

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07761

研究課題名(和文) 悪性グリオーマ治療の製剤化に向けたHSVtk遺伝子導入細胞株の構築

研究課題名(英文) Construction of HSVtk transgenic cell lines for formulation of malignant glioma therapies

研究代表者

池野 正史 (Ikeno, Masashi)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80298546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子とプロドラッグであるガンシクロビル(GCV)による悪性グリオーマに対する遺伝子細胞治療の開発を目的とした。ヒト組織幹細胞をベースにHSVtk遺伝子を導入した細胞の単クローン化と、抗腫瘍効果を指標とした選別により、HSVtk遺伝子を効率よく悪性グリオーマにデリバリーするヒト組織幹細胞の作製法を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の遺伝子細胞治療法の開発は、遺伝子導入により組織幹細胞を加工する技術と密接に関連する。HSVtk遺伝子を悪性グリオーマに効率よくデリバリーするヒト組織幹細胞の製剤化に向けて、細胞加工の工程および加工した細胞の性能について評価検討した。その結果、加工細胞を単クローン化により最適化する重要性を示したことに大きな意義がある。また、加工工程および加工細胞における具体的課題が見出され、今後の遺伝子細胞治療の発展への寄与が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a gene and cell therapy for malignant glioma using herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene and its prodrug ganciclovir (GCV). We investigated a method to produce tissue stem cells that efficiently deliver the HSVtk gene to malignant gliomas by cloning HSVtk gene-transfected cells and selecting them for their anti-tumour effects.

研究分野：分子生物学

キーワード：組織幹細胞 悪性グリオーマ HSVtk遺伝子 TERT遺伝子 細胞寿命 クローン化 遺伝子細胞治療

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。

1. 研究開始当初の背景

多くの癌は治癒的切除が可能であるが、悪性グリオーマは脳の広範摘出術ができないため、基本的に非治癒手術となる。一方、悪性グリオーマが脳外に転移することは極めてまれであるため、摘出後の残存腫瘍細胞に対する有効な治療が開発されれば、予後は飛躍的に改善する可能性がある。

このため悪性グリオーマにレトロウイルスを用いた遺伝子治療が最初に臨床応用された。単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子を腫瘍細胞へ直接導入させ、プロドラッグであるガンシクロビル(GCV)を全身投与する自殺遺伝子療法(HSVtk/GCVシステム)であり、周囲の腫瘍細胞を死滅させるバイスタンダー効果の特徴とする(図1)。しかしながら臨床試験では治療効果は限定的であり、HSVtk 遺伝子の悪性グリオーマへのデリバリー効率が不十分なことが主な原因と考えられた。

そこで、レトロウイルスに代わり、脳内を広範に遊走することが知られている神経幹細胞や骨髄由来の間葉系幹細胞を HSVtk 遺伝子のデリバリー手段とした遺伝子細胞治療の開発が進められた。治療対象が悪性グリオーマのために免疫拒絶に大きな問題がなく、ラット脳腫瘍モデルを治癒させることに成功している。

その一方で、ヒト組織(体性)幹細胞には細胞寿命があるために、細胞の加工は一時的な遺伝子導入に限定され、恒常的に HSVtk 遺伝子を発現する治療用細胞の作製、最適化、製剤化には至っていない。

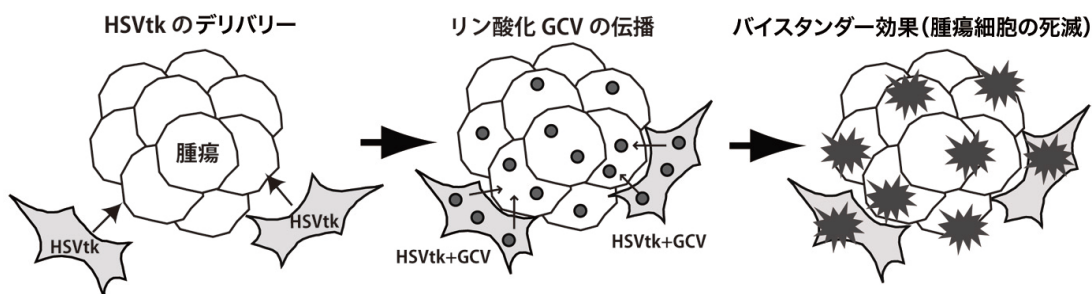


図1. HSVtk/GCV システム

2. 研究の目的

HSVtk 遺伝子とプロドラッグである GCV の投与による悪性グリオーマに対する遺伝子細胞治療の開発のために、HSVtk 遺伝子をデリバリーするヒト組織幹細胞を作製、最適化する技術を確認する。そのため、ヒト組織幹細胞の寿命延長化を用いて、HSVtk 導入細胞の単クローン化、および評価選別することが重要な課題となる。

3. 研究の方法

トランスポゾンを用いたウイルスフリーの遺伝子導入技術(PiggyBac システム)と、hTERT 遺伝子による寿命延長技術により、ヒト組織幹細胞を加工した。ヒト線維芽細胞を比較対象に複数種のヒト組織幹細胞に、HSVtk 遺伝子と hTERT 遺伝子とを同時に導入し、単クローン化する工程を検討した。製剤化への観点から、作製過程の再現性、単クローン化後のヒト組織幹細胞が持つ機能の維持、加工機能(細胞の増殖期間、抗腫瘍効果:バイスタンダー効果)の適正、長期培養に伴う機能の持続性、を指標として評価検討した。

- (1) ヒト組織幹細胞に対し、加工に必要な遺伝子を導入し、単クローンを取得した。
- (2) 単クローン後に組織幹細胞が本来持つ性質を維持するか否かの評価として、細胞核型、細胞形状について、遺伝子導入前後で比較検討した。特に hTERT 導入に起因する変化に注意した。
- (3) 各クローンの HSVtk 遺伝子の発現量を調べ、in vitro のバイスタンダー効果を検討した。
- (4) 長期培養により各クローンの細胞増殖期間を測定し hTERT 遺伝子の効果を調べた。合わせて長期培養後の性質変化の有無を検討した。
- (5) 各評価項目において設定した基準を満たさない場合は、各要素および条件を見直した。

4. 研究成果

(1) ヒト組織幹細胞に対する複数種遺伝子の導入と単クローン化

HSVtk 遺伝子、寿命延長に重要な hTERT 遺伝子、Hygromycin 耐性遺伝子、発現モニターとなる GFP 遺伝子、合計 4 種の遺伝子を安定に発現する DNA コンストラクトを作製した。安定かつ均一な発現に向けて、発現プロモーターを CAG とし、4 種の遺伝子を同一コンストラクトに集約した。比較検討用のヒト線維芽細胞、および複数種のヒト組織幹細胞に対し PiggyBac システムを利用して、4 種遺伝子を連結した遺伝子発現コンストラクトを導入した。その結果、ヒト組織

維芽細胞および組織幹細胞において Hygromycin 耐性の安定導入細胞がクローンとして再現的に得られた。

安定導入細胞の初期評価として、導入配列が無傷にゲノムに挿入されたか否かを確認するため、hTERT および GFP 遺伝子配列を指標として PCR 解析した。その結果、ヒト繊維芽細胞および組織幹細胞のすべてのクローンにおいてゲノムへの挿入は導入配列の全長ではないことが明らかとなった。

また、ヒト組織幹細胞においては、GFP 遺伝子単独の導入により、発現プロモーターの強さを評価した。予想に反し、CAG プロモーターの発現強度は著しく弱い一方で、遺伝子発現のサイレンシングが予想された CMV プロモーターでは、蛍光強度は CAG プロモーターより高く、細胞間で均一であった。

課題解決のために、導入コンストラクトが長いことが原因と考え、4種の遺伝子発現コンストラクトを2つに分割した。また HSVtk の発現プロモーターを CAG から CMV プロモーターに変更したうえで、細胞への導入と単クローン化をおこなった。コンストラクトを分割したことにより、クローンを選別する過程が増えたが、解析には十分な個数のクローンが得られ、ゲノムを PCR 解析した結果、導入配列の全長が挿入されていた。

(2) HSVtk 発現による増殖阻害

hTERT 単独導入した場合と比較して、ヒト組織幹細胞において HSVtk 遺伝子と hTERT 遺伝子を同時に導入した場合に、クローン樹立直後にもかかわらず細胞の増殖速度が遅く、原因として HSVtk 遺伝子による細胞毒性が考えられた。

そこで、HSVtk 遺伝子によるネガティブスクリーニング法を参考に、HSVtk 遺伝子配列を野生型から変異型に変更した。変異型 HSVtk 遺伝子と hTERT 遺伝子とを発現する細胞株は、単クローン化後の細胞増殖が hTERT 単独の導入株と同程度になった。

(3) HSVtk の in vitro バイスタンダー効果

GCV により細胞死を誘導する際には HSVtk が高発現することが望ましい。変異型 HSVtk 遺伝子と hTERT 遺伝子を保有する組織幹細胞クローンに GCV を添加して細胞死の誘導を検討した。比較対象としたウイルスにて HSVtk を導入した組織幹細胞においては GCV 濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ 、5 日間の処理にて 90%以上の細胞が死滅したが、クローン化したヒト組織幹細胞では GCV 濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ の条件でも細胞死は 70%程度であった (図 2)。長期間培養した HSVtk 発現クローンではさらに細胞死の誘導効率が低く、細胞老化による HSVtk の発現低下が原因として考えられた。

遺伝子導入細胞の作製工程における単クローン化は本研究における基盤技術であるが、同時に組織幹細胞の培養期間の長期化による細胞性質の変化を伴うことは当初から予想された。このために hTERT 遺伝子を同時に導入し、細胞寿命を延長する一定の効果が得られたが、培養の長期化に伴う HSVtk の発現量の低下が顕在化した。

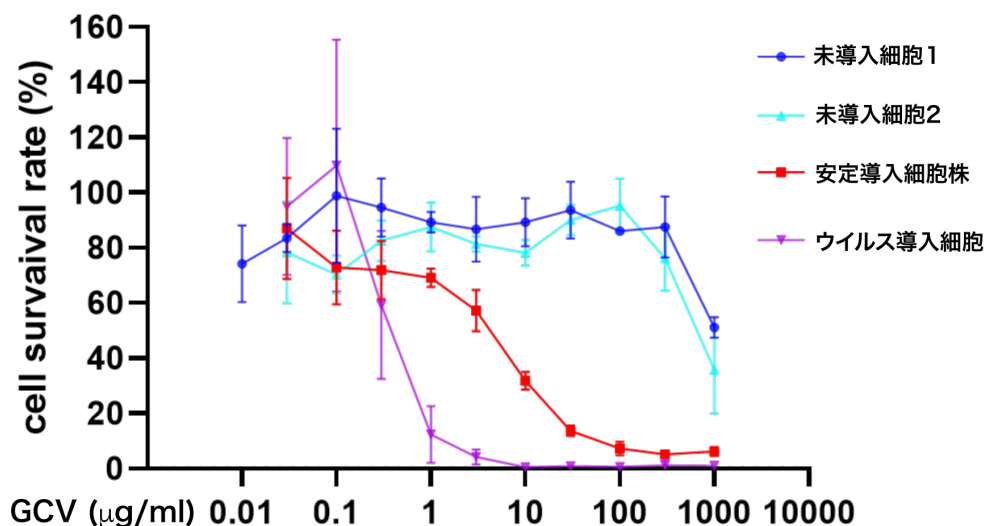


図 2. GCV による細胞死誘導

(4) hTERT 導入による細胞寿命の延長効果

ヒト組織幹細胞において hTERT の寿命延長効果が限定されたことから、細胞種間において hTERT 遺伝子の寿命延長効果を比較した。再生医療に期待される脂肪由来幹細胞、歯髄由来幹細胞においては寿命延長効果が低く、一方で線維芽細胞の中には寿命延長効果が高いものがあった (図 3)。効果の違いを検討するため、線維芽細胞の hTERT 導入前後の遺伝子変動を比較した結果、予想外に多くの遺伝子発現に変動があり、寿命延長効果に関連する可能性がある。今後、脂肪由来幹細胞、歯髄由来幹細胞における hTERT 遺伝子効果の向上を検討する同時に、新たな寿命

延長法を検討する必要がある。

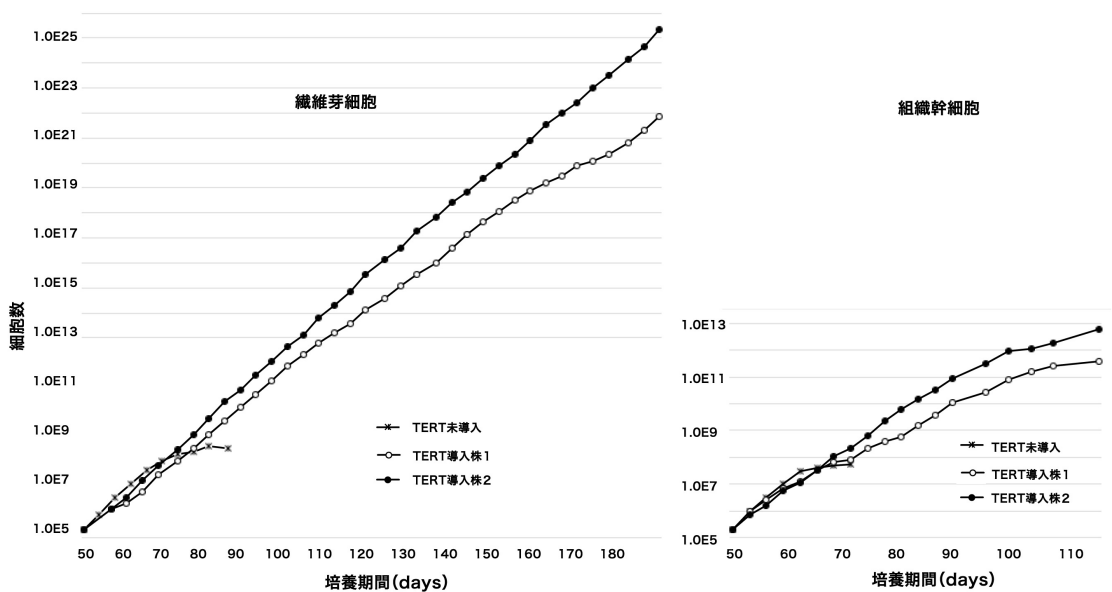


図3. hTERT 導入による細胞寿命の延長

(5) 単クローン化の有効性と課題

単クローン化の特徴を生かし各細胞クローンの性質を比較検討した。その結果、同種由来の細胞クローン間においても、HSVtk の発現量、および細胞増殖期間（延長効果）において明確な差があり、細胞クローンを多数作製することにより、治療に適した細胞クローンを選別することの有効性が示唆された。

一方で、ヒト組織幹細胞は、単クローン化の工程により細胞増殖能の低減や老化による細胞性質の変化が生じる可能性があり、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki K, Elegheert J, Song I, Sasakura H, Senkov O, Matsuda K, Kakegawa W, Clayton A J, Chang V T, Ferrer-Ferrer M, Miura E, Kaushik R, Ikeno M, Morioka Y, Takeuchi Y, Shimada T, Otsuka S, Stoyanov S, Watanabe M, Takeuchi K, Dityatev A, Aricescu A R, Yuzaki M	4. 巻 369
2. 論文標題 A synthetic synaptic organizer protein restores glutamatergic neuronal circuits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eabb4853
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abb4853	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Ikeno M, Hasegawa Y	4. 巻 390
2. 論文標題 Application of bottom-up artificial chromosomes in cell research and cell engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2019.111793	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 -
1. 著者名 Horikawa M, Koizumi S, Oishi T, Yamamoto T, Ikeno M, Ito M, Yamasaki T, Amano S, Sameshima T, Mitani Y, Otani Y, Yan Y, Suzuki T, Namba H, Kurozumi K	4. 巻 30
2. 論文標題 Potent bystander effect and tumor tropism in suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 85-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-022-00527-5	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 -
1. 著者名 Kunoki S, Tatsukawa H, Sakai Y, Kinashi H, Kariya T, Suzuki Y, Mizuno M, Yamaguchi M, Sasakura H, Ikeno M, Takeuchi K, Ishimoto T, Hitomi K, Ito Y	4. 巻 103
2. 論文標題 Inhibition of Transglutaminase 2 Reduces Peritoneal Injury in a Chlorhexidine-Induced Peritoneal Fibrosis Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2022.100050	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池野正史、鈴木伸卓、笹倉寛之、武内恒成
2. 発表標題 ヒト初代培養細胞へのTERT遺伝子導入による増殖期間の延長効果
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池野 正史、笹倉 寛之、武内 恒成
2. 発表標題 hTERT導入細胞による神経疾患および脊髄損傷に対する再生治療
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池野 正史、鈴木伸卓、笹倉 寛之、武内 恒成
2. 発表標題 細胞増殖におけるTERT遺伝子の機能と細胞治療技術への応用
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀川 真、小泉慎一郎、大石智也、山本泰資、伊藤昌彦、池野正史、難波宏樹、黒住和彦
2. 発表標題 悪性gliomaに対するHSV由来TK遺伝子導入ヒト乳児歯髄幹細胞の治療応用の可能性
3. 学会等名 第38回 日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池野 正史, 鈴木伸卓, 笹倉 寛之, 武内 恒成
2. 発表標題 細胞増殖におけるTERT遺伝子の機能と細胞治療への応用
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池野正史、笹倉寛之、武内恒成
2. 発表標題 Development of hTERT-expanded cell-based regenerative medicine in neurological diseases and spinal cord injury
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池野正史、鈴木伸卓、笹倉寛之、武内恒成
2. 発表標題 細胞寿命におけるTERT発現の効果と細胞治療への応用
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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	難波 宏樹 (Namba Hiroki) (60198405)	浜松医科大学・医学部・特命研究教授 (13802)	

6. 研究組織（つづき）

	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	武内 恒成 (Takeuchi Kosei) (90206946)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	小泉 慎一郎 (Koizumi Shinichiro) (10456577)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	

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