や有効な治療法開発の必要性は高いと考えられた。さらに、腎臓癌における Cx 遺伝子に関する研究が皆無であったことから、進行性腎臓癌に対して抑制的に働く Cx 遺伝子分子種を特定し、その癌抑制機能を解明することは、新しい癌抑制遺伝子の癌抑制効果に基づく新たな癌治療法構築につながると考え、腎臓癌を研究対象とした。

まず、各腎臓癌組織、腎臓癌細胞株および正常腎尿細管上皮細胞株を網羅的に解析し、腎臓癌で特異的に発現抑制される Cx 遺伝子分子種の特定を試みた。その結果、Cx32 が正常腎尿細管上皮細胞に発現しており、癌化に伴って発現抑制される傾向が認められた(16)。これまで、各癌の発生段階で発現抑制される Cx 分子種が、その癌に対し強い癌抑制作用を有していることが報告されているため(17)、Cx32 を腎臓癌に対する癌抑制遺伝子候補としてリストアップした。次に、ヒト原発腎臓癌から樹立された細胞株に Cx32 を発現させ、その癌抑制機能を評価したところ、マウス移植モデルにおいて Cx32 の癌抑制機能を確認した(18)。以上の解析結果から、Cx32 は、ヒト原発腎臓癌に対して癌抑制遺伝子として働くと結論した。

2. Cx32 遺伝子の転移性腎臓癌の増殖，浸潤および転移に対する抑制作用

浸潤・転移性を持った悪性度の高い腎臓癌細胞株を用いて，Cx32 の癌抑制機能とその機構解析を行った(19)．まず，Cx32 を発現させることによる転移性腎臓癌細胞の細胞増殖の変化を解析したところ，GJIC 機能が回復し，in vitro での腫瘍形成能（足場非依存性）等が有意に抑制されていることが示された．in vivo においても，Cx32 は，マウス移植モデルでの腫瘍組織の著しい退縮・壊死を引き起こすことが確認された．また，Cx32 は，転移性腎臓癌細胞において正常腎尿管上皮細胞の分化機能に必要ないくつかの分子の発現・機能を回復することが明らかとなり，Cx32 が腎臓癌の分化誘導を引き起こすことが推測された．次に，細胞浸潤能に対する Cx32 の抑制作用について検討したところ，in vitro において Cx32 は有意に細胞浸潤を抑制した．また，転移モデルにおいても，Cx32 は転移性腎臓癌細胞の肺および肝臓への転移を有意に抑制した．さらに，転移性腎臓癌細胞に対する Cx32 の抑制作用のいくつかは，Cx32 の siRNA を用いて Cx32 の発現を阻害することにより解除されることを確認した(19)．以上のことから，Cx32 遺伝子は転移性腎臓癌の増殖，浸潤および転移に対して抑制作用を有することが明らかとなった．

3. Cx32 遺伝子の転移性腎臓癌に対する抑制作用機構（図 2）

現在までの研究で，Cx 遺伝子は多くの growth factor receptor に依存したシグナル系を制御することにより，癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなって

いる(20)．それらのシグナル分子の中で，非受容体型 tyrosine kinase（Src）は古くから癌原遺伝子として知られており，Src が癌細胞の増殖・生存・浸潤・転移に関与するシグナル分子を幅広く制御していることが示されている(21)．また，我々の研究も含めて Src の活性化がいくつかの癌（腎臓癌も含む）の悪性形質獲得に必要な不可欠であることが証明され(22)，癌の有力な治療ターゲットとして考えられようになってきた．そこで，我々は観察された Cx32 による転移性腎臓癌の抑制作用の主要標的分子として Src を予測し，種々の検討を行った．その結果，Cx32 は Src 活性化を抑制することにより転移性腎臓癌の増殖・生存・浸潤・転移を抑制することが推測された(19,23-25)．この Cx32 の Src 抑制作用は Cx32 の siRNA を用いた検討でも確認された．また，GJIC の特異的な阻害薬を用いた解析から Cx32 による Src 活性化抑制は GJIC 非依存的であることが判明した．以上の結果から，Cx32 の転移性腎臓癌に対する抑制作用には，少なくとも GJIC による細胞間の恒常性維持の正常化，分化誘導および GJIC に非依存的な Src 活性化抑制が関与していることが推測された．

Src によって制御される下流のシグナル分子の中で，特に Signal transducers and activators of transcription 3（STAT3）が腎臓癌の悪性化に寄与していると考えられる．なぜならば，STAT3 は腎臓癌の poor diagnostic factor であることが知られており(26)，転写因子として細胞周期の G1 から S 期の移行に必要な Cyclin D や細胞のアポトーシス耐性に関与する Bcl-xL，血管新生に関与する vascular endothelial growth factor（VEGF）の発現を高め，逆に細胞周期の制御に必要な p21 の発現を Myc 蛋白機能を介して抑制することによって癌細胞の増殖・生存・浸潤・転移を促進すると考えられているからである(27-30)．これらの因子の中で，我々は，血管新生能の高い腎臓癌では VEGF の mRNA が増加しているという報告(31)に着目し，Cx32 の Src-STAT3-VEGF 経路に対する作用を詳しく検討した(19)．まず，転移性腎臓癌細胞に Src dominant negative mutant を導入し，Src が STAT3 依存性シグナル経路の上流に位置するか検討した．その結果，Src dominant negative mutant は Src 活性化だけでなく STAT3 活性化も抑制した．このことから，Src は STAT3 の上流に位置し，STAT3 活性化を制御していることが確認された．次に，Cx32 の Src-STAT3 経路を介する転移性腎臓癌細胞の VEGF 発現調節について検討した．その結果，Cx32 は VEGF 発現を有意に抑制した．一方，Cx32 の発現を siRNA 処理により阻

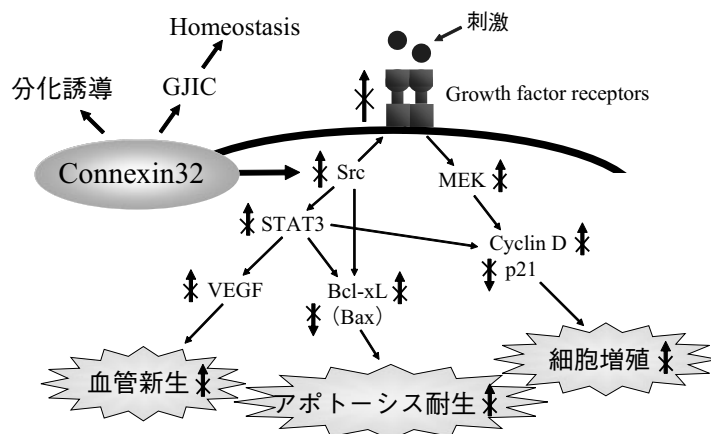


図 2 コネキシン 32 による転移性腎臓癌の抑制機構

害すると VEGF の発現は有意に増加した。さらに, Cx32 発現下, STAT3 の発現を siRNA 処理により阻害すると VEGF の発現は有意に減少した。これらの結果から, Cx32 は移行性腎臓癌細胞において Src-STAT3 経路の不活性化により VEGF 発現を抑制していることが示された。また, マウス移植モデルにおける腫瘍増殖は Cx32 により有意に抑制され, それと関連して血清 VEGF も Cx32 により有意に抑制された。さらに, マウスから摘出した腫瘍において, Src および STAT3 活性化は Cx32 により顕著に抑制されていた。これらの結果から, Cx32 は Src-STAT3-VEGF 経路を阻害することによりマウスにおける転移性腎臓癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。以上の結果から, Cx32 による転移性腎臓癌細胞の悪性化抑制は, 主に Src-STAT3 経路の活性化抑制に起因していることが推測された。

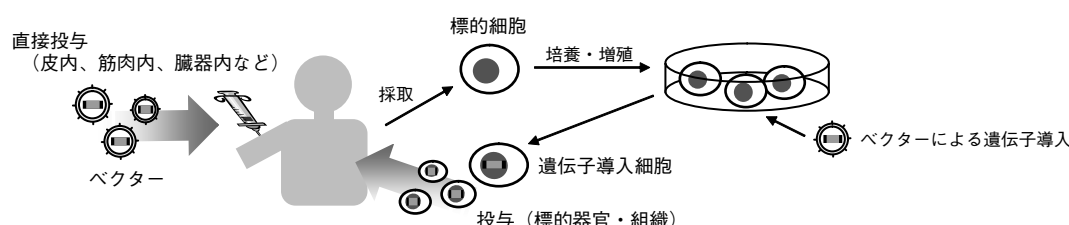
4. Cx32 遺伝子の癌抑制機能に立脚した新たな転移性腎臓癌に対する治療法構築の可能性 (図 3)

癌が限局した場所にだけある場合には手術によって癌細胞を取り除くことで完治できるが, 転移が多発するようになった癌には局所的な治療法は役に立たず,

化学療法や免疫療法などの全身的な治療法に頼らざるを得ない。しかしながら, これらの治療法が現在のところ外科手術後の補助療法として用いられていることからわかるように, それら自身に十分な効果を期待することは困難な状況にある。今回, Cx32 の持つ転移性腎臓癌に対する新たな癌抑制機能が明らかになったことから, この Cx32 の癌抑制機能に立脚した転移性腎臓癌に対する新しい治療法開発が可能となり, この癌治療の現状を克服する一助になることが示唆された。

Cx32 の癌抑制機能に立脚した癌治療の臨床応用を考えた時, 2つの方法が考えられる。第一は, 直接コネキシン遺伝子を導入する方法である。遺伝子治療を行うには未だ多くの基礎的技術の開発が必要であり, 十分な導入効率で癌細胞を特異的に攻撃できるようなベクターが存在しないため, 依然として十分な結果が得られていないのが現状である。しかしながら, コネキシン遺伝子のもつ bystander effect には, 必ずしも全ての癌細胞にコネキシン遺伝子が導入されなくとも治療効果が得られるという利点があるため, 現在の遺伝子治療の問題点である遺伝子導入効率の悪さを補うことができ, 臨床応用に期待がもてる (32)。第二は, Cx32 の発現抑制が Cx32 遺伝子のプロモーター領域

A. 遺伝子導入



B. DNA脱メチル化剤およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬による遺伝子再発現

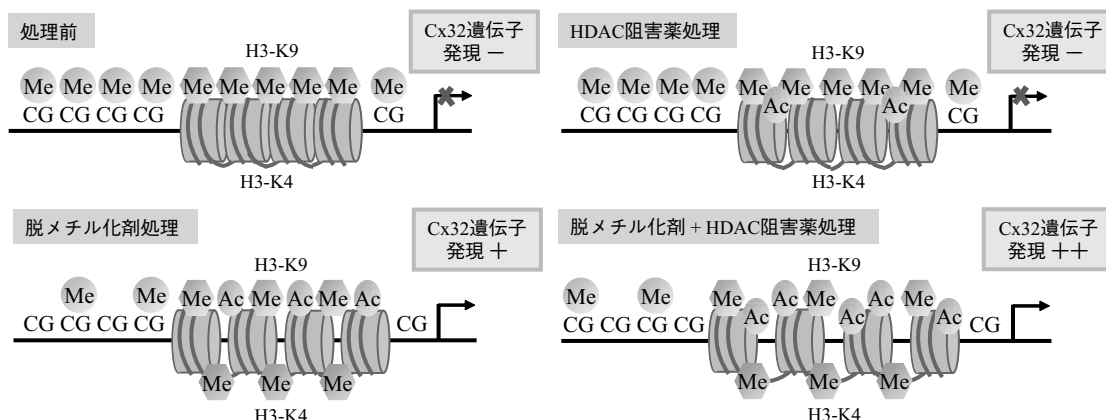


図 3 癌細胞におけるコネキシン 32 遺伝子発現回復による治療法構築の可能性

のメチル化に依存していることに着目し、脱メチル化剤により Cx32 の発現を回復させる方法である。実際、我々は *in vitro* において、脱メチル化剤によりいくつかの腎臓癌細胞での Cx32 発現回復を確認している (33)。しかしながら、脱メチル化剤単独では Cx32 の癌抑制機能が期待できるレベルまで Cx32 を回復させることが困難な場合が想定される。その場合は、図 3 に示したように、脱メチル化剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の併用（エピジェネティック療法）が有効と考えられ、今後、さらなる検討が期待される。

謝辞：本研究は創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業の助成によるものであり、感謝の意を表します。

文 献

- 1) Simpson I, et al. Science. 1977;195:294-296.
- 2) Paul DL. Curr Opin Cell Biol. 1995;7:665-672.
- 3) Mesnil M, et al. Mol Carcinogenesis. 1993;7:14-17.
- 4) Rae RS, et al. Mol Carcinogenesis. 1998;22:120-127.

- 5) Bond SL, et al. Cell Growth Differ. 1994;5:179-186.
- 6) Mesnil M, et al. Cancer Res. 1995;55:629-639.
- 7) Yano T, et al. Carcinogenesis 2001;22:1593-1600.
- 8) Trosko JE, et al. Curr Drug Targets. 2002;3:465-482.
- 9) Duflot-Dancer A, et al. Gene Ther. 1998;5:1372-1378.
- 10) Yamasaki H, et al. Novartis Found Symp. 1999;219:241-254.
- 11) Omori Y, et al. Carcinogenesis. 1996;17:2077-2080.
- 12) Trosko JE, et al. Life Sci. 1993;53:1-19.
- 13) Nicolson GL, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:473-476.
- 14) Motzer RJ, et al. N Eng J Med. 1996;335:865-875.
- 15) Choyke PL. Eur Radiol. 2000;10:1716-1721.
- 16) Yano T, et al. Kidney Int. 2003;63:381.
- 17) Yamasaki H, et al. Carcinogenesis. 1996;17:1199-1213.
- 18) Fujimoto E, et al. Mol Carcinogenesis. 2004;40:135-142.
- 19) Fujimoto E, et al. Oncogene. 2005;24:3684-3690.
- 20) Vinken M, et al. Cell Signal. 2005;18:592-600.
- 21) Rosen N, et al. J Biol Chem. 1994;261:13754-13759.
- 22) Yonezawa Y, et al. Mol Carcinogenesis. 2005;43:188-197.
- 23) Hagiwara H, et al. Life Sci. 2006;78:2249-2254.
- 24) Fujimoto E, et al. Oncol Rep. 2006;15:1359-1366.
- 25) Sato H, et al. Mol Carcinogenesis. in press.
- 26) Bromberg J, et al. Oncogene. 2000;19:2468-2473.
- 27) Catlett-Falcone R, et al. Immunity. 1999;10:105-115.
- 28) Niu G, et al. Oncogene. 2002;21:2000-2008.
- 29) Turkson J, et al. Mol Cell Biol. 1998;18:2545-2552.
- 30) Shay JW, et al. Oncogene. 2004;23:2919-2933.
- 31) Takahashi A, et al. Cancer Res. 1994;54:4233-4237.
- 32) Mesnil M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:1831-1835.
- 33) Shirai S, et al. Kidney Int. 2005;67:2506-2507.

著者プロフィール

藤本絵里子（ふじもと えりこ）

◇ 2004 年 千葉大学大学院医学薬学府修士課程医療薬学専攻修了，'05 年～現在 千葉大学大学院医学薬学府博士課程創薬生命科学専攻在学。◇研究テーマ：癌抑制遺伝子の機能解明とその機能に立脚した新たな癌予防・治療法の構築。◇趣味：テニス，スキューバダイビング。



矢野 友啓（やの ともひろ）

（独）国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム，補完成分プロジェクトリーダー，薬学博士。
◇ 1987 年 千葉大学大学院薬学研究科修了，'87 年 横浜市立大学医学部，'91 年 国立健康・栄養研究所応用食品部，'98 年～'00 年 フランス国際癌研究センター（IARC）客員研究員，'06 年 米国 Van Andel Research Institute 客員研究員，'06 年より現職。◇研究テーマ：代替・補完医療に有用な食品機能性成分のスクリーニングとその作用機構の解明，癌抑制遺伝子の機能解明とその機能に立脚した新たな癌予防・治療法の構築。◇趣味：ドライブ，サッカー観戦。



上野 光一（うえの こういち）

千葉大学大学院薬学研究院（高齢者薬剤学研究室）教授，薬学博士。
◇ 1972 年 千葉大学薬学部卒業，'74 年 同大学院薬学研究科修士課程修了，同年 帝人株式会社入社，'79 年 千葉大学助手（薬学部薬物学研究室），'84 年 同講師，'89 年 同助教授，'90 年 ワシントン大学（セントルイス）医学部留学，'95 年 ダートマス医科大学留学，'97 年 千葉大学大学院 助教授，'01 年 千葉大学大学院薬学研究院（高齢者薬物学講座）教授。◇研究テーマ：性差に基づく医薬品適正使用に関する研究，薬剤関連機能タンパク質の遺伝子多型情報の解析と応用に関する研究，高齢者における和漢薬との多剤併用・適正使用に関する研究など。◇趣味：音楽鑑賞，スポーツ観戦，オヤジギャグ。

