

論 文 要 旨

**Novel technologies to directly eliminating tumorigenic cells
in pluripotent stem cells**

多能性幹細胞における腫瘍化細胞を直接除去する
新技術の開発

井手 佳菜子

【序論及び目的】

ヒト多能性幹細胞(Human pluripotent stem cells: hPSCs)による再生医療は、臨床応用による革新的医療としての実用化が期待されている。しかし、hPSCs の細胞移植療法の最大の障壁は腫瘍化であり、これは hPSCs の自己増殖能、分化多能性、ゲノム不安定性による遺伝子変異という hPSCs の特性であるため、腫瘍化の完全克服は困難である。実際、腫瘍化に対応する従来法は、リプログラミング法や培養方法の改良、「安全な」hPSCs の使用など、「間接的な」腫瘍化抑制戦略による危険性の「減少」に過ぎない。我々は、腫瘍化原因細胞を「直接」殺傷・除去する新戦略の技術開発が必須と考え、これを可能とする二つの革新的なベクター技術の開発を行った。まず一つは、がん治療薬として独自開発した腫瘍溶解性ウイルス「多因子制御増殖型アデノウイルスベクター(m-CRA)」を異分野の本問題解決に応用した新技術である。もう一つは、腫瘍化細胞を特異的に可視化・殺傷できる新規レンチウイルスベクター(TC-LV)を網羅的に作成・解析できる新技術の開発である。このように、腫瘍化原因細胞を直接的かつ特異的に殺傷する新戦略の二つの新技術を開発することを、本研究の目的とする。

【材料及び方法】

腫瘍化原因細胞を直接・特異的に除去する2種類の技術開発を、以下のように行う。

- ① がん治療薬として独自開発した腫瘍溶解性ウイルスの m-CRA を応用し、hPSCs 由来の腫瘍化原因細胞を特異的に殺傷する新技術が確立できると発想した。Survivin promoter と telomerase reverse transcriptase (Tert) promoter でウイルス増殖が制御される Surv.m-CRA, Tert.m-CRA を用い、*in vitro* での hPSCs の未分化と分化の各条件での腫瘍化原因細胞の特異的殺傷の作用と効果を詳細に検証し、さらに *in vivo* での腫瘍化阻止効果を調べた。
- ② TC-LV の迅速作製法として、まず 2A 配列で繋いだ蛍光タンパク質と自殺遺伝子の upstream に、リコンビネーションでプロモーターを簡単に挿入できる基盤プラスミド(pLVA)を作製する。次に解析候補のプロモーターをサブクローニングできるプラスミド(pPS)を作製する。この2つのプラスミドを独自に作製し自由に融合させる

ことで、様々なプロモーターを組み込んだ複数の TC-LV を同時に作製する。さらに作製した TC-LV の機能検証のため、Survivin promoter と、*cytomegalovirus enhancer and β -actin* (CA) promoter を組み込んだ TC-LV (TC-LV.Surv, TC-LV.CA) が、腫瘍化原因細胞特異的かつ完全に殺傷できるか検証する。

【結 果】

- ① 我々は以前、Survivin promoter が癌特異的に高活性であることを見出している。今回 Survivin promoter は、正常の未分化状態の hPSCs においても高い活性がある一方、分化 hPSCs では活性が検出できなかった。これに一致して、Surv.m-CRA は腫瘍化原因細胞である未分化 hPSCs を特異的に殺傷した。さらに免疫不全モデルマウスへの未分化 hPSCs 移植による *in vivo* 腫瘍形成実験系で、その治療作用・効果を比較したところ、Surv.m-CRA 感染 hPSCs は完全に腫瘍形成を抑制した。
- ② TC-LV の構築の前段階として、より目的細胞同定・殺傷効果の高い遺伝子を探索できるよう、蛍光タンパク質 2 種類・自殺遺伝子 3 種類を候補とし、これらを組みあわせて計 6 種類の pLVA を作製することができた。このうち蛍光タンパク質に Venus、自殺遺伝子として、がん治療で多数の実績を持つ *herpes simplex virus thymidine kinase* (HSV-tk) を持つ pLVA に対し、解析候補となるプロモーターを組み込んだ TC-LV を 6 種類同時に簡便に作製することができ、本 TC-LV システムにより、網羅的なプロモーター解析が可能となることを実証した。また TC-LV.Surv, TC-LV.CA 感染 hPSCs の腫瘍形成抑制機能の検証を行ったところ、未分化細胞では Survivin promoter, CA promoter 共に HSV-tk に対応する薬剤である GCV の薬剤濃度依存的に細胞殺傷効果が見られた。さらに TC-LV.Surv, TC-LV.CA 感染 hPSCs を分化させたものでは傷害が見られず、特に Survivin promoter では高濃度の GCV 投与でも毒性がなく、より分化細胞への安全性が高い未分化特異的な殺傷効果であることが実証できた。さらに、*in vivo* においても、免疫不全モデルマウスへの TC-LV 導入細胞移植後、薬剤依存性に腫瘍抑制効果を得ることができ、特に TC-LV.Surv においては GCV 投与群で腫瘍が見られず、より優れた腫瘍化阻止効果を得ることができた。

【結論及び考察】

今回我々が開発した 2 つの新技术で、hPSCs の腫瘍化原因細胞を特異的に効率よく殺傷できた。よって、hPSCs での再生医療を促進する、腫瘍化阻止の全く新たな戦略、そして具体的に 2 つの新技术を開発できた。本技術により、プロモーターの網羅的な解析が可能となるため、より特異性の高いプロモーターが得られれば、さらに優れた m-CRA, TC-LV が開発できる。これまでの残存未分化細胞を減らす技術とは一線を画す、腫瘍化原因細胞を直接・特異的に殺傷除去する新技术により、hPSCs による再生医療の臨床応用が大きく進展することが期待される。