

令和 4 年 6 月 20 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：19K09523

研究課題名(和文)単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子導入Muse細胞を用いた肺癌脳転移新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for brain metastasis of lung cancer using herpes simplex thymidine kinase bearing Muse cells.

研究代表者

鮫島 哲朗 (Sameshima, Tetsuro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00295213

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)：野生型のHSV-TKをSHEDに導入したところ、thymidineの代謝亢進に伴う細胞毒性が出現したため、thymidineを代謝しにくい変異を導入した。改変したHSV-TKを用いることでSHEDに対してHSV-TK遺伝子を安全に導入できることを証明した。SHED-TKはGCVに対して感受性を持っており、bystander効果による抗腫瘍効果も持っていることを証明した。治療モデルでは共移植モデル同様に腫瘍発光の増大が抑制され、マウスの生存期間が延長した。肺癌脳転移においてもTKを発現したSHEDによる自殺遺伝子治療は有効であることが示された。この内容を各種関連学会、論文として投稿した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌脳転移に対しては手術や定位放射線治療が選択されるが、制御できないこともある。実際、原発巣がコントロールされている転移性脳腫瘍患者の生存期間中央値は19.7ヶ月と報告されており、脳転移巣に特異性があり、全身性の副作用が限定的な新規治療法が望まれる疾患である。幹細胞を用いた自殺遺伝子療法はprodrugを使用して腫瘍特異的に抗腫瘍効果を示す点で安全性が高い。

研究成果の概要(英文)：Wild-type HSV-TK was transfected into SHED, cytotoxicity associated with hypermetabolism of thymidine appeared, so we introduced a mutation that makes it less likely to metabolize thymidine. We demonstrated that the HSV-TK gene can be safely transduced into SHED using the modified HSV-TK, and that SHED-TK is sensitive to GCV and has an anti-tumor effect due to the bystander effect. In the treatment model, the increase in tumor luminescence was suppressed as in the co-transplantation model, and the survival period of mice was prolonged. Suicide gene therapy with TK-expressing SHED was also shown to be effective in lung cancer brain metastases.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：自殺遺伝子療法 歯髄幹細胞 HSV-TK 肺癌脳転移

1. 研究開始当初の背景

申請者らは腫瘍指向性を有する生体組織由来多能性幹細胞の一つである Multilineage differentiating stress-enduring cell (Muse 細胞)を用いた悪性グリオーマに対する自殺遺伝子幹細胞療法の研究開発を行っており、これまでに HSVtk 発現 Muse 細胞 (Muse-tk 細胞)を用い、強力な抗腫瘍効果と腫瘍指向性について明らかにした。また、マウス脳内に移植した Muse-tk 細胞は GCV 投与のより完全に消失することから、安全性も示された。我が国の癌死亡数第 1 位の肺癌は剖検時に約 40%の脳転移がみられ、ADL、QOL の低下に高く寄与している。癌の診断、治療の進歩が進むにつれて、脳以外に広がった癌細胞は徐々に増殖の抑制が可能となってきており生存期間の延長が可能となってきた。一方で、脳には血液脳関門が存在することにより抗癌剤の治療効果が限定的であり、生存期間の延長は逆に脳への転移の機会を与えることとなり、脳転移は転移性脳腫瘍の死因の 30%に及んでいる。特に原発巣のコントロールが良好な脳転移に対する転移巣の制御の重要性が高まってきている。

2. 研究の目的

肺癌脳転移に対しては手術や定位放射線治療が選択されるが、制御できないこともある。実際、原発巣がコントロールされている転移性脳腫瘍患者の生存期間中央値は 19.7 ヶ月と報告されており、脳転移巣に特異性があり、全身性の副作用が限定的な新規治療法が望まれる疾患である。今回、原発巣がコントロールされている転移性脳腫瘍患者の治療を想定し、マウス脳転移モデルに対する Muse-tk 細胞の静脈内投与による自殺遺伝子幹細胞治療の有効性と安全性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

当初、Muse-tk 細胞を使用する予定であったが、間葉系幹細胞の中でも分裂能の高いヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 (Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED) の方が利用価値が高いと考え、SHED を利用して肺がん脳転移に対する自殺遺伝子療法の開発を行う方針とした。本研究では幹細胞を自殺遺伝子の輸送体として利用しているが、臨床応用を考慮した際には幹細胞の入手における倫理的問題、培養の簡便さ、腫瘍化の有無などの問題がある。SHED は脱落乳歯から採取できるため入手においてほとんど侵襲がなく、倫理的問題もほとんどない。また、腫瘍化に関する報告はされていない。

SHED に HSV-TK をレンチウイルスを用いて遺伝子導入し、ガンシクロビル (GCV) 存在下での感受性を比較し、腫瘍細胞と共培養したときの bystander 効果による抗腫瘍効果を viability assay を行い測定した。

SHED-TK を腫瘍細胞の conditioned medium に対する遊走能を matrigel invasion chamber を用いて測定した。

共移植モデルとして、ヌードマウスの脳に luciferase2 発現肺がん細胞株を定位的に移植し、肺がん脳転移モデルを作成した。肺がん細胞と SHED-TK を混合してマウス脳に移植して GCV を投与する群を治療群として、SHED-TK の有無、GCV の有無から 4 群に分けて腫瘍発光の推移および生存期間を比較した。

治療モデルとして、ヌードマウスの脳に luciferase2 発現肺がん細胞株を定位的に移植し、SHED-TK を腫瘍内に定位的に移植して GCV を投与する群を治療群とした。SHED-TK の有無、GCV の有無から 4 群に分けて腫瘍発光の推移および生存期間を比較した。

4. 研究成果

野生型の HSV-TK を SHED に導入したところ、thymidine の代謝亢進に伴う細胞毒性が出現したため、thymidine を代謝しにくい変異を導入した。改変した TK では viability が wild-type と比較して保たれており、また caspase 3/7 の活性も抑制されていたため、改変した TK を用いることで導入時の SHED の細胞死が抑制された。このことから、改変した HSV-TK を用いることで SHED に対して HSV-TK 遺伝子を安全に導入できることを証明した。改変した TK を導入した SHED-TK は LD50 が 1.82 µg/ml であり、これまでの報告と同様の GCV に対する感受性を持っていることがわかった。

抗腫瘍効果に関しては GCV 存在下あるいは非存在下に非小細胞性肺癌細胞株 (H1299 または A549) と共培養し GCV の有無で腫瘍の生存の viability assay を行った。腫瘍に対する SHED-TK の比に応じて抗腫瘍効果が出たことから、SHED-TK は肺癌細胞株に対する bystander 効果による抗腫瘍効果を持っていることを証明した。

また、Matrigel invasion chamber を用いて、肺癌細胞株の conditioned medium に対する SHED-TK の遊走能を評価した。control と比べて H1299 あるいは A549 の細胞株の

conditioned medium に対して有意な遊走を認めた。

マウス脳内での bystander 効果を検証するために共移植モデルにおける腫瘍の抑制効果に関して評価した。ヌードマウスの脳に肺がん細胞株(H1299)および SHED-TK を共移植した。移植後から GCV を 50mg/kg で投与した。治療群では luciferase を用いた生物学的発光の観察では経時的に腫瘍発光が消失し、腫瘍の形成は認めず、マウスは死亡しなかったが、コントロール3群では経時的に腫瘍発光は増大し、マウスは 45 日程度で死亡した。

SHED-TK の腫瘍内投与および GCV 投与による腫瘍増大の抑制効果を観察した。腫瘍をマウス脳内に投与して、5 日目に SHED-TK を定局的に腫瘍内投与した。脳内治療モデルでは共移植モデル同様に腫瘍発光の増大が抑制されたが、観察期間が長くなるにつれて再増大を認めた。コントロールは 50 日程度で死亡したが、治療群では生存中央値が 135 日であり、有意なマウスの生存期間が延長を認めた。

マウス脳内での SHED-TK の遊走能を観察した。肺癌細胞株を脳内に投与し、21 日後に対側に SHED-TK を投与し、7 日後にマウスの脳を取り出し、蛍光顕微鏡で観察した。腫瘍塊の周囲に SHED-TK の蛍光を認め、対側脳への遊走を観察できた。このことから SHED-TK はマウス脳内において腫瘍への遊走能を持っていることが明らかとなった。

SHED は脱落乳歯に由来する幹細胞で分裂速度も速いため扱いやすく、倫理的な背景による制限が高くないことが利点である。SHED に対して野生型の HSV-TK は毒性を示したが、アミノ酸配列を改変することにより、SHED に対して TK を導入するときの毒性を軽減することに成功した。樹立した SHED-TK は GCV に対して感受性を示し、肺癌細胞株に対して bystander effect による抗腫瘍効果および遊走能を示した。モデルマウスにおいても抗腫瘍効果を示し、腫瘍の増殖抑制およびマウスの生存期間の延長を確認した。このことから肺がん脳転移において SHED-TK の腫瘍内投与と GCV 投与を行うことで治療効果を得ることができることを証明した。

この内容を第 39 回日本脳腫瘍学会、第 27 回日本遺伝子細胞治療学会、第 21 回日本分子脳神経外科学会、第 80 回日本脳神経外科学会総会、World Federation of Neuro-Oncology Societies 2022 で発表し、論文として投稿し現在査読中である。

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 1件）

1. 著者名 Tomoya Oishi, Shinichiro Koizumi, Kazuhiko Kurozumi	4. 巻 20;12(2)
2. 論文標題 Molecular Mechanisms and Clinical Challenges of Glioma Invasion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 291
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci12020291.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大石知也
2. 発表標題 非小細胞性肺癌脳転移に対するTk発現脱落乳歯髄幹細胞を用いた自殺遺伝子療法の効果
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石知也
2. 発表標題 非小細胞性肺癌脳転移に対するTK発現脱落乳歯髄幹細胞を用いた自殺遺伝子療法の効果
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石知也
2. 発表標題 Efficacy of the HSV1-TK/GCV suicide gene therapy against brain metastasis of non-small cell lung cancer using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) expressing HSV-TK
3. 学会等名 第27回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石知也
2. 発表標題 非小細胞性肺癌脳転移に対するTK発現脱落乳歯髓幹細胞を用いた自殺遺伝子療法の有効性
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoya Oishi
2. 発表標題 Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) expressing "modified" HSV-TK against brain metastasis of non-small cell lung cancer
3. 学会等名 World Federation of Neuro-Oncology Societies 2022 (国際学会)
4. 発表年 2021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	小泉 慎一郎 (Koizumi Shinichiro) (10456577)	浜松医科大学・医学部附属病院・助教 (13802)	
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)	

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
---------	---------