慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	悪性脳腫瘍に対するウイルス搭載iPS細胞を用いた新規治療の開発
Sub Title	iPS cells producing retroviral replicating vector for malignant glioma
Author	戸田, 正博(Toda, Masahiro) 植田, 良(Ueda, Ryo)
Publisher	
Publication year	2024
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	自殺遺伝子搭載ウイルスベクターを導入したNSC（治療用NSC）から、良好にウイルスベクターが放出される事を定量的に評価し、最適な培養条件を確立した。さらに細胞にウイルスベクターが感染・拡散していく様子をin vitro、in vivoで経時的にモニタリング可能とするシステムを構築した。透明化脳による3次元的解析により、ウイルス感染細胞を1細胞レベルで解析することで、治療用NSCが広域の腫瘍細胞に感染可能であることを確認し、マウスモデルに対して、顕著な抗腫瘍効果を発揮することに成功した。治療用NSCは、様々な浸潤性悪性腫瘍にも応用可能であり、新たな癌治療のプラットフォームとなり得ると考えている。 Glioblastoma is characterized by diffuse infiltration into the normal brain. Invasive glioma stem cells (GSCs) are an underlying cause of treatment failure. New therapeutic approach targeting invasive GSCs is required. In this study, we showed that human iPS cell-derived neural stem cells (NSCs) could efficiently produce viral vector. Optimal culture condition of viral vector -producing NSCs was found. Infection rate was quantitatively evaluated in vitro. Furthermore, three-dimensional images of brain clearing revealed that NSCs trafficked to the GSCs and produced viral vector covered the broad area of invasive GSCs. Finally, our established NSCs showed antitumor effects in GSC mouse models, leading to the prolonged survival. Our results indicate the potential benefit of viral vector-producing NSCs for invasive GSCs. Furthermore, the present research concept may become a platform to promote clinical studies using human iPS cell.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2021～2023 課題番号：21H03046 研究分野：脳神経外科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21H03046seika

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.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｈ０３０４６

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍に対するウイルス搭載iPS細胞を用いた新規治療の開発

研究課題名（英文）iPS cells producing retroviral replicating vector for malignant glioma

研究代表者
戸田　正博（toda, masahiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：２０２１７５０８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：自殺遺伝子搭載ウイルスベクターを導入したNSC（治療用NSC）から、良好にウイルスベクターが放出される事を定量的に評価し、最適な培養条件を確立した。さらに細胞にウイルスベクターが感染・拡散していく様子をin vitro、in vivoで経時的にモニタリング可能とするシステムを構築した。透明化脳による3次元的解析により、ウイルス感染細胞を1細胞レベルで解析することで、治療用NSCが広域の腫瘍細胞に感染可能であることを確認し、マウスモデルに対して、顕著な抗腫瘍効果を発揮することに成功した。治療用NSCは、様々な浸潤性悪性腫瘍にも応用可能であり、新たな癌治療のプラットフォームとなり得ると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により樹立される治療用NSCは、グリオーマの浸潤性を克服する新たな治療戦略となり、グリオーマの生命予後の改善につながる可能性がある。またグリオーマで治療成績を残すことが出来た際には、その他の膵癌をはじめとする悪性・難治性腫瘍にも応用可能であり汎用性も高く社会的意義も大きい。この研究開発はiPS細胞を再生医療以外の疾患(がん)治療に応用する極めて革新的な1st clinical trial となり得るプロジェクトと言える。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma is characterized by diffuse infiltration into the normal brain. Invasive glioma stem cells (GSCs) are an underlying cause of treatment failure. New therapeutic approach targeting invasive GSCs is required. In this study, we showed that human iPS cell-derived neural stem cells (NSCs) could efficiently produce viral vector. Optimal culture condition of viral vector -producing NSCs was found. Infection rate was quantitatively evaluated in vitro. Furthermore, three-dimensional images of brain clearing revealed that NSCs trafficked to the GSCs and produced viral vector covered the broad area of invasive GSCs. Finally, our established NSCs showed antitumor effects in GSC mouse models, leading to the prolonged survival. Our results indicate the potential benefit of viral vector-producing NSCs for invasive GSCs. Furthermore, the present research concept may become a platform to promote clinical studies using human iPS cell.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Glioma　iPS　Neural stem cell　Viral vector　Suicide gene　Genome editing

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

悪性神経膠腫（グリオーマ）は、原発性脳腫瘍の 15～20%を占め、最も難治性の脳腫瘍である。過去 40 年間、治療成績の著明な改善はなく、抗 VEGF-A 抗体(bevacizumab)や免疫チェックポイント阻害剤も有意な生存期間の延長をもたらすことはできなかった[Tamura R. Brain Tumor Pathol. 2017;Reardon DA. JAMA Oncol. 2020]。難治性の背景として、高い造腫瘍性・浸潤性を有するグリオーマ幹細胞(glioma stem cell: GSC)の存在が挙げられる。従って、予後改善・根治には、GSC の浸潤をカバーする新たな治療戦略が求められている。

近年、複製型レトロウイルス（retroviral replicating vector: RRV）の複製能を用いて浸潤する GSC をカバーする戦略が報告された。自殺遺伝子 cytosine deaminase (CD)発現の RRV（Toca 511）とプロドラッグ 5-Fluorocytosine (5-FC) 徐放性製剤（Toca FC）を組み合わせた治療の臨床試験が欧米で行われたが[Huang TT. Hum Gene Ther, 2015;Cloughesy TF. Neuro Oncol. 2018]、Phase III であと一歩有意な全生存期間の延長は認めなかった[Tamura R and Toda M. Neurosurg Review. 2019; Tamura R and Toda M. Neurol Med Chir. 2020]。この原因としてウイルス単独の拡散のみでは GSC の広範な浸潤領域をカバーするに不十分であることが考えられた。一方でプロドラッグを代謝して殺腫瘍物質に変換させる酵素をコードする自殺遺伝子を RRV に組み入れるその戦略は安全性と有効性を担保した斬新なアイディアであった。

近年、神経幹細胞（Neural stem cell: NSC）や間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC)は腫瘍細胞の分泌するケモカインによって指向・遊走性を示すことが示された[Vescovi AL. Nat Rev Cancer. 2006]。そのため、これらの幹細胞を治療遺伝子の Delivery vehicle として使用する戦略は浸潤性の GSC に対して理にかなっている。倫理的問題により、ヒトに投与可能かつ十分量の NSC を入手することは困難だったが、iPS 細胞の技術開発に伴い、現在はヒト iPS 細胞から NSC を誘導可能となり、倫理的諸問題も回避できる様になった [Tamura R and Toda M. Intech. 2017; Tamura R and Toda M. Cell and Tissue Engineering. 2018]。さらに我々は iPS 細胞由来 NSC (iPS-NSC)が特有のケモカイン受容体を有し、グリオーマ細胞(Glioma cell; GC)や GSC に対してその他の幹細胞と比較して有意に高い遊走・指向性を持つことを確認した。その後、我々は iPS-NSC と自殺遺伝子を組み合わせた遺伝子細胞療法を考案し研究を重ねてきた。その結果、GC や GSC マウスモデルにおいて、良好な治療成績を示すことができた [Tamura R and Toda M. Bioeng Transl Med. 2023; Tamura R and Toda M. Hum Gene Ther. 2020; Iwasawa C and Toda M. Int J Mol Sci. 2019]。しかし、びまん性に浸潤を呈す GSC マウスモデルに対しては、根治例を得ることは容易ではなかった。そこで、本研究開発では iPS-NSC を、自殺遺伝子搭載複製型ウイルスベクターの Delivery vehicle として用いる新たな治療戦略を確立する。

２．研究の目的

申請者が、かねてより解析してきた遊走能の高いヒト iPS-NSC を自殺遺伝子発現の複製型ウイルスベクターの Delivery vehicle として用いることにより、現在までのグリオーマに対する様々な治療法の欠点を克服する新たな治療戦略を確立することを本研究の目的とする。この研究開発は iPS 細胞を再生医療以外の疾患(がん)治療に応用する極めて革新的な 1st clinical trial となり得るプロジェクトと言える。

３．研究の方法

(1) 自殺遺伝子搭載複製型ウイルスベクターを導入した NSC の 作製

作成した自殺遺伝子搭載複製型ウイルスベクターをヒト iPS 細胞より誘導させた NSC に感染させる（治療用 NSC)。NSC 内でのウイルスベクター複製効率を定量的に評価する。また感染に最適な細胞培養条件を検討する。

(2) 治療用 NSC のプロドラッグに対する感受性の評価

樹立した治療用 NSC はプロドラッグ投与により抗腫瘍物質を放出し、自らに細胞死を誘導すると同時に、周囲の腫瘍細胞にも抗腫瘍物質が届き死滅する (bystander 効果)。治療用 NSC のプロドラッグに対する感受性を in vitro で評価する。また、治療用 NSC の上澄み培養液を回収することで、ウイルスベクターも放出されていることを評価する。

(3) 治療用 NSC の in vitro での抗腫瘍効果の評価

U87 及び我々の所有するヒトグリオーマ幹細胞株 (hGO08)と治療用 NSC を混合培養しプロドラッグを投与することで、引き起こされる bystander 効果を定量評価する。

(4) グリオーマモデルマウスにおける治療用 NSC の治療効果及び安全性の評価

U87 及びヒトグリオーマ幹細胞株(hGO08) をそれぞれ線条体に移植したヒトグリオーマモデルマウスに対して治療用 NSC を移植し、プロドラッグを投与する事で抗腫瘍効果を評価する。

(5) 透明化技術を用いた脳内 RRV の 3 次元的拡散能の評価
透明化技術を用いて、脳内に移植された治療用 NSC 及び、NSC から放出される複製型ウイルスベクターがびまん性に浸潤するグリオーマ細胞及びグリオーマ幹細胞を広範にカバーする様子を 3 次元的に評価する。

４．研究成果
自殺遺伝子搭載ウイルスベクターを導入した NSC（治療用 NSC）から、良好にウイルスベクターが放出される事を定量的に評価することができた。またその最適な培養条件を確立した。プロドラッグにも想定通り良好に反応することを評価することができた。さらに周囲のグリオーマ細胞及びグリオーマ幹細胞にウイルスベクターが感染・拡散していく様子を in vitro だけでなく in vivo でも経時的にモニタリング可能とするシステムを構築することに成功した。透明化脳による 3 次元的解析により、ウイルス感染細胞を 1 細胞レベルで解析することで、治療用 NSC が広域の腫瘍細胞に感染可能であることを確認し、実際のグリオーマモデルマウス及びグリオーマ幹細胞モデルマウスに対して、顕著な抗腫瘍効果を発揮することに成功した。
本研究により開発した治療用 NSC は、様々な浸潤性悪性腫瘍にも応用可能であり、新たな癌治療のプラットフォーム技術となり得ると考えている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 田村亮太 戸田正博	４．巻 285
２．論文標題 グリオーマに対する遺伝子細胞療法・ウィルス療法	５．発行年 2023年
３．雑誌名 週刊医学のあゆみ	６．最初と最後の頁 469-475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 戸田正博	４．巻 49
２．論文標題 総論:悪性脳腫瘍の診断・治療の現状と展望	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Medical Science Digest	６．最初と最後の頁 170-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 田村亮太　戸田正博	４．巻 49
２．論文標題 ゲノム編集iPS細胞を用いた薬剤・遺伝子デリバリーシステムの開発 -グリオーマに対するトランスレーショナルリサーチ-	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Medical Science Digest	６．最初と最後の頁 176-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Tamura Ryota、Miyoshi Hiroyuki、Imaizumi Kent、Yo Masahiro、Kase Yoshitaka、Sato Tsukika、Sato Mizuto、Morimoto Yukina、Sampetrean Oltea、Kohyama Jun、Shinozaki Munehisa、Miyawaki Atsushi、Yoshida Kazunari、Saya Hideyuki、Okano Hideyuki、Toda Masahiro	４．巻 e10406
２．論文標題 Gene therapy using genome-edited iPS cells for targeting malignant glioma	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Bioengineering & Translational Medicine	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/btm2.10406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Tamura Ryota、Miyoshi Hiroyuki、Yoshida Kazunari、Okano Hideyuki、Toda Masahiro	4．巻 44
2．論文標題 Recent progress in the research of suicide gene therapy for malignant glioma	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Neurosurgical Review	6．最初と最後の頁 29～49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10143-019-01203-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計7件（うち招待講演　6件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 戸田正博
2．発表標題 脳腫瘍治療の将来展望
3．学会等名 第20回港医療連携カンファレンス（招待講演）
4．発表年 2023年

1．発表者名 戸田正博
2．発表標題 ゲノム編集iPS細胞を用いた悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療の開発
3．学会等名 JKiC Seminar（招待講演）
4．発表年 2023年

1．発表者名 戸田正博
2．発表標題 ゲノム編集iPS細胞を用いた悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療の開発
3．学会等名 ゲノム創薬・創発フォーラム 第14回シンポジウム（招待講演）
4．発表年 2023年

１．発表者名
戸田正博

２．発表標題
ゲノム編集iPS細胞を用いた脳腫瘍に対する遺伝子治療

３．学会等名
日本放射線腫瘍学会第36回学術大会（招待講演）

４．発表年
2023年～2024年

１．発表者名
戸田正博

２．発表標題
難治性脳腫瘍の手術と新たな治療法の開発

３．学会等名
2024　Neurosurgery　Conference in Aichi（招待講演）

４．発表年
2023年～2024年

１．発表者名
戸田　正博

２．発表標題
iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた脳腫瘍に対する ex vivo 遺伝子治療

３．学会等名
第22回日本再生医療学会総会（招待講演）

４．発表年
2023年

１．発表者名
田村 亮太、楊 正博、三好 浩之、サンペトラ オルテア、佐谷 秀行、岡野 栄之、戸田 正博.

２．発表標題
ゲノム編集iPS細胞を用いた悪性神経膠腫に対する革新的遺伝子細胞療法の開発

３．学会等名
第39回　日本脳腫瘍学会

４．発表年
2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	植田　良 (Ueda Ryo) (30317143)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関