

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15505

研究課題名（和文）IFN による腫瘍微小環境の代謝改変メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism underlying the metabolic reprogramming of tumor microenvironment by IFN γ

研究代表者

西田 充香子（Nishida, Mikako）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：60844644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：我々はメトホルミンと抗PD-1抗体の併用治療によって腫瘍浸潤CD8 T細胞の代謝は上昇し、腫瘍細胞の代謝は低下するという現象を見出した。この腫瘍微小環境の代謝改変に抗腫瘍免疫応答に重要なサイトカインであるIFN γ が関与をしていると考えた。事実、腫瘍細胞にIFN γ を処置すると代謝関連分子の発現が大幅に低下した。さらに代謝制御に関与している分子も特定し、腫瘍細胞とCD8細胞では逆方向性の機能を示すことも分かった。さらにその分子を欠損させた腫瘍細胞では代謝低下だけでなく、従来のIFN γ の機能や免疫治療効果が消失することが判明し、抗腫瘍効果を制御する重要な分子であることが本研究によって明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、免疫治療を阻む要因として腫瘍微小環境における腫瘍細胞と免疫細胞（主にCD8T細胞）の代謝競合を是正することが重要とされている。そのためには腫瘍細胞の代謝を低下させ、その一方でCD8T細胞の代謝を上昇させる必要がある。それを同時に実現できる代謝介入によるがん治療法は未だ確立されていないが、本研究を通して腫瘍細胞とCD8T細胞を腫瘍退縮へ優位な方向へ代謝や機能を同時に制御する分子の同定ならびにその制御機構の一端を解明できたことは、今後の免疫療法の発展のために重要な基礎的知見を提供することに繋がり、社会的な貢献は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that combined treatment with metformin and anti-PD-1 antibodies increased the metabolism of tumor-infiltrating CD8 T cells and decreased the metabolism of tumor cells. We hypothesized that IFN γ , an important cytokine for antitumor immune responses, is involved in this metabolic modification of the tumor microenvironment. In fact, treatment of tumor cells with IFN γ significantly reduced the expression of metabolic-related molecules. We also identified molecules involved in metabolic regulation, and found that tumor cells and CD8 T cells exhibit opposite functions. Furthermore, it was found that tumor cells lacking this molecule not only have a decreased metabolism, but also lose the conventional IFN γ function and immunotherapeutic effect, and this study reveals that it is an important molecule that controls antitumor effects.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍微小環境 代謝 IFN γ 腫瘍浸潤CD8T細胞 腫瘍免疫 メトホルミン

1. 研究開始当初の背景

これまでの癌治療は、腫瘍に直接、作用して細胞増殖抑制もしくは細胞死を誘導する治療や、免疫療法のように免疫細胞とりわけ CD8 T 細胞を活性化して腫瘍を殺傷し、腫瘍退縮の方向へと誘導してきた。そのような中、近年、腫瘍微小環境に存在する免疫細胞と腫瘍細胞の代謝状況が腫瘍の運命を決めるという概念が浸透してきている。これは低栄養といった過酷な腫瘍微小環境下で生存するためにはエネルギーを得ることが肝要であり、エネルギーレベルの高い細胞が腫瘍微小環境下で生き抜くことができる。言い換えれば、腫瘍細胞の代謝を低下させ、その一方でエフェクター T 細胞の代謝を上昇させることが腫瘍退縮には重要である。これまでに我々は 2 型糖尿病治療薬であるメトホルミンを用いた免疫治療(抗 PD-1 抗体併用)によって腫瘍浸潤 CD8 T 細胞(CD8 TILs) の代謝は上昇し、腫瘍細胞の代謝は低下するという現象を見出した。治療によって CD8 TILs の IFN γ 産生が有意に増加しており、代謝変化を誘導している因子は活性化された CD8 TILs から分泌される IFN γ ではないかと考えた。IFN γ は腫瘍免疫においては腫瘍細胞の細胞周期を抑制し、また、MHC class 分子の発現を増加させ、抗腫瘍効果の発揮に重要な役割を担っているサイトカインであるが、腫瘍免疫において IFN γ と代謝を関連付ける報告が少なかったことから、IFN γ が腫瘍微小環境に存在する細胞群の代謝にどのような影響を与えているのか、また、その分子機構は如何なるものかという点に着目し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

我々はメトホルミンと抗 PD-1 抗体の併用治療によって CD8 TILs の解糖系は上昇するが、その一方で腫瘍細胞の解糖系は低下するという現象を見出したが、2019 年に Leone ら (Science, 66(6468):1013-1021) のグループがグルタミン代謝阻害剤である 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン(DON)を処置によっても類似の現象が起こることを報告している。そのメカニズムは腫瘍細胞では DON 処置によって酸化的リン酸化(OXPHOS) が抑制され、細胞内の ATP 量が低下し、エネルギーセンサーである AMPK が活性化し、その結果、解糖系も低下し、増殖が抑制される。その一方で CD8 TILs においては DON による OXPHOS 抑制の影響から回避するため、ピルビン酸や酢酸から TCA 回路の中間代謝産物を合成する酵素の発現が増加し、OXPHOS 上昇による ATP 産生を促進し、腫瘍細胞とは逆に AMPK 活性を低下させ、解糖系を活性化して細胞の機能・増殖を維持する。このように CD8 TILs はエネルギー枯渇ストレス下において代謝関連酵素の発現を促し、反発力(レジリエンス)を発揮することがわかる。メトホルミンによる CD8 TILs そして腫瘍細胞の代謝変化にもこれらの分子機構が働いている可能性も考えられた。しかし、これまでの予備検討から免疫不全マウスではメトホルミンと抗 PD-1 抗体の併用治療によって認められていた免疫細胞と腫瘍細胞の代謝変化が完全に消失したことから、メトホルミンによる免疫治療における CD8 TILs と腫瘍細胞の逆方向性の代謝制御に IFN γ の関与も必須であると考えた。その点において本研究は Leone らのグループとは違った CD8 TILs ならびに腫瘍細胞の代謝改変メカニズムを解明できる可能性があり、さらに、本研究で得られた成果は代謝介入による癌治療法の確立のために重要になると考えられたため、IFN γ を中心とした新たな腫瘍微小環境の代謝制御機構の解明を目的として本研究を遂行した。

3. 研究の方法

IFN γ がどのような分子機構で CD8 TILs と腫瘍細胞の代謝を逆方向性に制御するのか解明するために、大凡次のように研究を進めた。

IFN γ 中和抗体処置時の CD8 TILs 並びに腫瘍細胞の代謝・機能解析

MO5 細胞をマウスに移植し、メトホルミンによる免疫治療(抗 PD-1 抗体併用)を行い、さらに治療時に IFN γ 中和抗体を同時処置し、その際の CD8 TILs 並びに腫瘍細胞のグルコーストランスポーター(Glut-1)発現、グルコースアナログ(2-NBDG)の取り込み、ミトコンドリア関連分子(PGC1)発現を FACS にて解析した。また、腫瘍局所のグルコース濃度も定量し、IFN γ が腫瘍微小環境に存在する細胞群の代謝に与える影響を評価した。

B16-fucci δ IC 細胞におけるメトホルミンによる免疫治療効果の検討と CD8 TILs 並びに腫瘍細胞の代謝・機能解析

B16-fucci(WT 腫瘍)、B16-fucci δ IC (IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍)細胞をマウスに移植し、メトホルミンによる免疫治療(抗 PD-1 抗体併用)を行い、まず、腫瘍増殖を検討した。その際の CD8 TILs 並びに腫瘍細胞の Glut-1 発現、グルコースアナログ(GLUP-G)の取り込み、ミトコンドリア関連分子(PGC1)発現、CD8 TILs の増殖・機能を FACS にて解析を行った。さらに腫瘍塊を用いてシングルセル解析ならびにメタボライト解析も行い、遺伝子発現や腫瘍局

所の代謝産物の変動も比較した。さらに WT 腫瘍、IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍に IFN γ を *in vitro* 処理し、その際の代謝変化をシーホースアナライザーにて評価した。さらに解糖系・OXPHOS・エピジェネティクス制御関連分子の遺伝子ならびにタンパク発現変動を qPCR とウエスタンブロッティング法によって確認を行った。また、腫瘍細胞との比較のため、マウス脾臓から CD8 T 細胞を精製し、抗 CD3 抗体・抗 CD28 抗体で刺激した。この活性化 CD8 T 細胞に IFN γ を *in vitro* 処置し、腫瘍細胞と同様の検討を行った。

CD8 TILs 並びに腫瘍細胞の代謝を同時制御する分子の同定とその関与の検討

の検討より IFN γ による腫瘍細胞の代謝制御を担っている可能性のある分子 A を同定し、siRNA、shRNA を作成した。そして、分子 A のノックダウン腫瘍細胞(KD 細胞)を樹立し、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系によって IFN γ による腫瘍細胞の代謝ならびに機能、腫瘍増殖を検討した。また、CD8 TILs における分子 A の発現ならびに活性化 CD8 T 細胞を *in vitro* で培養し、IFN γ を経時的に処置し、その際の分子 A の発現・代謝変動も併せて検討した。

4. 研究成果

メトホルミンによる免疫治療(抗 PD-1 抗体併用)によって CD8 TILs の代謝は上昇し、腫瘍細胞の代謝が低下するという現象に活性化された CD8 TILs から分泌される IFN γ が関与しているのかどうかを確定するため、メトホルミンによる免疫治療時に IFN γ 中和抗体処置し、IFN γ を生体内から除去したところ、治療時に見られていた腫瘍細胞の Glut-1 発現ならびに 2-NBDG の取り込み低下、CD8 TILs における Glut-1 発現ならびに 2-NBDG の取り込み上昇の現象は消失した。また、メトホルミンによる免疫治療によって腫瘍局所のグルコース濃度は増加するが、この現象も IFN γ 中和抗体を処置すると消失した。この結果は通常、IFN γ は腫瘍細胞の解糖系を抑制することでグルコースの消費を抑え、腫瘍局所のグルコース濃度を上昇させ、その一方で CD8 TILs の解糖系は上昇させ、CD8 TILs がグルコースを利用しやすい状況へと導いていることを示唆する結果であった。また、ミトコンドリア関連分子(PGC1 α)発現も治療によって腫瘍細胞で有意に低下したが、その現象も IFN γ 中和抗体処置によって消失した。この現象の裏付けとしてメトホルミンによる免疫治療によって CD8 TILs ならびに腫瘍細胞には IFN γ シグナルが強く誘導されており(図 1・図 2)、その時にミトコンドリア代謝関連遺伝子の発現が腫瘍細胞においてのみ有意に低下していることも、RNA シークエンスの結果から得られている(図 3)。これは腫瘍細胞の IFN γ シグナルの活性化が腫瘍細胞の代謝低下に寄与していることを示唆している。

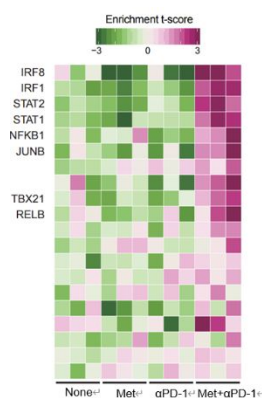


図 1: CD8TILs における遺伝子発現

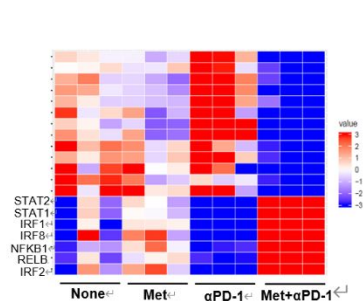


図 2: 腫瘍細胞における遺伝子発現

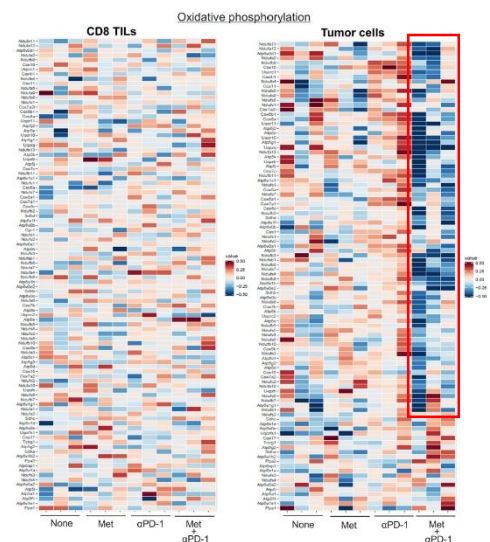


図 3: ミトコンドリア関連分子の遺伝子発現

そこで、B16-fucci (WT 腫瘍)並びに B16-fucci δ IC (IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍)細胞を用いて、IFN γ を *in vitro* 処置した際の代謝能をシーホースアナライザーで評価したところ、WT 腫瘍では IFN γ 処置によって解糖能並びにミトコンドリア代謝が低下するのに対し、IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍では IFN γ による代謝低下は認められなかった(図 4)。

さらに *in vivo* 実験系において WT 腫瘍と IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍をマウスに移植し、メトホルミンによる免疫治療を行ったところ、IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍では治療効果が消失した。さらに IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍から回収した CD8 TILs の Glut-1 発現、IFN γ 産生能、増殖は治療を行ってもその発現は有意に低下していた(図 5)。

また、腫瘍細胞自身においては CD8 TILs とは逆の反応を示し、IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍の Glut-1 発現は上昇すなわち解糖能は常に高く、治療抵抗性になっていた。このことからメトホルミンによる免疫治療効果に IFN γ による代謝制御ならびに腫瘍細胞の IFN γ R1 シグナルが関わっていることが *in vivo* で証明された。

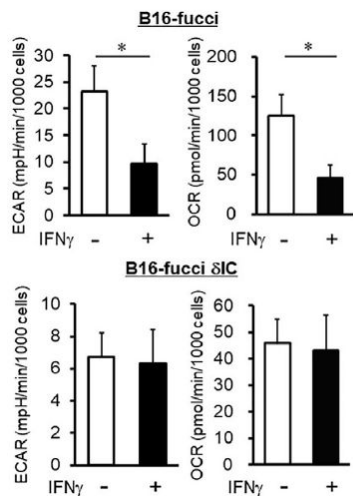


図 4: IFN 処置時の ECAR と OCR

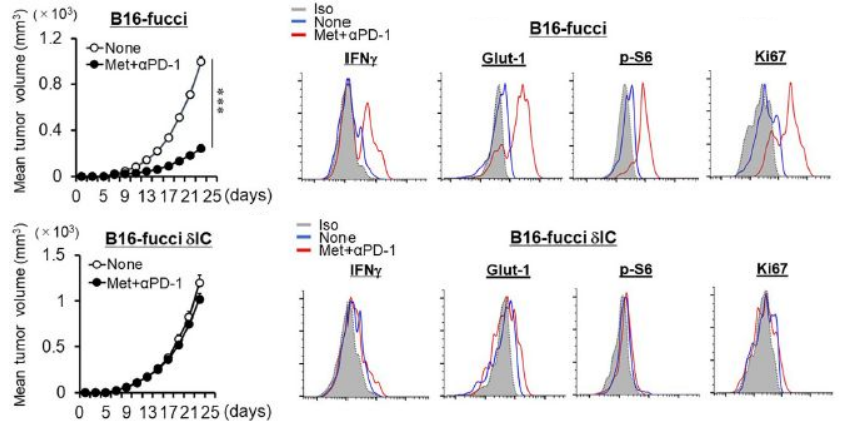


図 5: WT 腫瘍と IFN R1 シグナル欠損腫瘍の腫瘍増殖と CD8 TILs 解析

また、*in vitro* において IFN γ 処置時の代謝関連分子のタンパク発現をウエスタンブロッティングで確認したところ、WT 腫瘍と IFN γ R1 シグナル欠損腫瘍では解糖系ならびにミトコンドリア機能に関わる分子のタンパク発現パターンに大きな違いがあることも明らかとなってきた。さらに *in vitro* で見られた現象は *in vivo* におけるシングルセル解析ならびにメタボライト解析からも同様の知見が得られた。それらのすべての結果から IFN γ による腫瘍細胞の代謝制御に関与している可能性のある候補分子をいくつかリストアップした。さらにそこから腫瘍細胞における IFN γ の機能を制御している重要な分子 A を特定した。特定した分子 A の siRNA ならびに sh RNA を用いてノックダウン腫瘍細胞(KD 細胞)を樹立し、*in vitro* ならびに *in vivo* 実験系によって IFN γ による腫瘍細胞の代謝並びに機能を確認したところ、興味深いことに IFN γ による代謝低下だけでなく、IFN γ によって引き起こされる事象(細胞死誘導など)も消失したことから、分子 A は代謝だけでなく IFN γ の機能全般を制御する重要な因子であることが新たに分かってきた。また、分子 A の CD8⁺ T 細胞における役割についても検討を行ったところ、分子 A は腫瘍細胞では IFN γ によってその発現が上昇するが、活性化 CD8⁺ T 細胞では IFN γ によって発現が低下傾向にあった。また、活性化 CD8⁺ T 細胞では分子 A は腫瘍細胞とは逆方向性に代謝や機能を制御することが判明した。この CD8⁺ T 細胞における分子 A による逆方向性の制御に抗原刺激に関わる分子が関与していることも分かってきており、より詳細な制御機構は今後も引き続き、検討を続ける予定である。

本研究を通して腫瘍細胞と CD8⁺ T 細胞を腫瘍退縮に導く方向へ代謝や機能を制御する共通分子の同定ならびにその制御メカニズムの一端を解明できた。さらに腫瘍微小環境の代謝改変に IFN γ が必要であるという腫瘍免疫に於いて新たな IFN γ の役割についても証明することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tokumasu M, Nishida M, Kawaguchi T, Kudo I, Kotani T, Takeda K, Yoshida T, Uono H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Blocking EP4 downregulates tumor metabolism and synergizes with anti-PD-1 therapy to activate natural killer cells in a lung adenocarcinoma model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 293-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxac004.	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 Uono H, Nishida M.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Metformin-ROS-Nrf2 connection in the host defense mechanism against oxidative stress, apoptosis, cancers, and ageing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 130171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2022.130171.	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 Chao R, Nishida M, Yamashita N, Tokumasu M, Zhao W, Kudo I, Uono H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Nutrient Condition in the Microenvironment Determines Essential Metabolisms of CD8+ T Cells for Enhanced IFN Production by Metformin.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 864225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.864225.	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 Nishida M, Yamashita N, Ogawa T, Koseki K, Warabi E, Ohe T, Komatsu M, Matsushita H, Kakimi K, Kawakami E, Shiroguchi K, Uono H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Mitochondrial reactive oxygen species trigger metformin-dependent antitumor immunity via activation of Nrf2/mTORC1/p62 axis in tumor-infiltrating CD8T lymphocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for immunotherapy of cancer	6. 最初と最後の頁 e002954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2021-002954.	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 Udono H , Nishida M	4. 巻 34
2. 論文標題 Pharmacological effects on anaplerotic pathways alters the metabolic landscape in the tumor microenvironment, causing unpredictable, sustained antitumor immunity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 133-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab067.	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 鶴殿 平一郎, 工藤 生, 西田 充香子
2. 発表標題 IFN を介したCD8TILと腫瘍血管のクロストーク促進、及び腫瘍微小環境の代謝改変
3. 学会等名 第27回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田充香子
2. 発表標題 腫瘍微小環境の代謝改変と抗腫瘍免疫応答の向上メカニズム
3. 学会等名 第26回 日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田充香子, 鶴殿平一郎
2. 発表標題 代謝介入による抗腫瘍免疫応答の向上
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田充香子
2. 発表標題 メトホルミン治療研究から読み解く腫瘍微小環境の代謝改変メカニズム
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 西田充香子, 鶴殿平一郎
2. 発表標題 メトホルミンは ROS 依存的にNrf2/mTORC1 経路を活性化し CD8TILs を賦活する
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田充香子, 山下奈穂子, 鶴殿平一郎
2. 発表標題 メトホルミンによる活性酸素依存的Nrf2/mTORC1/p62 経路を介した抗腫瘍効果メカニズム
3. 学会等名 第15回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計8件

1. 著者名 西田 充香子, 鶴殿 平一郎	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本医学出版	5. 総ページ数 3
3. 書名 先進医療NAVIGATOR がん免疫療法最前線	

1. 著者名 西田充香子, CHAO Ryoyu, 鶴殿平一郎	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 月刊臨床免疫・アレルギー科 特集 I. Immunometabolismで読み解く免疫現象 特集 II. マイクロバイオームの異常と疾患	

1. 著者名 鶴殿平一郎, CHAO Ruoyu, 徳増美穂, 西田充香子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2
3. 書名 生体の科学 増大特集 代謝	

1. 著者名 西田充香子, 鶴殿平一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 週刊 医学のあゆみ【腫瘍免疫 免疫ネットワークから考える基礎と臨床】	

1. 著者名 西田充香子, 鶴殿平一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 炎症と免疫 特集: 1. Basic Science T細胞の疲弊、老化と寿命 2. Clinical Science 膠原病・自己免疫疾患と神経障害	

1. 著者名 西田充香子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 岡山医学会	5. 総ページ数 3
3. 書名 岡山医学会雑誌	

1. 著者名 鶴殿平一郎、西田充香子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 7
3. 書名 腫瘍内科 特集 がん免疫療法研究の進歩	

1. 著者名 西田充香子、鶴殿平一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 週刊 医学のあゆみ 腫瘍免疫 免疫ネットワークから考える基礎と臨床	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 プレスリリース https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id877.html?msclkid=91e13b59c52e11eca3f224dd62014330</p>
--

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