

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670237

研究課題名(和文)腫瘍局所の免疫疲弊解除研究

研究課題名(英文)Reversion of exhausted T cells in tumor microenvironment

研究代表者

鵜殿 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD8TILの解糖系の亢進が判明した。また、ナイーブCD8T細胞のin vitro刺激誘導系において、メトホルミン処理により解糖系及び酸化リン酸化の双方が亢進した。一方で腸内フローラはメトホルミン服用で大きく変動しなかった。腫瘍浸潤Tregの数の優位な減少を認めた。ナイーブCD4T細胞のin vitro刺激によるiTreg誘導実験でメトホルミン処理により誘導効率が低下した。さらに、腫瘍浸潤MDSCの数の優位な減少、とりわけG-タイプMDSCの減少が顕著であった。また、マクロファージではM1/M2比の上昇が認められた。以上、メトホルミンによる腫瘍微小環境の改変が明確になった。

研究成果の概要(英文)：Elevation of glycolysis in CD8 tumor infiltration lymphocyte (CD8TIL) was found by metformin (Met) administration. Also, mature CD8T cells differentiated from naive CD8T cells by in vitro TCR stimulation revealed enhanced glycolysis as well as oxidative phosphorylation by Met-treatment. Intestinal micro flora was not altered by Met. Significant reduction of Treg in tumors was also observed by Met. Inducible Treg (iTreg) differentiated from naive CD4T cells by TCR stimulation and TGFbeta was reduced in number and suppressive function by Met-treatment. Furthermore, reduction of MDSC in number, especially, G-MDSC rather than M-MDSC, was prominent in tumor tissue by Met. Also, increase of M1/M2 macrophage ration was observed by Met. It is clear that Met-administration dramatically changes tumor microenvironment towards favorable state for anti-tumor immunity.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫疲弊 CD8T細胞 腫瘍微小環境 メトホルミン

## 1. 研究開始当初の背景

がんや慢性感染症の場合には、繰り返し抗原刺激を受けた CD8 T細胞は、最初に IL-2 産生能を消失し、次に TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ の産生能が次第に弱くなり、最後にはアポトーシスによって細胞死に至る。この現象は免疫疲弊と呼ばれており、CD8 T細胞の細胞膜表面上に発現する Programmed cell death protein 1 (PD-1)、T cell membrane protein 3 (Tim-3) などから入る負のシグナルが原因と考えられている。PD-1分子は T細胞の活性化に伴い発現してくる分子であり、同分子が発現されると T細胞の活性状態に歯止めをかける。PD-1分子からのシグナルにより、SHP2ホスファターゼをリクルートし脱リン酸化により T細胞受容体シグナルは抑制される。PD-1は CTLA4分子と同様に制御性 T細胞(Treg)にも発現しており、PD-1リガンド(PDL)との結合により Treg依存性の免疫抑制も引き起こす。PD-L1はとりわけ腫瘍組織では非常に高い発現が認められる。PD-L1は炎症性サイトカイン、特に IFN $\gamma$ に反応して腫瘍細胞表面(正常組織でも)に発現する。従って腫瘍を取り囲む炎症を伴う微小環境下では浸潤 T細胞はPD-1/PD-L1会合を通して抑制状態に置かれていることになる。また、癌細胞のAKTやSTAT3が恒常的に活性化された状態では、サイトカインとは無関係にPD-L1の発現が促進され、PD-1/PD-L1会合が進み免疫抑制に至る。

Tim-3分子も腫瘍組織内の T細胞表面に発現が誘導され、疲弊マーカーとして最近注目を集めている。Tim-3のリガンドはガレクチン9であり、多くの癌組織、Tregなどから分泌される。抗Tim-3抗体投与によりガレクチン9との結合をブロックすれば、腫瘍に対する免疫応答は促進される。また、PD-1とTim-3に対するブロック抗体を併用する事により、単独使用の場合と比較して劇的な効果があることがマウスモデルにて確認されている(J. Exp. Med., 207: 2175, 2010)。PD-1、Tim-3以外にも Lymphocyte activation gene 3 (LAG3)、Adenosine A2a receptor (A2aR)など続々と同様のチェックポイント分子が同定されており、個別に対応することが非常に難しくなることも予測される。

メトホルミンは、世界でもっとも多く使われている II型糖尿病治療薬である。メトホルミンはインスリン抵抗性を是正して血糖値を

下げ、肥満を伴う II型糖尿病ないし心臓血管病に対して効果がある。近年の報告によれば、インスリンによる II型糖尿病の治療では発癌率が上昇する一方、メトホルミンによる治療では発癌率が減少することが言われている。非常に興味深いことに 20万人を超える後ろ向き疫学調査により、メトホルミンで治療していた II型糖尿病の患者は、それ以外の治療法を行っていた患者と比較して、癌の発生率・癌死亡率が 30~40%ほど低下することが明らかとなった。血糖値のコントロール、或いはインスリンの血中値が癌の発生率・癌死亡率に影響を与えるのではないかと考えられているが、確かなことはわかっていない。メトホルミンによる抗腫瘍効果のメカニズム、および前向きコホート研究の必要性が強く謳われており、最新の情報では世界173か所の機関でメトホルミンの抗癌作用に関する臨床試験が行われている。

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。II型糖尿病治療薬メトホルミンは AMP/ATP 比の上昇をもたらす、TCA サイクルを回して無理矢理 ATP 産生方向へ舵をきる。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へ 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機能的に回避ないし克服されていることが証明された。本研究課題では、CD8 TIL 細胞のメトホルミンによる免疫疲弊からの脱却と活性化がどのように行われているのか、そのメカニズムを明らかにする。

## 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 II 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 $\alpha$ 、IFN $\gamma$  の同時産生能 (多機能性) を消失しており、さらに多くはアネクシン 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

メトホルミンは CD8 TIL 内に発生した負のシグナルを直接的に解除し、本来の活性化シグナルが蘇る方向に向かわせる可能性が最初に考えられる。一方で CD8 TIL に疲弊を誘導するものとして腫瘍自体 (AKT/STAT3 活性化)、Treg、MDSC の 3 つが考えられるため、メトホルミンはこれらの細胞群の機能を抑制し、その結果として間接的に CD8 TIL の免疫疲弊が解除される可能性も否定できない。上記 4 つの可能性をそれぞれに分けて検証し、メトホルミンによる免疫疲弊解除のメカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

メトホルミン服用で CD8 TIL の解糖系の亢進が判明した。また、ナイーブ CD8 T 細胞の in vitro 刺激誘導系において、メトホルミン処理により解糖系及び酸化的リン酸化の双方が亢進した。一方で腸内フローラはメトホ

ルミン服用で大きく変動しなかった。腫瘍浸潤 Treg の数の優位な減少を認めた。ナイーブ CD4 T 細胞の in vitro 刺激による iTreg 誘導実験でメトホルミン処理により誘導効率が低下した。さらに、腫瘍浸潤 MDSC の数の優位な減少、とりわけ G-タイプ MDSC の減少が顕著であった。また、マクロファージでは M1/M2 比の上昇が認められた。以上、メトホルミンによる腫瘍微小環境の改変が明確になった。

## 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 8 件)

- (1) 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, gt. 2016. 7. doi: 10.1038/gt.2016.7.
- (2) 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.
- (3) 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  $\beta$  (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.

- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) Ichianagi T, Ichianagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Udono H. HSP90  $\alpha$  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.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (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）
- ② 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）
- ③ 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、（岡山県津山市）
- ④ 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、長崎大学ポンペ会館（長崎県長崎市）
- ⑤ 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）
- ⑥ 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）
- ⑦ 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、金沢大学附属病院（石川県金沢市）
- ⑧ 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）
- ⑨ 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 40<sup>th</sup> Annual

[学会発表] (計 24 件)

- ① 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

Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015年12月11日、Okayama Convention Center (岡山県岡山市)

- ⑩ 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)
- ⑪ 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)
- ⑫ 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)
- ⑬ 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)
- ⑭ 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)
- ⑮ 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)
- ⑯ Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Nishida M, Ichianagi T, Yamazaki C, Udono H. : 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)
- ⑰ 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)

- ⑱ 鵜殿平一郎、柴川伸吾 : 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)
- ⑲ 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 (Core-Symposium)、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)
- ⑳ Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Ichianagi T, Yamazaki C, Udono H. : Metformin-induced tumor infiltrating CD8 T cells with effector memory phenotype and multi-functional reversion. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (oral presentation)、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)
- ㉑ Negawa M, Eikawa S, Uehara T, Kunisada Y, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Uenaka A, Kakimi K, Wada H, Oka M, Nakayama E, Udono H. : Immunomonitoring multifunctionality of exhausted CD8 T-cells in cancer patients. 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)
- ㉒ Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Ichianagi T, Yamazaki C, Udono H. : 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)

⑳ 榮川伸吾、根川真実、國定勇希、上原健

敬、一柳朋子、山崎千尋、鵜殿平一郎：  
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、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）

㉑ 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 1 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：PCT

番号：PCT/JP2015/73011 号

出願年月日：2015 年 8 月 17 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.okayama-u.ac.jp/user/immuno/  
index.html](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