

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591703

研究課題名 (和文) 自家骨髄間質細胞を使った神経膠芽腫治療法の開発

研究課題名 (英文) Bystander killing effect of suicide gene-transduced allogenic bone marrow stromal cells on malignant glioma

研究代表者

森 健太郎 (MORI KENTARO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30200364

研究成果の概要：

自殺遺伝子 (herpes simplex virus (Hsv) thymidine kinase(tk)) を持った細胞 (effector cell) の周辺に存在する自殺遺伝子を持たない細胞 (bystander cell) も prodrug (ganciclovil: GCV) の投与によって死滅する効果、すなわち bystander 効果を利用して骨髄間質細胞を vector として用いる悪性脳腫瘍の治療が可能であるかについて研究した。Hsv-tk 遺伝子を骨髄間質細胞 (MSCs) に導入し、glioma 細胞と異なる比率で一緒に培養し、培養液中に pro-drug である ganciclovir (GCV) を異なる濃度で混入すると、Hsv-tk を持たない glioma 細胞も死滅するか、すなわち in vitro での bystander 効果があるか検討した。免疫染色と核染色を行い Hsv-tk 遺伝子を持たない glioma 細胞核に apoptosis による核変化を認め形態的に bystander 効果を認めた。また、9L/LacZ glioma 細胞の持つ β -galactosidase 活性を測定し、Hsv-tk 遺伝子を持つ MSC 細胞の比率が高いほど、また GCV 濃度が高いほど glioma 細胞の生存率が低下することを認め、定量的にも bystander 効果の存在を証明した。この研究結果に基づき、in vivo で Rat の glioma モデルを作成し、Hsv-tk 導入した MSCs を移植し GCV を投与し、脳腫瘍の治療ができるかについて検討した。F 344/N Slc Fisher Rat をハロセン麻酔下にて頭蓋骨に小開頭を作製し、 1×10^5 個の 9L/LacZ glioma 細胞を 5×10^4 個の Hsv-tk 導入 (MSCs/tk (+) 群, N=7) または非導入 (MSCs/tk (-) 群, N=7) の MSCs と一緒に大脳基底核部に移植した。また control 群として 1×10^5 個の 9L/LacZ のみを移植した (N=7)。GCV 100mg/Kg を 7 日間連続腹腔内投与した。Day 7, 14, 21 に MR にて造影剤を投与して腫瘍体積を測定した。また、生存日数を比較した。その結果 Day 14 及び 21 にて MSCs/tk (+) 群では有意に他の 2 群に比べて腫瘍体積の縮小を認めると共に ($p < 0.05$)、Kaplan-Meier 解析にて有意に他の 2 群に比べ生存日数の延長をみとめた (log-rank test: $p < 0.001$)。以上より、自家骨髄間質細胞を vector 細胞として用いて Hsv-tk を導入し、それを脳腫瘍内に注入し GCV を投与することによる bystander 効果を利用した悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療が可能であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学，脳神経外科学

キーワード：神経膠腫，骨髄間質細胞，Bystander 効果

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫 (glioma) は原発性脳腫瘍の 1 つであり、びまん性に進展するため手術的に全摘出することは困難である。そのため、悪性神経膠腫 (glioblastoma) の 1 年生存率は手術および放射線治療を施行しても 50% に過ぎないのが現状である。一方、化学療法でも著しい延命効果は無く新しい治療法の開発が必要とされている。一方、遺伝子治療に関しては自殺遺伝子の一つである herpes simplex virus 1 thymidine kinase (HSVtk) gene を用いた臨床研究では明らかな治療効果を認めなかったことと、vector となる adenovirus や herpes simplex virus の病原性の問題も無視できない。一方、近年骨髄間質細胞が神経細胞などへの分化能を持つことや脳内遊走作用があることが判明した。骨髄間質細胞は患者から自家細胞として採取可能であり、拒絶反応などの問題もない。一方、癌治療には以前から自殺遺伝子を持った細胞の近傍の自殺遺伝子を持たない細胞が pro-drug 投与にて死滅する bystander 効果が知られている。そこで、骨髄間質細胞に自殺遺伝子を導入して安全な vector として活用し bystander 効果を用いて悪性神経膠腫の治療が出来る可能性があると考えたのである。

2. 研究の目的

自殺遺伝子のひとつである herpes simplex virus 1 thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を glioma 細胞に導入し、pro-drug である ganciclovir (GCV) を投与すると glioma 細胞内の thymidine kinase によって活性化型に変換され細胞は死滅するが、HSVtk を持たない周辺の glioma 細胞も死滅することが知られており、これを bystander 効果という。この bystander 効果が、HSVtk を導入した骨髄間質細胞 (MSC) と HSVtk を持たない glioma 細胞との間にも bystander 効果が認められるかを検討することによって、自家骨髄間質細胞を vector として用いる悪性脳腫瘍に対する新しい治療方法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄間質細胞の採取と培養及び Hsv-tk 遺伝子の導入

F33/N Slc Fisher ラットをエーテルで安楽死させた後、大腿骨を取り出し骨髄を採取し 20% fetal bovine serum (FBS) と 100U/mL penicillin と 100 μ g/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて 5% CO₂ incubator で 48 時間培養し、二日ごとに培養液を交換することによって培養器に接着した細胞のみを培養した。10 から 15 回培養を繰り返した後、培養された骨髄間質細胞 (MSCs) を cell banker (BLC-2; ZENOAQ) にて凍結保存した。pNT plasmid 上の herpes simplex virus thymidine kinase (Hsv-tk) 遺伝子は Tag DNA polymerase による PCR にて増殖した。使った primer は以下の通りである。primer hsv-tk F1, CTCGAGATGGCTTCGTACCCCTGCCAT and primer hsv-tk R2, AGATCTTCAGTTA GCCTCCCCATCTC PCR 産物を pGEM®-T にてサブクローニングして、KhoI と NotI にて切断した Hsv-tk 遺伝子を pcDNA3.1/Hygro(-) vector に組み込んだ。これを lipofection 法を用いて MSCs に導入した。Hygromycin B にて selection した後、数代培養して cell banker にて凍結保存した。

(2) Connexin 43 (Cx43) の Western blotting による検出

Bystander 効果は細胞間接合物質である Cx43 が関係すると考えられている。そこで、今回使われる悪性 glioma 細胞株である 9L/LacZ 細胞と MSCs と Hsv-tk 遺伝子導入 MSCs (MSCs/tk(+)) に Cx43 蛋白が発現しているかを Western 法を用いて調べた。それぞれの細胞溶解液を電氣的に Hybond™-P に transfer したのち、mouse monoclonal (Cx43) 一次抗体で処理し、horseradish peroxidase 法にて 2 次抗体 (anti-mouse immunoglobulin G) を用いて標識した。ECL detection kit (Amersham) を用いて Hyperfilm-ECL に写し検討した。

(3) In vitro における MSCs/tk(+) と 9L/LacZ 細胞間の Bystander killing 効果の検討

①免疫染色による形態的検討

1 × 10⁴ 個の 9L/LacZ glioma 細胞を MSCs/tk(+)細胞または MSCs/tk(-)細胞と 1:2 の比率で 20% FBS-DMEM を用いて 24-well plate にて培養した。24 時間後に ganciclovil (GCV) 10 μg/mL を培養液に 3 日間加えた。1 日目、2 日目、3 日目の検体を免疫染色した。すなわち、9L/LacZ glioma 細胞を標識するために、anti-β-galactosidase monoclonal 抗体と goat anti-mouse immunoglobulin (Alexa Fluor® 594 A-11005) で標識した。細胞核の形態的観察のため Hoechst 33258 を用いて染色した。各サンプルを蛍光顕微鏡を用いて観察するとともに Meta View software で解析した。

②定量的解析

1 × 10⁴ 個の 9L /LacZ glioma 細胞を 24 well plate で、色々な比率の MSCs/tk(+)細胞(1:0, 4:1, 2:1, 1:1, 2:1, 4:1)で 20% FBS-DMEM にて培養し、24 時間後に濃度の異なる GCV(0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μg/mL)を加える。9L 細胞の生存率はそれの持つ β-galactosidase 活性に比例するので、培養後 72 時間後に cell lysate に ONPG を加えて spectrophotometer(420nm)にて OD を測定して β-galactosidase 活性を測定し評価した。色々な比率での培養下での、9L /LacZ glioma 細胞の生存率を次の式を用いて算出した。

Cell survival rate (%) of 9L/LacZ in mixed cells = β-galactosidase enzyme activity (mU/100 μL) at varying concentrations of GCV/ β-galactosidase enzyme activity (mU/100 μL) without GCV × 100

一方、同様な実験で実際に生存している 9L /LacZ glioma 細胞の数を算出して検討した。すなわち、1 × 10⁴ 個の 9L /LacZ glioma 細胞を 24 well plate で、色々な比率の MSCs/tk(+)細胞(1:0, 4:1, 2:1, 1:1, 2:1, 4:1)で 20% FBS-DMEM にて培養し、24 時間後に濃度の異なる GCV(0, 1, 10 μg/mL)を加える。培養後 72 時間後に、それぞれの well を PBS で洗浄後に接着した細胞を 0.25% trypsin-EDTA にて剥がし、集めた細胞を 2% glutaraldehyde にて固定し、X-gal 染色液にて染色し、各 well での生存 9L /LacZ glioma 細胞数を算出した。9L /LacZ glioma 細胞の生存率を次の式を用いて算出した。

Cell survival rate (%) of 9L/LacZ in mixed cells = cell count at varying concentrations of GCV/cell count without

GCV × 100

(4) In vivo における MSCs/tk(+) と 9L/LacZ 細胞間の Bystander killing 効果の検討

Rat の glioma 脳腫瘍モデルを作成し、Hsv-tk 導入した MSCs を移植し GCV を投与し、脳腫瘍の治療ができるかについて検討した。F 344/N Slc Fisher Rat をハロセン麻酔下にて頭蓋骨に小開頭を作製し、stereotaxic に 1 × 10⁵ 個の 9L/LacZ glioma 細胞を 5 × 10⁴ 個の Hsv-tk 導入(MSCs/tk(+))群, N=7) または非導入(MSCs/tk(-))群, N=7) の MSCs と一緒に大脳基底核部に移植した。また control 群として 1 × 10⁵ 個の 9L/LacZ のみを移植した(N=7)。GCV 100mg/Kg を 7 日間連続腹腔内投与した。Day 7, 14, 21 に 1.5T の MR にて造影剤を投与して撮像して腫瘍体積を測定した。また、生存日数を比較した。

4. 研究成果

(1) Cx43 の発現結果

Western blot による検討では、9L/LacZ glioma 細胞、MSCs/tk(+), MSCs/tk(-)の全ての細胞において Cx43 蛋白の発現を認めており(Fig. 1)、Bystander 効果における細胞間連絡の橋渡しとなる蛋白が glioma 細胞と骨髄間質細胞の両方に存在することが証明された。



Fig.1

(2) In vitro における MSCs/tk(+) と 9L/LacZ 細胞間の Bystander killing 効果の検討結果

①Bystander 効果の免疫染色による形態的検討結果

Fig. 2 に 9L/LacZ glioma 細胞を MSCs/tk(+)細胞または MSCs/tk(-)細胞との co-culture

後 GCV を加えた後 1 日目、2 日目、3 日目の免疫染色像を提示する。9L/LacZ glioma 細胞は β -galactosidase 陽性 (赤) の細胞質と小さな核を持っている細胞である。MSC 細胞は β -galactosidase 陰性で大きめの核を持った細胞である。MSCs/tk(-) 細胞との co-culture では、glioma 細胞が核の形態的变化無く日々増殖している。MSCs/tk(+) 細胞との co-culture では、MSCs/tk(+) 細胞と接触している glioma 細胞では核凝集と核の断片化を認めるとともに (矢印)、細胞数の現象を認めた。以上より、MSCs/tk(+) 細胞と接触している glioma 細胞では bystander 効果により apoptosis を来し死滅減少していることが、形態学的に証明された。

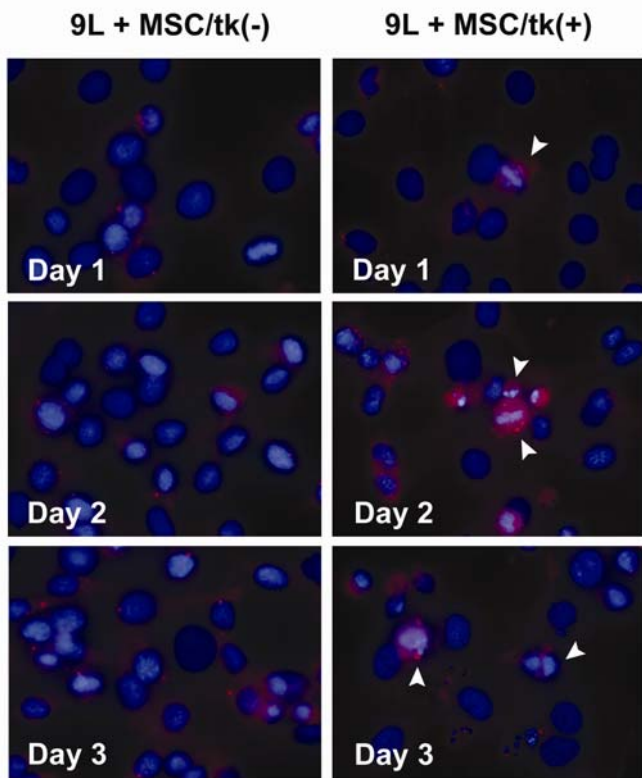


Fig.2

②Bystander 効果の定量的解析

Fig.3 (上段) に 9L/LacZ glioma 細胞と MSCs/tk(+) 細胞との色々な比率の co-culture 下に各濃度の GCV を加えた場合の、glioma 細胞の β -galactosidase 活性からみた生存率を提示する。9L/LacZ glioma 細胞と

MSCs/tk(+) 細胞との 1:2 の比率での co-culture では GCV 濃度が $0.01 \mu\text{g/mL}$ では glioma 細胞の生存率は $93.4 \pm 1.6\%$ であり、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ では $74.9 \pm 2.0\%$ であり、9L/LacZ glioma 細胞のみでの生存率に比べ有意 ($p < 0.01$) に減少した。GCV 濃度が $1 \mu\text{g/mL}$ の場合、glioma 細胞の生存率は、9L/LacZ glioma 細胞と MSCs/tk(+) 細胞との比率が 2:1, 1:1, 1:2 の場合、それぞれ $90.4 \pm 2.4\%$, $81.9 \pm 2.5\%$, $57.9 \pm 0.9\%$ であり有意 ($p < 0.01$) に低下した。GCV 濃度が $10 \mu\text{g/mL}$ の場合、glioma 細胞の生存率は、9L/LacZ glioma 細胞と MSCs/tk(+) 細胞との比率が 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 の場合、それぞれ $57.8 \pm 1.6\%$, $39.3 \pm 1.3\%$, $28.9 \pm 0.6\%$, $13.4 \pm 0.3\%$ であり有意 ($p < 0.01$) に低下した。

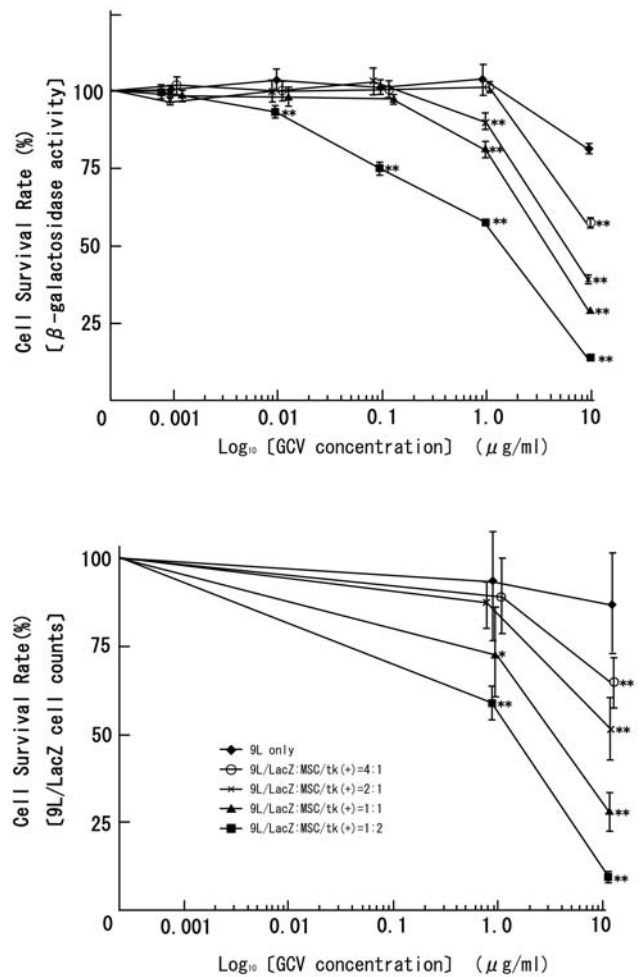


Fig.3

Fig.3 (下段) に 9L/LacZ glioma 細胞と MSCs/tk(+) 細胞との色々な比率の co-culture 下に各濃度の GCV を加えた場合の、glioma 細胞の生細胞数からみた生存率を提示する。GCV 濃度が $1 \mu\text{g/mL}$ で、9L/LacZ

glioma細胞とMSCs/tk(+)細胞との比率が1:1および1:2では、glioma細胞の生存率は、9L/LacZ glioma細胞のみでの培養に比べ、それぞれ73.9±12.7%および59.5±4.6%と有意(p<0.05)に減少した。GCV濃度が10μg/mLで、9L/LacZ glioma細胞とMSCs/tk(+)細胞との比率が4:1, 2:1, 1:1および1:2では、glioma細胞の生存率は、9L/LacZ glioma細胞のみでの培養に比べ、それぞれ65.7±8.8%, 52.6±11.2%, 28.9±5.6%および10.1±1.5%と有意(p<0.01)に減少した。

以上より、MSCs/tk(+)細胞の比率が高い程、またGCV濃度が高い程、glioma細胞の生存率が有意に減少し、Bystander効果が定量的に証明された。

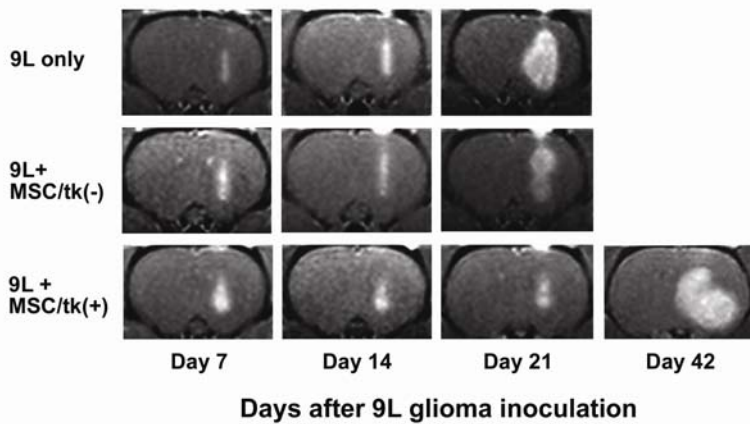


Fig.4

(3) In vivoにおけるMSCs/tk(+)と9L/LacZ細胞間のBystander killing効果による腫瘍増大効果の抑制と生存期間の延長効果

9L/LacZ glioma細胞をHsv-tk導入(MSCs/tk(+))群, N=7)または非導入(MSCs/tk(-))群, N=7)のMSCsと一緒に大脳基底核部に移植した群とcontrol群として9L/LacZのみを移植した3群で、GCV 100mg/Kgを7日間連続腹腔内投与した。Day 7, 14, 21にMRにて造影剤を投与して測定した3群の腫瘍体積の経時変化とそのMR画像を提示する(Table 1, Fig. 4)。その結果Day 14及び21にてMSCs/tk(+)群では有意に他の2群に比べて腫瘍体積の縮小を認めた。Fig. 5に、3群の生存日数を提示する。MSCs/tk(+)群ではKaplan-Meier解析にて有意に他の2群に比べ生存日数の延長をみとめた(log-rank test: p<0.001)。以上より、自家骨髄間質細胞をvector細胞として用いてHsv-tkを導入し、それを脳腫瘍内に注入しGCVを投与する

ことによるbystander効果を利用した悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療が可能であることが示唆された。

Table 1

Groups	Day 7	Day 14
Only 9L (n=7)	5.4±1.1	6.9±0.9
MSCs/tk(-)+GCV (n=7)	6.4±2.2	7.0±1.4
MSCs/tk(+)+GCV (n=7)	5.9±1.1	5.4±0.8

Groups	Day 21	Day 42
Only 9L (n=7)	43.3±11.4	ND
MSCs/tk(-)+GCV (n=7)	22.0±10.6	ND
MSCs/tk(+)+GCV (n=7)	8.1±1.9	96.1±84.7

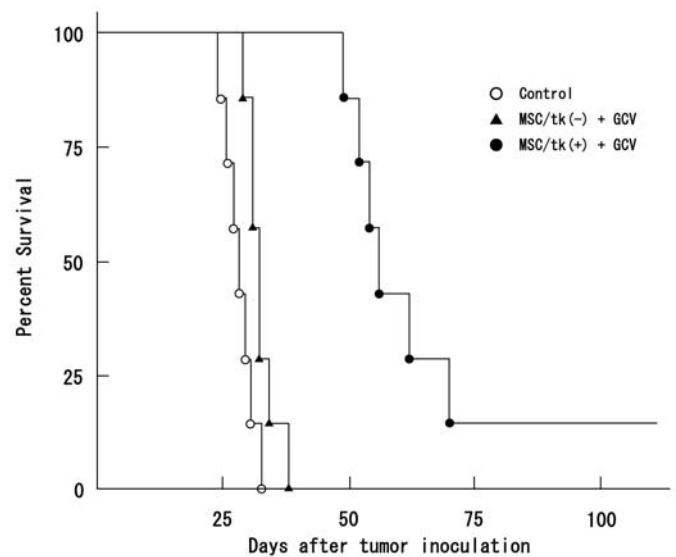


Fig.5

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 1 件)

① Kentaro Mori, Junko Iwata, Masahiro Miyazaki, Hideo Osada, Yuichi Tange, Takuji Yamamoto, Yasuhisa Aiko, Masaru Tamura, Toshihiko Shiroishi: Bystander killing effect of thymidine kinase gene-transduced allogeneic adult bone marrow stromal cells with ganciclovir on malignant glioma cells. Neurosurg Rev, 2009(in progress)

〔学会発表〕(計 1 件)

①丹下 祐一、森 健太郎、岩田 純子、宮崎 正弘：自殺遺伝子を導入した骨髄間質細胞による bystander 効果を用いた悪性 glioma 治療法。第 67 回日本脳神経外科学会総会、平成 20 年 10 月 2 日 (盛岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 健太郎 (MORI KENTARO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号： 30200364

(2) 研究分担者

長田 秀夫 (OSADA HIDEO)

順天堂大学・医学部・講師

(3) 連携研究者