

機関番号：13802
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791354
 研究課題名（和文） 自殺遺伝子導入 iPS 細胞による悪性神経膠腫治療におけるバイスタンダー効果の研究
 研究課題名（英文） Study of bystander effect in the therapy of malignant gliomas by using induced pluripotent stem cell transduced with herpes simplex virus-thymidine kinase gene and ganciclovir
 研究代表者 小泉 慎一郎 (Koizumi Shinichiro)
 浜松医科大学 医学部 脳神経外科学 リサーチアシスタント
 研究者番号：10456577

研究成果の概要（和文）：自殺遺伝子導入人工多能性幹細胞（iPS 細胞）による悪性神経膠腫治療におけるバイスタンダー効果の評価を行ったが、難航の末、まず悪性神経膠腫へ向けての移動能を検討した。その結果、in vitro、in vivo の実験ともに、iPS 細胞は悪性神経膠腫への移動能を認め、またその移動能には腫瘍関連成長因子が関与していることが示された。本研究の結果により iPS 細胞をベクターとして用いる自殺遺伝子治療の可能性を示唆された。

研究成果の概要（英文）：I studied the bystander effect in the therapy of malignant gliomas by using induced pluripotent stem cell (iPS cell) transduced with herpes simplex virus-thymidine kinase gene and ganciclovir, however, it has run into difficulties. So, at first, I examined the migration ability of iPS cells to malignant glioma and tumor-associated specific growth factors in vitro and in vivo. iPS cell show intensive migratory to the malignant gliomas. And tumor-associated growth factors participate in migration. We suggested that iPS cell can become effective vehicles for delivering gene therapies to malignant glioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

日本における悪性神経膠腫の年間発生患者数は約 2300 人と推定され、そのうち悪性度の高い退形成性星細胞腫と悪性神経膠腫瘍の割合は合わせて 95%以上（約 2200 人）を占めているといわれている（2006 年）。ま

た、脳腫瘍全体で見ると、罹患率は 10 万人につき 46 人で、その約 20%が悪性神経膠腫とされており、さらに 1 年間に 10 万人につき約 10 人が腫瘍死している。悪性神経膠腫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、平均生存期間は約1年で、現在も多くの患者が命を落としている。その理由の一つとして、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があげられる。従って、術後放射線、化学療法などの *adjuvant therapy* に頼ることとなるが、これらの治療に対し腫瘍細胞は抵抗性を示す。一方悪性神経膠腫が中枢神経系以外に遠隔転移することは極めて稀なことであり、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いる。以上から、新たな治療戦略の開発が切望されており、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。

悪性神経膠腫に対する遺伝子治療は 1990年代に開発され、なかでも、*herpes simplex virus-thymidine kinase*(HSVtk)遺伝子と抗ウイルス剤 *ganciclovir*(GCV)による自殺遺伝子治療が最も広く研究され、既に欧米では臨床応用も進められている。自殺遺伝療法とは、腫瘍細胞に導入された酵素遺伝子の発現で、全身投与した *prodrug* を腫瘍内でのみ *active drug* に変換させ、抗腫瘍効果を発現させる治療法である。脳細胞自体はほとんど分裂能を有さないことを利用し、脳腫瘍への *retrovirus* を用いた遺伝子導入法では、選択的に腫瘍細胞に導入される。また、このシステムにおいては全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腫瘍細胞に対しても殺細胞効果が及ぶことが判明しており、*bystander* 効果とよばれる。遺伝子導入効率が 10%程度でも、*bystander* 効果により十分な殺細胞効果があることが確認されている (Namba et al, *Hum Gene Ther* 1998)。ラットなどの前臨床の動物実験では顕著な効果が見られたにもかかわらず、臨床成績は思うようないも

のではなかった (Rainov et al, *Hum Gene Ther* 2000)。その理由の一つに *retrovirus* 産生線維芽細胞を用いる方法では、それは移動能が低く、浸潤性に発育する腫瘍全体をカバーしきれなかったことがあげられる。

我々の教室ではこの流れをうけ、遺伝子の *vector* を工夫することで、抗腫瘍効果を最大限に発揮させる方法を追及してきた。自殺遺伝子療法の臨床応用の問題点や、ウイルス利用に伴う危険性を考慮し、HSVtk 遺伝子を導入した腫瘍細胞 (TK 細胞) を治療細胞として用いることを提唱し、基礎実験を進めてきた。結果として TK 細胞そのものが腫瘍細胞であることより、既存の腫瘍内に浸潤性に入り込み、周辺浸潤部位まで抗腫瘍効果が及ぶことがわかった (Namba et al, *Hum Gene Ther* 1998)。さらに、この抗腫瘍効果は TK 細胞が *syngenic* (腫瘍細胞と TK 細胞が同一個体由来のもの) であるときのみならず、*allogenic* (腫瘍細胞と TK 細胞が同一個体由来でない) でも生ずることを明らかにした (Namba et al, *Cancer Gene Ther* 2000)。また、TK 細胞自体も移植後 1-2 週間の末、すべて死滅することも一連の実験で示してきた。これは TK 細胞療法が安全弁を持つことを意味するが、いかに致死性疾患の治療法とはいえ、*viable* な腫瘍細胞を移植することは倫理的に議論の余地が残り、またプロトコール上、患者に負担がかかり非現実的である。

その観点から、我々は腫瘍細胞の代わりに神経幹細胞 (NSC; *neural stem cell*) を *vector* として応用することを考えた。HSVtk 遺伝子導入 NSC (NSCtk) を作成、脳腫瘍モデルラットに移植し、GCV の全身投与により既存の脳腫瘍を消失させることに成功している (Li et al, *Cancer Gene Ther* 2005)。さらに、顕著な *bystander* 効果により、NSCtk が腫瘍細胞の 1/16 の量でも腫瘍消失

が確認された (Li et al, Oncology 2005)。また、NSC は脳内で極めて活発な移動能をもつことが知られており、動物実験において、腫瘍細胞と NSC を別々に左右の脳に移植して観察すると NSC が対側の脳腫瘍まで移動し、腫瘍への集積性があることがわかっている。この NSC の移動能に注目し、NSCtk を腫瘍対側に移植し、GCV 投与による治療を行っても、NSCtk は腫瘍へ遊走し、bystander 効果を有し、腫瘍縮小効果があることが明らかになった (Li et al, Cancer Letters 2007)。以上の結果を踏まえ、臨床応用を検討したが、NSC を患者より取り出すのは侵襲が大きく、細胞入手の面から非現実的と考えられる。

そこで、より容易に治療細胞を得るために、骨髄より採取できる間葉系幹細胞 (MSC; mesenchymal stem cell) を用い、MSCtk を vector とした自殺遺伝子療法の抗腫瘍効果を検証したが、NSCtk と同等かそれ以上の良好な移動能と bystander 効果が認められた (Amano et al, 2010)。倫理的な問題や細胞入手の簡便性等の面から、現実的な手法であると考えられるが、bystander 効果にばらつきがあるなどの細胞の quality control に問題が残る。

2. 研究の目的

2007 年、京都大学山中伸弥教授らの研究グループは iPS 細胞の開発に成功し、マウス iPS 細胞の世界的な提供が開始された。今後の iPS 細胞の発展性、臨床応用を考慮すると、他の幹細胞と比較し採取も容易であり、遺伝子治療の vector として iPS 細胞を用いることは、より現実的と考える。悪性神経膠腫に対する幹細胞を用いた遺伝子治療の最終的な到達点として、この iPS 細胞に HSVtk 遺伝子導入を行い (iPStk)、vector とした遺伝子治療の臨床応用に向けての基礎実験を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

今回の研究の目的は、今後の iPS 細胞の臨床応用のために、マウス iPS 細胞を用いた基礎実験として bystander 効果を検証することである。つまり、腫瘍細胞に対してどれほど iPS 細胞があれば bystander 効果による抗腫瘍効果が期待できるのか、また、どの時期に GCV を投与するのが適切なのかなどを調査する。in vitro において、iPStk 細胞が bystander 効果がどの程度の細胞比率で起こるのか、また抗腫瘍効果を発現させる適切な GCV の投与開始時期、期間、濃度などを検討する。in vivo では、bystander 効果による抗腫瘍効果が最大になる iPStk 細胞の移植濃度や、GCV の投与開始時期、期間、濃度などを検討する。

4. 研究成果

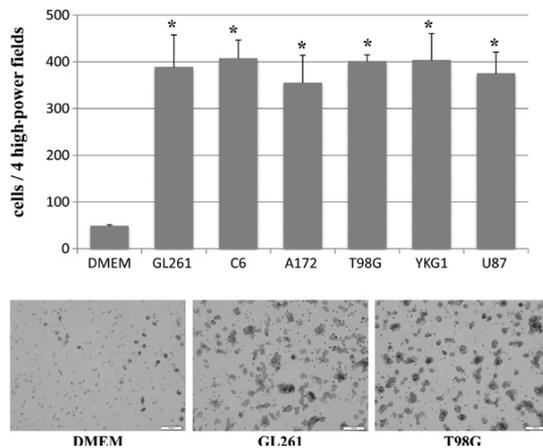
(1) 当初の研究目的を全うすべく、上記方法にて、実際の実験を行ってきたが、思うような遺伝子導入ができず、良好なバイスタンダー効果を見出すことができなかった。このため、まずこれまで神経幹細胞や間葉系幹細胞で確認されてきた悪性神経膠腫へ向けての移動能が、iPS 細胞においても認められるかどうかを検討する目的にて、悪性神経膠腫培養液ならびにそこに含まれる腫瘍関連成長因子を用いた in vitro の評価を行った。

(2) 方法：細胞の移動能評価には double chamber system (24well) を用いた。上部 chamber にマウス iPS 細胞 (5×10^4)、下部 chamber に悪性神経膠腫細胞株 (マウス: GL261、ラット: C6、ヒト: A172、T98G、YKG1、U87) の培養液 (conditioned medium; CM) または未処理培養液 (unconditioned medium; UCM) を入れ、24 時間培養し、上部から下部に移動したマウス iPS 細胞数を顕微鏡下に 4 high power fields の合計で比較検討した。次に下部に腫瘍関連成長因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)、stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)、stem cell factor (SCF) を加えた medium を入れ (0.1、1、10、100 ng/ml) 検討した。さらに CM に各腫瘍関連成長因子の中和抗体 (1、10 μ g/ml) を加えることによる抑制効果を検討した。

マウスiPS細胞側における各腫瘍関連成長因子に対応する受容体vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)、c-Kitの発現程度をreverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法により検討した。

(3) 結果：移動したマウス iPS 細胞数はそれぞれ UCM; 48±2.9、GL261; 388±69.7、C6; 407±39.6、A172; 355±59.2、T98G; 401±14.1、YKG1; 403±57.7、U87; 375±46.2で、いずれの CM 群でも、UCM 群と比較して有意に多かった(p<0.001) (Fig. 1)。

Fig. 1



また、いずれの腫瘍関連成長因子存在下でも移動したマウス iPS 細胞は濃度依存性に増加していた。CM 内に各腫瘍関連成長因子の中和抗体を加えると、マウス iPS 細胞の移動は濃度依存性に減少した(Fig. 2, 3)。

Fig. 2

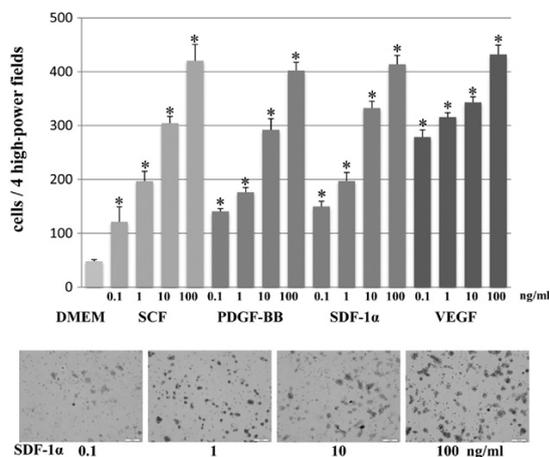
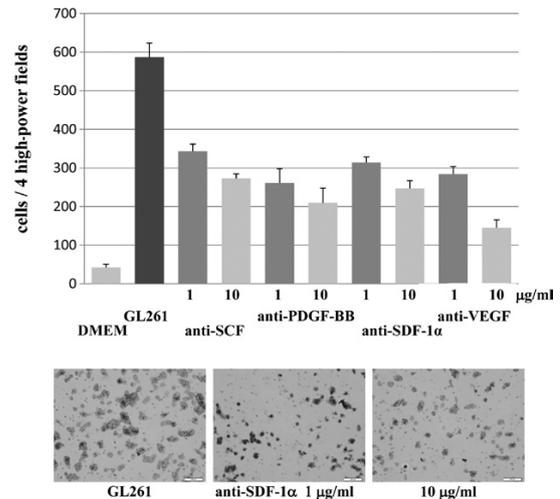
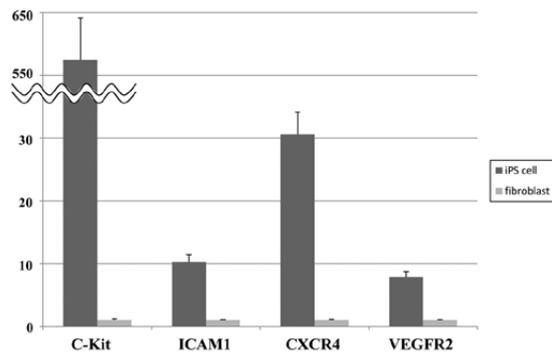


Fig. 3



RT-PCR 法による検討では、マウス iPS 細胞における各腫瘍関連成長因子受容体発現はマウス線維芽細胞と比較して有意に上昇していた(p<0.001) (Fig. 4)。

Fig. 4



(4) 考察：マウス iPS 細胞の悪性神経膠腫培養液に向けての有意な移動能を確認した。悪性神経膠腫が多種多様の腫瘍関連成長因子を分泌していることは既に知られており、今回用いた VEGF、PDGF-BB、SDF-1α、SCF はそれらの代表的な因子である。今回の実験において、マウス iPS 細胞は、これら 4 因子に対しても良好な移動能を有し、また一方、CM にこれらの中和抗体を加えることにより移動能は抑制された。さらにマウス iPS 細胞側では 4 因子に対する受容体(VEGFR2、ICAM-1、CXCR4、c-Kit)の発現も確認された。以上のことから、悪性神経膠腫とマウス

iPS 細胞間には、いくつかのリガンド・受容体相互作用が働いており、この作用の影響によりマウス iPS 細胞は悪性神経膠腫への有用な移動能を有していると示唆された。マウス iPS 細胞の移動能がマウスのみならずラットやヒト腫瘍細胞株に対しても移動能を示したことも興味深い。

今回の研究結果は、脳内に広く浸潤する悪性神経膠腫に対する遺伝子導入幹細胞治療研究において、iPS 細胞をベクターとして用いることが有望な戦略であることを示唆している。今後の iPS 細胞の発展性、利便性、将来性を考慮すると、遺伝子治療のベクターとして iPS 細胞を用いることは、より臨床応用の実現性が高いと考える。今後、自殺遺伝子導入 iPS 細胞による治療効果を検証し、さらに臨床応用を考慮し、「細胞の安全性（腫瘍形成能）」や「治療の安全性（治療後の脳損傷の有無）」なども検証していきたいと考えている。

(5) 結語：悪性神経膠腫培養液ならびにそこに含まれる腫瘍関連成長因子を用いて、マウス iPS 細胞における悪性神経膠腫へ向けての移動能の *in vitro* の評価を行い、腫瘍関連成長因子である VEGF、PDGF-BB、SDF-1 α 、SCF が関与していることが示された。本研究の結果により iPS 細胞をベクターとして用いる自殺遺伝子治療の可能性を示唆する。

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 1 件)

Shinichiro Koizumi, Migration of mouse induced pluripotent stem cells to glioma conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors, *Oncology Letter*, 査読有, 2,2011, 283-288

[学会発表] (計 5 件)

①小泉慎一郎、*in vitro*、*in vivo*における悪性神経膠腫へのマウス iPS 細胞の移動能の基

礎評価、第 28 回日本脳腫瘍学会、2010 年 11 月 28 日～30 日、軽井沢

②小泉慎一郎、マウス iPS 細胞における、悪性神経膠腫および成長因子への移動能、特異的指向性の基礎評価、第 69 回日本脳神経外科学会総会、2010 年 10 月 27～29 日、福岡

③小泉慎一郎、マウス iPS 細胞における悪性神経膠腫、成長因子への移動能の評価、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪

④Shinichiro Koizumi, Migration of mouse induced pluripotent stem cells to glioma conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors, 10th Kyungpook Hamamatsu Joint Medical Symposium, 2010/09/17, Hamamatsu

⑤小泉慎一郎、マウス iPS 細胞における悪性神経膠腫、specific growth factors への移動能の基礎評価、第 11 回日本分子脳神経外科学会、2010 年 8 月 27～28 日、仙台

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 慎一郎 (Koizumi Shinichiro)

浜松医科大学 医学部 脳神経外科学

リサーチアシスタント

研究者番号：10456577