

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15025

研究課題名(和文) 2型糖尿病薬メトホルミンによる腫瘍内制御性T細胞の機能調節と抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文) Regulation of function and antitumor effect of regulatory T cells in the tumor microenvironment by metformine, a type 2 diabetes drug

研究代表者

國定 勇希 (Kunisada, Yuki)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：10779416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病薬メトホルミンが免疫細胞を介した抗腫瘍作用を有することを先行研究で明らかとしていた。本研究により、腫瘍の増大に寄与するといわれている免疫抑制能を持つ制御性T細胞(Regulatory T cell: Treg)への作用を解析した。マウス腫瘍移植モデルにおいてメトホルミン投与群では腫瘍局所のみTregの細胞死を誘導し、Tregの機能抑制を生じていることを明らかとした。また、non Treg細胞からTregへの分化・誘導時に、本来であれば脂質代謝優位といわれているTregの代謝を解糖代謝優位に変化させていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メトホルミンは世界中で使用されている糖尿病薬であり、安全性や実用性が高い。また、その費用も安価である。さらに、全身のTregには影響を与えず、腫瘍局所のみ作用することを明らかとしており、自己免疫疾患の副作用が生じにくい、非常に革新的である。腫瘍内Tregのみを制御する薬剤の報告は未だになかったため、本研究での結果は学術的にも社会的にも非常に高いといえる。

研究成果の概要(英文)：We have already demonstrated that the type 2 diabetes drug metformin has antitumor activity via immune cells. In this study, we analyzed the effect of metformin on immunoregulatory regulatory T cells (Tregs), which are said to contribute to tumor growth. In the mouse tumor transplantation model, we observed that administration of metformin induced Treg apoptosis and suppressed Treg function in only tumor local sites. In addition, we demonstrated that the metabolism of Treg, which metabolism is dominant in fatty acid oxidation, is predominantly changed from fatty acid oxidation to glycolytic metabolism at the time of differentiation / induction from non-Treg cells to Treg.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：Treg メトホルミン 代謝

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

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の治療方法として、手術による外科療法、化学療法、放射線治療に加えて、がん免疫療法が新たな治療方法として注目されている。がん免疫療法は、がん細胞特異的なエフェクターT細胞を賦活化する活性型免疫療法や Treg など免疫抑制細胞の抑制能を阻害する抑制解除型免疫療法など様々である。腫瘍環境には様々な免疫細胞が集積しており、Treg もそのうちの一つである。Treg は CD4⁺T 細胞のサブセットの一つで特異的遺伝子である核内転写因子 Foxp3 を発現している。また、細胞表面に CD25 分子を発現しており、免疫抑制能を有し、自己免疫疾患やアレルギーなどの過剰免疫抑制といった生体の免疫機構の維持という重要な役割を担っている。その一方、Treg は腫瘍局所において抗腫瘍活性を有する免疫細胞の機能を抑制することが報告されており、腫瘍局所の Treg の集積は腫瘍増殖を助長する一因であると考えられている。癌種によっては腫瘍環境において Treg が有意に増加することが知られており、マウスでは Treg を抗体などで除去すると腫瘍の増殖を抑制、拒絶するという報告もされている。しかし、これらの方法は腫瘍局所のみならず、全身の Treg を除去してしまうため、ヒトにおいては自己免疫疾患のような副作用も生じる危険性があり、腫瘍局所に限局した Treg の除去が望ましく、課題となっている。2型糖尿病薬メトホルミンは世界中で最も使用されている糖尿病薬である。既に発売されて長期にわたり使用されている薬であり、副作用についても十分に調査されており、また薬価も安値である。メトホルミンを内服している糖尿病患者は、それ以外の薬を内服している糖尿病患者と比較し、発癌率、癌死が有意に減少したと報告されている。先行研究のマウス腫瘍モデルではメトホルミンを担癌マウスに投与することにより、腫瘍に浸潤した CD8⁺T 細胞の細胞死(アポトーシス)抑制、CD8⁺T 細胞機能の活性化を観察している。このようにメトホルミンが CD8⁺T 細胞の機能を介した抗腫瘍作用を有することを明らかにしているが、メトホルミンのその他免疫細胞に対する作用は不明である。本研究課題では、Treg 特に腫瘍内 Treg の動態に対して検討し、in vivo および in vitro の実験系においてそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

糖尿病患者において、メトホルミン内服患者はそれ以外の内服薬を使用している患者と比較し、有意に癌死・発癌が低下したと報告されているが、当初のその抗腫瘍効果のメカニズムは不明であった。先行実験により、メトホルミンは免疫細胞、特に CD8⁺T 細胞を介した抗腫瘍作用を有することを明らかにしているが、その他の免疫細胞に対する作用は未だ不明である。制御性 T 細胞 (Regulatory T cell: Treg) は CD8⁺T 細胞のような抗腫瘍作用を有する免疫細胞の活性抑制能を持ち、腫瘍増殖へ寄与することが報告されている。本研究では、メトホルミンの作用を Treg、特に腫瘍内 Treg の胴体に対して検討し、in vivo および in vitro の実験系においてそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

メトホルミンの抗腫瘍効果の解析と腫瘍局所 Treg への影響を解析するために、担癌マウスを用意し、その腫瘍におけるメトホルミンの抗腫瘍効果を判定する。また、その際に腫瘍内 Treg の動態を解析する。Treg 依存性・非依存性の腫瘍株を用意し、マウスに移植する。移植して約一週間からメトホルミンを内服させ、抗腫瘍効果に差があるかどうかを解析する。フローサイトメーターを用いて、腫瘍内 Treg の表現型を解析する。担癌マウスにメトホルミン治療を施し、治療後経時的に秘蔵、腫瘍所属リンパ節、腫瘍組織を回収する。それぞれの細胞を蛍光色素標識抗体 (Foxp3、CD25、Ki67) などで染色し、Treg が増減しているかどうかを解析する。また、メトホルミンによる効果が観察された腫瘍の実験系において、Treg の表現型の変化を解析する。腫瘍内 Treg では KLRG1、CD103 の両分子陽性細胞が最も抑制能が強く、両分子陽性細胞の割合が高いと報告されており、メトホルミン未投与、投与群の同 Treg の表現型について組織ごとに解析する。Treg の抑制能は IL-10 サイトカインや CTLA-4 分子などであると報告されており、フローサイトメーターを用いてメトホルミン未投与、投与群の秘蔵、腫瘍所属リンパ節、腫瘍組織の Treg における IL-10 産生および CTLA-4 分子の発現について解析する。メトホルミンはミトコンドリア呼吸鎖 complex を阻害し、AMPK 分子を活性化することが報告されている。AMPK は糖代謝をはじめ、多岐にわたる細胞妻帯者を調節するエネルギーセンサー分子である。この知見から、担癌マウスにメトホルミン治療を施し、治療経時的に脾臓、腫瘍所属リンパ節、腫瘍組織、それぞれの細胞を蛍光色素標識抗体で染色し、2-NBDG や BODIPY といった代謝を観察する抗体を用いて、糖代謝あるいは脂質代謝が優位であるか代謝の観点から解析を行う。Treg は胸腺由来の natural occurring Treg (nTreg) と局所で誘導される inducible Treg (iTreg) に大別される。nTreg と iTreg においてメトホルミンの作用を詳細に解析し、どのような代謝変化が起きているか、またそれにより Treg の動態がどのように変化するかを明らかにし、分子メカニズムの解明の足掛かりとする。nTreg を in vitro でメトホルミン存在下、非存在下で培養し、またメトホルミン処理後に抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体、TGF- β 、IL-2 により異なった条件で刺激培養を行い、Treg を増殖誘導する。刺激後、サンプルを回収し、各遺伝子・分子の発現を qPCR 法やウェスタンブロット法により解析する。non Treg 細胞 (CD4⁺CD25⁻T 細胞) を in vitro でメトホルミン存在下、非存在下で培養する。nTreg と同様に異なった条件で刺激培養を行い、iTreg を誘導する。刺激後、サンプルを回収し、各遺伝子・分子の発現を qPCR 法やウェ

スタンプロット法により解析する。Seahorse 社の flux analyzer は細胞の代謝解析において非常に注目されており、同機器により細胞の酸素消費量と pH の変化により TCA 回路の亢進および解糖系の亢進をそれぞれ測定することができる。T 細胞の機能解析においても非常に有用であり、近年、同機器を使用した代謝変化が多く報告されている。同機器により、それぞれの条件下で誘導した Treg の代謝を解析に、メトホルミンによってどのように代謝変化が生じているかを明らかにする。

4. 研究成果

4つの腫瘍 (RLmale1、MCA、MO-5、MethA) をマウス皮内に移植した。腫瘍移植後、5日目あるいは7日目からメトホルミン投与を行い、腫瘍径を経時的に測定したところ、全ての腫瘍において抗腫瘍効果が認められた。マウスに腫瘍を移植し、メトホルミン投与群、非投与群に分けてそれぞれ解析した。腫瘍移植後、経時的に末梢の脾臓、腫瘍所属リンパ節と腫瘍組織を回収し、細胞を蛍光色素標識抗体 (Foxp3、CD3、CD4、CD25 など) で染色し、フローサイトメーターを用いてそれぞれの組織に浸潤している Treg の解析を行った。その結果、メトホルミン投与を行ったマウスでは脾臓と腫瘍所属リンパ節では有意差のある変化は認めなかったが、腫瘍内 Treg は早期アポトーシスの増加を認め、腫瘍内 Treg の割合は減少していることを明らかとした。また、Treg の最終分化とされている KLRG1 と CD103 の両分子陽性細胞の割合もメトホルミン治療を施した担癌マウスの腫瘍内 Treg では減少していることを確認した。さらに、Treg の抑制能を示す IL-10 のサイトカインや CTLA-4 分子の発現もメトホルミン治療を施したマウスにおいては、腫瘍内 Treg においてのみ減少を認めた。代謝の変化に関して、2-NBDG や BODIPY での観察は困難であったが、腫瘍内 Treg の細胞表面にあるグルコーストランスポーターである Glut1 の発現は上昇しており、解糖代謝の亢進が認められることを明らかとした。また、ミトコンドリアの活性を示す Mitosox や TMRE はメトホルミン治療群で有意に減少していた。nTreg の増殖誘導、iTreg の分化誘導を行い、qPCR とウェスタンブロット法で解析した。nTreg においてはメトホルミン処理を行っても有意な差を認めなかったが、iTreg 誘導実験では、メトホルミン処理を行うと Foxp3 陽性細胞は有意に減少した。また、誘導された Foxp3 陽性細胞は細胞死が誘導されていることを確認した。Flux analyzer による Treg 誘導時の代謝変化の解析を行った。同機器によりメトホルミン処理を行った細胞では解糖代謝が亢進していることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

國定勇希、柴川慎吾、中7人、鵜殿平一郎(10番目)、Attenuation of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment by Metformin, a Type 2 Diabetes Drug, EBioMedicine, 査読有、vol.25、2017、154-164、DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.10.009.

[学会発表](計 2件)

國定勇希 他、2型糖尿病薬メトホルミンによる腫瘍局所の制御性 T 細胞抑制による抗腫瘍効果、日本口腔科学会学術集会、2018年

國定勇希 他、Attenuation of CD4+CD25+ regulatory T cells in the tumor microenvironment by metformin, a type 2 diabetes drug、日本癌学会学術総会、2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 鵜殿 平一郎、柴川 慎吾

ローマ字氏名:(UDONO, Heiichiro)(EIKAWA, Shingo)

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。