



## Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大石, 知也 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00004342">http://hdl.handle.net/10271/00004342</a>

博士 (医学) 大石 知也

論文題目

Efficacy of HSV-TK/GCV system suicide gene therapy using SHED expressing modified HSV-TK against lung cancer brain metastases

(肺がん脳転移モデルに対する modified HSV-TK 発現ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 (SHED)を用いた TK/GCV 自殺遺伝子療法の有効性)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肺がん患者の 20%には診断時に脳転移が見られ、脳転移のある非小細胞肺がん (NSCLC) 患者の生存期間中央値は 3~15 ヶ月と報告されている。肺がん脳転移における新規治療の開発として以下のように作用する自殺遺伝子療法の応用を試みた。ヘルペスの治療薬であるガンシクロビル (GCV) は単純ヘルペスウイルス thymidine kinase (HSV-TK) によりリン酸化される。その後細胞内でリン酸化を受け 3 リン酸化 GCV となる。3 リン酸化 GCV は細胞間ギャップ結合を通じて HSV-TK を発現していない周囲の細胞に移行しアポトーシスを誘導する (bystander 効果)。

ここで、腫瘍に対する遊走能を持つ幹細胞に HSV-TK を導入し治療細胞として用いることで腫瘍への拡散性を向上させることが可能である。脱落乳歯の歯髄から分離される幹細胞であるヒト脱落乳歯歯髄幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth; SHED) を応用した。SHED は他の間葉系幹細胞と比較して分裂速度が速く、入手時の侵襲的な手技や倫理的な問題がほとんどないことが特徴である。また、幹細胞に HSV-TK を導入する場合にチミジンの代謝亢進に伴う毒性が指摘されている。本研究では既存の TK を改変して SHED に対する毒性を回避した。さらに作成した治療細胞を用いて肺がん脳転移モデルに対する治療効果を検討した。

[材料ならびに方法]

SHED は Kids well BioScience Co., Ltd より MTA 契約に基づき譲渡された。本研究に関わる組み換え DNA 実験 (承認番号: 2-36) および動物実験 (承認番号: 2020092) は本学委員会の承認を受けた。

HSV-TK (TK<sup>wt</sup>)、A168H の point mutation を導入した HSV-TK (TK<sup>A168H</sup>)、GFP を導入するためのレンチウイルスを作成した。レンチウイルスを SHED に MOI = 2, 4, 6 で感染させ、導入効率および HSV-TK の発現をフローサイトメトリーおよびウエスタンブロッティング (WB) を行って定量した。レンチウイルス感染後の SHED における viability と caspase 3/7 活性を評価した。SHED に TK<sup>A168H</sup> を MOI = 4 で導入し治療細胞 (SHED-TK) を作成した。SHED-TK を GCV (0-300 µg/ml) で培養し、SHED-naive と viability を比較した。NSCLC 細胞株 (H1299, A549)

と SHED-TK (SHED-TK: NSCLC cell = 63-2000 : 2000) を GCV 3  $\mu\text{g/ml}$  下で共培養した。5 日目に viability を測定した。

7 週齢メスの BALB/c ノードマウスの右脳に 26G 針を挿入し  $5 \times 10^4$  個の luc2 を恒常的に発現する H1299 を移植した (36 匹)。治療群は day5 に  $5 \times 10^4$  個の SHED-TK を腫瘍内投与し day6 から 10 日間 GCV を投与した。治療群及びコントロールの生物学的発光の変化および生存期間について検討した。治療細胞の腫瘍に対する遊走能について Matrigel invasion chamber およびマウス脳を用いて評価した。

#### [結果]

はじめに、SHED-TK を樹立するために最適な TK とその条件を検討した。TK<sup>A168H</sup>, TK<sup>wt</sup>, GFP それぞれ MOI = 2 では 60% 程度、MOI=4 では 80% 程度と有意差を認めた。WB で TK の発現量は MOI の増加に従って有意な増加を認めた。TK の SHED に対する毒性に関しては day5 において TK<sup>wt</sup> では GFP と比較して有意な viability の低下を認めたが TK<sup>A168H</sup> では TK<sup>wt</sup> と比較して優位に viability が保たれていた。Caspase 3/7 活性に関しては viability と逆相関していた。SHED-TK の GCV における LD<sub>50</sub> は 1.82  $\mu\text{g/ml}$  であった。SHED-TK を NSCLC (H1299、A549) と 63-2000 : 2000 で 3  $\mu\text{g/ml}$  GCV 存在下で共培養し bystander 効果による抗腫瘍効果を認めた。

次に、bystander 効果による抗腫瘍効果を確認するため腫瘍モデルに対する治療効果を検討した。コントロールの 3 群では時間経過に伴う腫瘍発光量の増加を認めたが、治療群では腫瘍発光の増加の抑制を認めた。生存期間中央値はコントロール群で 43-50 日、治療群で 135 日であり、有意な生存期間の延長を認めた。

SHED-TK の H1299、A549 の conditioned medium に対する有意な遊走を認めた。腫瘍モデルの対側脳に移植した SHED-TK では腫瘍周辺に集積していた。

#### [考察]

幹細胞を使用した TK/GCV 自殺遺伝子療法における理想的な治療細胞は TK 導入後も細胞の生存が保たれており、GCV 投与時には GCV の効率的な代謝が可能な細胞である。TK を導入することにより HSV-TK 本来の機能であるチミジンの代謝が亢進し、チミジン 3 リン酸が蓄積することで毒性が出現することが報告されている。A168H による HSV-TK の最適化は GCV の代謝効率を高めるだけでなく、TK 導入時における幹細胞への毒性を軽減できることで有効である。

本研究から SHED に最適化された TK/GCV 自殺遺伝子療法は肺がん脳転移に対して十分な治療効果があることを示された。脳転移に関する自殺遺伝子療法の報告の多くはシトシンデアミナーゼ (CD) /5-フルオロシトシン (5-FC) を用いたものであり、HSV-TK を用いたものは少ない。腫瘍の種類により 5-FC と GCV で効果が異なることが報告されている。また、TK/GCV 自殺遺伝子療法の利点

としては代謝されたGCVは細胞間ギャップ結合を通じてのみ移行することから、幹細胞と接触した腫瘍細胞にのみ効果を示し、正常組織に与える影響は少ない点と考えられる。

〔結論〕

TK<sup>wt</sup>と比べて、TK<sup>A168H</sup>ではSHEDに対するTKの毒性が低減した。さらに、肺がん脳転移モデルにおいてSHED-TKを腫瘍内移植しGCVを投与することで腫瘍増殖が抑制されることを明らかにした。これらのデータは、SHEDに対して最適化されたTKを用いることで、肺がん脳転移に対してSHEDを用いたTK/GCV自殺遺伝子療法に有効な治療効果があることを示している。