

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09378

研究課題名（和文）M2マクロファージ上に発現する B7 分子を標的とした転移性脳腫瘍の発症制御

研究課題名（英文）Regulation of metastatic brain tumors by targeting B7 molecules expressed on M2 macrophages

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） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では転移性脳腫瘍の病態におけるM2マクロファージの役割を詳細に解析し、さらに本細胞群を標的とした転移性脳腫瘍に対する免疫学的アプローチによる新たな治療法確立の可能性について検討した。転移性脳腫瘍ヒト検体と動物モデルによる検証で腫瘍内、腫瘍周囲組織に浸潤するマクロファージを解析し、このマクロファージがM2マクロファージであることを確認した。また、これらM2マクロファージは免疫チェックポイント分子であるB7-H5を発現しており、原発巣も同様であることが判明した。これらの結果よりM2マクロファージが脳転移病巣形成に関与していることが示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性脳腫瘍の制御は進行癌症例における治療成績向上に必須の条件であり、新規治療開発が望まれている。この状況の中で本研究では新たな病態として免疫チェックポイント分子の関与を証明した。この結果より、M2マクロファージに高発現しているB7-H5をターゲットとする免疫療法を開発することによって、転移性脳腫瘍制御の新たなアプローチを開発することが可能となった。また、もう一つの展望としてこの新たな免疫療法にて脳への転移を制御する、予防的治療の開発も可能になることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the role of M2 macrophages in the pathogenesis of metastatic brain tumors in detail and investigated the possibility of establishing a new treatment for metastatic brain tumors by targeting this cell population through immunological approaches. We analyzed macrophages infiltrating into tumors and peritumoral tissues in human specimens and animal models of metastatic brain tumors, and confirmed that these macrophages are M2 macrophages. These M2 macrophages were also found to express the immune checkpoint molecule B7-H5, and the primary tumor was found to be similar. These results suggest that M2 macrophages are involved in the formation of brain metastatic foci.

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 B7-H5

## 1. 研究開始当初の背景

転移性脳腫瘍は進行癌症例において致命的な遠隔転移であり、治療困難な病態である。また、脳への転移は生命予後に直接的に影響を与えるのみならず、performance status を低下させることによって他治療の中断を余儀なくされるため、間接的にも生命予後に影響を与える。近年、分子標的薬を含む全身薬物療法の進歩によって進行癌症例の生存期間は飛躍的に向上しているが、転移性脳腫瘍に対する恩恵は乏しく、新規治療手段の開発が急務な領域である。転移性脳腫瘍の原発癌腫は肺癌が約半数を占めるが、我々は先行研究において肺癌脳転移病巣において M2 マクロファージを中心とした慢性炎症状態が脳転移病巣の増大や発生に大きな役割を果たしている可能性について報告した。また、このマクロファージ内において免疫チェックポイント分子である B7-H3 と B7-H5 が高発現していることも確認した。免疫療法は進行癌症例の治療についてブレイクスルーと言える治療成績向上をもたらした。しかしながら、転移性脳腫瘍に対する効果は不確定であり、脳内における免疫担当細胞が他臓器と異なることを示している。このため、この脳内における特殊環境下の免疫機構に対して、M2 マクロファージと高発現する B7-H3 と B7-H5 をターゲットとした新たな免疫療法の開発を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究では肺癌転移性脳腫瘍において、この腫瘍内 M2 マクロファージが高発現する B7 分子の機能解析を行い、この結果として宿主由来の免疫細胞をターゲットした転移性脳腫瘍制御の可能性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 血行性脳転移マウスモデルの作成

従来の転移性脳腫瘍研究では細胞移植型の動物実験モデルが頻用されている。我々はルシフェラーゼ発現型 C57BL/6 マウス由来肺癌細胞株 LL/2luc を樹立しており、本細胞が同系マウス頭蓋内に生着することは確認済みである。また同細胞を左心室内注入することで多発性脳転移を作製しえることも確認している。さらに脳卒中に関連する先行研究より (Liu R. Gene Ther 2005, 12:647)、全身麻酔下に頸動脈を露出し、腫瘍細胞を頸動脈内注射できることも確認済みである。これらの技術を応用し、樹立した LL/2luc マウス肺癌細胞を経頸動脈的投与し、臨床に即した血行性転移性脳腫瘍マウスモデルを作製する。

### (2) 機械学習による脳腫瘍組織のマクロファージ解析

従来の脳組織内浸潤細胞の評価は、組織切片の免疫染色および目視確認が主流であった。この従来法は組織における標的分子/細胞の部位的分布は評価しやすいものの、各細胞分画の詳細な質的量的解析は困難である。その点においては、我々が以前より行っているパーコール比重分離法を用いることで、脳などの固形組織から免疫細胞のみを分離し、フローサイトメトリー多重染色法にて各細胞分画を詳細に解析可能である (Tasaki T, Okuda T, Kato A, Fujita M. Anticancer Res. 2016, 36:3571)。我々は本手法を用い、脳腫瘍マウス脳内から免疫細胞を分離し、フローサイトメトリー法にてマクロファージ分画上の B7-H3 および B7-H5 発現レベルを確認している。本研究ではそれに加え、転移性脳腫瘍症例の各臨床検体 (末梢血、原発組織片、脳転移巣組織片) より M2 マクロファージおよび各種免疫担当細胞をセルソーティング法にて単離し、mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ等のトランスクリプトーム解析に供する。同時に、上記で述べた免疫組織化学染色法の弱点を克服すべく、本研究では深層学習アルゴリズムを用いたハイスループット画像解析を導入し、免疫組織化学染色による M2 マクロファージ上の B7 等の分子発現解析を試みる。

### (4) バイオインフォマティクス的手法による M2 マクロファージ関連タンパクの発現解析

転移性脳腫瘍症例の各臨床検体 (末梢血、原発組織片、脳転移巣組織片) より M2 マクロファージを単離し、それらから mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ等のトランスクリプトーム解析を行う。mRNA 発現プロファイルを網羅的に評価できる一方、実際のタンパク発現レベルとは必ずしも相関しないため、本研究ではマルチプレックスサイトカイン測定系も併用する。本手法により限られた量のサンプルから相当量のサイトカイン/ケモカインデータを取得することが可能であり、大規模データに親和性の高いバイオインフォマティクスの解析手法に応用していく。

#### 4 . 研究成果

肺癌原発の転移性脳腫瘍において、腫瘍内で浸潤している M2 マクロファージ、特に免疫チェックポイント分子である B7-H3 および B7-H5 は転移病巣形成に大きく貢献していることが示された。この結果より、宿主由来免疫細胞である M2 マクロファージを標的とした新たな免疫学的アプローチ、そして新規治療開発が可能と考えられた。また、これらの免疫細胞、特に M2 マクロファージは脳転移病巣の発生/形成に関与している可能性が高く、この免疫系を制御可能であれば脳転移そのものを予防できる可能性も示唆される結果であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamada Kota, Saito Masafumi, Ando Masayuki, Abe Tomoki, Mukoyama Tomosuke, Agawa Kyosuke, Watanabe Akihiro, Takamura Shiki, Fujita Mitsugu, Urakawa Naoki, Hasegawa Hiroshi, Kanaji Shingo, Matsuda Takeru, Oshikiri Taro, Kakeji Yoshihiro, Yamashita Kimihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Reduced Number and Immune Dysfunction of CD4+ T Cells in Obesity Accelerate Colorectal Cancer Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 86 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010086	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 Kaida Hayato, Okuda Takeshi, Hanaoka Kohei, Ishii Kazunari	4. 巻 47
2. 論文標題 High 11C-Methionine Uptake in a Parasellar Inflammatory Pseudotumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 965 ~ 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RLU.0000000000004298	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 YOSHIOKA HIROMASA, OKUDA TAKESHI, NAKAO TAKAYUKI, FUJITA MITSUGU, TAKAHASHI JUN C.	4. 巻 42
2. 論文標題 Experience With Tirabrutinib in the Treatment of Primary Central Nervous System Lymphoma that Is Difficult to Treat With Standard Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4173 ~ 4178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15917	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 Hiromasa Yoshioka, Takeshi Okuda, Takayuki Nakao, Mitsugu Fujita, Jun C Takahashi	4. 巻 41
2. 論文標題 Effectiveness of Palliative Cerebrospinal Fluid Shunting for Patients With Leptomeningeal Carcinomatosis-related Hydrocephalus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 4169-4172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15221	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 Yoshioka Hiromasa, Okuda Takeshi, Nakao Takayuki, Fujita Mitsugu, Takahashi Jun C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Experience with nasogastric tube administration of tirabrutinib in the treatment of an elderly patient with primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Cancer Conference Journal	6. 最初と最後の頁 290 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13691-021-00491-1	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 Chiami Moyama, Mitsugu Fujita, Shota Ando, Keiko Taniguchi, Hiromi Ii, Seisuke Tanigawa, Naoya Hashimoto, Susumu Nakata	4. 巻 12
2. 論文標題 Stat5b inhibition blocks proliferation and tumorigenicity of glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1129 ~ 1142
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 -

1. 著者名 Watanabe Akihiro, Yamashita Kimihiro, Fujita Mitsugu, Arimoto Akira, Nishi Masayasu, Takamura Shiki, Saito Masafumi, Yamada Kota, Agawa Kyosuke, Mukoyama Tomosuke, Ando Masayuki, Kanaji Shingo, Matsuda Takeru, Oshikiri Taro, Kakeji Yoshihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Vaccine Based on Dendritic Cells Electroporated with an Exogenous Ovalbumin Protein and Pulsed with Invariant Natural Killer T Cell Ligands Effectively Induces Antigen-Specific Antitumor Immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 171 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14010171	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 Ando Shota, Moyama Chiami, Kojima Naoto, Fujita Mitsugu, Ohta Kaito, Kohno Yukina, Ii Hiromi, Nakata Susumu	4. 巻 591
2. 論文標題 JCI-20679 suppresses autophagy and enhances temozolomide-mediated growth inhibition of glioblastoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 62 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.113	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 AGAWA KYOSUKE, YAMASHITA KIMIHIRO, NAKAGAWA AKIQ, YAMADA KOUTA, WATANABE AKIHIRO, MUKOHYAMA JUNKO, SAITO MASAFUMI, FUJITA MITSUGU, TAKIGUCHI GOSUKE, URAKAWA NAOKI, HASEGAWA HIROSHI, KANAJI SHINGO, MATSUDA TAKERU, OSHIKIRI TARO, NAKAMURA TETSU, SUZUKI SATOSHI, KAKEJI YOSHIHIRO	4. 巻 41
2. 論文標題 Simple Cancer Stem Cell Markers Predict Neoadjuvant Chemotherapy Resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4117 ~ 4126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15214	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 Tanigawa Seisuke, Fujita Mitsugu, Moyama Chiami, Ando Shota, Ii Hiromi, Kojima Yasushi, Fujishita Teruaki, Aoki Masahiro, Takeuchi Hayato, Yamanaka Takumi, Takahashi Yoshinobu, Hashimoto Naoya, Nakata Susumu	4. 巻 28
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 1339 ~ 1352
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 -

1. 著者名 Takayuki Nakao, Takeshi Okuda, Hiromasa Yoshioka, Mitsugu Fujita	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/anticancerres.14483	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 -

1. 著者名 Shoichi Deguchi, Yoko Nakasu, Tsukasa Sakaida, Jiro Akimoto, Kuniaki Tanahashi, Atsushi Natsume, Masamichi Takahashi, Takeshi Okuda, Hirofumi Asakura, Koichi Mitsuya, Nakamasa Hayashi, Yoshitaka Narita	4. 巻 25
2. 論文標題 Surgical outcome and graded prognostic assessment of patients with brain metastasis from adult sarcoma: multi-institutional retrospective study in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of clinical oncology	6. 最初と最後の頁 1995-2005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01740-8	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5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 吉岡宏真 藤田 貢 高橋 淳
2. 発表標題 二刀流の脳腫瘍外科医だからこそ選択できる真のless-invasive approach
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉岡宏真 奥田武司 中尾剛幸 藤田 貢 高橋 淳
2. 発表標題 標準的治療遂行が困難な中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するチラブルチニブの治療経験
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田武司 吉岡宏真 藤田 貢 高橋 淳
2. 発表標題 転移性脳腫瘍に対する集学的治療の時代的変遷と治療成績-自験172例の摘出術より検証-
3. 学会等名 第27回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田武司 吉岡宏真 中尾剛幸 藤田 貢 高橋 淳
2. 発表標題 ライフシフトを意識した高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するチラブルチニブを用いた治療戦略の可能性
3. 学会等名 第35回日本老年脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田武司 吉岡宏真 中尾剛幸 藤田 貢、高橋 淳
2. 発表標題 転移性脳腫瘍に対する集学的治療の時代的変遷と治療成績-自験172例の摘出術より検証
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奥田武司(分担執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版株式会社	5. 総ページ数 243
3. 書名 高齢者がん治療Q&A 臓器別編	

〔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	藤田 貢  (Fujita Mitsugu)  (40609997)	近畿大学・医学部・准教授   (34419)	
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
---------	---------