

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18433

研究課題名（和文）脳血管周囲マクロファージが悪性神経膠腫の増殖・浸潤に関わる病態の解明

研究課題名（英文）The role of Neuro-Immuno-Vascular Unit in growth and invasion of Glioma

研究代表者

植川 顕 (Uekawa, Ken)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：40448535

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）：悪性神経膠腫の増殖・浸潤には免疫細胞浸潤と血管増生を含む腫瘍微小環境の関連が考えられる。本研究では腫瘍と免疫細胞と血管構造を連携する脳血管周囲マクロファージに着目し、悪性神経膠腫の増殖・浸潤機序の解明を目指し実験を行った。患者腫瘍組織内の各種マクロファージをM1/M2 マーカーで免疫染色し、その分布や血管形態を調べた。腫瘍内にマクロファージとミクログリアを含む免疫細胞が多数確認され、内因性免疫受容体CD36が陽性であり、CD36/NADPH oxidase経路を介した殺腫瘍作用をしてしている可能性が示唆された。今後、この殺腫瘍作用を利用した、新たな治療法確立を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者腫瘍組織内にマクロファージとミクログリアを含む免疫細胞が多数確認され、内因性免疫受容体CD36が陽性であり、CD36/NADPH oxidase経路を介した殺腫瘍作用をしてしている可能性が示唆された。今後、この殺腫瘍作用を利用した、新たな治療法確立を目指す。この研究によって悪性神経膠腫の増大・浸潤機序が明らかになり、化学放射線療法に耐性例に対する新治療法確立の基盤となることが期待される。また、上記の手法を下垂体腺腫や髄膜腫、転移性脳腫瘍などの脳腫瘍にも応用し各疾患の治療法の確立を目指す。

研究成果の概要（英文）：Tumor growth and invasion is associated to immune cell migration and angiogenesis or vascular disruption in malignant glioma. To elucidate the role of tumor/immune cell/vasculature interaction in growth and invasion of malignant glioma, we performed the immunohistochemistry staining with sections from patients. We evaluated distribution and morphology of immune cells including activated microglia and macrophage (M1 and M2), and vasculatures. A large number of macrophages and activated microglia are shown in tumor tissue, some of which are CD36 positive, suggesting that the immune cells exert anti-tumor effect via CD36/NADPH oxidase pathway. The anti-tumor effect via CD36/NADPH on brain immune cells may be a promising mechanism to develop the new strategy for malignant glioma.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：腫瘍免疫 腫瘍微小環境 ミクログリア マクロファージ 血管新生 悪性神経膠腫 CD36/NADPH oxidase 殺腫瘍作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内には神経-血管ユニット(neuro-vascular unit)と呼ばれる、「神経」と「血管」が連携する微小構造が存在する。さらに、脳内に存在するミクログリアや脳常在型マクロファージなど脳特有の免疫細胞も脳の恒常性に関与する。近年、腫瘍周辺の微小環境に関する研究が進んでいる。悪性神経膠腫の増殖・浸潤には、血管増生・血管透過性亢進などの「血管性因子」と、免疫細胞による「免疫性因子」を含む微小環境が関連していると考えられる。ただし、脳特有の血管構造と免疫環境の中で悪性神経膠腫がどのような機序で増殖・浸潤するか、その詳細な機序は分かっていない。

悪性神経膠腫の増殖・浸潤に、脳特有の微小環境は大きな影響を及ぼすと考えられる。脳内の微小環境には、1)血管増生・血管播種・血管透過性亢進などに関わる「血管性因子」が病態に関与し、抗VEGFヒト化モノクローナル抗体(ベバシズマブ)が臨床応用され、一定の効果を示している。また、2)免疫細胞が腫瘍細胞を認識し応答・制御する「免疫性因子」について研究が進んでおり、最近では抗PD-1抗体薬(ニボルマブ)が癌免疫療法として、悪性神経膠腫に対して治験が進行している。さらに、ミクログリアや脳常在型マクロファージなどの脳内免疫細胞が、悪性神経膠腫の浸潤や血管新生に影響していることが注目されている(Roesch et al., Int J Mol Sci 2018)。さらに、3)「神経細胞因子」として、障害を受けた神経細胞は、サイトカインを出し血管や免疫細胞に作用を及ぼすと推測される。そのため、悪性神経膠腫の増殖・浸潤を考える上で、「神経」と「血管」と「免疫」で構成される脳特有の微小環境の役割を解明することは重要であると考えられる。(図1)そこで申請者は、神経-免疫-血管ユニット(Neuro-Immuno-Vascular Unit)という概念を考案した。その研究背景として、脳内の免疫系の最近の発見で、脳で産生された老廃物が脳血管周囲腔を経由し脳髄膜のリンパ管へ排出する血管周囲リンパ排出経路の存在が報告された(Kipnis, et al., Nature 2015)。この排出経路には、脳常在型免疫細胞である脳血管周囲マクロファージ(perivascular macrophage; PVM ϕ)が多数存在する。このPVM ϕ は血管周囲腔を移動でき、血管内皮細胞やペリサイト、T細胞などの多様な細胞と相互作用しながら、老廃物の処理などの脳の恒常性を維持するとともに、様々な病態にとって免疫の中心的な役割を担っていると考えられる(Prinz et al., Nat Immunol 2016)。申請者のこれまでの研究結果として、アルツハイマー病マウスで過剰なアミロイド蛋白に暴露されるとPVM ϕ に発現する免疫受容体CD36が活性酸素種(ROS)を産生し脳血管機能障害と認知機能低下を引き起こすことを実証した(Uekawa et al., Mol Neurodegener. 2023)。

このPVM ϕ を含めた脳内免疫細胞と悪性神経膠腫の増殖・浸潤の関係について詳細は分かっていない。本研究では、脳内微小環境の中の神経と免疫と血管の相互作用に着目しながら、悪性神経膠腫が増殖・浸潤の新たな病態の解明を目指し実験を行った。(図2)

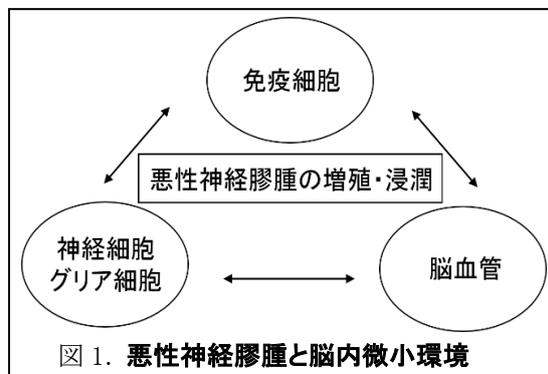


図1. 悪性神経膠腫と脳内微小環境

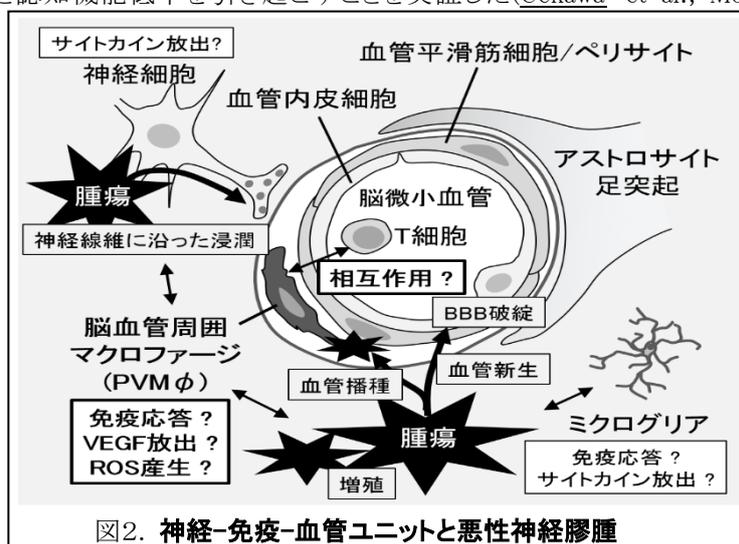


図2. 神経-免疫-血管ユニットと悪性神経膠腫

2. 研究の目的

本研究の目的は悪性神経膠腫の増殖・浸潤・血管新生における脳血管周囲マクロファージの役割を解明し、臨床応用により新たな治療戦略を確立することである。

前記のようにPVMφに発現する免疫受容体CD36はNADPH oxidaseを介し活性酸素種(ROS)を産生するが、このCD36/NADPH oxidase経路が抗腫瘍作用を発揮している可能性があり実証する。

さらに悪性神経膠腫は高齢者に発症し、アルツハイマー病をはじめとした認知症の病態背景に関連し(Med Hypotheses. 2010)、腫瘍内に蓄積したアミロイドβが治療標的となる可能性が報告されている(Int J Mol Sci. 2019、Clin Exp Immunol. 2020)。脳腫瘍の微小環境においてアルツハイマー病理や脳血管病の腫瘍に対する影響についても病理的に検討を行う。

3. 研究の方法

患者の脳腫瘍組織サンプルを用いた組織学的検討

悪性神経膠腫患者から採取した腫瘍組織検体を用いて、免疫染色によりPVMφが脳腫瘍細胞の増殖・浸潤にどのように関わっているか関連を評価した。

当教室で蓄積している悪性神経膠腫のサンプルと臨床情報に加え、今後の手術例から採取されるサンプルも使用する。腫瘍本体と腫瘍周辺の浸潤部組織を用い、腫瘍細胞の浸潤、血管構築と免疫細胞について評価した。免疫細胞・血管構築に対する抗体はミクログリア(Iba1, TMEM119)、脳常在性/M2マクロファージ(CD206抗体)、単球・未熟マクロファージ(CD68抗体)、血管内皮細胞(CD31/34)、血管平滑筋(SMA)などを染色評価した。CD36/NADPH oxidase経路を中心にVEGF、IL-6、MMP-9、TNFαなどの血管増殖因子・サイトカインの発現を評価した。組織の立体構造を観察するために60μmの厚みの切片をvibratomeで作成し、free floating stainingで共染色し細胞の種類と上記の病態に関連するシグナル蛋白の発現を観察した。

細胞培養による脳内マクロファージの病態解明と治療評価

採取した脳組織からPVMφの単離培養を作成し、当教室で樹立した脳腫瘍培養細胞と共培養を行い、血管増殖因子やサイトカインを定量評価した。脳腫瘍脳内移植モデルマウスを用いて病態解明と治療介入の方法を検討した。

4. 研究成果

(論文作成中のため概略に留める。)

これまでの研究で、患者腫瘍組織内の各種マクロファージをM1/M2マーカーで免疫染色し、その分布や血管形態との関連を調べた(図3)。腫瘍内にマク

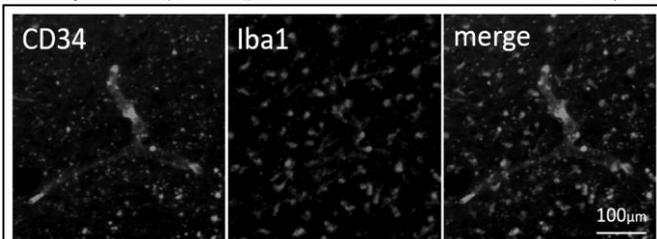


図3: 悪性神経膠腫患者検体の共焦点顕微鏡・免疫染色
CD34(+)血管内皮、Iba1(+)ミクログリア/マクロファージ

ロファージとミクログリアを含む免疫細胞が多数確認され、内因性免疫受容体CD36が陽性であり、CD36/NADPH oxidase経路を介した殺腫瘍作用をしてしている可能性が示唆された。今後、この殺腫瘍作用を利用した、新たな治療法確立を目指す。

また、脳血管周囲の活性酸素種は脳血管反応性を障害し認知機能を低下させ、アミロイドβの蓄積を促進させる可能性がある。アミロイドβの蓄積が血管・免疫機序を介して悪性神経膠腫の増大・浸潤に影響を与えている可能性について患者組織で検討を続けている。

さらに細胞培養・脳腫瘍脳内移植モデルマウスを用いて病態解明と治療法確立の実験を進めている。

この研究によって悪性神経膠腫の増大・浸潤機序が明らかになり、化学放射線療法に耐性例に対する新治療法確立の基盤となることが期待される。また、上記の手法を下垂体腺腫や髄膜腫、転移性脳腫瘍などの脳腫瘍にも応用し各疾患の治療法の確立を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuzaki Hiroaki, Komohara Yoshihiro, Yano Hiromu, Fujiwara Yukio, Kai Keitaro, Yamada Rin, Yoshii Daiki, Uekawa Ken, Shinojima Naoki, Mikami Yoshiki, Mukasa Akitake	4. 巻 67
2. 論文標題 Macrophage colony stimulating factor potentially induces recruitment and maturation of macrophages in recurrent pituitary neuroendocrine tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 90 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13041	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 Kai Keitaro, Komohara Yoshihiro, Esumi Shigeyuki, Fujiwara Yukio, Yamamoto Takahiro, Uekawa Ken, Ohta Kazutaka, Takezaki Tatsuya, Kuroda Junichiro, Shinojima Naoki, Hamasaki Tadashi, Mukasa Akitake	4. 巻 35
2. 論文標題 Macrophage/microglia-derived IL-1 induces glioblastoma growth via the STAT3/NF- B pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 226 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00619-8	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 Uchikawa Hiroki, Kameno Koki, Kai Keitaro, Kajiwara Soshō, Fujimori Kana, Uekawa Ken, Fujiwara Yukio, Mukasa Akitake, Kim-Mitsuyama Shokei, Hasegawa Yu	4. 巻 39
2. 論文標題 Pretreatment with Clodronate Improved Neurological Function by Preventing Reduction of Posthemorrhagic Cerebral Blood Flow in Experimental Subarachnoid Hemorrhage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurocritical Care	6. 最初と最後の頁 207 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12028-023-01754-w	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 Uchikawa Hiroki, Uekawa Ken, Hasegawa Yu	4. 巻 374
2. 論文標題 Perivascular macrophages in cerebrovascular diseases	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 114680 ~ 114680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2024.114680	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 -

〔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 植川顕、服部頼都、Laibaik Park、Costantino Iadecola、武笠晃丈
2. 発表標題 脳血管周囲マクロファージはCD36を介して活性酸素種を産生し脳アミロイド血管症と認知機能障害を引き起こす
3. 学会等名 第23回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植川顕、服部頼都、Laibaik Park、Costantino Iadecola、武笠晃丈
2. 発表標題 脳境界マクロファージは脳血管周囲でCD36を介して酸化ストレスを産生し脳アミロイド血管症を悪化させる
3. 学会等名 第66回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植川顕、服部頼都、Laibaik Park、Costantino Iadecola、武笠晃丈
2. 発表標題 脳血管周囲マクロファージが産生する活性酸素種は脳アミロイド血管症を進行させる
3. 学会等名 第42回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植川顕、亀野功揮、岳元裕臣、Laibaik Park、Costantino Iadecola、長谷川雄、武笠晃丈
2. 発表標題 Laser speckle flowmetryを用いた脳血管反応性の測定法の工夫(technical note)
3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------