

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 413 号	学位申請者	井手 佳菜子
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	西村 正宏	副査 宮田 昌明
	副査	後藤 哲哉	副査 永野 聡

主査および副査の5名は、平成29年1月23日、学位申請者 井手 佳菜子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 臨床応用の際に、どの組織に細胞を分化させるかで癌化抑制効果が違うのか?

(回答) 今回の実験では、胚葉体への分化のみで検証を行ったが、各組織によって効果が違うため、今後の臨床応用に際しては様々な正常組織細胞での検討が必要である。

質問2) アデノウイルスを用いているが、ウイルス自体による癌化の可能性はないか?

(回答) アデノウイルスはエピソードな導入という性質を持つため癌化リスクが低く、遺伝子治療研究での実績も多数あり、野生型ウイルスでも癌化の報告は見られていない。

質問3) ES細胞とiPS細胞で殺傷効果等に差があるのか?

(回答) 基本的な特性は同じだが、細胞株によっても生物学的特性に差があり、特にiPS細胞はclone間での差も大きい。

質問4) SurvivinがTERTより未分化細胞の殺傷効果が高い理由と作用機序はどうか?

(回答) 殺傷機序については今後解析予定であるが、今回はこれまでに報告した癌細胞だけでなく、新たに未分化幹細胞でもSurvivinのプロモーター活性が強いことを見出し、このプロモーター部分を治療ウイルスに用いたことで、高い殺傷効果が得られたものと考えられる。

質問5) 内因性の遺伝子発現と、m-CRAの治療効果に相違があるのはなぜか?

(回答) 遺伝子発現とpromoter活性には一定の相関関係はあるものの、今回m-CRAには遺伝子配列のうちpromoter部分を一部使用しているため、治療効果は遺伝子発現と完全に一致はしないものである。

質問6) 今後他にどのようなpromoterの検討予定があるのか? Nanog等未分化promoterなど?

(回答) 実際既に解析中だが、Nanogを含めた他の未分化・癌特異的なpromoterを複数解析予定である。

質問7) m-CRAが感染後、感染していない細胞への治療効果もあるか?

(回答) 未分化細胞への感染・殺傷後、周囲の非感染未分化幹細胞にも効果がある。

質問8) Fig 8ではTC-LV感染(GFP陽性)細胞の割合は低くても高い殺傷効果があるということか?

(回答) HSV-tkによりリン酸化されたGCV-3Pは、細胞間輸送により非感染細胞へも移行するBystander効果があることが知られており、これにより未分化細胞への高い殺傷効果が見られたものと推察される。

質問9) 臨床応用の際、TC-LVはどのような形で用いるのか?

(回答) TC-LV導入細胞での網羅的解析により、腫瘍化細胞除去に最適な遺伝子の選定を行った後、最終的に導入遺伝子のみをゲノム編集技術を用いて安全領域へ組み込んで使用する。これにより移植前の除去だけでなく、移植後のSafety swichとしても有効となる。

最終試験の結果の要旨

質問 1 0) Survivin が各種細胞で高発現しているメカニズムは分かっているか？

(回答) 癌細胞では、細胞周期の異常で転写機構そのものが破綻していることが多く、今回は初めて未分化多能性幹細胞での Survivin の高発現を認めたので、メカニズムは今後解析予定である。

質問 1 1) 腫瘍化でも分化が進んだ癌もあると思うが、増殖を続ける癌種とは治療効果も異なるのでは？

(回答) HSV-tk による癌に対する遺伝子治療では多くの研究がなされており、増殖の程度に差はあるものの、ほとんどの癌種で治療効果があることが報告されている。

質問 1 2) 臨床応用の際は、患者別に個々の iPS 細胞を全てスクリーニングしなければならないのか？

(回答) iPS 細胞由来細胞移植の現状として、1 例目では全ゲノムのスクリーニングにより安全性を確認した後に自家移植が行われたが、現在では iPS 細胞のマスターバンク化による他家移植への移行が進められており、これが達成できた際にはいくつかの細胞種で解析を行うことで安全性の検証を行う。

質問 1 3) Virus 投与のタイミングとして、vivo での腫瘍内投与の際、腫瘍内部まで感染できないのでは？

(回答) 今回は virus 投与後の腫瘍抑制効果を検証したが、m-CRA は腫瘍内増殖が可能で、非増殖型に比べて腫瘍内部でも治療効果が期待できる。

質問 1 4) 未分化幹細胞に対する殺傷効果であれば、体内の組織幹細胞への影響はないのか？

(回答) 体内への直接投与の場合は影響が完全に否定できないが、今回は移植前の薬剤投与であることに加え、腫瘍化原因細胞を完全に排除するためには、移植前に不完全な前駆細胞や幹細胞を除き、成熟した分化細胞のみを単離し移植することで腫瘍化リスクを回避することが最も重要となる。

質問 1 5) 臨床応用では目的細胞へと分化誘導したのちに、残存未分化細胞を取り除いて移植するのか？

(回答) TC-LV 導入細胞の分化誘導後に薬剤投与し、残存未分化細胞を除去後に移植とする。本法はさらに従来は不可能であった、移植後悪性転化した細胞の殺傷も可能な Safety switch としても有効である。

質問 1 6) m-CRA の癌に対する殺傷メカニズムは？

(回答) アデノウイルス増殖制御部に、癌特異的 promoter を用いているため、がん細胞のみでウイルス増殖し、ウイルス自身の増殖による細胞変性効果で腫瘍を溶解し殺傷するものである。

質問 1 7) Figure 9b で細胞生存率が 0%にはなっていないが、残存しているのか？

(回答) グラフの性質上、吸光度測定による評価では細胞数を正確には反映しておらず、写真では全滅しても数値が 0 にならないこともあるが、目視により細胞の死滅を確認している。

質問 1 8) ex vivo での TC-LV 導入後、細胞移植はどのように行っているか？

(回答) 細胞が生着できるよう 30%マトリゲルを使用し、 4×10^6 個の細胞を移植している。

質問 1 9) EB (胚葉体) は ES 細胞だけでなく iPS 細胞でも形成できるのか？

(回答) iPS 細胞の場合、多少成長が遅く細胞塊が小さい傾向は見られるが、形成は可能であった。

質問 2 0) EB の形成状態によって、分化の進行状態も異なるのでは？

(回答) EB 細胞塊の大きさによって、細胞塊内部の分化状態にも違いがでる可能性はあるので、分化・未分化マーカー遺伝子等の発現解析を行う予定である。

質問 2 1) Figure 2 の分化細胞での検証で、virus 感染した細胞の方が非感染細胞より細胞生存率が高い部分があるがこれはなぜか？

(回答) 細胞の絶対数ではなく吸光度測定を行っているため、実験のばらつきの範囲であり、有意差は見られていない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。