

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10347

研究課題名(和文) 肺がん脳転移発症における M2 マクロファージの病的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the M2 macrophage in brain metastases from lung cancer

研究代表者

奥田 武司 (OKUDA, TAKESHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10340796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺がんにおける脳転移発症のメカニズムにM2マクロファージを中心とした免疫機構が関与していることが判明した。さらにマイクロアレイ解析にて、このM2マクロファージの治療標的となり得る遺伝子群も同定することができた。また、この免疫応答は腸内細菌が産生する代謝産物も関与していることを証明した。これらより、今後、脳転移を予防する新たな治療戦略が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was recognized that the immune system mainly on the M2 macrophage participated in mechanism of the metastasis to brain onset in the lung cancer. Furthermore, I was able to identify the gene cluster which could become the treatment target of this M2 macrophage in microarray analysis. In addition, this immunoresponse proved that the metabolism product which intestinal bacteria produced participated. The possibility that a new treatment strategy to prevent metastasis to brain was provided was suggested in future.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：転移性脳腫瘍 M2マクロファージ 肺がん

1. 研究開始当初の背景

(1) がん原発巣に対する治療成績向上に伴い転移性脳腫瘍罹患率が漸増しており、がん患者の約 10% が転移性脳腫瘍を発症するとされている。統計的には肺がんを原発とするものが最も多い (表 1; 脳腫瘍全国統計第 12 版)。転移性脳腫瘍は頭蓋内圧亢進症状または局所神経症状により患者の QOL を低下させ、がんにおける主要な予後不良因子となっている (Steeg PS. Nat Rev Cancer 2011, 11:352)。従って、がん患者における転移性脳腫瘍予防の意義・需要は極めて大きい。

| 症例 | 全国集計 |
|-------|---------|
| 肺癌 | 51.90% |
| 乳癌 | 9.30% |
| 直腸癌 | 5.70% |
| 腎/膀胱癌 | 5.30% |
| 胃癌 | 4.80% |
| 腸 | 4.70% |
| 頭頸部癌 | 3.20% |
| 肝 | 2.10% |
| 子宮癌 | 1.70% |
| その他 | 11.30% |
| (症例数) | 13,393例 |

表 1: 転移性脳腫瘍の原発巣頻度

(2) 解剖学的には脳血管内皮は血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を構成し、脳内への液性物質および細胞等の移行を厳密に制御している。この BBB のために化学療法薬の多くは脳実質内透過性に乏しく、これまでのところ転移性脳腫瘍に対して著効するものは知られていない (Owonikoko TK. Nat Rev Clin Oncol 2014, 11:203)。このような背景から、化学療法を代替・補助する新規治療法の出現が望まれている。

(3) 免疫学的に脳実質はリンパ系組織を欠き、実質内への生理的免疫細胞浸潤は極めて稀である。そのため脳・中枢神経系は免疫学的特権部位と言われる。しかし最近で

は脳組織および脳病変において様々な免疫応答が生じることが知られている (Ransohoff RM. Nat Rev Immunol 2003, 3:569)。これらの知見を基に、脳・中枢神経系疾患に対してさまざまな免疫学的アプローチがなされており、脳腫瘍についても数多くの免疫療法が試みられている (Fujita M. Brain Tumor 2011, 19:331)。

(4) 一方、我々は脳腫瘍微小環境内における慢性炎症とそれに付随する免疫抑制性細胞内シグナルおよびサイトカインに注目し研究をすすめてきた。脳腫瘍において特に顕著であった発見は、腫瘍細胞内の恒常的 STAT3 シグナル亢進が腫瘍微小環境内における STAT3 活性化型サイトカイン産生を促し、それが腫瘍周囲の免疫細胞における STAT3 シグナルを亢進させ慢性炎症状態を惹起することであった (Fujita M. J Immunol 2008, 180:2089)。また STAT3 阻害薬により腫瘍細胞のアポトーシスを誘導するのみならず、慢性炎症状態の解除をもたらし、腫瘍抗原特異的 CTL の活性化を誘導しうることを明らかにした。さらに後の研究により、脳腫瘍微小環境内では CCL2 サイトカインの発現亢進がみられ、腫瘍微小環境内への M2 マクロファージ集積に関与していることを明らかにした (Zhu X. J Neurooncol 2011, 104:83)。また CCL2 遺伝子欠損マウスを用いた実験により、本ケモカインが M2 マクロファージ集積の中心的役割をする分子であり、CCL2 の治療標的の可能性も示した (Fujita M. Cancer Res 2011, 71: 2664)。

(5) さらに直近の研究において、我々は転移性脳腫瘍発症には M2 マクロファージとよばれる細胞が惹起する慢性炎症が関わっていることを明らかにした (Fujita M, Okuda T, Nakata S. Cancer Res 投稿中)。肺がん転移性脳腫瘍組織内では CCL2 および CXCL12 ケモカインの発現亢進がみられ、同時に末梢血内において該当受容体を発現するマクロファージ増加を伴っていた (次頁図 1)。またこれらのマクロファージでは所謂 M2 型サイトカイン(IL-4, IL-6 等) の産生増加がみられた。ここで M2 マクロファージは慢性炎症の惹起および遷延化の中心的役割をする細胞として知られる (Gabrilovich DI. Nat Rev Immunol 2009, 9:162)。さらにこれら腫瘍内マクロファージ由来 mRNA を用いた DNA マイクロアレイ解析により、本細胞群は通常のマクロファージと比較し、共刺激分子 CD276 の発現低下をはじめとするユニークな表面抗原プロファイルを持っていることが明らかとなった。以上の結果より、本細胞群が関わる一連のカスケードが転移性脳腫瘍発症および増悪の寄与因子であることが示唆される。

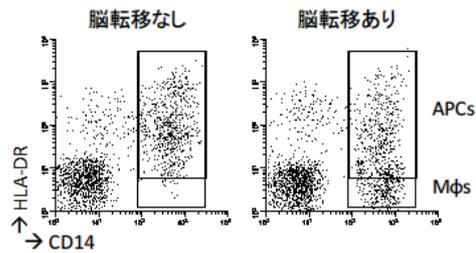


図1: 転移性脳腫瘍に伴うM2マクロファージの増加。 以後の解析により、脳転移を伴う肺がん症例末梢血内マクロファージは、M2表現型を示していた。

2. 研究の目的

以上の問題点・知見に着目し、本研究では肺がん転移性脳腫瘍ヒト検体に加え、臨床像に即したマウス実験モデルを確立し、本病態におけるM2マクロファージの寄与をより詳細に解析、さらに本細胞群を標的とした治療法の確立をめざすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) siRNAによるM2マクロファージ関連遺伝子の機能解析: 前述のDNAマイクロアレイの結果より得られた各遺伝子の機能を明らかにするため、ヒトマクロファージ細胞株THP-1を用いて特異的siRNAによりこれらの遺伝子をノックダウンした。同時にセルソーターを用いて一部の患者検体よりM2マクロファージを単離し、siRNA処理に供した。フローサイトメトリーによる機能的表面抗原の解析およびサイトカイン発現プロファイル解析、さらにはCD8陽性Tリンパ球との共培養による抗原特異的CTL誘導抑制効果などを評価した。

(2) マウス血行性肺がん脳転移実験モデルの作製・改良: 以前に作製したルシフェラーゼ発現C57B6マウス由来肺がん細胞株LL/2lucが同系マウス頭蓋内に生着することを確認した(図3)。さらに同細胞を経皮的左心室内注入することで多発性脳転移を作製することもできた。さらに先行文にならない(Liu R. Gene Ther 2005, 12:647)、全身麻酔下に頸動脈を露出し頸動脈内注射が可能であることも確認した(図4)。これらの技術を応用し、作製済のLL/2lucマウス肺がん細胞を経頸動脈の投与し、血行性転移性脳腫瘍を作製する。腫瘍増殖は造影CTあるいはルシフェラーゼ発光計測器を用いてモニターした(図5)。

(3) ケモカイン受容体遺伝子欠損マウスを用いたM2マクロファージ関連ケモカインの機能評価: M2マクロファージDNAマイクロアレイおよび本研究結果より、M2マクロファージ脳転移集積にはCCR4ケモカイン軸が関与していることが明らかとなった。そこでCCR4-KOマウスを宿主として脳腫瘍担がん状態にさせ、上記実験計画にならって各種免疫学的評価を行った。

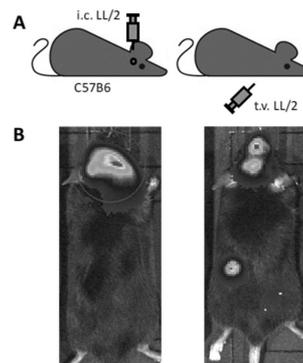


図3: 転移性脳腫瘍マウスモデルの開発。 肺がん細胞株の脳内移植(左)および心室内注入(右)

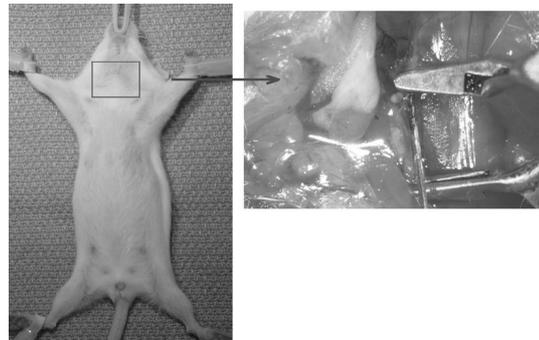


図4: マウス頸動脈の露出および動脈内注射

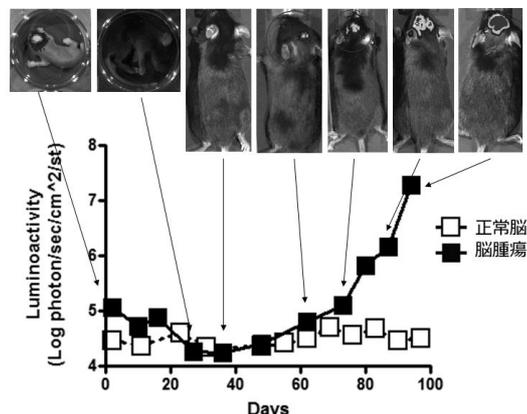


図5: ルシフェラーゼ発光系により同一個体で脳腫瘍増大をモニターした。

(4) 肺がん脳転移マウスにおける腸内細菌叢解析: 近年の次世代シーケンサー技術の発達により、腸内細菌叢と宿主免疫機能との関

連が示唆されている。そこで本研究では、放射線脳壊死マウスおよび対象マウスより糞便を採取し、16S リボソーム RNA をコードする遺伝子を次世代シーケンサーで読み込み、腸内細菌叢の分布を調べた。

4 . 研究成果

肺がんにおける脳転移発症のメカニズムに M2 マクロファージを中心とした免疫機構が関与していることが判明した。さらにマイクロアレイ解析にて、この M2 マクロファージの治療標的となり得る遺伝子群も同定することができた。また、この免疫応答は腸内細菌が産生する代謝産物も関与していることを証明した。これらより、今後、脳転移を予防する新たな治療戦略が得られる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Okuda T, Tasaki T, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, Kato A, Fujita M: Efficacy of combination therapy with MET and VEGF inhibitors for MET-overexpressing glioblastoma. *Anticancer research* 37:3871-3876, 2017 (査読あり)

Okuda T, Kato A, Fujita M: Successful treatment of large intracranial granulocytic sarcomas. *J Clin Neurol Neurosurg spine* 1:112, 2017 (査読あり)

Uzuka T, Takahashi H, Nakasu Y, Okuda T, Mitsuya K, Hayashi N, Hirose T, Kurai H. Surgical Site Infection after Malignant Brain Tumor Resection: A Multicenter Study for Induction of a Basic Care Bundle. *Neurologia medico-chirurgica*, 57:542-547, 2017 (査読あり)

Hayashi N, Takahashi H, Hasegawa Y, Higuchi F, Takahashi M, Makino K, Takagaki M, Akimoto J, Okuda T, Okita Y, Mitsuya K, Hirashima Y, Narita Y, Nakasu Y, Committee of Brain Tumor Registry of Japan Supported by the Japan Neurosurgical Society. A nationwide multi-institutional retrospective study to identify prognostic factors and develop a graded prognostic assessment system for patients with brain metastases from uterine corpus and cervical cancer. *BMC cancer* 17:397, 2017 (査読あり)

Fujita M, Nakata S. Significance of immune cell migration/adhesion in central

nervous system tumors. *J Adv Oncol*. 1:1005, 2017 (査読あり)

Sakai K, Takeda M, Hayashi H, Tanaka K, Okuda T, Kato A, Nishimura Y, Mitsudomi T, Koyama A, Nakagawa K: Clinical outcome of node-negative oligometastatic non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer* 7: 670-675, 2016 (査読あり)

Okuda T, Fujita M, Yoshioka H, Tasaki T, Izumoto S, Kato A: Endoscopic Biopsy using High-Dose Fluorescein Sodium for Malignant Brain Tumors. *International Journal of Neurology and Neurotherapy* 3:1052, 2016 (査読あり)

Tasaki T, Fujita M, Okuda T, Yoneshige A, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, Kato A: MET Expressed in Glioma Stem Cells Is a Potent Therapeutic Target for Glioblastoma Multiforme. *Anticancer Research* 36:3571-3578, 2016 (査読あり)

泉本修一, 友金勇介, 奥田武司, 眞田寧皓, 加藤天美. 頭蓋内血管周皮腫 (SFT の亜型として)の診断・治療と長期予後. *Progress in Neuro-Oncology* 23:27-34,2016 (査読なし)

奥田武司. 長期的予後を視野に入れた転移性脳腫瘍の多角的治療戦略-分子標的薬の役割. *脳神経外科速報* 25:1307-1315, 2015 (査読なし)

〔学会発表〕(計 13 件)

田崎貴之, 泉本修一, 宮内正晴, 奥田武司, 中川信宏, 中野直樹, 加藤天美, 藤田眞. 神経膠腫に合併したてんかん患者におけるペランパネルの発作抑制効果と腫瘍抑制効果. 第 21 回パイオ治療法研究会学術集会, 福岡県, 2017 年 12 月 2 日

脈絡叢全域に腫瘍形成した CNS PTLD の一例. 田崎貴之, 奥田武司, 辻潔, 井上宏昭, 山名正樹, 楠進, 松村到, 加藤天美. 第 76 回日本脳神経外科学会総会, 愛知県, 2017 年 10 月 13 日

奥田武司, 林央周, 高橋雅道, 宇塚岳夫, 沖田典子, 植木敬介, 藤中俊之, 藤田眞, 加藤天美, 成田善孝, 中洲庸子. 多施設共同研究による肝細胞脳転移の実態調査と治療戦略の確立. 第 76 回日本脳神経外科学会総会, 愛知県, 2017 年 10 月 12 日

奥田武司, 加藤天美. 分子標的薬時代における非小細胞肺癌脳転移の治療戦略. 第 26 回日本定位放射線治療学会, 大阪府, 2017 年 6 月 30 日

奥田武司, 眞田寧皓, 泉本修一, 加藤天美. 海綿静脈洞に発生した血管内リンパ腫の1例. 第35回日本脳腫瘍病理学会, 栃木県, 2017年5月19日

奥田武司, 藤田眞, 田崎貴之, 吉岡宏真, 泉本修一, 加藤天美. 膠芽腫におけるMET遺伝子発現の臨床的意義. 第75回日本脳神経外科学会総会, 福岡県, 2016年9月30日

奥田武司. 転移性脳腫瘍治療における分子標的薬のインパクト. 第25回日本定位放射線治療学会, 京都府, 2016年5月27日

奥田武司, 泉本修一, 吉岡宏真, 田崎貴之, 加藤天美. 後期高齢者、特に80歳以上の膠芽腫に対する治療. 第29回日本老年脳神経外科学会, 奈良県, 2016年4月23日

奥田武司, 藤田眞, 田崎貴之, 中田晋, 吉岡宏真, 泉本修一, 加藤天美. 膠芽腫におけるMET遺伝子発現の臨床的意義. 第34回日本脳腫瘍病理学会, 東京都, 2016年5月28日

田崎貴之, 藤田眞, 奥田武司, 吉岡宏真, 加藤天美. 悪性神経膠腫におけるMET遺伝子発現の臨床的意義. 第19回バイオ治療法研究会学術集会, 東京都, 2015年12月5日

奥田武司, 林央周, 高橋雅道, 宇塚岳夫, 沖田典子, 植木敬介, 藤中俊之, 藤田眞, 加藤天美, 成田善孝, 中洲庸子. 多施設共同研究による肝細胞脳転移の実態調査と治療戦略の確立. 第53回日本癌治療学会学術集会, 京都府, 2015年10月31日

奥田武司, 加藤天美. 分子標的薬時代における転移性脳腫瘍治療の再考. 第20回日本脳腫瘍の外科学会, 愛知県, 2015年9月25日

Fujita M, Okuda T, Nakata S, Komohara Y, Kato A, Yoshie O. Tumor-associated macrophages positive for B7-H3 and/or B7-H5 accelerate the brain metastasis formation of lung cancers. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015, 東京都, 2015年7月11日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 武司 (OKUDA, Takeshi)
近畿大学・医学部・医学部講師
研究者番号: 10340796

(2) 研究分担者

藤田 眞 (FUJITA, Mitsugu)
近畿大学・医学部・准教授

研究者番号: 40609997

中田 晋 (NAKATA, Susumu)
京都薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80590695