Bystander effect-mediated gene therapy of gliomas using genetically engineered neural stem cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 少一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/254

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　４３４号	学位授与年月日	平成１７年　３月１５日
氏　　名	李　　少一		
論文題目	Bystander effect-mediated gene therapy of gliomas using genetically engineered neural stem cells (遺伝子導入神経幹細胞を用いたバイスタンダー効果によるグリオーマの遺伝子治療)		

博士(医学)　李　　少　一

論文題目

Bystander effect-mediated gene therapy of gliomas using genetically engineered neural stem cells

(遺伝子導入神経幹細胞を用いたバイスタンダー効果によるグリオーマの遺伝子治療)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

悪性グリオーマ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、最も悪性度の高いグリオブラストーマの平均生存期間は約一年であり、この成績は過去30年間あまり改善していない。一方グリオーマの中枢神経系外への転移は極めて稀で、脳内腫瘍の局所制御がそのまま生存率の向上につながる可能性があり、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。中でもHerpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk)遺伝子の導入と抗ウイルス剤Ganciclovir(GCV)を用いた遺伝子治療では、実験脳腫瘍モデルにおいて遺伝子導入細胞が10%程度でもすべての腫瘍が消失する現象(バイスタンダー効果)が認められ注目された。欧米においてHSVtkレトロウイルス産生細胞を悪性グリオーマ内に移植する遺伝子治療の臨床応用が開始されたが、動物実験ほどの臨床効果は得られなかった。その理由の一つには、ウイルス産生細胞の移動性が低いため、高い浸潤性をもつグリオーマの辺縁部まで充分に治療効果が及ばなかったことが考えられている。そこで本研究ではウイルス産生細胞の代わりに、高い遊走能をもつことが知られている神経幹細胞にHSVtk遺伝子を導入、腫瘍内に移植し、GCV投与により生ずるバイスタンダー効果を利用して脳腫瘍を治療する新しい遺伝子治療を開発する目的で、本治療法の実験脳腫瘍モデルにおける治療効果を検討した。

〔材料ならびに方法〕

胎生14日のSD系ラットより神経幹細胞を採取しレトロウイルスを使ってHSVtk遺伝子を導入、GCVに対し最も高い感受性をもつ細胞株(NSCtk)を選び実験に用いた。SD系ラット由来のC6グリオーマ細胞とNSCtk細胞とを1:1で混合してGCV存在下に培養し、*in vitro*バイスタンダー効果を評価した。

ヌードマウスおよびSDラットの脳内にC6細胞(1×105)とNSCtk細胞(1×105)を混合し移植後、GCVを腹腔内投与し、*in vivo*バイスタンダー効果を評価した。

さらに、臨床応用を考慮し、既存の脳腫瘍に対する治療を検討した。まずC6細胞(1×10^5)をラットの脳内に移植し、一週間後にMRIで腫瘍の生着を確認した後、同じ場所にNSCtk細胞(2×10^6)を移植し(この時点でC6細胞とNSCtk細胞の比が10:1になるよう考慮)、GCVの腹腔内投与を10日間行った。MRIにより経時的に腫瘍を観察し、大きさを測定した。

〔結果〕

C6細胞とNSCtk細胞を混合してGCV存在下に培養すると、C6細胞の増殖は顕著に抑制され10日後にはほぼ全て死滅した。ヌードマウスおよびSDラット脳内にC6細胞とNSCtk細胞を混合して移植すると、GCV非投与群では全例腫瘍を形成し2-4週で死亡するが、GCV投与群では全例腫瘍形成がみられず、100日以上生存した。さらに脳内にC6腫瘍を作成した7日目後に同部にNSCtk細胞を移植し、その後MRIに

て経時的に観察すると、生食投与群では徐々に腫瘍が増大し3週間で死亡するが(C6細胞のみ移植した場合と同じ経過)、GCV投与群では9匹中6匹のラットで腫瘍が消失し100日以上生存した。

〔考察〕

癌遺伝子治療の中では(HSVtk/GCV)を用いる「自殺遺伝子治療」が最も広く研究されている。HSVtk/GCV遺伝子治療ではGCVにより遺伝子導入細胞のみならず近隣にある遺伝子非導入細胞も共に死滅するバイスタンダー効果が知られており、全ての細胞に遺伝子導入することが不可能であることを考慮すると極めて有用な現象である。本研究では以前より移動能力の低いウイルス産生細胞の代わりに、脳腫瘍細胞自身に遊走能HSVtk遺伝子を導入し腫瘍内に注入し、GCV投与により生ずるバイスタンダー効果を利用する治療法を検討してきた。遺伝子導入腫瘍細胞はたしかにより強い遊走能を認めるが、生きた腫瘍細胞を脳内に移植することには臨床上、倫理的問題がある。

最近の研究では神経幹細胞は胎児や成体の脳から採取/培養が可能であり、脳組織中における強い遊走能と、脳腫瘍を含めた病的な組織への集積性などの性質が確認されている。今回の研究は遺伝子導入腫瘍細胞の代わりに遺伝子導入神経幹細胞を用い、HSVtk細胞療法の安全性を確保することが目的である。結果的にHSVtk遺伝子導入神経幹細胞を用いた遺伝子治療では、従来のHSVtk導入腫瘍細胞を用いた方法よりさらに強いバイスタンダー効果が観察された。脳内移植に際し神経幹細胞は腫瘍細胞に比し、安全性のみならず効果においても優れていることが判明した。近年、骨髄から得られる間葉系幹細胞が神経幹細胞と類似した性質をもつことが報告され、より採取しやすい細胞として間葉系幹細胞を用いた研究も進めている。

〔結論〕

HSVtk遺伝子導入神経幹細胞とGCVを用いたバイスタンダー効果によるグリオーマの遺伝子治療は安全性が高いだけでなく、抗腫瘍効果も強いため、臨床応用が強く期待される。

論文審査の結果の要旨

悪性グリオーマの治療は外科切除、放射線・化学療法を駆使しても困難である。遺伝子治療に期待が寄せられている。グリオーマの中枢神経系外への転移はまれであり、遺伝子治療を始めとする局所治療が期待されている。Herpes simplex virus thymidine kinase(HSVtk)遺伝子導入と抗ウイルス剤であるganciclovir(GCV)を用いた遺伝子療法では、実験脳腫瘍モデルにおいて遺伝子導入細胞が少なくても、すべての腫瘍細胞が消失するバイスタンダー効果が認められ、注目されている。HSVtkレトロウイルス産生細胞を悪性グリオーマ内に移植する遺伝子治療が臨床でも試みられてきたが、ウイルス産生細胞の移動性が不十分なため、充分な抗腫瘍効果が認められなかった。そこで申請者らは高い遊走能を持つことが知られている神経幹細胞にレトロウイルスベクターでHSVtk遺伝子を導入し、実験脳腫瘍モデルを用いて、腫瘍内に移植し、GCV投与により生ずるバイスタンダー効果を利用して脳腫瘍を治療する新しい治療法を試みた。

1) 胎生14日のSD系ラットより神経幹細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いてHSVtk遺伝子を導入し、GCVに対して最も高い感受性を持つ細胞株(NSCtk)を選択し、実験に用いた。SD系ラット由来のC6グリオーマ細胞とNSCtk細胞をin vitroで混合し、GCV存在下でバイスタンダー効果を評価した

ところ、培養10日でC6細胞はほぼ全て死滅した。

2) 実体顕微鏡下で経時的に撮影したところ、NSCtkとC6グリオーマ細胞が接触して、C6細胞がアポトーシスに陥っていく像が観察された。

3) ヌードマウス及びSDラット脳内にC6グリオーマとNSCtk細胞を混合して移植すると、GCV非投与群では全例に脳腫瘍を形成し、2～4週で死亡したが、GCV投与群では全例に腫瘍形成が見られず、100日以上生存した。

4) さらに、臨床応用を考慮して既存の脳腫瘍に対する治療を検討した。最初にC6細胞をラットの脳内に移植し、1週間後にMRIで脳腫瘍の生着を確認した後、同じ場所にNSCtk細胞を移植した。対照として生理的食塩投与群では腫瘍が徐々に増大し、3週間で死亡したが、GCV投与群では9匹中6匹は腫瘍が消失し、100日以上生存した。申請者らは現在、神経幹細胞より採取しやすい骨髄からの間葉系幹細胞を用いて同様の研究を行っている。

本研究では従来用いられた移動性の低い線維芽細胞にHSVtkを導入して脳腫瘍内に移植する代わりに、遊走能の高い神経幹細胞にHSVtk遺伝子を導入し、これらのNSCtkを脳内に脳腫瘍とともに、あるいは脳腫瘍形成後移植し、強いバイスタンダー効果により高い治療効果を認めた。動物腫瘍実験モデルで、神経幹細胞を用いてHSVtk遺伝子治療法が成功した最初の論文である。従来のHSVtk遺伝子療法に比較して、安全で強い抗腫瘍効果を示す有効な治療法として臨床応用が期待できる。

審査委員会では、神経幹細胞を用いた脳腫瘍の新たな治療法の可能性を示した重要な実験結果であることを高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

(1) GCVが腫瘍細胞の核酸合成を阻害するメカニズムについて

(2) 腫瘍細胞のバイスタンダー効果とNSCtkの量の関係について

(3) 神経幹細胞がin vivoで脳の障害部位へ向かって遊走するのはなぜか

(4) 神経幹細胞はどのように標識し、検出するか

(5) In vitroのバイスタンダー効果でGCV濃度が高いとtk-geneの導入されていない神経幹細胞も死ぬのはなぜか

(6) グリオーマ細胞とNSCtkが直接接触しないと、グリオーマ細胞は死なないか、その時、NSCtkはどうなるか

(7) NSCtkはin vivoで増殖しないのはなぜか

(8) 臨床応用する場合、神経幹細胞はどこから採るか

(9) NSCtkの脳内移植における遊走能を示す実験を試みたか

(10)NSCより採取しやすい細胞として骨髄由来間葉系幹細胞を用いることが考えられているが、グリオーマに対してNSCと同じ効果が得られると考えるか

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文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　筒井祥博
副査　佐藤康二　副査　大西一功