

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09167

研究課題名(和文) バイオインフォマティクス的手法による放射線脳壊死関連M2マクロファージの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of radiation brain necrosis-associated M2 macrophages by bioinformatics methods.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線療法の発展により悪性脳腫瘍グリオーマの生存期間が延長する一方、遅発性脳放射線壊死が問題となっている。研究では、放射線脳壊死マウスモデルを用いてM2マクロファージの集積と免疫抑制性分子の発現増加を確認し、これらが脳浮腫に関与することを明らかにした。また次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析により、クロストリジウム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を示した。さらにM2マクロファージを除去することでマウスの生存日数が延長することを確認した。これらの結果から、脳放射線壊死の悪化にはM2マクロファージと腸内細菌が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、放射線脳壊死の病態におけるM2マクロファージの役割を詳細に解明し、これらの細胞が免疫抑制性分子の発現を通じて脳浮腫の進行に寄与することを示した点が重要である。また腸内細菌叢の解析により、クロストリジウムが免疫応答の強度と相関することを明らかにし、腸内細菌が脳放射線壊死に与える影響を示唆した。社会的意義としては、M2マクロファージの除去がマウスの生存期間を延長することを確認し、新たな治療法の開発に向けた基盤を提供した点が挙げられる。これにより、放射線治療を受ける患者のQOL(生活の質)向上や治療効果の最大化が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze the function of M2 macrophages associated with radiation-induced brain necrosis using bioinformatics methods. In the treatment of gliomas, while advancements in chemotherapy and radiotherapy have extended survival times, the incidence of delayed radiation injuries, including brain necrosis, has also increased. The study confirmed the accumulation of M2 macrophages and the increased expression of immunosuppressive molecules (B7-H3, B7-H5) in radiation-induced brain necrosis mouse models, indicating their involvement in brain edema. Additionally, next-generation sequencing analysis of the gut microbiota revealed a correlation between Clostridia and the intensity of immune responses related to brain radiation necrosis. The removal of M2 macrophages significantly extended the survival time of mice. These results suggest that M2 macrophages infiltrating the tissue and metabolites produced by gut bacteria contribute to the exacerbation of brain radiation necrosis.

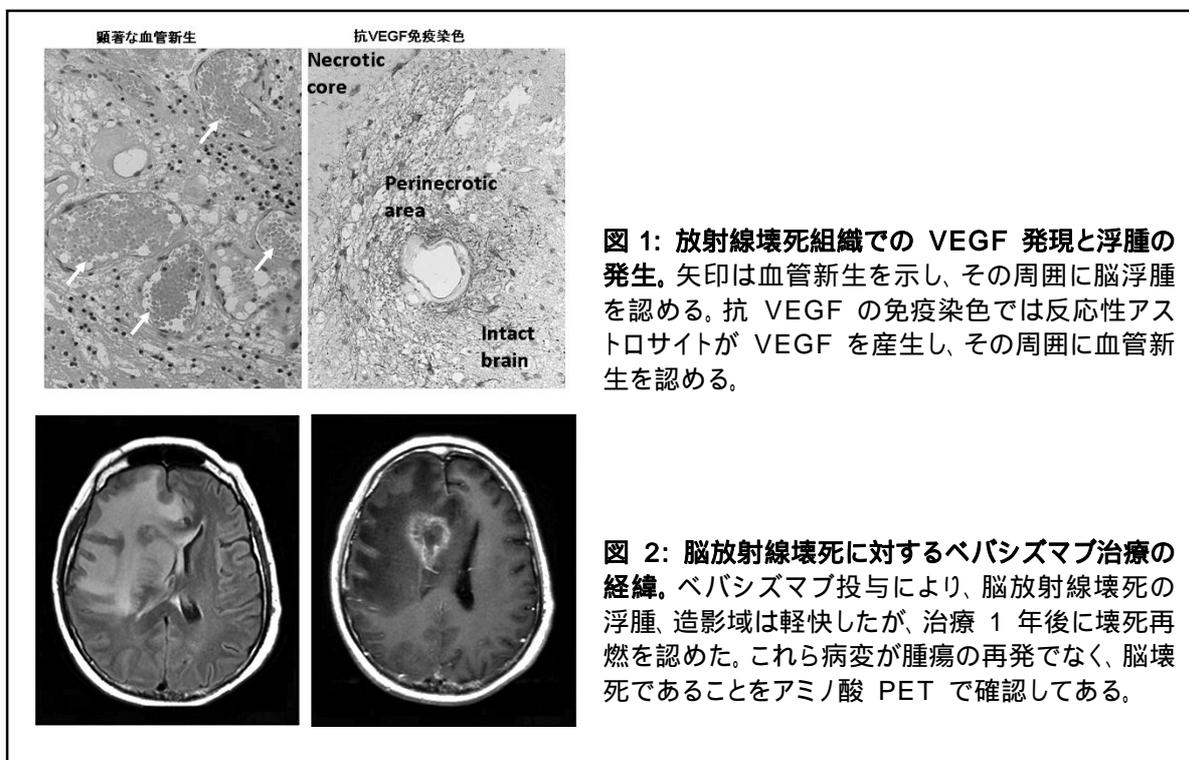
研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 放射線脳壊死 マクロファージ 免疫抑制性分子 腸内細菌叢 慢性炎症

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) グリオーマ放射線脳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脳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。



(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)。とくにヒト放射線脳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も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。

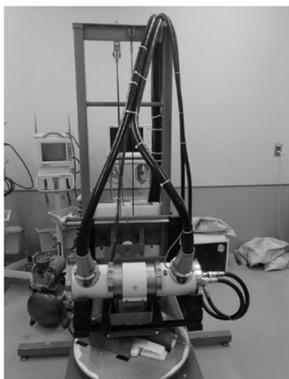


図 3
小動物放射線治療装置ラジオフレックス 350

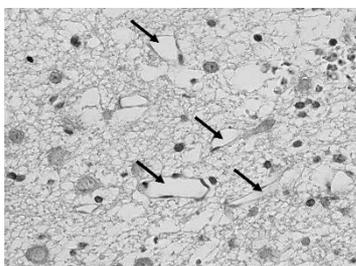


図 4: C57B6 マウス脳での壊死組織。壊死巣周囲の脳組織では周囲脳浮腫を伴う血管新生 (矢印) がみられ、ヒトでの症候性放射線脳壊死に近似している。

Day 78

Day 87

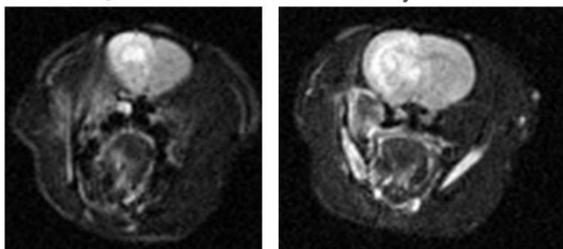


図 5: 60 Gy X 線照射ラットの経時的 T2 強調 MRI。動物用 MRI で同一個体での経時的観察が可能であった。

(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; Kuramoto Y, Fujita M. *J Neuroinflammation* 2022, 19:48)。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)。

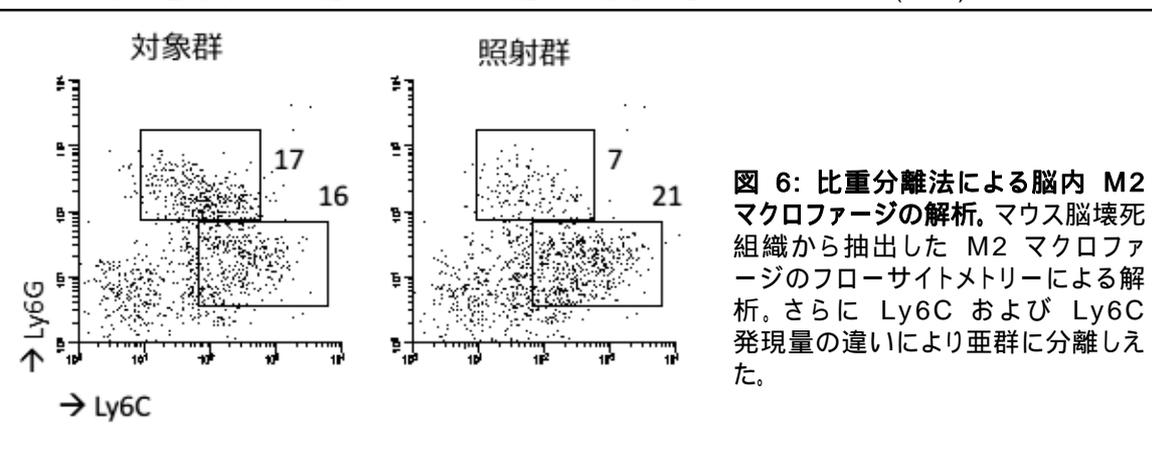


図 6: 比重分離法による脳内 M2 マクロファージの解析。マウス脳壊死組織から抽出した M2 マクロファージのフローサイトメトリーによる解析。さらに Ly6C および Ly6C 発現量の違いにより亜群に分離した。

(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わることが知られている (Fujita M. *Anat Physiol* 2017, 7:274)。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)。

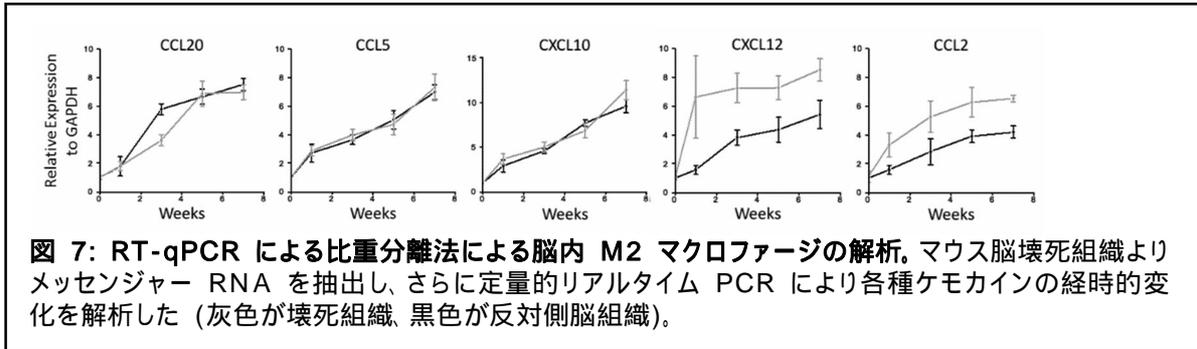


図 7: RT-qPCR による比重分離法による脳内 M2 マクロファージの解析。マウス脳壊死組織よりメッセンジャー RNA を抽出し、さらに定量的リアルタイム PCR により各種ケモカインの経時的変化を解析した (灰色が壊死組織、黒色が反対側脳組織)。

(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 (Ishihara K, Fujita M, Nakata S. *Anticancer Res* 2024, 44:489)。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16件（うち査読付論文 16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 Moyama C, Fujita M, Ando S, Taniguchi K, Ii H, Tanigawa S, Hashimoto N, Nakata S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Stat5b inhibition blocks proliferation and tumorigenicity of glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1129-1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ishihara K, Sakoda R, Mizoguchi M, Fujita M, Moyama C, Okutani Y, Takata K, Tanaka M, Minami T, Sago H, Yamakawa K, Nakamura T, Kawashita E, Akiba S, Nakata S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Suppression of Sleeping Beauty-induced Gliomagenicity in Ts1Cje Mice, a Model of Down Syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 489-495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16836	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 Tatebayashi K, Nakayama N, Sakamoto D, Iida T, Ono S, Matsuda I, Enomoto Y, Tanaka M, Fujita M, Hirota S, Yoshimura S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Significance of Early Venous Filling Detected via Preoperative Angiography in Glioblastoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers.	6. 最初と最後の頁 3800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15153800	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 Tatebayashi K, Shirakawa M, Abe S, Fujita M, Yoshimura S.	4. 巻 106
2. 論文標題 Vascular Ehlers-Danlos syndrome with a Novel missense COL3A1 gene mutation present with bilateral spontaneous carotid-cavernous fistula: a case report.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta neurochirurgica.	6. 最初と最後の頁 3799-3804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00701-023-05859-1	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 Abe T, Yamashita K, Nagasaka T, Fujita M, Agawa K, Ando M, Mukoyama T, Yamada K, Miyake S, Saito M, Sawada R, Hasegawa H, Matsuda T, Kato T, Harada H, Urakawa N, Goto H, Kanaji S, Yanagimoto H, Oshikiri T, Ajiki T, Fukumoto T, Kakeji Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Deep Learning-based Image Cytometry Using a Bit-pattern Kernel-filtering Algorithm to Avoid Multi-counted Cell Determination.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 3755-3761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16560	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 Morotomi T, Nishiwaki H, Iuchi T, Sanada Y, Nakao H, Fujita M, Niwa K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Epidermoid Cyst of Orbit Requiring Cranialization of Frontal Sinus.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Eplasty	6. 最初と最後の頁 QA13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀬梢, 森昌也, 茂山千愛美, 飯居宏美, 藤田貢, 中田晋
2. 発表標題 -glutamylcyclotransferase(GGCT) ノックダウンは膠芽腫幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森昌也, 嶋田絢子, 谷口恵香, 茂山千愛美, 藤田貢, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 マウス膠芽腫幹細胞におけるGGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制に対するDesert hedgehogの関与
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本夏菜,山向千晶,松下眞子,橋本彩花,野瀬梢,茂山千愛美,藤田貢,飯居宏美,中田晋
2. 発表標題 sh-p53,EGFRvIII, NRasG12V導入による膠芽腫幹細胞モデルを用いたGGCTおよびヘッジホッグ経路リガンド発現制御機構
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野瀬梢,茂山千愛美,飯居宏美,森昌也,亀井美保,椎達哉,吉田百花,大草由佳子,南京香,安藤翔太,藤田貢,中田晋
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞における -glutamylcyclotransferase(GGCT) ノックダウンによる増殖抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森昌也,吉田百花,茂山千愛美,安藤翔太,藤田貢,飯居宏美,中田晋
2. 発表標題 GCTノックダウンによるマウス膠芽腫幹細胞の増殖抑制に対するDhhの関与
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田武司,吉岡宏真,中尾剛幸,藤田貢,高橋淳
2. 発表標題 転移性脳腫瘍に対する外科的治療の多様性と役割-自験284例より検証-
3. 学会等名 日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤翔太, 小島直人, 茂山千愛美, 藤田貢, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞ではJCI-20679処理によりAMPKの活性化とNFATc2の発現低下が引き起こされる
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂山千愛美, 藤田貢, 安藤翔太, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞におけるStat5bの阻害はCyclin E2とMybの発現抑制を誘導する
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂山千愛美, 藤田貢, 安藤翔太, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 マウス膠芽腫モデルにおけるStat5bを標的とした抗腫瘍メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野瀬梢, 椎達哉, 吉田百花, 大草由佳子, 南京香, 茂山千愛美, 安藤翔太, 藤田貢, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 -Glutamylcyclotransferase(GGCT)の発現抑制は膠芽腫幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤翔太, 小島直人, 茂山千愛美, 藤田貢, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 アセトゲニン誘導体JCI-20679はp-AMPKタンパク質の発現上昇とNFATc2の発現低下を介して膠芽腫幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田武司, 吉岡宏真, 中尾剛幸, 藤田貢, 高橋淳
2. 発表標題 転移性脳腫瘍に対する集学的治療の時代的変遷と治療成績-自験172例の摘出術より検証-
3. 学会等名 日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾剛幸, 吉岡宏真, 奥田武司, 藤田貢, 高橋淳
2. 発表標題 髄膜癌腫症に合併した水頭症に対する髄液シャント術の有用性
3. 学会等名 近畿大学医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂山千愛美, 藤田貢, 安藤翔太, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 Stat5bの阻害はマウスモデル由来膠芽腫幹細胞の腫瘍形成能を抑制する
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤翔太, 小島直人, 茂山千愛美, 藤田貢, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 JCI-20679はAMPKの活性化とNFAT1の減少を介して膠芽腫幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川成佑, 藤田貢, 茂山千愛美, 安藤翔太, 飯居宏美, 武内勇人, 山中巧, 高橋義信, 橋本直哉, 中田晋
2. 発表標題 マウス由来膠芽腫幹細胞におけるHedgehogシグナル転写因子Gli2抑制による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤翔太, 小島直人, 茂山千愛美, 藤田貢, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 アセトゲニン誘導体JCI-20679はAMPKの活性化とNFAT1発現低下を介して膠芽腫幹細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂山千愛美, 藤田貢, 安藤翔太, 飯居宏美, 中田晋
2. 発表標題 マウス膠芽腫モデルにおける生体内でのSTAT5b阻害による抗腫瘍効果
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2021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	山下 公大 (Yamashita Kimihiro) (80535427)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	中田 晋 (Nakata Susumu) (80590695)	京都薬科大学・薬学部・准教授 (34306)	
研究分担者	宮武 伸一 (Miyatake Shin-Ichi) (90209916)	大阪医科薬科大学・医学部・特別職務担当教員(教授) (34401)	

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
---------	---------