

令和元年6月7日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15024

研究課題名(和文)メトホルミンによる抗癌治療時における認識抗原の多様性の解析

研究課題名(英文) Analysis of metformin effect on TCR repertoire diversity in tumor infiltrating cytotoxic T cells

研究代表者

山崎 千尋 (Yamazaki, Chihiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60620995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物モデルにおいて、近年癌治療薬として実用化されたPD-L1/PD-1結合阻害薬と、当研究室で免疫系を介した腫瘍縮小効果を持つことが見出されたメトホルミンとの併用治療が、それぞれの単独治療と比べて相乗効果があることが、予備実験にて見出されていた。これらの治療薬の作用メカニズムについて、細胞障害性T細胞の質的变化を調べるため、腫瘍浸潤T細胞をソーティングにより分取し、T細胞レパトワの同定を試みた。解析の結果、メトホルミン/抗PD-L1抗体併用治療群ではより多くの細胞障害性T細胞クローンの増殖・活性化を促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

患者腫瘍検体を用いた研究で、腫瘍に浸潤している細胞傷害性T細胞は、多くが非常に限定されたクローン由来であるという報告がなされてきた。これはT細胞が非常に限られた抗原エピトープを認識して抗腫瘍免疫応答を行っているということであり、腫瘍がその抗原エピトープを喪失してしまえば、新たな応答が難しくなることを示唆する。先行研究において、メトホルミンと抗PD-L1抗体を併用することで腫瘍縮小効果が相乗的に高まることが認められていたが、本研究において、これらの薬剤を併用することにより、細胞傷害性T細胞のクローン多様性が高まることが示唆され、併用時の抗腫瘍効果の一端を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：From a preliminary experiment, we have revealed a synergistic cytoreductive effect between PD-1/PD-L1 blocking antibodies and metformin, a drug for the treatment of type 2 diabetes. To elucidate the qualitative changes in cytotoxic T lymphocyte (CTL) under the PD-1/PD-L1 blockade-metformin combination therapy, TCR repertoire of the CTL infiltrating tumors was determined after single cell sorting. This research indicated that the combination therapy induces activation and clonal expansion of tumor infiltrating CTL.

研究分野：免疫学

キーワード：TCRレパトワ 癌治療薬 メトホルミン 抗PD-L1抗体 癌抗原

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

人類はこれまで、腫瘍を克服するべく様々な手段を講じてきたが、切除不能なものについては根治の決定打となる治療法が見つけれられずにきた。腫瘍は周囲の組織とはその形態・増殖速度が明らかに異なり、これは遺伝子の変異に由来すると考えられる。遺伝子の変異することはすなわち、免疫応答により非自己として排除されうるということであるが、実際には抗腫瘍免疫応答が十分に働かず癌を発症することが少なからずある。

この原因として近年注目されているのが T 細胞疲弊 (T cell exhaustion) である。腫瘍細胞や抗原提示細胞の膜表面にはしばしば PD-L1/L2 という分子が発現しており、活性化 T 細胞が発現する PD-1 分子と結合することで T 細胞の活性化を抑制、あるいはアポトーシスさせて抗腫瘍免疫応答を不活化するというものである。近年になりこの PD-L1/L2 - PD-1 結合を阻害する抗体 (nivolumab 等) が癌治療薬として実用化され、一部の患者では腫瘍が消失するなど劇的な効果を挙げている。

また、患者腫瘍検体を用いた研究で、腫瘍に浸潤している細胞傷害性 T 細胞の T 細胞受容体遺伝子シーケンスを行ったところ、それらの T 細胞は多くが非常に限定されたクローン由来であるという報告もなされている (Emerson, *et al. J Pathol* 2013.)。これは T 細胞が非常に限られた抗原エピトープを認識して抗腫瘍免疫応答を行っているということであり、腫瘍がその抗原エピトープを喪失してしまえば、新たな応答が難しくなることを示唆する。これを回避するために、健常者の末梢血から、患者の腫瘍の変異抗原を認識する T 細胞を同定し、その TCR 遺伝子を患者の T 細胞に遺伝子導入することで、認識できる抗原の種類を増やす試みも報告されている (Strønen, *et al. Science* 2016.)。

一方で、申請者らは、2 型糖尿病治療薬として用いられているメトホルミンが、細胞傷害性 T 細胞の機能を回復させることで腫瘍の縮小効果を持つことを見出ししてきた。また、近年臨床で使用が開始された癌治療薬である PD-L1/L2 - PD-1 結合阻害薬とメトホルミンの併用で、それぞれの単剤治療よりも高い抗癌効果が得られることを、マウスの系で認めることができた。このことは、メトホルミンは、PD-1 分子を介した抑制シグナルの解除とは別のメカニズムで抗腫瘍免疫応答を活性化していることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究課題では、メトホルミンと抗 PD-1 抗体により多数の細胞傷害性 T 細胞の機能が回復されることにより、認識される変異抗原の種類が多様化し、腫瘍細胞の免疫回避を抑制している可能性について検討することにした。具体的には、以下の通りである。

- (1) 抗腫瘍免疫において、メトホルミンと抗 PD-1 抗体による治療が細胞傷害性 T 細胞クローンの種類を増やしているか否かを検証する。
- (2) 1)において同定された細胞傷害性 T 細胞の TCR を持つ T 細胞を遺伝子導入によって作成し、未治療群と認識するエピトープが異なるか検証する。

3. 研究の方法

(1) C57BL/6 マウスの背部皮内に、同系のメラノーマ由来の細胞である B16-OVA を移植する。移植後 10 日後、腫瘍径にして 7mm 前後になったところで 5 匹ずつ 2 群に分け、未治療群、メトホルミン+抗 PD-1 抗体治療群とした。治療開始後 3 日目にマウスを安楽死させ、腫瘍部分を切除し回収した。腫瘍を半自動組織粉砕機 (メディマシーン) にて破砕し、single cell suspension とする。このサンプルをフローサイトメトリー用抗体にて染色後、SONY SH800 セルソーターにより CD8 陽性 T 細胞 (CD3+CD8+) を 1 細胞ソートする。これらのサンプルから mRNA を回収し、TCR α 、TCR β の遺伝子配列を解析した。

(2) 上記(1)で同定された TCR α/β のペアをレトロウイルスベクターに組み込み、TCR α/β 欠損 CD3+CD8+細胞株に遺伝子導入することで、人工的に T 細胞クローン作成を試みた。

4. 研究成果

(1) 腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞を、各個体から 192 個ずつシングルセルソートすることに成功した。各個体につき、そのうち 96 個ずつを TCR α 、TCR β の遺伝子配列の解析に供した。TCR α/β のペアの両方の CDR3 配列が同じクローンの種類を解析した。結果は Table 1 の通りであった。

CD8 陽性 T 細胞のクローン拡大が認められたのは未治療群で 5 匹中 3 匹、治療群では 5 匹中 4 匹であった。また、増殖が認められたクローンの種類は未治療群で 6 種類、治療群では 13 種類となり、治療群で CD8 陽性 T 細胞クローンの種類が増加している傾向にあった。

(2) 上記(1)で同定された TCR α/β のペアの mRNA をテンプレートとして、それぞれの可変領域を PCR によって増幅した。これとは別に、TCR α 、 β のそれぞれの定常領域も PCR によって増幅し、レトロウイルスベクターに組み込んだ。現在、(1)で同定した未治療群 6 種類、治療群 13 種類のクローンの発現ベクターの作成を完了し、TCR α/β 欠損 CD3+CD8+細胞株に遺伝子導入を試みている。TCR α/β の発現が確認でき次第、まずは、B16-OVA の既知の腫瘍抗原ペプチドである OVA、gp100、p15E を認識するクローンがあるか確認する予定である。

Table 1. TCR beta/alpha CDR3 frequency

| TCRbeta | TCRalpha | count no. |
|-----------------------|---------------------|--------------|
| PD-1 + Met 2-1 | | |
| ASSLGVGTEVF | CAAGANSGGSSNAKLT | 3 |
| ASSRTGQNTLY | CALGHD TNAYKVIF | 2 |
| ASSINWRGDTQY | CAVFGDSGT YQRF | 2 |
| ASSHPGLGVYEQY | CAVKPNSAGNKLT F | 2 |
| ASSLGGVEQY | CAVSIRAPP GGS AKLIF | 2 |
| GARGSSYEQY | CAVHDSGYNKLT F | 2 |
| Unique | | 72 |
| total | | 85 |
| PD-1 + Met 3-1 | | |
| ASSFLDSSQNTLY | CAL TDSNYQLIW | 3 |
| ASSGGSGNTLY | CAALYQGGRALIF | 2 |
| Unique | | 86 |
| total | | 91 |
| PD-1 + Met 4-1 | | |
| ASSLEGGQDTQY | CALSA*#NMGYKLT F | 2 |
| ASGGDRDMNYAEQF | CAMRELNAYKVIF | 2 |
| Unique | | 78 |
| total | | 82 |
| PD-1 + Met 5-1 | | |
| ASSEGGSDTQY | CALSVPTQVVGQLTF | 3 |
| ASSQGARAQF | CALSDGMAS SFSKLI | 2 |
| ASSPDNSGNTLY | CAASGDTGN YKYVF | 2 |
| Unique | | 83 |
| total | | 90 |
| PD-1 + Met 6-1 | | |
| Unique | | 87 |
| total | | 87 |

| TCRbeta | TCRalpha | count no. |
|--------------------|-----------------|--------------|
| Notreat 2-1 | | |
| ASSVDRASQNTLY | CAVDSGYNKLT F | 3 |
| ASSVDRASQNTLY | CAVDSESH EFTF | 2 |
| ASSLGQNSGNTLY | CAAMGSALGRLHF | 2 |
| Unique | | 74 |
| total | | 81 |
| Notreat 3-1 | | |
| ASSDVYEQY | CAVRDQDYSNNRLTL | 2 |
| ASSSGPPNTEVF | CAVYDTNAYKVIF | 2 |
| Unique | | 87 |
| total | | 91 |
| Notreat 4-1 | | |
| Unique | | 76 |
| total | | 76 |
| Notreat 5-1 | | |
| ASSSLGGRGQDTQY | CAVSNYAQLTF | 5 |
| Unique | | 84 |
| total | | 89 |
| Notreat 6-1 | | |
| Unique | | 85 |
| total | | 85 |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/immuno/>

6. 研究組織

該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。