

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08773

研究課題名(和文) がん微小環境を利用した誘導型ベクター産生細胞による新規がん標的化戦略

研究課題名(英文) Development of inducible vector-producing mesenchymal stem cells for anticancer therapy

研究代表者

山崎 吉之 (YAMAZAKI, Yoshiyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90407685

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)：本研究では、申請者らが開発したがん治療用ベクター産生型間葉系幹細胞(VP-MSC)システムの更なる安全性・抗腫瘍効果向上を目的として、VP-MSCが腫瘍周辺に到達するタイミングに合わせて治療ベクターの産生を開始する、誘導型ベクター産生細胞の開発を目指した。本研究期間を通じてiPS細胞からMSCへの分化誘導法、ならびに、MSCからがん関連線維芽細胞(CAF)への分化誘導法を確立し、CAF分化依存的にレポーター遺伝子の発現を制御する発現カセットを構築した。また、MSCおよびCAFにおいてはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの産生能が低く抑制されていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のがんウイルス療法において解決すべき課題の一つはベクターの病巣への送達の難しさである。本法の治療担体はあくまでウイルスであるため、ベクターが生体内の免疫システムに速やかに排除される。一方、申請者らが開発するシステムでは、ベクター産生系そのものを組み込まれたVP-MSCが腫瘍周辺に集積し、治療ベクターを病巣に送り込む。本研究の成果にてiPS細胞からMSCへの分化誘導法を確立し、大量培養が非常に困難であるヒトMSCの細胞ソースの確保に目途をつけることができた。また、CAF分化依存的に特定のタンパク質を発現させるシステムは、精度の高いがん治療用VP-MSCシステムの構築を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop an innovative inducible vector-producing mesenchymal stem cells (iVP-MSCs) which is capable of producing therapeutic vectors in coincidence with differentiation from MSCs to cancer associated fibroblasts (CAFs) within the cancer microenvironment. Here, we established optimal differentiation methods from iPS cells to MSCs and from MSCs to CAFs for our study, and constructed inducible promoter for adeno-associated virus (AAV) vector production in a CAF differentiation-dependent manner. Meanwhile, MSCs and CAFs were revealed to have only low productivity of AAV vector.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：iPS細胞 間葉系幹細胞 がん関連線維芽細胞 アデノ随伴ウイルスベクター

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんウイルス療法は治療用に開発されたウイルスベクターを患者に投与し、このウイルスベクターががん細胞を選択的に攻撃して腫瘍組織を消滅させる画期的な治療法であり、第四のがん治療法として我が国の難治性がん治療戦略に大きく貢献することが想定される。このように大変期待度の高いがんウイルス療法であるが、解決すべき課題も存在している。その一つがベクターの病巣への送達の難しさである。本法の治療担体はあくまでウイルスであるため、ウイルスが生体内の免疫システムに速やかに排除される。よって病巣・転移巣が体内深部である場合には、ベクターが病巣に到達する前に排除されてしまい、十分な治療効果が得られない可能性がある。本課題を解決する方法として、近年、申請者らは生体外で生産した治療ウイルスベクターを投与するのではなく、生体内の病巣周辺にてベクターを産生し、直接病巣に送り込むという画期的なシステムを開発した(Uchibori *et al.*, *J. Gene Med.* 2009)。本システムでは腫瘍組織に集積する性質を持つ間葉系幹細胞(MSC)に対して、ベクター産生系そのものを組み込む。このベクター産生型MSC(VP-MSC)は腫瘍周辺に集積し、治療ベクターを病巣に送り込む。よってベクターが生体内の免疫機構を回避して、体内深部の病巣に対しても直接到達できるため、高い治療効果を期待できる。しかし本法を実際に臨床応用可能な実用性・安全性の高いシステムにするためには、改善すべき点として次の二つがある。(1)MSCは生体内にわずかししか存在せず、治療に必要な量のMSCの採取には大量の骨髓液が必要であること。MSCの大量培養は非常に困難であるため、本法の細胞ソースを見直す必要がある。(2)体内に投与されたVP-MSCは消失するまでウイルスを産生・分泌し続けるので、標的ではない正常細胞に非特異的にベクターが送達される危険性が残ること。本研究ではこの二点の課題を解決し、更に効率的にがんを治療するシステムの確立を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが近年開発に成功したがん治療用VP-MSCシステムの更なる安全性・抗腫瘍効果向上を目的として、VP-MSCが腫瘍周辺に到達するタイミングに合わせて治療ベクターの産生を開始する、誘導型ベクター産生細胞(iVP-MSC)の開発を目指す。まず細胞ソースとして、半永久的に増殖が可能でMSCに分化させることができる人工多能性幹(iPS)細胞を採用する。これにより患者の侵襲することなく、大量に治療細胞を確保できる。次に非特異的なベクター産生・感染を制御するために、MSCの腫瘍集積部位におけるがん関連線維芽細胞(CAF)への分化を利用する。MSCは腫瘍発生の初期段階では異常な細胞に働きかけて正常状態を保とうとするが、腫瘍の発達とともにCAFへと分化し、逆に腫瘍の成長を助けることが知られている。本研究ではこのCAF分化シグナルをウイルスベクター構成因子の発現開始スイッチとすることで、ベクターの産生をCAF分化依存的に制御し、精度の高いがん治療用iVP-MSCシステムを構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) VP-MSCベクター産生誘導のための適切なCAFシグナルの検討

VP-MSCにベクター産生の誘導性を付与するために、SMAなどのCAF分化シグナルが利用可能であるかレポーターアッセイを用いて調べる。これらの因子の転写制御領域をレポーター遺伝子と組み合わせた発現カセットを作製してレンチウイルスベクターに搭載し、ヒトMSCに導入する。このMSCをCAFへと分化誘導し、その分化するタイミングでレポーター遺伝子の発現量がどの程度変化するかフローサイトメトリーなどで測定し、適切な誘導性を得られるか検討する。

#### (2) iVP-MSC株の樹立

iVP-MSCの供給源とするため、MSCへの分化誘導が可能であることが知られるヒトiPS細胞株を細胞ソースとして利用する。本研究では、いくつかの報告されている培養培地の変更によるMSCへの分化誘導法を試みる。実際にiVP-MSCに産生させる治療ベクターとしては、アデノ随伴ウイルス(AAV)を採用する。(1)にて決定されたCAF分化シグナルの転写制御領域の下流にAAV構成因子(AAVの機能・構造タンパク質の遺伝子(Rep/Cap)および、その発現を助けるアデノウイルスヘルパー遺伝子(E1A/E1B/E2A/VA/E4))を連結した発現カセットを構築してiPS細胞に導入することで、iPSからMSCを介してCAFへと分化するタイミングに合わせて治療用AAVベクターを産生できる細胞株を樹立する。

### 4. 研究成果

iVP-MSCシステムを確立するために、まず、CAFの代表的なマーカーとして知られるSMAの転写制御領域(転写開始点より約1 kbp上流まで)をヒトゲノムからPCRにてクローニングし、その下流にレポーター遺伝子AcGFPを連結してレポーターアッセイ用の発現カセットを構築した。それと並行して、市販のヒト骨髓由来MSCを用い、培養培地へのTGF添加によるMSCからCAFへの分化誘導を試みた。TGF添加された細胞内のSMA発現量の増加を抗体染色にて経時的に確認し、分化誘導に最適なTGF添加量と添加期間を決定した。続いて、作製したレポーターアッセイ用発現カセットを、レンチウイルスを用いてMSCに導入し、このMSCに対して適当量のTGFをその培養培地に添加してCAFへの分化を促した。分化の過程を蛍光顕微鏡観察、免疫染色法およびフローサイトメトリーにより追跡し、発現カセットを導入された細胞においては

SMAの発現増大に伴ってAcGFPの発現が増大すること、すなわち、MSCからCAFへの分化に合わせてレポーター遺伝子の発現が増大することを定量的に確認した。その一方で、iVP-MSCの供給源とするため、MSCへの分化誘導が可能であることが知られるヒトiPS細胞株(409B2株)の供与を理化学研究所より受け、いくつかの既報の方法によるiPS細胞からMSCへの分化誘導を試みた。その結果、iPS細胞から神経堤細胞(NCC)への分化を経由してMSCへの分化誘導を促す手法が本研究において最も効率的であることを確認した。

次に、AAV構成因子を含有したプラスミドを化学的および物理的遺伝子導入法を用いてヒトMSCに導入し、MSCのAAVベクター産生能を定量的に計測することを試みた。そのため、まず、MSCにおいて高い産生能があることが報告されているレトロウイルス(RV)構成因子含有プラスミドをコントロールとして用い、MSCが最も効率的にRVベクターを産生できる遺伝子導入条件を探った。その結果、エレクトロポレーション法がMSCに対する遺伝子導入に最も適していることを見出した。続いて、決定した最適電気刺激条件を用い、RVベクター産生実験と同様の手順でAAV構成因子含有プラスミドの導入を行って、産生されたAAVベクターのゲノム力価を定量PCR(qPCR)にて測定した。その結果、同じ遺伝子導入法を用いてもRVベクターの産生は高力価であったのに対し、AAVベクターの産生は検出限界以下となった。このことは、MSCではAAVの産生能力が抑制されていることを示唆している。そこで次に、MSCをCAFへと分化させることでこの抑制が緩和されるかを検証した。MSCを培養培地中へのTGF添加によりCAFへと分化誘導させ、この細胞に対してAAV構成因子含有プラスミドを導入した。遺伝子導入から6日後に培養上清を回収し、培地中のAAVベクター力価をqPCRにて測定した結果、分化誘導されたCAFにおいても、AAVベクターの産生能は低く抑制されていることが分かった。この結果が実際に生体内に存在するCAFについても当てはまるか検証するために、市販の前立腺がん由来CAFと、既存のAAV産生細胞として知られるHEK293細胞を用いて同様の実験を行い、生体内のCAFにおけるAAV産生能もHEK293細胞に比べて非常に低いことを確認した。以上、本研究期間を通じてiPS細胞からMSCへの分化誘導法、ならびに、MSCからCAFへの分化誘導法を確立し、また、CAF分化依存的にレポーター遺伝子の発現を制御する発現カセットを構築した。しかし、CAFのAAV産生能が極めて低いことが判明し、それがiVP-MSCシステムの確立にとって予想外の障壁となった。そこで我々は引き続き、CAFあるいはMSCにおけるAAVベクター産生能を向上させることを目的として、HEK293細胞に倣い、MSCに対してアデノウイルス遺伝子断片を導入することを計画した。我々は、既に他の研究成果から、MSCのような幹細胞でもウイルス因子を導入することで有意なAAV産生能が発現することを確認している。このことを本研究で応用するために、ウイルス因子をコードする遺伝子をトランスポゾン配列に連結したプラスミドを設計し、その作製を既に完了した。今後は、このプラスミドをMSCおよびiPS細胞に導入し、高いAAVベクター産生能を達成するiVP-MSCシステムの構築に力を注ぎたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎吉之, 笠原優子, 宮崎海, 宮川世志幸, 岡田尚巳
2. 発表標題 がん治療用ウイルスベクター産生羊膜間葉系幹細胞の開発
3. 学会等名 第87回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamazaki Y, Nitahara-Kasahara Y, Miyazaki K, Miyagawa Y, Okada T.
2. 発表標題 Development of viral vector-producing amniotic mesenchymal stem cells for in situ cancer cell therapy.
3. 学会等名 The 25th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy (JSGCT)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮川 世志幸  (MIYAGAWA Yoshitaka)  (90415604)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	
研究協力者	平井 幸彦  (HIRAI Yukihiko)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	黒田 誠司  (KURODA Seiji)		
研究協力者	榎本 篤  (ENOMOTO Atsushi)		
連携研究者	岡田 尚巳  (OKADA Takashi)  (00326828)	日本医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授    (32666)	