

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23887

研究課題名(和文)メトホルミンと抗PD-1抗体併用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 the combination therapy of metformin and anti-PD-1 antibody

研究代表者

西田 充香子(Nishida, Mikako)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60844644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は2型糖尿病治療薬であるメトホルミンと抗PD-1抗体併用による腫瘍退縮の実験系を用いて、腫瘍浸潤CD8T細胞(CD8 TILs)、腫瘍細胞の同時解析を行うことで腫瘍微小環境の代謝を制御する因子を同定することを目的としている。本研究結果からメトホルミンの誘導する抗腫瘍効果に活性酸素(ROS)を起点とした解糖系の亢進ならびにNrf2- mTORC1 経路の活性化による増殖がCD8TILsにおいて起こることが重要であるが、腫瘍細胞に対しては活性化CD8TILsが産生するIFN γ が腫瘍細胞の代謝を制御しているという新たな知見を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん治療に免疫チェックポイント阻害剤が用いられており、治療効果が従来の治療法と比較して有効であるとされた。しかしその一方で効果が限定的、副作用の問題など解決すべき課題が残されている。我々はこれまでに2型糖尿病治療薬のメトホルミンと抗PD-1抗体を併用することで相乗的な抗腫瘍効果を示すことを見出したが、詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。この機序解明は今後の免疫療法の発展にも重要である。本研究課題はメトホルミンが誘導する抗腫瘍効果の分子メカニズムの詳細部分を明らかにしたものであり、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から、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)：In the combination therapy model with metformin and anti-PD-1 Ab, we tried to identify the intrinsic factor(s) of tumor infiltrating CD8+ T lymphocytes (CD8TILs), which was involved in the metabolic reprogramming of the tumor microenvironment. To this end, we performed FACS analysis of both CD8TILs and tumor cells simultaneously. We found that metformin-induced mitochondrial ROS (mtROS) elevates Glut-1 on the cell surface and Nrf2/mTORC1 in CD8TILs, which induced glycolysis elevation and cell proliferation, respectively. Intriguingly, the robust production of IFN γ by the combination therapy, not by the monotherapy, was found involved in downregulation of the glycolysis and the oxidative phosphorylation (OxPhos) of tumor cells. Thus, we could successfully identify the molecular mechanism of the combination therapy-induced metabolic reprogramming of the tumor microenvironment.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：メトホルミン 腫瘍微小環境 代謝 活性酸素 IFN CD8 TILs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍浸潤 CD8T 細胞(CD8 TILs)がエフェクター機能を維持するためには、転写因子 NFAT の核内移行を確実に行う必要がある。そのためには、CD8TILs の代謝を解糖系優位にすることが必須であることが昨今の免疫代謝研究で明らかにされている(1)。しかし皮肉なことに腫瘍細胞自身も解糖系によってエネルギーを得ており、低グルコースの腫瘍微小環境においては CD8 TILs と腫瘍細胞の間には必然的に代謝競合が起こっている(2,3)。代謝競合に負けた CD8 TILs はその機能を失い、その結果、腫瘍は増大へと向かう。これは腫瘍微小環境に存在する細胞の代謝が腫瘍の運命を決定付けていることを示唆している。このような背景から近年、腫瘍免疫の分野において代謝制御薬を用いた免疫療法の研究も進んでいる。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が腫瘍浸潤 CD8 T 細胞 (CD8 TILs) の代謝を解糖系優位に改変し、疲弊 CD8 TILs の機能を回復させるということを示唆してきた(4)。現在はメトホルミンと免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体との併用効果の検討を行っており、併用により有意な腫瘍増殖抑制効果が認められている。しかし、その詳細な分子メカニズムに関しては不明な点が多い。メトホルミンの抗腫瘍効果についての報告は多くあるが、その大部分はメトホルミンが腫瘍細胞のエネルギーセンサーである AMPK を活性化し、腫瘍細胞の増殖を抑えるという機序によるものとされている。しかし、それらの論文ではメトホルミンの使用濃度が高く、事実、メトホルミン服用患者の血中濃度に近い 10 μ M 程度の濃度では AMPK の活性化はあまり起こらないため、メトホルミンによる抗腫瘍効果の誘導には別のメカニズムがあるのではないかと考えた。そのような中、2014 年に Haes らのグループが線虫にメトホルミンを処置するとミトコンドリアから活性酸素(ROS)が産生され、抗ストレス応答分子の発現を誘導し、寿命を延長させ、その効果は抗酸化剤処置で消失するということを報告した(5)。つまり、メトホルミン服用により生体内で最初に起こる事象は標的分子であるミトコンドリア呼吸鎖を阻害し、ROS を発生させることであった。過剰の ROS は生体にとって有害であるが、適度な ROS は腫瘍免疫研究においては重要なシグナル伝達分子であるとされている(6)。そこで予備検討としてメトホルミンと抗 PD-1 抗体併用時に抗酸化剤を処置すると併用効果は消失したことから、メトホルミンが誘導する抗腫瘍効果に活性酸素(ROS)が関与している可能性が強く示唆された。したがって本研究では併用効果をもたらす詳細な分子メカニズムを活性酸素(ROS) および腫瘍微小環境の代謝に着目し検討を行った。

2. 研究の目的

これまでの我々の検討から、メトホルミンと抗 PD-1 抗体の併用効果は抗酸化剤処置によって消失したことから ROS が必要であるということに加え、

CD8 TILs の グルコーストランスポーター(Glut-1)、サイトカイン (IL-2, TNF , IFN) 産生上昇は抗酸化剤処置(NAC)により遮断される。

メトホルミン処置によって CD8 TILs で産生される ROS は、徐々に消去の方向へ向かう。これは抗酸化ストレス応答 (Nrf2 経路) の発現による。

CD8 TILs における増殖関連分子である mTORC1 活性化 (p-S6 上昇) は、大変興味深いことに Nrf2 活性化阻害剤で抑制される。

以上の事実を見出した。すなわち併用治療によって生じる ROS が Glut-1 の発現上昇を介して CD8 TILs における解糖系を上昇させ、サイトカイン産生を促し、その機能を維持していると考えられる。CD8 TILs の機能に加え、腫瘍内での増殖も極めて重要な事項である。この点については、Nrf2 が mTORC1 を活性化するため CD8 TILs の細胞増殖を維持している可能性が考えられた。以上の予備的実験事実から、解糖系-Nrf2-mTORC1 がどのような分子機構で連動するのか、ということを知ることが必要であると考えた。

さらに併用治療によって 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結果も予備検討から得ており、如何にして同一腫瘍微小環境下に存在する免疫細胞と腫瘍細胞の代謝を逆方向へと変化させているのかということも大変興味深い点であったため、我々はメトホルミンと抗 PD-1 抗体併用による腫瘍退縮の実験系を用いて CD8 TILs、腫瘍細胞の同時解析によって腫瘍微小環境の代謝を制御する因子を ROS の関与も含め、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ROS を起点とした Nrf2-mTORC1 経路活性化による CD8 TILs、腫瘍細胞の代謝改変メカニズムの解明(2019 年度)

1. CD8 TILs における 2-DG (解糖系阻害剤) を処置した際の Nrf2 経路関連分子(Nrf2、HO-1)、mTORC1 経路関連分子(p-S6、Ki67) の発現を FACS 解析する。
2. OTA (Nrf2 阻害剤)、Rapamycin (mTORC1 阻害剤) 処置時の CD8 TILs の Glut-1 の発現、サイトカイン産生量も同様の方法で検討する。
3. 腫瘍細胞においても各阻害剤を用いて Glut-1、Nrf2、mTORC1 経路関連分子の発現を同様の手法で解析する。

メトホルミンと抗 PD-1 抗体併用効果における Nrf2 の関与を Nrf2 コンディショナル KO マウスを用いて証明する(2020 年度)

活性化 CD8 T 細胞特異的に Nrf2 分子を欠損させることのできる Nrf2 コンディショナル KO マウスを用いて、腫瘍移植実験を行い、併用効果の有無を確認する。また、CD8 TILs、腫瘍細胞における Glut-1、Nrf2 および mTOR 関連分子の発現解析も行い、併用治療による Nrf2-mTORC1 経路活性化と代謝制御メカニズムを確固たる形で証明する。

CD8 TILs、腫瘍細胞を同時に回収し、その発現遺伝子および代謝を解析する (2020 年度)

CD8 TILs、腫瘍細胞の代謝改変に関しては ROS に加え、免疫細胞が産生する因子も必要と考えられる。何故なら併用治療は SCID マウスにおける腫瘍細胞の解糖能には影響を与えないからである。そこで免疫系を介する腫瘍微小環境の代謝改変に重要な因子を同定するため、併用治療時の腫瘍塊から CD8 TILs、腫瘍細胞をソーティングにより回収し、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析をする。さらに腫瘍切片から代謝関連分子をイメージング化し、in situ 代謝解析を行う。これらの解析から代謝制御に関連する分子を同定する。同定後は因子の阻害剤を用いて CD8 TILs、腫瘍細胞における Glut-1、Nrf2 そして mTORC1 経路関連分子の発現を解析し、その関与を証明する。

4. 研究成果

予備実験からメトホルミンの誘導する抗腫瘍効果に ROS を起点とした Nrf2-mTORC1 経路の活性化が CD8TILs において起こることが重要であることが分かってきた。さらにメトホルミンは CD8TILs の解糖系を亢進し、サイトカイン産生を増加させるが、抗酸化剤処置(NAC 処置)によってこれらの現象が消失し、抗腫瘍効果も消失するという知見も得られた(図 1)。従い、本研究ではまず解糖系と ROS-Nrf2-mTORC1 経路がどのような分子機構で連動するのかを明らかにするため、まずは 2-DG(解糖系阻害剤) 処置時の CD8TILs における Nrf2 ならびに mTORC1 関連分子(Nrf2、HO-1、p-S6、Ki67)の発現を FACS にて解析した。その結果、解糖系阻害によって Nrf2、mTORC1 関連分子の発現が低下した。その一方で Nrf2 および mTORC1 阻害剤は解糖系関連分子(Glut-1)の発現、サイトカインの産生能に影響は与えなかった。これらの事実からメトホルミンによる CD8TILs における Nrf2-mTORC1 経路の活性化には ROS を起点とした解糖系の亢進が必要であるが、Nrf2-mTORC1 経路の活性化は細胞の機能維持よりもむしろ細胞増殖の維持に寄与している可能性が示唆された。腫瘍細胞でも同様の検討を行ったが、メトホルミンおよび併用治療は腫瘍細胞における Nrf2-mTORC1 経路には何ら影響を与えていなかった。しかし、腫瘍細胞では Glut-1 の発現低下すなわち解糖系の低下が認められ、免疫不全マウスでは消失したことから、メトホルミンが誘導する腫瘍細胞の代謝改変には免疫細胞の関与が必須であると考えられた。

また、次に活性化 CD8T 細胞特異的に Nrf2 を欠損させることのできる Nrf2 コンディショナル KO マウスを作成し、そのマウスを用いて、腫瘍移植実験を行ったところメトホルミンが誘導する抗腫瘍効果が消失したことから、メトホルミンによる抗腫瘍効果には活性化 CD8TILs の Nrf2 が必須であることも確認出来た。さらにその時の CD8TILs の Glut-1、Nrf2 および mTORC1 関連分

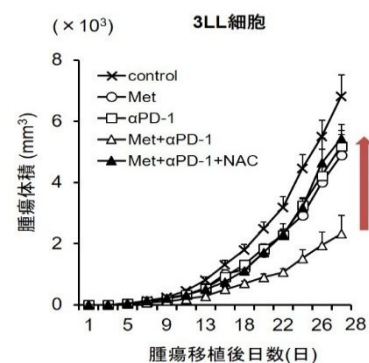


図 1: 抗酸化剤(NAC)処置時の腫瘍体積

子の発現解析を行ったところ、Glut-1の発現には影響していなかったが、Nrf2ならびにmTORC1関連分子の発現は低下し、Nrf2阻害剤処置時と同様の結果が得られた。これまで得られた結果からCD8 TILs、腫瘍細胞の代謝変化に関してはROSに加え、免疫細胞が産生する因子も必要と考えられた。何故なら併用治療はSCIDマウスにおける腫瘍細胞の解糖能には影響を与えないからである。そこで免疫系を介する腫瘍微小環境の代謝変化に重要な因子を同定するため、併用治療時の腫瘍塊からCD8 TILs、腫瘍細胞をソーティングにより回収し、RNAシーケンスによる遺伝子発現解析をしたところ、腫瘍細胞においてのみ特に酸化リン酸化(OXPHOS)の低下が認められた。すなわち腫瘍細胞ではミトコンドリアにおけるエネルギー代謝も著しく低下していた。さらにCD8 TILs、腫瘍細胞共にIFNシグナル関連因子の発現が増加していた。このことから活性化CD8TILsから分泌されるIFNが腫瘍細胞の代謝を低下させている可能性が示唆された。IFNによる腫瘍微小環境の代謝制御メカニズムについては引き続き、検討を行っているところである。

さらに併用治療時の腫瘍微小環境の代謝産物の変動を検討するため、腫瘍切片から代謝関連分子をイメージング化し、in situ代謝解析を行ったところ、特定のアミノ酸の発現分布の変動が認められた。このアミノ酸発現分布の変動とメトホルミンによって誘導される抗腫瘍効果との関連についても現在、検討中である。

本研究結果からメトホルミンによる免疫治療はCD8TILsに対してはROS、そして腫瘍細胞に対しては活性化CD8TILが産生するIFNがそれぞれの細胞の代謝を制御し、腫瘍を退縮に導いているという従来、提唱されているAMPK依存性の抗腫瘍効果とは違う新たなメトホルミンによる抗腫瘍効果メカニズムを見出すことが出来た。

参考文献

- (1) P. C. Ho, J. D. Bihuniak, A. N. Macintyre, M. Staron, X. Liu, R. Amezcua, Y. C. Tsui, G. Cui, G. Micevic, J. C. Perales, S. H. Kleinstein, E. D. Abel, K. L. Insogna, S. Feske, J. W. Locasale, M. W. Bosenberg, J. C. Rathmell, S. M. Kaech, Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. *Cell* **162**, 1217-1228 (2015).
- (2) C. H. Chang, J. Qiu, D. O'Sullivan, M. D. Buck, T. Noguchi, J. D. Curtis, Q. Chen, M. Gindin, M. M. Gubin, G. J. van der Windt, E. Tonc, R. D. Schreiber, E. J. Pearce, E. L. Pearce, Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell* **162**, 1229-1241 (2015).
- (3) 西田充香子, 鶴殿平一郎: イムノメタボリズムとT細胞の疲弊・老化 免疫機能不全を克服する新たなターゲット】腫瘍微小環境の代謝制御によるT細胞疲弊の解除. 実験医学, 38 巻19号, 3204-3210(2020).
- (4) S. Eikawa, M. Nishida, S. Mizukami, C. Yamazaki, E. Nakayama, H. Udono, Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 1809-1814 (2015).
- (5) W. De Haes, L. Froninckx, R. Van Assche, A. Smolders, G. Depuydt, J. Billen, B. P. Braeckman, L. Schoofs, L. Temmerman, Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E2501-2509(2014).
- (6) L. A. Sena, S. Li, A. Jairaman, M. Prakriya, T. Ezponda, D. A. Hildeman, C. R. Wang, P. T. Schumacker, J. D. Licht, H. Perlman, P. J. Bryce, N. S. Chandel, Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* **38**, 225-236 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mikako Nishida
2. 発表標題 Metformin synergizes with PD-1 blockade through activation of Nrf2/mTORC1 axis in reactive oxygen species (ROS) dependent manner
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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 ROS依存的なNrf2/mTORC1経路の活性化はメトホルミンと抗PD-1抗体の併用効果を誘導する
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 西田充香子、鶴殿平一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 同仁化学研究所	5. 総ページ数 4
3. 書名 ドージンニュース 代謝制御による腫瘍免疫の向上	

1. 著者名 西田充香子、鶴殿平一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ 【免疫リプログラミングと細胞デザイン】免疫代謝リプログラミング 腫瘍微小環境の代謝制御による腫瘍免疫の向上	

1. 著者名 西田充香子、鶴殿平一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学 【イムノメタボリズムとT細胞の疲弊・老化 免疫機能不全を克服する新たなターゲット】腫瘍微小環境の代謝制御によるT細胞疲弊の解除	

〔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
---------	---------