HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Genetically engineered multilineage-differentiating stress-enduring cells as cellular vehicles against malignant gliomas

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-03-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山﨑, 友裕 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3225

博士（医学）　　山﨑　友裕

論文題目

Genetically engineered multilineage- differentiating stress-enduring cells as cellular vehicles against malignant gliomas

(遺伝子改変 Muse 細胞は悪性グリオーマに対する細胞媒体となる)

論文の内容の要旨

［はじめに］

悪性グリオーマは脳内を浸潤性発育する致死的な脳腫瘍であり、腫瘍選択的に抗腫瘍効果を発揮する治療法として自殺遺伝子療法の開発が多方面で行われてきた。その一つが単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HSVtk)／ガンシクロビル(GCV)システムを用いた手法であり、この系では遺伝子導入細胞のみならず、周囲の非導入細胞にも殺細胞を及ぼす効果があり「バイスタンダー効果」と呼ばれている。腫瘍指向性を有する幹細胞に本システムを応用したのが自殺遺伝子幹細胞療法である。Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) 細胞はヒト正常組織に含まれ容易に採取できる腫瘍化しない多能性幹細胞であり、損傷組織に遊走する性質を有することから自殺遺伝子幹細胞療法の臨床応用に適した細胞媒体と考えられる。本研究では HSVtk 遺伝子を導入したヒト Muse 細胞（Muse-tk 細胞）を用い、悪性グリオーマに対する自殺遺伝子幹細胞療法の治療効果および安全性について検討した。

［材料ならびに方法］

ヒト線維芽細胞にレンチウイルスにて HSVtk 遺伝子を導入後、stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) 陽性細胞をソーティングすることで Muse-tk 細胞を作製した。Muse-tk 細胞と firefly luciferase 遺伝子を導入したヒトグリオーマ U87 (U87-luc)細胞を Muse：腫瘍細胞比が 1：1～1：64（腫瘍細胞は常に 105 個）になるように混合し、ヌードマウス脳内に移植した後、GCV 投与群、非投与群で経時的な発光強度（腫瘍の大きさを反映）と生存期間の比較を行った（in vivo バイスタンダー効果）。また既存腫瘍に対する治療実験として、腫瘍移植 1 週間後に Muse-tk 細胞を腫瘍内に移植し、GCV を全身投与する治療実験を行った。さらに Muse-tk 細胞を U87-luc 移植部の遠隔部（対側脳）に移植後 GCV 全身投与し、Muse 細胞の腫瘍への遊走による抗腫瘍効果を検討した。凍結切片を作成し蛍光免疫染色を行うことで Muse-tk 細胞の脳内の動態を観察した。in vitro 遊走能は matrigel invasion chamber にて検討した。安全性を担保する目的で、治療後のマウス脳を採取し、ヒト特異的配列である Alu sequence を real-time PCR で検出し、GCV 投与後の移植した Muse 細胞の有無を検討した。なお、本研究は浜松医科大学組換え DNA 実験安全委員会、並びに動物実験委員会に申請、承認を得ており、その倫理指針に従って実施した。

［結果］

U87-luc 細胞（105 個）に対し 1/32 の Muse-tk 細胞を共移植した場合でも GCV 投与

群で発光強度が有意に低下、生存期間が有意に延長し、強力なバイスタンダー効果が確認された。Muse-tk 細胞を既存腫瘍内に移植する腫瘍治療実験において、Muse-tk 細胞腫瘍内移植かつ GCV 全身投与群（Muse-tk/GCV 群）で対照群（Muse 細胞非投与群または GCV 非投与群）に対し有意な発光強度の低下を認めた。また Muse-tk/GCV 群の平均生存期間（115 日）は Muse-tk/PBS 群（51 日）に比し優位に延長し、9 匹中 4 匹では 200 日以上生存し、治癒したと考えられた。また Muse-tk 細胞の対側脳移植モデルにおいても、GCV 投与群は PBS 投与群と比較して有意な発光強度の低下と生存期間の延長を認め Muse-tk 細胞の腫瘍への遊走能が間接的に示された。凍結切片の蛍光免疫染色実験では Muse-tk 細胞が脳梁を通って対側の腫瘍に向かって移動する現象が確認された。in vitro 遊走能実験では Muse-tk 細胞は非 Muse-tk 細胞（SSEA-3 陰性細胞）に比較して複数のグリオーマ細胞株の培養上清への有意な遊走能を認めた。Muse-tk 細胞移植後、GCV 非投与群では day 3 で Alu sequence が検出されたが、GCV 投与群では day 100 でも検出されなかった。

［考察］

本研究は Muse 細胞を用いた世界で初めての遺伝子治療である。ヒト Muse-tk 細胞は U87 細胞に対し強力なバイスタンダー効果を示し、その効果は我々の先行研究で用いたラット神経幹細胞と同等であった。臨床研究に準じた Muse-tk 細胞の既存腫瘍内移植モデルや遠隔部の浸潤腫瘍に対する対側脳移植モデルにおける抗腫瘍効果も、ラット神経幹細胞を用いた際とほぼ同等であった。免疫組織学的検討でも Muse-tk 細胞が腫瘍移植部位に脳梁を介して移動することが確認されている。神経幹細胞を成人脳から採取し増殖させるのは困難であり臨床応用には不適当と思われるが、Muse 細胞は採取が容易であり臨床応用が期待できる。Muse 細胞は腫瘍化しない安全な多能性幹細胞として再生医療分野で注目されているが、今回 Muse-tk 細胞は GCV 投与により移植後 100 日間経過しても検出されなかったことより、さらなる安全性が示唆された。

［結論］

細胞媒体としてヒト Muse 細胞を用いた HSVtk/GCV システムによる自殺遺伝子幹細胞療法のマウス脳内ヒト悪性グリオーマモデルに対する有効性と安全性を検証した。Muse-tk 細胞は強力なバイスタンダー効果と高い腫瘍指向性を有することから、浸潤発育する悪性グリオーマの新たな治療戦略として期待される。また移植した Muse-tk 細胞の安全性も担保されており臨床応用実現可能性の高い治療用細胞媒体と考えられる。