

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430051

研究課題名(和文) 脳腫瘍組織内血管周囲微小環境における腫瘍随伴マクロファージの役割

研究課題名(英文) Tumor-associated macrophages and microvascular proliferation in glioblastoma

研究代表者

佐々木 惇 (Sasaki, Atsushi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80225862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性神経膠腫の血管新生、特に微小血管増殖(microvascular proliferation(MVP))におけるtumor-associated macrophage (TAM)の役割を検討するために病理学的検索を行った。対象は、ヒトglioblastoma (GB)組織とラット実験悪性神経膠腫で、方法には酵素抗体法、蛍光抗体法と3次元画像解析を用いた。ヒトGBのMVP周囲ではTAMが多数浸潤しており、それらは高率にCD204を発現していた。血管新生とTAMの出現は腫瘍組織内において有意に増加していた。本研究により、GBの血管新生にM2-like TAMが関与することが病理学的に示された。

研究成果の概要(英文)：We examined human glioblastoma (GBs) to obtain a detailed alteration of tumor-associated macrophages (TAMs) within and around proliferating vessels. Expression of various macrophage markers, including Iba1, CD68, CD163, CD204, Glut5, HLA-DR, was evaluated in surgically resected GBs using immunohistochemistry as well as double immunofluorescence. 3D images were reconstructed in glomeruloid vascular proliferation with Iba1 immunohistochemistry using recent computer imaging software. Iba1-positive, TAMs increased around the MVP structure. The expression of CD204 was most frequently shown, followed by that of CD163, but HLA-DR was rarely found. Double immunofluorescence showed the different localization of Iba1 and α-SMA in TAMs and pericytic cells, respectively. 3D image analysis showed the accumulation of Iba1-labeled macrophages along the vascular wall of glomeruloid vessel. These results indicate that M2-like TAMs might be an important molecule for TAMs contributing to MVP in GB.

研究分野：統合領域

キーワード：ミクログリア、マクロファージ、グリオーマ、腫瘍随伴マクロファージ、血管新生、微小血管増殖、M1マクロファージ、M2マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

脳実質病変組織内マクロファージの由来には、脳在住マクロファージ(ミクログリアと血管周囲マクロファージ)と浸潤性の骨髄由来細胞が考えられている。マクロファージはしばしば M1 (古典的活性化マクロファージ) と M2 (代替的活性化マクロファージ) の2つのタイプに大別される。がん組織の間質に浸潤しているマクロファージは、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)と呼ばれ、がんの増殖や進展に影響を与えることから注目されている。

TAM は抗腫瘍作用を発揮する場合もあるが、血管新生の誘導などにより腫瘍進展に促進的に作用することも知られている。マクロファージは極めて高い可塑性がある細胞である。TAM の表現型は微小環境によって決定され、特定のタイプの TAM が、腫瘍浸潤に有利な微小環境を維持するために、血管新生や免疫抑制作用などの労役を提供する可能性が示されてきた。

菰原らは、神経膠腫では腫瘍組織内に浸潤している M2 マクロファージが多いほど悪性度が高くなることを報告した。我々の悪性神経膠腫を用いた予備研究では、血管新生部に多数の M2 マクロファージを認めた一方で、M1 と M2 の2分類が困難な細胞が観察された。また、乳癌のモデルマウスでは少なくとも6つのマクロファージのタイプが同定されている。従来報告では、乏突起膠細胞系や上衣細胞系の悪性神経膠腫や脳原発悪性リンパ腫での TAM の特性は明らかにされていない。

脳腫瘍の生物学において、脳の特殊環境と腫瘍細胞の相互作用は、腫瘍細胞の浸潤現象を考えるうえで極めて重要である。神経膠腫細胞は髄鞘や上衣下とともに、血管壁に沿って浸潤する傾向を示すことから、腫瘍細胞と血管壁細胞と密接な相互作用があることが示唆されてきた。近年注目されている脳腫瘍幹細胞は PVN の中に存在し、niche からの刺激によってその幹細胞性を維持していると考えられている。また、血管周囲の腫瘍細胞が血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor:VEGF) を分泌して血管新生を促進し、PVN の構築に係わるとの報告もある。神経膠腫の血管新生や血管新生抑制療法 (bevacizumab: VEGF-A に対するヒトモノクローナル抗体) を考えるには、腫瘍細胞と内皮細胞に加えて、周皮細胞やマクロファージの役割を明確にする必要がある。

2. 研究の目的

脳腫瘍組織内の血管周囲腫瘍微小環境 (perivascular niche:PVN) における TAM のサブタイプや由来分子同定による新たな予後マーカーの発見や脳腫瘍の血管新生抑制療法・分子標的療法の開発のための基礎的研究として、3年間で以下の5項目の解明

を目的とする。

- (1) 脳腫瘍血管壁・周囲 TAM の形質と微小血管増殖での空間的配置の解明
- (2) ラット実験悪性神経膠腫における angiogenic macrophage の解析
- (3) 脳腫瘍微小環境での DAP12 分子の発現解析
- (4) TAM 増殖因子受容体発現
- (5) 神経膠腫の血管新生に特徴的な TAM 発現遺伝子・蛋白の解明

3. 研究の方法

(1) ヒト神経膠芽腫(Glioblastoma:GB)生検・手術症例の検討:

埼玉医科大学病院および国際医療センターで2009年から2012年までに生検・手術で得られたGB約50例を対象とした。病理診断は研究代表者と分担者(TH)の2名の神経病理医によって確定された。大多数例で、治療法と予後データを取得した。

病理学的検索はホルマリン固定パラフィン包埋の連続切片(1枚あたり厚さ約3μm)を作成して行った。酵素抗体法では、1次抗体として、各種のマクロファージ・ミクログリアマーカー(CD68, CD163, CD204, Iba1, glucose transporter 5, MHC class II Ag, CSF1-R, DAP12), glioma cell marker(GFAP)、増殖マーカー(MIB-1)、血管内皮細胞マーカー(CD31, CD34)、pericytic-cell marker(alpha smooth muscle actin:aSMA)を使用した。

GB組織内のmicrovascular proliferation(MVP)部位において、各マクロファージマーカー発現を半定量的に比較した。さらに画像解析ソフトウェア(Image J, WinROOF, Aperio)を用いての定量的解析をMVP部位のIba1, CD163,CD204, MHC class II発現率、腫瘍組織と非腫瘍組織におけるCD204およびCD34陽性率に関して、施行した。

GBにおける特徴的MVP病変とされる、glomeruloid bodyにおけるTAMの空間的配置を明らかにするために一部の症例においてIba1連続染色標本のデジタル画像をソフトウェア(Image J, INTAGE Rearia Professional)を用いて3D画像を作成した。

さらに、一部の症例において蛍光二重染色(Iba1-CD204, Iba1-aSMA, CD204-MHC class II)を行った。

さらに一部の症例を用いて、TAMのマーカー発現とoverall survivalとの関係を検討した。

(2) S-100 -v-erbB TGラット実験神経膠腫組織の検討:

本TGラットは4つの組織型を生じるが、そのうち、退形成性乏突起膠腫に相当する腫瘍組織を検索した。免疫組織化学的検索は、(1)のヒトと同様の検索法で、一次抗体として、Iba1とCD204を使用した。

4. 研究成果

(1) MVP 周囲では Iba1 陽性 TAM が多数浸潤しており、それらは高率に CD204 を発現していた。CD163 陽性 TAM も認められたが、CD204 陽性 TAM よりも少数であった。一方、MHC class II 陽性 TAM は上記のマーカーよりも少なかった。Glut5 陽性細胞はほとんど認められなかった。

定量的解析では、陽性細胞面積率は Iba1, CD204, CD163, MHC class II の順であり、Iba1 と MHC class II との発現率については統計学的有意差が認められた(図 1)。MVP を有する腫瘍組織での定量的解析では、CD204/Iba1 の面積比は 0.31 - 0.78 (mean 0.51, n=10) と高値であった。上記の結果より、MVP 部位での TAM は M1-like cell よりも M2-like cell が多いことが示された。

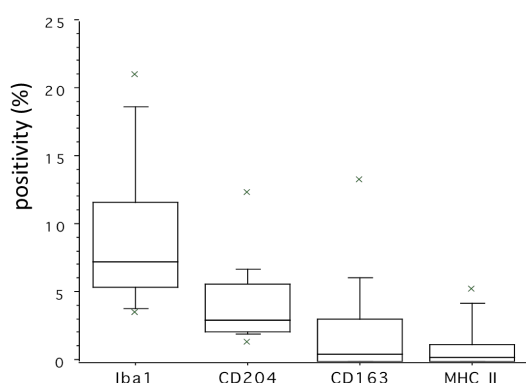


図 1 the morphometric, quantitative analysis of macrophage marker expression in the area of glomeruloid vessels

さらに、GB での血管新生と M2-like TAM との関係性を腫瘍内外の CD34 と CD204 陽性率の定量的解析で検討したところ、統計学的有意さをもって、GB 腫瘍組織内血管新生部位では M2-like TAM が増加していることが示された(図 2)。

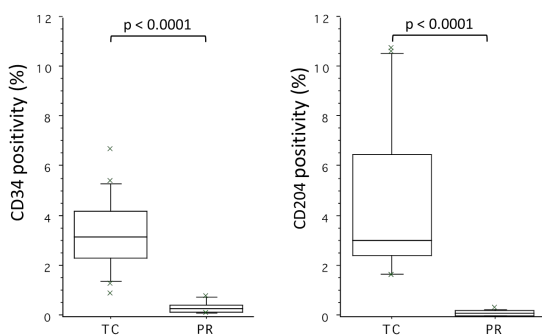


図 2 Comparison between Tumor Core and Peri-tumoral Region in the expression of CD34 (endothelial cells) and CD204 (macrophages)

蛍光二重染色では、Iba1 と CD204 の double positive TAM が多数見られることが示された。しかし、少数の症例では、CD204 と MHC class

II の double positive cell の存在が示され、M1 と M2 両者の中間的表現型を示す TAM の存在も明らかとなった。Glomeruloid body では、Iba 陽性 TAM が血管壁内に存在し、aSMA 陽性の pericytic cell と相互に隣接して存在することが明らかとなった。

Glomeruloid body の 3 次元的画像解析では、Iba1 陽性 TAM が MVP 血管壁の外側から周囲にかけて相互に接する様に位置して集簇していた。

GB の予後と MVP 部位 TAM との相関関係は認められなかった。

CSF1-R と DAP12 の発現に関しては、TAM や腫瘍組織外のミクログリアや血管周囲細胞に陽性像がみられたが、症例数が少なく、定量的解析や統計学的解析は施行できなかった。

(2) ラット実験悪性神経膠腫では、Iba1 陽性 TAM が MVP 微小血管増殖部で増加していた。活性型ミクログリア/マクロファージの浸潤は、AS は他の悪性型グリオーマ(A0, MG)と比較して軽度であり、AS の Ki-67 陽性率は低かった。A0 や MG の腫瘍組織内壊死巣では、Iba1 陽性、CD204 陽性の貪食マクロファージが観察されたが、CD163 や CD204 陽性の TAM は少数であった。

以上の結果より、悪性グリオーマ組織内では、CD204 陽性形質を示す M2-like TAM が MVP と関連する可能性が示唆された。MVP 血管壁の構成細胞に Iba1/CD204 陽性マクロファージが存在することが示され、周皮様細胞や内皮細胞との直接接触を介しての細胞間相互作用が示唆された。

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 11 件)

Fukumura K, Kawazu M, Sasaki A (他 19 名、12 番目) Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. 査読有、Acta Neuropathol 131, 2016, 865-875

A Sasaki, A Kakita, K Yoshida, (他 5 名) Variable expression of microglial DAP12 and TREM2 genes in Nasu-Hakola disease. 査読有、Neurogenetics 16, 2015, :265-276. DOI 10.1007/s10048-015-0451-3

佐々木 惺: 臨床医のための神経病理。

MG-PNET. 査読なし、Clinical Neuroscience 33, 2015

Ishizawa K, Tsukamoto Y, Sasaki A (他 5 名、8 番目) 'Papillary' solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma with nuclear STAT expression and NAB2-STAT6 fusion. 査読有、Brain Tumor Pathol 33, 2016,

151-156

Fukuoka K, Yanagisawa T, Sasaki A. (他 9 名、11 番) Brainstem oligodendroglial tumor in children: two case reports and review of literatures.. 査読有、Child Nerv Syst 31, 2015, 449-455

Kato Y, Hayashi T, Sasaki A. (他 5 名、5 番目) Primary central nervous system cytotoxic T-cell lymphoma mimicking demyelinating disease. 査読有、Inter Med 53, 2014, 1197-1200

Fukuoka K, Yanagisawa T, Sasaki A (他 4 名、4 番目) Successful treatment of hemorrhagic hemorrhagic congenital intracranial immature teratoma with neoadjuvant chemotherapy and surgery: Case report. 査読有、J Neurosurg: Pediatr 13, 2014, :38-414

Sasaki A. Pathological diagnosis of the pineal region tumors. 査読有、Progress in Neuro-Oncology 21, 2014, 1-8

Hirose T, Nobusawa S, Nakazato Y, Sasaki A.: A case of oligodendroglioma with prominent neuronal differentiation. 査読有、Hum Pathol. 44, 2013, 2353-2359

Komori T, Hirose T, Sasaki A (他 3 名、6 番目) Controversies over the diagnosis of oligodendroglioma: a report from the satellite workshop at the 4th international symposium of brain tumor pathology, Nagoya Congress center, May 23, 2012. 査読有、Brain Tumor Pathol 30, 2013, 253-261

Sasaki A, Yokoo H, Honma T (他 3 名、1-2-4 番目) Characterization of microglia/macrophages in brain tumors developed in S-100 β -v-*erbB* transgenic rats. 査読有、Neuropathology 33, 2013, 505-514

〔学会発表〕(計 8 件)

佐々木 惇:「上衣腫の病理学的再検討: 病理診断の標準化へ向けて」シンポジウム「小児悪性腫瘍(基礎と臨床)」第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会 (京都、2015.12.6.)

佐々木 惇:「Nasu-Hakola 病におけるミクログリア: 病態への関与」教育講演 E-04「神経疾患においてミクログリアはもはや脇役ではない」第 56 回日本神経学会学術大会 (新潟、2015.5.21.)

佐々木 惇:「悪性リンパ腫、組織球性腫瘍、松果体腫瘍と胚細胞性腫瘍の病理」教育セミナー、第 32 回日本脳腫瘍病理学会 (徳島、2014.5.23.)

佐々木 惇:「Glioblastoma with oligodendroglioma component」シンポジウム 1「悪性グリオーマの病理診断」第 32 回日本脳腫瘍病理学会 (徳島、2014.5.23.)

Fujimaki T, Sasaki A, Matsutani M. Are germinomatous components hidden in “non-germinomatous” teratomas? 4th International CNS germ cell tumor symposium. (Happo-en, Tokyo, Japan, 2015.4.13.)

藤巻高光、脇谷健司、佐々木 惇 膠芽腫(GBM)長期生存例の検討: 多施設共同研究 第 32 回日本脳腫瘍学会 (浦安市、2014.12.1.)
Sasaki A, Honma T (他 3 名、1-5 番目) Clinicopathologic features of pineal parenchymal tumors in a single institutional study. 18th International Congress of Neuropathology (Rio de Janeiro, Brazil, 2014.9.15.)

佐々木 惇: 日本脳腫瘍病理学会「脳腫瘍の病理診断のポイント」 (札幌、2013.6.7.)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

<http://www.saitama-pathology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 惇 (SASAKI, Atsushi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 80225862

(2) 研究分担者

横尾 英明 (YOKOO, Hideaki)
群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号：40282389

(3)連携研究者

本間 琢 (HONMA, Taku)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：00307852