

博士(医学) 小泉 慎一郎

論文題目

Migration of mouse induced pluripotent stem cells to glioma conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors

(マウス人工多能性幹細胞の悪性神経膠腫培養液への移動は腫瘍関連特異的成長因子を介する)

論文内容の要旨

【はじめに】

脳腫瘍の1/4を占める神経膠腫は脳内を浸潤性に発育するため治療が難しく、最も悪性の神経膠芽腫ではさまざまな治療戦略の開発にも関わらず、平均生存期間は1年余りであり、この治療成績は過去30年間ほとんど変わっていない。新たな治療戦略の一つとして遺伝子治療があり、特に単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子とガンシクロビルを用いる自殺遺伝子治療は1990年代後半に癌に対する最初の遺伝子治療として臨床応用されたが、予想通りの結果が得られなかった。我々はその原因の一つが遺伝子導入細胞などの移動能の低さにあると考え、これまでに脳内を自由に遊走し腫瘍に集積する神経幹細胞や間葉系幹細胞をベクターとする遺伝子治療の研究を展開してきた。

2007年に作られた人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)は様々な細胞への分化誘導や再生医学への応用など多岐にわたり研究が進められており、現在最も臨床応用が期待されている幹細胞の一つである。皮膚から採取できるという簡便性と安定した細胞の性質は、iPS細胞を用いた遺伝子導入幹細胞治療の新たな展開を期待させるものである。本研究では、これまで神経幹細胞や間葉系幹細胞で確認されてきた悪性神経膠腫へ向けての移動能が、iPS細胞においても認められるかどうかを検討する目的にて、悪性神経膠腫培養液ならびにそこに含まれる腫瘍関連成長因子を用いたin vitroの評価を行った。

【材料および方法】

細胞の移動能評価にはdouble chamber system (24well)を用いた。上部chamberにマウスiPS細胞(5×10^4)、下部chamberに悪性神経膠腫細胞株(マウス: GL261、ラット: C6、ヒト: A172、T98G、YKG1、U87)の培養液(conditioned medium; CM)または未処理培養液(unconditioned medium; UCM)を入れ、24時間培養し、上部から下部に移動したマウスiPS細胞数を顕微鏡下に4 high power fieldsの合計で比較検討した。次に下部に腫瘍関連成長因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)、platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)、stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α)、stem cell factor (SCF)を加えたmediumを入れ(0.1、1、10、100 ng/ml)検討した。さらにCMに各腫瘍関連成長因子の中和抗体(1、10 μ g/ml)を加えることによる抑制効果を検討した。

マウス iPS 細胞側における各腫瘍関連成長因子に対応する受容体 vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)、CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)、c-Kit の発現程度を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法により検討した。

【結果】

移動したマウス iPS 細胞数はそれぞれ UCM; 48 ± 2.9 , GL261; 388 ± 69.7 , C6; 407 ± 39.6 , A172; 355 ± 59.2 , T98G; 401 ± 14.1 , YKG1; 403 ± 57.7 , U87; 375 ± 46.2 で、いずれの CM 群でも、UCM 群と比較して有意に多かった($p < 0.001$)。また、いずれの腫瘍関連成長因子存在下でも移動したマウス iPS 細胞は濃度依存性に増加していた。CM 内に各腫瘍関連成長因子の中和抗体を加えると、マウス iPS 細胞の移動は濃度依存性に減少した。RT-PCR 法による検討では、マウス iPS 細胞における各腫瘍関連成長因子受容体発現はマウス線維芽細胞と比較して有意に上昇していた($p < 0.001$)。

【考察】

マウス iPS 細胞の悪性神経膠腫培養液に向けての有意な移動能を確認した。悪性神経膠腫が多種多様の腫瘍関連成長因子を分泌していることは既に知られており、今回用いた VEGF、PDGF-BB、SDF-1 α 、SCF はそれらの代表的な因子である。今回の実験において、マウス iPS 細胞は、これら 4 因子に対しても良好な移動能を有し、また一方、CM にこれらの中和抗体を加えることにより移動能は抑制された。さらにマウス iPS 細胞側では 4 因子に対する受容体(VEGFR2、ICAM-1、CXCR4、c-Kit)の発現も確認された。以上のことから、悪性神経膠腫とマウス iPS 細胞間には、いくつかのリガンド・受容体相互作用が働いており、この作用の影響によりマウス iPS 細胞は悪性神経膠腫への有用な移動能を有していると示唆された。マウス iPS 細胞の移動能がマウスのみならずラットやヒト腫瘍細胞株に対しても移動能を示したことも興味深い。

今回の研究結果は、脳内に広く浸潤する悪性神経膠腫に対する遺伝子導入幹細胞治療研究において、iPS 細胞をベクターとして用いることが有望な戦略であることを示唆している。今後の iPS 細胞の発展性、利便性、将来性を考慮すると、遺伝子治療のベクターとして iPS 細胞を用いることは、より臨床応用の実現性が高いと考える。今後、自殺遺伝子導入 iPS 細胞による治療効果を検証し、さらに臨床応用を考慮し、「細胞の安全性 (腫瘍形成能)」や「治療の安全性 (治療後の脳損傷の有無)」なども検証していきたいと考えている。

【結語】

悪性神経膠腫培養液ならびにそこに含まれる腫瘍関連成長因子を用いて、マウス iPS 細胞における悪性神経膠腫へ向けての移動能の *in vitro* の評価を行い、腫瘍関連成長因子である VEGF、PDGF-BB、SDF-1 α 、SCF が関与していることが示された。本研究の結果により iPS

細胞をベクターとして用いる自殺遺伝子治療の可能性を示唆する。

論文審査の結果の要旨

(研究の背景) 神経膠腫は脳内を浸潤性に発育するため治療が難しく、最も悪性の神経膠芽腫ではさまざまな治療戦略の開発にも関わらず、平均生存期間は1年余りであり、この治療成績は過去30年間ほとんど変わっていない。申請者らは、治療戦略の一つである単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子とガンシクロビルを用いる自殺遺伝子治療について、脳内を移動し、腫瘍に集積する神経幹細胞や間葉系幹細胞をベクターとして用いた研究を展開してきた。さらに、再生医学への応用など多岐にわたり研究が進められている人工多能性幹細胞(iPS細胞)が皮膚から作製できるという簡便性と安定した性質を有することに注目し、iPS細胞は自殺遺伝子治療の新しいベクターになりうると推測した。そこで、本研究ではこれまでに神経幹細胞や間葉系幹細胞に確認された悪性神経膠腫へ向けての移動能をiPS細胞において検討した。(方法) マウスiPS細胞の移動能評価にはdouble chamber systemを用い、上部chamberにiPS細胞、下部chamberに7種類の悪性神経膠腫細胞株の培養液(condition medium: CM)または腫瘍関連成長因子であるvascular endothelial growth factor、platelet-derived growth factor-BB、stromal cell-derived factor-1 α 、stem cell factor 各々を加えたmediumを入れ、上部から下部に移動したiPS細胞数を比較した。(結果) CMおよび腫瘍関連成長因子に向かって移動したiPS細胞数はすべての場合において有意に増加した。さらにCM内に各腫瘍関連成長因子に対する中和抗体を加えると、iPS細胞の移動は有意に抑制された。以上の結果から、iPS細胞は悪性神経膠腫へ向けて移動し、その移動能は4つの腫瘍関連成長因子が関与していることが示された。

iPS細胞の悪性神経膠腫への移動能を確認した申請者は、in vivoへの応用研究を進めており、iPS細胞が遺伝子治療の新しいベクターになりうるdataを得ている。本研究によって、遺伝子治療の新しい方法としてiPS細胞が応用されるための基礎的な結果を得た点を審査委員会は高く評価した。審査委員会では研究方法論と実験結果の解釈に関する質疑が出され、申請者は妥当な回答をした。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 岩下 寿秀
副査 大西 一功 副査 宮嶋 裕明