

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15666

研究課題名(和文) 骨軟部肉腫における新規免疫機能解析システムと新規免疫治療の開発

研究課題名(英文) Development of novel immune system analysis and immunotherapy for bone and soft tissue sarcomas

研究代表者

尾崎 敏文(OZAKI, toshifumi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40294459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマウス骨肉腫モデルにおいて、CD11b陽性の免疫細胞主体の抗腫瘍免疫機構の存在が明らかとなった。また、CD8TILs、Tregと同様に骨髄球系細胞においてもメトホルミンが細胞内代謝を制御することで抗腫瘍効果を惹起することが示され、それは細胞内における嫌氣的解糖の促進によるものであった。先行研究と合わせると腫瘍微小環境においてメトホルミンがT cells、CD11b陽性細胞の双方で同様に嫌氣的解糖を促進しており、腫瘍微小環境におけるglucoseの代謝制御が抗腫瘍免疫と密接に関連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

本研究では、骨肉腫マウスモデルにおいてメトホルミンの骨髄球系細胞を主体とした免疫を介した抗腫瘍効果が明らかとなった。また、メトホルミンが骨髄球系細胞の好氣的解糖を低下させることでMDSCやM2-like TAMが腫瘍内で減少したことが明らかとなった。これらの結果から、メトホルミンが腫瘍に浸潤した骨髄球系細胞の代謝を制御し、腫瘍微小環境を改変することで抗腫瘍効果を発揮することが示された。

研究成果の概要(英文)：Metformin induces CD11b⁺-cell-mediated growth inhibition of a K7M2neo osteosarcoma independent of T cells. PMN-MDSCs were significantly reduced in both spleens and tumors following Metformin treatment. In TAMs, production of IL-12 and TNF- α , but not IL-10, became apparent, and elevation of MHC class II with reduction of CD206 was observed, indicating a shift from an M2- to M1-like phenotype via metformin administration. Metformin treatment leads metabolic reprogramming in tumor infiltrated CD11b⁺ cells. Tumor infiltrated CD11b⁺ cells were decreased basal respiration and the OCR/ECAR ratio. In addition, uptake of fatty acids was decreased in MDSCs and TAMs, and uptake of glucose was decreased in MDSCs only. Our results suggest that metformin redirects the metabolism of CD11b⁺ cells to lower oxidative phosphorylation (OXPHOS) while elevating glycolysis, thereby pushing the microenvironment to a state that inhibits the osteosarcoma growth.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：immunometabolism 骨髄球由来抑制細胞 腫瘍浸潤マクロファージ metformin osteosarcoma cancer immunotherapy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性骨腫瘍の治療では手術による病巣切除と抗がん剤による全身治療を併用する集学的治療は標準治療として広く認知されている。人工関節や処理骨、組織移植手術の導入や胸腔鏡を用いた低侵襲な肺転移切除など手術手技や再建手段の種類が増え患肢温存が可能となる患者が増えている一方で、薬物治療は20年以上にわたり新規薬剤の導入がなく、そのために再発・根治切除不能な症例への対応が困難で臨床予後の改善も得られていない。これは近年新規薬剤が複数導入されている悪性軟部腫瘍とは対照的な状況である。骨肉腫はAYA世代を含む若年に好発するがんのひとつであり、副作用が少なく、生命予後改善が見込まれる新規治療の開発が強く望まれている。

研究者らは先行研究において2型糖尿病治療薬メトホルミンの免疫系を介した抗腫瘍効果について検討しており、悪性黒色腫、白血病、線維肉腫といった複数のマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍成長抑制を示し、その機序として腫瘍局所でのCD8T細胞の増加と抗腫瘍活性の維持が挙げられることを報告している。メトホルミンは世界で最も頻用される糖尿病治療薬であり、その副作用や安全性については広く知られるところである。マウスモデルにおいては通常の中濃度で治療効果が得られており、骨肉腫において治療効果が確認できれば臨床応用にもつながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究の結果を参考としつつ、マウス骨肉腫モデルにおけるメトホルミンの効果の有無を確認する。さらに本骨肉腫モデルにおける抗腫瘍効果の作用機序を明らかにすることを目指す。

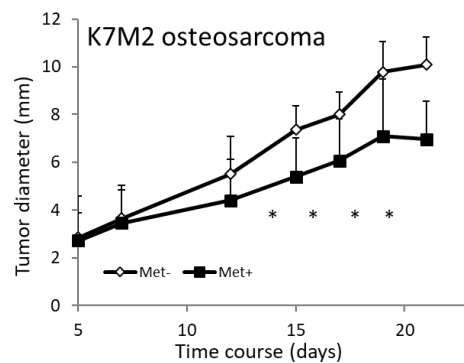
3. 研究の方法

骨肉腫細胞株(K7M2neo)を同系野生型マウスに移植するマウスモデルを用い、メトホルミンの骨肉腫に対する抗腫瘍効果について検討した。また本モデルを用いて形成された腫瘍内に浸潤したT細胞、骨髄球系細胞の分画のメトホルミンによる変化をフローサイトメーターにて検討した。骨髄球系細胞に関しては分画の変化を経時的に計測した他、腫瘍浸潤マクロファージ(TAM)のサイトカイン産生を検討した。メトホルミンによる骨髄球系細胞の代謝変化およびブドウ糖と脂肪酸の取込の変化を検討した。

4. 研究成果

骨肉腫モデルにおけるメトホルミンによる抗腫瘍効果の検討

In vivo 腫瘍モデルにおいて骨肉腫の成長はメトホルミン内服により抑制された。*In vitro* ではK7M2neoがメトホルミン環境で増殖が抑制されるのは血中濃度の500-1000倍程度必要であり、生体内での腫瘍微小環境に由来する間接的な抗腫瘍効果であることが示唆された。免疫系に着目すると、抗CD4抗体および抗CD8抗体投与時、またT細胞欠損マウスにおいてもメトホルミンによる抗腫瘍効果は維持された。T細胞欠損マウスにおいて抗CD11b抗体を投与し骨髄球系細胞を除去するとメトホルミンの腫瘍抑制効果が消失した。これらの結果より、K7M2neo骨肉腫モデルにおいてメトホルミンによる骨髄球系細胞の制御を介した抗腫瘍効果の発現が示唆された。

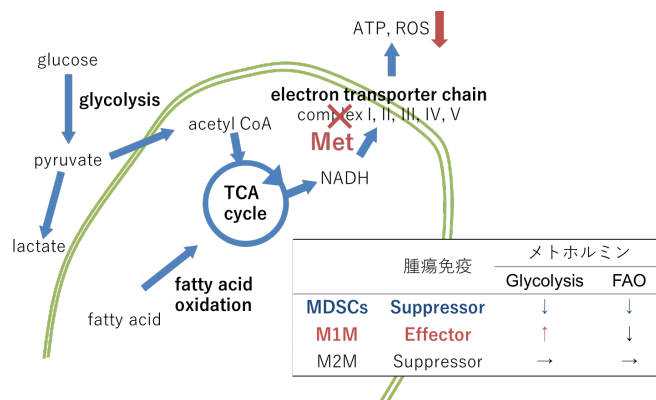


骨肉腫細胞株における抗腫瘍効果の機序の検討

骨肉腫マウスモデル腫瘍内および脾臓において骨髄球系細胞の増加がメトホルミンにより抑制され、腫瘍内および脾臓の双方で骨髄球由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)のうちPMN-MDSCの分画が減少した。腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophages, TAMs)の解析では、腫瘍内でM1-like TAMの割合が増加し免疫刺激性サイトカインの産生が増加していた。これが本腫瘍系におけるメトホルミンによる腫瘍成長抑制作用の本態と考えられた。

腫瘍内骨髄球系細胞の代謝変化の検討

MDSCs, TAMs の細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を計測すると, 腫瘍内では細胞内 ROS が低下し, フラックスアナライザー (Seahorse) での代謝解析においても腫瘍内骨髄球系細胞ではミトコンドリアの機能が低下していることが示唆された. MDSCs と TAMs においてブドウ糖と脂肪酸の取込を蛍光アナログを用いて評価すると, メトホルミン投与群では腫瘍内 MDSCs においてブドウ糖と脂肪酸双方の取込が減少した. また TAMs ではブドウ糖の取込は維持されたが脂肪酸の取込が低下した. これらの結果はメトホルミンが MDSCs, TAMs においてミトコンドリア機能低下を通じた好氣的解糖の抑制をもたらし, 腫瘍内骨髄球系細胞の分布を変化させることで抗腫瘍効果を増強する方向へ傾かせることが明らかとなった.



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Uehara T, Eikawa S, Nishida M, Kunisada Y, Yoshida A, Fujiwara T, Kunisada T, Ozaki T, Udono H. Metformin induces CD11b⁺-cell-mediated growth inhibition of an osteosarcoma: implications for metabolic reprogramming of myeloid cells and anti-tumor effects. *Int Immunol*. 2019 Mar 28;31(4):187-198. 査読有
DOI: 10.1093/intimm/dxy079

Kunisada Y, Eikawa S, Tomonobu N, Domae S, Uehara T, Hori S, Furusawa Y, Hase K, Sasaki A, Udono H. Attenuation of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug. *EBioMedicine*. 2017 Nov;25:154-164. 査読有
DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.10.009

Fujiwara T, Uotani K, Yoshida A, Morita T, Nezu Y, Kobayashi E, Yoshida A, Uehara T, Omori T, Sugiu K, Komatsubara T, Takeda K, Kunisada T, Kawamura M, Kawai A, Ochiya T, Ozaki T. Clinical significance of circulating miR-25-3p as a novel diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncotarget*. 2017 May 16;8(20):33375-33392. 査読有
DOI: 10.18632/oncotarget.1649

[学会発表](計4件)

鵜殿平一郎, 西田充香子, 榮川伸吾, 國定勇希, 上原健敬. 腫瘍免疫の制御によるがん治療の展開 腫瘍微小環境の代謝改変は免疫を介して腫瘍増殖を抑制する. 第77回日本癌学会総会. 2018年9月28日. 大阪国際会議場.

上原健敬, 榮川伸吾, 吉田 晶, 長谷井嬢, 中田英二, 国定俊之, 尾崎敏文, 鵜殿平一郎. メトホルミンは腫瘍内骨髄球系細胞の代謝を制御し骨肉腫増殖を抑制する. 第22回日本がん免疫学会総会. 2018年8月2日. 岡山コンベンションセンター

鵜殿平一郎, 榮川伸吾, 國定勇希, 上原健敬, 渡邊元嗣, 木村裕司, 佐々木朗, 尾崎敏文, 豊岡伸一, 藤原俊義. がん免疫療法の一段の進化へむけて 腫瘍浸潤免疫細胞の代謝は抗腫瘍免疫応答を制御する. 第76回日本癌学会総会. パシフィコ横浜. 2017年9月29日

上原健敬, 榮川伸吾, 國定勇希, 渡邊元嗣, 友信奈保子, 吉田 晶, 藤原智洋, 国定俊之, 尾崎敏文, 鵜殿平一郎. 骨肉腫における腫瘍浸潤骨髄球型細胞を介したメトホルミンの抗腫瘍効果. 第75回日本癌学会総会. パシフィコ横浜. 2016年10月8日.

[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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榮川 伸吾
ローマ字氏名：(EIKAWA, shingo)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学院医歯薬学総合研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：40635265

研究分担者氏名：長谷井 嬢
ローマ字氏名：(HASEI, joe)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学院医歯薬学総合研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：40636213

(2)研究協力者

研究協力者氏名：上原 健敬
ローマ字氏名：(UEHARA, takenori)

研究協力者氏名：鵜殿 平一郎
ローマ字氏名：(UDONO, heiichiro)

研究協力者氏名：藤原 智洋
ローマ字氏名：(FUJIWARA, tomohiro)

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。