

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15289

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9によるHSVtk導入iPS細胞を用いたグリオーマ遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene therapy using CRISPR/Cas9-edited iPS cells with HSVtk for malignant glioma

研究代表者

森本 佑紀奈 (MORIMOTO, Yukina)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：10793119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ細胞へ遊走性を示すiPS細胞由来の神経幹細胞(NSC)に自殺遺伝子(HSVtk)を導入する治療法を開発することを目的とした。メタボローム代謝解析により、HSVtkはiPS細胞に対して細胞毒性を有することを明らかにした。さらにNSCへの分化誘導過程で、挿入遺伝子の不活性化も生じたため、CRISPR/Cas9を用い挿入部位の最適化を行うことで、安定した遺伝子発現の実現を目指した。一方で、HSVtkの細胞毒性の問題から、長期間マウス生体内で生着させることが困難であるという課題も明らかとなった。本研究計画は、ゲノム編集技術及び細胞療法を組み合わせた新たな治療戦略の先駆けとなると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞(NSC)は、脳腫瘍へ遊走する性質を持つため、治療遺伝子を搭載する運搬体として注目される。本研究では、グリオーマ細胞の根絶を目指しiPS細胞から分化誘導したNSCを用いた自殺遺伝子細胞治療の開発を行った。HSVtkはiPS細胞に細胞毒性を有することを同定し、NSCへの分化過程で遺伝子発現の不活性化を生じる事も明らかにした。安定した遺伝子発現を可能とする導入部位をゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9を用いて評価した。本研究概念はヒトiPS細胞に治療遺伝子を導入するあらゆる研究に応用できるものであり、将来のヒトiPS細胞を用いた様々な遺伝子治療のプラットフォームになり得る。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells (NSCs) are known to possess the tumor-tropic migratory capacity and thus can be used as cellular vehicles for targeted delivery of therapeutic agents. The HSV-TK gene, in combination with ganciclovir, is the most widely used enzyme/prodrug suicide system from basic research to clinical applications. In the present study, we attempted to establish human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) that stably expressed HSV-TK with either lentiviral vectors or CRISPR/Cas9-mediated genome editing. A nucleotide metabolism analysis suggested that high-level and/or constitutive expression of HSV-TK resulted in the induction of cell death or silencing of HSV-TK expression during differentiation to NSCs. We also demonstrated that the Tet-inducible system was a feasible solution for overcoming the cytotoxicity of HSV-TK expression. Our results provided a warning against using the HSV-TK gene in human iPSCs, particularly in clinical applications.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：iPS細胞 神経幹細胞 自殺遺伝子 HSVtk 遊走 CRISPR/Cas9 悪性神経腫瘍 グリオーマ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫(グリオーマ)は、原発性脳腫瘍の15~20%を占め、脳実質に広く浸潤する脳腫瘍幹細胞(brain tumor stem cell, BTSC)による治療抵抗性のため、現在の治療法では治癒不能な最難治脳腫瘍であり、浸潤性のBTSCを標的とする治療法の開発が急務である。ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ(HSVtk)自殺遺伝子は、HSVtkを発現する細胞にプロドラッグのガンシクロビル(GCV)を投与するとGCVはリン酸化され、強い細胞毒性(DNA合成阻害)を有する三リン酸化GCVへと変化し、細胞死を誘導する。自殺遺伝子療法は、一部の癌細胞にのみ遺伝子を発現させるだけで、周囲の多くの癌細胞まで死滅させることができるため(bystander効果)、注目を浴びてきた。さらに、HSVtkはその効果が細胞周期依存性であり、正常脳組織には影響せず、増殖している腫瘍細胞のみを選択的に殺傷することができ、放射線治療や化学療法などとは一線を画すものである。悪性グリオーマに対して、HSVtkとGCVを組み合わせた自殺遺伝子療法が、ウイルスベクターあるいはウイルスベクター産生細胞を直接脳患部に投与する方法で試みられてきたが、浸潤性の腫瘍細胞への拡散が不十分であり、臨床試験における治療効果は限定的であった。一方、神経幹細胞(neural stem cell: NSC)が腫瘍細胞に遊走・集積する性質を持つことが明らかとなり、NSCを自殺遺伝子産物のcellular vehicleとして用いて、bystander効果により腫瘍細胞の細胞死を誘導する方法が注目されている。また、ヒトに投与可能で均一なNSCはヒトiPS細胞から分化誘導することによって大量に得ることが可能となった。

申請者らはこれまで、ヒトiPS細胞から分化誘導したNSCにレンチウイルスベクターを用いてHSVtkを導入し、ヒトグリオーマモデルマウス(U87細胞株)において、bystander効果により顕著な生存期間の延長を認め、本治療法の有効性を証明することができた。一方、治療用NSCの品質管理、安定供給を考慮すると、iPS細胞へのHSVtk導入が望ましい。これまで、HSVtk導入ヒトiPS細胞を用いた治療研究の報告はないが、これは、iPS細胞でのHSVtkの発現は細胞毒性があるためであることを申請者らは明らかにした。さらに高い抗腫瘍効果を実現するために、HSVtkの恒常的に安定した遺伝子発現が不可欠である。そこで、まず「ヒトiPS細胞におけるHSVtkの細胞毒性の原因」を探索し克服する必要がある。さらに、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入は、染色体にランダムに挿入され、挿入部位の遺伝子変異や周辺遺伝子の活性化、位置効果による不活性化が懸念されるため、「CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用い、遺伝子挿入部位を指定することで、HSVtkの安定した遺伝子発現を実現」することを検討する。

2. 研究の目的

グリオーマは、脳腫瘍幹細胞の存在により、強い浸潤性および治療抵抗性を示す。自殺遺伝子療法は、bystander効果により広範に脳腫瘍幹細胞を死滅させる可能性があるが、さらに治療効果を高めるため、脳腫瘍幹細胞へ遊走性を示すinduced pluripotent stem cell(iPS細胞)由来の神経幹細胞(NSC)に自殺遺伝子を導入する新規治療法を開発し、ヒトグリオーマモデルマウスに対して著明な治療効果を証明した。しかし自殺遺伝子のヒトiPS細胞に対する細胞毒性から、恒常的な遺伝子発現が困難であることも明らかになった。本研究ではまず自殺遺伝子による細胞毒性を克服するために、iPS細胞のメタボローム代謝解析を行う。次に、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、ハウスキーピング遺伝子領域等に自殺遺伝子を挿入したiPS細胞を樹立し、NSCへ分化させ遺伝子を恒常的に安定して発現する治療用NSCを確立し、グリオーマ細胞根絶のためにbystander効果を増強させることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、HSVtkのヒトiPS細胞に対する細胞毒性の原因を明らかにするために、メタボローム代謝解析を行った。HSVtkは、Thymidine kinaseを有するため、thymidine blockによるS期停止と同様のメカニズムが生じている可能性があった。そのため例えばまず、thymidine添加によるプリンヌクレオチド及びピリミジンヌクレオチド合成経路の変動を解析した。

次に、ヒトiPS細胞に対するHSVtkの恒常的に安定した遺伝子発現のために、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を使用して、ハウスキーピング遺伝子または安全性が高いとされるAAVS1領域にTet-inducibleシステムのHSVtkを挿入するためのプラスミドDNAコンストラクトを作製した。本研究開発では、GAPDHまたは β -actinとhK01(赤色蛍光タンパク質)とrtTA(Reverse Tet-controlled transactivator protein)が2A peptide配列で繋がった形で挿入され、さらにその下流にTRE(Tet-responsive promoter)-HSVtk発現ユニットが逆方向に挿入されるような相同組み換え用のコンストラクトを作製した。AAVS1領域への相同組み換え用コンストラクトはEF-1プロモーターでhK01-2A-rtTAを発現する形にした。相同組み換え用コンストラクトとgRNAおよびCas9発現ベクターをヒトiPS細胞株にエレクトロポレーションで導入し、相同組み換えiPS細胞をhK01の発現により選択し、FACS sortingによりクローニングを行った。各クローンの相同組み換えの確認は、genomic PCRおよび最終的にはgenomic sequencingによって確認した。

こうして得られたTet-inducible HSVtk iPS細胞からNSCを分化誘導し、DoxとGCV添加によるin vitroでの細胞死の誘導効率を検討し、脳腫瘍モデルマウスでの治療効果と安全性の評価を行った。具体的には、U87細胞株には、Venus蛍光タンパク質とLuc(ルシフェラーゼ)の融合タンパク質遺伝子(ffLuc)を導入しており、ルシフェラーゼ活性を指標としたIVISにより経時的・定量的に腫瘍の増減や脳内浸潤をモニターした。また、生存解析、病理組織学的解析を行い、抗

腫瘍効果と移植 NSC の残存等の治療の安全性を評価した。

4. 研究成果

我々は、グリオーマ幹細胞へ遊走性を示す iPS 細胞由来の神経幹細胞 (NSC) に自殺遺伝子 (HSVtk) を導入する新規治療法を開発することを目的とした。メタボローム代謝解析により、HSVtk は iPS 細胞に対して細胞毒性を有することを明らかにした。さらに NSC への分化誘導過程で、挿入遺伝子の不活性化も生じることを明らかにし、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて挿入部位の最適化を行うことで、安定した遺伝子発現の実現を目指した。一方で、HSVtk の細胞毒性の問題から、長期間マウス生体内で生着させることが困難であるという課題も明らかとなった。本研究計画は、ゲノム編集技術及び遺伝子細胞療法を組み合わせた今後の新たな治療戦略の先駆けとなると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamura Ryota, Miyoshi Hiroyuki, Morimoto Yukina, Oishi Yumiko, Sampetrea Oltea, Iwasawa Chizuru, Mine Yutaka, Saya Hideyuki, Yoshida Kazunari, Okano Hideyuki, Toda Masahiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Gene Therapy Using Neural Stem/Progenitor Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells: Visualization of Migration and Bystander Killing Effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 352 ~ 366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/hum.2019.326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 三好浩之、田村亮太、森本佑紀奈、サンベトラ・オルテア、岩澤千鶴、峯裕、成田年、葛巻直子、佐谷秀行、吉田一成、岡野栄之、戸田正博
2. 発表標題 HSV-TK suicide gene therapy for glioblastoma using neural stem/progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第25回 日本遺伝子細胞治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Miyoshi, Ryota Tamura, Yukina Morimoto, Oltea Sampetrea, Chizuru Iwasawa, Yutaka Mine, Minoru Narita, Hideyuki Saya, Kazunari Yoshida, Hideyuki Okano, Masahiro Toda
2. 発表標題 HSV-TK suicide gene therapy for glioblastoma using neural stem/progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 Annual Meeting of 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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------