

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500321

研究課題名（和文）脳腫瘍の診断と治療に有効なミクログリア/マクロファージのサブタイプの同定

研究課題名（英文）Subtypes of microglia/macrophages relevant to the diagnosis and treatment of brain tumors

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

研究成果の概要（和文）：本研究において我々は、グリオーマ組織内 tumor-associated macrophages (TAM) に関して、ヒト悪性グリオーマと S100- β -*v-erbB* トランスジェニックラット発症グリオーマ組織を用いて、画像解析による定量的検討と統計学的解析を行い、悪性度の高いグリオーマで TAM の活性化が優位に強いという興味深い成果が得た。さらにラット発症グリオーマはヒト悪性グリオーマと異なり、M2 タイプの TAM が少ないことが見出した。以上の結果は、英文雑誌、国内学会とシドニー大学でのセミナーにおいて発表した。

研究成果の概要（英文）：Glioma-infiltrating microglia/macrophages are referred to as tumor-associated macrophages (TAMs). Transgenic (TG) rats expressing *v-erbB*, which is a viral form of the epidermal growth factor receptor, under transcriptional regulation by the S100- β promoter develop brain tumors. We carried out immunohistochemical and morphometrical analyses of microglia/macrophages both in human gliomas and in the experimental tumors. Based on the results, we found that the Iba1-positive, TAM with the morphology of activated/phagocytic cells were consistently found within glioma tissues. Iba1-positive TAMs of tumor core were significantly more activated than Iba1-positive microglia of non-neoplastic brain tissue in intraparenchymal, anaplastic oligodendrogliomas. In contrast to human gliomas, most TAMs in the experimental gliomas showed no or little expression against CD68, CD163, or CD204, although CD204-positive TAMs were observed in necrosis as well as in proliferating vascular wall. In conclusion, S-100 β -*v-erbB* TG rats may serve as a useful animal model for further analysis of TAMs in terms of tumor cell proliferation, microvascular proliferation and phagocytosis, and as a tool for therapeutic use in malignant gliomas, although it should be noted that the polarization of TAMs towards the M2 phenotype remains unclear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：ミクログリア、マクロファージ、脳腫瘍、グリオーマ、トランスジェニックラット、*v-erbB*、TAM

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍には約 130 の組織型があり、その約 30% を占める神経膠腫は、最新鋭のがん治療法をもってしてもなお治癒の困難な腫瘍である。その原因には、神経膠腫の生物学的特性に未知のことがらが多いことが一因として挙げられる。悪性神経膠腫は予防や早期発見が困難で、手術的治療には限界があり、現在、効果的治療法や可能な限り非侵襲的治療法の開発は急務である。また、小児に多い胎児性脳腫瘍や近年増加する脳原発悪性リンパ腫も予後不良である。これまで研究代表者・分担者の施設では脳腫瘍に関する病理学的研究が継続して行われ、病理形態学的解析、生物学的解析、遺伝子解析、蛋白発現、臨床病理などの研究が発表されてきた。また、研究ツールの開発として、神経組織抗体の作製や画像解析ソフトウェアの開発も行われてきた。

ミクログリア (mic) は、Rio-Hortega の炭酸銀法によって、1919 年に分離されたグリア細胞の 1 型である。1980 年代半ばに抗原提示反応に必要な MHC class II 抗原が mic に発現されることが示されて以来、mic の機能に関する研究は加速度的に増加した。本研究代表者の佐々木は、1980 年代末に培養 mic における MHC class II 抗原発現機構の解析を始め、以後、様々な抗体・レクチンを用いた顕微鏡ならびに電顕的手法により、成人脳、疾患脳ならびに TG マウス脳における mic の活性化を明らかにしてきた。神経膠腫の研究でも、IL-1 や IL-6 の mRNA・蛋白発現や glucose transporter 5 (Glut5) や Iba1 を発現する mic の腫瘍組織浸潤を報告した。

脳腫瘍組織内のマクロファージ (mac) は mic、血液細胞など複数の細胞に由来すると考えられている。文献的に、mac が脳腫瘍容積の約 8% を占めるとの報告や神経膠腫組織内に浸潤した M2 タイプ mac は悪性度評価の指標として有用との報告が近年なされた。しかし、M2 タイプの mac の細胞形態の特徴は不明であり、その細胞由来も明らかにされていない。さらに、神経膠腫以外の脳腫瘍での mac サブタイプも不明である。したがって、第一に、脳腫瘍の診断、特に悪性度判定に有効な mac の細胞形態像を明らかにすること、そして、脳腫瘍の悪性化に関わる mic/mac 関連分子、特にハブとなる分子の同定と研究が診断および治療の観点から重要である。一般に mic は免疫学的に腫瘍細胞によって不活化されていると考えられており、mic の免疫学的活性化と骨髄由来細胞の脳腫瘍組織内導入が免疫治療の観点から必要である。

2. 研究の目的

「mic/mac のサブタイプに基づく脳腫瘍の

診断・治療法の開発」のための基礎的研究として、3 年間で以下の課題に取り組む。

(1) ヒト脳腫瘍の組織型・悪性度・予後と mac サブタイプ (M1 と M2) の解析：

ヒト脳腫瘍組織において、pan-macrophage マーカーである CD68 と M2 タイプ mac マーカーである CD163 と CD204 の発現を検討し、M1 と M2 の比率を解析する。予後の判明している脳腫瘍症例を後方視的に検索し、mic/mac サブタイプと患者予後との関連も検索する。

(2) トランシジェニック (TG) ラット神経膠腫における mic/mac 活性化とサブタイプの解析：

S-100 β -v-*erb* B TG ラット腫瘍組織を用いて、免疫組織化学を行い、腫瘍組織内外の mic/mac の活性化とサブタイプを明らかにする。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、mic/mac と脳腫瘍について細胞形態、分子レベルで検討する。研究材料として、in vivo のヒト脳腫瘍組織と S-100 TG ラット自然発症神経膠腫組織を用いる。検索方法は、mic/mac マーカーを含む特異抗体を用いた免疫細胞組織化学やコンピューター画像解析であり、研究代表者 1 名、分担者 2 名で実施していく。

脳腫瘍検索症例の収集とヒト脳腫瘍症例の臨床的解析については、埼玉医科大学国際医療センターでの脳腫瘍生検・剖検症例を検索対象とする。この中から適切な症例を選択し、データベースに組織型とグレードごとに登録する。個々の腫瘍について、臨床情報を収集する。S-100 β -v-*erb* B TG ラット自然発症脳腫瘍に関しては、腫瘍組織型ごとにパラフィン切片と凍結組織切片を作製する。

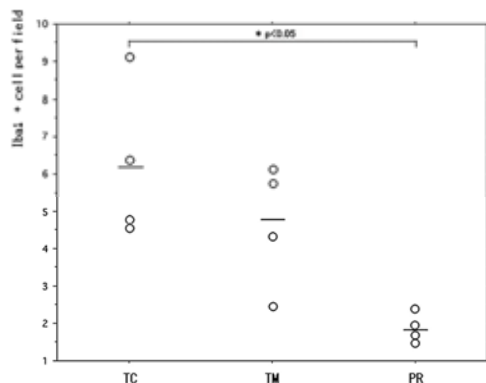
Mic/mac 関連分子発現の免疫組織化学では、上記の組織標本において、mic マーカー (Glut5)、Mic/mac マーカー (CD68, Iba1)、M2 タイプ mac マーカー (CD163, CD204)、MHC class II 抗原、の発現を腫瘍細胞増殖能、血管増殖、リンパ球浸潤との関連と併せて検討する。一部の症例では、蛍光抗体法多重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて同一細胞での複数分子の発現を確認する。形態情報のデジタル化による画像解析では、顕微鏡に装着したデジタルカメラで腫瘍組織像をコンピューターに取り込み、我々が開発した画像解析ソフトウェアや ImageScope, Aperio を用いて形態情報を抽出する。具体的に計測する因子は、単位面積あたりの細胞数・細胞面積などである。

4. 研究成果

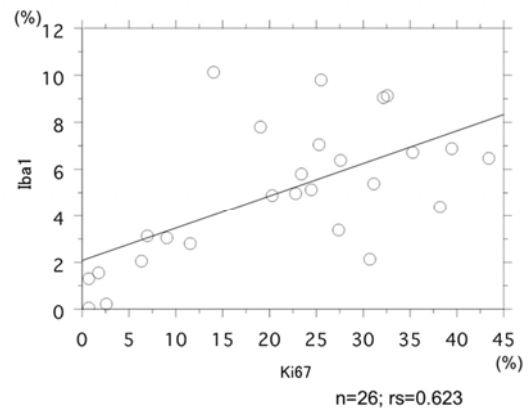
我々は、グリオーマ組織内

tumor-associated macrophages (TAM)に関して、ヒト悪性グリオーマと S100 β -v-erbB TG ラット発症グリオーマ組織を検討し、画像解析による定量的検討と統計学的解析を行い、悪性度の高いグリオーマで TAM の活性化が優位に強いという興味深い成果を得た。さらにヒト悪性グリオーマとの比較検討を行い、ヒトグリオーマとの共通性と違いが見出され、その結果の一部をシドニー大学でのセミナーで発表した。さらに研究をまとめ、第 53 回日本神経病理学会に発表した。その後、論文を "Neuropathology" に投稿し、受理された。

具体的には、TG ラット 11 個体に発生した 13 の脳腫瘍を研究対象とし、腫瘍の内訳は、anaplastic oligodendroglioma (AO) 5, malignant glioma (MG) 4, low-grade astrocytoma (AS) 4 であった。免疫組織化学的検討は、一次抗体として、Iba1, ED1 (CD68), ED2 (CD163), SRA-E5 (CD204), SP6 (Ki-67) を用いた。Iba1 および SP6 染色標本では、画像解析ソフト (Win Roof) を用いて定量的解析も施行し、統計処理を行った。AO 症例では Iba1 と SP6 の蛍光二重染色も行った。その結果、AO と MG の全例で、多数の Iba1 陽性活性化型 mic/mac が腫瘍組織内に認められた。AO 4 例で単位面積あたりの Iba1 陽性細胞占有面積を定量的に解析したところ、腫瘍組織内部 (TC) と腫瘍境界部 (TM) は非腫瘍部 (PR) と比較して優位に増加していた ($P < 0.05$)。



蛍光二重染色では、Iba1/SP6 の double positive 細胞が少数認められ、TAM は腫瘍組織で増殖能を有することが示された。腫瘍組織内部においては、Iba1 陽性細胞占有面積と Ki-67 陽性率には正の相関関係が認められた。



活性化型 mic/mac の浸潤は、AS は他の悪性型グリオーマ (AO, MG) と比較して軽度であり、AS の Ki-67 陽性率は低かった。さらに、AO では、Iba1 陽性 TAM が微小血管増殖部で増加しており、グリオーマのニッチと TAM の関連が示唆された。AO 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 M2 タイプの TAM は少数であった。ヒトグリオーマの解析では多数の M2 タイプ TAM が認められており、ヒトとラットの種差による違いの可能性が考えられた。

このように、S100 β -v-erbB TG ラット発症グリオーマは腫瘍組織内、特に壊死と微小血管増殖部でヒトグリオーマと同様の TAM を有しており、有効な実験モデルであることが示された。今後は、おもに血管新生における TAM の役割解析をすすめる予定である。

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 10 件)

Sasaki A, Yokoo H, Nakazato Y (他 3 名、1-2-5 番目)、Characterization of microglia/macrophages in gliomas developed in S100 β -v-erbB transgenic rats、Neuropathology、doi 10.1111/neup.12015、2013、査読有

Ohe Y, Sasaki A (他 6 名、5 番目)、Central nervous system lymphoma initially diagnosed as tumefactive multiple sclerosis after brain biopsy、Internal Medicine、85 巻、2246-2252、2013、査読有

Fukuoka K, Sasaki A (他 8 名、2 番目)、Pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation with marked elevation of MIB-1 labeling index、Brain Tumor Pathology、29 巻、229-234、2012、査読有

Ishizawa K, Sasaki A (他 8 名、8 番目)、Clear cells are associated with

proliferative activity in ependymoma: a quantitative study、Clinical Neuropathology、31 巻、146-151、2012、査読有

Adachi J, Sasaki A (他 7 名、8 番目) 06-methylguanine-DNA

methyltransferase promoter methylation in 45 primary central nervous system lymphomas: Quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment、Journal of Neurooncology、107 巻、147-153、2012、査読有

Matsui A, Yokoo H (他 11 名、2 番目) CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b+Gr1highF4/80. cells and promotes tumor progression、PLoS ONE 7:e44080、2012、査読有

Ishizawa K, Sasaki A (他 6 名、8 番目) Pathologic diversity of glioneuronal tumor with neuropil-like islands: a histological and immunohistochemical study with a special reference to isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) in 5 cases、Clinical Neuropathology、31 巻、67-76、2012、査読有

Fukuda T, Sasaki A, Nakazato Y (他 11 名、5-9 番目)、Expression of hydroxyindole-O-methyltransferase enzyme in the human central nervous system and in pineal parenchymal cell tumors、Journal of Neuropathology and Experimental Neurology、69 巻、498-510、2010、査読有

Horiguchi K, Yokoo H, Sasaki A, Nakazato Y (他 13 名、9-10-15 番目) Primary bilateral adrenal diffuse large B-cell lymphoma demonstrating adrenal failure、Internal Medicine、49 巻、2241-2246、2010、査読有

Hirose H, Sasaki A (他 5 名、2 番目) 1950 MHz IMT-2000 field does not activate microglial cells in vitro. Bioelectromagnetics、31 巻、104-112、2010、査読有

[学会発表](計 8 件)

佐々木 惇ら、S100 -v-erbB トランスジェニックラット発生グリオーマにおけるミクログリア/マクロファージの免疫組織化学的検討、第 53 回日本神経病理学会、2012.6.29、新潟

横尾 英明ら、S100 -v-erbB トランスジェニックラットに発生する脳腫瘍：ホモおよびヘテロ接合性抗体間の比較、第 53 回日本神経病理学会、2012.6.29、新潟
Sasaki A、Tumor-associated

microglia/macrophages in human gliomas and a transgenic rat glioma model、Seminar, BMRI, University of Sydney, 2011.9.21、Sydney, Australia
横尾 英明ら、S100 -v-erbB トランスジェニックラットに発生する脳腫瘍の解析：ヘテロ接合性個体の長期観察、第 52 回日本神経病理学会、2011.6.2、京都
中里 洋一、脳腫瘍の治療に有益な病理診断をめざして、第 69 回日本脳神経外科学会、2010.10.28、福岡

Sasaki Aら、Immunohistochemical study of microglia in the Nasu-Hakola diseased brain、17th International Congress of Neuropathology、2010.9.12、Sarzburg, Austria

中里 洋一、教育セミナー：脳腫瘍の WHO 分類 (WHO2007)、第 28 回日本脳腫瘍病理学会、2010.5.22、大阪

横尾 英明ら、S100 -v-erbB トランスジェニックラットに発生するグリオーマは NG2/CSPG4 を発現する、第 28 回日本脳腫瘍病理学会、2010.5.21、大阪

[図書](計 5 件)

佐々木 惇、中山書店、癌診療指針のための病理診断プラクティス。脳腫瘍 限局性星細胞腫、2012 年、12 頁

中里 洋一、中山書店、癌診療指針のための病理診断プラクティス。脳腫瘍 脳腫瘍の病理診断、2012 年、21 頁

横尾 英明、中山書店、癌診療指針のための病理診断プラクティス。脳腫瘍 術中生検診断のポイント 乏突起膠細胞系腫瘍、2012 年、16 頁

中里 洋一、日本臨床社、新時代の脳腫瘍学 診断・治療の最前線 脳腫瘍の病理 脳腫瘍の WHO 分類 - 現状と展望 -、2010 年、7 頁

佐々木 惇、日本臨床社、新時代の脳腫瘍学 診断・治療の最前線 膠芽腫、星細胞腫、2010 年、5 頁

[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

中里 洋一 (NAKAZATO YOICHI)
群馬大学・医学系研究科・教授
研究者番号：10106908

横尾 英明 (YOKOO HIDEAKI)
群馬大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40282389