

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670194

研究課題名(和文)ES/iPS細胞の腫瘍化を克服し再生医療応用を実現するベクター技術の開発

研究課題名(英文)The development of the novel vector that eliminates ES/iPS cell-derived tumor to realize regenerative medicine

研究代表者

小賤 健一郎(Kosai, Ken-ichiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90258418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまで間接的な腫瘍化抑制に過ぎなかったES/iPS細胞の「腫瘍化克服」への取り組みにおいて、革新的な癌遺伝子治療技術として独自開発したSurvivin反応性m-CRA(Surv.m-CRA)を応用し、本問題を克服する技術開発を行う。

正常ヒトES/iPS細胞の未分化状態でのSurvivinの役割は解析されていなかったが、本研究で、ヒトES/iPS細胞の未分化状態でのSurvivinプロモーター活性が高レベルで、未分化細胞をSurv.m-CRAが特異的に殺傷できることを見出した。さらにin vivoでの細胞移植による奇形腫形成試験では、完全に腫瘍化発生を阻止できることまで見出した。

研究成果の概要(英文)：Incomplete abolition of tumorigenicity creates potential safety concerns in clinical human pluripotent stem cells (hPSCs)-based regenerative medicine. We found that conditionally replicating adenoviruses that specifically target cancers using multiple factors (m-CRAs), originally developed as anticancer drugs, may also be useful as novel antitumorigenic agents in hPSC-based therapy. The survivin promoter was more active in undifferentiated hPSCs than the telomerase reverse transcriptase (TERT) promoter, whereas both promoters were minimally active in differentiated ones. Accordingly, survivin-responsive m-CRA (Surv.m-CRA) killed only undifferentiated hPSCs, but not differentiated ones, more efficiently than TERT-responsive m-CRAs (Tert.m-CRA). Pre-infection of hPSCs with Surv.m-CRA or Tert.m-CRA abolished in vivo teratoma formation following hPSC implantation into mice. Thus, m-CRAs may be novel antitumorigenic agents in hPSC-based regenerative medicine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 iPS細胞 遺伝子治療 ウイルスベクター 腫瘍溶解性ウイルス サバイビン 腫瘍化 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)学術的背景と国内外の研究動向及び位置づけ

ヒトES細胞/iPS細胞による再生医療実現は社会的にも大きく期待され、本研究申請時には本邦でのヒトiPS細胞の臨床研究はまだ実施されていなかったが、その次の年に開始予定と報道されていた(そして、実際に臨床研究が開始された)。臨床応用において、腫瘍化(奇形腫、癌化)は安全性における大きな危惧課題とは一般にも認識されていたものの、具体的にその重要性はどの程度までなのかは明確でなく、またその安全基準ははっきり定まっていなかった。

これに対し申請者は、iPS細胞では高率な腫瘍化も予想される科学的根拠が示された論文も数多く出されていたこと(もともとの多能性幹細胞に基づく科学的性質;例えば無限増殖性や染色体の培養による不安定性など)、また造血幹細胞へのex vivo 遺伝子治療で、動物実験で問題なくてもヒト患者で予想以上に高率に腫瘍化が起こったという歴史のように、腫瘍化の完全なる阻止はヒトiPS/ES細胞の臨床応用の最大の克服課題(つまり当時一般に考えられていた程度よりも遥かに重要な程度の問題)と考え、本研究に取り組んだ。

また特に当時の腫瘍化阻止の報告は、c-myc除去のリプログラミング法や染色体組み込みのない遺伝子導入法など、「iPS作製時の発癌リスクの軽減」などであり、これは腫瘍化の抑制にはなっても、不完全、あるいは直接的な腫瘍化阻止まではなりえない、と考え、従来と違う発想や戦略に基づく、iPS/ES細胞の腫瘍化を直接阻止する技術開発という、本研究を行うことにした。

(2)これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

前項の経緯から、申請者は「そもそも腫瘍化は完全には阻止できない」と考え、「全能性幹細胞の腫瘍化細胞を『直接』標的治療する技術を開発」という、全く新しい方向からこの問題の解決を試みることにした。

本研究では、「自死機構の遺伝子構築をES/iPS細胞の染色体に組み込んでおく」という一般的な発想だけではなく、革新的癌治療技術として我々が独自開発したm-CRAベクター(多因子で同時に精密に癌特異標的治療できる増殖制御型アデノウイルスベクター)を応用することで、iPS/ES細胞の腫瘍化を直接阻止する全く新しい技術ができるという着想に至った。

(補足: 詳細な背景説明)

具体的に、その着想に至るまでの研究者の背景を述べる。まず研究代表者は、遺伝子治療研究において、黎明期に米国でベクター開発に取り組んだ後(PNAS 1995, 1996)、本邦の自身の研究室で、革新的癌遺伝子治療を可

能とするm-CRAベクターの効率的作製法に世界で初めて成功した(*Gene Ther* 2005)。本技術で第一段の癌治療医薬として開発したサバイビン反応性m-CRA(Sruv.m-CRA)(*Cancer Res.* 2005)は全癌種を治療でき、安全性、治療効果で従来技術を凌ぐ性能を示したため、本邦「発」の医師主導治験を目指して非臨床研究を、当時進めていた(現時点では治験開始準備完了し、がん患者に医師主導治験を開始直前)。

一方、ES/iPS細胞での再生医学研究には、①分化誘導法の研究(*J Circ* 2004; 同誌表紙)だけでなく、「遺伝子治療のベクター・発現調節技術をES細胞の再生医学研究に初めて本格的に導入」し、②「ES/iPS細胞由来の目的細胞を確実に単離できる」Adenoviral conditional targeting in stem cell法の開発に成功した(*Mol Ther* 2006; 同誌表紙・ニュース; 国内特許取得)。本研究で、両分野の研究を統合することで、③「m-CRAベクターでES/iPS細胞由来の腫瘍化細胞を治療できる」と着想するに至ったものであった。

2. 研究の目的

前項記載のように、ヒトES細胞、iPS細胞の臨床応用において、安全性確保、中でも「腫瘍化克服」は最重要課題であるが、これまでの取組みは間接的な腫瘍化抑制の戦略や発想である。本研究は、革新的な癌遺伝子治療技術として研究者が独自開発したm-CRAベクター作製技術を異分野の幹細胞再生医学に応用することで、腫瘍化ES/iPS細胞を標的治療するm-CRAベクターを開発して、本問題を克服する新技術確立を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

癌治療用に開発したm-CRAベクター技術にて、ヒトES/iPS細胞由来の腫瘍細胞を直接標的化でき、さらに治療できる技術の開発のため、以下の科学的検証の実験を行う。

- (1) ES/iPS細胞中の未分化/腫瘍化細胞を同定できる遺伝子/プロモーターの探索と検証
- (2) m-CRAのヒトES/iPS細胞由来の腫瘍細胞を直接標的・殺傷する技術の開発と確立

4. 研究成果

- (1) ES/iPS細胞中の未分化/腫瘍化細胞を同定できる遺伝子/プロモーターの探索と検証:

従来の方法で探索してだけでなく、m-CRAに搭載する未分化/腫瘍化細胞を同定できる候補遺伝子/プロモーターをさらに効率よく探索する方法の開発も同時に進めた。

このため、新しいレンチウイルスベクターの迅速作成技術を開発した。このウイルスベ

クターは、①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、②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、複数の候補となる未分化細胞特異的な遺伝子プロモーターを効率的に解析できるという理論である。

後述する *Survivin* プロモーターをこの新しいシステムに用いて機能検証を行い、本システム自体の有用性を実証できた。

(2) m-CRA のヒト ES/iPS 細胞由来の腫瘍細胞を直接標的・殺傷する技術の開発と確立:

これまでががん細胞以外では明確な発現の報告がなかった *Survivin* と、ヒト多能性幹細胞において高発現を示すという報告がある *Tert* の両遺伝子の発現とプロモーター活性を確認した。ヒト多能性幹細胞において、両遺伝子は未分化状態特異的に高発現し、さらに *Survivin* プロモーターは *Tert* プロモーターよりも高い活性を有していた。そこで、アデノウイルス増殖に必須である E1A 遺伝子の発現制御に *Survivin* プロモーターあるいは *Tert* プロモーターを用いた m-CRA (Surv.m-CRA、Tert.m-CRA)を用いた *in vitro* 感染実験を行った。

その結果、両 m-CRA 群ともに、ウイルスの盛んな増殖による強力な細胞殺傷効果が示された。一方で、ヒト多能性幹細胞由来の分化細胞あるいは正常分化細胞では、m-CRA は感染したものの、ウイルスの増殖及び殺傷効果はほとんどみられなかった。さらに Surv.m-CRA は、Tert.m-CRA より強い殺傷効果を示し、がん細胞だけでなく、多能性幹細胞に対しても、治療効果と特異性 (安全性) ともに優れていることを明らかにした。

また、m-CRA 感染させたヒト ES 細胞を免疫不全マウスに移植した *in vivo* 実験により、m-CRA 感染群の奇形腫形成阻止は、m-CRA による未分化細胞 (腫瘍化原因細胞) 特異的な殺傷効果によるものであることが示唆された。

以上のことから、革新的ながん治療薬の技術として開発された m-CRA 技術を応用し、分化細胞中に残存する多能性幹細胞 (腫瘍化原因細胞) を直接的かつ特異的に殺傷除去する、全く新たな「多能性幹細胞の直接的腫瘍化阻止技術」の開発に成功した。

腫瘍化原因細胞内でのみ増殖し、細胞を殺傷する遺伝子組換えウイルス技術を用いた「多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞の除去技術」は、世界初の報告であり、科学的な独創性・先駆性の高いものである。

今後、(1)の研究で開発した方法で検証した候補プロモーターで新たな m-CRA を開発・検証を効率的に行っていくことで、ヒト ES/iPS 細胞の腫瘍化原因細胞 (残存する未分化細胞やがん化細胞) への殺傷性や、特異性をより向上する新規 m-CRA の開発・確立が

期待される。

また Surv.m-CRA は、がんへの革新的医薬として、実用化を目指した医師主導型治験の最終準備を進めており、臨床用 GMP グレードの m-CRA の製造・試験などはすでに行われている。再生医療分野での臨床応用へも比較的迅速にできる可能性があるため、今回の研究成果は、科学的にも臨床的の両面で意義は高いと考える。

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 8 件)

- ① 小賤健一郎;多因子増殖制御型アデノウイルスの開発と実用化の展望:独自開発の技術を本邦発の革新医薬へ. 実験医学. 34 (1), 19-25, 2016.
- ② 三井 薫, 小賤健一郎;多能性幹細胞の腫瘍化原因細胞をがん特異的制限増殖型アデノウイルスにより特異的に除去する新技術, BIOINDUSTRY. 33(2),11-18,2016.
- ③ 三井 薫, 小賤健一郎;iPS 細胞培養からがん化の恐れのある細胞を死滅させる方法. PHARMSTAGE. 15(12),10-15,2016.
- ④ Kosai K. (全 15 名,14 番目); Intravenous administration of endothelial colony-forming cells overexpressing integrin b1 augments angiogenesis in ischemic legs. *Stem Cells Transl Med.* 5(2):218-26.2015. (査読有) doi: 10.5966/sctm.2015-0096. ※cover
- ⑤ Mitsui K., Ide K., Irie R., Kosai K.(全 6 名, Last); Conditionally replicating adenovirus prevents pluripotent stem cell-derived teratoma by specifically eliminating undifferentiated cells. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2,15026;2015.(査読有) doi:10.1038/mtm.2015.26. ※Featured article & Editorial
- ⑥ Kosai K. (全 15 名,13 番目); Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes Mecp2-null mice to arrhythmias. *Sci Rep.* 5:11204, 2015. doi: 10.1038/srep11204.
- ⑦ Kosai K. (全 7 名, Last); Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Int J Mol Med.* 33(5):1064-1074, 2014. (査読有) doi: 10.3892/ijmm.2014.1686
- ⑧ Wang Y., Mitsui K., Irie R., Kosai K. (全 9 名, Last);Survivin-responsive conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. *J Trans Med.* 12:27. 2014. doi: 10.1186 / 1479-5876-12-27 (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 三井薫、井手佳菜子、小賤健一郎；ヒト ES/iPS 細胞における再生医療の課題を克服する独自ウイルスベクターの開発。(シンポジウム) 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28-30 日(ビッグパレットふくしま/福島県郡山市)
- ② 三井薫、井手佳菜子、小賤健一郎；独自開発の増殖制限型アデノウイルスベクターによるヒト ES/iPS 細胞の腫瘍化細胞治療技術の発展。(一般演題・口演) 第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17-19 日(大阪国際会議場/大阪府大阪市)
- ③ 井手佳菜子、三井薫、小賤健一郎；ES/iPS 細胞の腫瘍化細胞を可視化・標的殺傷するレンチウイルスベクターの開発と治療効果。(一般演題・口演) 第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 17-19 日(大阪国際会議場/大阪府大阪市)
- ④ 小賤健一郎；がんへの多因子増殖制御型アデノウイルス薬の開発と実用化の展望。(特別講演・市民公開講座) 日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2016. 2016 年 3 月 12 日(鹿児島サンロイヤルホテル/鹿児島県鹿児島市)
- ⑤ Kosai K; Development of the original surviving-responsive conditionally replicating adenovirus toward the investigator-initiated GCP clinical trial. (招待シンポジウム) 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会、2015 年 7 月 24-26 日(大阪国際会議場/大阪府大阪市)
- ⑥ Mitsui K, Ide K, Takayama A, Wada T, Irie R, Wang Y, Kosai K ; Conditionally replicating adenovirus kills tumorigenic pluripotent stem cells. (口演) 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会、2015 年 7 月 24-26 日(大阪国際会議場/大阪府大阪市)
- ⑦ Ide K, Mitsui K, Matsushita Y, Kosai K; An efficient construction of lentiviral vectors that identify and eliminate tumorigenic cells in pluripotent stem cells. (ポスター) 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会、2015 年 7 月 24-26 日(大阪国際会議場/大阪府大阪市)
- ⑧ 三井薫、井手佳菜子、高山明子、和田忠久、小賤健一郎；独自開発の増殖制御型アデノウイルスベクターによる新たな ES/iPS 細胞の腫瘍化細胞治療技術の開発。(口頭発表) 第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 21 日(パシフィコ横浜/神奈川県横浜市)
- ⑨ 井手佳菜子、三井薫、松下洋平、小賤健一郎；ES/iPS 細胞の腫瘍化細胞を可視化・標的殺傷するレンチウイルスベクターの効率的な製法の開発。(口頭発表) 第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 21 日(パシフィコ横浜/神奈川県横浜市)
- ⑩ 小賤健一郎；増殖制御型アデノウイルスによる革新的癌治療法の独自開発と臨床応用への展望。(特別講演) 第 29 回日本整形外科基礎学術集会、2014 年 10 月 9-10 日(城山観光ホテル/鹿児島県鹿児島市)
- ⑪ 永野 聡、小賤健一郎、小宮節郎；革新的癌治療薬を目指した増殖制御型アデノウイルスの独自開発から医師主導治験へ。(シンポジウム) 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9-10 日(城山観光ホテル/鹿児島県鹿児島市)
- ⑫ 小賤健一郎；新しい遺伝子治療ウイルスベクターの開発と基礎・臨床への応用。(ランチョンセミナー) 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日(鹿児島大学/鹿児島県鹿児島市)
- ⑬ 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎；アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への効率的遺伝子導入技術の開発。(ポスター) 第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4-6 日(国立京都国際会館/京都府京都市)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

- ① 名称: 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法
発明者: 小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2015/000138
出願年月日: 2015 年 1 月 14 日
国内外の別: 国外
- ② 名称: 幹細胞における腫瘍化原因細胞の新たな標識法と治療法
発明者: 小賤健一郎、三井薫、井手佳菜子
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許権
番号: 特願 2014-004262
出願年月日: 2014 年 1 月 14 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 3 件)

- ① 名称: サービビン(Survivin)プロモーターを含む増殖型ベクターを有効成分とする癌治療薬
発明者: 小賤健一郎、神園純一、永野聡
権利者: 小賤健一郎
種類: 特許権
番号: 特許第 5574284 号
取得年月日: 2014 年 7 月 11 日
国内外の別: 国内
- ② 名称: Drug Comprising As The Active Ingredient Proliferative Vector Containing Survivin Promoter.

発明者：小賤健一郎、神囿純一、永野聡
権利者：小賤健一郎
種類：特許権
番号：US 8,709,812
取得年月日：2014年 4月 29日
国内外の別： 国外

- ③ 名称:増殖制御型組換えアデノウイルスベクターの効率的な作製方法及びその作製用キット
発明者：小賤健一郎、永野聡
権利者：財団法人 名古屋産業科学研究所（中部 TLO）
種類：特許権
番号：EP 1662004
取得年月日：2013年 11月 20日
国内外の別： 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/index.html?device=desktop>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小賤 健一郎 (KOSAI, Ken-ichiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：90258418

(2)研究分担者

三井 薫 (MITSUI, Kaoru)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号：40324975

研究分担者

入江 理恵 (IRIE, Rie)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：90381178

研究分担者

伊地知 暢広 (IJICHI, Nobuhiro)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：80380624

研究分担者

王 宇清 (WAN, Yu-chin)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・分担研究員
研究者番号：80380624
(平成 26 年度 辞退)