



Potent bystander effect and tumor tropism in suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2022-12-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 堀川, 真 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00004253

博士（医学）堀川 真

論文題目

Potent bystander effect and tumor tropism in suicide gene therapy using stem cells from human exfoliated deciduous teeth

（ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞を用いた自殺遺伝子療法における強力な bystander 効果と腫瘍への遊走性）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ヒト悪性グリオーマ、特に膠芽腫（glioblastoma multiforme, GBM）は標準治療として、神経所見を勘案した外科的切除後に temozolomide を主とする化学療法と分割放射線治療を行う。しかし、それらを完遂したとしても全生存期間は 14.6-20.5 ヶ月と満足できる結果ではない。Herpes simplex virus - thymidine kinase (HSVTK) - ganciclovir (GCV) 自殺遺伝子療法は、1990 年代後半に悪性グリオーマの治療として臨床評価された。HSVTK をヒト細胞に導入し、哺乳類細胞に無害なヌクレオシド類似体である GCV を全身投与する。GCV は HSVTK により GCV - 1P に代謝され、さらに細胞内酵素によって GCV - 3P へと代謝される結果、有糸分裂時に DNA ポリメラーゼを阻害し、導入細胞をアポトーシスへ誘導する。Bystander 効果は、GCV - 1P が HSVTK 導入細胞から非導入細胞へと細胞間ギャップ結合を介して拡散し、HSVTK 導入治療細胞に隣接した脳腫瘍細胞を次々にアポトーシス誘導する。間葉系幹細胞などの幹細胞は腫瘍への遊走能を有し、HSVTK 遺伝子を腫瘍近傍へ運ぶ担体として機能する。申請者はこれまでに幹細胞を使用した自殺遺伝子療法の有効性について、マウスグリオーマモデルを用いて報告した。その中で、臨床応用を見据えた際の最も重要な点は、採取性・安全性・倫理面などを考慮した治療用細胞の選択であった。近年注目されるヒト脱落乳歯歯髄幹細胞（stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED）は、乳歯歯髄に存在する幹細胞であり、高い自己複製能と多分化能を有する。レトロウイルスベクターにより HSVTK 遺伝子を導入した SHED (SHEDTK) を自殺遺伝子療法へ応用し、悪性グリオーマにおける抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で評価した。

〔材料ならびに方法〕

Matrigel invasion chamber を用いて、グリオーマ細胞株 (U87, U251) の conditioned medium (CM) および腫瘍成長因子へ遊走する SHEDTK を数えた。次に、SHEDTK と U87, U251 を GCV 添加下に共培養し、methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay により細胞の生存率を測定することで bystander 効果を検証した。Caspase3/7 の存在下に、GCV 反応群と非反応群において、SHEDTK と U87 が apoptosis 誘導される様子を time lapse image で視覚化した。U87 脳腫瘍モデルマウスを用いて *in vivo* 遊走能を評価した。U87 を右大脳基底核へ移植し、鉄で標識した SHEDTK を対側大脳へ移植し、1 週間経過後に腫瘍側へ遊走する SHEDTK の有無を脳切片の鉄染色標本で確認した。SHEDTK と U87 luciferase 発現細胞 (U87 Luc) を 5×10^4

個ずつ脳内へ移植後、10日間GCVを腹腔内投与し、luminescenceを測定することで経時的な腫瘍増大を観察した。同時にマウスの生存曲線を評価した（co-implantation model）。次にU87 Lucを 3×10^5 個移植後5日目に腫瘍内にSHEDTKを 3×10^5 個移植するモデル（tumor model）で同様の評価をした。Bystander効果の正常脳組織への影響を調べるため、tumor modelと同様のスケジュールでU87 Luc及びSHEDTK（Qtracker 525で標識）を投与し、マウス脳内での分布を蛍光免疫染色にて検討した。U87 Lucは一次抗体：ウサギポリクローナル抗ホタルルシフェラーゼ抗体（1：500）および二次抗体：Alexa Fluor 594 / AffiniPure donkey anti-rabbit IgG（H+L）（1：500）で標識し、倒立蛍光顕微鏡で観察した。同時にapoptosis細胞をTdT In Situ Apoptosis Detection Kit - diaminobenzidine（DAB）を用いて検出した。

本実験は、組換えDNA実験安全委員会：承認番号1-27および動物実験委員会：承認番号2018050の承認を得て行った。

〔結果〕

U87 / U251 CM および各腫瘍成長因子に対し、SHEDTKは*in vitro*で対照群に比し有意に遊走した。*In vitro* bystander効果はSHEDTK：U87 = 1：256、SHEDTK：U251 = 1：128まで確認された。GCV投与群ではSHEDTKとU87の両細胞内でcaspase3/7が活性化した。鉄標識したSHEDTKは*in vivo*で対側脳へ移植した腫瘍近傍まで遊走した。Co-implantation modelでは、対照群は全例腫瘍死した一方で、治療群はGCV投与期間内に腫瘍が消失し、100日生存した。Tumor modelにおいても治療群の有意な生存期間および腫瘍抑制期間の延長を確認した。

〔考察〕

過去に神経幹細胞や骨髄由来間葉系幹細胞で報告したものと同様にSHEDTKは悪性グリオーマに対し遊走し、さらにbystander効果を有することが示された。SHEDは成人歯髄幹細胞（dental pulp stem cell, DPSC）の一種であるが、DPSCが放出するセクレトームや細胞外エクソソームは細胞間コミュニケーションに深く関与することが報告されており、bystander効果にも影響を与えうる。さらに申請者は、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞とSHEDの遊走能が同等であることも報告した。SHEDの遊走能を用いることで、直接HSVTK遺伝子を腫瘍へ導入するよりも効率的に腫瘍と治療細胞の接触を促し、より強力なbystander効果を発揮できると考えられる。

臨床応用を意識した時、SHEDを細胞治療に用いる利点としては以下の点がある。乳児由来組織のため、細胞分裂能が高い。他の間葉系幹細胞と異なり非侵襲的に採取可能である。廃棄される医療資源由来なので供給が潤沢である。胚性幹細胞やiPS細胞とは異なり、増殖能に限界があるため、腫瘍化の可能性はないとされる。間葉系幹細胞は一般的に免疫原性が低いため、同種異系のSHEDTKは宿主免疫系により排除される前に腫瘍へ移動し、bystander効果を発揮することが期待できる。

〔結論〕

SHEDTKの悪性グリオーマに対する遊走能およびbystander効果を*in vitro*および*in vivo*で確認した。SHEDTKを用いたTK-GCV自殺遺伝子療法は、悪性グ

リオーマの新たな治療モダリティーとなる可能性が示唆された。