

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09012

研究課題名(和文)放射線脳壊死関連マクロファージに発現する免疫制御分子B7ファミリーの意義の解明

研究課題名(英文)Significance of B7 family expressed on macrophages relevant to radiation necrosis of brain

研究代表者

藤田 貢(FUJITA, Mitsugu)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：40609997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳放射線壊死組織内に集積するM2マクロファージではB7-H3およびB7-H5といった免疫抑制性分子が発現亢進していることが判明した。同様にグリオーマ放射線脳壊死マウスモデルにおいても同分子の発現亢進がみられ、これらの分子が放射線脳壊死の周囲浮腫に関与していることが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いたマウス腸内細菌叢解析の結果、クロストリジア目が脳放射線壊死に関連する免疫応答の強度と相関していた。またM2除去実験によりマウス生存日数の著明な延長がみられた。以上より、脳放射線壊死の悪化には組織中に浸潤するM2マクロファージおよび腸内細菌が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、脳放射線壊死巣に生じる免疫反応の詳細が明らかとなった。その実態は B7-H3 あるいは B7-H5 を発現するマクロファージによる局所的免疫抑制であり、それを適切に解除することによって発症予防あるいは治療を行う可能性が示唆された。これにより QOL を維持した状態でのグリオーマ治療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In M2 macrophages accumulating in radioactive necrotic brain tissues, immunosuppressive molecules such as B7-H3 and B7-H5 were found to be upregulated. Likewise, in the mouse model, the expression of these molecules was also enhanced, and they were found to be involved in peripheral edema of radiation brain necrosis. Analysis of intestinal microflora in mice using the next generation sequencer showed that Clostridia correlated with the intensity of the immune response related to cerebral radiation necrosis. M2 removal experiment showed marked prolongation of mouse survival days. These results suggest that M2 macrophages and intestinal bacteria infiltrating into tissues are involved in the deterioration of cerebral radiation necrosis.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 放射線脳壊死 マクロファージ 免疫チェックポイント分子 腸内細菌叢

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍グリオーマの主たる治療法は外科的摘出であるが (Eyüpoglu IY. *Nat Rev Neurol* 2013, 9:141)、実際には全摘出困難な例が多く治療効果には限界がある。しかしながら近年の化学療法ならびに放射線療法の発達により、グリオーマ長期生存例の割合が増加している (Stupp R. *N Engl J Med* 2005, 352:987)。一方で症候性遅発性放射線障害の頻度も増加し (Hutchinson L. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8:125)、悪性グリオーマの平均生存期間延長は遅発性放射線障害の制御という新たな課題を我々に突き付けている。遅発性放射線障害の典型が脳放射線壊死であり、進行性の組織壊死および脳浮腫によってもたらされる神経症状悪化は全生存期間に占める入院期間の割合を増やす一因となっている。

(2) グリオーマ放射線脳壊死に対する薬物療法としては抗凝固薬・ステロイドホルモン・高浸透圧利尿剤等の投与が行われるが、症状の顕著な改善は期待し難く、また治療薬の副作用も無視できない。これまでの研究で我々は放射線脳壊死組織内における血管内皮増殖因子 (VEGF) 過剰産生がその病態の主因であることを明らかにし (Furuse M. *J Neurooncol.* 2011, 102:471 / 図1)、抗血管新生薬であるベバシズマブ (抗 VEGF 抗体) が脳放射線壊死に著効を示すこと示した (Miyatake S. *Neuro Oncol.* 2013, 15:650 / 図2)。それらの結果を元に、現在は本治療の薬事承認を目指した第3項先進医療が実施されている。しかしながらベバシズマブ治療終了後に壊死の再発をきたす症例も多く、脳放射線壊死の病態すべてが解明されたとは言い切れない現状である。

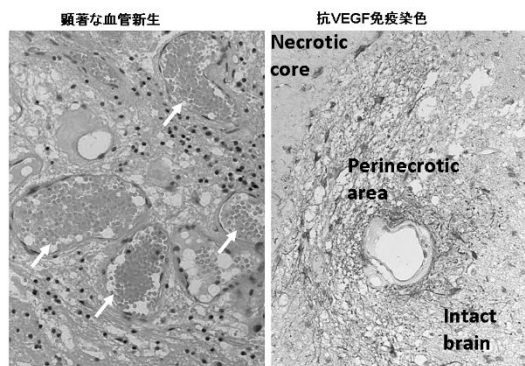


図1: 放射線壊死組織での VEGF 発現と浮腫の発生

矢印は血管新生を示し、その周囲に脳浮腫を認める。抗 VEGF の免疫染色では反応性アストロサイトが VEGF を産生し、その周囲に血管新生を認める。

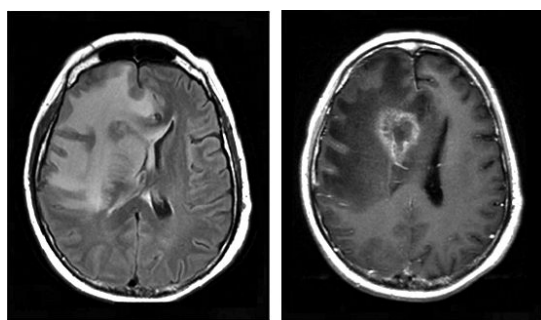


図2: 脳放射線壊死に対するベバシズマブ治療の経緯

ベバシズマブ投与により、脳放射線壊死の浮腫、造影域は軽快したが、治療1年後に壊死再燃を認めた。これら病変が腫瘍の再発でなく、脳壊死であることをアミノ酸 PET で確認してある。

(3) 以前の研究で我々は、本病態には慢性炎症が関わることを示した (Yoritsune E. *J Radiat Res.* 2014, 55:803)。とくにヒト放射線脳壊死組織内ではケモカイン CXCL12 発現亢進およびその受容体 CXCR4 陽性マクロファージ浸潤が亢進し、かつ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 (Gabrilovich DI. *Nat Rev Immunol* 2009, 9:162)、本細胞群が関わる一連のカスケードが脳放射線壊死発症および浮腫増悪の寄与因子であると推測された。

## 2. 研究の目的

以上の問題点・知見に着目し、本研究では脳放射線壊死の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) 放射線脳壊死マウス実験モデル作製および手技改良: 予備実験により放射線脳壊死マウスモデル作製が可能であることが分かっており、小動物放射線治療装置ラジフレックス 350 (図 3) を用いてマウス頭蓋に 60 Gy 以上の外照射を加え、60 日程度の経過でヒト症候性放射線脳壊死相当の病理所見をともなう脳実質内病変を誘導された (図 4-5)。そこで本研究では照射されたマウスの自然歴、照射量、照射間隔、総照射時間などを解析した。

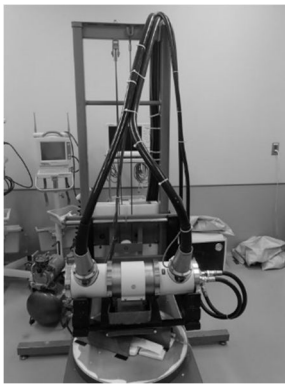


図 3: 小動物放射線治療装置ラジフレックス 350

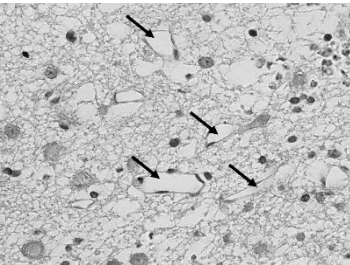
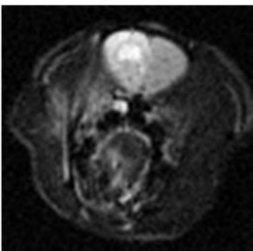


図 4: C57B6 マウス脳での壊死組織

壊死巣周囲の脳組織では周囲脳浮腫を伴う血管新生 (矢印) がみられ、ヒトでの症候性脳放射線壊死に近似している。

Day 78



Day 87

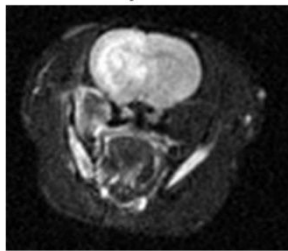


図 5: 60 Gy X 線照射ラットの経時的 T2 強調 MRI

動物用 MRI で同一個体での経時的観察が可能であった。

(2) 放射線脳壊死マウス脳組織からの M2 マクロファージ抽出および機能分子の発現解析: マウス脳組織からはパーコールを用いた比重分離法により各種免疫細胞の分離が可能である (Fujita M. *Cancer Res* 2008, 69:1587)。我々は長年同手法を用いて脳腫瘍内微小環境の評価をしており、同手法を用いて放射線脳壊死マウス脳内からも免疫細胞が単離し解析した。特に本研究では、変微小環境内の M2 マクロファージおよび各種免疫担当細胞を単離し、各細胞の機能分子発現解析を行った (図 6)。

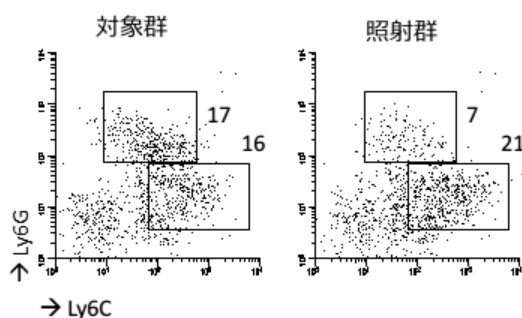


図 6: 比重分離法による脳内 M2 マクロファージの解析

マウス脳壊死組織から抽出した M2 マクロファージのフローサイトメトリーによる解析。さらに Ly6C および Ly6G 発現量の違いにより亜群に分離しえた。

(3) 放射線脳壊死マウス脳組織における各種ケモカイン発現解析: M2 マクロファージをはじめとする免疫細胞の遊走には各種ケモカインが深く関与している (Yoshie O. *Immunity* 2012, 36:705)。そこで本研究では DNA マイクロアレイおよび定量的リアルタイム PCR を用い、放射線脳壊死マウス脳内でのケモカイン発現量を経時的に測定し、M2 マクロファージおよび各種免疫細胞が壊死組織内集積に寄与するケモカインの同定を試みた (図 7)。

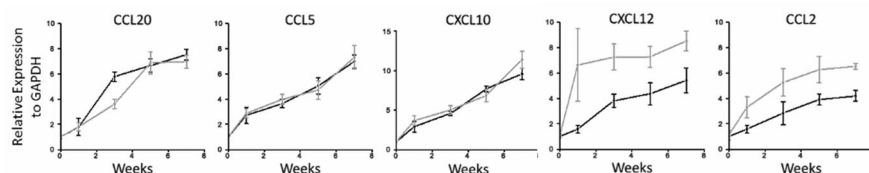
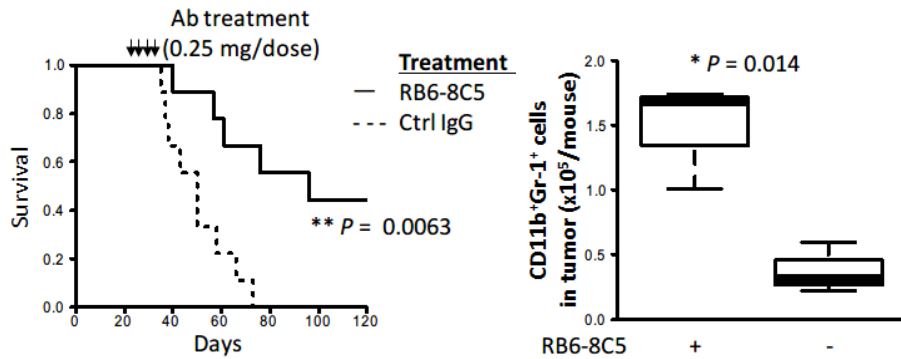


図 7: RT-qPCR による比重分離法による脳内 M2 マクロファージの解析

マウス脳壊死組織よりメッセンジャー RNA を抽出し、さらに定量的リアルタイム PCR により各種ケモカインの経時的变化を解析した (灰色が壊死組織、黒色が反対側脳組織)。

(4) 放射線脳壊死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 リボゾーム 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。

(5) 自発型マウスグリオーマ照射後の M2 マクロファージ 機能解析: 我々は *Sleeping Beauty* トランスポゾン系を用いた自発型脳腫瘍マウスモデルを継続使用している (Kohanbash G. *Cancer Res* 2013, 73:6413)。本手法では、新生児マウス脳室周囲に多く存在する神経幹細胞に複数のがん遺伝子を導入し、グリオーマに類似した脳腫瘍を誘導する。そこで本研究では、マウス脳内にグリオーマを誘導した後、前頁と同様に脳局所照射を行い、臨床に即したグリオーマ放射線脳壊死マウス実験モデルの構築を行った。さらに脳腫瘍マウスに RB6-8C5 抗体を投与し、M2 マクロファージを除去した (図 8)。評価項目は前項 (2) (3) に準じた。



**図 8: M2 マクロファージ除去実験**

グリオーマ放射線脳壊死マウスに抗マウス Gr-1 抗体 RB6-8C5 投与し M2 マクロファージを除去したところ、生存率延長をみた。

#### 4 . 研究成果

以上の結果より、ヒト脳放射線壊死組織内には M2 マクロファージの集積亢進がみられ、これらの M2 マクロファージではさらに B7-H3 および B7-H5 といった免疫抑制性分子が発現亢進していることが判明した。同様にグリオーマ放射線脳壊死マウスモデルにおいても同分子の発現亢進がみられ、これらの分子が放射線脳壊死の周囲浮腫に関与していることが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いたマウス腸内細菌叢を調べた結果、クロストリジア目が脳放射線壊死に関連する免疫応答の強度と相関することが明らかとなった。また M2 除去実験によりマウス生存日数の著明な延長がみられた。以上の結果より、脳放射線壊死の悪化には組織中に浸潤する M2 マクロファージの一部が関与しており、また腸内細菌が産生する代謝産物も関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 18件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakata S, Fujita M, Nakanishi H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Efficacy of Afatinib and Lapatinib Against HER2 Gene-amplified Trastuzumab-sensitive and -resistant Human Gastric Cancer Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5927-5932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Fukuoka E, Yamashita K, Tanaka T, Sawada R, Sugita Y, Arimoto A, Fujita M, Takiguchi G, Matsuda T, Oshikiri T, Nakamura T, Suzuki S, Kakeji Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Neoadjuvant Chemotherapy Increases PD-L1 Expression and CD8(+) Tumor-infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4539-4548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okuda T, Fujita M, Kato A.	4. 巻 39
2. 論文標題 Significance of Elevated HMGB1 Expression in Pituitary Apoplexy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4491-4494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakao T, Okuda T, Fujita M, Kato A.	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of leptomeningeal metastases of human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer that responded well to lapatinib plus capecitabine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgical Neurology International	6. 最初と最後の頁 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI-106-2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakamoto D, Takagi T, Fujita M, Omura S, Yoshida Y, Iida T, Yoshimura S.	4. 巻 39
2. 論文標題 Basic Gene Expression Characteristics of Glioma Stem Cells and Human Glioblastoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 597-607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashita K, Arimoto A, Nishi M, Tanaka T, Fujita M, Fukuoka E, Sugita Y, Nakagawa A, Hasegawa H, Suzuki S, Kakeji Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 Application of iNKT Cell-targeted Active Immunotherapy in Cancer Treatment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4233-4239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12719.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanigawa S, Fujita M, Moyama C, Ando S, Ii H, Kojima Y, Fujishita T, Aoki M, Takeuchi H, Yamanaka T, Takahashi Y, Hashimoto N, Nakata S	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Gli2 suppresses tumorigenicity in glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41417-020-00282-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Park AM, Khadka S, Sato F, Omura S, Fujita M, Hsu DK, Liu FT, Tsunoda I	4. 巻 11
2. 論文標題 Galectin-3 as a Therapeutic Target for NSAID-Induced Intestinal Ulcers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 550366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.550366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Omura S, Sato F, Park AM, Fujita M, Khadka S, Nakamura Y, Katsuki A, Nishio K, Gavins FNE, Tsunoda I	4. 巻 11
2. 論文標題 Bioinformatics Analysis of Gut Microbiota and CNS Transcriptome in Virus-Induced Acute Myelitis and Chronic Inflammatory Demyelination; Potential Association of Distinct Bacteria With CNS IgA Upregulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.01138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakao T, Okuda T, Yoshioka H, Fujita M	4. 巻 40
2. 論文標題 Clinical Outcomes of Surgical Resection for Brain Metastases from Non-small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4801 ~ 4804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14483	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kubota M, Ito K, Tomimoto K, Kanazaki M, Tsukiyama K, Kubota A, Kuroki H, Fujita M, Vandenplas Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Lactobacillus reuteri DSM 17938 and Magnesium Oxide in Children with Functional Chronic Constipation: A Double-Blind and Randomized Clinical Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 225 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12010225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tatebayashi K, Takagi T, Fujita M, Doe N, Nakagomi T, Matsuyama T, Yoshimura S	4. 巻 1712
2. 論文標題 Adipose-derived stem cell therapy inhibits the deterioration of cerebral infarction by altering macrophage kinetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 139 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.01.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する



1. 著者名 Omura S, Sato F, Martinez NE, Park AM, Fujita M, Kennett NJ, Cvek U, Minagar A, Alexander JS, Tsunoda I	4. 巻 10
2. 論文標題 Bioinformatics Analyses Determined the Distinct CNS and Peripheral Surrogate Biomarker Candidates Between Two Mouse Models for Progressive Multiple Sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuramoto Y, Takagi T, Tatebayashi K, Beppu M, Doe N, Fujita M, Yoshimura S	4. 巻 1711
2. 論文標題 Intravenous administration of human adipose-derived stem cells ameliorates motor and cognitive function for intracerebral hemorrhage mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 58 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.12.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanakawa S, Kitoh A, Shibuya R, Dainichi T, Nomura T, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Nakajima S, Fujita M, Kabashima K	4. 巻 144
2. 論文標題 Percutaneous sensitization is limited by in situ inhibition of cutaneous dendritic cell migration through skin-resident regulatory T cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 1343 ~ 1353.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2019.05.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Omura S, Fujita M, Park AM, Alexander JS, Kilgore PCSR, Cvek U, Tsunoda I	4. 巻 23
2. 論文標題 Computational analyses associate the CNS lymphatic molecules with disease progression of a viral model for multiple sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroinfection	6. 最初と最後の頁 114~120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okuda T, Hayashi N, Takahashi M, Uzuka T, Okita Y, Otani R, Fujinaka T, Fujita M, Kato A, Narita Y, Nakasu Y	4. 巻 23
2. 論文標題 Clinical outcomes of brain metastases from hepatocellular carcinoma: a multicenter retrospective study and a literature review	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1095 ~ 1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1312-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuo K, Nagakubo D, Yamamoto S, Shigeta A, Tomida S, Fujita M, Hirata T, Tsunoda I, Nakayama T, Yoshie O	4. 巻 200
2. 論文標題 CCL28-Deficient Mice Have Reduced IgA Antibody?Secreting Cells and an Altered Microbiota in the Colon	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 800 ~ 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1700037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Izumoto S, Miyauchi M, Tasaki T, Okuda T, Nakagawa N, Nakano N, Kato A, Fujita M	4. 巻 38
2. 論文標題 Seizures and Tumor Progression in Glioma Patients with Uncontrollable Epilepsy Treated with Perampanel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4361 ~ 4366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12737	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥田武司, 藤田 貢, 加藤天美.
2. 発表標題 下垂体卒中とHMGB1
3. 学会等名 第37 回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 貢, 田崎 貴之, 宮内 正晴, 奥田 武司, 中川 修宏, 中野 直樹, 加藤 天美, 泉本 修一
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中田 晋  (NAKATA Susumu)  (80590695)	京都薬科大学・薬学部・准教授   (34306)	
研究分担者	宮武 伸一  (MIYATAKE Shin-Ichi)  (90209916)	大阪医科大学・医学部・特別職務担当教員(教授)   (34401)	
研究分担者	山下 公大  (YAMASHITA Kimihiro)  (80535427)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授   (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------