

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19389

研究課題名(和文) ES/iPS細胞の腫瘍化細胞を標的治療可能な革新的ベクターシステムの開発

研究課題名(英文) A Novel Vector system that I Specifically Eliminate Tumorigenic Cells in Pluripotent Stem Cells.

研究代表者

井手 佳菜子 (IDE, Kanako)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員

研究者番号：20725791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞(ES細胞・iPS細胞)を用いた再生医療において、安全な臨床応用には腫瘍化の完全阻止に向けた技術開発が最重要課題である。従来は間接的な腫瘍化の抑制戦略が中心であったが、腫瘍化の完全阻止には不十分である。そこで本研究では、腫瘍化の原因となる細胞に特異性の高い複数候補の遺伝子・プロモーターの網羅的解析と、薬剤選択的な殺傷コントロールが可能なシステムの確立をめざし、独自技術の開発に成功した。本ベクターを導入したヒト多能性幹細胞では、薬剤選択的な殺傷効果と生体内での腫瘍化阻止効果をもたらした。本技術の開発により、ヒト多能性幹細胞による再生医療の臨床応用の大きな進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSCs) are a promising source of regenerative material for clinical applications. However, hPSC transplant therapies pose the risk of teratoma formation and malignant transformation of undifferentiated remnants. Researchers have recently embarked on studies aimed at locating and directly treating hPSC-derived tumorigenic cells. In particular, novel approaches to directly killing tumorigenic cells are expected to improve the safety of hPSC-based therapy.

Here, we developed a novel method for efficiently generating diverse tumorigenic cell-targeting lentiviral vectors(TC-LVs), which can specifically and efficiently kill tumorigenic cells in transduced hPSCs. This study demonstrates the utility of this methodology and reveals that the products, including hPSCs with the suicide gene downstream of the tumor specific promoter, should pave the way toward safe clinical applications of hPSC-based regenerative medicine.

研究分野：再生医療

キーワード：ES/iPS細胞 腫瘍化阻止 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞、iPS 細胞(以下、ES/iPS 細胞)は、医療・医薬創出の基盤ツールとしてとして期待されている。特に再生医療では、脳梗塞、心筋症など、現在の医療では根治不可能であった疾患を治療できる可能性を秘め、早期の実用化が期待される。このような ES/iPS 細胞による臨床応用を実施するためには高レベルの安全性の確立が不可欠であり、最重要課題は、腫瘍化(奇形種、癌)を完全に克服する技術の開発である。これまでに、僅かでも残存未分化細胞が移植細胞に混入すると、奇形種を形成する可能性があることや、奇形種に限らず悪性腫瘍(癌)の発生も高度であるという報告が数多くある。しかし、この課題を克服するための既存の報告は、リプログラミング法の改良といった「間接的な抑制」のレベルに過ぎず、直接的な革新技术開発としては世界でも未だ本格的に取り込まれていないのが現状である。つまり腫瘍化(奇形種、癌)を完全に克服する技術の開発は、最重要課題といえる。

2. 研究の目的

研究代表者は、「iPS 細胞の移植において腫瘍化は完全には阻止できない」「既存の腫瘍化抑制のアプローチだけでは腫瘍化リスクをゼロとすることは不可能である」と考えた。その前提の基に「ES/iPS 細胞の腫瘍化原因細胞(癌・奇形種)を直接標的治療する技術を開発する」という全く新しい視点から、この問題の解決を試み、新たに「ES/iPS 細胞の腫瘍化原因細胞を同定・可視化し、特異的に除去可能な革新的なベクター(TC-LV)」の作製技術の開発に成功した(国内特許取得、国際特許出願中)。本技術を用いて、腫瘍化原因細胞を特異的に同定・殺傷できるプロモーター・殺傷遺伝子の同定と、生体内における腫瘍化原因細胞の特異的殺傷効果の検証を行うことを目的とした。

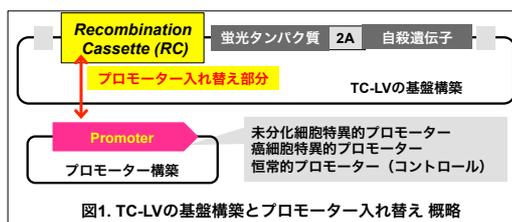
3. 研究の方法

(1) 基盤ベクターとプロモーターの構築

研究代表者が開発した「ES/iPS 細胞の腫瘍化原因細胞を同定・殺傷する新規ベクターシステム(TC-LV)」は、レンチウイルスベクターを基盤とし、①リコンビネーションシステ

ムを用いプロモーター配列が簡便に組換え可能、②蛍光タンパク質と薬剤感受性自殺遺伝子が同一プロモーター下で発現、という特徴を持つ。

これにより、既報の研究では不十分であった同一条件下での腫瘍化原因細胞におけるプロモーター活性の横断的な比較が可能となる。本システムで候補となる種々プロモーターを解析することで、最適なプロモーターを同定し、最終的には腫瘍化原因細胞のみを標的とし確実に殺傷可能な標準技術としての確立を目指す。



これまでに、二種類の蛍光タンパク質(緑色蛍光タンパク質; Venus、赤色蛍光タンパク質; mKate2)と、三種類の薬剤誘導性自殺遺伝子(HSV-tk、新規のヒト由来自殺遺伝子 X、新規の薬剤誘導性遺伝子 Y)のそれぞれの組み合わせについて、2A 配列を介してつないだ遺伝子カセットを作製し、遺伝子発現を確認できている。また、様々な未分化・癌特異的プロモーターの候補遺伝子はそれぞれ基盤ベクターとは別のシャトルベクターに導入した。

(2) TC-LV 導入細胞の作製と殺傷効果の検証

上記で作製した複数基盤ベクターのうち、Venus 及び HSV-tk の遺伝子を持つ基盤ベクターについて、様々な未分化・癌細胞特異的プロモーターを組み込んだ TC-LV をそれぞれ作製した。各プロモーターを挿入したベクターを ES/iPS 細胞に感染させ、蛍光タンパク質発現細胞のみを分取し、TC-LV 導入細胞とした。In vitro における細胞殺傷効果の検証では、TC-LV 導入未分化細胞、もしくは分化誘導後の腫瘍化原因細胞(残存未分化細胞)に、HSVtk に対応する薬剤であるガンシクロビル(GCV)を投与し、薬剤濃度依存性の未分化特異的殺傷効果が得られるかを検証した。また、in vivo における腫瘍抑制効果の検証においては、TC-LV 導入細胞を免疫不全マウスに皮下移植したのち、GCV 投与群と非投与群でそ

れぞれ腫瘍径を評価した。

4. 研究成果

本研究では、複数の作製した候補プロモーターのうち癌特異的プロモーターである **Survivin** プロモーター及び恒常性の **CA** プロモーターを持つ **TC-LV** をそれぞれ用いて、腫瘍化原因細胞への殺傷効果の検証を行った。In vitro において、ES/iPS 細胞への **GCV** の投与により、ヒト ES/iPS 細胞共に、未分化細胞特異的な殺傷効果が得られた。

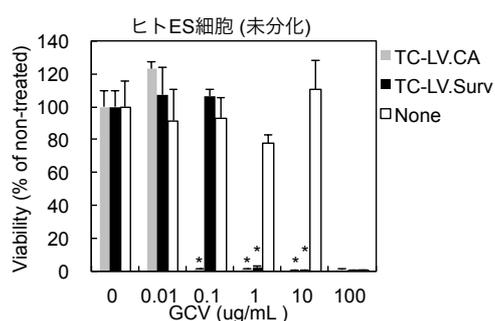


図2. TC-LV導入ヒトES細胞の薬剤投与による殺傷効果

さらに *in vivo* においても、TC-LV 発現細胞では移植後の **GCV** 投与により有意な腫瘍抑制効果が得られ、特に **Survivin** プロモーターでは完全に腫瘍化を阻止した。

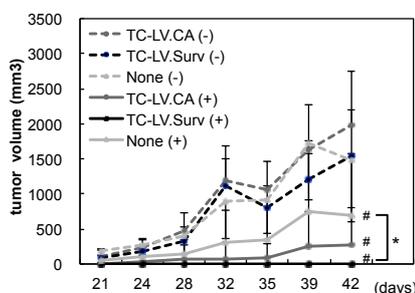


図3. TC-LV導入ヒトES細胞の薬剤投与による腫瘍抑制効果

今後さらに、これらを分化誘導した心筋細胞中に残存する腫瘍化原因細胞に対して同様の検討を行い、分化細胞への安全性の担保、及び腫瘍化原因細胞特異的な殺傷効果を得られることを検証し、本技術の確立を目指していく。

本技術は、本邦ならびに世界中で進められている全ての **ES/iPS** 細胞での再生医療研究に応用可能な共通根源の技術であるが、極めて高いオリジナリティーを持ち、特許申請中であるようにベクター技術は知財も確保しているため、本邦での再生医療の基

礎研究と臨床応用の両面での推進に大きく貢献するものである。最終的に、本研究の期待される成果が得られれば、**ES/iPS** 細胞に最も重要な「安全性」の問題を克服することができ、本邦での早期の再生医療の安全かつ着実な実現が可能となるため、本邦の科学的発展は元より、先端医療実現による国民福祉の向上と経済発展に繋がる、中長期的には大きな社会貢献の成果が期待できる。

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 2 件)

- ① Kanako Ide, Kaoru Mitsui, Rie Irie, Yohei Matsushita, Nobuhiro Ijichi, Soichiro Toyodome, Ken-iciro Kosai: A Novel Construction of Lentiviral Vectors for Eliminating Tumorigenic Cells from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells*. 2018 Feb;36(2):230-239. 査読有. doi: 10.1002/stem.2725
- ② Kaoru Mitsui, Kanako Ide, Tomoyuki Takahashi, Ken-ichiro Kosai: Viral Vector-Based Innovative Approaches to Directly Abolishing Tumorigenic Pluripotent Stem Cells for Safer Regenerative Medicine. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017 5:51-58. 査読有. doi: 10.1016/j.omtm.2017.03.002.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 井手佳菜子, 三井 薫, 小賤 健一郎: 多能性幹細胞における腫瘍化阻止のための新規ベクターシステムの開発. 2017 年. 第 2 回 JSGCT 若手研究会
- ② 井手佳菜子, 三井 薫, 小賤 健一郎: 新規レンチウイルスベクターシステムによる多能性幹細胞の腫瘍化阻止技術の開発. 2017 年. 第 35 回日本ヒト細胞学会
- ③ 井手佳菜子, 三井 薫, 小賤 健一郎: 多能性幹細胞の腫瘍化阻止のための新規レンチウイルスベクター技術の開発. 2017 年. 第 122 回日本解剖学会
- ④ 小賤 健一郎, 三井 薫, 井手佳菜子, 伊

地知 暢広, 入江 理恵: 遺伝子治療、再生医療の独自開発技術の臨床応用と発生学への展望. 2017年. 第122回日本解剖学会

- ⑤ 井手佳菜子, 三井 薫, 小賤 健一郎: 多能性幹細胞の腫瘍化細胞を同定・殺傷する新規レンチウイルスベクターの効率的作製法の開発. 2017年. 第16回日本再生医療学会
- ⑥ 井手佳菜子, 三井 薫, 小賤 健一郎: A Novel Construction of Lentiviral Vectors that Identify and Specifically Eliminate Tumorigenic Cells in Pluripotent Stem Cells. 2016年. 第39回日本分子生物学会
- ⑦ Kanako Ide, Kaoru Mitsui, Rie Irie, Yohei Matsushita, Nobuhiro Ijichi, Ken-ichiro Kosai: A novel system to efficiently construct lentiviral vectors that identify and eliminate tumorigenic cells in pluripotent stem cells. 2016年. 第22回日本遺伝子細胞治療学会
- ⑧ Kanako Ide, Kaoru Mitsui, Ken-ichiro Kosai: An efficient construction of lentiviral vectors that identify and eliminate tumorigenic cells in pluripotent stem cells. 2016年. The 19th ASGCT
- ⑨ 井手佳菜子, 三井薫, 小賤健一郎: ES/iPS細胞の腫瘍化細胞を可視化・標的殺傷するレンチウイルスベクターの開発と治療効果. 2016年. 第15回日本再生医療学会総会
- ⑩ Ide K, Mitsui K, Kosai K: An efficient construction of lentiviral vectors that identify and eliminate tumorigenic cells in pluripotent stem cells. 2015年. 第74回日本癌学会学術総会.
- ⑪ Ide K, Mitsui K, Matsushita Y, Kosai K: An efficient construction of lentiviral vectors that identify and eliminate tumorigenic cells in pluripotent stem cells. 2015年. 第22回日本遺伝子治療学会総会
- ⑫ 井手佳菜子, 三井 薫, 松下洋平, 小賤 健一郎: ES/iPS細胞の腫瘍化細胞を可視化・標的殺傷するレンチウイルスベ

クターの効率的作製法の開発. 2015年. 第14回日本再生医療学会総会.

- ⑬ 井手佳菜子, 三井 薫, 松下洋平, 小賤 健一郎: ES/iPS細胞の腫瘍化細胞を可視化・標的殺傷するレンチウイルスベクターの効率的作製法の開発. 2015年. 第8回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法

発明者: 井手佳菜子, 小賤 健一郎, 三井 薫
権利者: 国立大学法人鹿児島大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2015/000138

出願年月日: 2015年1月14日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 佳菜子 (IDE, Kanako)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・
特任研究員

研究者番号: 20725791