

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591099

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞由来心筋細胞の腫瘍化克服のための革新的な高純度単離技術の開発

研究課題名(英文) A novel method for identification and isolation of human pluripotent stem cell-derived target cells and elimination of tumorigenic cells.

研究代表者

三井 薫 (Mitsui, Kaoru)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：40324975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍化の完全阻止は、ヒト多能性幹細胞の再生医療の最重要課題の一つである。我々は直接腫瘍化阻止する独自ウイルスベクターの開発を行った。がん治療薬として我々が独自開発した制限増殖型アデノウイルスベクターm-CRAを再生医療に応用し、腫瘍化原因細胞である未分化多能性幹細胞を直接的かつ特異的に標的として殺傷することができることを示した。また異なるアプローチとして、腫瘍化原因細胞の同定と特異的殺傷を可能とするレンチウイルスベクターを開発し、その有効性を確認した。さらに、非増殖型アデノウイルスベクターによる目的分化細胞の同定・単離技術を用い、ヒト多能性幹細胞から誘導した心筋分化細胞の同定・単離に成功した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSC) are promising sources for cell transplantation therapy. However, the risk of formation of tumors represents the most critical obstacle to the safe clinical applications. We developed a novel safety approach that “directly” eliminates tumorigenic cells. We demonstrated that the oncolytic adenoviruses, m-CRAs, were potentially useful as both potent anticancer drugs and as novel antitumorigenic agents in hPSC-based regenerative medicine. We also developed the novel method for a rapid generation of Tumorigenic Cell-targeting Lentiviral Vectors that could systematically identify the best promoter and suicide gene to surely eliminate tumorigenic cells. Further, we demonstrated that adenoviral conditional targeting method, using non-replicating adenoviruses, efficiently isolates viable hPSC cell-derived cardiac lineage cells.

研究分野：再生医学

キーワード：再生医学 ヒトES細胞 ヒトiPS細胞 アデノウイルスベクター 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞、iPS 細胞(以下、ES/iPS 細胞)は、(1)創薬開発(薬物毒性試験)用のヒト細胞、(2)発生・病態の解明のための *in vitro* 実験を可能とする疾患モデル細胞、(3)再生医療の移植用細胞という、革新的な医療・医薬創出の基盤ツールとして期待されている。特に(3)に関しての最重要の克服課題は、①目的細胞の高純度単離、②腫瘍化(奇形種、癌化)の阻止であるが、既存の報告は①に関しては標準化技術がなく、②に関してはリプログラミング法の改良といった「間接的な抑制」の視点とレベルに過ぎない。しかし実際の臨床応用では、iPS 細胞の癌化の問題だけでなく、未分化細胞の残存で生じる奇形種すら致命的であり、多能性幹細胞を使用した再生医療(細胞移植治療)においても、腫瘍化原因細胞の混在を「減らす」という従来の戦略に加え、これらを「直接」「安全(特異的に)」殺傷・除去する新戦略技術の開発は必須であると言える。(1)(2)の目的においても、目的の細胞以外が混在している既存レベルでは、(1)毒性薬効試験も信頼性が乏しく、(2)発生機構や病態の解明の実験系においても信頼性や精度が低下する。つまり①②の克服の標準化技術の開発は、これまでボトルネックであった領域で、全応用のための最重要の課題であった。

2. 研究の目的

ヒト ES/iPS 細胞は、創薬、発生・病態解明、再生医療の基盤ツールとして期待されているが、「①目的細胞の高純度単離、②腫瘍化阻止、の標準化技術がない」ことが、全応用での最大の克服課題であった。申請者らはこれまでの研究を進展させ、①目的細胞の高純度単離については、ヒト ES/iPS 細胞での目的細胞の高純度単離法の開発と、心筋系統細胞をモデルとした高純度単離と、細胞機能解析を行う。また申請者らが独自開発したがん治療薬ウイルスベクターの再生医療への応用、腫瘍化原因細胞を同定するための網羅的解析システムを備えた新たな

ウイルスベクターの開発により、②腫瘍化阻止の標準化技術を開発する。そして、創薬、発生・病態解明、再生医療への多能性細胞応用における根幹共通の基盤技術として確立することを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍化原因細胞の除去方法の確立

①申請者らが独自開発し、革新的がん治療薬として実用化を目指している、増殖制限型アデノウイルスベクター **Conditionally Replicating Adenovirus regulated with multiple tumor-specific factors (m-CRA)** 技術を応用し、多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞を特異的に除去する新技術の開発を行った。

②未分化/分化細胞を同定する際、経時的に観察するには、レンチウイルスベクターによる遺伝子発現カセットの染色体への導入が適していること、腫瘍化原因細胞(未分化細胞、がん化細胞)を同定・標的殺傷するためには、腫瘍化原因細胞を定義する遺伝子の探索が重要であると考えた。そこで、①とは異なるアプローチとして、腫瘍化原因細胞を同定するための網羅的解析システムを備えた、腫瘍化原因細胞の同定と特異的殺傷を可能とするレンチウイルスベクター **Tumorigenic Cell-targeting Lentiviral Vectors (TC-LVs)** を開発し、これによる腫瘍化原因細胞の除去方法の確立を行った。

(2) 目的分化細胞(心筋系統細胞)の同定・単離技術の確立

申請者らが開発し、マウス ES 細胞未分化ならびに成熟心筋細胞の単離成功で実証した「目的細胞を簡単・確実に同定・単離する標準化技術(Adenoviral Conditional Targeting method in Stem Cells; ACT-SC 法)」(*Mol Ther.* 2006; 国内特許成立)をヒト多能性幹細胞へ応用し、分化させた心筋系統細胞の同定・単離方法を確立する。さらに、異なる発生段階にある細胞が分取できているかを遺伝子発現や形態学的アプローチ

で評価する。

(3) 目的分化細胞(心筋系統細胞)の機能検証 と臨床応用に向けた有効性検証

単離・同定した心筋細胞について、遺伝子発現について解析し、機能評価を行う。

4. 研究成果

(1) 腫瘍化原因細胞の除去方法の確立

①m-CRA による腫瘍化原因細胞の除去

申請者らは、これまでにがん細胞に対する高い治療効果と安全性を向上させるため、アデノウイルスの増殖に必須な遺伝子である E1A, E1B それぞれの発現制御に、異なるプロモーターを用いて増殖を制御する m-CRA を作製する標準的技術を確立した(*Gene Ther.* 2005、日米欧特許取得)。この技術を用いて作製した m-CRA の中で、がん治療において、特に治療効果と安全性が優れていたのが、正常細胞ではほとんど発現せず、がん特異的に高発現している *Survivin* 遺伝子プロモーターを E1A の発現制御に用いた、*Survivin* 反応性 m-CRA (Surv.m-CRA) であった(*Gene Ther.* 2005, *Cancer Gene Ther* 2011)。さらに、従来の抗がん剤や放射線治療が効果を示さない「がん幹細胞」においては、より治療効果が増強するなど、Surv.m-CRA は革新的ながん治療薬として開発と実用化が期待されている。そこで、この m-CRA を再生医療へ応用し、多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞(未分化細胞、がん化細胞)を特異的に除去する新技術の開発を行った。がん細胞以外の正常細胞では *Survivin* の発現は明確な報告がなかったため、まず遺伝子発現と m-CRA で用いているプロモーターの活性を測定した。がん細胞や多能性幹細胞で発現が確認されているテロメラーゼ主要構成因子である *Tert* (*telomerase reverse transcriptase*; テロメア逆転写酵素) 遺伝子と併せて測定したところ、両遺伝子とも未分化状態特異的に極めて高値を示し、さらに *Survivin* プロモーターは *Tert* プロモ

ーターよりも高い活性を持っていることを明らかにした。*Survivin* および *Tert* プロモーターが未分化細胞特異的に高レベルな活性状態にあったので、未分化ヒト多能性幹細胞に Surv.m-CRA および Tert.m-CRA を感染させたところ、両 m-CRA ともにウイルスの盛んな増殖による強力な細胞殺傷効果を示した。一方で、ヒト多能性幹細胞由来の分化細胞あるいは正常分化細胞(HDF)では、m-CRA は感染するが、ウイルスの増殖及び殺傷効果はほとんど無いことを示した。さらに、多能性幹細胞と正常分化細胞とを共培養した系において、m-CRA 感染の効果を詳細に検討したところ、m-CRA は正常分化細胞を傷害することなく、未分化多能性幹細胞を特異的に殺傷した。特に Surv.m-CRA は、Tert.m-CRA より強い殺傷効果を示しており、がん細胞にだけでなく、正常未分化細胞においても、治療効果と特異性(安全性)の両面とも優れていることを明らかにした。

マウスを用いた *in vivo* 移植実験を行った結果、m-CRA を感染させたヒト ES 細胞を移植した免疫不全マウスでは、コントロール群で発生した三胚葉性の奇形腫は形成されず、完全に阻止することができた。つまり m-CRA 感染群の奇形腫形成阻止は、m-CRA による未分化細胞(腫瘍化原因細胞)特異的な殺傷効果によるものであると示唆できる。

これらのことから、革新的ながん治療薬の技術として申請者らが開発した m-CRA 技術、中でも Surv.m-CRA は、がん細胞のみならず、分化細胞中に残存する腫瘍化原因細胞である多能性幹細胞を直接的にかつ特異的に標的として殺傷することができることを明らかにし、m-CRA による全く新たな「多能性幹細胞の直接的腫瘍化阻止技術」を開発することに成功した(*Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2015)。

腫瘍化原因細胞内でのみ増殖し、細胞を殺傷する遺伝子組換えウイルス技術を用いた「多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞の除去技術」は、世界初の報告であり、科学的な独創性・先駆性

が高い。今後、m-CRA に搭載する治療遺伝子を検討することで、腫瘍化原因細胞への殺傷性や、特異性の向上を検討していく予定である。

② TC-LVs の開発と腫瘍化原因細胞の除去

腫瘍化原因細胞を定義する遺伝子の探索を行うため、腫瘍化原因細胞で特異的かつ強力に活性化するプロモーターの網羅的解析・同定可能なベクターである TC-LVs の開発を行った。まず、さまざまなプロモーター配列を簡単に組換え、候補となる腫瘍化原因細胞特異的プロモーターを持つベクターを迅速・効率的に作製することが可能となるよう、プロモーター部位にリコンビネーションシステムを導入した。さらに、腫瘍化原因細胞の同定(可視化)のための蛍光タンパク質と、殺傷のための薬剤感受性自殺遺伝子が 2A 配列を介して 1 つの遺伝子カセットとしてベクターに挿入し、1 つのプロモーターの制御下でこの二つの遺伝子を同時に発現することができるよう設計し、腫瘍化原因細胞で蛍光タンパク質と薬剤感受性自殺遺伝子とを発現し、薬剤投与により殺傷されるようにした。構築した基本 TC-LVs の機能検証を行うため、恒常的または未分化細胞特異的なプロモーターをそれぞれ挿入した TC-LVs を作製し、レンチウイルスベクターの産生を行い、ヒト多能性幹細胞へ感染させた安定発現株を樹立した。これらの細胞について機能検証を行ったところ、未分化なヒト多能性幹細胞では、恒常的、未分化細胞特異的プロモーターともに、蛍光タンパク質の発現が確認された。さらに、自殺遺伝子が応答する薬剤投与により、濃度依存的かつ未分化状態特異的な殺傷効果が得た。このようにヒト多能性幹細胞における TC-LVs の有用性を確認できたので、本システムを用いてプロモーターの網羅的解析・同定を行い、最適な腫瘍化原因細胞特異的プロモーターを決定していく予定である。

(2) 目的分化細胞(心筋系統細胞)の同定・単離技術の確立

まず、多能性幹細胞からの心筋細胞の分化方法について、検討を行った。胚様体から心筋分化誘導する従来の方法をベースに、心筋分化に必要な転写因子などを導入することにより、分化効率の上昇を試みたが、分化効率の大幅な向上は見られなかった。そこで、既報の論文を参考に、単層培養と低分子化合物添加による心筋誘導法(単層分化法)を試みたところ、分化誘導効率の大幅な上昇を得ることができた。そこで、単層分化法により分化させたヒト多能性幹細胞に、ACT-SC 法の二種類のベクターを感染させ、心筋特異的プロモーターにより心筋分化細胞の可視化を試みたところ、拍動心筋細胞での EGFP の発現を確認できた。さらに、複数の心筋特異的プロモーターでの可視化が可能であることも確認できた。

(3) 目的分化細胞(心筋系統細胞)の機能検証と臨床応用に向けた有効性検証

(2)の結果から、ACT-SC 法により分化段階に応じた心筋分化細胞の可視化が可能であることが確認できたので、ACT-SC 法の二種類のベクターを感染させた分化誘導初期(分化 5 日目)と後期(分化 21 日目)の心筋分化細胞をセルソーターで分取した。得られた細胞と未分化細胞とを用いて遺伝子の発現比較解析を行い、遺伝子発現と細胞分化との関係性について、検討を進めているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- ① 三井薫、小賤健一郎 (2016) iPS 細胞培養からがん化の恐れのある細胞を死滅させる方法. *PHARMSTAGE* 査読無 15 (12) 10-15
- ② 三井薫、小賤健一郎 (2016) 多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞をがん特異的制限増殖型アデノウイルスにより特異的に除去する新

技術. *BIO INDUSTRY* 査読無 33 (2)
11-18

- ③ Mitsui K, Ide K, Takayama A, Wada T, Irie R, Kosai K (2015) Conditionally replicating adenovirus prevents pluripotent stem cell-derived teratoma by specifically eliminating undifferentiated cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 査読有 2:15026 doi:10.1038/mtm.2015.26
- ④ Tanoue K, Wang Y, Ikeda M, Mitsui K, Irie R, Setoguchi T, Komiya S, Natsugoe S, Kosai K (2014) Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Transl Med.* 査読有 12, 27. doi: 10.1186/1479-5876-12-27

[学会発表] (計 22 件)

【シンポジウム (国内学会)】

三井薫、井手佳菜子、小賤健一郎

S22 革新技術が切り開く発生・再生医学研究の最前線「ヒト ES/iPS 細胞における再生医療の課題を克服する独自ウイルスベクターの開発」

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、平成 28 年 3 月 28 日～30 日、ビックパレットふくしま (福島県郡山市)

【招待講演(国内)】

三井薫 「再生医療のこれまでとこれから」 第 69 回プラセンタ療法研究会、平成 26 年 11 月 15 日、城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)

【一般演題 (国際学会) 計 2 件】

Kanako Ide, Kaoru Mitsui, and Ken-ichiro Kosai
An Efficient Construction of Lentiviral Vectors That Identify and Eliminate Tumorigenic Cells in Pluripotent Stem Cells (Poster presentation)
The American Society of Gene & Cell Therapy

(ASGCT) 19th Annual Meeting [MAY, 2016.
WASHINGTON, DC, USA]

Kaoru Mitsui, Kanako Ide, and Ken-ichiro Kosai
A Novel Method using Conditionally Replicating Adenovirus for Specifically Killing Tumorigenic Cells Derived from Pluripotent Stem Cells. (Poster presentation) The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016 Annual Meeting [JUNE 2016, San Francisco, USA]

【一般演題 (国内学会) 18件】

① 三井薫、井手佳菜子、小賤健一郎

「独自開発の増殖制御型アデノウイルスベクターによる ES/iPS 細胞の腫瘍化細胞治療技術の発展」 第 15 回日本再生医療学会総会、平成 28 年 3 月 17 日～19 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

② Kaoru Mitsui, Kanako Ide, Ken-ichiro Kosai

「癌特異的増殖制御型アデノウイルス m-CRA による腫瘍化多能性幹細胞の殺傷効果」 第 74 回日本癌学会学術総会、平成 27 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

③ Kaoru Mitsui, Kanako Ide, Akiko Takahama, Tadahisa Wada, Rie Irie, Yuqing Wang, Ken-ichiro Kosai 「Conditionally replicating adenovirus kills tumorigenic pluripotent stem cells.」 第 21 回日本遺伝子治療学会総会 平成 27 年 7 月 24 日～26 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

④ 三井薫、井手佳菜子、高山明子、和田忠久、小賤健一郎 「独自開発の増殖制御型アデノウイルスベクターによる新たな ES/iPS 細胞の腫瘍化細胞治療技術の開発」 第 14 回日本再生医療学会総会、平成 27 年 3 月 19 日～21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑤ 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎「アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への高効率遺伝子導入技術の開発」第13回日本再生医療学会総会、平成26年3月4日～3月6日、国立京都国際会館（京都府京都市）

⑥ 三井薫、井手佳菜子、高山明子、小賤健一郎「増殖型アデノウイルスベクターを用いた安全なヒトES/iPS細胞治療の開発」第11回日本再生医療学会総会、平成24年6月12日～14日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称:幹細胞における腫瘍化原因細胞の
新たな標識法と治療法

発明者:小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2014-004262

出願年月日:2015年1月14日

国内外の別:国際

出願年月日:2014年1月14日

国内外の別:国内

名称:ヒトES/iPS細胞における遺伝子発現方法

発明者:小賤健一郎、三井薫、高橋知之

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2012-117128

出願年月日:2012年5月23日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三井 薫(MITSUI Kaoru)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号:40324975

(2)研究分担者

小賤 健一郎(KOSAI Ken-ichiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号:90258418

(3)連携研究者

入江 理恵(IRIE Rie)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号:90381178

伊地知 暢広(IJICHI Nobuhiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号:80380624