様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １０ 日現在

機関番号： １３８０２
研究種目： 基盤研究(C)
研究期間： 2011～2013
課題番号： ２３５９２１１９

研究課題名（和文） 人工多能性幹細胞の悪性グリオーマへの移動能の検討

研究課題名（英文） Malignant glioma tropism of induced pluripotent stem cell

研究代表者
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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,900,000円、（間接経費）　1,170,000円

研究成果の概要（和文）：　Matrigel invasion assayにおいて、iPS細胞の各種glioma cell lineのcondition mediumへの移動能を確認した。これは悪性グリオーマが分泌する各種成長因子でも同様の所見がみられ、かつ成長因子の一次抗体で抑制された。さらにiPS細胞において、成長因子のレセプターが優位に発現しており、iPS細胞の移動能に成長因子とそのレセプターが関与していると考えられた。
　マウス脳への腫瘍およびiPS細胞の移植実験では、移植7日後の脳組織切片において、BrdUでラベルしたiPS細胞が、対側に移植した腫瘍細胞（GL261）まで移動していることを証明した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we tested tumor tropic activity of mouse iPSCs using in vitro Matrigel Invasion assay and in vivo mouse intracranial tumor model. Mouse iPS cells showed a significant tropism to the conditioned media prepared from glioma cell lines and this tropism to the glioma conditioned media was partially blocked by the neutralizing antibodies for four major tumor-associated growth factors. The receptors for those growth factors, measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction, were highly up-regulated in the mouse iPS cells compared to the mouse fibroblasts. Mouse iPSCs labeled with 5-bromo-2-deoxyuridine were intracranially implanted in the contralateral hemisphere to the GL261 glioma cell implantation in the allogeneic C57BL/6 mouse. Active migration of iPSCs was observed 7 days after implantation. These findings demonstrated that iPSCs had potent glioma tropism and could be candidates as vehicles in stem cell-based glioma therapy.

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：人工多能性幹細胞　悪性グリオーマ　移動能

１．研究開始当初の背景

脳腫瘍の発生は年間 10 万人に 10-15 人と考えられている。脳との境界が明瞭な良性腫瘍では手術療法のみで治癒することも可能だが、全脳腫瘍の約 1/3 を占めるグリオーマにおいては、腫瘍が脳内を浸潤性に発育し正常脳組織との境界が不明瞭で、かつ他の臓器と異なり、広範摘出術ができないため、基本的に手術療法は常に非治癒手術となる。残存腫瘍に対しては放射線療法や抗がん剤が用いられる。近年の腫瘍の分子生物学や放射線療法の発達には目を見張るものがあるが、悪性グリオーマの予後は未だ極めて不良であり、最も悪性の膠芽腫では生存中間値は一年程度にすぎず、治療成績は過去 30 年間ほとんど改善されていない。つい最近、テモゾロミドと呼ばれる抗がん剤が日本でも使えるようになり話題になったが、生存中間値が約 2.5 ヶ月延長されたに過ぎず、新たな治療法の開発が必須である。

一方、他の臓器の悪性腫瘍と異なり、悪性グリオーマが脳外に転移することは極めてまれであり、再発の多くは局所再発である。したがって残存腫瘍に対し、術後の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。このような発想ですべての悪性腫瘍の中で最初に遺伝子治療が試されたのが悪性グリオーマであった。この遺伝子治療ではレトロウイルスベクターを用いて単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk)/遺伝子を腫瘍細胞へ導入させ、prodrug であるガンシクロビル(GCV)を全身投与する方法が用いられており「自殺遺伝子療法」と呼ばれ脚光をあびた。理論的には癌の遺伝子治療においては、すべての癌細胞に遺伝子が導入されなければ治癒にはつながらないと考えられるが、治療遺伝子をすべての細胞に導入することはもちろん不可能である。しかしながらこの HSVtk/GCV システムにおいては、遺伝子導入効率が高々10%程度でも、周囲の腫瘍細胞がすべて消えてしまう現象がラットの研究で判明し「バイスタンダー効果」とよばれている。このような遺伝子非導入細胞に対しても殺細胞効果がおよぶ自殺遺伝子治療特有の極めて好都合な現象を背景に米国において悪性グリオーマに対する臨床試験が行われたが、当初のプロトコルであった HSVtk レトロウイルス産生線維芽細胞を腫瘍内に注入する方法では、思ったような臨床効果が得られなかった（Ram Z, Nature Medicine, 1997)。ヒトの脳はラットなどの実験動物に比較して大きく、グリオーマ細胞は治療当初よりかなり広範な脳領域まで浸潤しているため、レトロウイルスベクターでは治療範囲に制限があることが原因の一つと考えられている。

HSVtk/GCV 遺伝子治療においては、バイスタンダー効果というがん治療には極めて好都合な現象があることから、われわれはベクターに関する問題点を解決し、グリオーマに対する新たな HSVtk/GCV 遺伝子治療戦略の開発を目指してきた。ベクター細胞としてまずは遺伝子導入腫瘍細胞を利用したところ、既存の腫瘍の対する抗腫瘍が認められた（Namba et al, Hum Gene Ther 1998)。臨床応用を考慮し、さらに安全かつ遊走能の高い細胞を探索し、HSVtk 遺伝子を導入した神経幹細胞（TK 神経幹細胞）を用いる研究を展開した。

もとより神経幹細胞は損傷された脳組織を修復することがその機能の一つと考えられることから、治療範囲が飛躍的に広がることが期待されたが、実際、予想をはるかに超える遊走能と腫瘍細胞に対するきわめて高い集積性があることが判明した（Li, Tokuyama, Namba, et al, Cancer Lett 2007)。さらに HSVtk 遺伝子を導入した神経幹細胞とグリオーマ細胞株の間には、極めて強力なバイスタンダー効果があり、既存のラット脳腫瘍モデルを HSVtk 遺伝子導入神経幹細胞の腫瘍内注入と GCV の全身投与により治癒させることにも成功している（Li, Tokuyama, Namba, et al, Cancer Gene Ther 2005)。実際の臨床応用を考慮し、成人脳（患者自身）より十分な量のベクター細胞を得るために、2006-2008 年の研究では骨髄より比較的容易に採取できる間葉系幹細胞を用いる研究を進めてきた。HSVtk 遺伝子導入間葉系幹細胞（TK 間葉系幹細胞）には TK 神経幹細胞とほぼ同等のバイスタンダー効果と腫瘍指向性があり、代用可能であることが示唆された（Amano, Namba, et al, Int J Oncol, 2009)。

このように「TK 神経幹細胞療法」や「TK 間葉系幹細胞療法」は致死的疾患である悪性グリオーマに対するきわめて有効な遺伝子／細胞療法と考えられ、またこれらの細胞がそもそもは非致死的な神経再生療法などに用いることを目的とした細胞であることより、細胞の安全性は担保されており、臨床応用は可能と思われる。つまり「TK 幹細胞療法」自体はすでに実験的には完成しており、どのような「幹細胞」を臨床用ベクター細胞として選択するかが問題である。2007 年に京都大学から発表された「皮膚細胞から得られた iPS 細胞」は私たちの一連の研究にもインパクトを与えた。皮膚から採取できるという簡便性と安定した細胞の性質は「HSVtk 遺伝子導入 iPS（iPStk）細胞療法」への新たな展開を期待させるものである。

２．研究の目的

悪性グリオーマは脳内を浸潤性に広がる腫瘍であるが、脳を広範に摘出することができないことから、外科手術では治癒不能である。放射線療法や化学療法を用いても、その予後は極めて悪く、過去 30 年間ほとんど改善が見られていない。このような浸潤腫瘍を

ターゲットに、これまでわれわれは脳内を自由に遊走し腫瘍に集積する神経幹細胞や間葉系幹細胞をベクターとする自殺遺伝子治療を開発し、その有用性と安全性を検証してきた。

今回、iPS 細胞をベクター細胞として自殺遺伝子療法に応用できるかiPS 細胞の移動能（腫瘍への指向性）を検証することを研究目的とした。将来的な臨床応用を前提に、腫瘍への移動能、集積性の検証は極めて重要であり、それが確認されれば、自殺遺伝子治療における投与方法に飛躍的な step up をもたらすことが可能である。

３．研究の方法

①iPS 細胞培養手技の確立

②in vitro での移動能の検証

in vitro において、各種 glioma cell line(マウス：GL261、ラット：C6、ヒト：A172, T98G, YKG1,U87)の condition medium (腫瘍細胞を培養していた medium)を用い、通常移動能を見る際に用いられる 2 層式の chamber（Matrigel invasion assay）を用い、移動能の判定を行った。コントロールとして、何も入っていない medium(DMEM without FBS)を用いる。chamber 上層に iPS 細胞、chamber 下層に condition medium または、DMEM を入れ、下層へと移動した iPS 細胞を数え、比較検討を行った。同様に、下層に condition medium でなく、各種成長因子 VEGF（vascular endotherial growth factor）、PDGF-BB（platelet-derived growth factor-BB)、SDF-1α（stromal cell-derived factor-1α)、SCF（stem cell factor）の濃度を変更（0.1-100 ng/ml）しながら DMEM に入れたものを使用し、iPS 細胞の移動能を検証した。上記で検証した各種 growth factors（VEGF、PDGF-BB、SDF-1α、SCF）に対する一次抗体を濃度変更(1-10μg/ml）しながら condition medium 内に投与し、chamber 下層に入れ、上層に iPS 細胞を入れ、iPS 細胞の移動能の評価を行った。続いて、RT-PCR 法において iPS 細胞の VEGF、PDGF-BB、SDF-1α、SCF に対する receptor、VEGFR2（vascular endotherial growth factor receptor2）、ICAM1（intercellular adhesion molecule1）、CXCR4（CXC chemokine receptor4)、c-Kit の発現を fibloblast 等と比較して上昇しているか検証した。

③マウス脳腫瘍モデルの作成

マウス（C57BL/6）を用い、脳腫瘍モデルを作成した。腫瘍細胞（GL261）を神経幹細胞の培養液で培養することによって、GL261 sphere cell を作成し、これを 1×10^4 個程度、脳内に移植することにより約 3 週間程度で確実に腫瘍死するモデルを確立した。

④iPS-SPIO 細胞の作成、in vivo におけるその移動能の検証

HVJ-E（Hemagglutinating virus of Japan - envelope）を用い、SPIO(Resovist)を iPS 細胞に transfection し、マウス脳腫瘍モデルを用い、iPS-SPIO 細胞の腫瘍への移動能の評価を経時的に動物用 3T-MRI を撮像することにより、腫瘍に向かい移動している iPS-SPIO 細胞の追跡を行おうとしたが、この方法での検証は困難であったため、方法を⑤に変更した。

⑤BrdU でラベルした iPS 細胞の、in vivo における移動能の検証

GL261 sphere cell を 1×10^4 個脳内に移植し、同時に対側脳に BrdU でラベルした iPS 細胞を 1×10^4 個に移植し、7 日後に脳を取り出し、iPS 細胞が腫瘍に向かい移動しているかどうかを検討した。

４．研究成果

Magrigel invasion assay において、iPS 細胞は各種 glioma cell line の condition medium(CM)への移動能が認められ(図１)、これは悪性グリオーマが分泌する各種成長因子でも同様に移動能がみられ（図２)、この移動能は濃度に依存して増強された≪図３)。また、移動能は成長因子の一次抗体によって抑制された≪図４)。さらに iPS 細胞において、成長因子の receptor が優位に発現しており（図４)、iPS 細胞の移動能に growth factor/receptor interactions が関与していると考えられた。

マウス脳内での移植実験では、移植 7 日後の脳組織切片において、BrdU でラベルした iPS 細胞が、対側に移植した腫瘍細胞(GL261）まで移動していることを証明した(図５)。

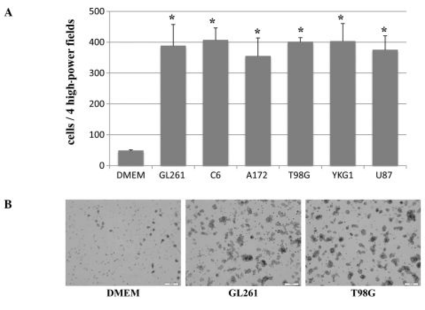

図１　各種 glioma cell line(マウス：GL261、ラット：C6、ヒト：A172, T98G, YKG1,U87)の condition medium(腫瘍細胞を培養していた medium)を用い、2 層式の chamber(Matrigel invasion assay）を用い、移動能の判定を行ったところ、コントロールである DMEM に対して、優位に移動した細胞数が増加していた。

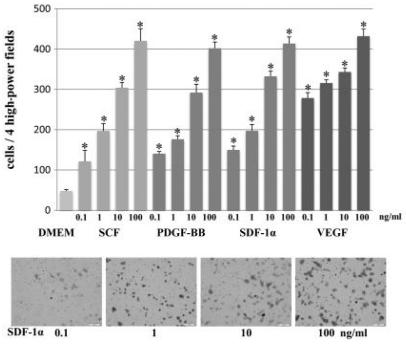

図２　下層に condition medium でなく、VEGF（vascular endothelial growth factor）、PDGF-BB（platelet-derived growth factor -BB）、SDF-1α（stromal cell-derived factor-1α）、SCF（stem cell factor）を用い、さらに濃度を変更（0.1-100 ng/ml）したところ濃度依存的に移動する iPS 細胞の細胞数が増加した。

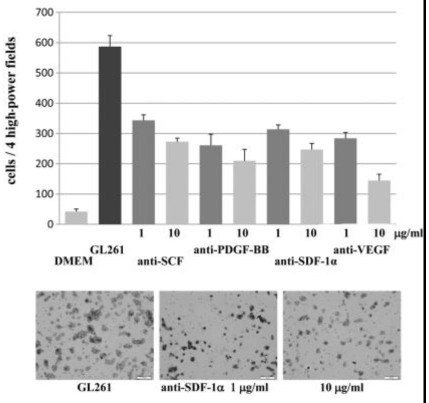

図３　GL261 の condition medium に各種 growth factors（VEGF、PDGF-BB、SDF-1α、SCF）に対する一次抗体を濃度変更(1-10μg/ml）しながら condition medium 内に投与したところ、iPS 細胞の移動能が抑制された

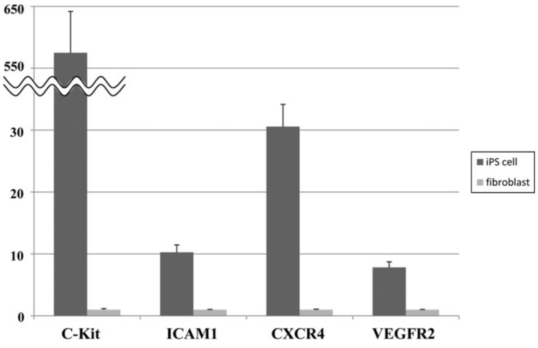

図４　RT-PCR 法において iPS 細胞の VEGF、PDGF-BB、SDF-1α、SCF に対する receptor、VEGFR2（vascular endotherial growth factor receptor2)、ICAM1（intercellular adhesion molecule1）、CXCR4（CXC chemokine receptor4)、c-Kit の発現は fibloblast と比較して上昇していた（それぞれの発現量はベーターアクチンのそれとの比)。

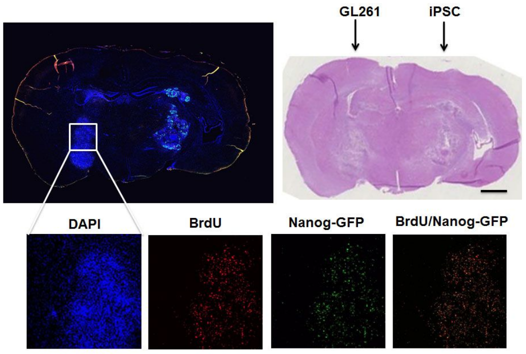

図５　GL261 sphere cell を 1×10^4 個脳内に移植し、同時に対側脳に BrdU でラベルした iPS 細胞を 1×10^5 個に移植した。7 日後に脳を取り出し、免疫染色したところ、腫瘍側に BrdU で染色される iPS 細胞が観察された。

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）

Koizumi S, Gu C, Amano S, Yamamoto S, Ihara H, Tokuyama T, Namba H.Migration of mouse-induced pluripotent stem cells to glioma-conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors Oncol Lett. 2(2) 283-288 2011

〔学会発表〕（計　３　件）

難波宏樹、小泉慎一郎、山添知宏、起本由美子、金子新、中内啓光

A potent in vitro bystander effect in the suicide gene therapy using iPS cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir

第 17 回日本遺伝子治療学会(2011.7.15-17、博多

小泉慎一郎、山添知宏、徳山勤、酒井直人、山崎友裕、起本由美子、金子新、中内啓光、難波宏樹

自殺遺伝子導入人工多能性幹細胞の glioma 治療への応用

第 70 日本癌学会学術総会（2011.10.3-5、名古屋）

山添知宏、小泉慎一郎、徳山勤、酒井直人、山崎友裕、起本由美子、金子新、中内啓光、

難波宏樹
単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ導入 iPS 細胞を用いたグリオーマ治療
第 12 回日本分子脳神経外科学会
（2011.10.14-15、横浜

〔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〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
徳山　勤（TOKUYAMA, Tsutomu）
浜松医科大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：90313957

(2)研究分担者
難波宏樹（NAMBA, Hiroki）
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：60198405