

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16864

研究課題名（和文）メトホルミンと抗PD-1抗体併用療法の発展：多重蛍光組織染色で解く腫瘍微小環境

研究課題名（英文）Advances of metformin and anti-PD-1 therapy: analysis of tumor microenvironment by using multiple fluorescent immunostaining

研究代表者

工藤 生 (Kudo, Ikuru)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：40830378

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）：本研究では、Met+ PD-1併用療法による抗腫瘍効果に着目してきた。腫瘍微小環境ではがん細胞の不均一なGLUT1発現と、腫瘍血管の走行に関連がある様子が見られた。そこでMet+ PD-1による腫瘍血管の正常化の指標として、血管内皮細胞とそれを覆っている血管平滑筋またはペリサイトとの重なる領域（CD31+ SMA+）の増加、蛍光標識された70kDa dextranの腫瘍組織内部の血管からの漏れの減少、2MDa dextranの腫瘍血管内部への蓄積の減少などを観察してきた。その結果、腫瘍血管の正常化は、活性化CD8T細胞によるIFN- γ 依存的事業であることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法では、腫瘍微小環境がどのように形成されているのかと、がん細胞を攻撃するCD8T細胞の働きを明らかにする必要がある。本研究では、がん細胞とCD8T細胞のグルコースの取り合いという観点から、GLUT1の発現を中心に、腫瘍微小環境が治療の前後でどのように変化するかを時空間的に解析した。その結果、メトホルミンと抗PD-1抗体併用療法において、CD8TILががん細胞を攻撃するだけでなく、腫瘍血管の正常化にも寄与していることが明らかになった。このことから、腫瘍微小環境の特徴である低グルコース、低酸素、低pHが、腫瘍血管正常化により一挙に解決できる可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：We have focused on the antitumor effect of metformin and the PD-1 blockade combination therapy (Met + PD-1). Although the effect was believed to be caused by the robust activation/proliferation of tumor-infiltrating CD8T lymphocytes (CD8TILs), there might be additional mechanism(s). In the tumor microenvironment, we found the relationship between heterogeneous GLUT1 expressions in tumor cells and localization of tumor vessels. To reveal the effect of Met + PD-1, we investigated the normalization of tumor vessels. We detected the tumor vessel normalization by the increased pericyte coverage on endothelial cells, decreased 70-kDa dextran leakage and increased VE-cadherin expression. Those were canceled by anti-CD8 Ab (but not anti-CD4 Ab and anti-NK Ab) or anti-IFN γ Ab injection to mice. These data indicate that metformin synergizes with PD-1 inhibition to create a positive feedback loop between CD8TILs and tumor vessels via IFN γ , resulting in durable antitumor immunity.

研究分野：生命科学

キーワード：腫瘍血管正常化 メトホルミンと抗PD-1抗体併用療法 CD8TIL IFN-

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍微小環境はがんを攻撃する CD8T 細胞にとって非常に働きにくい環境となっている。1つ目に低グルコース状態があげられる。がん細胞は増殖スピードが速く、それに必要なエネルギーをまかなうためにグルコーストランスポーター1(GLUT1)を多く発現しており、大量のグルコースを取り込んで消費する(ワールブルグ効果)。一方 CD8T 細胞の成熟、活性化にも解答系が必要である。しかしがん細胞によるグルコースの消費により、T 細胞にはグルコースが行き渡らず、脂肪酸のβ酸化をエネルギー源とするような制御性 T 細胞(Treg)などが優位になるため、CD8T 細胞の働きが抑制される。2つ目に、がん細胞の大量の嫌氣的グルコース代謝の結果出される乳酸が原因となる、低 pH 状態があげられる。3つ目にがん細胞の異常増殖により、血管から離れた位置にいる細胞が低酸素状態となることがあげられる。これら低グルコース、低 pH、低酸素という条件は、互いに連動する負のスパイラルを作り、がん細胞は適応できるが CD8T 細胞はその働きを抑制されてしまう。これをどれだけ改善できるかが、免疫による抗腫瘍効果の鍵となることは間違いない。また、がん細胞が発現する PD-L1 も CD8T 細胞が持つ PD-1 に結合することで、その働きを抑制する。近年、抗 PD-1/PD-L1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法は、がん治療分野における地位を確立してきた。しかし、これらの抗体による治療効果が全くなく免疫療法特有の副作用だけが出てしまう症例や、悪化してしまう症例も存在しており、実際の奏効率は 20%程度となっている。このような現状から、免疫チェックポイント阻害剤のさらなる作用機序の解明や、奏効率を改善するための併用療法の開発が急がれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多重蛍光組織染色法を用いてがん細胞と T 細胞の両側面を同時に多角的に解析することである。GLUT1、Nrf2、mTORC1、CD8、CD4、Foxp3、CD31(血管/内皮細胞マーカー)などの分子、さらにピモニダゾールを用いて低酸素領域を同定することで、治療前後の腫瘍微小環境の変化を調べる。近年の腫瘍免疫学の傾向として、シングルセル多分子解析が盛んになってきている。この解析法でがん細胞と免疫細胞の数と質は分かるが、それらがどこでどのように関わりあっているのかを推察するのは難しい。よってメトホルミンと抗 PD-1 抗体の併用療法のメカニズムの解明の一環として、多重蛍光染色による組織学的知見を積み上げることは非常に重要だと考える。また、我々が見出してきた TIL 内での Nrf2 シグナル伝達も、がん細胞と免疫細胞の攻防バランスに深く関連している。がん細胞の悪性度に関わる Nrf2 のメカニズムの解析は広く行われているが、TIL を含む T 細胞での Nrf2 の解析はほとんど行われていない。本研究ではメトホルミンにより TIL の代謝を解糖系優位にしたときの、Nrf2 を中心としたシグナル伝達経路の解明を進める。

3. 研究の方法

・腫瘍微小環境(低グルコース、低酸素、低 pH)を改善したときの TIL 分布解析と腫瘍血管正常化に与える影響の解析

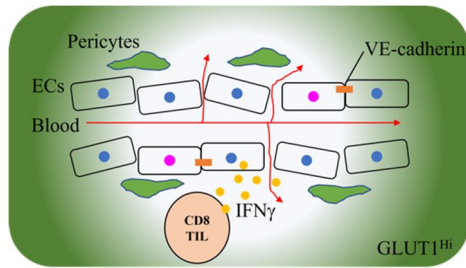
マウスにがん細胞を皮内注射し、7日後からメトホルミン(5 mg/mL)を自由飲水投与する。同時に抗 PD-1 抗体、抗酸化剤 N-アセチルシステイン(NAC)、グルコースなどを投与する。定着した腫瘍をマウスから摘出し、パラフィン包埋切片、凍結組織切片を作り免疫染色を行う。腫瘍微小環境の指標としては以下のものに着目する。

- 低グルコース状態：GLUT-1、2-NBDG(グルコースアナログ)の取り込み
- 低酸素領域：ピモニダゾールの染色像、CD31
- 細胞内 pH：SNARF の染色像
- T 細胞：CD8、CD4、CD3、CD11c、Foxp3、Nrf2、mTORC1、Ki-67、p62
- がん細胞：CD44、PD-L1、Nrf2、mTORC1、Ki-67、p62、Wnt5a、β-catenin
- 腫瘍血管正常化：ペリサイトのカバレッジ、VE-cadherin、70kDa or 2MDa デキストランの血管からの漏出もしくは蓄積

4. 研究成果

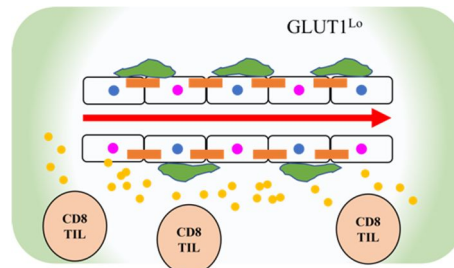
本研究では腫瘍微小環境中での腫瘍血管正常化の観点で、メトホルミン(Met)と抗 PD-1 抗体(PD-1)併用治療の影響を調べた。4T1 乳癌細胞株を BALB/c マウスに皮内注射し、5~6 日後からメトホルミン(5 mg/mL)の自由飲水投与と、抗 PD-1 抗体の腹腔内投与による治療を開始した。治療開始後 3 日目に腫瘍を摘出し、組織ブロックおよび切片を作成し、免疫組織染色法による解析を行った。本研究を通して、Met+ PD-1 併用療法による腫瘍血管の正常化の指標として、血管内皮細胞(CD31+)とそれを覆っている血管平滑筋またはペリサイトのマーカーである-smooth muscle actin (SMA)との重なる領域(CD31+ SMA+)の増加、蛍光標識された 70kDa dextran の腫瘍組織内部の血管からの漏れの減少、2MDa dextran の腫瘍血管内部への

蓄積の減少などを観察してきた。これらの Met+ PD-1 併用療法による腫瘍血管の正常化は、活性化 CD8T 細胞による IFN- γ 依存的であることが見出された。IFN- γ による血管正常化の指標の一つとして、血管内皮細胞における VE-cadherin の発現を調べた。Met+ PD-1 により血管内皮細胞での VE-cadherin の発現が上昇したが、それは治療時に CD8T 細胞の除去を行うことでキャンセルされた。したがって、これまで見出してきた CD8T 細胞および IFN- γ 依存的な血管正常化メカニズムに関する知見をさらに得ることができた。また、血管内皮細胞およびその近傍における p-STAT1 の発現を調べたところ、Met+ PD-1 により上昇することが分かった。このことから、Met+ PD-1 による腫瘍血管正常化には CD8T 細胞から分泌される IFN- γ が重要な働きをしていることが考えられる。



Tumor vessel

Pericyte coverage	↓
VE-cadherin	↓
Leakage	↑
Tumor GLUT1	Hi
pSTAT1	Lo



Normalized vessel

Pericyte coverage	↑
VE-cadherin	↑
Leakage	↓
Tumor GLUT1	Lo
pSTAT1	Hi

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 工藤 生、Zhang Xingda、西田 充香子、鶴殿 平一郎
2. 発表標題 メトホルミンと抗PD-1抗体併用療法が腫瘍血管の正常化に与える影響
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤 生、西田 充香子、鶴殿 平一郎
2. 発表標題 メトホルミンによる糖代謝バランスの改善と腫瘍微小環境の変化に関する組織学的解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤 生、西田 充香子、鶴殿 平一郎
2. 発表標題 メトホルミンによる糖代謝バランスの改善と腫瘍微小環境の変化に関する組織学的解析
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 生、西田 充香子、鶴殿 平一郎
2. 発表標題 メトホルミンによる糖代謝バランスの改善と腫瘍微小環境の変化に関する組織学的解析
3. 学会等名 第32回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2019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
---------	---------