

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290056

研究課題名(和文)メトホルミンによる免疫疲弊解除研究

研究課題名(英文)Reversion of the exhausted immunity by metformin

研究代表者

鶴殿 平一郎(Udono, Heiichiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：50260659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病薬メトホルミンの服用により、発癌率・癌死亡率が低下するという報告があるが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、メトホルミンの抗腫瘍効果が免疫、特にCD8T細胞(キラーT細胞)を介して行われることを明らかにした。通常、腫瘍内のキラーT細胞は疲弊し、その機能は消失している。メトホルミンはキラーT細胞の代謝、特に解糖系を高めて癌細胞を殺傷する機能を復活させることにより抗癌作用を付与していた。

研究成果の概要(英文)：Long term uptake of anti-diabetes drug, metformin, has been shown to reduce cancer incidence and mortality. However, the underlying mechanism of this effect is not yet understood. Immune system against cancers, particularly, CD8T cells (killer cells) undergoes exhaustion in tumors, which allows for tumor growth. We found that metformin reactivates exhausted CD8T cells in tumors to fight against cancer cells through elevation of their glycolysis, leading to the retardation of tumor growth.

研究分野：免疫学、腫瘍免疫学

キーワード：免疫疲弊 CD8 T細胞 アポトーシス メトホルミン 解糖系 酸化リン酸化

1. 研究開始当初の背景

癌細胞はそのエネルギー代謝において解糖系を主に使用しており、酸素が存在しても TCA サイクルの方へはシフトしない (Warburg effect)。即ち ATP 産生の効率は低い。2 型糖尿病治療薬メトホルミンは AMP/ATP 比の上昇を感知し、脂肪酸酸化により、TCA サイクルを回して無理矢理 ATP 産生方向へ舵をきると考えられる。このエネルギー代謝のパニックを誘導した際に癌増殖に影響を与えるのではないかと当初考えて担癌マウスにメトホルミンの経口投与を行った。驚いたことに、マウス固形腫瘍 RLmale1(放射線白血病)、melanoma(悪性黒色腫)、Renca(腎がん)、3LL(肺がん)、Colon26(大腸がん)、4T1(乳がん)において一旦生着した腫瘍の完全拒絶ないし増殖遅延を観察した。RLmale1 の WT マウスによる腫瘍拒絶は SCID マウスでは完全にキャンセルされた。さらに同系マウスによる RLmale1 拒絶は抗 CD8 抗体によりキャンセルされることから、腫瘍拒絶は従来の獲得免疫依存性の免疫応答である。メトホルミンは、がん幹細胞を傷害するというレポートが散見されるが、我々の知見はこれとは別に何らかの免疫活性化が腫瘍局所で起こっていることを示唆している。メトホルミンを正常マウスに投与しても脾臓、リンパ節の CD8 T 細胞が非特異的に活性化されることはない。従って、腫瘍局所に限局した現象であると考え TIL の解析を行ったところ、CD8 T 細胞のアポトーシス抑制と多機能性の回復を認めた。興味深いことに、多機能性を回復した TIL は Tim-3 陽性である。即ち、腫瘍環境に必然的に起こる T 細胞疲弊がメトホルミンにより回避ないし克服されていることが証明された。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント分子と呼ばれる免疫を負に制御する分子シグナルを如何に回避・克服するかという問題は「がんの免疫治療」において極めて重要な課題である。我々は 2 型糖尿病治療薬メトホルミンの経口投与が腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の CD8 T 細胞の免疫疲弊 (immune-exhaustion) を解除することを見いだした。CD8 TIL は通常、IL-2、TNF、IFN の同時産生能(多機能性)を消失しており、さらに多くは Annexin V 陽性となりアポトーシスに陥っている。メトホルミンによりアポトーシス陽性率は激減、多機能性は回復し、腫瘍増殖は一転退縮へと向かう。こ

のマウスモデルを用い、免疫疲弊とその解除に係る細胞内外の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

1) メトホルミンによる CD8TIL 内のシグナル変動の解析

遺伝子発現: メトホルミン服用の有無により CD8TIL の遺伝子発現の違いを検討する。CD8TIL をソニー・ソーターで 100 個/well で 8 well ほど回収し、RNA-seq. 可能かどうかを 3 well で確かめて、遺伝子発現を解析する。メタボローム解析: CD8TIL からのメタボローム解析は細胞数が限られているため、不可能である。そこで、脾臓から回収したナイーブ CD8T 細胞をメトホルミンで短時間培養し、その後のメタボライトの変動を解析する。

2) メトホルミンによる Treg 抑制

Treg の細胞表面マーカーの変化と機能の直接的な評価に基づいて行う。Treg 機能が抑制される場合、細胞表面分子の発現レベルの変動が見られる場合がある。Foxp3 の発現誘導と mTOR へのメトホルミン効果を検討する。

3) メトホルミンによる MDSC 抑制

1) と同様に担癌マウス腫瘍から TIL を回収し、CD11b、Ly6C、Ly6G の表面マーカー解析を行い、腫瘍局所における MDSC の数が減るのか変わらないのかを検討する。この場合、CD45.2 陽性細胞に占めるこれらの細胞集団の割合として解析する。さらに MDSC のアルギナーゼや NOS の量を FACS にて定量し、メトホルミン服用との関係を探る。

4) メトホルミンによる腸内フローラの変動

メトホルミンによる腸内フローラの変化が腫瘍局所の免疫状態、或は腫瘍微小環境に影響を与えている可能性がある。解析は慶應大学の長谷耕二教授との共同研究でメタゲノム解析を行い腸内細菌の変化を解析する。

4. 研究成果

CD8TIL の遺伝子発現解析は非常に苦労したが、ほぼ完了した。抗 PD-1 抗体とメトホルミンを併用した際に、サイトカイン産生に関連する転写因子の明らかな変動(上昇)が認められた。また、メタボローム解析ではメトホルミン処理の後に TCR 刺激を行った場合、有意に解糖系代謝産物が増加していること

が明らかになった。さらに細胞外フラックスアナライザーによる解析で、解糖系の上昇が確認された。また、メトホルミンは4種類の腫瘍モデル系で腫瘍内Tregの数を減少させた。アネキシンV陽性細胞のTregが増加していた。これはmTORC1活性化によるFoxp3の発現低下がその原因であることを特定した。MDSCについては、マウス骨肉腫モデルを用いて解析した。メトホルミン投与により、腫瘍内だけではなく脾臓内でもその数が激減することがわかった。特にG-MDSCの減少が著しかった。また、腸内フローラについては特段の変化は観察されず、メトホルミンの免疫細胞に対する代謝改変に基づく直接効果の方が大きいと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

(1) Hong F, Mohammad Rachidi S, Lundgren D, Han D, Huang X, Zhao H, Kimura Y, Hirano H, Ohara O, Udono H, Meng S, Liu B, Li Z. Mapping the Interactome of a Major Mammalian Endoplasmic Reticulum Heat Shock Protein 90. PLoS One., 査読有, 12(1), 2017, e0169260.

doi: 10.1371/journal.pone.0169260

(2) Watanabe M, Yamamoto H, Eikawa S, Shien K, Shien T, Soh J, Hotta K, Wada J, Hinotsu S, Fujiwara T, Kiura K, Doihara H, Miyoshi S, Udono H, Toyooka S. Study about the Efficacy of Metformin to Immune Function in Cancer Patients. Acta Med Okayama., 査読有, 70(4), 2016, 327-30.

http://www.lib.okayama-u.ac.jp/www/acta/pdf/70_4_327.pdf

(3) Ariyoshi Y, Watanabe M, Eikawa S, Yamazaki C, Sadahira T, Hirata T, Araki M, Ebara S, Nasu Y, Udono H, Kumon H. The induction of antigen-specific CTL by in situ Ad-REIC gene therapy. Gene Ther., 査読有, 23(5), 2016, 408-14.

doi: 10.1038/gt.2016.7.

(4) Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T, Doi T, Suzuki S, Isobe M, Funakoshi T, Kakimi K, Nishikawa H, Udono H, Oka M, Ueda R,

Nakayama E. Phase Ia Study of FoxP3+ CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. Clin Cancer Res., 査読有, 21(19), 2015, 4327-36.

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0357.

(5) Miyai M, Eikawa S, Hosoi A, Iino T, Matsushita H, Isobe M, Uenaka A, Udono H, Nakajima J, Nakayama E, Kakimi K. Detection and Tracking of NY-ESO-1-Specific CD8+ T Cells by High-Throughput T Cell Receptor (TCRB) Gene Rearrangements Sequencing in a Peptide-Vaccinated Patient. PLoS One., 査読有, 10(8), 2015, e0136086.

doi: 10.1371/journal.pone.0136086.

eCollection 2015.

(6) Uehara T, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Ozaki T, Udono H. Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas. BioMed Research International, 査読有, 2015, Article ID 820813.

doi: 10.1155/2015/820813.

(7) Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E and Udono H. Immune-mediated anti-tumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, 112(6), 2015, 1809-14.

doi: 10.1073/pnas.1417636112.

(8) Ichianagi T, Ichianagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Udono H. HSP90 plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. Nucleic Acids Res., 査読有, 42(19), 2014, 11903-11.

doi: 10.1093/nar/gku881.

(9) Eikawa S, Mizukami S, Udono H. Monitoring multifunctionality of immune-exhausted CD8 T cells in cancer bearing patients. Methods in Mol Biol., 査読有, 1142, 2014, 11-7.

doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4_2.

(10) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Udono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Doki Y, Oka M, Nakayama E.

Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing NY-ESO-1 antigen. *Journal of Immunotherapy*, 査読有, 37(2), 2014, 84-92.
doi: 10.1097/CJI.000000000000017.

[学会発表](計41件)

鵜殿 平一郎: CD8T 細胞代謝制御によるがん免疫療法(口頭) 第16回日本再生医療学会総会、2017年3月9日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

鵜殿 平一郎: 代謝改善によるがん微小環境の改変と抗腫瘍免疫応答のレポート(口頭) 第36回岡山免疫懇話会、2017年3月8日、岡山大学歯学部(岡山県岡山市)

鵜殿 平一郎: 代謝とがん免疫(口頭) 第16回岡山医療フォーラム-がんと免疫-, 2017年3月5日、岡山国際交流センター(岡山県岡山市)

鵜殿 平一郎: 腫瘍微小環境の代謝とがん免疫(口頭) 第2回腫瘍免疫研究会、2017年2月24日、九州医療センター(福岡県福岡市)

鵜殿 平一郎: 2型糖尿病治療薬メトホルミンによる腫瘍微小環境の代謝改変とがん免疫治療への応用(口頭) 第70回糖尿病臨床・研究開発センター講演会、2017年1月10日、徳島大学藤井節郎記念医学センター(徳島県鳴門市)

Eikawa S(他12名): Metformin enhances aerobic glycolysis and amino acids metabolism in CD8+ T cells(口頭) 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

UDONO H, NISHIDA M, EIKAWA S: Metformin-induced, metabolic reprogramming of CD8+ TIL requires reactive oxygen species (ROS)(口頭) 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月7日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

鵜殿 平一郎: 代謝改善によるがん微小環境の改変と抗腫瘍免疫応答のレポート(口頭) 第29回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2016年12月2日、久留米シティプラザ(福岡県久留米市)
榮川 伸吾(他10名): 2型糖尿病薬メト

ホルミンは CD8T 細胞のアミノ酸代謝および好氣的解糖を促進し抗腫瘍作用を示す(口頭) 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

榮川 伸吾(他11名): 2型糖尿病薬メトホルミンは CD8T 細胞のアミノ酸代謝および好氣的解糖を促進し抗腫瘍作用を示す(口頭) 第20回日本がん免疫学会総会、2016年7月28日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

鵜殿 平一郎: 免疫疲弊と腫瘍微小環境の改変(口頭) 第12回北海道癌免疫制御研究会、2016年7月9日、メルキュールホテル札幌(北海道札幌市)

鵜殿 平一郎: Metabolic reprogramming shapes tumor microenvironment to generate sustained anti-tumor immunity(口頭) 千葉大学リーディング大学院セミナー、2016年7月1日、千葉大学医学部(千葉県千葉市)

榮川 伸吾(他8名): T細胞代謝制御によるがん免疫療法(口頭) 第68回日本細胞生物学会・第11回日本ケミカルバイオロジー学会 合同大会、2016年6月17日、京都テルサ(京都府京都市)

鵜殿 平一郎: 魔法の弾丸メトホルミンで健康長寿を目指す(口頭) 岡山健康講座 2016 - やさしい保険と健康の話 -, 2016年4月19日、奉還町りづらホール(岡山県岡山市)

鵜殿 平一郎: 2型糖尿病治療薬メトホルミンの腫瘍微小環境に与える影響(口頭) 北海道大博大学院セミナー、2016年3月15日、北海道大学遺伝子病研究所(北海道札幌市)

鵜殿 平一郎: 2型糖尿病治療薬メトホルミンの腫瘍微小環境に与える影響(口頭) がん免疫療法最前線 日本が発するヒトがん免疫制御の新世界基準、2016年3月14日、Sola City Conference Center 東京(東京都千代田区)

鵜殿 平一郎: がん免疫研究の最前線 免疫疲弊解除研究(口頭) 山田養蜂場みつばち研究助成金 第7回成果発表会 2016年3月4日、山田養蜂場 第一工場 八二カムホール(岡山県津山市)

鵜殿 平一郎: 2型糖尿病治療薬メトホルミンの腫瘍微小環境に与える影響(口頭) 長崎大学大学院セミナー、2016年2月25日、長崎大学ボンペ会館(長崎県長崎市)

- Eikawa S (他 11 名): Metformin administration stimulates glycolysis of effector memory CD8TIL in tumor microenvironment (ポスター) Immunometabolism in Immune Function and Inflammatory Disease, 2016 年 2 月 21 日, Fairmont Banff Springs(バンフ・カナダ)
- 鵜殿 平一郎: 変貌するがん免疫治療(口頭) 熊本呼吸器フォーラム分科会, 2016 年 2 月 18 日, ホテルニューオータニ熊本(熊本県熊本市)
- ⑳ 鵜殿 平一郎: Metformin-induced reversion of exhausted CD8T cells in tumor microenvironment (口頭) Nagoya International Cancer Treatment Symposium, 2016 年 2 月 13 日, Aichi Cancer Center (愛知県名古屋市)
- ㉑ 鵜殿 平一郎: 腫瘍局所浸潤 CD8T 細胞の免疫疲弊解除と解糖系(口頭) メトホルミンセミナー, 2016 年 1 月 25 日, 金沢大学付属病院(石川県金沢市)
- ㉒ 鵜殿 平一郎: メトホルミンによる腫瘍浸潤 T 細胞の疲弊解除(口頭) 第 5 回 Metabolic Scientific Forum, 2015 年 12 月 19 日, ステーションコンファレンス東京(東京都千代田区)
- ㉓ 鵜殿 平一郎: Anti-cancer immunity elicited by type 2 diabetes drug metformin, is mediated by reversion of exhausted CD8T cells within tumor tissues. (口頭) The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015 年 12 月 11 日, Okayama Convention Center (岡山県岡山市)
- ㉔ 鵜殿 平一郎: メトホルミンは腫瘍局所浸潤 CD8T 細胞の解糖を促進する(口頭) 第 88 回日本生化学会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ㉕ 鵜殿 平一郎: メトホルミン誘導性の免疫疲弊解除によるがん免疫治療(口頭) Bio Japan 2015, 2015 年 10 月 15 日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ㉖ 榮川 伸吾(他 11 名): メトホルミンは腫瘍環境下において CD8 陽性エフェクターメモリー細胞の解糖系を亢進する(口頭) 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
- ㉗ Eikawa S (他 11 名): Metformin administration stimulates glycolysis of effector memory CD8TIL in tumor microenvironment (口頭) がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015, 2015 年 7 月 9 日, 東京大学 伊藤国際学センター内 伊藤謝恩ホール(東京都文京区)
- ㉘ 鵜殿 平一郎: 変貌するがん免疫治療 - がんは免疫の力で治せるのか?-(口頭) 第 34 回鹿児島呼吸器内科セミナー, 2015 年 6 月 23 日, 鹿児島大学共通教育棟(鹿児島県鹿児島市)
- ㉙ 鵜殿 平一郎: 2 型糖尿病治療薬メトホルミンによる免疫疲弊解除(口頭) 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2015 年 6 月 12 日, かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)
- ㉚ 鵜殿 平一郎: 腫瘍局所免疫疲弊解除によるがん免疫治療(口頭) 第 14 回国際バイオテクノロジー展, 2015 年 5 月 15 日, 東京ビッグサイト(東京都江東区)
- ㉛ 鵜殿 平一郎: メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除(教育講演) 第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会, 2015 年 2 月 28 日, 東京ガーデンパレス(東京都文京区)
- ㉜ Eikawa S (他 7 名): Metformin induced tumor infiltrating CD8 T effector memory cells with multiple cytokine producing ability. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 10 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)
- ㉝ 鵜殿 平一郎: エネルギーセンサーを介したストレス応答と腫瘍免疫の関わり(シンポジウム) 第 9 回臨床ストレス応答学会大会, 2014 年 11 月 2 日, マスカットキューブ(岡山県岡山市)
- ㉞ 榮川 伸吾(他 11 名): 2 型糖尿病薬メトホルミンの腫瘍局所における CD8T 細胞疲弊解除(口頭) 第 9 回臨床ストレス応答学会大会, 2014 年 11 月 2 日, マスカットキューブ(岡山県岡山市)
- ㉟ 鵜殿 平一郎, 榮川 伸吾: メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除(シンポジウム) 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 27 日, 国立京都国際会館(京都府京都市)
- ㊱ Udono H, Nishida M, Eikawa S: Metformin-induced reversion of exhausted CD8T cells in tumor microenvironment. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (シンポジウム), 第 73 回

- 日本癌学会学術集会、2014年9月27日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ③⑧ Eikawa S（他6名）：Metformin-induced tumor infiltrating CD8 T cells with effector memory phenotype and multi-functional reversion. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（口頭）、第73回日本癌学会学術集会、2014年9月25日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ③⑨ Eikawa S（他6名）：Activated AMPK induced tumor infiltrating CD8 T-cells with effector memory phenotype and functional reversion. 第73回日本癌学会学術集会、2014年9月25日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ④⑩ 榮川 伸吾（他6名）：腫瘍浸潤CD8T細胞の免疫疲弊解除における活性化AMPKの役割（口頭）第18回日本がん免疫学会総会、2014年8月1日、ひめぎんホール（愛媛県松山市）
- ④⑪ 鵜殿 平一郎：腫瘍局所免疫疲弊解除によるがん免疫治療研究、国際バイオテクノロジー展／技術会議、2014年5月14日、東京ビッグサイト（東京都江東区）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計2件）

名称：免疫細胞の機能増強方法及び免疫細胞の多機能性評価方法

発明者：鵜殿平一郎、榮川伸吾、豊岡伸一

権利者：国立大学法人 岡山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2015/73011号

出願年月日：2015年8月17日

国内外の別：国外

（特願2014-166593、免疫評価方法とその評

価された免疫活性化剤、2014年8月19日；

特願2015-085556、2015年4月20日；

JP2016-544195（2017年2月3日）

US15/503247（2017年2月13日） EPC

15833898.8（2017年2月22日）

以下、出願人は国立大学法人岡山大学と小野薬品工業株式会社である。

AU2015304448（2017年2月10日）
BR112017002807-7（2017年2月13日）
CA2958573（2017年2月17日）
CN201580043408.X（2017年2月13日）
MX/a/2017/002134（2017年2月16日）
PH1-2017-500224（2017年2月7日）
RU2017108754（2017年3月16日）
SG11201700978S（2017年2月8日）
TH1701000845（2017年2月17日）
ZA2017/01113（2017年2月14日）

名称：免疫機能の検査方法、がん患者の選別方法、がんの治療効果予測方法、細胞内カルシウムイオン濃度上昇剤、腫瘍組織におけるエフェクター・メモリー(EM)とエフェクター(eff)の選択的機能向上剤およびがん治療薬

発明者：鵜殿平一郎、榮川伸吾

権利者：国立大学法人 岡山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/005011号

出願年月日：2017年2月10日

国内外の別：国外

特願2016-024363（2016年2月12日）

特願2016-204284（2016年10月18日）

〔その他〕ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜殿 平一郎（UDONO HEIICHIRO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50260659

(2) 研究分担者

榮川 伸吾（EIKAWA SHINGO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40635265