

平成22年1月

木下雄介 学位論文審査要旨

主査 大野耕策
副主査 押村光雄
同 渡辺高志

主論文

A gene delivery system with a human artificial chromosome vector based on migration of mesenchymal stem cells towards human glioblastoma HTB14 cells

(ヒトグリオブラストーマ細胞HTB14細胞に向かう間葉系幹細胞の遊走能を利用したヒト人工染色体ベクターによる遺伝子搬送システム)

(著者：木下雄介、紙谷秀規、Mamun Mahabub Hasan、Brian Wasita、香月康宏、平塚正治、押村光雄、渡辺高志)

平成22年 Neurological Research 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

A gene delivery system with a human artificial chromosome vector based on migration of mesenchymal stem cells towards human glioblastoma HTB14 cells

(ヒトグリオブラストーマ細胞HTB14細胞に向かう間葉系幹細胞の遊走能を利用したヒト人工染色体ベクターによる遺伝子搬送システム)

近年、骨髄由来間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell、以下MSC)が移植再生治療における運搬細胞として利用が期待されているが、悪性脳腫瘍に対してもMSCの遊走性が示唆されている。この性質を利用し有効な抗腫瘍薬剤や液性免疫物質の運搬ツールとしての利用方法が模索されている。今回、不死化したヒト間葉系幹細胞 (human immortalized MSC、以下hiMSC) にCre/loxP systemを用いてヒト人工染色体ベクター (human artificial chromosome vector、以下HAC) を組み込みこんだHAC-hiMSCについて、ヒトグリオブラストーマ細胞HTB14に対する遊走能を検証し、さらにその性質を用いた脳腫瘍治療モデルにおける腫瘍抑制効果を検証した。

方 法

HAC-hiMSCに、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)と緑色蛍光タンパク(GFP)を搭載した細胞(GFP-HAC-tk-hiMSC)を使用した。標的となるヒトグリオブラストーマ細胞として赤色蛍光タンパク(RFP)でラベルされたHTB14細胞(RFP-HTB14)を使用した。ヌードマウス右脳皮質下に、RFP-HTB14を移植し、4日後対側皮質下にGFP-HAC-tk-hiMSCを移植した (Day 0)。この後経時的にマウス全脳切片を作成し (Day 1、4、7)、GFP-HAC-tk-hiMSC遊走能を蛍光顕微鏡下に観察した。遊走経路の確認には抗GFP抗体による免疫染色を行った。さらに上記の定位置移植モデルに、tkにより活性型となるガンシクロビル(GCV)をDay 7から10にかけて腹腔内投与し、Day 10で殺傷して冠状切片上でのHTB14腫瘍容量の測定を行いin vivoでの腫瘍増殖抑制効果を検討した。効果を検証するために以下の4群に分けた(各々n=6)。すなわち、(a)HTB14のみ移植してPBSを腹腔内投与した群、(b)HTB14のみ移植してGCVを腹腔内投与した群、(c)HTB14とHAC-tk-hiMSCの両者を移植しPBSを腹腔内投与した群、および(d)HTB14とHAC-tk-hiMSCの両者を移植しGCVを腹腔内投与した群である。

結 果

ヌードマウス脳内において、HAC-tk-hiMSC細胞は対側脳のHTB14腫瘍塊に向かって4日目より遊走をはじめ、7日目には腫瘍周囲に遊走集積した。抗GFP抗体による免疫染色にて遊走経路は脳梁部であることが確認された。

治療モデル検証でのHTB14腫瘍容量は、(a) 2.94 ± 0.15 、(b) 2.72 ± 0.15 、(c) 3.01 ± 0.21 、および (d) 0.89 ± 0.19 (平均 \pm S. D. mm³)であり、対側HAC-tkMSC移植後GCVを腹腔内投与した群においてのみ、有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた($p < 0.01$)。

考 察

本研究結果により、採取容易な間葉系幹細胞が、グリオブラストーマ細胞HTB14への遊走を示すことをin vivoモデルで確認できた。運搬細胞として使用されたHAC-hiMSCの特徴は、人工染色体が搭載された遺伝子発現システムが導入されていることであり、巨大遺伝子を搭載できること、遺伝子発現が安定していることなどの利点を持っている。

HTB14への遊走を示したHAC-tk-hiMSCを治療ターゲットとしたGCV投与実験で、明らかな腫瘍増殖抑制効果を示しており、直接的なグリオーマへの抗腫瘍効果よりは、むしろbystander effectによる効果を推測する。さらにこの結果により、HAC-hiMSCに何らかの抗腫瘍効果を狙う重要な遺伝子を搭載することができれば、遊走能を利用し脳内に浸潤したグリオーマへの治療デリバリーシステムを構築できる可能性を示唆した。

結 論

人工ヒト染色体を搭載した間葉系幹細胞HAC-tk-hiMSCは、脳内でグリオーマ細胞株HTB14が形成する腫瘍塊に対する強力な遊走能を示した。さらにこのHAC-tk-hiMSCをデリバリーシステムとして利用した腫瘍治療モデル(tk/GCV system)が有用であることが示唆された。