

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390394

研究課題名 (和文) 幹細胞をベクターとするグリオーマ遺伝子治療の臨床応用への研究

研究課題名 (英文) Use of mesenchymal stem cells as a vector for glioma gene therapy

研究代表者

難波 宏樹 (NAMBA HIROKI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：60198405

研究成果の概要：

ラット骨髄から採取した間葉系幹細胞 (MSC) をベクターとする単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk) / ガンシクロビル (GCV) 自殺遺伝子療法の効果を検討した。HSVtk 遺伝子を導入した MSC (MSCtk) とラット C6 グリオーマ細胞の間には強力なバイスタンダー効果が確認された。ラット脳内腫瘍モデルおよび髄液播種モデルに対し、MSCtk 細胞の腫瘍内または髄腔内投与と GCV の腹腔内投与により有意な腫瘍増殖の抑制と担癌ラットの生存期間の延長が見られた。以上より MSCtk 細胞を用いた遺伝子治療の有用性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	7,000,000	2,100,000	9,100,000

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

悪性グリオーマの治療成績は極めて悪く、外科的切除や放射線／化学療法を駆使しても、最も悪性度の高いグリオブラストーマの平均生存期間は約一年である。その理由の一つはグリオーマが浸潤性に発育するにもかかわらず、脳という臓器の特殊性から安全域をとった治癒的な腫瘍切除ができないことにある。一方グリオーマが中枢神経系を出て遠隔転移をすることが極めて稀であることは、局所脳内腫瘍制御がそのまま生存率につ

ながる可能性を示唆しており、遺伝子治療をはじめとする新たな局所治療戦略の開発に期待が寄せられている。

脳腫瘍の遺伝子治療としては単純ヘルペスチミジンキナーゼ (Herpes simplex virus-thymidine kinase, HSVtk) とガンシクロビル (GCV) を用いる自殺遺伝子療法が最も広く研究されている。このシステムにおいてはすべての腫瘍細胞に遺伝子が導入されなくとも GCV の投与により遺伝子非導入細胞に対しても殺細胞効果があることが判明してお

り「バイスタンダー効果」と呼ばれる。これまでわれわれは浸潤性に広がるグリオーマに対し、腫瘍へ向けての遊走能をもつ神経幹細胞をベクターとして用い、HSVtk/GCV system によるバイスタンダー効果を介する治療法を開発し優れた治療効果を得てきた (Li et al, Cancer Gene Ther, 2005)。しかしながら、臨床応用を考えると、採取が容易でなく、また増殖能が限られている神経幹細胞の利用には限界がある。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、骨髄より比較的容易に採取でき神経系にも分化することが知られている間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) に HSVtk 遺伝子を導入して用いた (MSCtk 細胞)、神経幹細胞をベクターとした際と同等の効果が得られるどうかを検証しようとするものである。

3. 研究の方法

1) in vitro バイスタンダー効果

Sprague-Dawley (SD) ラット骨髄より採取した MSC に HSVtk 遺伝子を導入し作成した細胞 (MSCtk 細胞) と SD ラット由来の C6 グリオーマ細胞を用いる。C6 細胞数を 5×10^3 で固定し、MSCtk 細胞数を徐々に減らし、MSCtk:C6 比を 1:1 から 1:128 までとする。GCV (1 μ g/ml) 存在下で培養し腫瘍細胞の増殖能を観察する。

2) in vivo バイスタンダー効果

C6 細胞数を 1×10^5 で固定し、MSCtk 細胞数を徐々に減らし、MSCtk:C6 比を 1:1 から 1:128 までとし、SD ラット脳内に移植する。同日より GCV (30 mg/kg/day) または生食を 10 日間腹腔内投与し、20 日目の腫瘍の大きさを測定し、生存期間を比較する。

3) ラット脳内腫瘍治療実験

SD ラット脳内に C6 細胞を移植し (1×10^5)、脳腫瘍を確立した 3 日後に、腫瘍内に MSCtk 細胞 (1×10^5) を注入。同日より GCV または生食を腹腔内投与し、20 日目の腫瘍の大きさを測定し、生存期間を比較する。

4) ラット髄液播種治療実験

SD ラット髄腔内に大孔より C6 細胞を注入し (2×10^5) 髄液播種モデルを作成。翌日に同様の手技にて MSCtk 細胞 (6×10^5) を注入。同日より GCV または生食を腹腔内投与し、14 日目の腫瘍の大きさを測定し、生存期間を比較する。

4. 研究成果

1) in vitro バイスタンダー効果

GCV 存在下での培養では MSCtk:C6 比が 1:1 から 1:32 までは C6 細胞の増殖が見られず、強力な in vitro バイスタンダー効果が確認された。

2) in vivo バイスタンダー効果

生食群では腫瘍の急速な増大がみられ、全動物が約 3 週間で腫瘍死する。一方 GCV 投与群では MSCtk:C6 比が 1:1 から 1:32 までは腫瘍が生着せず長期生存し、in vivo でも強力なバイスタンダー効果が確認された。

3) 脳内腫瘍治療実験

GCV 投与群では生食群に比し、腫瘍の大きさは有意に小さい ($p < 0.01$)。生存期間は生食群では全例 3 週間で腫瘍死するが、GCV 群では 6 匹中 2 例で 100 日以上長期生存 (治療)、その他の動物の生存期間も生食群と比し有意に延長した ($p < 0.01$)。

4) グリオーマ髄液播種治療実験

GCV 投与群では生食群に比し、腫瘍の大きさは有意に小さい ($p < 0.01$)。生存期間は GCV 群 (21.5 ± 1.5 日) では生食群 (17.2 ± 0.5 日) と比し有意に延長した ($p < 0.01$)。

以上の結果より、MSCtk 細胞をベクターとして用いた HSVtk/GCV 遺伝子治療は、神経幹細胞を用いた際とほぼ同等の治療効果があると考えられる。神経幹細胞の採取には開頭術を要し、また成人の神経幹細胞は増殖能が低く、十分な細胞数が得られない可能性があるが、代わりに骨髄から採取可能な MSC 細胞を用いることにより臨床応用の可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Yamamoto J, Yamamoto S, Hirano T, Li S, Koide M, Kohno E, Okada M, Inenaga C, Tokuyama T, Yokota N, Terakawa S, Namba H: Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma. Clin Cancer Res 12: 7132-7139, 2006 査読有

② Li S, Gao Y, Tokuyama T, Yamamoto J, Yokota N, Yamamoto S, Terakawa S, Kitagawa M, Namba H: Genetically engineered neural stem cells migrate and suppress glioma cell growth at distant intracranial sites. Cancer Lett 251: 220-227, 2007 査読有

③ Yokota N, Inenaga C, Tokuyama T, Nishizawa S, Miura K, Namba H: Synovial chondromatosis of the temporomandibular joint with intracranial extension. Neurol Med Chir 48:266-270, 2008 査読有

④ Mizutani A, Okada M, Yokota N, Namba H: Asymptomatic non-functioning ectopic pituitary adenoma in the suprasellar region: a case report. Brit J Neurosurg 2009, in press 査読有

⑤ Okada M, Namba H: Multifaceted effects of

selective inhibitor of phosphodiesterase III, cilostazol, for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in dog model, *Cerebrovasc Dis* 2009, in press 査読有

⑥ 磯田治夫、平野勝也、竹田浩康、大倉靖栄、小杉隆司、山下修平、竹原康雄、難波宏樹、Marcus T. Alley、阪原晴海：MR による脳動脈瘤血流解析 臨床放射線 53: 797-808, 2008 査読有

⑦ 磯田治夫、大倉靖栄、小杉隆司、山下修平、竹原康雄、竹田浩康、平野勝也、難波宏樹、Marcus T. Alley、Roland Banner、Nobert J. Pelc、阪原晴海：脳動脈瘤の 3D cine PC MRI 流体解析とこれを境界条件とした計算流体力学解析の比較 日磁医誌 29: 33-35, 2009 査読有

⑧ 平松久弥、杉浦康仁、竹田理々子、難波宏樹：腹壁内血腫の1例 - 大腿動脈穿刺によるセルジンガー法のピットフォール 脳神経外科 37: 167-171, 2009 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 難波宏樹、李少一、徳山勤、山本淳考、横田尚樹：Use of genetically engineered mesenchymal stem cells for treatment of experimental gliomas. 第 12 回日本遺伝子治療学会 (2006.8.24-26、東京)

② Hiroki Namba: Neural stem cell therapy for malignant glioma. 2007 Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting (2007.9.15-20, San Diego)

③ 難波宏樹、李少一、高芸、徳山勤、横田尚樹：Bystander effect between mesenchymal stem cells and brain tumor cells in the HSV-TK/GCV system is not species specific. 第 13 回日本遺伝子治療学会 (2007.6.28-30、名古屋)

④ 難波宏樹、徳山勤、横田尚樹、李少一：間葉系幹細胞をベクターとして用いる脳腫瘍の遺伝子治療. 第 66 回日本脳神経外科学会総会 (2007.10.3-5、東京)

⑤ 難波宏樹、高芸、李少一、谷春雨、徳山勤、横田尚樹：p27 modulates migration and tropism of mesenchymal stem cells. 第 14 回日本遺伝子治療学会 (2008.6.12-14、札幌)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 宏樹 (NAMBA HIROKI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：60198405

(2) 研究分担者

徳山 勤 (TOKUYAMA TSUTOMU)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90313957

横田 尚樹 (YOKOTA NAOKI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00273186

中村 悟己 (NAKAMURA SATOKI)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20377740

大西 一功 (OHNISHI KAZUNORI)
浜松医科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80252170

(3) 連携研究者