

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16872

研究課題名(和文) ゲノム編集yCD導入iPS細胞による悪性神経膠腫に対する新規遺伝子細胞療法

研究課題名(英文) Suicide gene therapy for malignant glioma using genome-edited human induced pluripotent stem cells

研究代表者

村瀬 真 (MURASE, Makoto)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30836755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞への遺伝子導入として、レンチウイルスベクターでは、位置効果による自殺遺伝子の不活性化が生じ、自殺遺伝子の恒常的な遺伝子発現を維持すること困難であった。この問題を解決するために、本研究ではまずCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、挿入位置の最適化を行い、ハウスキーピング遺伝子領域にyCD-UPRTを挿入したiPS細胞を作製し、恒常的に安定した遺伝子発現を実現した治療用NSCを作製した。治療用NSCはヒトGSCモデルマウスにおいて顕著な治療効果を生み、また脳切片培養を利用したtimelapse imagingにより、良好な指向・遊走性を示すことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹立した抗腫瘍効果を生む治療用NSCは、5-FUの投与により死滅するため、安全性は高く、その効果が細胞周期依存性であることから、終末分化した神経細胞などからなる正常脳組織には影響しない。また、当然その他の難治性脳腫瘍への応用も可能であり、iPS細胞を再生医療以外の疾患(がん)治療に応用した1st clinical trial modelとなり得る。さらに、本システムはiPS細胞を用いた再生医療において、造腫瘍性の問題を解消する安全装置としても利用できるため、iPS細胞を様々な遺伝子細胞治療に応用するためのプラットフォームにもなる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that human induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived neural stem cells (NSCs) possess the higher tumor-tropic migratory capacity than mesenchymal stem cells. Therefore, we established the concept of suicide gene therapy using iPSCs-derived NSCs as a cellular delivery vehicle for the treatment of malignant glioma. Lentiviral vectors integrated randomly into the host genome, raising concerns about insertional mutagenesis, oncogene activation, and transgene silencing. In order to improve safety and to achieve stable transgene expression, yCD-UPRT was inserted into a housekeeping gene locus in iPSCs using CRISPR/Cas9-mediated genome editing, resulting in a significantly better anti-tumor effect for human glioma and glioma stem xenograft mice than temozolomide (standard chemotherapy). In addition, time-lapse imaging of organotypic brain slice cultures could quantitatively visualize the migration of NSCs and bystander killing of glioma cells and glioma stem cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 自殺遺伝子 iPS細胞 神経幹細胞 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫(グリオーマ)は、原発性脳腫瘍の15~20%を占め、極めて予後不良な悪性腫瘍の一つである。高い造腫瘍能・遊走能を有するグリオーマ幹細胞(glioma stem cell: GSC)の存在が、既存の抗がん剤・放射線治療に対する治療抵抗性の原因と考えられている。したがって、予後改善・根治には、悪性神経膠腫の細胞生物学的特徴を踏まえた治療法の開発が急務である。自殺遺伝子治療とは、プロドラッグを自殺遺伝子により活性化代謝物に変換し、その細胞毒性を利用して標的細胞を殺す治療法であり、広範囲に細胞死を誘導するbystander効果を有する。近年、増殖型レトロウイルスを用いた自殺遺伝子治療の臨床試験が米国で行われ、現在の標準治療よりも優れた治療成績を上げており、bystander効果を発揮する自殺遺伝子治療法が再び注目を浴びている。一方で、広範囲に浸潤するすべての腫瘍細胞をウイルス感染でカバーすることは困難で、なかなか根治に至る例がないことも事実である。

申請者は、自殺遺伝子を搭載したヒトiPS細胞由来神経幹細胞(neural stem cell: NSC)が生体内で腫瘍細胞の浸潤を高い遊走能によりカバーする様子をリアルタイムで撮影することに成功し、NSCを自殺遺伝子産物のcellular vehicleとして用い、bystander効果により広範囲腫瘍細胞死を誘導する方法を兼ねてより検討してきた。NSCとヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSVtk)/ガンシクロビル(GCV)自殺遺伝子システムを組み合わせた遺伝子細胞療法を検討を行い、HSVtkのiPS細胞に対する細胞毒性の問題をTet-inducible systemを用いることで解決し、ヒトグリオーマモデルに対して顕著な効果を確認した。しかしながら、HSVtkがiPS細胞において細胞毒性を有することに懸念が生じた。そこで申請者は、他の自殺遺伝子システムとして、米国で臨床研究が進められている酵母シトシンデアミナーゼ(yCD)とプロドラッグ5-fluorocytosine (5-FC)の組み合わせに着目した。変換される5-fluorouracil (5-FU)は細胞膜を通過できるため、より広範囲な拡散が可能となる。また、uracil phosphoribosyl transferase (UPRT)は5-FUを5-FUMPへ変換するため、細胞死誘導効率が上がると報告されている。申請者はまず、ヒトiPS細胞から分化誘導したNSCにレンチウイルスベクターを用いてyCD-UPRTを導入し、ヒトグリオーマ及びグリオーマ幹細胞モデルマウス(U87及びhG008; Fukaya R. Cancer Res. 2016)において、抗腫瘍効果を評価し、顕著な効果を得ることに成功した。しかし、実際の臨床応用のためには、yCD-UPRTを導入したiPS細胞を樹立し、それをNSCに分化誘導する方法が望ましい。しかし、レンチウイルスベクターによるiPS細胞への遺伝子導入では、位置効果による自殺遺伝子の不活性化により、徐々にgene silencingが起きる傾向にあった。また、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入では、染色体にランダムに挿入されるため、挿入部位の遺伝子変異や周辺遺伝子の活性化が懸念された。

2. 研究の目的

本研究では、上記問題をCRISPR/Cas9ゲノム編集技術により解決し、臨床応用を見据えた優れた治療用NSCを樹立することを目的とする。さらに生体内において、腫瘍細胞に対し適した治療用NSCの細胞数、及びそれに伴いbystander効果が及ぶ範囲を可視化技術を用いた脳切片培養を行うことでリアルタイムに動態解析をする。

3. 研究の方法

まず、レンチウイルスベクターで生じた位置効果による自殺遺伝子の不活性化を克服し、治療用幹細胞の安全性、安定供給を目的として、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、ハウスキーピング遺伝子、およびセーフ・ハーバー領域に、yCD-UPRT融合自殺遺伝子を挿入したiPS細胞を作製する。相同組み換えの確認は、genomic PCRおよび最終的にはgenomic sequencingによって確認する。作製した各iPS細胞からNSCを分化誘導し、最も恒常的な遺伝子発現を達成できるNSCを樹立した後、以下の項目について比較する。

(1) *in vitro*で5-FCの添加による細胞死の誘導効率を比較する。また、Venus蛍光タンパク質とLuc(ルシフェラーゼ)の融合タンパク質(ffLuc)を安定に発現するU87ヒトグリオーマ細胞株またはhG008ヒトGSC株と共培養し、bystander効果による細胞死誘導効率についても比較する。

(2) U87またはhG008を免疫不全マウスの線条体内に定位的に移植したヒトグリオーマモデルマウスにおいて、抗腫瘍効果を比較する。ルシフェラーゼ活性を指標としたBio-luminescence imaging study (IVIS Systemを使用)により腫瘍の増減を経時的・定量的にモニターする。生存解析、病理組織学的解析を行い、抗腫瘍効果と治療の安全性を評価する。

(3) 移植したNSC(hK01でラベリングする)が脳腫瘍に遊走・集積し、bystander効果を及ぼす様子は、(2)に準じてNSCを移植し、その後脳を切片化して培養(slice culture)し、共焦点レーザー顕微鏡下で最長7日間ライブイメージング観察する。

4. 研究成果

iPS細胞への遺伝子導入として、レンチウイルスベクターでは、位置効果による自殺遺伝子の不活性化が生じ、自殺遺伝子の恒常的な遺伝子発現を維持すること困難であった。この問題を解決するために、本研究ではまずCRISPR/Cas9ゲノム編集技術を用いて、挿入位置の最適化を行い、ハウスキーピング遺伝子領域にyCD-UPRTを挿入したiPS細胞を作製し、恒常的に安定した遺伝子発現を実現した治療用NSCを作製した。遺伝子発現はiPS細胞、EB、NSCと持続し、細胞の増殖にも影響を及ぼさなかった。治療用NSCはびまん性浸潤するヒトGSCモデルマウスにおいて

顕著な治療効果を示した。生存曲線はコントロール群に比して延長し、腫瘍体積も顕著な縮小を見せた。また、組織学的解析により脳室周囲神経前駆細胞をはじめ、正常細胞には影響はなかった。さらに、脳切片培養を利用した timelapse imaging により、良好な指向・遊走性を示すこと及び bystander 効果をライブイメージングすることに成功した。本研究は、遺伝子細胞治療とゲノム編集技術を組み合わせた治療概念であり、今後様々な治療方法に応用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------