

## ベクター産生型骨髄間質細胞を利用した遺伝子治療

岡田 尚巳

## Gene Therapy with Vector-producing Multipotent Mesenchymal Stromal Cells

Takashi OKADA

Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

(Received July 20, 2010)

Suicide gene therapy with retroviral vector-producing cells was feasible as an adjuvant to the surgical resection of recurrent glioblastoma, although any benefit appeared to be marginal. Further evaluation of the therapeutic strategy with the vector-producing cells must incorporate improved delivery of vectors and transgenes to the target cells. We have previously demonstrated the ability of vector-producing tumor cells engineered by the adenovirus-retrovirus hybrid vector to destroy satellite tumor cells, although therapeutic efficacy for aggressive tumor has to be further evaluated by the systemic delivery of the vector-producing cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) should be an effective delivery vehicle to seek out tumor cells *in vivo* and transport cancer-killing gene or immune products with minimal rejection reaction by the host. We developed vector-producing tumor-tracking cells to improve suicide cancer gene therapy. Nucleofection was attempted to deliver retrovirus vector components into rodent MSCs. Athymic nude mice with subcutaneous 9L glioma were received vector-producing MSCs through the left ventricular cavity. Optical bioluminescence imaging *in vivo* revealed accumulation of the MSCs into the subcutaneous 9L tumors but not Rat-1 transplants. Consequently, the vector-producing MSCs significantly enhanced pro-drug killing of glioma cells compared to MSCs without ability to generate progeny virus. Our study demonstrated the effective MSCs-mediated tumor transduction with progeny vector production to improve suicide gene therapy. Although therapeutic benefit in the various orthotopic or metastatic tumor models has to be further validated, this transduction strategy would eradicate evasive tumors *in situ*.

**Key words**—mesenchymal stem cell; gene therapy; virus vector

## 1. はじめに

がんに対し様々な遺伝子治療の臨床試験が行われているが、いまだ十分な臨床的効果は得られていない。現行法では、遺伝子導入に様々なウイルスベクターが用いられているが、腫瘍標的が可能で遺伝子導入効率が高いシステムが確立されていない。このため、安全で臨床的に有効な新規遺伝子導入系の開発が急務である。

遺伝子治療としては、血管新生抑制や抗腫瘍免疫誘導等、様々なストラテジーが提案されているが、直接的に腫瘍の細胞死を誘導する方法として自殺遺伝子療法が開発された。この自殺遺伝子治療では、

導入遺伝子が発現していない周辺のがん細胞も死ぬというバイスタンダー効果を伴うことから高い治療効果が期待され、欧米を中心に臨床試験が実施された。<sup>1)</sup> 使用する自殺遺伝子としては様々なものが提唱されたが、Herpes simplex virus thymidine kinase gene (HSV-*tk*) と代謝拮抗剤 ganciclovir (GCV) を組み合わせた自殺遺伝子治療が最も広く検討されてきた。神経膠腫に対しては、レトロウイルス産生細胞を腫瘍組織内に移植する治療方法が開発され、NIH の Oldfield 博士及び Blaese 博士らのグループが、定位脳装置を用いて脳腫瘍内に HSV-*tk* 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターの産生細胞を移植した。この細胞は持続的にウイルスを産生し、周囲の腫瘍細胞に感染して HSV-*tk* 遺伝子を組込む働きをする。ところが、ウイルス産生細胞はマウス由来の線維芽細胞を改変したものであったことから移植後に拒絶され易く、組織内での拡散や治療遺伝子

国立精神・神経医療研究センター神経研究所遺伝子疾患治療研究部 (〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1)

e-mail: t-okada@ncnp.go.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

の導入効率が不十分であった。ただし、極めて低い遺伝子導入効率にもかかわらず抗腫瘍効果が認められた症例があったことは、HSV-*tk* 遺伝子のバイスタンダー効果による強力な殺細胞現象が生体内で生じた結果であると考えられる。また、腫瘍内に新生した異常血管の内皮細胞が障害されることもバイスタンダー効果の一因と考えられており、血管新生を抑制する手法を組み合わせることにより、さらに効果的に腫瘍退縮を試みることも有望と思われる。このため、遺伝子送達方法を中心とした基盤技術開発の重要性が高まっている。

治療遺伝子の改良として、HSV-*tk* 遺伝子の作用を増強した変異型 HSV-*tk* 遺伝子も応用が検討されている。さらに、同様の自殺遺伝子治療として、*Escherichia coli* cytosine deaminase (CD) 遺伝子による 5-Fluorocytosine (5-FC) から 5-Fluorouracil (5-FU) への活性化、thymidine phosphorylase (*tp*) と 5'-deoxy-5-fluorouridine (DFUR) との組み合わせ、そして cytochrome P450 遺伝子による cyclophosphamide (CPA) の活性化等の方法がある。

さらに自殺遺伝子治療の効果を高めるため、宿主の感染細胞に対する免疫応答を併用したワクチン治療、<sup>2)</sup> 遺伝子増幅システム、<sup>3)</sup> ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用<sup>4)</sup> など、様々な技術の開発が推進されているが、ウイルスに対する免疫応答を制御する技術の実用化も今後の重要な課題である。

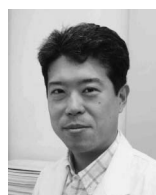
## 2. 治療遺伝子の増幅

がんに対する遺伝子治療を成功させるためには、治療遺伝子を目的の病巣に効率よく選択的に導入し、さらにその後も安定に発現させることが重要である。このために多くのウイルスが遺伝子を運ぶベクターとして応用されてきたが、どのウイルスも理想的なベクターとは言い難い。従来から用いられているベクター系の短所を克服するためには、免疫抑制プロトコルの改善のほか、中和抗体の影響を受け難いベクター、感染標的分子、遺伝子発現増強剤や遺伝子増幅法の開発が望まれる。

高い遺伝子導入効率をもたらす新規のベクター系としては、複数のベクター系を組み合わせるハイブリッドベクターが有用と考えられる。われわれは、ハイブリッドベクターを用いて子孫ベクターを腫瘍内で分泌させ、治療遺伝子を局所で増幅させるシステムを開発した。<sup>3)</sup> アデノウ

イルスベクターは、体内の様々な細胞に感染し遺伝子発現が可能であるが、免疫原性が比較的強く、発現は一過性であり、急速に減弱する。また、アデノウイルスはウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組込む確率が  $10^{-5}$  程度と極めて低いため、外来遺伝子の発現は細胞分裂により急激に減衰する。これに対し、レトロウイルスはウイルスゲノムが標的細胞の染色体に組込まれるため長期の発現が可能だが、分裂中の細胞にしか感染しない。この両者の欠点を補うために、アデノウイルスを骨格とするベクターにレトロウイルスのゲノムを搭載したハイブリッドのベクターを構築した。両者を組み合わせたハイブリッドベクターは、初期感染においてはアデノウイルスの感染機構を用いて静止期の腫瘍細胞にも感染し、腫瘍内で子孫レトロウイルスを産生する。その後、子孫ウイルスは最初の段階で感染できなかった周囲の細胞にも感染し、高い効率で遺伝子導入が可能となる。レトロウイルスの性質を利用して遺伝子は染色体に組込まれ長期間の発現を示す。このような複数のウイルスの特徴を生かし各々の欠点を解消したハイブリッドウイルスベクターは、ウイルスの生物学的特徴をうまく利用した新規のベクターとして応用が期待される。

ハイブリッドベクターを用いた自殺遺伝子治療の効果を検証するため、われわれは、HSV-*tk* 又は EGFP を発現するハイブリッドベクター (Ad.LTR. EGFP, Ad.LTR.TK) を構築し、がんにおける治療効果を検証した (Fig.1)。安全のため、自己複製型ウイルスが生じ難いように、複数のベクターを用いて発現させる手法を用いた。また、従来のハイブリッドベクターでは、パッケージングベクターからの env の発現によって細胞の env 受容体が飽和してしまい、ウイルスが感染し難くなるという問題があった。そこで、この問題を解決するために、過剰発現でも飽和し難く多くの腫瘍組織に親和性が高い VSV-G を用いたシュードタイプベクターを利用し



岡田尚巳

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部 遺伝子治療技術開発室長。1991年金沢大学医学部卒業。1995年金沢大学大学院医学研究科修了。1996年米 NIH 客員研究員。2000年自治医科大学助手。2004年講師。2007年現職。専門は脳神経外科、遺伝子治療基盤技術の開発。

### Therapeutic vectors

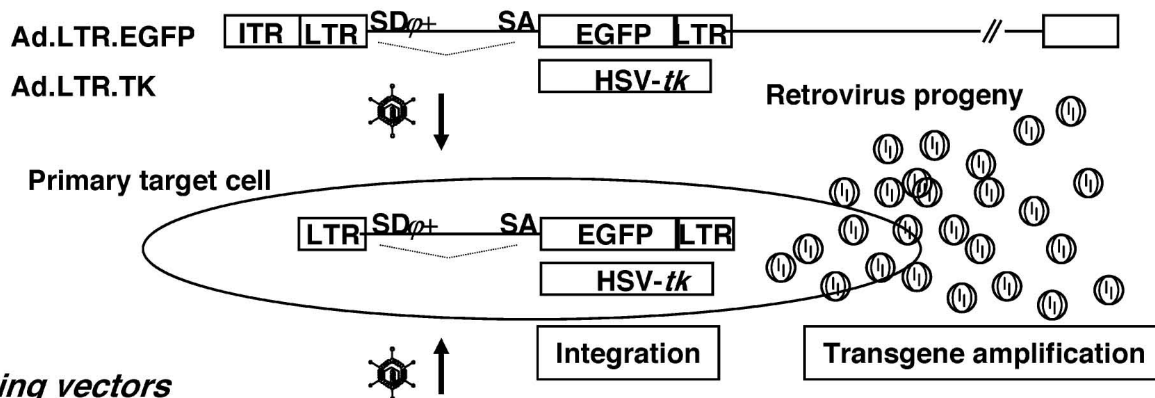


Fig. 1. *In Situ* Transduction of Target Cells with Trans-complementing Hybrid Adeno-retroviral Vectors

The adeno-retroviral hybrid vector containing the retroviral vector genome was constructed (Ad.LTR.EGFP or Ad.LTR.TK). Co-transduction of primary target cells with adeno-retroviral hybrid vector together with vectors expressing packaging proteins of retroviruses (Ad.gag.pol, Ad.VSV-G) as well as an inducer (Ad.rtTA) could integrate and amplify the transgene *in situ*.

た. Ad.LTR.EGFP とパッケージングベクターを腫瘍細胞に混合感染させてレトロウイルスベクターを誘導すると、非誘導時に比べて EGFP 陽性細胞の割合が増加した。また、治療ベクターとして Ad.LTR.TK を用いてパッケージングベクターとともに腫瘍細胞に混合感染させると、がん細胞のガンシクロビル (GCV) に対する感受性が増強した。さらに、ヌードマウス皮下腫瘍に Ad.LTR.TK とパッケージングベクターを混合感染させ、治療遺伝子の発現増強と GCV 投与後の抗腫瘍効果の増強を確認した。この際に GCV を投与しなかった群の皮下腫瘍から DNA を抽出し、定量的 PCR 法にて治療遺伝子のコピー数を調べてみると、レトロウイルスの誘導条件下で 200 倍弱の増幅が確認された。現在さらに、ヒトには病原性がないアデノ随伴ウイルス (AAV) を複製するシステムを開発中である。また、未分化な腫瘍細胞における遺伝子導入効率を上げる感染標的アダプター分子<sup>3)</sup>や遺伝子発現増強剤<sup>4)</sup>などの併用により、ハイブリッドベクターの遺伝子導入効率をさらに改善することが可能であると考えられる。これらのシステムを応用することにより、臨床的效果の高い治療遺伝子増幅法の実用化が期待される。アデノウイルスは比較的広範囲の組織

に感染し大きな遺伝子の挿入が可能であることから、ハイブリッドベクターの基本骨格として利用されている場合が多いが、Herpes simplex virus (HSV), Epstein-Barr virus (EBV), ポックスウイルス, アルファウイルスやワクシニアウイルスなど、様々なウイルスを利用したハイブリッドベクターやアンプリコンシステムが開発されている。

### 3. 間葉系幹細胞と腫瘍との相互作用

間葉系幹細胞 (MSCs) は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、神経など様々な組織へと分化する広範囲の多分化能力を有している。近年、炎症部位や組織傷害部位への集積性と免疫抑制作用が注目され、この性質を利用し、欧米で GVHD (graft versus host disease, 移植片対宿主拒絶反応) 治療への臨床応用が活発化してきている。<sup>6)</sup> MSCs は HLA が一致しなくても使用可能で倫理的な障壁が低く、わが国でも臨床治験の準備が進行中である。

炎症部位への MSCs の集積には、各種のケモカインの関与が示唆されているが、がんは、“never-healing wounds” と言われるように絶えず炎症を伴っており、MSCs が集積し易い病巣である。<sup>7)</sup> この集積性を利用して、転移・浸潤性の高い腫瘍を標的として全身投与による臨床的な効果が期待される。

さらに MSCs には血液脳関門の透過性があることも報告されており,<sup>8)</sup> 脳腫瘍の治療にも有用と考えられる。MSCs は、骨髄や脂肪のほか、胎児肝臓、肺、羊水、胎盤、臍帯血、月経血など様々な組織から調製可能であるが、マーカーや性質は若干異なることが知られている。中でも骨髄液は、比較的容易に繰り返し採取することができるため、移植用 MSCs のソースとして有望である。しかし MSCs は骨髄液中で全細胞の数十万個に 1 個程度しか存在せず、また細胞寿命も線維芽細胞などと比較して短い。このため、自家 MSCs による再生医療を普及させるためには、これらを大量に培養して増幅する技術が重要である。われわれは、CD271 陽性 MSCs が高い増殖能を示し、かつ多分化能力を保持していることを確認している (Kasahara *et al.*, 投稿準備中)。さらに実用化に向け、実際に患者に移植する前に、細胞の品質を短期間に高い精度で確認する技術の開発が望まれる。

ただし、MSCs の安全性が完全に確立されたわけではない。また、腫瘍細胞と MSCs との相互作用により、腫瘍の増殖能や転移能に様々な変化が生じる可能性も指摘されている。乳がん細胞を用いた検証では、腫瘍細胞の増殖能には大きな変化はないものの、MSCs ががん細胞の転移能を一過性に促進するという可能性が指摘された。<sup>9)</sup> 腫瘍細胞との相互作用によって MSCs からのケモカイン (CCL5) の産生が誘導された結果、腫瘍細胞の走化性が刺激されたことが示唆されている。さらに、MSCs から分泌される Ang1 (angiopoietin-1)、VEGF (vascular endothelial growth factor) や PDGF (platelet-derived growth factor) などの因子が相乗的に作用し、血管新生を促すという可能性も指摘された。ただし、相互作用の影響は腫瘍の種類により大きく異なり、その作用機序や安全性との係わりについては、今後の詳細な解析を待たなければならない。

#### 4. がん治療への応用

MSCs の腫瘍への集積性を利用し、遺伝子修飾 MSCs を利用した様々ながん治療が考えられる。集積能のある細胞を用いるメリットとして、全身的投与によって転移巣も含めた治療が可能であることや、治療タンパク質の濃度を局所的に高くすることで多臓器への悪影響を回避させる効果が期待できることが挙げられる。動物モデルでは、免疫療法とし

て IFN- $\beta$ <sup>10)</sup> や IL-12<sup>11)</sup> を発現する遺伝子修飾 MSCs の抗腫瘍効果が報告された。同様に、NK4 を用いて血管新生を抑制する取り組みも提案されている。<sup>12)</sup> また、MSCs 自身は DNA 損傷の修復能が高く放射線照射にも抵抗性が高いという性質があり、CD 発現 MSCs を利用した自殺遺伝子治療のモデルが報告されている。<sup>13)</sup>

MSCs を利用したこれらの治療方法の効果を改善させるためには、標的組織内で感染を維持させる工夫や集積能をさらに高める技術が有用と考えられる。腫瘍内でウイルスを増殖させ、ウイルス自身の腫瘍細胞毒性を利用する手法として、MSCs を担体として制限増殖型ウイルスを腫瘍に送達させる試みが報告されている。<sup>14)</sup> ただし、治療遺伝子を効果的に発現させ、臨床的有効性を得るためには、MSCs への細胞傷害性が低くかつ遺伝子発現を安定に維持するシステムが望まれる。

全身投与による腫瘍組織への集積後に、生着細胞の周辺で効果的な治療遺伝子の発現を得るためには、MSCs を土台としたウイルス産生細胞が有用であると期待される。<sup>15)</sup> 従来の遺伝子修飾細胞の場合、移植後の生着効率が低いため、細胞を移植しても、十分量の遺伝子発現を長期間維持することは困難である [Fig. 2(A)]. これに対して、腫瘍組織内でベクターを産生し続けるウイルス産生細胞を利用した場合には、長期間続く高い遺伝子導入効率が期待される [Fig. 2(B)]. また、腫瘍内のがん幹細胞の維持に MSCs が支持細胞として重要な役割を果たしていることから、MSCs 自身に治療遺伝子発現ベクターを産生させることは治療に有利である。われわれは、ベクター産生型 MSCs を用いたがんに対する新しい細胞治療戦略を提案し (特許出願中)、治療遺伝子の増幅と病巣イメージングを行い、自殺遺伝子治療への応用の可能性を検証した。<sup>16)</sup> Luciferase 発現レトロウイルスベクタープラスミド、*gag-pol* 発現プラスミド及び VSV-G 発現プラスミドを、Nucleofection 法にて SD ラット骨髄由来 MSCs に導入後、経時的に培養上清を採取し、ウイルス産生量の推移を解析した。また、MSCs への遺伝子導入 24 時間後、皮下に 9L 細胞を接種したヌードマウスの左心室腔内に遺伝子導入細胞を注入し、生体イメージング装置を用いて腫瘍での遺伝子発現を経時的に評価した。その結果、遺伝子導入

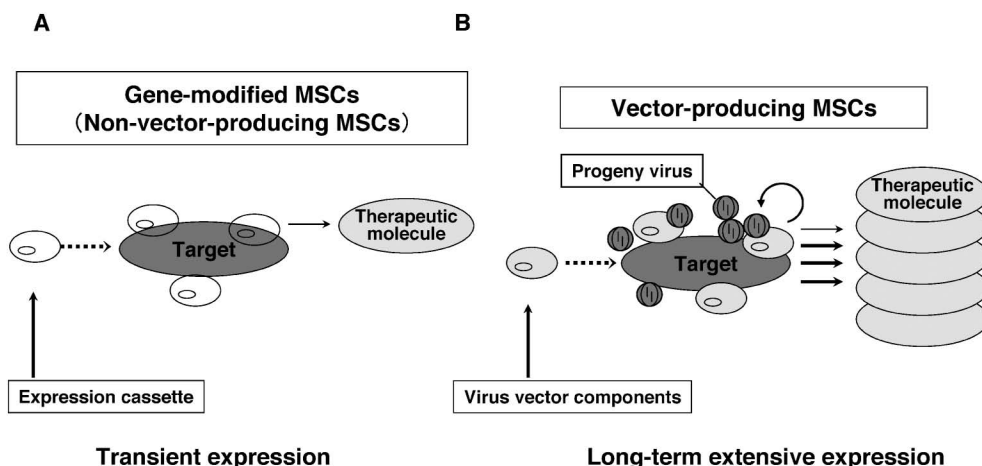


Fig. 2. Improved *in Situ* Vector Production Strategy

A. Gene-modified MSCs: Although gene-modified MSCs have tumor-seeking property, local expression of the therapeutic protein is up to the presence of the MSCs. B. Vector-producing MSCs: Progeny virus produced by the MSCs can transduce target cells *in situ* to amplify the therapeutic genes, which would be followed by long-term extensive expression, even when MSCs fade away.

24 時間後より、間葉系幹細胞からベクターが分泌されることが確認された。さらに、全身投与された MSCs は皮下腫瘍に集積し、ベクター分泌にて遺伝子発現を増幅していることが示唆された。本遺伝子増幅システムによって、生体内でのがん病巣の検出と治療遺伝子の増幅が可能であり、診断や治療への応用が期待される。

### 5. 将来展望

がん遺伝子治療に必要な遺伝子導入技術にはまだまだ改善の余地が多く、基礎研究の重要性が再認識されている。遺伝子治療の実用化に向けて、様々なベクター系を用いた遺伝子導入が行われているが、いずれのベクター系にも短所がある。このため、これまでに蓄積されてきた膨大な知見を活用し、新たな遺伝子導入技術の開発を推進することが必要である。臨床試験での反省を生かした次世代の遺伝子導入技術が次々と考案されており、より優れた治療方法の開発に向けて基礎技術は着実に進歩している。腫瘍の生物学的な特性を考慮したベクターの開発がさらに進めば、より幅広い治療方法の選択が可能となり、適応症例も広がることが期待される。臨床研究では日本は欧米諸国に遅れをとっているが、歴史的にはまだ遺伝子治療は始まったばかりであり、日本独自の技術を応用した臨床試験の成果が今後期待される。

MSCs をベクター産生細胞として用いるがん治療戦略として、自殺遺伝子治療以外にも、免疫療法や

血管新生抑制療法による全身的治療への応用が期待される。MSCs の腫瘍集積性とベクター産生に伴う遺伝子増幅効果をうまく利用し、従来の遺伝子治療の臨床的効果を大きく改善することが望まれる。将来の臨床応用に向け、高い安全性と有効性を担保するためには、腫瘍細胞との相互作用を様々なモデルで解析するとともに、集積能と特異性の向上が重要な課題である。また、MSCs が産生する子孫ベクターとして、安全性の高い AAV ベクターの応用も期待される。分泌型のレトロウイルスと異なり、AAV を産生させ組織内で拡散させるためには工夫を要するが、感染細胞の染色体には組込まれ難いため、全身投与した場合の長期的な安全性を鑑みる場合、極めて有用な担体である。治療遺伝子の発現に関しては、ベクター系の工夫に合わせて、併用薬剤としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いた治療遺伝子発現増強法が有効と考えられる。アデノウイルスベクターの場合には、増強効果の作用機序として受容体の発現誘導が知られており、ベクター感染前に薬剤を投与することが有効である。これに対して AAV ベクターにおいては、ベクターゲノムが感染直後からヒストン修飾を受け脱アセチル化を受けていることから、AAV ベクターの感染に合わせて投与すると高い効果が期待できる。<sup>4)</sup>

MSCs を用いた治療法は現時点では確立されたものとは言いがたいが、今後、様々なストラテジーで臨床試験が推進されることにより、臨床効果と安全

面での課題が次第に明らかになっていくものと思われる。従来のベクター系の短所を補完するベクター産生型 MSCs の応用により、様々な腫瘍に対し標的化遺伝子増幅を利用した新たな治療法が開発されることが期待される。

#### REFERENCES

- 1) Ram Z., Culver K. W., Oshiro E. M., Viola J. J., DeVroom H. L., Otto E., Long Z., Chiang Y., McGarrity G. J., Muul L. M., Katz D., Blaese R. M., Oldfield E. H., *Nat. Med.*, **3**, 1354–1361 (1997).
- 2) Okada T., Shah M., Higginbotham J. N., Li Q., Wildner O., Walbridge S., Oldfield E., Blaese R. M., Ramsey W. J., *Gene Ther.*, **8**, 1315–1322. (2001).
- 3) Okada T., Caplen N. J., Ramsey W. J., Onodera M., Shimazaki K., Nomoto T., Ajalli R., Wildner O., Morris J., Kume A., Hamada H., Blaese R. M., Ozawa K., *J. Gene Med.*, **6**, 288–299 (2004).
- 4) Okada T., Uchibori R., Iwata-Okada M., Takahashi M., Nomoto T., Nonaka-Sarukawa M., Ito T., Liu Y., Mizukami H., Kume A., Kobayashi E., Ozawa K., *Mol. Ther.*, **13**, 738–746 (2006).
- 5) Ito A., Okada T., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mizukami H., Kume A., Takatoku M., Komatsu N., Hanazono Y., Ozawa K., *J. Gene Med.*, **5**, 929–940 (2003).
- 6) Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Gotherstrom C., Hassan M., Uzunel M., Ringden O., *Lancet*, **363**, 1439–1441 (2004).
- 7) Lazennec G., Jorgensen C., *Stem Cells*, **26**, 1387–1394 (2008).
- 8) Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F. F., *Cancer Res.*, **65**, 3307–3318 (2005).
- 9) Karnoub A. E., Dash A. B., Vo A. P., Sullivan A., Brooks M. W., Bell G. W., Richardson A. L., Polyak K., Tubo R., Weinberg R. A., *Nature*, **449**, 557–563 (2007).
- 10) Studeny M., Marini F. C., Champlin R. E., Zompetta C., Fidler I. J., Andreeff M., *Cancer Res.*, **62**, 3603–3608 (2002).
- 11) Chen X. C., Wang R., Zhao X., Wei Y. Q., Hu M., Wang Y. S., Zhang X. W., Zhang R., Zhang L., Yao B., Wang L., Jia Y. Q., Zeng T. T., Yang J. L., Tian L., Kan B., Lin X. J., Lei S., Deng H. X., Wen Y. J., Mao Y. Q., Li J., *Carcinogenesis*, **27**, 2434–2441 (2006).
- 12) Kanehira M., Xin H., Hoshino K., Maemondo M., Mizuguchi H., Hayakawa T., Matsumoto K., Nakamura T., Nukiwa T., Saijo Y., *Cancer Gene Ther.*, **14**, 894–903 (2007).
- 13) Kucerova L., Altanerova V., Matuskova M., Tyciakova S., Altaner C., *Cancer Res.*, **67**, 6304–6313 (2007).
- 14) Stoff-Khalili M. A., Rivera A. A., Mathis J. M., Banerjee N. S., Moon A. S., Hess A., Rocconi R. P., Numnum T. M., Everts M., Chow L. T., Douglas J. T., Siegal G. P., Zhu Z. B., Bender H. G., Dall P., Stoff A., Pereboeva L., Curiel D. T., *Breast Cancer Res. Treat.*, **105**, 157–167 (2007).
- 15) Okada T., Ozawa K., *Front. Biosci.*, **13**, 1887–1891 (2008).
- 16) Uchibori R., Okada T., Ito T., Urabe M., Mizukami H., Kume A., Ozawa K., *J. Gene Med.*, **11**, 373–381 (2009).