

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16570

研究課題名(和文)脳スライス培養によるiPS細胞由来神経幹細胞及び腫瘍幹細胞の動態解析

研究課題名(英文)Visualization of spatiotemporal dynamics of iPS cell-derived neural stem cells migration and glioma stem cell invasion

研究代表者

大石 裕美子(OISHI, Yumiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50793121

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): ヒトグリオーマに対して、ヒトiPS細胞由来のNeural stem cell (NSC)をcellular delivery vehicleとして用いる自殺遺伝子治療の開発を続けてきた。本研究では、細胞の可視化技術及び脳切片培養法を組み合わせた独自のスクリーニング法を樹立し、グリオーマ幹細胞の生体内での浸潤様式を明らかにし、NSCのグリオーマ細胞・幹細胞への指向性や生体内遊走速度を評価した。さらに、自殺遺伝子治療における腫瘍細胞死誘導効果を定量的に検討した。本手法は細胞療法を行うあらゆる治療戦略で用いる事ができる評価系であり、今後さらに様々な細胞の挙動を解析する事にも応用できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞から分化誘導したNSCと自殺遺伝子治療を組み合わせたグリオーマに対する新規遺伝子細胞療法の開発を続けてきた。NSCは腫瘍や損傷部位へ遊走することができるため、治療遺伝子の細胞運搬体として使用することができ、脳腫瘍に対する治療のみならず、脳梗塞、脊髄損傷等あらゆる疾患にも応用できる。本研究開発では、可視化技術と脳切片培養法を組み合わせた独自の方法により、生体内での移植細胞の挙動や治療効果をリアルタイムに詳細かつ長期間定量的に解析した。今回樹立したスクリーニング法により、幹細胞を用いた移植細胞療法を臨床応用する上で、その治療効果を効率的に評価可能となる。

研究成果の概要(英文): In this study, we visualized the spatiotemporal dynamics of invasion of glioma stem cells (GSCs) and migration of human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neural stem cells (NSCs) in an orthotopic xenograft mouse model using time-lapse imaging of organotypic brain slice cultures. GSCs implanted in the striatum exhibited directional invasion toward axon bundles, perivascular area, and the subventricular zone around the inferior horn of the lateral ventricle. Time-lapse imaging of organotypic brain slice cultures first demonstrated the directional migration of NSCs with suicide gene toward GSCs and the bystander killing effect. The present methodology can efficiently visualize the behavior of implanted cells, leading to the clinical application.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 iPS細胞 神経幹細胞 遊走 脳切片培養 スライスカルチャー 自殺遺伝子 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、現在自殺遺伝子 (HSVtk: 単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ) を導入したヒト induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) を作製し、分化誘導した Neural stem cell (NSC) の抗腫瘍効果を、極めて予後不良なヒト悪性神経膠腫 (グリオーマ) モデルマウスにおいて評価し、著明な効果を得ており、臨床応用を目指している。本治療法において、「NSC の腫瘍への遊走」「バイスタンダー効果 (遺伝子導入された細胞だけでなくその周囲の細胞死も誘導される)」は重要な要素である。その上で、NSC の遊走は、in vitro (2D 基質上や 3D バイオマトリックスゲル上) でリアルタイムにイメージングした報告は認めるものの、生体内を完全に反映できておらず、「実際に長期間生体内で NSC がいかに挙動するのか」はまず明らかにすべき課題である。さらに、化学療法及び放射線治療等に対し抵抗性である脳腫瘍幹細胞 (brain tumor stem cell, BTSC) の概念樹立から、その性質を探索した様々な報告がありグリオーマの浸潤や予後との関与が強く指摘されているが、同様に生体内での挙動は明らかでない部分が多い。一方で近年、脳スライス培養系により、脳内に近い細胞構築を保ちつつ、長期間の観察をすることが可能となった。今までにも、蛍光標識したグリア細胞等を用いてその移動をリアルタイムに観察した報告を多数認める。本研究では、脳スライス培養系及び可視化技術を用い、生体内での上記課題を追求することで、幹細胞を用いた様々な再生医療及び、グリオーマに対する自殺遺伝子治療の向上を促すものとした。

2. 研究の目的

我々が、研究開発してきた治療法は、ヒト iPS 細胞から分化誘導した NSC と自殺遺伝子治療 (HSVtk) を組み合わせた新規遺伝子細胞療法であり、独自性が高く、将来の臨床応用を期待できる。著明な効果の要因として、NSC の腫瘍への遊走が挙げられるが、「NSC の生体内での挙動をリアルタイムに詳細かつ長期間解析」した報告はない。この挙動を明らかにすることは、脳腫瘍に対する治療のみならず、脳梗塞、脊髄損傷等あらゆる疾患に対する幹細胞を用いた再生医療を飛躍的に促進させる可能性があり、学術的意義が高い。さらに、本研究により生体内におけるバイスタンダー効果を可視化することは、自殺遺伝子治療を臨床応用する上で大きな足掛かりとなるものである。BTSC は治療抵抗性の根幹をなし、治療標的として研究されているが、その生体内での挙動は明らかでないことが、治療をより困難としている原因の一つである。「グリオーマ幹細胞の生体内での長期にわたる挙動をリアルタイムにとらえる」事は、治療成績改善に貢献できる可能性がある。本研究では、臨床応用を念頭に安全性の確認された integration-free, feeder-free のヒト iPS 細胞株 (1210B2 等) を用いることや、ヒトグリオーマ幹細胞株 (HG008) を用いるため、齧歯類の幹細胞を用いた研究とは一線を画するものとなる。

3. 研究の方法

NSC の可視化のため Humanized Kusabira-Orange (hK01) 蛍光タンパク質遺伝子を用いた。CpG-free HSVtk 遺伝子 (HSV1tk) の cDNA をレンチウイルスベクタープラスミド CSII-EF-RfA-IRES2-hK01 にサブクローニングを行い、CSIV-EF-HSV1tk-IRES2-hK01 を得た。CSIV-EF-HSV1tk-IRES2-hK01 は、EF-1 α プロモーター下で HSV1tk と hK01 が発現するレンチウイルスベクターの作製に使用した。ヒト iPS 細胞から分化誘導した 3 次ニューロスフェアに、上記作成した CSIV-EF-HSV1tk-IRES2-hK01 レンチウイルスベクターを MOI 1-2 で感染させ、HSVtk 発現ニューロスフェアを作製した。ヒトグリオーマ幹細胞株 (HG008) には、ffLuc (Venus 蛍光タンパク質と Luc2 ホタルルシフェラーゼの融合遺伝子) 発現レンチウイルスベクター (CSII-EF-ffLuc) を感染させ、セルソーターによるクローンソートを行い、ffLuc が安定高発現する HG008 細胞株を得た。ffLuc を安定高発現する U87 細胞株も同様に得た。

脳スライス培養作成は、T cell-deficient mouse (U87 細胞株、HG008 細胞株や NSC を右線条体に移植) を非灌流下で断頭し Vibratome で 200 μ m 厚の脳切片を作成し、Millipore 社の sterile porous (0.4 μ m) insert membranes にのせ、培養液入りの Glass base dish に浮かせた。その後 dish を、共焦点レーザー顕微鏡の CO2 チャンバー内に入れ、timelapse で撮影を行った。

まず U87 を、 1×10^5 個 T cell-deficient mouse の右線条体に定量的に移植し 7 日後に、上記 HSVtk 発現ヒト iPS 細胞由来 NSC 5×10^5 個を、腫瘍上方 1mm に定量的に移植した。その翌日に上記方法にて脳スライス培養を開始し、timelapse で最大 7 日間の撮影を行った。Dish 内の medium には上皮成長因子、線維芽細胞増殖因子-2、白血球阻止因子、B-27 supplement などを含む公知のニューロスフェア培地を満たした。こうして、「NSC の腫瘍への明らかな指向性や、生体内での遊走速度」を解析した。次に U87 を 1×10^5 個右線条体に移植後 7 日目に、同部位腫瘍内に NSC を 5×10^5 個定量的に移植し、脳スライス培養を開始し同様に撮影した。Medium には GCV も投与した。こうして、「自殺遺伝子治療における HSVtk 発現 NSC の GCV に対する感受性、及びバイスタンダー効果による腫瘍細胞死誘導」をリアルタイムにとらえた。その後、NSC の移植細胞数を、 1×10^5 個~ 1×10^7 個と変えることで、「有効なバイスタンダー効果を起こす至適な移植幹細胞数」を同定した。さらに培地に 500mM の Temozolomide を加えた脳スライス培養とも比較し、「現標準治療 (Temozolomide) と自殺遺伝子療法の治療効果比較」も行った。さらに、「グリオーマ幹細胞の生体内での浸潤発育 (コントロールは上記 U87 細胞株とする)」、及び「グリオーマ幹細胞に対する NSC の指向性・バイスタンダー効果による腫瘍細胞死、さらに至適な移植幹細胞数」の解析も行った。HG008 細胞株は、移植後 30 日後に脳をスライスした。

4. 研究成果

我々は、ヒトグリオーマに対して、ヒト iPS 細胞由来の NSC を cellular delivery vehicle として用いる自殺遺伝子治療の開発を続けている。本研究では、細胞の可視化技術及び脳切片培養法を組み合わせた独自のスクリーニング法を樹立し、びまん性浸潤するグリオーマ幹細胞の生体内での浸潤様式を明らかとし、NSC のグリオーマ細胞・幹細胞への明らかな指向性や生体内での遊走速度を定量的に評価した。さらに、自殺遺伝子治療におけるバイスタンダー効果による腫瘍細胞死誘導効果を定量的に検討することにも成功した。いずれも、本治療戦略の臨床応用に際し、重要な基盤情報となる。本手法は細胞療法を行うあらゆる治療戦略で用いる事ができる評価系であり、今後さらに様々な細胞の挙動を解析する事にも応用できると考えられる。

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 0件）

1. 著者名 Tamura Ryota, Miyoshi Hiroyuki, Morimoto Yukina, Oishi Yumiko, Sampetean Oltea, Iwasawa Chizuru, Mine Yutaka, Saya Hideyuki, Yoshida Kazunari, Okano Hideyuki, Toda Masahiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Gene Therapy Using Neural Stem/Progenitor Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells: Visualization of Migration and Bystander Killing Effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 352 ~ 366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/hum.2019.326	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------