

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03042

研究課題名（和文）7T-MRIおよび3次元組織透明化技術を駆使した悪性神経膠腫の微小環境の可視化

研究課題名（英文）Visualization of microenvironments of malignant glioma utilizing 7T-MRI and 3D tissue clearing technology

研究代表者

藤井 幸彦（Fujii, Yukihiko）

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：40283014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、摘出悪性神経膠腫組織の腫瘍微小環境の可視化を目指した。高磁場7T-SWI撮像条件の最適化を図り、微小環境に重要な微小血管の描出に成功した。神経膠腫21例に対し、微小血管の肥厚や圧排により、悪性度の判定や星細胞腫・乏突起膠腫の鑑別ができAJNRに報告した。次に微小環境の3次元可視化について、1,2-Hexanediolと有機溶媒系のBenzyl Benzoate/Benzyl Alcoholで透明化する事で、抗原性が維持された成体脳の透明化組織免疫染色ができ、悪性神経膠腫微小環境の構成要素を3次元撮影できた。研究期間中に予定していた実験はほぼ完了し、今後、研究成果の論文化を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫の新規治療標的として、腫瘍微小環境が重要である。しかし、その微小環境は、個々の患者により大きく異なり、また免疫応答が多なる影響を及ぼすため、実験系で再現することは極めて困難である。本研究では、術前に、7T-MRI詳細画像法を用いて、個々の脳腫瘍の微小構造の描出し、摘出脳組織を、術後に組織透明化染色により腫瘍微小環境を3次元的に可視化し、病理学的に詳細解析する、新規治療法の開発を目指した、世界初、かつ実現可能な腫瘍微小環境の3次元可視化プロジェクトである。個々の症例に応じた免疫チェックポイント阻害剤の選択等が可能となり、悪性神経膠腫の治療に革命的な進歩をもたらす。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we set out to visualize the tumor microenvironment of malignant gliomas. First, we optimized 7T-SWI imaging to visualize microvessels, which are an important element of the tumor microenvironment. We performed 7T-SWI in 21 glioma patients and succeeded in malignant grading and differentiating between astrocytomas and oligodendrogliomas by evaluating the thickening and compression of microvessels (Natsumeda, Fujii et al., AJNR, 2022). Next, for 3D visualization of the tumor microenvironment, tissue clearing methods using 1,2-Hexanediol and organic solvent benzyl benzoate/benzyl alcohol we were able to keep the antigens intact and visualize components of the tumor microenvironment in 3D. Experiments have gone according to plan, and we hope to write a paper soon.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：腫瘍微小環境 7T-MRI詳細画像 3次元病理解析 摘出脳組織透明化 新規治療法開発 グリオーマ 組織透明化 微小環境

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性神経膠腫は、可及的摘出後の放射線治療及びテモゾロミドが標準治療であるが、再発は免れず、極めて予後不良な脳腫瘍であることは周知の如くである。悪性神経膠腫の血管新生には、腫瘍細胞、微小環境を構成する細胞および血管内皮とのクロストークが重要であることが明らかにされている。悪性神経膠腫おける強力な血管新生抑制因子である VEGF の阻害剤、ベバシズマブが臨床に導入されたが、大規模第 3 相臨床試験でも生存期間延長は示されず、微小環境そのものを標的とした新規治療法の開発が喫緊の課題である。
- (2) しかしその微小環境は、個々の患者により大きく異なり、また免疫応答が多なる影響を及ぼすため、実験系で再現することは極めて困難である。

2. 研究の目的

本研究では、画像評価に関しては超高磁場 7T-MRI を用いて、微細かつ複雑な腫瘍血管の分布を術前に把握し、腫瘍および周辺組織を含めた脳切除術を行い、さらには組織透明化技術を駆使して、3 次元病理解析を行うことで正確に腫瘍微小環境を把握することを目指す。また、摘出前に 7T-MRI を撮像し、3 次元病理解析との対比を複数症例で行うことで術前における微小環境の評価が可能になり、微小環境の状態に応じて開発された免疫チェックポイント阻害剤を選択することが可能となり、悪性神経膠腫の治療に paradigm shift をもたらす可能性を秘めている。

3. 研究の方法

- (1) 超磁場 MRI : 7T SWI を悪性神経膠腫の微小環境の大事な要素である微小血管を鮮明に撮像できるよう、撮像及び画像加算処理に工夫をした。20 例以上の悪性神経膠腫患者の撮像を行った。
- (2) 脳腫瘍モデルマウス作製 : 当科で樹立したヒト膠芽腫細胞である NGT41 細胞をヌードマウス Balbc nu/nu の脳内に移植し、異種同所移植モデルマウスを作製した。
- (3) 組織透明化蛍光染色 : 異種同所移植モデルマウスの摘出脳組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定後に透明化蛍光免疫染色を行い、透明化染色には水溶性 CUBIC 法 (Tainaka K et al., Cell Reports 24(8): 2196-2210.e9, 2018) と有機溶媒系の Benzyl Benzoate/Benzyl Alcohol (BABB; Azaripour A et al., Progress in histochemistry and cytochemistry, 51(2), 9-23, 2016) 法を試した (図 1)。それぞれ透明化

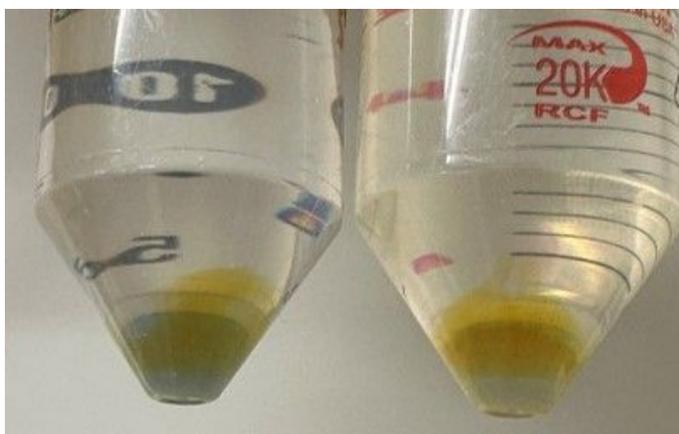


図 1 : 1,2- Hexanediol と有機溶媒系の Benzyl Benzoate/Benzyl Alcohol で組織透明化に成功

染色後にLight sheet 顕微鏡 (Ultramicroscope Blaze, Miltenyi Biotec) で断層撮影し(図2)、三次元解析ソフト (Imaris, Oxford Instruments) で3D再構成し、悪性神経膠腫微小環境を解析した。

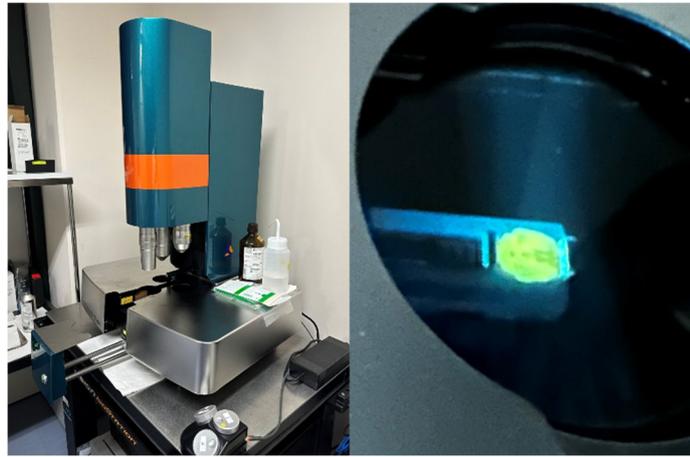


図2：ライトシート型顕微鏡で観察

4. 研究成果

脳内、腫瘍内の微小血管(図3)及び腫瘍微小環境の他の構成要素(data not shown)

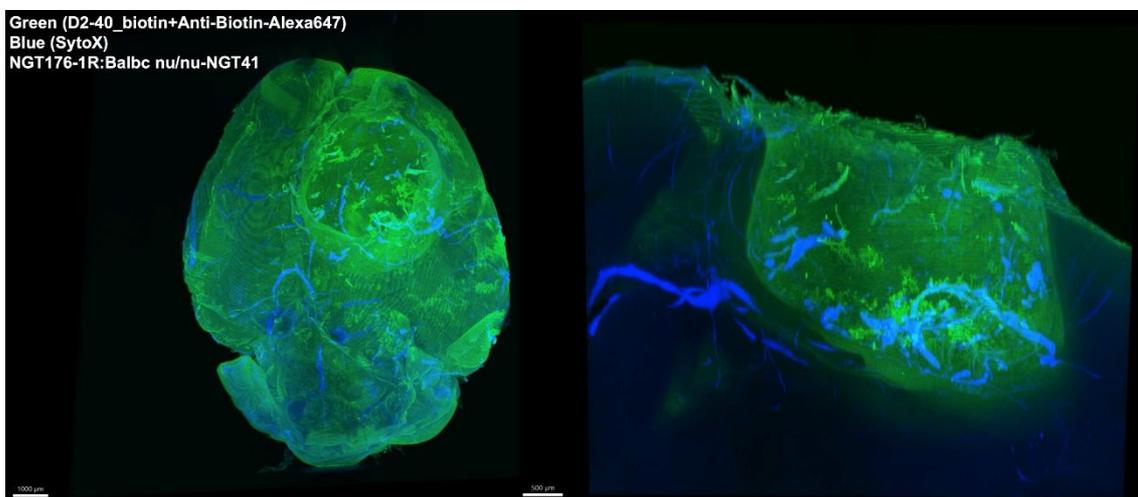


図3：左前頭葉膠芽腫の3次元蛍光免疫染色

の3次元撮像に成功した。微小環境構成要素の症例別個人差及び同一症例内の空間的不均一さを捉えることができた。現在、微小環境の構成要素の空間的不均一さの客観的評価の方法を模索中である。

マウス脳腫瘍モデル脳を用いて、CUBIC法の膜透過処理はCUBIC-L試薬とBABBでは膜透過処理では1,2-Hexanediolを使用した。BABB法の方が、全脳での透明化染色で歪みのない画像が撮影できることがわかった。BABB法での組織透明化染色後の3D撮影により、血管については488nmの波長で自家蛍光として撮影され、腫瘍はPodoplanin抗体で描出され、腫瘍とその内部を走行する血管など解析に成功した(図3)。詳細に関しては論文掲載前のため省くが、腫瘍内部の新生血管を取り巻くように腫瘍が形成されている様子が確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi Haruhiko, Natsumeda Manabu, On Jotaro, Watanabe Jun, Tada Mari, Shimizu Hiroshi, Tsukamoto Yoshihiro, Okada Masayasu, Oishi Makoto, Takizawa Jun, Hayashi Yasuhiko, Masaki Yasufumi, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 64
2. 論文標題 Administration of glucocorticoids prior to liquid biopsy dramatically reduces the detection rate of MYD88 L265P mutation in cerebrospinal fluid of primary CNS lymphoma patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2023.2199895	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 Kazuhiro, Natsumeda Manabu, Kawamura Masahide, Shirakawa Kamon, Okada Masayasu, Tsukamoto Yoshihiro, Eda Takeyoshi, Watanabe Jun, Saito Shoji, Takahashi Haruhiko, Kakita Akiyoshi, Oishi Makoto, Fujii Yukihiko	4. 巻 223
2. 論文標題 Elevated ratio of C-type lectin-like receptor 2 level and platelet count (C2PAC) aids in the diagnosis of post-operative venous thromboembolism in IDH-wildtype gliomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 36 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.01.018	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 Natsumeda M., Matsuzawa H., Watanabe M., Motohashi K., Gabdulkaev R., Tsukamoto Y., Kanemaru Y., Watanabe J., Ogura R., Okada M., Kurabe S., Okamoto K., Kakita A., Igarashi H., Fujii Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 SWI by 7T MR Imaging for the Microscopic Imaging Diagnosis of Astrocytic and Oligodendroglial Tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Neuroradiology	6. 最初と最後の頁 1575 ~ 1581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3174/ajnr.A7666	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 Nakata Satoshi, Murai Junko, Okada Masayasu, Takahashi Haruhiko, Findlay Tyler H, Malebranche Kristen, Parthasarathy Akhila, Miyashita Satoshi, Gabdulkaev Ramil, Benkimoun Ilan, Druillennec Sabine, Chabi Sara, Hawkins Eleanor, Miyahara Hiroaki, Tateishi Kensuke, Yamashita Shinji, Yamada Shiori, Saito Taiki, et al	4. 巻 25
2. 論文標題 Epigenetic upregulation of Schlafen11 renders WNT- and SHH-activated medulloblastomas sensitive to cisplatin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 899 ~ 912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noac243	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 該当する

1. 著者名 Mitsuhashi Daiju, Hishida Ryuichi, Oishi Makoto, Hiraishi Tetsuya, Natsumeda Manabu, Shibuki Katsuei, Fujii Yukihiko	4. 巻 137
2. 論文標題 Visualization of cortical activation in human brain by flavoprotein fluorescence imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2022.1.JNS212542	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 Sasame Jo, Ikegaya Naoki, Kawazu Masahito, Natsumeda Manabu, Hayashi Takahiro, Isoda Masataka, Satomi Kaishi, Tomiyama Arata, Oshima Akito, Honma Hirokuni, Miyake Yohei, Takabayashi Katsuhiko, Nakamura Taishi, Ueno Toshihide, Matsushita Yuko, Iwashita Hiromichi, Kanemaru Yu, et al	4. 巻 28
2. 論文標題 HSP90 Inhibition Overcomes Resistance to Molecular Targeted Therapy in BRAFV600E mutant High-grade Glioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-21-3622	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 Okada Masayasu, Kawagoe Yosuke, Takasugi Toshiyuki, Nozumi Motohiro, Ito Yasuyuki, Fukusumi Hayato, Kanemura Yonehiro, Fujii Yukihiko, Igarashi Michihiro	4. 巻 47
2. 論文標題 Correction to: JNK1-Dependent Phosphorylation of GAP-43 Serine 142 is a Novel Molecular Marker for Axonal Growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2683 ~ 2683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03639-4	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 Okada Masayasu, Kawagoe Yosuke, Takasugi Toshiyuki, Nozumi Motohiro, Ito Yasuyuki, Fukusumi Hayato, Kanemura Yonehiro, Fujii Yukihiko, Igarashi Michihiro	4. 巻 47
2. 論文標題 JNK1-Dependent Phosphorylation of GAP-43 Serine 142 is a Novel Molecular Marker for Axonal Growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2668 ~ 2682
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03580-6	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 Asano Kenichiro, Yamashita Yoji, Ono Takahiro, Natsumeda Manabu, Beppu Takaaki, Matsuda Kenichiro, Ichikawa Masahiro, Kanamori Masayuki, Matsuzaka Masashi, Kurose Akira, Fumoto Toshio, Saito Kiyoshi, Sonoda Yukihiko, Ogasawara Kuniaki, Fujii Yukihiko, Shimizu Hiroaki, Ohkuma Hiroki, Kitanaka Chifumi, et al	4. 巻 39
2. 論文標題 Clinicopathological risk factors for a poor prognosis of primary central nervous system lymphoma in elderly patients in the Tohoku and Niigata area: a multicenter, retrospective, cohort study of the Tohoku Brain Tumor Study Group	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 139 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-022-00427-4	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 Eda Takeyoshi, Okada Masayasu, Ogura Ryosuke, Tsukamoto Yoshihiro, Kanemaru Yu, Watanabe Jun, On Jotaro, Aoki Hiroshi, Oishi Makoto, Takei Nobuyuki, Fujii Yukihiko, Natsumeda Manabu	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel Repositioning Therapy for Drug-Resistant Glioblastoma: In Vivo Validation Study of Clindamycin Treatment Targeting the mTOR Pathway and Combination Therapy with Temozolomide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 770 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14030770	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 Saito Shoji, Natsumeda Manabu, Sainouchi Makoto, Takino Toru, Shibuya Kohei, On Jotaro, Kanemaru Yu, Ogura Ryosuke, Okada Masayasu, Oishi Makoto, Shimada Yoshifumi, Wakai Toshifumi, Okuda Shujiro, Ajioka Yoichi, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Elucidating the multiple genetic alterations involved in the malignant transformation of a KRAS mutant neurenteric cyst. A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 519 ~ 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12822	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 Mouri Yoshihiro, Natsumeda Manabu, Okubo Noritaka, Sato Taro, Saito Taiki, Shibuya Kohei, Yamada Shiori, On Jotaro, Tsukamoto Yoshihiro, Okada Masayasu, Oishi Makoto, Eda Takeyoshi, Murai Junko, Shimizu Hiroshi, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Successful Treatment of Acute Uric Acid Nephropathy with Rasburicase in a Primary Central Nervous System Lymphoma Patient Showing a Dramatic Response to Methotrexate - Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5548 ~ 5548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11195548	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10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 人生を変えて頂いた先師たち
3. 学会等名 退任記念講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 脳機能再構築：温故知新
3. 学会等名 新潟脳神経研究会特別例会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 神経科学研究における脳外科医の役割
3. 学会等名 最終講義 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 神経科学研究における脳外科医の役割
3. 学会等名 第12回 生理研-脳研-ヒト進化研究センター合同シンポジウム(特別セッション)(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶田学、松澤等、塚本佳広、小倉良介、岡本浩一郎、五十嵐博中、藤井幸彦
2. 発表標題 星細胞腫及び乏突起膠腫の鑑別、悪性度診断における7T MRI-SWIの有用性
3. 学会等名 第45回日本脳神経CI学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fujii Y
2. 発表標題 Visualization of human brain activation by flavoprotein fluorescence imaging
3. 学会等名 2022 Mini-Symposium DENDRITE and BRI(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 神経科学に新たな展開をもたらす imaging
3. 学会等名 第45回日本脳神経CI学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 神経科学を切り拓くイメージング
3. 学会等名 第112回富山県脳神経外科医会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井幸彦
2. 発表標題 意識障害のイメージング
3. 学会等名 第30回日本意識障害学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 粟田学、松澤等、塚本佳広、小倉良介、岡本浩一郎、柿田明美、五十嵐博中、中田力、藤井幸彦
2. 発表標題 星細胞腫及び乏突起膠腫の鑑別、悪性度診断における7T MRI SWIの有用性
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会学術総会
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
研究分担者	粟田 学 (Natsumeda Manabu) (00515728)	新潟大学・脳研究所・特任准教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	五十嵐 博中 (Igarashi Hironaka) (20231128)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究分担者	柿田 明美 (Kakita Akiyoshi) (80281012)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	
研究分担者	田井中 一貴 (Tainaka Kazuki) (80506113)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	

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