

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09504

研究課題名(和文) 脳腫瘍に対する間葉系幹細胞を用いた自殺遺伝子療法

研究課題名(英文) Suicide gene therapy using mesenchymal stem cells for brain tumors

研究代表者

天野 慎士 (Amano, Shinji)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：70464138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍に対して、脂肪由来間葉系幹細胞/ganciclovirを用いた自殺遺伝子療法の研究を行った。SDラット脂肪細胞より、間葉系幹細胞を分離した。ラットC6脳腫瘍細胞に対し、herpes simplex virus-thymidine kinaseを導入した脂肪由来間葉系幹細胞tkを用いて治療を試みた。In vitroでは、脂肪由来間葉系幹細胞tk:C6の細胞比率が1:16でも抗腫瘍効果を示し、1:8で腫瘍死滅効果が得られた。In vivoでのラットを用いた研究では、腫瘍縮小効果と、生存曲線の延長が確認された。脂肪由来間葉系幹細胞tk/GCV治療は、効果的な治療であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで我々は一貫して、自殺遺伝子療法を用いた脳腫瘍の治療研究にあたってきた。その中で、安定的に供給できるベクターの選択が問題であった。今回、自己からも容易に採取できる脂肪細胞を用いることにより、より臨床への発展が期待できるものとなっている。脂肪細胞由来の間葉系幹細胞を用いることは、今後、他の伝子治療のベクターとして用いることができる可能性を広げるだけでなく、自己由来細胞での治療や再生医療にも応用ができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We researched suicide gene therapy to the malignant brain tumor which has difficulty in treatment, using adipose mesenchymal stem cell(ADMSC)/ganciclovir(GCV). First mesenchymal stem cell was separated from a SD rat fat cell. Treatment was tried using ADMSC which introduced herpes simplex virus-thymidine kinase(ADMSCtk) to a rat C6 brain tumor cell. In vitro, the cell ratio of ADMSCtk:C6 also indicated anti-tumor effect in 1:16, and the perfect tumor grave effect was obtained in 1:8. In vivo, the tumor volume reduction effect and the extension of a survival curve were confirmed by a study using a rat. ADMSCtk/GCV treatment will be effective.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：自殺遺伝子療法 脳腫瘍 間葉系幹細胞 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍(転移生脳腫瘍を除く)の罹患率は10万人につき46人、1年間に10万人につき約10人が死亡しており、決して稀な病気ではない。その約1/5を占める悪性神経膠腫の治療成績は、近年の手術、放射線治療、化学療法の著しい発達にもかかわらず、過去30年間ほとんど改善されておらず、現在も多くの患者が約1年で命を落としている。新たな治療法の開発が切望されており、中でも遺伝子治療が注目されている。特に herpes simplex virus - thymidine kinase (HSVtk) 遺伝子を腫瘍細胞へ導入させ、prodrug である ganciclovir (GCV) を全身投与する方法は「自殺遺伝子療法」と呼ばれ、既に欧米では臨床応用も進められている。脳腫瘍への retrovirus を用いた遺伝子導入では脳細胞がほとんど分裂能を持たないため、HSVtk 遺伝子は選択的に腫瘍細胞へ導入される。また、すべての脳腫瘍に遺伝子が導入されなくても(10%程度の導入効率でも)、遺伝子非導入細胞に対しても殺細胞効果が及ぶことが知られており、bystander 効果と呼ばれる。ラット脳腫瘍モデルでは腫瘍の消失が観察されているが、臨床では思うように効果は上がらなかった。retrovirus 産生繊維芽細胞を腫瘍に注入する方法では、脳内の神経膠腫の浸潤性に発育する部分をカバーすることができなかつたためと考えられた。

我々の研究室では、現在まで行われてきた自殺遺伝子療法の臨床応用の問題点を考慮し、また組み替えウイルスの出現などウイルス利用に伴う危険性を回避し、我が国においても神経膠腫に対し新たな治療戦略の導入を可能にするために、ウイルス産生繊維芽細胞の代わりに HSVtk 遺伝子を導入した腫瘍細胞を用いる「TK 細胞療法」を提唱し、基礎実験を進めてきた。既存の腫瘍(target cell)内に TK 細胞(effector cell)を移植した後 GCV を投与することにより生じる bystander 効果により、target cell の増殖を阻止することができることが分かった(Namba et al, Human Gene Ther 1998)。このモデルでは、effector cell である TK 細胞そのものが腫瘍細胞であることから、target の腫瘍内に浸潤性に入り込み、周辺浸潤部まで bystander 効果による抗腫瘍効果が及ぶものと考えられた。さらに我々はこの抗腫瘍効果は TK 細胞が syngenic (すなわち target cell と effector cell が同じ細胞) であるときのみならず、allogenic でも (すなわち target cell と別の cell line の細胞を effector cell として用いても) 生ずることを明らかにした(Namba et al, Cancer Gene Ther 2000)。また、TK 細胞として使用する腫瘍細胞は GCV 投与にて全て死滅し、allogenic な細胞は移植後 1-2 週間で死滅することを一連の実験で示してきた。これは TK 細胞療法が二重の安全弁を持つことを意味している。しかし、いかに致死性疾患の治療法とはいえ viable な腫瘍細胞を移植することは倫理的に議論の余地が残るであろう。その観点から、我々は腫瘍細胞の代わりに神経幹細胞(neural stem cell, NSC)を TK 細胞として応用することを考え、良好な成績を得た(Li et al, Cancer Gene Ther 2005)。

また、幹細胞自体に腫瘍への集積性があることが明らかになってきた。ラット脳腫瘍モデルにおいて、腫瘍移植側と反対側の脳に NSCtk を注入しても、しばらくすると脳腫瘍周辺に NSCtk が移動し、GCV の全身投与を行うと腫瘍を縮小させることができることを確認した(Li et al, Cancer Letters 2007)。さらにこの腫瘍集積性は、NSC のみならず骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)や iPS 細胞、MUSE 細胞等でも確認された。

しかし、NSC は採取、培養等の面から、大量の bector 細胞を得るのが困難であった。そのため、自己から採取できる骨髄間葉系幹細胞を bector として用いることを考え、良好な成績を得た(Amano et al, Int J Oncol. 2009)。また、正常細胞に対する安全性も検証された(Amano et al, Cancer Genomics Proteomics. 2011)。しかし、骨髄間葉系幹細胞も採油、培養の面から、NSC 程ではないにしても、大量の細胞を準備することが困難であった。

その後も、より良い bector を使用するために、iPS 細胞を用いた研究を行ったが、腫瘍に対する遊走能の問題から、bector にはあまり適さないものであることが判明した。

いずれの治療においても、安全かつ大量のベクター細胞が必要であった。

2. 研究の目的

悪性グリオーマは脳内を浸潤性に広がる腫瘍であるが、脳を広範に摘出することができないことから、外科手術では治癒不能である。放射線療法や化学療法を用いても、その予後は極めて悪く、過去30年間ほとんど改善が見られていない。このような浸潤腫瘍をターゲットに、これまで我々は脳内を自由に遊走し腫瘍に集積する神経幹細胞や間葉系幹細胞をベクターとする自殺遺伝子治療を開発し、その有用性と安全性を検証してきた。いずれの治療においても、大量かつ安全なベクター細胞の調達課題となっていた。近年、脂肪細胞からの間葉系幹細胞への分化研究が進んできている。採取が容易で、自己細胞からの精製も可能なこの細胞をベクターとして用いる研究を行うことを考えた。

3. 研究の方法

(1)脂肪細胞由来間葉系幹細胞の確立

SD rat(300g male)より皮下脂肪細胞を採取した。機械的破碎後、HBSS(+collagenase type II 1mg/ml)に入れ、ミンスした。100 μ m nylon cell strainerにて濾し、細胞を採取した。Adipose-derived stem cell growth medium (Cyagen)にて培養(Mediumは3日毎に交換)し、脂肪由来間葉系幹細胞を作成した。その後、Differentiation assayにて細胞性状を確認した。

(2)ADMSCへherpes simplex virus-thymidine kinase(HSVtk)を導入

精製されたADMSCへHSVtk retrovirus-producing cells (PA317; mouse fibroblast cell line with HSVtk gene)を用いて、tk geneを導入し、脂肪由来間葉系幹細胞 tk(ADMSCtk)を作成した。

(3)in vitro バイスタンダー効果の検証

バイスタンダー効果は、ADMSCtkとC6ラット脳腫瘍細胞とを、GCV存在下に共培養することにより検証した。腫瘍細胞に対する脂肪細胞由来間葉系幹細胞tkの比率を徐々に下げ(1/1~1/128程度)バイスタンダー効果の強さを評価し、これまでに当研究室で蓄積されてきた、HSVtk遺伝子導入神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いた際のバイスタンダー効果と比較検討した。

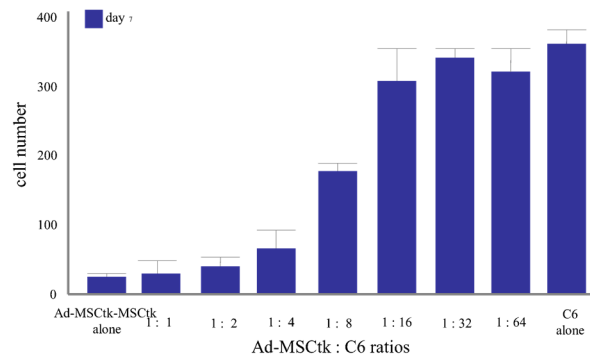
(4)in vitroでのADMSCtk/GCV療法の検証

ラットC6脳腫瘍モデルを作成した。作成1日後にADMSCtkを、脳腫瘍モデルラット作成に使用したC6細胞に対して様々な比率で注入した。翌日より、GCV(15mg/kg、1日2回)腹腔内に投与、一部(n=6)は20日目に脳を取り出し、形成された腫瘍の大きさを検討、一部(n=6)は生存曲線の調査を行った。

4. 研究成果

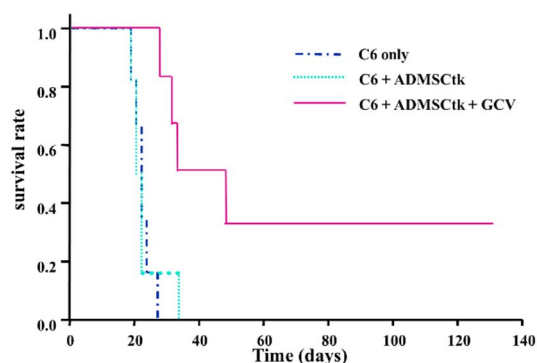
脂肪由来間葉系幹細胞を作成した。作成した細胞は、differentiation assayにより、adipogenic、osteogenic、chondrogenicの各potentialを持つかどうか培養し、染色(Oil red O, Alizarin, safranin等)にて確認した。

In vitroでは、脳腫瘍細胞C6とADMSCtkを様々な比率で共培養し、GCVの投与を行い、bystander効果の発現を観察した。ADMSCtk:C6比が1:8までbystander効果による殺腫瘍効果を確認した



In vivoでは、ラットC6脳腫瘍モデルを作成し、作成1日後にAD-MSCにtk遺伝子を導入した細胞(ADMSCtk)を同数注入し、GCVによる治療を行った。左図のように、生存曲線の延長が見られた。

MSCtkの比率が大きい程、抗腫瘍効果が得られ、C6:ADMSCtkの比率が16:1まで抗腫瘍効果が得られた。



脂肪細胞由来間葉系幹細胞は、tk自殺遺伝子療法のvectorに適していると考えられた。自己から採取可能な細胞がvectorとして使用できることは、他細胞を使用する事と比べ、医療的にも倫理的にも理にかなっており、今後の進展が期待された。安定した分化細胞を多量に作成することができれば、また、治療効果を高める他因子の関与等が解明されれば、治療は更に飛躍的に前進すると思われ、今後の更なる研究が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野慎士
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞を用いた悪性脳腫瘍に対する自殺遺伝子療法
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
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
---------	---------