

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16725

研究課題名（和文）腫瘍関連マクロファージ/ミクログリアの分極化制御によるグリオーマの増殖抑制

研究課題名（英文）Inhibition of glioma growth by regulating tumor-associated macrophage/microglia polarization

研究代表者

中野 洋輔（NAKANO, Yousuke）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：40776530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳に発生するグリオーマは、腫瘍関連マクロファージ/ミクログリア（TAM）によって保護され、集学的治療を施しても予後が非常に悪い。そこで、TAMを構成するミクログリアのサブタイプに着目し、分極化を制御することで、グリオーマの進展抑制を試みた。本研究では、グリオーマ細胞株U87MGから樹立したU87-CSCが培養条件下で癌幹細胞モデルとして有用であることを示し、U87-CSCを移植したマウスではM2型ミクログリアマーカーであるCD206の陽性細胞が増加することが示唆された。また、U87-CSCのSSEA-1陽性細胞集団が、グリオーマにおける生存率を低下させる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍とTAMに関する研究は、国内外を問わず活発に行われており、例えば乳癌やホジキンリンパ腫においてTAMの存在が予後を悪化させることが知られている。しかし、グリオーマの増殖、進展過程におけるTAMの形成メカニズムは明らかになっていない。一方で、TAMを形成するマクロファージについても積極的に研究が行われ、腫瘍細胞がマクロファージをM2型に分極化させる機構も一部解明されつつある。しかし、脳の免疫担当細胞であるにもかかわらず、ミクログリアに焦点をあてた研究報告は少ない。本研究の成果は、TAMを標的としたグリオーマの新規治療法を開発するための基礎的知見となり、社会的、学術的に意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：Gliomas are tumors that arise in the brain, are protected by tumor-associated macrophages/microglia (TAMs), and have a very poor prognosis despite multidisciplinary treatment. In this study, we focused on the microglial subtypes that comprise the TAM and attempted to inhibit glioma progression by regulating microglial polarization.

U87-CSCs established from the glioma cell line U87MG were shown to be useful as a cancer stem cell model under culture conditions, and mice transplanted with U87-CSCs showed an increase in CD206 positive cells, an M2-type microglial marker. We also found that the SSEA-1-positive cell population of U87-CSCs may reduce survival in gliomas, although we were unable to demonstrate a molecular correlation with TAM.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：ミクログリア グリオーマ 腫瘍関連マクロファージ/ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

近年、癌細胞の一部に増殖能の高い癌幹細胞が存在し、それらが癌の腫瘍形成において重要であると考えられている。グリオーマは、脳に発生する腫瘍で、悪性度が高く、根本的な治療法はいまだ確立されていない。なぜなら、血液脳関門の存在により、腫瘍まで到達可能な治療薬が限定されているうえ、早期から広範囲に腫瘍が進展するため、放射線治療および外科的治療で腫瘍を除去しても、正常組織内に癌幹細胞がわずかに残るだけで再発するからである。このことから、グリオーマの生存期間中央値は約1年であり、予後が非常に悪い。グリオーマの予後不良には、腫瘍関連マクロファージ/ミクログリア (TAM) が関与することが知られている。腫瘍と TAM に関する研究は、国内外を問わず活発に行われており、例えば乳癌 (David G. DeNardo, et al. *Cancer Discovery*, 1, 2011) やホジキンリンパ腫 (Christian Steidl, et al. *N Engl J Med*, 362, 2010) において TAM の存在が予後を悪化させることが知られている。にもかかわらず、グリオーマの増殖、進展過程における TAM の形成メカニズムは明らかになっていない。一方で、TAM を形成するマクロファージについても積極的に研究が行われ、腫瘍細胞がマクロファージを M2 型に分極化させる機構も一部解明されつつある (Wenchao Zhou, et al. *Nat Cell Biol*, 17, 2015)。しかし、脳の免疫担当細胞であるにもかかわらず、ミクログリアに焦点をあてた研究報告は少ない。

2. 研究の目的

報告者は、グリオーマと腫瘍微小環境を多層の構造物としてとらえ (グリオーママルチレイヤーモデル) 腫瘍の進展過程における領域別のミクログリアのサブタイプを解析した。その結果、腫瘍組織と正常組織の境界付近で炎症性の M1 型ミクログリアが一過性に増加すること、そして腫瘍内部で抗炎症性の M2 型ミクログリアが増加することが明らかとなった。さらには、腫瘍形成能の高い細胞株においては、他の細胞株と比較して M1 型ミクログリアの細胞数が少ないという結果が得られた。本研究では、TAM を構成するミクログリアのサブタイプに着目し、ミクログリアの分極化を制御することで、グリオーマの進展抑制を試みる。グリオーマの増殖および進展の過程における TAM の分極化を経時的に解析し、さらには、TAM の分極化を制御した際の、グリオーマの形成を評価することで、TAM を標的としたグリオーマの新規治療法を開発するための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

グリオーマの進展過程におけるミクログリアのサブタイプ解析

報告者の所属研究室では、既に、ヒトグリオーマ細胞株 U87MG から腫瘍形成能の高い癌幹細胞様の特徴をもつスフェロイド (U87-CSC) を樹立している。報告者はこれまでに、U87-CSC を用いたグリオーママルチレイヤーモデルにおける包括的 TAM マーカー CD11b の免疫染色像から、CD11b 陽性細胞が正常組織で経時的に減少し、グリオーマ周辺で一過性に増加する傾向にあることを見出した。一般的に、TAM は M2 型マクロファージに類似しているとされているが、分極化の機序及び時期は明らかにされていない。そこで、成体ヌードマウスの脳内に U87-CSC または U87MG を投与し、5、10、15 日後に脳切片を作製し、複数の M1 型 (Iba1, CD16, CD86)、M2 型マーカー (CD206, Ym-1, Fizz1) を用いた免疫染色を行い、マルチレイヤーモデルにおける領域別に定量を行うことで、グリオーマの形成および進展に伴う M1 型、M2 型ミクログリアの population の経時変化を解析する。また、同様の実験をグリオーマ患者由来癌幹細胞株 (MD13) についても行う。

TAM の分極化の誘導によるグリオーマ進展への影響

M0 型のミクログリアは、リポ多糖 (LPS) 刺激により M1 型へ、インターロイキン 4 (IL-4) 刺激により M2 型への分極化が誘導される。報告者はこれまでの研究から、マウスの脳にカニューレデバイスを移植し、非麻酔下で薬剤を脳内へ反復投与可能な系を確立している (Nakano Y, et al. *Journal of Neuroimmunology*, 278, 2015)。そこで、成体ヌードマウスの脳にカニューレデバイスを移植し、同一箇所への反復投与が可能な経路を確保する。カニューレデバイス経由で U87-CSC または U87MG を脳内移植後、得られた結果をもとに、移植から 5 日または 10 日後に LPS または IL-4 を同じ経路で腫瘍内投与し、それぞれ M1 型、M2 型へのミクログリアの分極化を誘導する。その後、移植から 15 日後に脳切片を作製し、腫瘍のサイズおよび M1 型/M2 型ミクログリアの population を免疫染色により解析することで、TAM の分極化制御がグリオーマ進展に与える影響について明らかにする。

in vitro におけるミクログリアとグリオーマ癌幹細胞との相互作用解析

成体マウス脳からミクログリアを単離し、M0 型の初代培養ミクログリアを作製する。培地に LPS または IL-4 を添加し、M1 型または M2 型にそれぞれ分極化させる。分極化させた初代培養ミク

ログリアを、既に報告者によって作成済みの GFP 安定発現 U87-CSC または U87MG と共培養し、GFP 陽性細胞の数を測定することで、M1 型あるいは M2 型マイクログリアが U87-CSC および U87MG の増殖能に与える影響を調べる。この実験で増殖能に差がみられた場合、FACS 法により GFP 安定発現 U87-CSC または U87MG を単離し、それらを DNA マイクロアレイにより網羅的に解析することで、M1 型あるいは M2 型マイクログリアとの共培養によって変動するグリオーマ癌幹細胞の遺伝子を調べる。

その一方で、M0 型、あるいは M1 型に分極化させたマイクログリアの培地に、U87-CSC または U87MG の培養上清を添加して、免疫染色により分極化の変化を調べることで、グリオーマ癌幹細胞からの液性因子が、マイクログリアの分極化に与える影響を明らかにする。

これらの実験から、マイクログリアとグリオーマ癌幹細胞との相互作用を明らかにする。

以上により、グリオーマ形成過程において、マイクログリアの分極化による TAM の形成がどのように進行するかを明らかにし、さらには、それらの分極化を制御した際のグリオーマ形成を解析することで、TAM を標的としたグリオーマの新規治療法の開発を目指す。

4. 研究成果

2019 年度では、グリオーマ細胞株 U87MG と、そこから樹立したグリオーマ癌幹細胞様細胞株 U87-CSC を、マウスの脳実質内にそれぞれ移植し、グリオーママルチレイヤーモデルを作製した。免疫組織化学法により、同モデルにおける M1 型マーカー (Iba1, CD86) と M2 型マーカー (CD206) の局在を調べた結果、U87-CSC から発生した腫瘍組織内で、CD206 陽性細胞が多数みられた。また、この CD206 陽性細胞の腫瘍組織内における密度は、腫瘍組織の進展に相関して経時的に上昇することが明らかとなった。

一方で、リポ多糖 (LPS) とインターロイキン 4 を用いた分極化誘導試験は、LPS 投与条件検討のパイロット実験の段階で、マウス脳室周囲器官においてパターン認識受容体の一種に特異な反応がみられたため、別の試薬を用いた同等の実験系を再構築することが必要であった。今後の改善策として、M1 型マイクログリア分極化阻害剤であるミノサイクリンの使用を検討した。

2020 年度では、U87-CSC において、既知の癌幹細胞マーカーである SSEA-1 が U87MG と比較して高発現していることから、年度予定を一部変更し、U87-CSC で SSEA-1 についての細胞分離を行った。ソーティング後の SSEA-1 陽性細胞または陰性細胞の集団をマウスの脳実質内に移植した結果、SSEA-1 陰性細胞集団を移植したマウスの方が生存率が低い傾向がみられた。一方で、ソーティング後の SSEA-1 陽性細胞または陰性細胞についてシングルセル解析を実施したが、有意な差は得られなかった。

2021 年度では、コロナ禍の影響で学生教育に想定以上のエフォートを割く必要があり、研究計画に大幅な遅れが生じたが、2020 年度で得られた U87-CSC において、既知の癌幹細胞マーカーである SSEA-1 が U87MG と比較して高発現しているという結果をもとに ELISA による解析を実施し、U87-CSC が培養条件下における癌幹細胞のモデルとして有用であることを示した。

2022 年度では、2021 年度に得られた、U87-CSC が既知の癌幹細胞マーカーである SSEA-1 を高発現しており、培養条件下における癌幹細胞のモデルとして有用であるという結果から、SSEA-1 についてソーティングを行った U87-CSC を移植したマウスにおける SSEA-1 陽性細胞数と腫瘍サイズ、および M1 型マイクログリアの経時変化についての相関を調べたが、有意な結果は得られなかった。

研究期間全体を通じては、グリオーマ細胞株 U87MG から樹立した U87-CSC が培養条件下で癌幹細胞モデルとして有用であることを示し、U87-CSC を移植したマウスでは、M2 型マイクログリアマーカーである CD206 の陽性細胞が増加していることが示唆された。また、TAM との分子的な相関関係を示すには至らなかったが、U87-CSC の SSEA-1 陽性細胞集団が、グリオーマにおける生存率を低下させる可能性を見出した。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruyama M, Nakano Y, Nishimura T, Iwata R, Matsuda S, Hayashi M, Nakai Y, Nonaka M, Sugimoto T	4. 巻 44
2. 論文標題 PC3-Secreted Microprotein Is Expressed in Glioblastoma Stem-Like Cells and Human Glioma Tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological & pharmaceutical bulletin	6. 最初と最後の頁 910-919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00868	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野洋輔, 田中進, 平原幸恵, 林真一, 大江総一, 小池太郎, 関亮平, 北田容章
2. 発表標題 グリオーマ進展過程において、腫瘍微小環境を形成するミクログリアのサブタイプは経日的に変化する
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野洋輔, 中井悠稀, 丸山正人, 田中進, 林真一, 大江総一, 北田容章
2. 発表標題 The Cancer Stem Cell Marker SSEA-1 in a Mouse Glioma Model
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野洋輔, 丸山正人, 加瀬政彦, 杉本哲夫, 北田容章
2. 発表標題 マウス脳室周囲器官に局在するToll様受容体4の発現量はLPS濃度依存的に減少する
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野洋輔, 田中進, 加瀬政彦, 平原幸恵, 大江総一, 小池太郎, 北田容章
2. 発表標題 グリオーママルチレイヤーモデルに基づいた腫瘍関連マクロファージ/ミクログリアのサブタイプ解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020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