

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791005

研究課題名（和文） 自殺遺伝子導入幹細胞による悪性グリオーマの治療研究

研究課題名（英文） suicide gene therapy of glioma using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

天野 慎士（AMANO SHINJI）

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：70464138

研究成果の概要（和文）：治療に難渋する悪性脳腫瘍に対しての骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)/ganciclovir(GCV)を用いた自殺遺伝子療法の研究を行った。ラット C6 脳腫瘍細胞に対し、herpes simplex virus-thymidine kinase(HSVtk)を導入した MSC(MSCTk)を用いて治療を試みた。In vitro では、MSCTk:C6 の細胞比率が 1:128 でも抗腫瘍効果を示し、1:32 で完全な腫瘍死滅効果が得られた。培養顕微鏡での観察では、MSCTk が 48 時間以上生存し、bystander 効果が続いていく様子が観察された。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。安全性の確認では、in vitro において neuron および glia の初代培養上にて MSCTk/GCV 治療を行ったが、正常脳細胞に対する影響は見られず、in vivo においては治療ラットの経時的な組織学的検索を行ったが、正常脳細胞に対する影響は認められなかった。MSCTk/GCV 治療は、効果的で安全な治療であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The suicide gene therapy using mesenchymal stem cells (MSC) and ganciclovir (GCV) was researched to the malignant brain tumor that has a hard time in treatment. Treatment was tried by using MSC that introduced herpes simplex virus-thymidine kinase (HSVtk) (MSCTk) for rat C6 brain tumor cell. In vitro, The ratio of cells of MSCTk:C6 showed as many as 1:128 antitumor effects, and an effect of the tumor extinction complete by 1:32 was achieved. In the observation with the culture microscope, MSCTk was observed and the appearance to which it lived for 48 hours or more, and the bystander effect continued was observed. In vivo, in the research that used the rat, the extension of the effect of the tumor reduction and the survivorship curve was confirmed. In the confirmation of safety, in vitro, the influence on the normal brain cell is not seen though MSCTk/GCV was treated on the primary culture of neuron and glia. In vivo, the influence on the normal brain cell was not admitted though the treatment rat was passing time and histology retrieved. It was thought that the MSCTk/GCV treatment was effective and a safe therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：脳腫瘍学

## 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っ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、いかに致命的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た。

ラット脳腫瘍モデルを用いた研究では、腫瘍内への HSVtk 遺伝子導入 NSC (NSCtk) の投与と脳腫瘍と GCV 全身投与により既存の脳腫瘍を消失させることに成功している(Li et al, Cancer Gene Ther 2005)。腫瘍細胞と NSCtk 細胞をさまざまな割合で混合して移植する実験では、NSCtk 細胞が腫瘍細胞の 16 分の 1 の量でも、顕著な bystander 効果により腫瘍の消失が確認された(Li et al, Oncology 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) でも確認されている。MSCtk を effector 細胞とした自殺遺伝子療法の抗腫瘍効果を検証中であるが、現在のところ良好な移動能と bystander 効果が認められている。今後の臨床応用を考えると、倫理的な問題や細胞入手の簡便性等の面からも、この MSCtk を用いた自殺遺伝子療法が現実的であると考えている。

## 2. 研究の目的

脳神経外科領域において、悪性神経膠腫は治療が困難な疾患の一つである。悪性神経膠

腫の治療として遺伝子治療が注目されているが、腫瘍細胞に直接遺伝子導入を行う臨床試験では、期待された効果は得られなかった。神経幹細胞に遺伝子導入を行い、その腫瘍集積性を利用して、bystander 効果にて抗脳腫瘍効果を発現させる動物実験は良好な結果が得られている。今後の臨床応用を考えると、神経幹細胞よりも採取が容易で、より高い腫瘍集積性を持つ骨髄幹細胞を用いる方が現実的と考える。この骨髄幹細胞を用いた遺伝子治療の臨床応用に向けての基礎実験を行うことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) in vitro での MSCtk/GCV 療法の検討

300gSD ラット長幹骨より骨髄細胞を採取、培養し MSC を取り出した。精製された MSC へ HSVtk retrovirus-producing cells (PA317; mouse fibroblast cell line with HSVtk gene) を用いて、tk gene を導入し、MSCtk を作製した。

##### ① in vitro での bystander 効果の検討

作製した MSCtk と C6 細胞を様々な比率 (1:1~1:128) で混在させ、GCV (1 μg/ml) 存在下にて 7 日間培養を行い、その後 7 日間は GCV なしの通常培養を行った。これにより、MSCtk/GCV 療法の効果および、腫瘍を死滅させることができるか検討した。

②培養顕微鏡を用いた bystander 効果の検討  
GFP-SD ラットより GFP-MSCtk を作製。C6 細胞と混在培養させ、GCV を投与。その後の治療効果の様子を培養顕微鏡にてリアルタイムに観察した。

#### (2) in vivo での MSCtk/GCV 療法の検討

300gSD ラット脳内に C6 (50000 個、10 μl) を注入し、脳腫瘍モデルラットを作製。3 日後に同側脳内に MSCtk (50000 個、10 μl) を注入し、その翌日より 7 日間 GCV (15mg/kg、1 日 2 回) を腹腔内投与した。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。

#### (3) MSCtk/GCV 治療の安全性の検討

##### ① in vitro での検討

1 日齢 SD ラット大脳皮質より、neuron および glia の primary culture を作製し、5 日後に PKH26 にて蛍光染色を行った。更にその 2 日後に、GFP-MSCtk および C6 を混在培養させ、GCV (1 μg/ml) を投与した。時系列に各細胞数を確認し、MSCtk/GCV 治療が正常脳細胞にどのような影響をもたらすのか検討した。

##### ② in vitro での検討

300gSD ラットにて C6 脳腫瘍モデルラットを作製。作製 3 日後に、同側脳内に MSCtk を注入、翌日より 1 週間 GCV 投与を行った。GCV 投与後、3 日目、7 日目にラット脳を摘出し、病理標本を作製。H-E、Nissle、TUNEL 染

色を行い、MSCtk/GCV 治療の正常脳への影響を検討した。

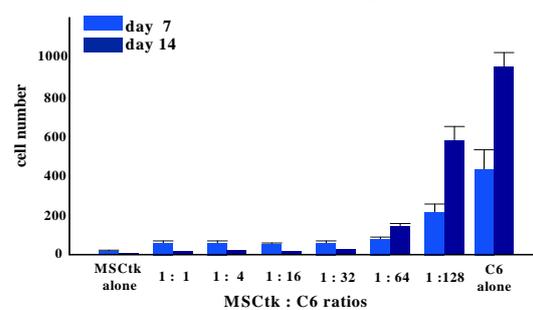
### 4. 研究成果

#### (1) in vitro での MSCtk/GCV 療法の検討

##### ① in vitro での bystander 効果の検討

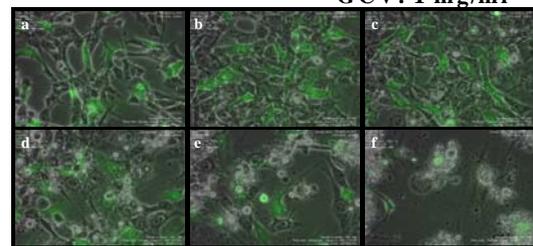
MSCtk:C6 の細胞比率が 1:128 でも腫瘍抑制効果が認められた。1:32 までで、完全な腫瘍死滅効果が得られた。

#### in vitro での bystander 効果の検討



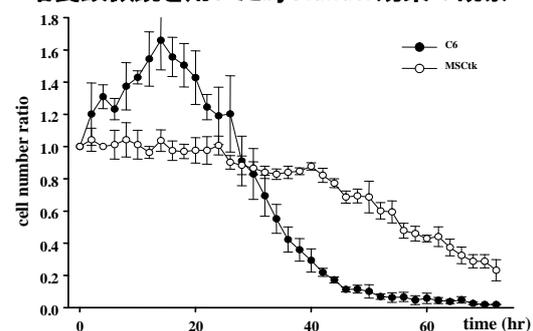
②培養顕微鏡を用いた bystander 効果の検討  
治療開始後すぐは、C6 の増加が認められたが、MSCtk と接触した C6 が次々に死滅していく様子が観察された。MSCtk は GCV 下でも 48 時間以上生存し、周囲の C6 に bystander 効果をもたらし続けていた。

MSCtk:C6 = 1:1  
GCV: 1 mg/ml



a:0, b:12, c:24, d:36, e:48, f:72 hr

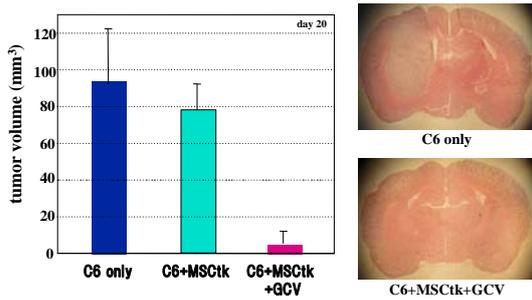
#### 培養顕微鏡を用いた bystander 効果の観察



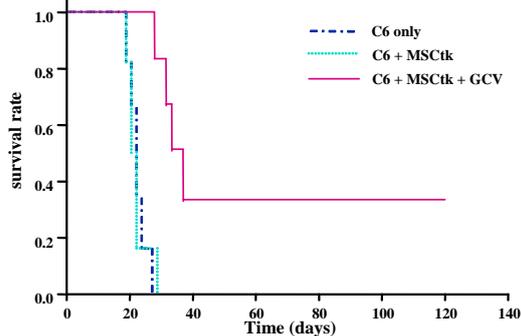
#### (2) in vivo での MSCtk/GCV 療法の検討

MSCtk/GCV 治療群にて有意に脳腫瘍の縮小と、生存曲線の延長が認められた。

### MSCtk-GCV療法の病理学的検討



### MSCtk-GCV療法の生存曲線での検討

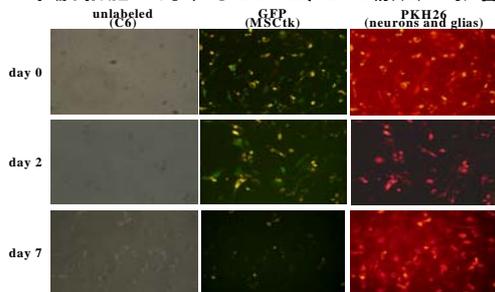


### (3) MSCtk/GCV 治療の安全性の検討

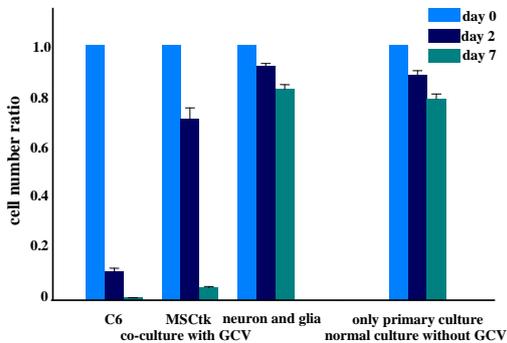
#### ① in vitro での検討

neuron および glia の primary culture 上で MSCtk/GCV 治療を行っても、正常細胞に対する有意な影響は認められなかった。

#### 正常脳細胞に対する MSCtk/GCV 療法の影響



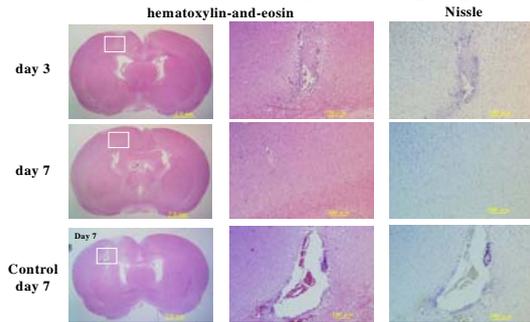
#### 正常脳細胞に対する MSCtk/GCV 療法の影響



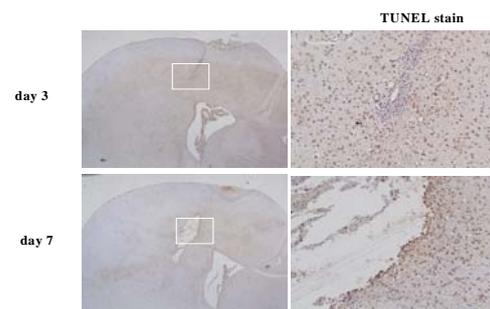
#### ② in vitro での検討

生体内で MSCtk/GCV 治療を行っても、周囲の正常脳組織には明らかな形態学的異常は認められなかった。

### in vivo での MSCtk-GCV 療法の影響の検討



### in vivo での MSCtk-GCV 療法の影響の検討



このように、本研究にて自殺遺伝子導入骨髄間葉系幹細胞を用いた悪性グリオーマに対する治療の効果と安全性が確認でき、臨床的な補助療法として十分効果が期待された。また、今後の臨床応用へのプロトコール作成に重要な基礎実験を行うことができた。

治療困難な悪性神経膠腫の治療の選択肢となり得る研究が進んでいることは、悪性脳腫瘍の治療に難渋している臨床の現場において、希望の光となるものである。臨床実験へと進めば、多大なインパクトを与えるものであると考えられる。

今後は、ヒト細胞を用いた研究や、臨床応用に向けてのプロトコール作成が望まれる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① AMANO SHINJI、NAMBA HIROKI、Use of genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells for glioma gene therapy、INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY、査読有、Vo1 35、2009、1265-1270

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 天野慎士、tk 遺伝子導入骨髄間葉系幹細胞を用いた神経膠腫に対する自殺遺伝子療法の影響について、第 67 回日本脳神経外科学会総会、2008 年 10 月 1 日、盛岡  
 ② 天野慎士、Tumoricidal bystander effect

ct-mediated suicide gene therapy of glioma using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells, Asian society Neuro-Oncology、2009年5月12日、横浜

③天野慎士、Suicide gene therapy of glioma using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜

④天野慎士、骨髄間葉系幹細胞を用いたgliomaに対するtk自殺遺伝子療法、第68回日本脳神経外科学会学術総会、2009年10月15日、東京

⑤天野慎士、骨髄間葉系幹細胞を用いたgliomaに対するtk自殺遺伝子療法、第27回日本脳腫瘍学会、2009年11月8日、大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

天野 慎士 (AMANO SHINJI)  
浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント  
研究者番号：70464138

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし