

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10861

研究課題名(和文) HSVtk遺伝子導入Muse細胞を用いた膠芽腫治療戦略と生体モニタリングの開発

研究課題名(英文) Treatment strategy using Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells transduced with HSVtk gene monitored by in vivo Positron Emission Tomography imaging in mouse glioma models

研究代表者

山崎 友裕 (Yamasaki, Tomohiro)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：40781050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマの予後改善を目指し、腫瘍指向性を有する Multilineage-differentiating stress-enduring cell (Muse細胞)を用いた自殺遺伝子幹細胞療法の開発を行ってきた。これまでにHSVtk遺伝子導入Muse細胞(Muse-tk細胞)を用いたin vitro、in vivoの強力な抗腫瘍効果と腫瘍指向性について明らかにした。今回、臨床応用の際に必須となるMuse-tk細胞の生体モニタリング法を確立、患者由来悪性グリオーマ細胞株における本治療の有効性の検証、正常脳に対する本治療の毒性について検証を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

enzyme/prodrugシステムを用いた幹細胞療法は幹細胞が腫瘍組織に遊走する。腫瘍部位特異的に無毒なプロドラッグを細胞障害性物質に変換し抗腫瘍効果を発現するため全身性の副作用が少ない。このため、副作用にて用量が制限される化学療法に代わる抗がん療法として期待される。また、Muse細胞を使用した遺伝子産物のデリバリーシステムを確立できれば他の遺伝子治療研究にも応用でき、本研究は多大な波及効果を提供できると考えられる。さらにHSVtk/GCVシステムを使用した本療法は転移性乳癌や前立腺癌等、他の癌治療への応用も検証されておりがん治療のbreakthroughとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have been developing suicide gene-stem cell therapy using multilineage-differentiating stress-enduring cells (Muse cells) to improve the prognosis of malignant gliomas. We have demonstrated the potent in vitro and in vivo antineoplastic effect and the migration capacity of Muse cells with the thymidine kinase of herpes simplex virus (Muse-tk cells). In this study, we will (1) establish in vivo monitoring methods for Muse-tk cells, which is essential for clinical application, (2) verify the efficacy of this therapy in a patient-derived malignant glioma cell line, and (3) examine the toxicity of this therapy in normal brain tissues.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：Muse細胞 遺伝子細胞治療 単純ヘルペスチミジンキナーゼ ガンシクロビル 生体モニタリング

1. 研究開始当初の背景

<悪性グリオーマ>全脳腫瘍の約 1/4 を占めるグリオーマは脳内を浸潤性に発育するため手術療法は大半が非治療手術となる。残存腫瘍に対しては放射線療法や化学療法が行われるが効果は限定的であり、最も悪性の膠芽腫では生存期間中央値は2年に満たない。一方、グリオーマの再発の多くは腫瘍断端におこる局所再発である。したがって腫瘍の切除断端周辺に浸潤した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。<HSVtk/GCV システムによる自殺遺伝子幹細胞療法(TK 幹細胞療法)>

この難治な悪性グリオーマに対し、我々は HSVtk/GCV システムを用いた自殺遺伝子幹細胞療法(TK 幹細胞療法)の研究開発を行ってきた。本法の機序で

あるが、腫瘍指向性を有する幹細胞に HSVtk 遺伝子を導入した治療細胞(HSVtk 発現幹細胞, Fig.1)を腫瘍内に移植し、そこにプロドラッグである GCV を全身投与すると治療細胞内で GCV のリン酸化が始まる。治療細胞は腫瘍細胞に向かって遊走し、接着するとギャップジャンクションを介して無毒な一リン酸化 GCV のみが腫瘍細胞に移行し、腫瘍細胞内でさらにリン酸化が進み毒性の三リン酸化 GCV に変化。DNA ポリメラーゼ阻害によるアポトーシスが誘導される。この際、周囲の腫瘍細胞に同様のことが起こるため1つの治療細胞で多数の腫瘍細胞をアポトーシスすることができる。これがバースタンダー効果と呼ばれる現象でバースタンダー効果の程度が本治療の有効性を左右する。

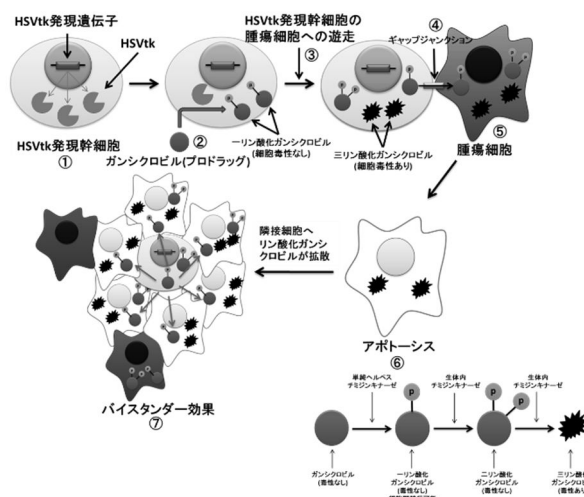


Fig.1 : HSVtk/GCV システムによる遺伝子幹細胞療法

< Muse- tk 幹細胞療法 >

われわれはこれまで本治療法開発の過程で、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(Li et al, stem cell research, 2011)、ラット骨髄由来間葉系幹細胞(Amano et al, Int J Oncol, 2009)、ラット神経幹細胞(Li et al, Cancer Gene Ther 2005)、マウス iPS 細胞(Yamazoe et al, Int J Oncology, 2014)、ヒト Muse 細胞(未発表)等様々な幹細胞の遊走能とバースタンダー効果について検証し、良好な結果を示してきた。その中で Muse 細胞は体内に自然に存在する多能性幹細胞であり腫瘍化の危険性が極めて低く、また市販の間葉系培養細胞からも採取でき線維芽細胞と同程度の自己複製能を有するため、細胞の分離・培養が容易であり、臨床応用実現可能性の高い幹細胞である。

< Muse- tk 幹細胞療法の有効性 >

本治療法の有効性はバースタンダー効果の程度と腫瘍組織へ遊走能(腫瘍指向性)の程度に依存しており、現在までに in vitro、in vivo の検証が終了している。Fig.2 は Muse-tk 細胞とルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒトグリオーマ細胞株(U87-luc2)を各割合で混合し、マウス脳内に移植後、GCV または PBS を腹腔内投与した実験で、Muse-tk 細胞は GCV 投与下で 10 倍以上の数の U87-luc2 の増殖を抑制できる強力なバースタンダー効果があることを示した。Fig.3 は腫瘍移植脳と対側の脳に Muse-tk 細胞を移植すると(), 脳梁を介して()対側脳の腫瘍周囲に集まり(), 腫瘍内部にも侵入していく Muse-tk 細胞()の脳内の移動を捉えた実験である。また、既存腫瘍に対する腫瘍縮小効果と治療マウスの生存期間が延長することも確認でき、本治療の有効性を実証するデータを集積してきた。

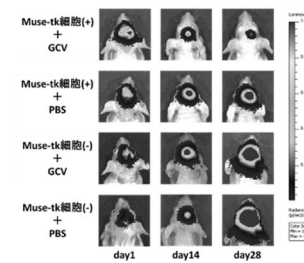


Fig.2 : バースタンダー効果

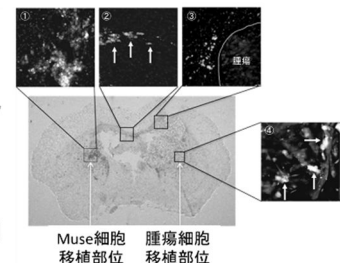
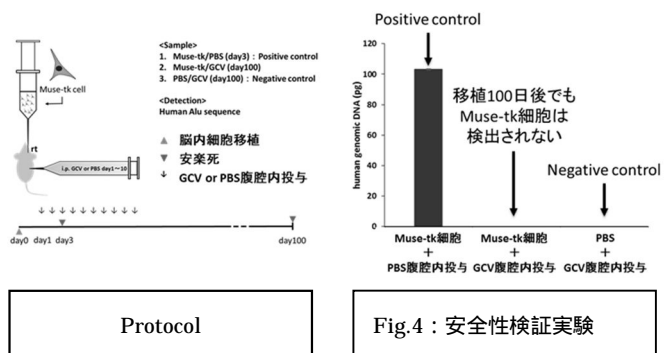


Fig.3 : 腫瘍部位への遊走能

< Muse- tk 細胞移植の安全性 >

Muse 細胞は再生医療に用いられる安全な細胞として開発されているが、ウイルスベクターを使用して HSVtk 遺伝子導入を行っているため、遺伝子導入活性が高い一方で、外来遺伝子が宿主遺伝子に組み込まれ、免疫原性や挿入変異、腫瘍原性といった安全面での問題が考慮される。そこ

で、マウス脳内に移植したヒト Muse-tk 細胞が GCV 投与後完全に消失するのかがヒト特異的配列である Alu シーケンスを real-time PCR にて検出する方法を用いて遺伝子レベルで解析したところ、Alu シーケンスは検出されなかったことから、移植した Muse-tk 細胞は GCV 投与後完全に消失する安全な治療細胞であることが確認された(Protocol, Fig. 4: 未発表)。



2. 研究の目的

悪性グリオーマの予後改善を目指し、腫瘍指向性を有する Multilineage-differentiating stress-enduring cell (Muse 細胞)を用いた自殺遺伝子幹細胞療法の開発を行ってきた。これまでに HSVtk 遺伝子導入 Muse 細胞 (Muse-tk 細胞)を用いた in vitro、in vivo の強力な抗腫瘍効果と腫瘍指向性について明らかにした。今回、臨床応用の際に必須となる Muse-tk 細胞の生体モニタリング法を確立、患者由来悪性グリオーマ細胞株における本治療の有効性の検証、正常脳に対する本治療の毒性について検証を行う。

3. 研究の方法

解決すべき課題は大きく分けて 3 つある。まずは PET を用いた Muse-tk 細胞の生体モニタリングである。本実験では HSVtk 導入細胞を定量的にモニターできる分子プローブを作成することから始まる。プローブの作成後、当施設で利用可能な小動物イメージング用 PET を使用し、移植細胞数に応じたイメージングを行い、感度、空間分解能の検証を行う。感度の検証については二光子励起顕微鏡を併用し移植細胞の細胞レベルでの有無の確認を行う。2 つ目は患者由来悪性グリオーマ細胞株に対する in vitro、in vivo バイスタンダー効果並びに腫瘍指向性の検証を行い、実験の再現性の確認と共に、実臨床反応を反映した結果を得る。3 つ目は正常脳に対する本治療の毒性の検証をアポトーシスに着目し、in vitro・in vivo における real-time 画像解析にて実施する。

4. 研究成果

(1) tk 幹細胞の生体モニタリングの開発

臨床応用を視野に入れた場合、移植後の tk 幹細胞の腫瘍内分布をモニターすることは GCV の投与期間を決める上で重要な情報である。そこで PET を用いた tk 幹細胞の生体モニタリングの開発のため PET 分子プローブとして 9-(4-[18F]fluoro-3-hydroxy methylbutyl)guanine (18F-FHBG) を作成し、予備実験としてヌードマウス脳内に HSVtk 遺伝子導入 U87 ヒトグリオーマ細胞を当該細胞数移植し小動物用 PET にてイメージングを実施したところ検出に至らなかった。原因として、マウスに移植した tk 幹細胞数が PET の検出感度に達しなかった可能性があり、移植細胞数を増やすべく、使用する実験動物をラットに変更し実験を進める計画とした。使用した HSVtk 遺伝子導入幹細胞は人由来であったため、入手困難な免疫不全ラットの代わりに、免疫抑制剤を投与した免疫抑制ラットを用いたが PET での検出には至らなかったため、新たに PET 分子プローブを作成している。また並行して Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) でラベルした間葉系幹細胞を用いた遊走能実験を実施した。脳内に移植した本細胞は対側脳の腫瘍部位まで遊走することを組織学的に確認した。SPIO に含まれる鉄成分は MRI で検出されることが分かっており、PET による生体モニタリングの研究を進めると共に、今後 SPIO 標識間葉系幹細胞の MRI での生体モニタリングの検証実験を進める予定である。

(2) 患者由来グリオーマ細胞株に対する遊走能

まずグリオーマ細胞の培養上清に対する tk 幹細胞の in vitro 遊走能を Matrigel invasion chamber を用いて検証した。組織型、悪性度の異なるグリオーマ細胞株の培養上清に対し、DMSO または FBS のコントロールと比較し tk 幹細胞は優位に高い遊走能を示した。さらに、遊走を誘導する腫瘍因子の同定を行った。具体的には、腫瘍細胞で産生されるサイトカイン (SCF、VEGF、CXCL12、PDGF-BB など) に対する tk 幹細胞の遊走を Matrigel invasion chamber にて確認したところ、すべての因子に対する遊走が認められた。次いで、腫瘍細胞培養液にサイトカインに対する阻害因子を投与し、遊走が抑制されるかを確認した。すると、阻害剤の濃度に依存して tk 幹細胞の遊走が抑制されることが分かった。このことから、tk 幹細胞の遊走には患者由来グリオーマ細胞の培養上清に含まれる複数のサイトカインが関与していることが分かった。in

vivo 遊走能の検証のため患者由来グリオーマ細胞株をヌードマウス右脳に移植し、1 週間後に左脳に色素標識した tk 幹細胞を移植した。その 1 週間後に脳を摘出し、組織学的検討を行ったところ、tk 幹細胞は腫瘍の周囲に集簇し、さらに腫瘍内部にも色素標識された tk 幹細胞が確認された。

以上のことから患者由来グリオーマ細胞株に対しても tk 幹細胞は良好に遊走することが示された。

(3) 正常脳に対する本治療の毒性の検証

HSVtk/GCV システムは DNA ポリメラーゼ阻害によるアポトーシスによる殺細胞効果を用いた治療法であり、原理的には分裂細胞のみにアポトーシスが起こるため正常組織を傷害しないと考えられるが詳細な検討はされていない。そこで tk 幹細胞と星状膠細胞 (Normal Human Astrocyte: NHA) を共培養し、ホスファチジルセリンに強い結合親和性をもつアネキシン A-5 を蛍光色素標識した試薬を用いて、タイムラプスイメージングにて細胞レベルのアポトーシスの検出を行った。結果として、腫瘍細胞のみにアポトーシスが確認され、NHA にはアポトーシスは検出されなかった。TUNEL 法を用いて同様にアポトーシス検出実験を行い同様の結果を得た。

以上、tk 幹細胞治療の有効性と安産性を示すことができ、今後、GMP 基準に準じた細胞製剤化を行っている企業と提携し、臨床利用を見据えた tk 幹細胞作成を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamasaki Tomohiro, Sakai Naoto, Shinmura Kazuya, Kawaji Hiroshi, Koizumi Shinichiro, Samashima Tetsuro, Namba Hiroki	4. 巻 35
2. 論文標題 Anaplastic changes of diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor with polar spongioblastoma pattern	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 209 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-018-0326-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiro Yamasaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Genetically Engineered Multilineage-Differentiating Stress-Enduring Cells as Cellular Vehicles against Malignant Gliomas.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Therapy oncolytics	6. 最初と最後の頁 45-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2017.06.001.	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 -

1. 著者名 Horikawa Makoto, Koizumi Shinichiro, Oishi Tomoya, Yamamoto Taisuke, Ikeno Masashi, Ito Masahiko, Yamasaki Tomohiro, Amano Shinji, Sameshima Tetsuro, Mitani Yasuyuki, Otani Yoshihiro, Yan Yuanqing, Suzuki Tetsuro, Namba Hiroki, Kurozumi Kazuhiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Potent bystander effect and tumor tropism in suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-022-00527-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Taisuke, Koizumi Shinichiro, Oishi Tomoya, Horikawa Makoto, Asakawa Tetsuya, Yamasaki Tomohiro, Sameshima Tetsuro, Mitani Yasuyuki, Namba Hiroki, Kurozumi Kazuhiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Migration Capacity of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Towards Glioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31083/j.jin2201001	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 -

1. 著者名 Oishi Tomoya, Ito Masahiko, Koizumi Shinichiro, Horikawa Makoto, Yamamoto Taisuke, Yamagishi Satoru, Yamasaki Tomohiro, Sameshima Tetsuro, Suzuki Tetsuro, Sugimura Haruhiko, Namba Hiroki, Kurozumi Kazuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Methods & Clinical Development	6. 最初と最後の頁 253 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2022.07.001	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 -

1. 著者名 Kenmochi Hiroaki, Yamasaki Tomohiro, Koizumi Shinichiro, Sameshima Tetsuro, Namba Hiroki	4. 巻 42
2. 論文標題 Nicotine does not affect stem cell properties requisite for suicide gene therapy against glioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurological Research	6. 最初と最後の頁 818 ~ 827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01616412.2020.1782123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tomohiro Yamasaki
2. 発表標題 Targeted enzyme/drug delivery system for glioma using iPSC-derived NSCs by virus-free HSVtk gene transfer method
3. 学会等名 The 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎友裕
2. 発表標題 Targeted enzyme/drug delivery system for glioma using iPSC-derived NSCs by integration-free HSVtk gene transfer method
3. 学会等名 第75回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohiro Yamasaki
2. 発表標題 iPSC-derived neural stem cells transfected with HSVtk gene using integration-free method as a feasible carrier for targeted delivery of phosphorylated ganciclovir into glioma cells
3. 学会等名 The 23rd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山崎友裕
2. 発表標題 HSVtk発現プラスミド導入幹細胞を用いたグリオーマ標的 enzyme/prodrugシステムの開発
3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohiro Yamasaki
2. 発表標題 Genetically modified stem cells expressing HSVtk gene using a transposon-mediated non-viral gene transfer method for glioblastoma
3. 学会等名 23th Annual Meeting and Educational Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Yamasaki
2. 発表標題 Stearoyl-CoA desaturase inhibitor suppresses IDH mutant glioma growth via enhancing lipolysis
3. 学会等名 27th Annual Meeting and Educational Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎友裕
2. 発表標題 IDH変異神経膠腫のStearoyl-CoA desaturase 1はグリオーマ幹細胞治療の標的となる
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2022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	難波 宏樹 (Namba Hiroki) (60198405)	浜松医科大学・医学部・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
---------	---------