

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15853

研究課題名(和文) 多能性幹細胞由来の分化細胞に混在する腫瘍化細胞を標的治療する革新的ベクターの開発

研究課題名(英文) A novel Lentiviral vectors for eliminating tumorigenic cells contaminating in differentiated cells derived from pluripotent stem cells

研究代表者

井手 佳菜子 (Ide, Kanako)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20725791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞:hPSCs)は、医療・医薬創出の基盤ツールとして期待されるが、その安全性において最重要課題である腫瘍化(奇形種、癌)の完全な克服技術は未だない。我々はhPSCsの腫瘍化を同定・治療する革新的なレンチウイルスベクター(TC-LV)の開発に取組み、腫瘍化原因細胞を特異的に同定・殺傷できるプロモーターを同定した。また、TC-LV導入未分化細胞の強力な殺傷効果と同時に、目的細胞(心筋細胞等)への分化誘導後の安全性を示すことができ、未分化細胞特異的な殺傷効果を実証することができた。本技術の開発により、ヒト多能性幹細胞による再生医療の臨床応用の大きな進展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術は、本邦ならびに世界中で進められている全てのhPSCsでの再生医療研究に応用可能な共通根源の技術であるが、高いオリジナリティを持ち、ベクター技術は特許取得済みで知財も確保しているため、本邦での再生医療の基礎研究と臨床応用の両面での推進に大きく貢献するものである。本研究により腫瘍化細胞特異的な強力な殺傷効果が得られたことは有意義であり、今後の詳細な解析により期待される成果が得られれば、hPSCsに最も重要な安全性の問題を克服でき、本邦での早期の再生医療の安全かつ着実な実現が可能となるため、先端医療実現による国民福祉の向上と経済発展に繋がる、中長期的には大きな社会貢献の成果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSCs) are a promising source of regenerative material for clinical applications. However, hPSC transplant therapies pose the risk of teratoma formation and malignant transformation of undifferentiated remnants. To facilitate safe clinical applications, it is necessary to develop new approaches to directly, completely, and specifically eliminate tumorigenic cells. Here, we developed a novel method for efficiently generating diverse candidates for tumorigenic cell-targeting lentiviral vectors (TC-LVs), enabling systematic identification of the most suitable promoter for this purpose. hPSCs with the suicide gene downstream of the tumor specific promoter, showed undifferentiated cell specific cytotoxic effect and the safety after induction of differentiation into cardiomyocytes. This study demonstrates the utility of this methodology and reveals that the products should pave the way toward safe clinical applications of hPSC-based regenerative medicine.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 腫瘍化阻止 レンチウイルス 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞、iPS 細胞(以下、hPSCs)は、高い自己増殖能と分化多能性を保持し、その特性から臓器移植に代わる細胞移植療法としての再生医療の実現化が可能となり、本邦においても既に hPSCs 由来の網膜色素上皮の加齢黄斑変性症患者への投与が開始され、また、心不全やがん免疫療法、神経疾患を対象とした細胞治療の臨床試験も開始されている [Yamanaka 2020]。一方で、臨床化においては高レベルの安全性の確立が不可欠であり、最重要課題は、腫瘍化(奇形種、癌)を完全に克服する技術の開発である。

これまでに、残存未分化細胞が移植細胞に混入し奇形種を形成する可能性や [Takahashi 2007]、奇形種に限らず悪性腫瘍(癌)の発生も高度であるという報告が数多くあり、また hPSCs のゲノム不安定性による遺伝子変異や [Lee 2013]、ヒト iPS 細胞においては、遺伝子変異を伴わない腫瘍化の可能性の報告もある [Ohnishi 2014]。しかし、この課題を克服するための既存の報告の多くは、リプログラミング法や培養法の改良、高効率な分化誘導法の開発など、間接的な腫瘍化「抑制」であり、直接的な革新技术の開発に向けた取り組みは不十分である。よって hPSCs での安全な再生医療の実現のためには、残存未分化細胞や奇形腫・がん化の性質を持つ細胞、つまりは腫瘍化原因細胞を「直接」・「安全(特異的)」に殺傷・除去するという全く新しい戦略での革新的技術開発が必要である。

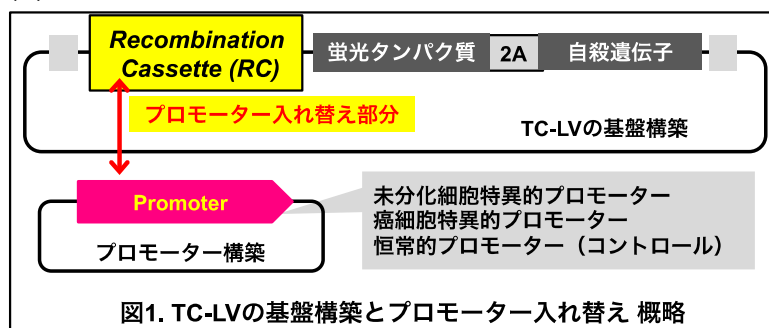
2. 研究の目的

研究代表者は、目的の正常細胞を傷つけずに腫瘍化原因細胞のみを除去するためには、(1)腫瘍化原因細胞への特異性の高い複数候補の遺伝子・プロモーターの効率的な解析、(2)殺傷を薬剤選択性にコントロールできるシステムの確立が有用と考え、「腫瘍化原因細胞を同定・可視化し特異的に殺傷可能な、腫瘍化原因細胞標的レンチウイルスベクター(TC-LVs)」の作製に組み、独自技術の開発に成功した(国内・国際特許出願) [Ide 2018]。これは、レンチウイルスベクターに、プロモーターの簡便な組み換えが可能なりコンビネーションカセットを用いて、複数の未分化・がん細胞特異的プロモーターを網羅的に解析できるシステムである。また、下流には蛍光タンパク質と、薬剤感受性自殺遺伝子を 2A 配列で介した遺伝子カセットを組み込んでおり、単一のプロモーターで目的細胞の可視化と自殺遺伝子に対応する薬剤での選択的殺傷が可能となる。薬剤感受性自殺遺伝子を用いることで、移植後の細胞に有害事象が発生した場合でも、薬剤投与により細胞死の誘導が可能なセーフティ・スイッチとしての応用性も示唆されている [Yagyu 2016, Wu 2014]。しかし、分化した目的細胞に傷害を与えず腫瘍化原因細胞へのみ十分な治療効果を得るために必要な自殺遺伝子の発現量については未だ詳細な検討は行われていない。

そこで研究代表者は、自殺遺伝子を至適発現レベルで誘導可能なプロモーターを、網羅的解析により選定することを重点として、本システムを用いて、腫瘍化原因細胞を特異的に同定できる遺伝子プロモーターの同定と目的細胞分化誘導後に残存する腫瘍化原因細胞の除去と移植時の安全性の検証を行うことを目的として研究を進めた。本システムでの網羅的解析により、最適なプロモーターで制御した腫瘍化原因細胞の確実な殺傷効果をもたらす TC-LV を完成させることが可能となる。これにより、従来技術では十分に成し得なかった腫瘍化の完全除去を目指し、腫瘍化阻止の標準化技術として確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 基盤ベクターの改良とプロモーターの構築



研究代表者が以前より開発してきた「hPSCs の腫瘍化原因細胞を同定・殺傷する新規レンチウイルスベクターシステム(TC-LV)」は、リコンビネーションシステムを用いプロモーター配列が簡便

に組換え可能、かつ蛍光タンパク質と薬剤感受性自殺遺伝子が同一プロモーター下で発現、という特徴を持つ。これにより、既報の研究では不十分であった同一条件下での腫瘍化原因細胞におけるプロモーター活性の横断的比較が可能となる(図1)。

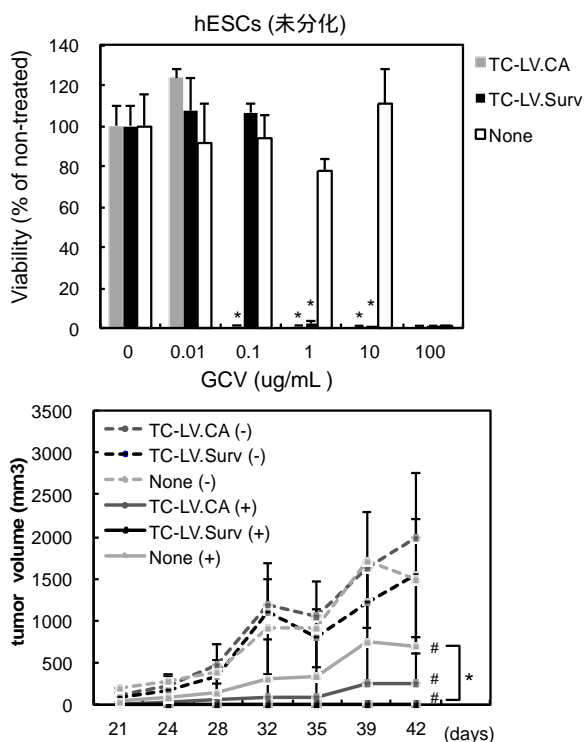


図2. TC-LV導入hESCの薬剤投与による殺傷効果(上)と腫瘍抑制効果(下)

より高感度な細胞分取が可能な TC-LV2 を作製し、これにより複数プロモーターの網羅的検証を試みた(図3)。

(2)改良 TC-LV2 による網羅的なプロモーター解析

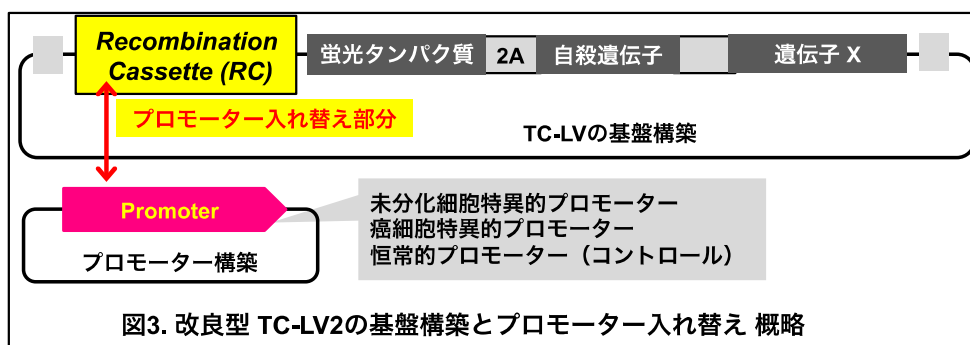


図3. 改良型 TC-LV2の基盤構築とプロモーター入れ替え 概略

作製した複数プロモーターの TC-LV2 をヒト ES 細胞 (hESC) へ感染させ、遺伝子 X により単一細胞レベルで分取し、TC-LV2 感染クローン細胞とした。In vitro における細胞殺傷効果の検証として、TC-LV2 導入未分化細胞、もしくは分化誘導後の腫瘍化原因細胞(残存未分化細胞)に、HSV-tk に対応する薬剤のガンシクロビル (GCV) を投与し、薬剤濃度依存性の未分化特異的殺傷効果を得られるかを検証した。

4. 研究成果

本研究では、6種類の候補プロモーターA~Fを持つ TC-LV2 をそれぞれ用いて、腫瘍化原因細胞への殺傷効果の検証を行った。TC-LV2 導入未分化 hESCs への GCV の投与では、各プロモーター間で殺傷効果の得られる薬剤濃度に違いが見られ、Promoter F ではほとんど殺傷効果が得られなかった(図4)。一方で、分化誘導した TC-LV2 導入 hESCs では、ほとんどのプロモーターでは高濃度の GCV でも細胞傷害がほとんど見られず、分化誘導後の細胞への安全性が高い結果となったが、一部の強力なプロモーターにおいては分化後の細胞への傷害がみられ、プロモーターの選定が重要であることを裏付ける結果となった(図4)。

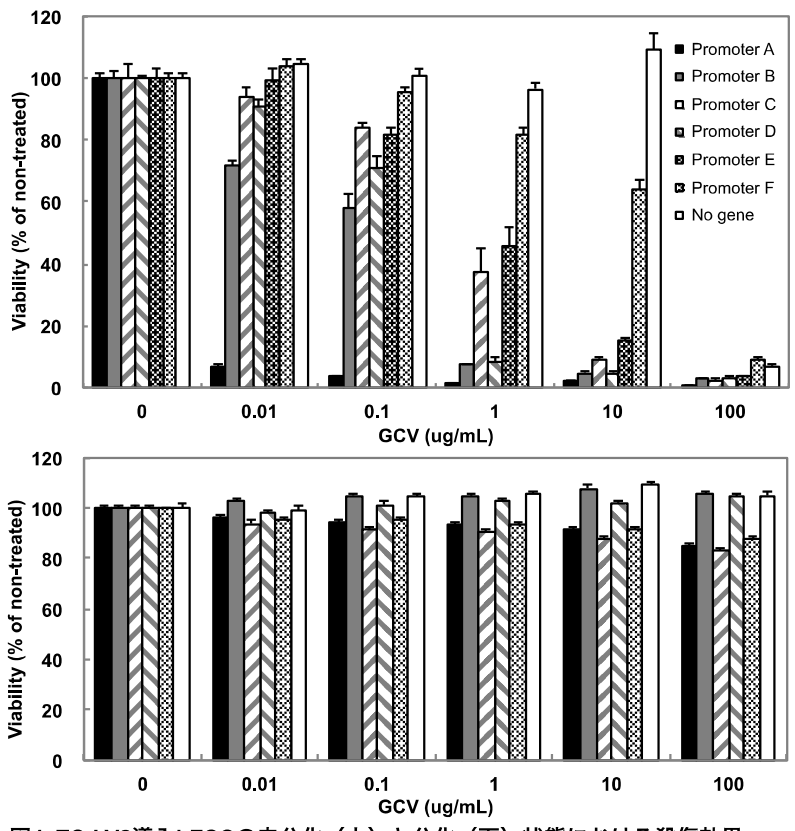


図4. TC-LV2導入hESCの未分化（上）と分化（下）状態における殺傷効果

これらの結果から、予想通りプロモーター活性の違いにより未分化細胞への殺傷効果は異なり、腫瘍性細胞の特異的な殺傷効果を得るためにはプロモーターの選出が重要であることが示された。今後さらに、分化誘導後の残存未分化細胞に対する同様の検証や、今回用いた自殺遺伝子・プロモーター以外の複数候補についても詳細な検討を行い、分化細胞への安全性の担保、及び腫瘍化原因細胞特異的な殺傷効果を得られる最適な候補遺伝子の組み合わせを決定し、hPSCs に最も重要な「安全性」の問題を克服することを目指す。

本技術は、本邦ならびに世界中で進められている全ての hPSCs での再生医療研究に応用可能な共通根源の技術であるが、極めて高いオリジナリティーを持ち、特許申請中であるようにベクター技術は知財も確保しているため、本邦での再生医療の基礎研究と臨床応用の両面での推進に大きく貢献するものである。最終的に、本研究の期待される成果を得ることができれば、hPSCs に最も重要な「安全性」の問題を克服することができ、本邦での早期の再生医療の安全かつ着実な実現が可能となるため、本邦の科学的発展は元より、先端医療実現による国民福祉の向上と経済発展に繋がる、中長期的には大きな社会貢献の成果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ide Kanako, Mitsui Kaoru, Irie Rie, Matsushita Yohei, Ijichi Nobuhiro, Toyodome Soichiro, Kosai Ken-ichiro	4. 巻 36
2. 論文標題 A Novel Construction of Lentiviral Vectors for Eliminating Tumorigenic Cells from Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 230 ~ 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2725	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井手 佳菜子、三井 薫、松田 恵理子、小賤 健一郎
2. 発表標題 独自開発のレンチウイルスベクター（TC-LV）による多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞の同定・除去技術
3. 学会等名 第75回日本解剖学会九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井手 佳菜子、豊留 宗一郎、三井 薫、松田 恵理子、小賤 健一郎
2. 発表標題 多能性幹細胞の腫瘍化完全克服を目指した「ゲノム編集での自殺遺伝子挿入技術」の開発.
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井手 佳菜子
2. 発表標題 多能性幹細胞での再生医療に必須となる腫瘍化克服の独自技術の開発
3. 学会等名 第3回JSGCT若手研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kanao Ide, Kaoru Mitsui, Rie Irie, Yohei Matsushita, Nobuhiro Ijichi, Soichiro Toyodome, Eriko Matsuda, Yoshimi Tomiyama and Ken-ichiro Kosai
2. 発表標題 A novel construction of lentiviral vectors that identify and eliminate tumorigenic cells from pluripotent stem cells.
3. 学会等名 ISSCR2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト多能性幹細胞の安全領域に長い外来遺伝子を組み込み正常機能させる方法	発明者 小賤健一郎、三井 薫、井手佳菜子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-030699	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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