

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462252

研究課題名(和文)自殺遺伝子導入iPS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 for malignant glioma using induced pluripotent stem cells

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマに対する、人工多能性幹細胞(iPS細胞)をベクターとする自殺遺伝子療法の研究を行った。マウスiPS細胞は、多種のグリオーマ細胞に集積性を示したが、腫瘍細胞とのbystander効果では、細胞分裂の速さやcolony形成により細胞接触が阻害され思うような効果は得られなかった。マウスiPS細胞をmesenchymal stem cell(MSC)に分化させたところ、良好な抗腫瘍効果が認められた。また、colony形成に参与しているMELK遺伝子をSiomycinAにて抑制したが、効果に差はなかった。MELK遺伝子抑制はcancer stem cellに対して効果の増強が見られた。

研究成果の概要(英文)：Suicide gene therapy for malignant glioma using induced pluripotent stem cells(iPS cells) was studied. Mouse iPS cells indicated accumulation in a various glioma cell lines. The bystander effect with the glioma cells didn't give us the good effect, because cell contact is obstructed by speed of the iPS cell division and the colony formation. When I made a mouse iPS cell differentiate into mesenchymal stem cell (MSC), and it was considered, good anti-tumor effect was admitted. The MELK gene which participates in colony formation was restrained in SiomycinA, but the effect was impartial. MELK genetic restraint could see reinforcement of the effect to cancer stem cell.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：自殺遺伝子療法 iPS細胞 bystander効果 mesenchymal stem cell

1. 研究開始当初の背景

全脳腫瘍の約 1/3 を占める神経膠腫においては、腫瘍が脳内を浸潤性に発育するにもかかわらず、脳の広範摘出術ができないため、基本的に手術療法は常に非治療手術となる。残存腫瘍に対しては放射線療法や抗がん剤が用いられるが、一定の効果はあるものの不十分であり、最も悪性の膠芽腫では生存中間値は一年程度にすぎない。再発の多くは腫瘍断端に残存した腫瘍細胞からおこる局所再発である。したがって腫瘍の切除断端およびその近傍の残存腫瘍細胞に対し有効な治療が行われれば、予後は飛躍的に改善する可能性がある。このような発想で悪性神経膠腫に対して遺伝子治療の研究が進められてきた。レトロウイルスベクターを用いて単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子を腫瘍細胞へ導入させ、prodrug であるガンシクロビル(GCV)を全身投与する方法が用いられ、「自殺遺伝子療法」と呼ばれた。癌の遺伝子治療においては、すべての癌細胞に遺伝子が導入されなければ理論的には治療にはつながらないと考えられるが、HSVtk/GCV システムにおいては、遺伝子導入効率が高々10%程度でも、周囲の腫瘍細胞がすべて消えてしまう現象が確認されている(バイスタンダー効果)。このような背景にて米国において悪性グリオーマに対する臨床試験が行われたが、当初のプロトコルであった HSVtk レトロウイルス産生線維芽細胞を腫瘍内に注入する方法では、思ったような臨床効果が得られないことがわかった(Ram Z, Nature Medicine, 1997)。ヒトの脳はラットなどの実験動物に比較して大きく、グリオーマ細胞は治療当初よりかなり広範な脳領域まで浸潤しているため、レトロウイルスベクターでは治療範囲に制限があることが原因の一つと考えられている。

がん治療には極めて好都合なバイスタンダー効果という現象があることから、われわれはベクターに関する問題点を解決し、神経膠腫に対する新たな HSVtk/GCV 遺伝子治療戦略の開発を目指してきた。中枢神経腫瘍であることから、ベクター細胞としてまずは HSVtk 遺伝子を導入した神経幹細胞(TK 神経幹細胞)を利用した。もとより神経幹細胞は損傷された脳組織を修復するための細胞であるため、予想をはるかに超える遊走能と腫瘍細胞に対するきわめて高い集積性があることが判明した(Li, Namba, et al, Cancer Lett 2007)。さらに TK 神経幹細胞と神経膠腫細胞の間には、極めて強力なバイスタンダー効果があり、既存のラット脳腫瘍モデルを TK 神経幹細胞の腫瘍内注入と GCV の全身投与により治療させることに成功している(Li, Namba, et al, Cancer Gene Ther 2005)。

2006-2009 年の研究では、実際の臨床応用を考慮し、成人(患者自身)から十分な量のベクター細胞を得るために、骨髄より比較的

容易に採取できる間葉系幹細胞を用いる研究を進めてきた。HSVtk 遺伝子導入間葉系幹細胞(TK 間葉系幹細胞)には TK 神経幹細胞とほぼ同等のバイスタンダー効果と腫瘍指向性があり、代用可能であることが示唆された(Amano, Namba, et al, Int J Oncol, 2009)。またバイスタンダー効果の発現が背景にある正常神経細胞を損傷しないことも証明している(Amano, Namba, et al, Cancer Lett, 2011)。

このように「TK 神経幹細胞療法」や「TK 間葉系幹細胞療法」は致命的疾患である悪性グリオーマに対するきわめて有効な遺伝子/細胞療法と考えられ、またこれらの細胞がそもそもは非致命的な神経再生療法などに用いることを目的とした細胞であることより、細胞の安全性は担保されており、臨床応用は可能と思われる。つまり「TK 幹細胞療法」自体はすでに実験的には完成しており、どのような「幹細胞」を臨床用ベクター細胞として選択するかが問題である。2007 年に京都大学から発表された「皮膚細胞から得られた iPS 細胞」は私たちの一連の研究にもインパクトを与えた。皮膚から採取できるという簡便性と安定した細胞の性質は「HSVtk 遺伝子導入 iPS (iPS_{tk}) 細胞療法」への新たな展開を期待させるものである。

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、外科手術では治療不能である。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、これまでわれわれ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。人工多能性幹細胞(iPS 細胞)は患者本人からの作成が可能で多能性幹細胞であり、再生医療領域のみならず本研究のベクターとしても臨床応用に適していると考えられ、本研究ではその開発を目的としている。

3. 研究の方法

本研究の目的は、すでにわれわれが進めてきている HSVtk/GCV 遺伝子治療の臨床応用に適した新たなベクター細胞の開発にある。われわれは 10 年以上前から、腫瘍細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞などをベクター細胞として検証し、抗腫瘍効果、安全性、そして利便性を追及してきた。今回はさらに利便性がよいと思われる iPS 細胞が利用可能かどうかを検証する。HSVtk/GCV 遺伝子導入細胞療法としては「バイスタンダー効果」と「腫瘍に向けての遊走能」が効果発現の鍵になるため、iPS 細胞の利便性に効果が伴うかどうかを以前用いた細胞と比較する。

HSVtk 導入 iPS (iPS_{tk}) 細胞の確立と in

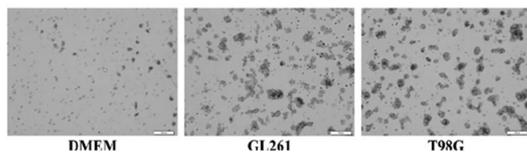
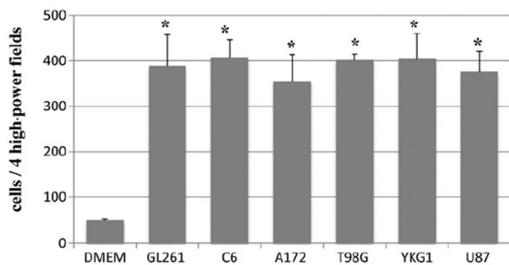
in vitro バイスタンダー効果の検証として、バイスタンダー効果は、iPStk 細胞と遺伝子が導入されていない腫瘍細胞と GCV 存在下に共培養することにより検証する。現在用いている iPStk 細胞がマウス由来のものであることから、GL261 (マウス神経膠腫細胞株)、C6 および 9L (ラット神経膠腫細胞株)などで検討する。腫瘍細胞に対する iPStk 細胞の比率を徐々に下げ (1/1 ~ 1/128 程度) バイスタンダー効果の強さを評価し、これまでに当研究室で蓄積されてきた、HSVtk 遺伝子導入神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いた際のバイスタンダー効果と比較検討する。

ラット (C6 神経膠腫細胞) およびマウス (C57BL/6) を用い、脳腫瘍モデルを作成する。ラットおよびマウス脳腫瘍モデルを作成する際に、iPStk 細胞を種々の割合で混ぜて移植し、GCV を全身投与する。例えば腫瘍 1×10^5 に対し iPStk 細胞 1×10^5 を混合すれば、TK 細胞の比率は 50% となる (50%TK)。TK 細胞の比率を 50%TK, 25%TK, 10%TK, 5%TK などとし、どこまでバイスタンダー効果を通して腫瘍を消失させることが出来るかを観察することによりバイスタンダー効果の強さがわかる。

治療効果が十分に実証されれば、次いで動物実験に入る。効果が十分得られなかった場合は、効果があがらなかった原因を調査し、より効果をあげるための手法を検討する。

4. 研究成果

iPS は、GL261、C6、A172、T98G、YKG1、U87 等のヒト、マウス、ラット脳腫瘍細胞に高い集積性を示した。



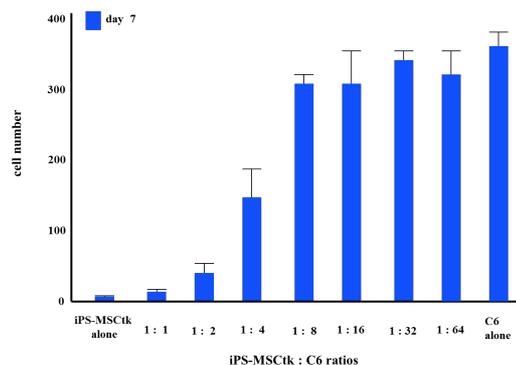
次いで、iPS-tk を作成し、iPS をベクターとした自殺遺伝子療法の検討を行った。しかし、ある程度の効果を示すものの NSC や MSC 程の効果はあがらなかった。その理由として、iPS 細胞が増殖する際にコロニーを形成し腫瘍への遊走が阻害され、その結果細胞接触が制限され bystander 効果が低下することが考えられた。そこで我々は、iPS 細胞を MSC に分化させ治療に用いる方法を考えた。

マウス iPS-venus-tk を分化誘導培地にて 3 週間培養し、MSC like cell に分化させた。骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化や表面

抗原を調査し、MSC 類似の細胞であることを確認した。iPS 細胞より分化させた MSC-venus-tk 細胞とマウス神経膠細胞 GL を様々な比率にて混在培養させ、GCV 存在下と非存在下での腫瘍細胞の生存数を調査した。結果としては、骨髄細胞より直に採取した MSC と比べると効果は低下するが、iPS-MSC-tk : GL = 1 : 4 程度の比率まで抗腫瘍効果が明らかに認められた。

iPS-MSC を用いての治療は、MSC を用いての治療と比べ効果が低下するが、iPS-MSC が安

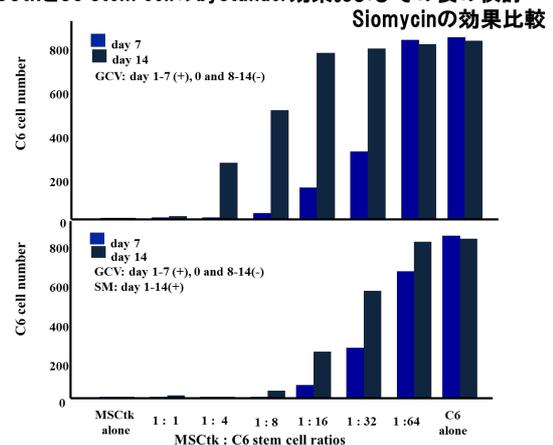
IPS-MSCtkとC6の比率を変えてのbystander効果の検討



定的でないか、ヘテロな細胞集団であった可能性があった。

また、バイスタンダー効果をより良くする方法として、腫瘍細胞に発現している、腫瘍細胞の自己修復等に関与し、治療抵抗性の要因となっているとされる maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) 遺伝子に注目した。ラット脳腫瘍細胞 C6 の幹細胞に対し、MELK 遺伝子阻害作用があるシオマイシン A (SM) を添加し、MSCtk を用いたバイスタンダー効果を検討した。

MSCtkとC6 stem cellのbystander効果およびその後の検討



MELK の抑制は効果があるものと考えられ、tk 自殺遺伝子療法を含めた他の治療との併用にて更なる効果を挙げられる可能性があると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Tomohiro Yamazaki, Amano Shinji, H. Namba et al; Suicide genetherapy for glioma using multilineage-differentiating stress enduring(MUSE) cells; Neuro-Oncology 16:v94-v94, November 2014

Tomohiro Yamazoe, Amano Shinji, H. Namba et al; Potent tumor tropism of induced pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells in the mouse intracerebral glioma model; International Journal of Oncology 46(1), October 2014

Tomohiro Yamasaki, Shinji Amano, H. Namba et al; Generation of genetically engineered induced pluri@potent stem cell-derived neural stem cells without using viral vectors ; Neuro-Oncology, September, 2014

〔学会発表〕(計2件)

天野慎士 「iPSより分化させたMSCをベクターとして用いたtk自殺遺伝子療法の検討」第72回日本脳神経外科総会 2013/10/13-16 横浜

天野慎士 「神経膠芽腫幹細胞に対するtk遺伝子療法の効果 MELK 遺伝子との関連について」第73回日本脳神経外科総会 2014/10/9-11 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

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・特任研究員

研究者番号：70464138

(2)研究分担者

難波宏樹 (Namba, Hiroki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：60198405