

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ゲノム編集 iPS 細胞による遊走性を利用した悪性神経膠腫に対する遺伝子細胞療法の研究開発

(英 語) Study of cell-based gene therapy for malignant glioma using genome-edited human induced pluripotent stem cells

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 戸田正博
(英 語) Masahiro Toda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 学校法人慶應義塾 慶應義塾大学医学部 教授
(英 語) Professor, Department of Neurosurgery, Keio University School of Medicine

II 研究開発の概要

＜和文＞

研究開発の成果およびその意義等

悪性神経膠腫（グリオーマ）は、浸潤性のグリオーマ幹細胞を有し、有効な治療法の開発が急務である。自殺遺伝子療法はプロドラック投与により、*bystander* 効果による選択的細胞死を誘導する治療法である。近年、増殖型レトロウイルスを用いた自殺遺伝子療法の臨床試験が米国で行われ、優れた治療成績を挙げているが、浸潤性の腫瘍細胞をウイルス感染でカバーする事は困難であった。我々はヒト iPS 細胞由来神経幹細胞 (NSC) がグリオーマ幹細胞 (Glioma stem cell: GSC) に対して顕著な遊走能を示すことを見出し、ヒト iPS 細胞由来 NSC を自殺遺伝子の cellular delivery vehicle (CDV) として利用し、*bystander* 効果により浸潤腫瘍を殺傷する革新的な方法を考案した。これまで、iPS 細胞に組み込む有効な自殺遺伝子として yCD-UPRT を同定し、脳内投与に関しては CDV として iPS 細胞由来 NSC が間葉系幹細胞 (MSC) より優れる事を明らかにした。一方、レンチウイルスによる iPS 細胞への遺伝子導入では、位置効果による遺伝子不活性化が生じたため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて、ハウスキーピング遺伝子領域への挿入で解決し、ヒト GSC マウスモデルに対して顕著な治療効果を発揮した。

本研究では研究用ではなく、①臨床グレードの yCD-UPRT 遺伝子導入・治療用 NSC の開発に向けて、遺伝子挿入部位の最適化を再度行った。次に臨床用 iPS 細胞で同定した最適な挿入部位に yCD-UPRT を挿入し、作製した iPS 細胞の全ゲノムシーケンス解析や、分化誘導した治療用 NSC の一般毒性試験、造腫瘍性試験を行い、安全性と共にグリオーマモデルマウスに対する有効性を検証した。さらに、膀胱モデルマウスに対する有効性も検証した。一方で、本治療用 NSC は造腫瘍性の問題を解決する安全装置を備えた細胞であるため、脳挫傷や脳梗塞等のその他の再生医療へ応用も可能である。そこで、②治療用 yCD-NSC の再生医療への応用検討として、我々が樹立した脳挫傷モデルに対しての治療効果を検証した。本研究成果の早期の医師主導治験開始を目指してベンチャー企業を設立し、③導出・実用化に向けた知的財産戦略、企業連携・交渉に関して PMDA 事前面談・対面助言の準備、製造体制構築などを平行して進めた。

① 臨床グレードの yCD-UPRT 遺伝子導入・治療用 NSC の開発

治療用 NSC の抗腫瘍効果には yCD-UPRT の発現量や細胞の viability に起因する遊走能が大きく影響するため、臨床応用に際し我々が探索した GAPDH 以外の治療遺伝子挿入部位も検証し最適化する必要があった。そこで CRISPR/Cas9 を用いて、ハウスキーピング遺伝子領域 ACTB (β -actin)、およびセーフ・ハーバー領域 AAVS1 に yCD-UPRT 融合自殺遺伝子を挿入した iPS 細胞（研究用）を作製した。遺伝子導入後の細胞の増殖速度、未分化性、神経細胞系への分化能、yCD-UPRT の発現量、導入遺伝子の不活性化と安定性を検証した結果、ACTB に 2A ペプチドで yCD-UPRT を連結する導入法が最適であると特定できた。全ゲノムシーケンス解析及び RNAseq 解析により、オフターゲット効果や遺伝子挿入による関連遺伝子の発現変化、mutagenesis や oncogene activation 等が起きてないことを確認した。次に ACTB 領域に yCD-UPRT を挿入した yCD-UPRT-NSC をヒトグリオーマ細胞株及びヒトグリオーマ幹細胞株と共に培養して 5-FC を投与することで、*bystander* 効果により NSC 及び腫瘍細胞が 5-FC 濃度依存的に死滅した。動物モデルを用いた治療効果に関しても、免疫不全マウスの線条体内に腫瘍細胞を定位的に移植したヒトグリオーマモデルマウスにおいて、同部位に yCD-UPRT-NSC を投与した後に 5-FC を腹腔投与することで、グリオーマモデルマウスの生存期間延長の有意差が認められた。またグリオーマ幹細胞モデルマウスでは生存期間延長に加えて完治個体も確認された。治療用 NSC の遊走性に関しても *in vitro/vivo*、そして *ex vivo* において NSC は腫瘍細胞に対して高い指向性・遊走性を有していること評価できた。治療用 NSC の高い遊走能は、EphB-ephrinB および CXCL12-CXCR4 シグナル伝達に関与する自己反発作用と指向性が関連していることも突き止めた (Tamura R et al., Bioeng Transl Med. 2022 Sep 10;8(5))。

以上の事を同様に臨床グレードの iPS 細胞株に対しても行った。ゲノム編集技術を用いて ACTB 領域に yCD-UPRT を導入し、作製した臨床グレードの治療用 NSC の安全性・有効性を検証した。臨床グレードのゲノム編集 iPS 細胞樹立の際に、再度実験条件及び gRNA を微修正し最適な条件で培養することができた。その後、ゲノム編集による臨床用 iPS 細胞の性質変化及びオフターゲット効果が起きないことを確認できた。抗腫瘍効果に関しても in vitro/vivo においてこれまでの研究用 iPS 細胞由来 NSC と同等の有効性を示した。また、生体内での NSC の遊走性を評価するために、多色発光イメージング技術による in vivo 観察実験系を確立した。異なる発光タンパク質で観察することで、脳腫瘍細胞への NSC の遊走性を in vivo で経時的に評価できた。ゲノム編集 iPS 細胞を作製する際には yCD-UPRT が導入された細胞をセレクションする必要があるため、研究用ではセレクションマーカー遺伝子を同時導入していたが、臨床用細胞製剤の製造に向けてセレクションマーカーか細胞ゲノムに残らない細胞製造法を確立した。また、実用化に向けて障壁となる知財を回避する技術も確立した（特許出願済み）。現在は慶應義塾大学病院細胞培養加工施設にて臨床用試薬を用いた細胞製剤の製造に向けて検証を進めている。

yCD-UPRT を導入した NSC は従来の yCD のみを導入した NSC よりも 5-FU の LD50 値が低くなかった。Bystander 効果に関しても UPRT を付けることで腫瘍細胞の LD50 値が低くなかった。そのため、UPRT 遺伝子による安全性への影響を確認するために、yCD 及び yCD-UPRT 遺伝子をそれぞれ導入した治療用 NSC の培養上清内の 5-FU 代謝産物を経時的に定量解析した。免疫不全マウスの脳内においても同様の解析を行った結果、UPRT 遺伝子を付けることでの 5-FU の合成速度を推測することができた。現在、これらの代謝産物の計測結果から、臨床試験の際に最適な NSC の投与量を検討中である。また、臨床用 NSC を用いた PK 試験及び一般毒性試験も進行中であり、動物検体の組織学的な解析により治療用 NSC および yCD-UPRT による安全性への影響を評価している。

また、脳腫瘍以外の難治性がんへの応用として、膵がんモデルマウスへの治療効果を評価した。膵臓に膵癌細胞株を移植した膵がんモデルマウスの膵臓に、治療用 NSC を移植した後に 5-FU を投与することで、膵がん細胞に対する抗腫瘍効果を確認できた。引き続き様々ながん種に対しての応用も探索する予定である。

② 治療用 yCD-NSC の再生医療への応用検討

治療用 NSC は腫瘍化した際の安全装置を有しているとも考えることができる。そのため、損傷脳の機能再生を図るための、造腫瘍性を回避した安全性を高めた再生医療を実現可能である。治療用 NSC の再生医療への応用として、脳挫傷モデルマウスに対して損傷部位への遊走と保護効果を検証した。冷凍手術装置を用いた cryo injury による運動機能障害を有する皮質挫傷モデルマウスを作製し、治療用 NSC を同側近傍に移植した後に発光イメージングと病理組織学的解析により、NSC が損傷した大脳皮質周辺に集積することを確認した。NSC を移植した治療群ではビーム歩行試験と加速ロータロッド試験の成績が対照群と比較して有意に改善した。また、損傷部位も治療群ではより縮小しており、二次的脳損傷の予防が示唆された。慢性期には脳挫傷モデルマウスの脳萎縮と脳室拡大に関しても治療群で減少していた。さらに治療後に 5-FU を投与することで、隣接する神経細胞構造を温存しながら、未分化 NSC を選択的に除去することも確認できた (Imai R et al., Stem Cells. 2023 Jun 15;41(6):603-616)。本結果は自殺遺伝子導入 iPS 細胞の再生医療への応用、治療遺伝子を組み込む細胞治療への応用も期待される基盤技術となることを示唆している。脳梗塞モデルに関してはラット中大脳動脈閉塞モデルを樹立し、現在引き続き解析を続けている。

③ 導出・実用化に向けた知的財産戦略、企業連携・交渉

本研究期間中の早期から、ベンチャー企業である株式会社 iXgene を設立した。同社と協力の元、PMDA RS

戦略相談（再生医療等製品の品質および安全性）の事前面談・対面助言の準備、臨床応用・実用化に最短距離の研究開発工程を策定した。企業連携活動においては、PCT出願した主要特許の各国移行を達成および、早期実用化のための治験実施に向けた体制整備（GMP/GCTP 製造、GLP 安全性試験実施など）を進めるために、初年度から、支援班の協力、AMED プラット、慶應橋渡し拠点など活用し、早急に企業とのマッチングを進め、マッチング達成後も実用化に向け協業を進めた。

＜英文＞

Glioblastoma is characterized by diffuse infiltration into the normal brain. Invasive glioma stem cells (GSCs) are an underlying cause of treatment failure. Despite the use of multimodal therapies, the prognosis remains dismal. New therapeutic approach targeting invasive GSCs is required. We showed that neural stem cells (NSCs) derived from CRISPR/Cas9-edited human-induced pluripotent stem cell (hiPSC) expressing a suicide gene (yCD-UPRT) had higher tumor-trophic migratory capacity compared with mesenchymal stem cells (MSCs), leading to marked in vivo antitumor effects. High migratory capacity in iPSC-NSCs was related to self-repulsive action and pathotropism involved in EphB-ephrinB and CXCL12-CXCR4 signaling. The gene insertion to ACTB provided higher and stable transgene expression than other common insertion sites, such as GAPDH or AAVS1. NSCs derived from human iPSCs displayed stable and high transgene expression of yCD-UPRT following CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Our results indicate the potential benefit of genome-edited iPS cells based gene therapy for invasive GSCs. Furthermore, these methodologies were applied for the clinical-grade hiPSCs and NSCs. We successfully showed the safety and efficacy for the GSC mouse models using the clinical-grade hiPSCs-derived NSCs. Furthermore, NSCs could show the treatment effect for the pancreatic adenocarcinoma model. We have prepared to receive preliminary interview and advice from pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA).

Despite developing neurosurgical procedures, few treatment options have achieved functional recovery from traumatic brain injury (TBI). NSCs may produce a long-term effect on neurological recovery. Although iPSCs can overcome ethical and practical issues of human embryonic or fetal-derived tissues in clinical applications, the tumorigenicity of iPSC-derived populations remains an obstacle to their safe use in regenerative medicine. We established a novel treatment strategy for TBI using iPSCs expressing the yCD-UPRT. In vivo bioluminescent imaging and histopathological analysis demonstrated that NSCs concentrated around the damaged cortex of the TBI mouse model. During the subacute phase, performances in both beam walking test and accelerating rotarod test were significantly improved in the treatment group transplanted with genome-edited iPSC-derived NSCs compared with the control group. The injury area was smaller in the treatment group compared with the control group, suggesting the prevention of secondary brain injury. During the chronic phase, cerebral atrophy and ventricle enlargement were significantly less evident in the treatment group. Furthermore, after 5-FU administration, 5-FU converted from 5-FC selectively eliminated undifferentiated NSCs while preserving the adjacent neuronal structures. NSCs expressing yCD-UPRT can be applied for safe regenerative medicine without the concern for tumorigenesis.

The present research concept may become a platform to promote clinical studies using hiPSC.