

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19622

研究課題名(和文)自殺遺伝子CD-UPRTゲノム編集iPS細胞を用いた遺伝子治療

研究課題名(英文)Gene therapy using genome-edited iPS cells with CD-UPRT for malignant glioma

研究代表者

戸田 正博(Toda, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：20217508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマは予後不良の脳腫瘍であり、腫瘍幹細胞(BTSC)はびまん性に浸潤する性質を有する。神経幹細胞(NSC)は、脳腫瘍へ遊走する性質を持ち、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、浸潤性BTSCの根絶を目指して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。ゲノム編集技術を利用して、iPS細胞への治療遺伝子CD-UPRTの挿入部位を最適化し、優れた治療用NSCへ分化誘導することに成功した。その後、BTSCへの治療効果を評価し、顕著な効果を得た。本研究は、ゲノム編集技術と遺伝子細胞療法を組み合わせた革新的治療戦略と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BTSCは正常脳組織へ浸潤して発育するため、既存の治療法とは異なる細胞傷害機序を有する新たな治療法の開発が望まれている。本研究の斬新性は、NSCの脳腫瘍へ集積する性質に着目し、iPS細胞から分化誘導されたNSCをBTSC治療のための遺伝子搭載細胞として利用することにある。iPS研究は再生医療への応用が急速に進められているが、脳腫瘍治療への応用はほとんどない。さらに、最新のゲノム編集技術を用いて、自殺遺伝子CD-UPRTをiPS細胞に組み込む点も意義深い。本研究手法は今後の遺伝子治療のプラットフォーム技術となる革新性を有している。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is characterized by diffuse infiltration into the normal brain.

Invasive glioma stem cells (GSCs) is an underlying cause of treatment failure. Here we show that neural stem cells (NSCs) derived from CRISPR/Cas9-edited human induced pluripotent stem cell (hiPSC) expressing a suicide gene had high tumor-trophic migratory capacity, leading to marked in vivo anti-tumor effects. Time-lapse imaging of organotypic brain slice cultures first visualized the directional migration of NSCs toward GSCs and the bystander killing effect. The gene insertion to house-keeping gene locus provided higher and stable transgene expression than other common insertion sites. Our results indicate the potential benefit of NSC-based gene therapy for invasive GSCs. Furthermore, the present research concept may become a platform to promote clinical studies using hiPSC.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：glioblastoma gene therapy suicide gene neural stem cell CD-UPRT migration genome-editing CRISPR/Cas9

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍幹細胞 (BTSC) は正常脳組織へ浸潤して発育するため、既存の治療法とは異なる細胞傷害機序を有する新たな治療法の開発が望まれている。一方で、神経幹細胞 (NSC) は腫瘍や損傷部位に遊走・指向する性質を持つことを我々は明らかにした。我々は、この NSC の脳腫瘍へ集積する性質に着目して、iPS 細胞から分化誘導された NSC を BTSC 治療のための遺伝子搭載細胞として利用することとした。iPS 研究は再生医療への応用が急速に進められているが、脳腫瘍治療への応用はほとんどない。

本研究のもう一つの斬新性は、最新のゲノム編集技術を用いて、自殺遺伝子を iPS 細胞に組み込む点である。本研究手法は今後の遺伝子治療のプラットフォーム技術となる革新性を有しているのみならず、再生医療における iPS 細胞の腫瘍化の問題点を解消する側面も有する。

### 2. 研究の目的

悪性グリオーマが極めて治療困難な要因は、BTSC が正常脳組織へ浸潤する性質を有することである。そのため、外科的手術による全摘出は極めて困難である。一方、NSC は、脳内を遊走し脳腫瘍へ集積する性質を有することから、治療遺伝子を搭載する細胞としての役割が注目されている。そこで本研究では、治療困難な浸潤性 BTSC の根絶を目指して iPS から分化誘導した NSC を用いた遺伝子治療の開発を行う。導入遺伝子は、新たな自殺遺伝子治療として注目され、臨床研究が進められているシトシンデアミナーゼ (CD) と 5-fluorocytosine (5-FC) の組み合わせを用いる。CD は 5-FC を 5-fluorouracil (5-FU) に変換し、DNA および RNA 合成を抑制して細胞死へ誘導するが、さらに CD と uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) 遺伝子を組み合わせると、UPRT が 5-FU を thymidylate synthase 阻害剤の 5-FUMP へ変換するため、CD 単独と比べ 100 倍以上の強い bystander effect が得られる。局所 bystander effect は細胞周期依存性で、腫瘍細胞を選択的に殺傷するため、その他の化学療法や放射線治療等に対して、高い治療指数が期待される。

### 3. 研究の方法

#### ・ゲノム編集による CD-UPRT 遺伝子導入 iPS 細胞の作成

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、iPS 細胞のハウスキーピング遺伝子座に CD-UPRT 自殺遺伝子を挿入した。GAPDH 等と hK01 (赤色蛍光タンパク質) とを 2A peptide 配列で連結し、CD-UPRT 発現ユニットが逆方向に挿入される相同組み換え用コンストラクトを作製した。相同組み換え iPS 細胞を hK01 発現により選択し、genomic PCR および sequencing により確認した。

#### ・CD-UPRT-iPS 由来 NSC を用いた in vitro での BTSC 殺傷効果の解析

ゲノム編集操作により得られた CD-UPRT-iPS を NSC へ分化誘導後、in vitro でのヒト BTSC に対する bystander effect を検証した。細胞死は細胞増殖/細胞毒性アッセイキット Cell Counting Kit-8 を用いて評価した。

#### ・脳スライス培養における CD-UPRT-iPS 由来 NSC の BTSC 殺傷効果の解析

ヒト BTSC モデルマウスに CD-UPRT-NSC を移植後、200  $\mu$ m 厚の脳切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡の CO2 チャンバーで 5-FC 投与下に培養し、BTSC 殺傷効果を最大で 1 週間程度 time-lapse 撮影によりリアルタイムイメージングした。

#### ・ヒト BTSC マウスモデルにおける治療効果の解析

ヒト BTSC モデルマウスに CD-UPRT-NSC を移植後、5-FC を投与し、IVIS imaging system を利用した in vivo 腫瘍イメージングおよび生存解析を行った。また CD-UPRT-iPS 由来 NSC の BTSC への集積性を評価するため、経時的に脳組織を摘出し、免疫染色をすることで、組織学的検討を行った。

### 4. 研究成果

本研究では、浸潤性 BTSC の根絶を目指して 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。

まずゲノム編集技術を利用して、iPS 細胞への治療遺伝子 yCD-UPRT の挿入部位を最適化した。その結果、位置効果による自殺遺伝子の不活性化が生じることなく、恒常的な安定発現を実現した。さらに、増殖能等の面で優れた治療用 NSC へ大量分化誘導することにも成功した。その後、BTSC への治療効果を、in vitro, ex vivo (脳スライス培養: organotypic brain slice culture), in vivo でそれぞれ評価し、顕著な治療効果を得た。

特に脳スライス培養では、本治療用 NSC の腫瘍への指向・遊走を定量的に評価し、さらに治療用

NSC が引き起こす Bystander 効果の範囲をリアルタイムに可視化することに成功した。本結果は、十分な抗腫瘍効果を発揮するための至適な移植 NSC 数の情報として使用することができる。さらに、脳梁を越え対側の大脳半球にも腫瘍細胞がびまん性浸潤する in vivo BTSC モデルマウスに対しても、コントロールに比して 5-FC 投与治療群は、顕著な生存期間の延長を示し、組織学的にも腫瘍細胞の高密度部位に、治療用 NSC が集簇する様子を同定することができた。

本研究は、ゲノム編集技術と遺伝子細胞療法を組み合わせた革新的治療戦略であり、今後の遺伝子治療のプラットフォーム技術となり得る概念を提唱している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tamura R, Miyoshi H, Morimoto Y, Oishi Y, Sampetean O, Iwasawa C, Mine Y, Saya H, Yoshida K, Okano H, Toda M.  | 4. 巻<br>31(5-6)       |
| 2. 論文標題<br>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<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Hum Gene Ther.   | 6. 最初と最後の頁<br>352-366 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1089/hum.2019.326  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Tamura R, Miyoshi H, Yoshida K, Okano H, Toda M.                               | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Recent progress in the research of suicide gene therapy for malignant glioma. | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Neurosurg Rev.   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s10143-019-01203-3                                    | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Tamura R, Ohara K, Sasaki H, Morimoto Y, Kosugi K, Yoshida K, Toda M                                | 4. 巻<br>120           |
| 2. 論文標題<br>Difference in immunosuppressive cells between the peritumoral area and tumor core in glioblastoma. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>World Neurosurgery  | 6. 最初と最後の頁<br>601-610 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.wneu.2018.08.133.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kanazawa T, Minami Y, Jinzaki M, Toda M, Yoshida K, Sasaki H  | 4. 巻<br>120             |
| 2. 論文標題<br>Preoperative prediction of solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma and angiomatous meningioma using magnetic resonance imaging texture analysis. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>World Neurosurgery  | 6. 最初と最後の頁<br>1208-1216 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.wneu.2018.09.044.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kuga D, Toda M, Yoshida K  | 4. 巻<br>120             |
| 2. 論文標題<br>Treatment strategy for tuberculom sellae meningiomas based on a preoperative radiological assessment. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>World Neurosurgery   | 6. 最初と最後の頁<br>1279-1288 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.wneu.2018.09.054.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Mizutani K, Akiyama T, Yoshida K, Toda M   | 4. 巻<br>120           |
| 2. 論文標題<br>Skull base venous anatomy associated with endoscopic skull base neurosurgery: a literature review | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>World Neurosurgery   | 6. 最初と最後の頁<br>405-414 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.wneu.2018.09.067.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kuga D, Toda M, Ozawa H, Ogawa K, Yoshida K   | 4. 巻<br>121           |
| 2. 論文標題<br>Endoscopic endonasal approach combined with a simultaneous transcranial approach for giant pituitary tumors. | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>World Neurosurgery  | 6. 最初と最後の頁<br>173-179 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.wneu.2018.10.047.   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-             |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Kanazawa T, Minami Y, Jinzaki M, Toda M, Yoshida K, Sasaki H.       | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Predictive markers for MGMT promoter methylation in glioblastomas. | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Neurosurgical Review  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10143-018-01061-5.                       | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-       |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Iwasawa C, Tamura R, Sugiura Y, Suzuki S, Kuzumaki N, Narita M, Suematsu M, Nakamura M, Yoshida K, Toda M, Okano H, Miyoshi H. | 4. 巻<br>20            |
| 2. 論文標題<br>Increased Cytotoxicity of Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells.           | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>International journal of molecular sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>810-810 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms20040810   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Kikuchi R, Ueda R, Saito K, Shibao S, Nagashima H, Tamura R, Morimoto Y, Sasaki H, Noji S, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M  | 4. 巻<br>8         |
| 2. 論文標題<br>A pilot study of vaccine therapy with multiple glioma oncoantigen/glioma angiogenesis-associated antigen peptides for patients with recurrent/progressive high-grade glioma. | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Journal of clinical medicine  | 6. 最初と最後の頁<br>263 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/jcm8020263.   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-         |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Tamura R, Ohara K, Morimoto Y, Kosugi K, Oishi Y, Sato M, Yoshida K, Toda M                       | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>PITX2 Expression in Non-functional Pituitary Neuroendocrine Tumor with Cavernous Sinus Invasion. | 5. 発行年<br>2019年 |
| 3. 雑誌名<br>Endocrine pathology   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s12022-019-9573-8.  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-       |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shibao S, Toda M, Fujiwara H, Jinzaki M, Yoshida K   | 4. 巻<br>161           |
| 2. 論文標題<br>Bridging vein and tentorial sinus in the subtemporal corridor during the anterior transpetrosal approach. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Acta Neurochirurgica   | 6. 最初と最後の頁<br>821-829 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s00701-019-03857-w.  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田村亮太、三好浩之、森本佑紀奈、佐藤瑞仁、サンペトラ・オルテア、佐谷秀行、吉田一成、岡野栄之、戸田正博  |
| 2. 発表標題<br>Suicide gene therapy for malignant glioma using genome-edited human induced pluripotent stem cells |
| 3. 学会等名<br>第37回日本脳腫瘍学会  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田村亮太、三好浩之、森本佑紀奈、佐藤瑞仁、サンペトラ・オルテア、佐谷秀行、吉田一成、岡野栄之、戸田正博 |
| 2. 発表標題<br>CD-UPRT自殺遺伝子・ゲノム編集iPS細胞を用いた悪性神経膠腫に対する治療法の開発         |
| 3. 学会等名<br>第78回 日本脳神経外科学会総会                                    |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>戸田正博、田村亮太、三好浩之、森本佑紀奈、サンペトラ・オルテア、佐谷秀行、岡野栄之、吉田一成   |
| 2. 発表標題<br>Suicide gene therapy for malignant glioma using genome-edited human induced pluripotent stem cells |
| 3. 学会等名<br>第25回 日本遺伝子細胞治療学会   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>戸田正博、田村亮太、三好浩之、岡野栄之、吉田一成              |
| 2. 発表標題<br>ゲノム編集iPS細胞を用いた悪性神経膠腫に対する革新的遺伝子細胞療法の開発 |
| 3. 学会等名<br>第78回 日本脳神経外科学会総会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田村亮太、戸田正博、三好浩之、岩澤千鶴、森本佑紀奈、オルテア サンベトラ、佐谷秀行、岡野栄之、吉田一成 |
| 2. 発表標題<br>ゲノム編集iPS細胞を用いた悪性神経膠腫に対する自殺遺伝子治療                     |
| 3. 学会等名<br>第36回日本脳腫瘍学会学術集会                                     |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                |                            |               |
|--------------------------------|----------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>ゲノム編集多能性幹細胞を用いた治療薬 | 発明者<br>戸田正博、岡野栄之、田村亮太、佐藤瑞仁 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2020-63477 | 出願年<br>2020年               | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|         |         |