



Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 谷, 春雨 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1941

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 5 6 5 号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 15 日
氏 名	谷 春 雨		
論文題目	Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model (遺伝子導入間葉系幹細胞を用いたラットグリオーマ髄腔内播種モデルの治療効果)		

博士(医学) 谷 春 雨

論文題目

Therapeutic effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in rat experimental leptomeningeal glioma model

(遺伝子導入間葉系幹細胞を用いたラットグリオーマ髄腔内播種モデルの治療効果)

論文の内容の要旨

[はじめに]

悪性神経膠腫の生存期間は治療法の進歩により着実に延長しているが、それに伴い髄腔内播種の頻度が増加傾向にある。治療法としては化学療法剤の髄腔内投与が用いられるが、その治療は極めて困難であり新たな治療戦略の開発が望まれている。これまで我々はラット脳腫瘍モデルにおいて、腫瘍への向けての遊走能が知られている間葉系幹細胞 (MSC) をベクターとして用いる遺伝子治療を開発してきた。単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子を導入したMSC (MSCtk細胞) を腫瘍内に注入した後に、抗ウイルス剤であるガンシクロビル (GCV) を全身投与すると、MSCtk細胞と腫瘍細胞の間に生じるバイスタンダー効果により、腫瘍を縮小させることができる。今回、ラット大槽内にグリオーマ細胞を注入することにより髄腔内播種モデルを作製し、このモデルにおけるMSCを利用したHSVtk/GCV遺伝子治療の効果を検討した。

[方法]

Sprague-Dawley (SD) 系ラットより骨髓細胞を採取し、MSC を分離、培養した。レトロウイルスを用いて MSCtk 細胞を作製し、以下の実験に用いた。

SD ラットの大槽内に C6 グリオーマ細胞 (5×10^5) を注入し、髄腔内播種モデルを作製した。このモデルでは治療しないとラットは平均 18 日で腫瘍死する。まず MSCtk 細胞と C6 細胞の間に生じるバイスタンダー効果を検討する目的にて MSCtk 細胞と C6 細胞を同量 (5×10^5) 混合、髄腔内投与し、GCV (30 mg/kg/day) または生食を 10 日間腹腔内投与した。髄腔内播種モデルに対する治療としては、まず C6 細胞 (2×10^5) を、そして次の日に MSCtk 細胞 (6×10^5) を大槽より髄腔内投与し、GCV または生食を 10 日間腹腔内投与した。腫瘍移植より 2 週間後に脊髄を取り出し、腫瘍の大きさを測定し (n=5)、また別の動物では生存期間を測定した (n=6)。

MSCtk 細胞の腫瘍細胞に向けての遊走能を検討する目的にて、ラットの大槽内に C6 グリオーマ細胞 (5×10^5) を注入した 2 週間後に赤色蛍光でラベルした MSCtk 細胞 (RKH26 標識 MSCtk) を大槽内に注入し、3 日後に全脊髄を摘出し蛍光顕微鏡で観察した。

[結果]

MSCtk 細胞と C6 細胞を混合して髄腔内投与し、2 週間後に頸髄レベルで腫瘍を観察すると、GCV 投与群では生食投与群に比し、腫瘍が有意に小さかった (0.41 ± 0.22 vs 3.10 ± 0.97 mm², p<0.01)。また生存期間を比較すると、GCV 投与群では生食投与群に比し、有意に延長した (29.2 ± 3.3 vs 18.8 ± 0.8 日, p<0.001)。髄腔内播種モデルに対する MSCtk 治療実験においても、GCV 投与群では生食投与群に比し、有意に腫瘍が小さく (0.73 ± 0.29 vs 2.84 ± 0.82 mm², p<0.01)、また生存期間も有意に長かった (21.5 ± 1.5 vs 17.2 ± 0.5 日, p<0.001)。

髄腔内播種モデルにおける RKH26 標識 MSCtk 細胞の分布を観察すると、髄腔内投与 3 日

後にはたくさんの標識細胞が腫瘍表面に集積し、さらに腫瘍深部にまで移動していた。この現象は投与部位である大槽に近い頸髄で著明であったが、数は少ないが胸髄や腰髄にも認められた。

[考察]

本研究により、今まで知られていた脳内腫瘍のみならずグリオーマの髄腔内播種モデルにおいても MSC を利用した HSVtk/GCV 遺伝子治療が有効であることが示された。神経幹細胞や MSC が腫瘍への向けての遊走能を持つことはよく知られており、さまざまな遺伝子のベクターとして脳内腫瘍の治療実験が行われ、有効性が示されてきた。しかし髄腔内播種モデルでの検討は髄芽腫での研究が一つあるのみで、グリオーマでは本研究が初めてである。

HSVtk 遺伝子が導入された細胞は GCV の存在下において、周囲にある数十倍の遺伝子非導入細胞を死滅させることができ、この効果はバイスタンダー効果として知られている。この際のバイスタンダー効果は遺伝子導入細胞と非導入細胞が接触することにより生じることがわかっている。本研究室では神経幹細胞や MSC をベクターとして用い、バイスタンダー効果を利用した脳腫瘍の HSVtk/GCV 遺伝子治療研究を展開し、固形腫瘍に対してはこれまで良好な成績を得てきた。髄腔内播種モデルでは細胞同士が接触する機会が固形腫瘍に比して少ないため、効果が不十分となることが危惧された。しかしながら本研究の結果はそのような状況下でも HSVtk/GCV 遺伝子治療は効果があることが示され、現状では有効な治療がないグリオーマ髄腔内播種への臨床応用への第一歩として意義が深いと考える。

[結論]

MSC を利用した HSVtk/GCV 遺伝子治療はラット脳腫瘍モデルのみならず、グリオーマ髄腔内播種モデルにおいても有効であり、臨床への応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

悪性神経膠腫は予後不良の脳腫瘍であり、髄腔内播種の頻度も高い。髄腔内播種に対する従来の治療の有効性は低く新たな治療戦略の開発が望まれている。申請者らはラット脳腫瘍モデルにおいて、間葉系幹細胞(MSC)をベクターとして用いる遺伝子治療を開発してきた。本研究は、ラット髄腔内播種モデルにおいて、単純ヘルペスチミジンキナーゼ (HSVtk) 遺伝子を導入したMSC (MSCtk細胞) とガンシクロビル (GCV) 投与によるバイスタンダー効果を利用した自殺遺伝子治療の有効性の検討を目的としている。

申請者は、Sprague-Dawley (SD) 系ラット大槽内に C6 グリオーマ細胞を注入し、髄腔内播種モデルを作製し、また SD ラットの骨髄細胞から MSC を分離し、レトロウイルスを用いて MSCtk 細胞を作製した。1) バイスタンダー効果については、MSCtk 細胞と C6 細胞を同時に大槽内に注入し、その後 GCV または生食の 10 日間腹腔内投与により検討し、GCV 投与群では生食投与群に比し、2 週間後の頸髄レベルの腫瘍量は有意に少なく、生存期間も有意に延長している事を示した。2) 髄腔内播種モデルに対しては、C6 細胞の大槽内注入翌日に MSCtk 細胞を注入し、GCV または生食の腹腔内投与により検討し、GCV 投与群では有意に腫瘍が小さく、また生存期間も有意に長い事を示した。3) MSCtk 細胞の遊走能は、RKH26 標識 MSCtk 細胞の大槽内注入により検討

され、3 日後の観察により、多くの標識細胞が腫瘍表面に集積し、腫瘍深部にも移動している事を確認した。以上、本研究はグリオーマの髄腔内播種モデルにおいても MSC を利用した HSVtk/GCV 遺伝子治療が有効であることを初めて示したものである。

審査委員会では、申請者の研究は、現状では有効な治療がないグリオーマ髄腔内播種に対する HSVtk/GCV 遺伝子治療の臨床応用への意義を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	大西 一功		
	副査	岩下 寿秀	副査	山本 清二