

令和元年6月14日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10752

研究課題名(和文)非ウイルス的遺伝子導入法による自殺遺伝子幹細胞療法の開発とグリオーマ治療への応用

研究課題名(英文)Development of suicide gene stem cell therapy by non-viral gene transfer method and application to glioma therapy

研究代表者

鮫島 哲朗(sameshima, tetsuro)

浜松医科大学・医学部・講師

研究者番号：00295213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当初HSVtk遺伝子を挿入したエピソーマルベクターの電気穿孔法による幹細胞への導入を試みたが、ベクターサイズが大きく、導入効率が低い為、導入遺伝子が宿主遺伝子に挿入される新たなシステムを用いて、また、不死化を実現する遺伝子を同時導入する非ウイルス的HSVtk遺伝子導入幹細胞株作製法を考案した。GMP基準に準じた細胞製剤化を行う企業と提携し、細胞の腫瘍指向性と細胞増殖能を確認した。HSVtk遺伝子・hTERT遺伝子・hygromycin遺伝子・GFP遺伝子を配列するプラスミドを作成、現在、エレクトロポレーションとリポフェクション法で遺伝子導入を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスベクターを用いた遺伝子導入細胞は製剤化を考慮した場合、臨床使用が可能な安全で純度の高い製剤を作成可能な施設は非常に限定されている。そこで非ウイルス的HSVtk遺伝子導入幹細胞株の樹立を目指し本研究を着想した。エピソーマルベクターは自己増殖可能なプラスミドベクターであり、本プラスミドを用いた新規治療法の実現が期待されたがベクターサイズの壁に阻まれ断念した。しかし、引き続き考案したpiggyBacシステムは同様に非ウイルス的遺伝子導入法であるだけでなく、宿主遺伝子に安定的に目的遺伝子が挿入される手法であり、本法は有効性が高く、安全で高品質な細胞製剤の低コスト新規作成法となる。

研究成果の概要(英文)：We tried to transfect the episomal vector with HSVtk gene to stem cells, aiming at the development of stem cell therapy for glioblastoma by non-viral gene transfer method. However, that did not go well because the size of the episomal vector was too large, leading to the low transfer efficiency. So we have devised a non-viral method using another system in which the transgenes are integrated into the host gene. The immortalizing gene is co-transfected in order to achieve immortalization of HSVtk-expressing stem cells. The mesenchymal stem cells as the vehicle are provided by the company that performs cell preparation based on GMP standards. We have already confirmed the sufficient migratory capacity and cell proliferation ability of the stem cells. We have also prepared the plasmids of several patterns with the combination of the HSVtk, hygromycin, GFP and immortalizing gene so as not to be overlarge size. We are under plasmid transfection by electroporation and lipofection methods.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：自殺遺伝子幹細胞療法 HSVtk/GCV system PiggyBac system

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の約 1/4 を占めるグリオーマは、脳内を浸潤性に発育するため、機能温存を考慮した場合、腫瘍の完全な摘出ができないことから手術療法は大半が非治癒手術となる。現状、残存腫瘍に対して、放射線療法や化学療法が行われ、一定の効果はあるものの治癒に至るには不十分であり、実際、悪性グリオーマの生存期間中央値は 2 年に満たない。一方、遠隔転移する他臓器の悪性腫瘍と異なり、グリオーマの再発の多くは腫瘍断端に残存した腫瘍細胞からおこる局所再発である。したがって腫瘍の切除断端およびより遠位に浸潤した残存腫瘍細胞に対し有効な治療が行われれば、予後は飛躍的に改善する可能性がある。この治療困難な悪性グリオーマに対し、我々は単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HSVtk)/ガンシクロビル(GCV)システムを用いた自殺遺伝子幹細胞療法(TK 幹細胞療法)の研究開発を行ってきた。本法の機序であるが、腫瘍指向性を有する幹細胞に HSVtk 遺伝子を導入した治療細胞 (HSVtk 発現幹細胞を腫瘍内または腫瘍切除断端に移植し、そこにプロドラッグである GCV を全身投与すると治療細胞内でガンシクロビルのリン酸化が始まる。治療細胞は腫瘍細胞に向かって遊走し、接着するとギャップジャンクションを介して無毒な一リン酸化ガンシクロビルのみが腫瘍細胞に拡散し、腫瘍細胞内でさらにリン酸化が進み毒性の三リン酸化ガンシクロビルに変化し DNA ポリメラーゼ阻害によるアポトーシスが誘導される。この際、周囲の腫瘍細胞に同様のことが起こるので 1 つの治療細胞で多数の腫瘍細胞をアポトーシスすることができる。これがバイスタンダー効果と言われる現象である。

2. 研究の目的

悪性グリオーマに対する単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HSVtk)/ガンシクロビルシステム(GCV)による自殺遺伝子療法の遺伝子産物の輸送体として、腫瘍指向性を有する幹細胞を用いた自殺遺伝子幹細胞療法の検証を行ってきた。幹細胞の中で、間葉系幹細胞は入手が容易で、高い腫瘍指向性を有することから本治療に適した幹細胞であることを確認している。幹細胞への HSVtk 遺伝子の導入には主にウイルスベクターが使用されているが、臨床応用上、安全面での問題点が指摘されており、非ウイルス的遺伝子導入法が推奨されつつある。本研究では HSVtk 遺伝子を、virus-free で間葉系幹細胞に導入し、安全で安定した TK 幹細胞療法の開発と遺伝子産物の新規デリバリーシステムの構築を目的としている。

3. 研究の方法

ヒト間葉系幹細胞に HSVtk 遺伝子を導入し、安全で安定した治療細胞を作製する。GMP 基準に準じた細胞製剤化を行っている企業と提携し、幹細胞の提供を受け、最適な条件下で作製した治療細胞を使用し in vitro、in vivo のバイスタンダー効果と腫瘍指向性を検証し、腫瘍縮小実験を通して、本手法の有効性を、以前用いた幹細胞や遺伝子導入法と比較し評価する。

4. 研究成果

(1)非ウイルス的遺伝子導入法を用いた単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HSVtk)/ガンシクロビル(GCV)システムによる自殺遺伝子幹細胞療法の開発とグリオーマ治療への応用を目指し、当初は HSVtk 遺伝子を挿入したエピソードベクターを作成し、電気穿孔法にて幹細胞に導入することを試みたが、HSVtk 遺伝子発現エピソードベクターのベクターサイズが大きく、結果として十分な導入効率を得られず、他の遺伝子導入法にて再検討することとした。ベクターサイズを可能な限り小さく抑えることと、細胞分裂時に導入遺伝子が継代される必要があることから、我々は、他のシステムを用いた導入法と遺伝子導入幹細胞の不死化を実現するための遺伝子を同時導入する新たな非ウイルス的 HSVtk 遺伝子導入幹細胞株作製法を考案した。導入する腫瘍遺伝子として HSVtk 遺伝子、不死化遺伝子、遺伝子導入効率が高い場合に薬剤選択を行い治療細胞の発現効率を高めることを考え薬剤耐性遺伝子として hygromycin 遺伝子、蛍光観察を容易にする GFP 遺伝子の 4 種類を配列するプラスミドを構成したが、all-in-one での導入を考慮するとプラスミドサイズが大幅に大きくなるため、分割して導入することを考慮してプラスミドの構成を行った。現在エレクトロポレーションとリポフェクション法を用いて遺伝子導入の最適化を行っている。

(2)使用する幹細胞候補として、臨床利用を見据えて GMP 基準に準じた細胞製剤化を行っている企業と提携し、幹細胞の提供を受け、幹細胞の遊走能と増殖能の検証実験を行った。in vitro 遊走能の評価 次いで治療幹細胞におけるグリオーマ細胞株の conditional medium に対する遊走能を Matrigel invasion chamber にて評価した(Koizumi S, et al. Oncol Lett 2: 283-288, 2011)。これらの結果、使用する幹細胞の in vitro での十分な腫瘍指向性と必要細胞数確保に足る細胞増殖能を確認した。現在、8 週齢、雌のヌードマウス右脳に U87luc 細胞(1×10^5 個)を移植 1 週間後に対側の左脳に色素で蛍光した治療幹細胞(5×10^5 個)を移植し、その 1 週間または 2 週間後に脳の凍結切片を作製し蛍光免疫組織学的検査を行っている。腫瘍は抗ルシフェ

ラーゼ抗体 + 蛍光標識二次抗体で識別し、腫瘍内へ遊走する事を確認する検証実験を行っている。

(3) 8週齢、雌のヌードマウスおよびルシフェラーゼ遺伝子が導入された U87Luc 細胞を用いて脳腫瘍モデルを作成した。1×10⁵個程度の細胞を移植することにより約5~6週間で確実に腫瘍死するモデルを確立した。本モデルは腫瘍サイズと in vivo 発光イメージング装置である IVIS200 で観察される発光強度が相関し、時系列で腫瘍のサイズを確認した。

(4) 遺伝子導入された治療幹細胞の完成後、腫瘍形成抑制実験 (in vivo バイスタンダー効果の評価) U87Luc 細胞 (1×10⁵ 個で一定とする) に対し治療幹細胞の比率を徐々に下げて混合した細胞液 (1/4 ~ 1/64) をマウス脳内に共移植し、その後 GCV または PBS を 10 日間腹腔内投与し、発光強度、生存期間を比較し、腫瘍形成抑制に必要な最小の治療幹細胞の比率を検証する。IVIS200 で得られる発光強度は生着する U87Luc 細胞の脳内の深さに影響を受けるので 3T-MRI、組織学的検査で生着した腫瘍塊の脳内の位置も確認し、さらに腫瘍縮小実験 (治療実験) U87Luc 細胞 (1×10⁵ 個) のマウス脳内移植 1 週間後に治療幹細胞 (1×10⁵ 個) を腫瘍内に移植し、その後 10 日間 GCV または PBS を腹腔内投与し、既存腫瘍の大きさを経時的に IVIS200 と 3T-MRI にて観察し、生存期間を観察する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kenmochi H, Yamasaki T, Horikawa M, Yamamoto T, Koizumi S, Sameshima T, Namba H: P04.67 Assessments for prediction of bystander effect in HSV-tk/GCV gene therapy, Neuro-Oncology 20(suppl_3):iii295-iii295, 2018
2. Yamasaki T, Wakao S, Kawaji H, Koizumi S, Sameshima T, Dezawa M, Namba H: Genetically engineered multilineage-differentiation stress-enduring cells as cellular vehicles against malignant gliomas. Mol Ther Oncolytics 6: 45-56, 2017.

[学会発表] (計 4 件)

1. Yamasaki T, Ooishi T, Kenmochi H, Koizumi S, Sameshima T, Namba H: Targeted enzyme/drug delivery system for glioma using iPSC-derived NSCs by virus-free HSVtk gene transfer method. The 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO 2017) 2017.10.29-31, Osaka
2. Yamasaki T: New treatment strategy for malignant glioma utilizing tumor-tropic capability of Muse cells transduced with HSVtk gene, The 21st ANNUAL MEETING AND EDUCATION DAY OF THE SOCIETY FOR NEURO-ONCOLOGY, November 17-20, 2016, Scottsdale Fairmont Princess Hotel
3. Yamasaki T: MULTILINEAGE-DIFFERENTIATING STRESS-ENDURING (MUSE) CELLS MIGRATE A LONG DISTANCE TO THE GLIOMA IN THE MOUSE BRAIN, The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop, Oct 17th-21st, 2016 in Nippondaira Hotel, Shizuoka, Japan,
4. Yamasaki T: integration free 幹細胞はグリオーマに対する HSVtk 遺伝子産物の適した媒体となる。第34回日本脳腫瘍学会学術集会 2016年12月4-6日 甲府富士屋ホテル

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：難波 宏樹
ローマ字氏名：NAMBA HIROKI
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60198405

研究分担者氏名：小泉 慎一郎
ローマ字氏名：KOIZUMI SHINICHIRO
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部付属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：10456577

研究分担者氏名：山崎 友裕
ローマ字氏名：YAMASAKI TOMOHIRO
所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部付属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：40781050

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。