原著

悪性グリオーマに対する遺伝子治療の基礎的研究

—Bystander effect におけるギャップ結合の役割—

宮 城 航 一 六 川 二 郎 銘 苅 晋 福 永 利 彦^{*1}
 牧 野 芳 大^{*1} 新 垣 栄^{*1} 只 野 昌 之^{*1} 馬 紹 平^{*1}
 赤 城 剛^{*2} 上 田 房 雄^{*3}

Gene Therapy for Malignant Brain Tumor :
 The Role of Gap Junctional Intercellular Communication in Bystander Effect

by

Koichi Miyagi, M.D., Jiro Mukawa, M.D., Susumu Mekaru, M.D., Toshihiko Fukunaga M.D.^{*1},
 Yoshihiro Makino, M.D.^{*1}, Sakae Arakaki M.D.^{*1}, Masayuki Tadano M.D.^{*1},
 Shao-Ping Ma, M.D.^{*1}, Tsuyoshi Akagi, M.D.^{*2}, and Fusao Ueda^{*3}

from

Departments of Neurosurgery and ^{*1}Virology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus,

^{*2}Virology Division, National Cancer Center Research Institute, and

^{*3}Discovery Research Laboratories II, Nippon Shinyaku Co. Ltd.

The mechanism of bystander effect was considered to be due to the transfer of ganciclovir-metabolites derived from thymidine kinase (tk)-positive cells to the adjacent tk-negative cells via gap-junctional intercellular communication (GJIC). The purpose of this study is to clarify whether the compounds which are found to regulate the GJIC, promote or inhibit the bystander effect.

GJIC is composed of 6 connexin 43s on astrocyte. However, the connexin 43 quantity is much smaller in human malignant glioma cell than that in rat normal fibroblast (NRF) as shown by western immunoblot.

Connexin 43 was identified in NRF on the cell surface even in the state of semi-confluent by immunolight microscopic studies using anti-connexin 43 monoclonal antibody. Contrary, connexin 43 was not detected on the cell surface of malignant glioma. Connexin 43 in the PG13, human glioma cells are mainly localized intra-cytoplasmic rather than at the boundaries of cells.

Result of GJIC by Lucifer yellow fluorescent dye microinjection method indicate that GJIC was evident on NRF. On the contrary, GJICs on RBR17T and HBR96T were one-third and one-tenths of NRF respectively. GJIC on PG13 was not visible. Down-regulation of GJICs by phorbol were noted only in GJIC positive NRF and RBR17T.

Despite the absence or presence of small amount of GJICs in PG13 and glioma cell, we confirmed the bystander effect between human glioma cells and tk positive autologous glioma cells or PG13 (that hold HSVtk gene, but not the retroviral vector-producing cells) when these cells were treated with ganciclovir. Therefore, GJIC does not play a major role in the development of the bystander effect of PG13 or HSVtk gene transduced glioma cell on HSVtk negative glioma cell.

We examined the effects of chemicals or anti-connexin 43 monoclonal antibody that modulate GJIC on the bystander effect. When dexamethasone or β -carotene was added during the coculture of glioma cell with autologous HSVtk positive glioma cell or PG13, dexamethasone and β -carotene had no consistent promoting effect on bystander effect. When anti-connexin 43 monoclonal antibody was added during the coculture of glioma cell with autologous tk positive glioma cell, anti-connexin 43 monoclonal antibody did not inhibit bystander effect.

琉球大学医学部脳神経外科／〒903-01 沖縄県中頭郡西原町上原 207〔連絡先：宮城航一〕

Address reprint requests to : Koichi Miyagi, M.D., Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-01, Japan

^{*1}同ウイルス学科 ^{*2}国立がんセンターウイルス部門 ^{*3}日本新薬創薬第二研究所

Our results suggest that ; 1. There is a bystander effect between glioma cell and tk positive cell and that the mechanism was noted even between cells from different species ; 2. Connexin 43 was mainly intra-cytoplasmic in glioma cell. As a result of the small amount of GJIC on glioma cells, functionally, GJIC does not play a major role in the development of the bystander effect ; 3. Dexamethasone and β -carotene have a cytostatic effect. However, dexamethasone and β -carotene had no consistent promoting effect on the bystander effect. We therefore conclude that enhancers of GJIC such as dexamethasone and β -carotene have no benefit on the HSVtk/GCV gene therapy.

(Received June 16, 1995 ; accepted May 27, 1996)

Key words : bystander effect, ganciclovir, gap-junctional intercellular communication, gene therapy, glioblastoma

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 6 : 22-30, 1997

はじめに

Moolten¹²⁾は1986年, herpes simplex virus-1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を腫瘍細胞に導入した後に, ヌクレオシドアナログである抗ウイルス剤 ganciclovir (GCV) を使う癌化学療法の可能性を報告した. このような治療法を virally directed enzyme/prodrug therapy (VDEPT)⁷⁾,あるいは自殺遺伝子療法 (suicide gene system)¹³⁾¹⁷⁾とよび, 通常, 遺伝子導入にレトロウイルスベクターが利用されている. 悪性グリオーマの予後が悪いのは浸潤細胞に対する有効な治療法のないことによるが, レトロウイルスベクターはDNA合成の盛んな細胞にのみ感染し, 非分裂細胞である脳神経細胞には感染しないとされ, 悪性脳腫瘍は遺伝子療法のよい適応である.

この方法の長所は, 必ずしも100%の腫瘍細胞がHSVtkを発現しなくても, 10~20%程度の細胞にHSVtkが発現すれば, 隣接する非感染細胞(外来遺伝子を導入できなかった細胞)もGCVによる細胞障害を受けることである⁶⁾. Kolberg¹⁰⁾は遺伝子導入されなかった腫瘍細胞もHSVtk遺伝子導入細胞と混合培養するとGCVによる細胞障害を受けることをbystander effectとよんだ. bystander effectの機序として, ギャップ結合を介したGCVの副産物によるという説³⁾, apoptotic vesicleを貪食することによるという説⁶⁾, *in vivo*では免疫が関与しているという説⁴⁾, 腫瘍内血管の壊死が原因であるとの説¹⁶⁾などの報告がある. 本報告では特にbystander effectに対するギャップ結合の関与に注目した.

ギャップ結合は隣接する細胞間で細胞内シグナル伝達物質を交換する役目をもつ1.5 nmの孔を形成し, 分子量約1 kDまでの物質を隣の細胞内に送ることができる. GCVはHSVtkによって代謝され最終的にグアノシン三リン酸に代謝拮抗的に働くGCV三リン酸となるが,

これがギャップ結合を介して隣接する細胞に移行してbystander effectを現すと考えられている⁶⁾. だとすればギャップ結合阻害物質である12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (phorbol)¹⁴⁾はbystander effectを抑制し, 逆にギャップ結合促進物質であるglucocorticoid¹⁹⁾²⁰⁾や β -carotene²¹⁾はbystander effectを増強すると推測される. われわれはbystander effectにギャップ結合が関与しているか, 関与しているならギャップ結合促進物質を用いて自殺遺伝子療法の治療効果を上げることができないかを明らかにする目的で*in vitro*の実験を行った. これまでbystander effectに関して種々の機序が提唱されている^{2)~6)9)11)16)}が, ギャップ結合そのものの存在を確認した報告, ギャップ結合作用物質や抗コネキシン(Cx)抗体によるbystander effectに対する影響を検討した報告はない.

材料と方法

① 組換えレトロウイルスプラスミドベクターの作製

遺伝子導入に用いたプラスミドベクターは, 共著者の赤城が作製したMoloney murine leukemia virusから誘導し, 選択遺伝子としてNeoR遺伝子をもつpDGL¹⁾を使った. このpDGLにHSVtk遺伝子を組換え導入し, プラスミドベクターpDGL-HSVtkを作製した. 構造をFig. 1に示した.

② 組換えウイルス産生細胞の作製

Chen-Okayama法によってpDGL-HSVtk遺伝子をパッケージング細胞PG13(ATCC CRL 10686)に遺伝子導入し(作製法は文献¹¹⁾を参照), G418(500 μ g/ml)による薬剤選択を行い, 組換えレトロウイルス産生能の高いゼノトロピックパッケージング細胞のクローン, PG13pDGL-HSVtkを作製した.

Fig. 1 Map of retroviral vector (pDGL-HSVtk) used to transduce tumor cells with genes for neomycin phosphotransferase (NeoR) and herpes simplex thymidine kinase

Original retroviral vector pDGL (10.9 kb) was made by one of authors Akagi T (Dept. of Virology, National Cancer Center, Tokyo, Japan)¹¹⁾.

LTR: a long terminal repeat SV: simian virus promoter SD: spliced donor site SA: splice acceptor site ψ: packaging signal Δgag: a portion of the gag region

③ 標的細胞への遺伝子導入

組換えウイルス産生細胞 PG13pDGL-HSVtk の培養上清を 0.20 μm のフィルターで濾過し、この培養上清でヒト悪性グリオーマ細胞 (RBR17T, HBR96T) を 24 時間培養して、組換えウイルスを感染させた。さらに G418 (500 μg/ml) による薬剤選択を行い、HSVtk を発現するヒト悪性グリオーマ細胞を得た。RBR17T は琉球大学脳神経外科、HBR96T は Huntington Medical Research Institutes (USA) において得られた膠芽腫の手術摘出組織より作製した培養細胞である。いずれも継代が 80~120 の細胞を使用した。

④ *In vitro* における bystander effect の確認

ヒト悪性グリオーマ細胞と HSVtk 遺伝子導入ヒト悪性グリオーマ細胞を 24 well multiplate に混合培養した。HSVtk 発現細胞の比率が 0, 20, 40, 60, 80, 100% で細胞数が 1×10⁴個/well に調整し、GCV 1 μM を 5 日間作用させ、生細胞数を計数して bystander effect を確認した (n=4)。GCV は日本シンテックス社から提供を受けた。

ヒト悪性グリオーマ細胞と HSVtk 遺伝子導入ヒト悪性グリオーマ細胞、あるいは PG13 (HSVtk 陽性だがウイルス非産生細胞) を 1 対 1 に混合培養した。培養は 24 multiplate を使い、細胞数は 10⁴個/well とした。セミコンフルエント (細胞の一部が隣の細胞と接した状態) を確認後、GCV 0, 10 nM, 100 nM, 1 μM を 5 日間作用させ生細胞数を計数した。GCV 使用により 50% 以下の

生細胞率を bystander effect ありとした。

⑤ 抗 Cx 抗体を用いたヒト悪性グリオーマ細胞の免疫染色とウェスタンブロット

プレパラート上で培養したヒト悪性グリオーマ細胞をプレパラートあたり 10 μg/ml の抗 Cx43 抗体 (Zymed Laboratories, Inc, USA), または抗 Cx32 抗体¹⁸⁾ (日本新薬の提供) を約 200 μl 作用させ、ストレプトアビジンビオチン法による免疫染色を行った (Counter stain はマイヤーヘマトキシリン染色)。またウェスタンブロットで Cx43 蛋白の存在を確認した。蛋白量の定量は泳動像をコンピュータを用いて NIH image 1.56 のソフト上に読み込み、densitometric analysis を行って求めた。コントロール細胞は 5 週齢ウィスターラットから作製した正常線維芽細胞 NRF (琉球大学脳神経外科石田昭彦作製) を使用した。

⑥ Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法を用いたギャップ結合の確認

細胞を 35 mm dish に蒔き、コロニー形成を待って薬物を培地中に添加、1 時間後に Lucifer yellow CH (Sigma chemical) を microinjection し、3 分後に蛍光色素を取り込んだ細胞数を計数した。実験は各細胞で 6 回行い、コントロールと phorbol 100 nM (61.7 ng/ml) 添加時の蛍光細胞数を比較した (Student's t-test)。なお phorbol の濃度の決定は Murray ら¹⁴⁾の論文によった。

⑦ ギャップ結合作用物質の bystander effect への影響

ヒト悪性グリオーマ細胞 (RBR17T, HBR96T) と HSVtk 遺伝子導入ヒト悪性グリオーマ細胞、HSVtk 陽性細胞であるマウス線維芽細胞 PG13 を、1 対 1 の比率で 24 well multiplate に 1×10⁴個/well 混合培養し、ギャップ結合阻害物質 phorbol (Funakoshi) 2 μg/ml (3.24 μM), またはギャップ結合促進物質 dexamethasone sodium phosphate (萬有製薬) 2 μg/ml, あるいは β-carotene (和光純薬) 5.37 μg/ml (10 μM) を、GCV に 1 日先行させて 6 日間作用させた時の GCV の抗腫瘍効果に対するギャップ結合作用物質の影響を観察した。なお phorbol, dexamethasone および β-carotene の濃度の決定は、phorbol については HBR96T に対する Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法の結果を参考に約 30 倍の高濃度に設定、dexamethasone は Yamasaki ら¹⁹⁾, β-carotene は Zhang ら²¹⁾の論文に

Fig. 2 Coculture assay of HBR96T and HBR96TpDGL-HSVtk

"*in vitro*" bystander effect of HBR96TpDGL-HSVtk on HBR96T cells in the presence of ganciclovir. Cells were plated in 24-well microplate at a density of 10^4 cells/well. One set of wells was composed of various rates of HSVtk gene transduced cell. The cells were treated in the state of semi-confluent with $1 \mu\text{M}$ ganciclovir for 5 days, and the effect of ganciclovir on cell survival was expressed as a percent of cell number in well to that in well of only wild-type tumor cells. Short vertical lines indicate standard deviation ($n=4$).

よった。GCV は 0, 100 nM, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ または 0, 10 nM, 100 nM, $1 \mu\text{M}$ を 5 日間作用させ、生細胞数を計数して生細胞率を求めた。ギャップ結合作用物質を添加または添加せず、かつ GCV を作用させなかった時のそれぞれの生細胞数を 100% として、GCV 各濃度における生細胞率を求めた。こうして得られたギャップ結合作用物質を添加または添加しなかった時の生細胞率について、GCV の同じ濃度間で有意差判定した ($n=3$, Student's *t*-test)。

[8] 抗 Cx 抗体の bystander effect に対する影響

[4] の実験系で抗 Cx43 抗体を用いた時、bystander effect が阻害されるか確認した。300 ng/well の抗 Cx43 抗体を GCV に 1 日先行して 6 日間、 $1 \mu\text{M}$ の GCV を 5 日間作用させ、生細胞数を計数し生細胞率を算出した。この時、抗 Cx43 抗体を添加または添加せず、かつ GCV を作用させなかった時のそれぞれの生細胞数を 100% として、GCV 各濃度における生細胞率を求めた。こうして得られた抗 Cx43 抗体を添加または添加しなかった時の生細胞率について、GCV の同じ濃度間で有意差判定した ($n=3$, Student's *t*-test)。

前記 [4], [7], [8] において、7～8 日間の培養でコント

Fig. 3 Coculture assay of RBR17T and HSVtk positive cell

"*in vitro*" bystander effect of HSVtk positive cell on RBR17T cell in the presence of ganciclovir. Cells were plated in 24-well microplate at a density of 10^4 cells/well. Each well was composed of 50% of HSVtk positive cell. The cells were treated in the semi-confluent state with various concentrations of ganciclovir for 5 days. Bystander effect of HSVtk positive PG13 and RBR17TpDGL-HSVtk on RBR17T cell in the presence of ganciclovir are shown. PG13 cell is not producer cell, but HSVtk positive cell. Short vertical lines indicate standard deviation ($n=3$).

ロール細胞がオーバーコンフルエントにならぬように、 10^4 個/well に細胞数を調整した。すなわち GCV, ギャップ結合作用物質, 抗 Cx 抗体は 24 well microplate 中の細胞がセミコンフルエントとなったことを確認して、これを作用させた。[5] についてもコンフルエントの状態を観察した。

結 果

[1] *In vitro* における bystander effect の確認

Fig. 2 に HBR96T と HBR96TpDGL-HSVtk の混合培養における GCV $1 \mu\text{M}$ の抗腫瘍効果を示す。理論上 bystander effect がなければ、遺伝子導入を受けていない細胞は GCV の影響を受けず、遺伝子導入細胞のみが細胞障害を受け、「生細胞率 (%) = $100\% - \text{HSVtk 陽性細胞の}\%$ 」になるはずであるが、実際はこれよりも生細胞率は低くなり、Fig. 2 に示すように遺伝子導入を行わなかった細胞も障害を受けた。理論値と実際値の差が bystander effect である。

Fig. 3 に RBR17T と RBR17TpDGL-HSVtk または PG13 を 1 対 1 に混合培養した時の GCV の抗腫瘍効果を示した。RBR17T と RBR17TpDGL-HSVtk の混合培養における GCV 100 nM, $1 \mu\text{M}$ の生存細胞率はそれ

Fig. 4 Photomicrographs of cultured cells on slide showing immunohistological results of connexin 43 detected by mouse anti-connexin 43 monoclonal antibody with strepto-avidin-biotin-peroxidase complex

Mayer hematoxylin was used as counter staining. Connexin 43 in mouse fibroblast NRF is identified on the cell surface even in the state of semi-confluent (A). Connexin 43 in the PG13 (B), human glioma cells HBR96T (C) and RBR17T (D) are localized intra-cytoplasmic rather than at the boundaries of cells (A~C: $\times 200$, D: $\times 300$).

Fig. 5 Western blot analysis of connexin 43 in human glioma cell RBR17T, HBR96T, packaging cell PG13 and rat normal fibroblast NRF

Cell lysates were loaded at $10 \mu\text{l}/\text{lane}$, separated on 10% polyacrylamide gel, and transferred onto a nitrocellulose membrane. The latter was stained by mouse monoclonal anti-connexin 43 antibody using strepto-avidin-biotin-peroxidase complex. The band of 43 kD is compatible with connexin 43. Bar indicates mobilities of molecular mass marker in kilodaltons. Quantity of connexin 43 was much smaller in human malignant glioma cell than that in rat normal fibroblast (NRF).

それぞれ 26.9%, 4.6%, RBR17T と PG13 の混合培養では 23.6%, 6.5%であった。1対1の混合培養で GCV 100 nM, $1 \mu\text{M}$ の生存細胞率が 50%を大きく割ったのは bystander effect を示すものである。

② 抗 Cx43 抗体を用いた免疫染色 (Fig. 4)

コントロールの NRF はセミコンフルエントの状態でも隣接する細胞間に Cx43 が染色された。Figure には示さなかったが、Cx32 は染色されなかった。PG13, RBR17T, HBR96T は細胞質が染色されたが、細胞表面は Cx43, 32 とも染色されなかった。

ウェスタンブロットによる Cx43 蛋白 (Fig. 5) については、NRF, PG13, RBR17T, HBR96T を 75 cm^2 フラスコに培養し、コンフルエントな状態から蛋白を回収した。それぞれの細胞密度は NRF が $1.98 \times 10^6/75 \text{ cm}^2$, PG13 が $9.36 \times 10^6/75 \text{ cm}^2$, RBR17T が $9.49 \times 10^6/75 \text{ cm}^2$, HBR96T が $2.66 \times 10^6/75 \text{ cm}^2$ であった。同蛋白量に含まれる Cx43 蛋白は RBR17T が最も少なく NRF の $1/30.96$ で、PG13, HBR96T ではそれぞれ NRF の $1/22.27$, $1/14.88$ であった。

③ Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法を用いたギャップ結合の確認 (Fig. 6)

蛍光色素を取り込んだ細胞数は NRF で最も多く、逆

に PG13 では蛍光色素の取り込みはなかった (NRF の 0.56%). RBR17T, HBR96T の蛍光色素の取り込みはそれぞれ NRF の約 1/3 (37.2%), 1/10 (10.4%) であった. 蛍光色素の取り込みの多かった NRF と RBR17T で蛍光細胞数は phorbol 100 nM により有意に抑制された ($p < 0.01$). しかし HBR96T の phorbol 100 nM による蛍光細胞数の抑制は, control の 52.7% と有意差なしであった.

4 ギャップ結合作用物質の bystander effect に対する影響 (Table 1)

1. Bystander effect に対する phorbol の影響

Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法で, 100 nM の phorbol は HBR96T の蛍光細胞数を抑制しなかったで, 濃度を $2 \mu\text{g/ml}$ ($3.24 \mu\text{M}$) にして検討した. phorbol $2 \mu\text{g/ml}$ は RBR17T と PG13 の間で bystander effect を阻害した. 逆に HBR96T と PG13の間では促進した. RBR17T と RBR17T pDGL-HSVtk, HBR96T と HBR96TpDGL-HSVtkの間では, GCV の濃度により異なるものの bystander effect を阻害した.

2. Bystander effect に対する dexamethasone $2 \mu\text{g/ml}$ の影響

dexamethasone は, RBR17T または HBR96T と PG13 間で bystander effect をむしろ阻害した. Table には示さなかったが, dexamethasone それ自体に PG13, RBR17T の増殖抑制効果を認めた (GCV なし, dexamethasone のみにおいて RBR17T と PG13, HBR96T と PG13, RBR17T と RBR17TpDGL-HSVtk 間で, コントロールのそれぞれ 37.5%, 44.3%, 69.9%, 有意差はそれぞれ $p = 0.013$, $p = 0.000$, $p = 0.004$).

3. Bystander effect に対する β -carotene の影響

β -carotene 自体に PG13, RBR17T の増殖抑制効果を認めた (GCV なし, β -carotene のみにおいて RBR17T と PG13, HBR96T と PG13, RBR17T と RBR17TpDGL-HSVtk 間で, それぞれコントロールの 67.5%, 67.2%, 71.9%, 有意差はそれぞれ $p = 0.007$, $p = 0.027$, $p = 0.007$). β -carotene は HBR96T と PG13 間で bystander effect を促進, RBR17T と RBR17TpDGL-HSVtk 間では逆に bystander effect を阻害した.

4. Bystander effect に対する抗 Cx43 抗体の影響

Fig. 7 は HBR96T と HBR96TpDGL-HSVtk を種々

Fig. 6 Measurement of gap-junctional intercellular communication (GJIC) by Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection method and effect of phorbol on GJIC

The fluorescence indicator, Lucifer yellow CH, was microinjected into a cell 60 minutes after, 100 nM phorbol. The Lucifer yellow-fluorescent cells were counted 3 minutes later. Each column represents the mean of 6 microinjections. GJIC was apparent on NRF. GJIC on RBR17T and HBR96T was one third and one tenth of NRF respectively. GJIC on PG13 was not apparent. Down-regulation of GJIC by phorbol was noted GJIC positive cell lines significantly. $p < 0.01$ by Student's t-test. Short vertical line on the columns indicate standard deviation ($n = 6$). TPA (Tetradecanoyl phorbol acetate) in figure indicates phorbol ester.

の割合で混合培養し, 抗 Cx43 抗体を作用させた時, bystander effect が阻害されるか観察した結果である. 抗 Cx43 抗体は bystander effect を阻害しなかった.

考 察

Bi ら³⁾は bystander effect はギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションによると報告している. NIH の Oldfield によると, *in vivo* におけるレトロウイルス産生細胞を用いた悪性グリオーマ細胞への遺伝子導入効率は 0.2%以下にすぎないという (personal communication). したがって治療効果に果たす bystander effect の影響は大きい.

ギャップ結合阻害物質として phorbol¹⁴⁾ が, ギャップ結合の形成を促進する物質として dexamethasone¹⁹⁾²⁰⁾ や carotenoid (β -carotene)²¹⁾ が報告されており, これら薬剤の bystander effect に対する影響を検討した.

Naus ら¹⁵⁾は星細胞では Cx43 を認めるが, C6 グリオーマではわずかであると報告している. Hatton ら⁸⁾は良性グリオーマ細胞ではギャップ結合を認めたが, 悪性グリオーマ細胞ではギャップ結合を認めなかったと報告

Table 1 Influence of phorbol, dexamethasone and β -carotene on bystander effect

Cocultivated cell lines	GCV	0 nM	10 nM	100 nM
Phorbol (2 μg/ml)				
RBR17T + PG13	control	100 $\pm$ 24.45%	—	24.63 $\pm$ 1.85%
	phorbol	100 $\pm$ 11.81%	—	32.47 $\pm$ 3.89% p=0.034
HBR96T + PG13	control	100 $\pm$ 5.81%	—	8.49 $\pm$ 0.79%
	phorbol	100 $\pm$ 17.35%	—	3.88 $\pm$ 1.77% p=0.014*
RBR17T + RBR17TpDGL-HSVtk	control	100 $\pm$ 4.61%	—	33.97 $\pm$ 6.99%
	phorbol	100 $\pm$ 16.68%	—	32.61 $\pm$ 2.89% NS
HBR96T + HBR96TpDGL-HSVtk	control	100 $\pm$ 9.08%	—	38.18 $\pm$ 2.87%
	phorbol	100 $\pm$ 24.66%	—	48.08 $\pm$ 0.61% p=0.004
Dexamethasone (2 μg/ml)				
RBR17T + PG13	control	100 $\pm$ 24.45%	—	24.63 $\pm$ 1.85%
	dexamethasone	100 $\pm$ 20.17%	—	54.39 $\pm$ 6.43% p=0.002*
HBR96T + PG13	control	100 $\pm$ 5.81%	—	8.49 $\pm$ 0.79%
	dexamethasone	100 $\pm$ 7.36%	—	12.38 $\pm$ 4.09% NS
RBR17T + RBR17TpDGL-HSVtk	control	100 $\pm$ 4.61%	—	33.97 $\pm$ 6.99%
	dexamethasone	100 $\pm$ 4.25%	—	37.66 $\pm$ 6.41% NS
HBR96T + HBR96TpDGL-HSVtk	control	100 $\pm$ 9.08%	—	38.18 $\pm$ 2.87%
	dexamethasone	100 $\pm$ 26.65%	—	69.23 $\pm$ 5.37% p=0.001*
β-Carotene (10 μM)				
RBR17T + PG13	control	100 $\pm$ 11.56%	85.14 $\pm$ 6.79%	46.85 $\pm$ 5.51%
	β -carotene	100 $\pm$ 4.43%	74.81 $\pm$ 5.55% NS	39.37 $\pm$ 2.52% NS
HBR96T + PG13	control	100 $\pm$ 14.34%	—	57.21 $\pm$ 11.75%
	β -carotene	100 $\pm$ 12.38%	—	45.78 $\pm$ 13.35% NS
RBR17T + RBR17TpDGL-HSVtk	control	100 $\pm$ 9.22%	84.63 $\pm$ 16.49%	38.30 $\pm$ 14.24%
	β -carotene	100 $\pm$ 2.48%	102.96 $\pm$ 7.67% NS	74.34 $\pm$ 7.41% p=0.018*
HBR96T + HBR96TpDGL-HSVtk	control	100 $\pm$ 17.42%	—	49.20 $\pm$ 9.72%
	β -carotene	100 $\pm$ 15.85%	—	50.65 $\pm$ 11.73% NS

Asterisk(*) indicates the reverse effect of chemicals that modulate gap junctional intercellular communication on the bystander effect. Ordinarily phorbol inhibits and dexamethasone and β -carotene promote the gap junctional intercellular communication. % : mean percent of survival cell $\pm$ SD p : Student t-test were used NS : not significant (n=3)

Fig. 7 An influence of anti-connexin 43 monoclonal antibody on “*in vitro*” bystander effect of BR96T and tk-positive HBR96T cells in the presence of ganciclovir

Cells were plated in 24-well microplate at a density of 10^4 cells/well. On the day in the semi-confluent state, one set of wells was composed of various rates of HSVtk gene transduced cells. One group of wells was treated with anti-connexin 43 antibody at 300 ng/well and other received no antibody. After one day, ganciclovir (1 μ M) was added to the cell cultures and continued to cultivate for 5 days in the presence or absence of anti-connexin 43 monoclonal antibody. The effect of ganciclovir on cell survival was expressed as a percent of cell number in wells to that in wells of only wild-type tumor cell. Anti-Cx 43 antibody did not inhibit bystander effect. Short vertical lines indicate standard deviation (n=4)

している。われわれが検討したヒト悪性グリオーマ細胞では、Cx43 はウェスタンブロット法で正常線維芽細胞の 1/14.9~1/31.0 と少なく、しかも免疫染色では主として細胞質内に存在した。Cx43 についての知見はないが、Cx 32 については癌では遺伝子変異によって、Cx 蛋白が細胞膜内に移行できないために、ギャップ結合蛋白とし

ての機能を果たせなくなっていると山崎²⁰⁾は報告している。同様な機序は悪性グリオーマ細胞においても、またトランスフォームした PG13 においても起こっていると推測される。HBR96T は RBR17T に比べて Cx43 蛋白が多いにもかかわらず、Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法で phorbol の影響を受けなかった

1 μ M	10 μ M
8.72 $\pm$ 0.86%	2.88 $\pm$ 0.88%
12.17 $\pm$ 1.54% p=0.028	3.61 $\pm$ 0.78% NS
2.77 $\pm$ 1.09%	0.90 $\pm$ 0.36%
3.20 $\pm$ 0.43% NS	0.95 $\pm$ 0.47% NS
7.89 $\pm$ 2.15%	4.23 $\pm$ 0.34%
8.57 $\pm$ 1.97% NS	5.65 $\pm$ 0.75% p=0.04
18.18 $\pm$ 1.10%	9.46 $\pm$ 1.82%
20.44 $\pm$ 3.66% NS	8.86 $\pm$ 1.18% NS
8.72 $\pm$ 0.86%	2.88 $\pm$ 0.88%
28.74 $\pm$ 3.25% p=0.001*	6.48 $\pm$ 1.75% p=0.033*
2.77 $\pm$ 1.09%	0.90 $\pm$ 0.36%
5.58 $\pm$ 1.55% p=0.048*	3.40 $\pm$ 0.24% p=0.001*
7.89 $\pm$ 2.15%	4.23 $\pm$ 0.34%
13.63 $\pm$ 1.19% p=0.016*	7.26 $\pm$ 2.75% NS
18.18 $\pm$ 1.10%	9.46 $\pm$ 1.82%
26.39 $\pm$ 3.59% p=0.019*	10.77 $\pm$ 0.89% NS
7.11 $\pm$ 1.39%	—
8.48 $\pm$ 0.78% NS	—
19.52 $\pm$ 2.32%	2.39 $\pm$ 0.32%
7.91 $\pm$ 1.47% p=0.002	1.25 $\pm$ 0.41% p=0.019
24.63 $\pm$ 3.99%	—
24.93 $\pm$ 2.03% NS	—
29.88 $\pm$ 8.92%	1.95 $\pm$ 1.58%
27.15 $\pm$ 5.93% NS	8.62 $\pm$ 2.02% NS

ことは、HBR96T の Cx43 蛋白が細胞膜内に移行できず、ギャップ結合蛋白としての機能を果たせなくなっている可能性がある。

マウス由来の PG13 は、Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法で隣接細胞へ蛍光色素をまったく移行させなかったにもかかわらず、ヒト悪性グリオーマ細胞との異種細胞間（混合培養）においても bystander effect を認めた。したがって細胞膜上の Cx43 蛋白の発現が少ないヒト悪性グリオーマ細胞においては、ギャップ結合が bystander effect に主要な役割を担っているかどうか疑問である。

phorbol 濃度は Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法において 100 nM で抑制していることから十分阻害してよい濃度であるが、混合培養の細胞の組合せにより phorbol の濃度を約 30 倍にしても、bystander effect を阻害しない組合せもみられた。dexamethasone や β -carotene はそれ自体に腫瘍細胞増殖抑制効果があるものの、bystander effect を促進する作用に乏しく、自殺遺伝子治療への応用は、残念ながら *in vitro* の今回の実験結果から有効性を期待できないと考えた。dexamethasone や β -carotene が bystander effect を促進させなかったのは、これらの薬剤が Cx43

蛋白の少ないグリオーマ細胞のギャップ結合の形成を促進しなかったためか、あるいはギャップ結合の形成は促進したが bystander effect にギャップ結合が関与していないために bystander effect に影響が出なかったのかについては、本論文では明らかにできなかった。今後この問題に関する解明が必要である。

結 論

bystander effect は、ヒト悪性グリオーマ細胞と HSVtk 遺伝子導入ヒト悪性グリオーマ細胞、または異種細胞であるマウス由来の HSVtk 陽性パッケージング細胞 PG13 の間にも認められた。

ヒト悪性グリオーマ細胞における Cx43 は免疫染色で主として細胞質内に存在し、ウェスタンブロットでは正常線維芽細胞に比べて少なかった。したがって細胞表面に Cx43 の発現が少ないヒト悪性グリオーマ細胞では、ギャップ結合の bystander effect への関与が乏しいと判断した。

ヒト悪性グリオーマ細胞は正常線維芽細胞に比べギャップ結合の発現が少なく、Lucifer yellow-fluorescent dye microinjection 法で蛍光色素の取り込みも少なかった。しかも蛍光色素の取り込みのまったくなかった PG13 は、ヒト悪性グリオーマ細胞との間で bystander effect を示した。したがって Cx43 の少ない悪性グリオーマ細胞では、ギャップ結合だけで bystander effect を十分説明できない結果であった。

ギャップ結合促進物質と報告されている dexamethasone, β -carotene に一貫した bystander effect 促進作用を認めなかった。したがってギャップ結合促進物質の自殺遺伝子療法への応用は、dexamethasone, β -carotene に関するかぎり否定的であると考えた。

本論文の要旨は、第 54 回日本脳神経外科学会総会(1995 年 10 月 18 日、名古屋)で発表した。なお本研究は文部省科学研究費(課題番号 06671406)を用いて行われた。統計処理に助言をいただきました琉球大学医学部保健医学教室 有泉 誠教授に、ウイルス学教室 加根村和美技官、脳神経外科教室 藤原京子技官の実験協力に感謝します。ganciclovir を提供していただきました Syntex Corporation に、抗 Cx32 抗体を提供していただきました日本新薬に感謝します。

文 献

- 1) Akagi T, Nyunoya H, Shimotohno K: Murine retroviral vectors expressing the tax 1 gene of human T-cell leukemia virus type 1. *Gene* 106: 255-259, 1991.
- 2) Barba D, Ray JHJ, Gage FH: Thymidine kinase-mediated killing of rat brain tumors. *J Neurosurg*

- 79 : 729-735, 1993.
- 3) Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ : *In vitro* evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. *Human Gene Ther* 4 : 725-731, 1993.
 - 4) Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D : Regression of established macroscopic liver metastasis after *in situ* transduction of suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 7024-7028, 1993.
 - 5) Culver KW, Ram Z, Walbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM : *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256 : 1550-1552, 1992.
 - 6) Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN : The "bystander effect" : Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 53 : 5274-5283, 1993.
 - 7) Gutierrez AA, Lemoine NR, Sikora K : Gene therapy for cancer. *Lancet* 339 : 715-721, 1992.
 - 8) Hatton JD, Sang UH : Orthogonal arrays are absent from the membranes of human glioblastomatous tissues. *Acta Anat* 137 : 363-366, 1990.
 - 9) Kato K, Yoshida J, Mizuno M, Sugita K, Emi N : Retroviral transfer of herpes simplex thymidine kinase gene into glioma cells causes targeting of ganciclovir cytotoxic effect. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 34 : 339-344, 1994.
 - 10) Kolberg R : Gene therapists test puzzling "bystander effect" (News). *NIH Res* 4(7) : 68-74, 1992.
 - 11) 宮城航一, 六川二郎, 銘苅 晋, 古閑比佐志, 比嘉 靖, 福永利彦, 牧野芳大, 只野昌之, 新垣 栄, 馬 紹平, 赤城 剛 : 悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療の基礎的研究 —とくに bystander cell killing について. *神経免疫研究* 7 : 80-86, 1994.
 - 12) Moolten FL : Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes : Paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 46 : 5276-5281, 1986.
 - 13) Mullen CA, Kilstrup M, Blaese RM : Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine : A negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 33-37, 1992.
 - 14) Murray AW, Fitzgerald DJ : Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 91 : 395-401, 1979.
 - 15) Naus CC, Bechberger JF, Caveney S, Wilson JX : Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 126 : 33-36, 1991.
 - 16) Ram Z, Walbridge S, Shawker T, Culver KW, Blaese RM, Oldfield EH : The effect of thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor vasculature and growth of 9L gliomas in rats. *J Neurosurg* 81 : 256-260, 1994.
 - 17) 崎山 樹 : 自殺遺伝子による癌の遺伝子治療. *実験医学* 12 : 1915-1918, 1994.
 - 18) Takeda A, Kanoh M, Shimazu T, Takeuchi N : Monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the 27-kDa gap junction protein from rat liver. *J Biochem* 104 : 901-907, 1988.
 - 19) Yamasaki H, Katoh F : Further evidence for the involvement of gap-junctional intercellular communication in induction and maintenance of transformed foci in BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res* 48 : 3490-3495, 1988.
 - 20) 山崎 洋 : ギャップ結合細胞間コミュニケーションと発癌過程. *実験医学* 11 : 2152-2157, 1993.
 - 21) Zhang L-X, Robert V, Cooney RV, Bertram JS : Carotenoid up-regulate connexin 43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52 : 5707-5712, 1992.

要 旨

悪性グリオーマに対する遺伝子治療の基礎的研究
—Bystander effect におけるギャップ結合の役割—

宮城 航一 六川 二郎 銘苅 晋 福永 利彦
牧野 芳大 新垣 栄 只野 昌之 馬 紹平
赤城 剛 上田 房雄

ギャップ結合促進物質である dexamethasone や, β -carotene が bystander effect を促進し HSVtk/ganciclovir system の遺伝子治療効果を高めるか検討した.

ヒト悪性グリオーマ細胞は tk 遺伝子導入細胞や tk 陽性のマウス由来/パッキング細胞 PG 13 との間で bystander effect がみられた.

Cx 43 蛋白はヒト悪性グリオーマ細胞や PG 13 では細胞膜での発現は少なく細胞内に存在した. したがって, Cx 43 の少ないヒト悪性グリオーマ細胞においては, ギャップ結合が bystander effect に主要な役割を担っているとは考えにくい結果であった.

dexamethasone や, β -carotene は bystander effect を促進せず, 本療法への応用には否定的結果であった.

脳外誌 6 : 22-30, 1997