



Potent tumor tropism of induced pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells in the mouse intracerebral glioma model

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2015-03-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山添, 知宏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2797

博士(医学) 山添 知宏

論文題目

Potent tumor tropism of induced pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells in the mouse intracerebral glioma model

(iPS 細胞および iPS 細胞由来神経幹細胞はマウス脳内グリオーマモデルにおいて腫瘍への活発な遊走能を有する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

悪性グリオーマは標準治療を行っても平均余命が約 1.5 年の予後不良の疾患であり、新たな治療戦略の出現が切望されている。これまでわれわれは、自殺遺伝子を導入した神経幹細胞や間葉系幹細胞を用いたげっ歯類脳腫瘍治療研究を行い、良好な結果を得ている。これらの幹細胞を遺伝子の「運び屋」として用いる理由の一つが幹細胞のもつグリオーマ細胞への遊走能である。2007 年に iPS 細胞 (iPSC) が樹立され、さまざまな分野での応用が期待されている。本研究では iPSC がグリオーマ治療のための遺伝子の「運び屋」としての有用性を評価することを目的としている。iPSC そのものおよび iPSC から分化誘導された神経幹細胞 (iPS-NSC) を用い *in vitro* および *in vivo* でのグリオーマへの遊走能を検討した。

[材料ならびに方法]

以下の動物実験は浜松医科大学動物実験委員会(H23-012-2011031)にて承認を得た。

未分化マーカーとして Nanog-GFP が導入されたマウス iPSC とその細胞から adherent monoculture 方法で神経幹細胞へ分化誘導し継代維持した iPS-NSC を使用した。分化誘導の確認には、Oct3/4、Pax6、Nestin の発現を免疫蛍光法・蛍光顕微鏡にて検証した。マウス (GL261)、ラット (C6) およびヒト (U87) のグリオーマ細胞株を用いた。マウス脳内グリオーマモデルでは GL261 細胞を無血清培養し腫瘍幹細胞化した GL261 sphere 細胞を用いた。

in vitro での遊走能の検討には 24-well Matrigel invasion chamber を用い、グリオーマ細胞株 (GL261, C6, U87) の conditioned medium へ向けて移動した iPSC または iPS-NSC の細胞数を測定した。またこの時、移動した細胞の Nanog-GFP 発現を蛍光顕微鏡で確認した。

in vivo での遊走能は BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) で標識した iPSC および iPS-NSC を用いた。C57BL/6 マウスの一側脳内に GL261 sphere 細胞を、対側脳内に BrdU で標識した iPSC または iPS-NSC を定位的に移植した。7 日後に脳を取り出し、凍結切片を作成した。BrdU 抗体および GFP 抗体を用いた免疫蛍光法とレーザー顕微鏡を用い、BrdU 標識された iPSC および iPS-NSC の分布を観察するとともに、それらの細胞の Nanog-GFP 発現を検討した。

[結果]

免疫蛍光法ではiPSCはOct3/4とNanog-GFPが陽性だが、Pax6は陰性であった。分化誘導されたiPS-NSCはPax6とNestinが陽性であるが、Oct3/4 (-) とNanog-GFPは陰性であり、神経幹細胞に相当すると考えられた。

24-well Matrigel invasion chamberを用いた検討では、iPSCとiPS-NSCはともにすべてのグリオーマ細胞株 (GL261, C6, U87) のconditioned mediumへの高い移動能を認め、両細胞の遊走能に有意な差を認めなかった。また、この移動したiPSCはNanog-GFP陽性であった。

マウス脳内グリオーマモデルを用いた検討では、BrdUで標識されたiPSCとiPS-NSCの両者ともに、対側に移植したGL261 sphere細胞腫瘍内に存在することが確認された。また、この移動したiPSCはNanog-GFP陽性であり、iPSCのまま、分化せずに移動したものと考えられた。

[考察]

これまでわれわれは神経幹細胞や間葉系幹細胞を抗腫瘍遺伝子の「運び屋」として用いる遺伝子治療の基礎研究を重ねてきており、げっ歯類の脳腫瘍モデルにおいての有用性を確認してきた。しかしながら神経幹細胞や間葉系幹細胞の脳腫瘍患者からの採取は侵襲が大きく、皮膚細胞などから簡便に樹立できるiPSCは代替細胞として適切と考えられる。すでにわれわれはiPSCがグリオーマconditioned mediumへの遊走能を有し、この遊走能に腫瘍関連成長因子が関与していることを示してきた。今回、in vivoでのiPSCの遊走能をマウス脳腫瘍モデルにて検討した。iPSCには腫瘍化の可能性が指摘されているため、安全性を向上させる目的にて神経系への分化誘導をかけたiPS-NSCsの検討もあわせて行った。iPSCとiPS-NSCはともにグリオーマへの遊走能を有することを確認し、遊走したiPSCはNanog-GFP陽性であった。Nanogの発現はiPS細胞が未分化の状態であることを示唆しており、遊走したiPSCは分化誘導を受けることなく未分化のまま移動をしたと考えられた。

[結論]

iPSCとiPS-NSCはin vitroおよびin vivoでグリオーマへの活発な遊走能を示し、またin vivoで遊走したiPSCは分化することなく移動したと考えられた。グリオーマへの活発な遊走能を有することから、iPSCやiPS-NSCはグリオーマ治療の「運び屋」細胞として有望と考えられる。しかしながらiPSCの腫瘍形成性を考慮すると臨床応用前にさらなる安全性の確保が必要と考えられる。