

Title	ゲノム編集技術とiPS細胞を利用した脳腫瘍に対する遺伝子細胞療法の開発
Sub Title	Gene-cell therapy using iPS cells for the treatment of brain tumor
Author	戸田, 正博(Toda, Masahiro) 峯, 裕( Mine, Yutaka)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>はじめに, ヒトiPS細胞から分化誘導した神経幹細胞(NSC)にウイルスベクターを用いてHSV-tk遺伝子を導入した。脳腫瘍モデルマウスにHSV-tk発現NSCを移植し, Ganciclovir(GCV)を投与したところ, 著明な治療効果が認められた。つぎにゲノム編集によりHSV-tk遺伝子をiPSに導入したところ, 細胞毒性により安定したiPS細胞株が樹立できなかった。そこで, 遺伝子発現誘導システムを用いて, Tet-inducible HSV-tk導入iPS細胞を樹立した。治療用NSCを誘導し, 脳腫瘍モデルマウスに移植後, GCVとDoxycyclineを投与すると, 著明な治療効果が確認された。</p> <p>In this study, the HSV-tk gene was firstly transduced into neural stem cells (NSCs) differentiated from human iPS cells using a viral vector. HSV-tk expressing iPS-NSCs were transplanted into human brain tumor model mice, and the effectiveness of this therapy by administration of ganciclovir (GCV) was demonstrated. Next, HSV-tk gene was introduced into iPS by genome editing, but HSV-tk expressing iPS cell line could not be established due to cytotoxicity. Then, Tet-inducible HSV-tk transduced iPS cells were established using gene expression induction system. After induction of differentiation into therapeutic NSCs, these NSCs were transplanted into brain tumor model mice. After administration of GCV with Doxycycline, a remarkable therapeutic effect of this therapy using gene expression induction system was confirmed.</p>
Notes	研究種目: 挑戦的萌芽研究 研究期間: 2016~2017 課題番号: 16K15648 研究分野: 脳神経外科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K15648seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K15648seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15648

研究課題名(和文) ゲノム編集技術とiPS細胞を利用した脳腫瘍に対する遺伝子細胞療法の開発

研究課題名(英文) Gene-cell therapy using iPS cells for the treatment of brain tumor

研究代表者

戸田 正博 (TODA, MASAHIRO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20217508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに、ヒトiPS細胞から分化誘導した神経幹細胞(NSC)にウイルスベクターを用いてHSV-tk遺伝子を導入した。脳腫瘍モデルマウスにHSV-tk発現NSCを移植し、Ganciclovir (GCV) を投与したところ、著明な治療効果が認められた。つぎにゲノム編集によりHSV-tk遺伝子をiPSに導入したところ、細胞毒性により安定したiPS細胞株が樹立できなかった。そこで、遺伝子発現誘導システムを用いて、Tet-inducible HSV-tk導入iPS細胞を樹立した。治療用NSCを誘導し、脳腫瘍モデルマウスに移植後、GCVとDoxycyclineを投与すると、著明な治療効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the HSV-tk gene was firstly transduced into neural stem cells (NSCs) differentiated from human iPS cells using a viral vector. HSV-tk expressing iPS-NSCs were transplanted into human brain tumor model mice, and the effectiveness of this therapy by administration of ganciclovir (GCV) was demonstrated. Next, HSV-tk gene was introduced into iPS by genome editing, but HSV-tk expressing iPS cell line could not be established due to cytotoxicity. Then, Tet-inducible HSV-tk transduced iPS cells were established using gene expression induction system. After induction of differentiation into therapeutic NSCs, these NSCs were transplanted into brain tumor model mice. After administration of GCV with Doxycycline, a remarkable therapeutic effect of this therapy using gene expression induction system was confirmed.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学 ゲノム編集 幹細胞 自殺遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍幹細胞(BTSC)の存在が明らかとなり、抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示すことから、グリオーマ治療の重要な標的として解析が急速に進められている。とくにBTSCは周辺の脳実質に強く浸潤する性質を有することから、グリオーマに対する治療効果を高めるためには、浸潤性のBTSCを根絶することが、最重要課題であると考えられる。

遺伝子治療は、従来の治療法とは作用機序が異なるアプローチであり、様々なウイルスベクターが作成された。しかし、これまでの臨床試験の結果では、グリオーマに対する治療効果は限定的であった。ウイルスベクターの腫瘍周辺への拡散が不十分であったことが治癒に至らなかった主な原因と考えられるが、ウイルスベクターの多くは治療遺伝子が染色体にランダムに挿入されるため、挿入部位の遺伝子変異や周辺遺伝子の活性化、位置効果による導入遺伝子の不活性化など、様々な問題が生ずる可能性がある。一方、ごく最近ゲノム編集技術が進み、治療遺伝子を標的細胞の目的位置に正確に組み込むことが可能になり、有効性のみならず安全性も高く、臨床への応用が期待されている。

神経幹細胞(NSC)は、正常脳組織内を遊走する能力と脳腫瘍に集積する性質を有するため、治療遺伝子を搭載する細胞としての役割が注目されていたが、NSCを入手することは極めて困難であった。一方、ごく最近、induced pluripotent stem cell(iPS細胞)の臨床応用が開始されたことから、ヒトNSCの供給が現実的になりつつある。

## 2. 研究の目的

BTSCは、腫瘍周辺の正常脳組織へ浸潤する性質を有し、悪性神経膠腫が極めて治療困難な要因の一つと考えられている。一方、NSCは、脳内を遊走し脳腫瘍へ集積する性質を有することから、治療遺伝子を搭載する細胞としての役割が注目されている。最近、iPS細胞の臨床応用が開始されたことから、ヒトNSCの供給が現実的になりつつある。そこで本研究では、治療困難な浸潤性BTSCの根絶を目指してiPS細胞から誘導したNSCを用いた新たな遺伝子細胞治療の開発を行う。

## 3. 研究の方法

(1) ゲノム編集による自殺遺伝子導入iPS由来NSCの作成

安全かつ安定的な遺伝子発現を得ることを目的として、CRISPR/Cas9システムを使用して、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDH領域に自殺遺伝子HSV-tkを挿入する。iPS細胞のGAPDH領域へのHSV-tk遺伝子挿入は、Venus発現と遺伝子配列解析によって確認する。遺伝子導入確認後、NSCへ分化誘導する。

(2) in vitroにおけるHSV-tk遺伝子導入iPS

由来NSCによるBTSC殺傷効果の解析

HSV-tk発現細胞はganciclovir(GCV)をリン酸化し、周辺の腫瘍細胞を細胞死へ誘導する(bystander effect)。HSV-tk遺伝子導入NSCによるin vitroでのヒトBTSCに対するbystander effectを検証する。

(3) in vivoモデルにおけるヒトNSCの遊走性とBTSC集積性の解析

免疫不全マウスに、ルシフェラーゼ遺伝子導入したヒトBTSCを脳内移植し、ヒトBTSCマウスモデルを作成する。ヒトiPS由来NSC(Venus/HSV-tk遺伝子導入)をヒトBTSCマウスモデルへ移植し、経時的に組織解析することにより、ヒトNSCのBTSCへの集積性を解析する。

(4) ヒトBTSCマウスモデルにおける治療効果の検討

in vivoイメージングおよび生存解析  
ルシフェラーゼ遺伝子導入ヒトBTSCマウスモデルに、HSV-tk遺伝子導入・ヒトiPS由来NSCを移植し、一定期間後にGCV投与を開始する。具体的には、BTSCをマウス右線条体に移植後、遺伝子導入ヒトiPS由来NSCをBTSC移植部位から1mm離れた部位に移植する。GCV投与群と非投与群の治療効果についてIVIS imaging systemを利用したin vivo腫瘍イメージングおよび生存解析を行う。

組織学的解析

治療効果の機序解明のため、上記モデルを作成後、遺伝子導入ヒトiPS由来NSCを移植し、GCV投与群と非投与群において経時的に脳組織を摘出し、組織学的解析を行う。

## 4. 研究成果

早期に臨床応用可能なプラットフォーム技術を確立するため、すでに臨床応用された自殺遺伝子治療のHSV-tkとGCVを利用した。はじめに、ヒトiPS細胞およびiPS細胞から分化誘導したNSCの各段階でレンチウイルスベクターを用いてHSV-tk遺伝子を導入し、それぞれの細胞に対するGCVの薬剤感受性を調べた。

つぎに、HSV-tk遺伝子発現NSCと脳腫瘍細胞を共培養して、GCV投与後の脳腫瘍細胞に対するin vitroでのbystander effectを確認した。in vivoでの治療効果の解析は、HSV-tk遺伝子発現NSCをヒト脳腫瘍モデルマウスに移植し、GCVを投与した。その結果、コントロールと比較して、著明な治療効果を認め、本治療法の有効性を証明することができた(特2017-092973)。

治療用NSCの安定供給のためには、ヒトiPS細胞にHSV-tk遺伝子導入することが望ましい。レンチウイルスベクターおよびゲノム編集(CRISPR/Cas9システム)によりHSV-tk遺伝子をiPSに導入したところ、細胞毒性により、安定したHSV-tk発現iPS細胞が樹立できなかった。そこで我々は、Tet-inducible

システムを用いることにより、この問題を解決した。Tet-inducible HSV-tk 導入 iPS 細胞を樹立し、治療用 NSC を誘導し、ヒト脳腫瘍モデルマウスに移植すると、GCV と Doxycycline(Dox)投与により、著明な治療効果が確認された(特願 2017-092973)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Tamura R, Ohara K, Sasaki H, Morimoto Y, Yoshida K, Toda M., Histopathological vascular investigation of the peritumoral brain zone of glioblastomas., J Neurooncol., 査読有、Vol.136(2)、2018、233-241、DOI: 10.1007/s11060-017-2648-9  
Tamura R, Tomio R, Mohammad F, Toda M., Yoshida K., An Analysis of Various Tracts of Mastoid Air Cells Related to Cerebrospinal Fluid Leak after the Anterior Transpetrosal Approach., J Neurosurg, Vol.16, 査読有、2018、1-8、DOI: 10.3171/2017.9.JNS171622  
Kikuchi R, Toda M., Tomita T, Ogawa K, Yoshida K., Surgical Outcome of Endoscopic Endonasal Surgery for Non-Functional Pituitary Adenoma by a Team of Neurosurgeons and Otolaryngologists Adenoma by a Team of Neurosurgeons and Otolaryngologists., Turkish Neurosurg., 査読有、Vol.27 (1)、2017、1-7  
DOI: 10.5137/1019-5149.JTN.14354-15.0  
Nakagawa Y, Sasaki H, Ohara K, Ezaki T, Toda M., Ohira T, Kawase T, Yoshida K., Clinical and molecular prognostic factors for long-term survival of the patients with glioblastomas in a single institutional consecutive cohort., World Neurosurg., 査読有、Vol.106、2017、165-173、DOI: 10.1016/j.wneu.2017.06.126  
Mizutani K, Toda M., Yoshida K., The analysis of the petrosal vein to prevent venous complications during the anterior transpetrosal approach in the resection of petroclival meningioma., World Neurosurg., 査読有、Vol.93、2016、175-182

[学会発表](計 15 件)

戸田正博、神経線維腫症 2 型に対する VEGFR ペプチドワクチンの臨床試験、

第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会、2017

田村亮太、戸田正博、悪性神経膠腫に対するヒト iPS 細胞を用いた自殺遺伝子細胞療法、第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会、2017

戸田正博、斜台脊索腫に対する経鼻内視鏡手術と治療方針の検討、第 24 回日本神経内視鏡学会、2017

Toda M., Endoscopic endonasal approach for the treatment of parasellar lesions, 8<sup>th</sup> World Congress of Neuroendoscopy、2017

戸田正博、海綿静脈洞近傍の経鼻内視鏡手術、第 22 回日本脳腫瘍の外科学会、2017

戸田正博、下垂体-傍鞍部腫瘍、第 22 回日本脳腫瘍の外科学会、2017

戸田正博、Endoscopic Endonasal Approach、第 21 回慶應 Cadaver Dissection Course、2017

武藤淳、戸田正博、手術解剖に基づいた中頭蓋窩に広く及ぶ腫瘍への経鼻内視鏡手術の到達限界 内視鏡時代に難しい手術とは、第 29 回日本頭蓋底外科学会、2017

戸田正博、神経線維腫症 2 型に対する VEGFR1/2 ペプチドワクチンの臨床試験、第 26 回日本聴神経腫瘍研究会、2017

田村亮太、戸田正博、神経線維腫症 2 型 (NF 2) における神経鞘腫の病理組織学的検討、第 26 回日本聴神経腫瘍研究会、2017

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

名称: iPS 細胞を用いた自殺遺伝子脳腫瘍治療薬

発明者: 戸田正博、岡野栄之、三好浩之、田村亮太

権利者: 慶應義塾

種類：特許  
番号：特願 2017-22320 号  
出願年月日：平成 29 年 11 月 20 日  
国内外の別：国内  
名称：脳腫瘍治療用細胞製剤  
発明者：戸田正博、岡野栄之、三好浩之、田村亮太  
権利者：慶應義塾

種類：特許  
番号：特願 2017-092973 号  
出願年月日：平成 29 年 5 月 9 日  
国内外の別：国内  
名称：神経線維腫症 型患者に発生する腫瘍に対するペプチドワクチン及びペプチドワクチン組成物  
発明者：戸田正博、田村亮太  
権利者：慶應義塾

種類：特許  
番号：特願 2017-100361 号  
出願年月日：平成 29 年 5 月 19 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

戸田 正博 (TODA, Masahiro)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授

研究者番号：20217508

(2)連携研究者

峯 裕 (MINE, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・訪問研究

員

研究者番号：10306730