

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293306

研究課題名(和文) Muse細胞をベクターとする悪性グリオーマの自殺遺伝子治療

研究課題名(英文) Genetically-engineered multilineage-differentiating stress-enduring cells as cellular vehicles against malignant gliomas

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマの新規治療として単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HSVtk)とガンシクロビル(GCV)を用いる自殺遺伝子療法が注目されている。骨髄などから得られる多分化能細胞、Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞をベクターとするHSVtk/GCV自殺遺伝子治療の可能性を評価した。ヒトグリオーマ細胞を用いたヌードマウス脳腫瘍モデルに対し、遺伝子導入ヒトMuse細胞の腫瘍内投与とGCVの全身投与による治療は著名な腫瘍縮小効果と生存率の延長を示す。本治療は安全かつ有効であり、悪性グリオーマの新規治療として臨床応用に期待が寄せられる。

研究成果の概要(英文)：Suicide gene therapy based on the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir (GCV) is an efficient strategy for treating malignant gliomas. In the present study, we evaluated treatment with multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells, endogenous non-tumorigenic pluripotent-like stem cells, as carriers of the HSVtk gene. HSVtk gene-transduced human Muse cells (Muse-tk cells) showed a potent in vivo bystander effect and migratory activity toward glioma cells. Intracranial U87 gliomas in nude mouse brains injected intratumorally with Muse-tk cells followed by intraperitoneal GCV administration were significantly reduced in size within 2 weeks. These findings suggest that intratumoral Muse-tk cell injection followed by systemic GCV administration is safe and effective, and that allogeneic Muse-tk cell-mediated suicide gene therapy for malignant glioma is clinically feasible.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：glioma gene therapy stem cells bystander effect migration viral thymidine kinase ganciclovir

## 1. 研究開始当初の背景

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。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。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。近年、臨床応用を考慮し、骨髄などより比較的容易に採取できる間葉系幹細胞が注目されている。

## 2. 研究の目的

最近、ヒトの骨髄や脂肪組織など間葉系組織から得られる多様な分化能をもつ細胞、Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞が腫瘍形成を起こさない安全性の高い細胞として注目されている。本研究では Muse 細胞をベクターとする HSVtk/GCV 自殺遺伝子治療の開発を目的としている。

## 3. 研究の方法

### 1) Muse-TK 細胞の作製と in vitro バスタンダー効果

Muse 細胞は連携研究者の出澤らの研究室で作成されており、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子および GFP マーカー遺伝子を導入したヒト Muse 細胞 (Muse-TK-GFP 細胞) がすでに作成されている。ヒト Muse-TK 細胞とヒトグリオーマ細胞 (U87, U251;  $5 \times 10^3$ ) をさまざまな比率で混合培養 (Muse-TK:tumor 比を 1:1 から 1:128 まで)、GCV (2  $\mu\text{g/ml}$ ) 存在下で培養し腫瘍細胞の増殖能を観察する。

### 2) in vivo バスタンダー効果

In vivo で経時的に腫瘍の大きさを測定するために、luciferase 導入 U87 細胞 (U87-luc) を用い、nude mouse に移植した。U87-luc 細

胞数を  $1 \times 10^5$  で固定し、Muse-TK 細胞数を徐々に減らし (Muse-TK:tumor 比を 1:1 から 1:64 まで) マウス脳内に移植、同日より GCV (30 mg/kg/day) または生食を 10 日間腹腔内投与し、経時的に luciferin 投与による発光で腫瘍サイズを評価するとともに、生存期間を比較した。

### 3) マウス脳内腫瘍治療実験

Nude mouse 脳内に U87-luc 細胞を移植し ( $1 \times 10^5$ )、脳腫瘍を確立した 7 日後に、腫瘍内に Muse-TK 細胞 ( $1 \times 10^5$ ) または生食を注入した。その翌日より GCV (30 mg/kg/day) または生食を腹腔内投与し、経時的に luciferin 投与による発光で腫瘍サイズを評価するとともに、生存期間を比較した。

### 4) 腫瘍移植と対側脳への Muse-TK 投与による Muse 細胞の移動能の評価

Nude mouse 一側脳内に U87-luc 細胞を移植し ( $1 \times 10^5$ )、翌日、対側脳内に Muse-TK 細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を投与する。同日より GCV (30 mg/kg/day) または生食を 10 日間腹腔内投与し、経時的に luciferin 投与による発光で腫瘍サイズを評価するとともに、生存期間を比較した。

## 4. 研究成果

### 1) in vitro バスタンダー効果

GCV 存在下での培養では Muse-TK:tumor 比が 1:1 から 1:64 まで有意な腫瘍抑制効果があり、U87 細胞の方が U251 細胞に比しより in vitro バスタンダー効果が強力だった。

### 2) in vivo バスタンダー効果

生食群では腫瘍の急速な増大がみられ、全動物が 60 日程度で腫瘍死した。一方 GCV 投与群では Muse-TK:tumor 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 でも強力なバスタンダー効果が確認された。

### 3) マウス脳内腫瘍治療実験

GCV 投与群では対照群 (Muse-TK なし、または GCV なし) に比し、腫瘍の大きさは有意に小さかった ( $p < 0.05$ )。対照群では全例 60 日程度で腫瘍死するが、GCV 群では生存期間が有意に延長し ( $p < 0.001$ )、10 匹中 4 例で 200 日以上長期生存し、治癒したのもと思われた。

### 4) 腫瘍移植と対側脳への Muse-TK 投与による Muse 細胞の移動能の評価

Nude mouse において、腫瘍と対側に Muse-TK 細胞を投与したときでも、GCV 投与群では対照群に比し有意な腫瘍サイズの縮小 ( $p < 0.05$ ) と生存期間の延長 ( $p < 0.05$ ) が認められた。これは対側脳に投与された Muse-TK 細胞が腫瘍に遊走しバスタンダー効果により腫瘍の増殖を抑制したものと考えられた。

以上の結果より、Muse 細胞を運び屋として用いた HSVtk/GCV 遺伝子治療は、強力なバスタンダー効果と腫瘍への遊走能により、腫瘍の縮小および生存期間の延長をもた

らすものと考えられた。その効果は、これまで行ってきた神経幹細胞を用いた結果に匹敵する。採取が困難な神経幹細胞にかわり、Muse 細胞を用いた HSVtk/GCV 遺伝子治療の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 6 件)

Kawaji H, Koizumi S, Sakai N, Yamasaki T, Hiramatsu H, Kanoko Y, Kamiya M, Yamashita S, Takehara Y, Sakahara H, Namba H: Evaluation of tumor blood flow after feeder embolisation in meningiomas by arterial spin labeling perfusion magnetic resonance imaging. J.Neuroradiol 40 (4): 303-306, 2013 査読有

Sakai N, Koizumi S, Yamashita S, Takehara Y, Sakahara H, Baba S, Oki Y, Namba H: Arterial spin-labeling perfusion imaging reflects angiogenesis in non-functioning pituitary macroadenomas. AJNR Am J Neuroradiol 34 (11): 2139-2143, 2013 査読有

Yamazoe T, Koizumi S, Yamasaki T, Amano S, Tokuyama T, Namba H: Potent tumor tropism of induced pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells in the mouse intracerebral glioma model. Int J Oncol 46 (1): 147-152, 2015 査読有

Koizumi S, Sakai N, Kawaji H, Takehara Y, Yamashita S, Sakahara H, Baba S, Hiramatsu H, Sameshima T, Namba H: Pseudo-continuous arterial spin labeling reflects vascular density and differentiates angiomatous meningiomas from non-angiomatous meningiomas. J Neurooncol 121(3): 549-556, 2015 査読有

Kawaji H, Tokuyama T, Yamasaki T, Amano S, Sakai N, Namba H: Interferon- $\beta$  and temozolomide combination therapy for temozolomide monotherapy-refractory malignant gliomas. Mol Clin Oncol 3(4): 909-913, 2015 査読有

Namba H, Kawaji H, Yamasaki T: Use of genetically engineered stem cells for glioma therapy. Oncol Lett 11 (1): 9-15, 2016 査読有  
Yamasaki T, Wakao S, Kawaji H, Koizumi S, Sameshima T, Dezawa M, Namba H: Genetically-engineered multilineage-differentiating stress-enduring cells as cellular vehicles against malignant gliomas. Mol Ther Oncolytics, in press

〔学会発表〕(計 5 件)

難波宏樹、山添知宏、山崎友裕、小泉慎一郎、天野慎士、若尾昌平、土山健一郎、出澤真理: Potent in vitro bystander effect and migratory activity in the suicide gene therapy using Muse cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir. 第 19 回日本遺伝子治療学会 (2013.7.4-6、岡山)

難波宏樹、山崎友裕、山添知宏、川路博史、若尾昌平、出澤真理: Potent in vivo bystander effect of the suicide gene therapy to glioblastoma using Muse cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir. 第 20 回日本遺伝子治療学会 (2014.8.6-8、東京)

山崎友裕、若尾昌平、川路博史、天野慎士、酒井直人、徳山勤、出澤真理、難波宏樹: HSVtk 遺伝子導入 Muse 細胞を用いたグリオーマの自殺遺伝子幹細胞治療. 第 74 回日本脳神経外科学会総会 (2015.10.14-16、札幌)

難波宏樹、山崎友裕、若尾昌平、出澤真理: Genetically-engineered multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells as cellular assassins against malignant gliomas. 第 22 回日本遺伝子治療学会 (2016.7.28-30、東京)

山崎友裕、難波宏樹、若尾昌平、出澤真理: HSV 遺伝子導入 Muse 細胞の腫瘍指向性を用いた新規悪性グリオーマ治療戦略. 第 75 回日本脳神経外科学会総会 (2016.9.29-10.1、博多)

〔図書〕(計 件)  
計 0 件

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)  
名称: 脳腫瘍治療のための多能性幹細胞  
発明者: 難波宏樹、出澤真理、吉田正順  
権利者: 国立大学法人浜松医科大学、国立大学法人東北大学  
種類: A: 創薬に関する研究成果に係わる特許  
番号: 特願 2015-503024  
出願年月日: 2014 年 2 月 27 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 件)  
計 0 件

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 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

天野 慎士 (AMANO SHINJI)  
浜松医科大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：70464138

(3)連携研究者

出澤 真理 (DEZAWA MARI)  
東北大学・医学部・教授  
研究者番号：50272323

(4)研究協力者

( )