

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10348

研究課題名(和文) グリオーマ治療後脳放射線壊死における M2 マクロファージの病的意義の解明

研究課題名(英文) Impact of M2 macrophages on glioma-relevant radiation necrosis of the brain

研究代表者

藤田 貢 (FUJITA, Mitsugu)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：40609997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳放射線壊死組織内に集積する M2 マクロファージでは B7-H3 および B7-H5 といった免疫抑制性分子が発現亢進していることが判明した。同様にグリオーマ放射線脳壊死マウスモデルにおいても同分子の発現亢進がみられ、これらの分子が放射線脳壊死の周囲浮腫に関与していることが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いたマウス腸内細菌叢解析の結果、クロストリジア目が脳放射線壊死に関連する免疫応答の強度と相関していた。また M2 除去実験によりマウス生存日数の著明な延長がみられた。以上より、脳放射線壊死の悪化には組織中に浸潤する M2 マクロファージおよび腸内細菌が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In M2 macrophages accumulating in radioactive necrotic brain tissues, immunosuppressive molecules such as B7-H3 and B7-H5 were found to be upregulated. Likewise, in the mouse model, the expression of these molecules was also enhanced, and they were found to be involved in peripheral edema of radiation brain necrosis. Analysis of intestinal microflora in mice using the next generation sequencer showed that Clostridia correlated with the intensity of the immune response related to cerebral radiation necrosis. M2 removal experiment showed marked prolongation of mouse survival days. These results suggest that M2 macrophages and intestinal bacteria infiltrating into tissues are involved in the deterioration of cerebral radiation necrosis.

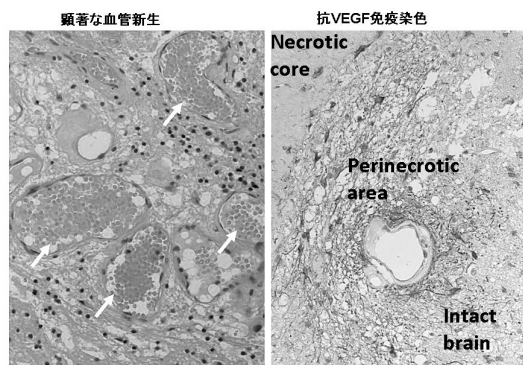
研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 放射線脳壊死 マクロファージ 免疫チェックポイント分子 腸内細菌叢

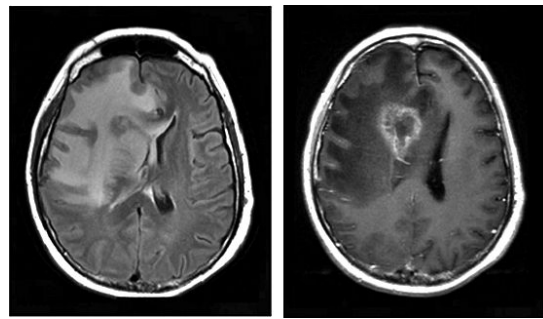
### 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍グリオーマの主たる治療法は外科的摘出であるが (Eyüpoglu IY. *Nat Rev Neurol* 2013, 9:141)、実際には全摘出困難な例が多く治療効果には限界がある。しかしながら近年の化学療法ならびに放射線療法の発達により、グリオーマ長期生存例の割合が増加している (Stupp R. *N Engl J Med* 2005, 352:987)。一方で症候性遅発性放射線障害の頻度も増加し (Hutchinson L. *Nat Rev Clin Oncol* 2011, 8:125)、悪性グリオーマの平均生存期間延長は遅発性放射線障害の制御という新たな課題を我々に突き付けている。遅発性放射線障害の典型が脳放射線壊死であり、進行性の組織壊死および脳浮腫によってもたらされる神経症状悪化は全生存期間に占める入院期間の割合を増やす一因となっている。

(2) グリオーマ放射線壊死に対する薬物療法としては抗凝固薬・ステロイドホルモン・高浸透圧利尿剤等の投与が行われるが、症状の顕著な改善は期待し難く、また治療薬の副作用も無視できない。これまでの研究で我々は放射線壊死組織内における血管内皮増殖因子 (VEGF) 過剰産生がその病態の主因であることを明らかにし (Furuse M. *J Neurooncol.* 2011, 102:471 / 図1)、抗血管新生薬であるベバシズマブ (抗 VEGF 抗体) が脳放射線壊死に著効を示すこと示した (Miyatake S. *Neuro Oncol.* 2013, 15:650 / 図2)。それらの結果を元に、現在は本治療の薬事承認を目指した第3項先進医療が実施されている。しかしながらベバシズマブ治療終了後に壊死の再発をきたす症例も多く、脳放射線壊死の病態すべてが解明されたとは言い切れないのが現状である。



**図1: 放射線壊死組織での VEGF 発現と浮腫の発生。** 矢印は血管新生を示し、その周囲に脳浮腫を認める。抗 VEGF の免疫染色では反応性アストロサイトが VEGF を産生し、その周囲に血管新生を認める。



**図2: 脳放射線壊死に対するベバシズマブ治療の経緯。** ベバシズマブ投与により、脳放射線壊死の浮腫、造影域は軽快したが、治療1年後に壊死再燃を認めた。これら病変が腫瘍の再発でなく、脳壊死であることをアミノ酸 PET で確認してある。

(3) 以前の研究で我々は、本病態には慢性炎症が関わることを示した (Yoritsune E. *J Radiat Res.* 2014, 55:803)。とくにヒト放射線壊死組織内ではケモカイン CXCL12 発現亢進およびその受容体 CXCR4 陽性マクロファージ浸潤が亢進し、かつこれらのマクロファージでは所謂 M2 型サイトカイン(IL-4, IL-6 等) の産生増加がみられた。ここで M2 マクロファージは慢性炎症の惹起および遷延化の中心的役割をする細胞として知られ (Gabrilovich DI. *Nat Rev Immunol* 2009, 9:162)、本細胞群が関わる一連のカスケードが脳放射線壊死発症および浮腫増悪の寄与因子であると推測された。

### 2. 研究の目的

以上の問題点・知見に着目し、本研究では脳放射線壊死の臨床像に即したマウス実験モデルを確立し、本病態における M2 マクロファージの寄与をより詳細に解析、さらに本細胞群を標的とした治療法の確立をめざすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 放射線脳壊死マウス実験モデル作製および手技改良: 予備実験により放射線脳壊死マウスモデル作製が可能であることが分かっており、小動物放射線治療装置ラジオフレックス 350 (図3) を用いてマウス頭蓋に 60 Gy 以上の外照射を加え、60 日程度の経過でヒト症候性放射線脳壊死相当の病理所見をとまなう脳実質内病変を誘導された (図4-5)。そこで本研究では照射されたマウスの自然歴、照射量、照射間隔、総照射時間などを解析した。

(2) 放射線脳壊死マウス脳組織からの M2 マクロファージ抽出および機能分子の発現解析: マウス脳組織からはパーコールを用い

た比重分離法により各種免疫細胞の分離が可能である (Fujita M. *Cancer Res* 2008, 69:1587)。我々は長年同手法を用いて脳腫瘍内微小環境の評価をしており、同手法を用いて放射線脳壊死マウス脳内からも免疫細胞が単離し解析した。特に本研究では、変微小環境内の M2 マクロファージおよび各種免疫担当細胞を単離し、各細胞の機能分子発現解析を行った (図 6)。

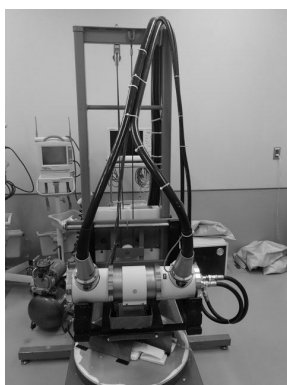


図 3  
小動物放射線治療装置ラジオフレックス 350

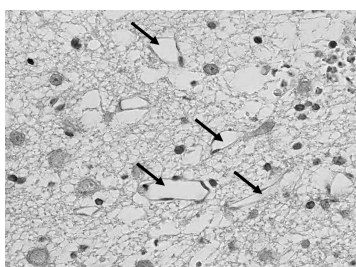


図 4: C57B6 マウス脳での壊死組織。壊死巣周囲の脳組織では周囲脳浮腫を伴う血管新生 (矢印) がみられ、ヒトでの症候性脳放射線壊死に近似している。

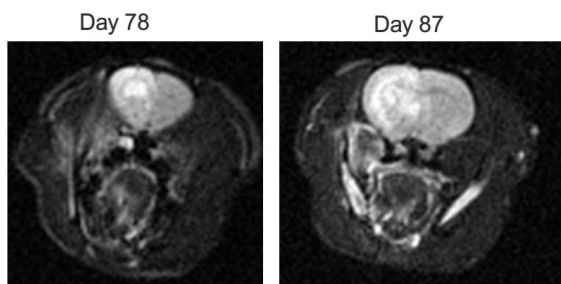


図 5: 60 Gy X 線照射ラットの経時的 T2 強調 MRI。動物用 MRI で同一個体での経時的観察が可能であった。

(3) 放射線脳壊死マウス脳組織における各種ケモカイン発現解析: M2 マクロファージをはじめとする免疫細胞の遊走には各種ケモカインが深く関与することが知られている (Yoshie O. *Immunity* 2012, 36:705)。そこで本

研究では DNA マイクロアレイおよび定量的リアルタイム PCR を用い、放射線脳壊死マウス脳内でのケモカイン発現量を経時的に測定し、M2 マクロファージおよび各種免疫細胞が壊死組織内集積に寄与するケモカインの同定を試みた (図 7)。

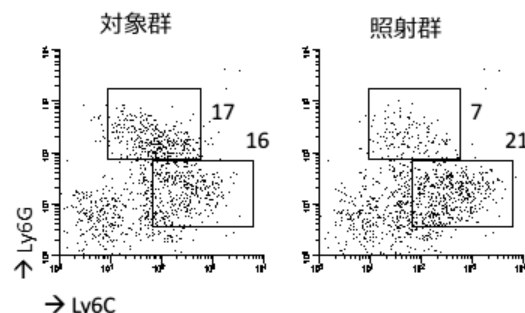


図 6: 比重分離法による脳内 M2 マクロファージの解析。マウス脳壊死組織から抽出した M2 マクロファージのフローサイトメトリーによる解析。さらに Ly6C および Ly6C 発現量の違いにより亜群に分離しえた。

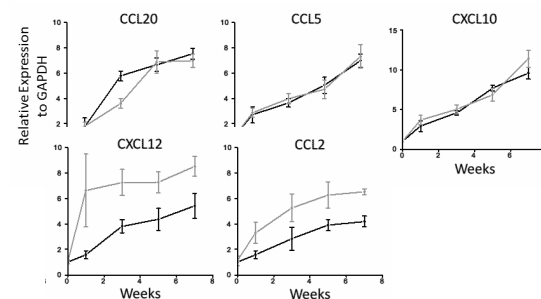
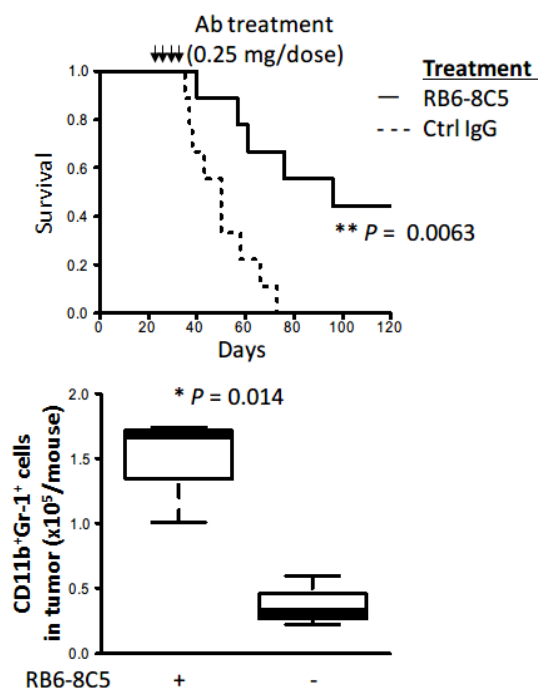


図 7: RT-qPCR による比重分離法による脳内 M2 マクロファージの解析。マウス脳壊死組織よりメッセンジャー RNA を抽出し、さらに定量的リアルタイム PCR により各種ケモカインの経時変化を解析した (灰色が壊死組織、黒色が反対側脳組織)。

(4) 放射線脳壊死マウスにおける腸内細菌叢解析: 近年の次世代シーケンサー技術の発達により、腸内細菌叢と宿主免疫機能との関連が示唆されている。そこで本研究では、放射線脳壊死マウスおよび対象マウスより糞便を採取し、16S リボソーム RNA をコードする遺伝子を次世代シーケンサーで読み込み、腸内細菌叢の分布を調べた。

(5) 自発型マウスグリオーマ照射後の M2 マクロファージ 機能解析: 我々は *Sleeping Beauty* トランスポゾン系を用いた自発型脳腫瘍マウスモデルを継続使用している (Kohanbashi G. *Cancer Res* 2013, 73:6413)。本手法では、新生児マウス脳室周囲に多く存在する神経幹細胞に複数のがん遺伝子を導入し、グリオーマに類似した脳腫瘍を誘導する。そ

ここで本研究では、マウス脳内にグリオーマを誘導した後、前頁と同様に脳局所照射を行い、臨床に即したグリオーマ放射線脳壊死マウス実験モデルの構築を行った。さらに脳腫瘍マウスに RB6-8C5 抗体を投与し、M2 マクロファージを除去した (図 8)。評価項目は前項 (2) (3) に準じた。



**図 8: M2 マクロファージ除去実験。** グリオーマ放射線脳壊死マウスに抗マウス Gr-1 抗体 RB6-8C5 投与し M2 マクロファージを除去したところ、生存率延長をみた。

#### 4. 研究成果

以上の結果より、ヒト脳放射線壊死組織内には M2 マクロファージの集積亢進がみられ、これらの M2 マクロファージではさらに B7-H3 および B7-H5 といった免疫抑制性分子が発現亢進していることが判明した。同様にグリオーマ放射線脳壊死マウスモデルにおいても同分子の発現亢進がみられ、これらの分子が放射線脳壊死の周囲浮腫に関与していることが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いたマウス腸内細菌叢を調べた結果、クロストリジア目が脳放射線壊死に関連する免疫応答の強度と相関することが明らかとなった。また M2 除去実験によりマウス生存日数の著明な延長がみられた。以上の結果より、脳放射線壊死の悪化には組織中に浸潤する M2 マクロファージの一部が関与しており、また腸内細菌が産生する代謝産物も関与していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

Tanaka T, Fujita M, Hasegawa H, Arimoto A, Nishi M, Fukuoka E, Sugita Y, Matsuda T, Sumi Y, Suzuki S, Kakeji Y, Yamashita K. Frequency of myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood reflects the status of tumor recurrence. *Anticancer Res.* 37:3863, 2017 (査読あり)

Okuda T, Tasaki T, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, Kato A, Fujita M. Efficacy of combination therapy with MET inhibitor and VEGF inhibitor for MET-overexpressing glioblastoma. *Anticancer Res.* 37:3871, 2017 (査読あり)

Okuda T, Kato A, Fujita M. Successful treatment of large intracranial granulocytic sarcomas. *J Clin Neurol Neurosurg Spine.* 1:112, 2017 (査読あり)

Yasuda Y, Fujita M. Significance of erythropoietin-receptor antagonist EMP9 in cancers. *Vitamins and Hormones.* 105:297-310, 2017 (査読あり)

Fujita M, Nakata S. Significance of immune cell migration/adhesion in central nervous system tumors. *J Adv Oncol.* 1:1005, 2017 (査読あり)

Matsuo K, Koizumi K, Fujita M, Morikawa T, Jo M, Shibahara N, Saiki I, Yoshie O, Nakayama T. Efficient use of a crude drug/herb library reveals Ephedra Herb as a specific antagonist for TH2-specific chemokine receptors CCR3, CCR4, and CCR8. *Front Cell Dev Biol.* 4:54, 2016 (査読あり)

Tasaki T, Fujita M, Okuda T, Yoneshige A, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Kato A. MET expressed in glioma stem cells is a potent therapeutic target for glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* 36:3571, 2016 (査読あり)

Yamashita K, Hasegawa H, Fujita M, Nishi M, Tanaka T, Arimoto A, Suzuki S, Kamigaki T, Kakeji Y. Host CD40 is essential for DCG treatment against metastatic lung cancer. *Anticancer Res.* 36:3659, 2016 (査読あり)

#### [学会発表](計 11 件)

Tasaki T, Izumoto S, Miyauchi M, Okuda T, Nakagawa N, Nakano N, Kato A, Fujita M. Therapeutic efficacy of perampanel in glioma-associated seizure. 第 20 回バイオ治療法研究会学術集会、福岡市、2017 年 12 月 2 日

Moyama C, Fujita M, Ii H, Taniguchi K, Yoshiki T, Nakata S. Stat5b promotes glioblastoma stem-like cells proliferation derived from a glioblastoma mouse model. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜市、2017 年 9 月 30 日

Fujita M, Yoshioka H, Okuda T, Tasaki T,

Yoneshige A, Nakata S. Critical roles of multidrug transporter ABCG2 in glioma stem cells. 第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会、神戸市、2017 年 6 月 11 日

Fujita M, Tasaki T, Okuda T, Yoneshige A, Nakata S, Yamashita K. Immunological significance of HGFR and VEGFR expressions on glioma stem cells. 第 14 回日本免疫治療法研究会学術集会、東京都、2017 年 2 月 11 日

Okuda T, Fujita M, Tasaki T, Nakata S, Yamashita K, Yoshioka H, Izumoto S, Kato A. Efficacy of combination therapy with MET inhibitor and VEGF inhibitor for MET-overexpressing glioblastoma. al significance of c-MET expression in gliomas. 第 20 回バイオ治療法研究会学術集会、福岡市、2016 年 12 月 10 日

Fujita M, Wada Y, Tomonori H, Rai S, Maekura S, Urase F, Muramatsu I, Yoshie O. Expression levels of SOX4 negatively correlate with the outcome of DLBCL patients treated with R-CHOP. 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜市、2016 年 10 月 7 日

Fujita M, Tasaki T, Okuda T, Yoneshige A, Nakata S, Yamashita K, Kato A. Immunological significance of MET expression on glioma stem cells as a glioma-associated antigen. 第 20 回日本がん免疫学会学術集会、大阪市、2016 年 7 月 28 日

Fujita M, Takaki T, Okuda T, Yoneshige A, Kato A. Pathological significance of c-MET expression in gliomas. 第 19 回バイオ治療法研究会学術集会、東京都、2015 年 12 月 5 日

Fujita M, Yoshioka H, Okuda T, Tasaki T, Miyatake S, Kato A, Yoshie O. Inhibition of ABCG2 enhances chemo-sensitivity of murine glioma stem cell-like cells and reduces chemokine-mediated tumorigenicity. 第 44 回日本免疫学会学術集会、札幌市、2015 年 11 月 18 日

Fujita M, Okuda T, Nakata S, Komohara Y, Kato A, Yoshie O. Metastasis-associated macrophages positive for B7-H3 and/or B7-H5 accelerate the brain metastasis formation of lung cancers. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2015 年 10 月 9 日

Fujita M, Okuda T, Nakata S, Komohara Y, Kato A, Yoshie O. Tumor-associated macrophages positive for B7-H3 and/or B7-H5 accelerate the brain metastasis formation of lung cancers. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015、東京都、2015 年 7 月 11 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤田 貢 (FUJITA, Mitsugu)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号：40609997

### (2)研究分担者

中田 晋 (NAKATA, Susumu)  
京都薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：8059615

宮武 伸一 (MIYATAKE, Shin-Ichi)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：8059615