

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09529

研究課題名(和文) 膠芽腫における腫瘍関連マクロファージによる受容体型チロシンキナーゼ活性化の究明

研究課題名(英文) Macrophage in glioblastoma activates receptor tyrosine kinase

研究代表者

貞廣 浩和 (Sadahiro, Hirokazu)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50509320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫の病理標本を用い、腫瘍関連マクロファージが膠芽腫のどのような病理像の部分に多く存在するか、CD11bの免疫染色を行った。この際、病理像を 腫瘍境界領域、細胞集簇領域、壊死領域、血管増勢領域に分類し検討した。移植マウスを作成し、腫瘍関連マクロファージの機能や生存に強く関わるcolony stimulating factor-1 (CSF-1)の阻害薬であるBLZ945を投与し、生存曲線を作成した。有意な延長が得られた。腫瘍関連マクロファージは血管周囲から壊死組織に向かい、浸潤している可能性を見だし、壊死組織やhypoxia と関連が深い可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根治が得られていない悪性脳腫瘍において、腫瘍細胞のみならず、脳腫瘍内に存在する免疫細胞の役割を解析した。免疫細胞が腫瘍を殺すということにはならず、免疫細胞が腫瘍を増殖させる因子を放出することで腫瘍が増大する。そのため、脳腫瘍内からこの免疫細胞を選択的に抽出し、どのような増殖因子を放出するか検討した。それを薬剤で阻害し、腫瘍の増殖を抑えられることも確認した。実際の脳腫瘍標本の中にどの程度、この免疫細胞が混入するか、どのような場所に混入するかでその役割を解析した。

研究成果の概要(英文)：Using pathological specimens of glioblastoma, immunostaining of CD11b was performed to see what part of the pathological image of glioblastoma was abundant in tumor associated macrophage. At this time, the pathological images were classified into (1) tumor border region, (2) cell colonization region, (3) necrotic region, and (4) vascular hyperplasia region. Brain tumor transplanted mice were made and administered with BLZ945, an inhibitor of colony stimulating factor-1 (CSF-1), which is strongly involved in tumor-related macrophage function and survival, to create a survival curve. A significant prolongation was obtained. Tumor associated macrophages were found to be infiltrated from around blood vessels toward necrotic tissue, and were found to be closely related to necrotic tissue and hypoxia.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 腫瘍関連マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

原発性悪性脳腫瘍である膠芽腫の治療方法は、可及的な外科的摘出後、放射線療法とアルキル化剤であるテモゾロミドの併用療法である。しかし、一度は緩解してもほぼ 100%再発し、その平均生存期間は 2 年に満たず、未だ長期生存の得られない数少ない固形癌である。近年、様々な癌腫に対して分子標的療法が盛んに研究されており、膠芽腫に対しても多くの分子標的療法が試みられている。膠芽腫でも RTK である Epidermal growth factor receptor (EGFR) や Platelet derived growth factor alpha (PDGFRA) の増幅や変異が報告され、それらに対するチロシンキナーゼ阻害薬 Tyrosine kinase inhibitor (TKI) を用いた臨床試験が試みられているが、未だ有効な新規治療法は確立していない。膠芽腫は多形性膠芽腫とも言われ、その病理像は細胞集族のみではなく、pseudopalisading に有名な壊死像や血管壁に細胞増勢を認める microvascular proliferation など多岐にわたり、リンパ球など炎症細胞の浸潤も多く観察される。Pyonteck らは腫瘍関連マクロファージ Tumor associated Macrophage (TAM) がサイトカインを産生し、膠芽腫の増殖に強く影響していると報告している。つまり、膠芽腫は単純な腫瘍細胞増殖ではなく、複雑な炎症細胞との関連が重要と考えられる。我々は受容体型チロシンキナーゼ Receptor tyrosine kinase (RTK) のひとつである AXL に関して研究してきた。この AXL が、膠芽腫に強発現していることを示し、さらに TAM から産生されるプロテイン S (PROS1) によって AXL がリン酸化されることを示した。このように他の膠芽腫に強発現する様々な RTK のリン酸化も TAM によって引き起こされている可能性が考えられる。膠芽腫細胞と TAM の詳細な相互作用に関しては、まだ不明な点が多く、今後の研究課題と考えられる。従来 of 腫瘍細胞に対する効果のみを考える治療ではなく、TAM に代表される腫瘍の微小環境も含めた多形成膠芽腫の生態について、そのメカニズムを詳細に検討する必要がある、それが将来の新たな治療を開発する手掛かりになるのではないかと、というのが本研究の問いである。

## 2. 研究の目的

原発性悪性脳腫瘍である膠芽腫は未だ根治の得られない数少ない固形癌である。受容体型チロシンキナーゼ Receptor tyrosine kinase (RTK) である Epidermal growth factor receptor (EGFR) や platelet derived growth factor receptor A (PDGFRA) の増幅や変異は膠芽腫で知られているが、それらに対するチロシンキナーゼ阻害薬 Tyrosine kinase inhibitor (TKI) も効果が得られていない。近年、癌の基礎研究においての微小環境が研究のトピックとなっており、腫瘍関連マクロファージ Tumor associated Macrophage (TAM) が膠芽腫に対して重要な役割を果たして

いると報告されている。我々は先行研究として TAM が RTK の一つである AXL を強くリン酸化させることを示した。本研究は、腫瘍の増殖や浸潤能などに大きく関わる RTK に、TAM がどのように関わるかを究明し、TAM と RTK を共に阻害する治療方法を開発することを目的とする。

### 3．研究の方法

山口大学医学部附属病院で手術を行った膠芽腫の病理標本を用い、TAM が膠芽腫のどのような病理像の部分に多く存在するか、CD11b の免疫染色を行い検討する。この際、病理像を 腫瘍境界領域、細胞集族領域、壊死領域、血管増勢領域に分類し検討する。

山口大学医学部附属病院で手術を行う膠芽腫標本を摘出直後に採取し、蛋白分解酵素を用いて single cell suspension を行って、lympholyte を用いて赤血球を除去する。CD11b 抗体 (magnetic beads の抗体で sorting、蛍光色素の抗体で純度の確認) を用い、膠芽腫より TAM のみ sorting して、48 時間選択培養を行い、遠心分離して condition medium を採取する。山口大学医学部附属病院で樹立したヒト膠芽腫幹細胞株や commercial されているヒト膠芽腫細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、その condition medium にさらし、網羅的な phospho-proteomics を行うことによってどの RTK が強くリン酸化されているかを確認する。組織内で TAM が多く存在する部分に高発現する RTK のうち、TAM の condition medium でリン酸化される target RTK をピックアップする。SCID mouse にヒト脳腫瘍幹細胞株を移植し、脳腫瘍モデルを作成する。モデルより脳腫瘍を摘出し、上記同様、腫瘍細胞を single cell suspension を行って、CD11b 抗体で TAM を sorting し選択培養する。次に、脳腫瘍モデルから抽出した TAM に対して、その機能や生存に強く関わる colony stimulating factor-1 (CSF-1) の阻害薬である BLZ945 を投与、もしくは放射線を照射することによって TAM の機能を抑制する。TAM の機能を低下させ、RTK のリン酸化が抑制されることを検証する。また、target RTK の TKI を用い、TAM の condition medium によって起こるリン酸化を抑制することも確認する。さらに、TAM の抑制と TKI の併用によって、より RTK のリン酸化が抑制されるかどうかを検証する。

### 4．研究成果

山口大学医学部附属病院で手術を行う膠芽腫標本を摘出直後に採取し、蛋白分解酵素を用いて single cell suspension を行って、lympholyte を用いて赤血球を除去した。抗体を用い、膠芽腫よりマクロファージのみ sorting して、48 時間選択培養を行い、遠心分離して condition medium を採取した。山口大学医学部附属病院で樹立したヒト膠芽腫幹細胞株や commercial されているヒト膠芽腫細胞株を 24 時間飢餓状態にした後、その condition medium にさらし、網羅的な phosphoproteomics を行うことによってどの RTK が強くリン酸化されているかを確認した。膠芽腫の病理標本を用い、TAM が膠芽腫のどのような病理

像の部分に多く存在するか、CD11b の免疫染色を行った。この際、病理像を腫瘍境界領域、細胞集族領域、壊死領域、血管増勢領域に分類し検討した。免疫不全マウスを用いてヒト膠芽腫細胞を移植し、脳腫瘍モデルを作成した。この腫瘍から腫瘍関連マクロファージを採取することはできた。移植マウスを作成し、腫瘍関連マクロファージの機能や生存に強く関わる colony stimulating factor-1 (CSF-1)の阻害薬である BLZ945 を投与し、生存曲線を作成した。有意な延長が得られた。実際のヒト・膠芽腫での腫瘍関連マクロファージの分布に着目することとし、腫瘍関連マクロファージは血管周囲から壊死組織に向かい、浸潤している可能性を見だし、壊死組織や hypoxia と関連が深い可能性を見いだした。一方、壊死の少ない部位では腫瘍関連マクロファージの絶対数が少なく観察された。それらを踏まえ cell line を hypoxia で培養し、そこから脳腫瘍モデルを作成することで通常の脳腫瘍モデルと腫瘍関連マクロファージがどう異なるか、の研究に移行することとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawano Akiko, Sugimoto Kazutaka, Nomura Sadahiro, Inoue Takao, Kawano Reo, Oka Fumiaki, Sadahiro Hirokazu, Ishihara Hideyuki, Suzuki Michiyasu	4. 巻 35
2. 論文標題 Association Between Spreading Depolarization and Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage: Post Hoc Analysis of a Randomized Trial of the Effect of Cilostazol on Delayed Cerebral Ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurocritical Care	6. 最初と最後の頁 91 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12028-021-01330-0	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 -

〔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 貞廣浩和
2. 発表標題 内腫瘍における術中MRIの有用性 -fence-post法との併用
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 貞廣浩和
2. 発表標題 オンラインサポートを用いた交流電場腫瘍治療システムの導入
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年 ~ 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------