

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に基づく癌免疫治療研究

2. 研究開発代表者： 鶴殿 平一郎（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 免疫学分野）

3. 研究開発の成果

A) メトホルミンによる免疫疲弊解除の分子メカニズムの解明

増大する腫瘍塊の中には、腫瘍浸潤 CD8T (CD8 TILs) はセントラル・メモリーT細胞 (TCM) として存在している。しかし、メトホルミン服用により TCM は減少し、エフェクター・メモリーT細胞 (TEM)、さらにエフェクターT細胞 (T eff) が増加し、腫瘍増大に抑制がかかる。

抗原特異的ナイーブ CD8T 細胞の養子移入実験においても同様のことが観察される。即ち、移入 CD8T 細胞は腫瘍に浸潤しても通常ほとんどは TCM の状態であるが、メトホルミン服用ないし *ex vivo* で予め移入 CD8T 細胞をメトホルミン処理しておけば、腫瘍浸潤後に TEM として存在し、多機能性を有しながら抗腫瘍効果を示す。

平成 27 年度はさらに以下を明らかにした。

- 1) *ex vivo* で移入 CD8T 細胞のメトホルミン処理時に AMPK 阻害剤 compound C を加えると、抗腫瘍効果は消失した。これは CXCR3 の発現が消失による。
- 2) 移入 CD8T 細胞が IRF4 を欠損していれば、メトホルミン処理効果は消失した。
- 3) 移入 CD8T 細胞のメタボローム解析の結果、メトホルミン処理で旺盛なアミノ酸代謝活性が認められた。
- 4) 移入 CD8T 細胞の網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq.) を 3. と同様の条件で現在解析した。メトホルミン処理で発現が増加し、compound C を加えると減少する遺伝子が同定されたが、その意味については解析中である。
- 5) 移入 CD8T 細胞の T 細胞シグナル経路における、リン酸化分子の網羅的同定を行ったが、調べた限りにおいて は特に変化は認められなかった。
- 6) メトホルミン処理移入 CD8T 細胞の TCR 刺激を *in vitro* で 48 時間行ったところ、解糖系 (ECAR) および酸化 的リン酸化能 (OCR) が、ともに大きく亢進することがわかった。OCR/ECAR の比はむしろ低下することから、どちらかといえば解糖系優位のエネルギー代謝の状態になると考えられた。
- 7) 腫瘍局所に浸潤した Treg の数はメトホルミン投与により、一過性に減少することがわかった。In vitro における iTreg 誘導系の実験においてメトホルミンにより iTreg の分裂を促進するものの、同時にアポトーシスを促進することがわかった。
- 8) In vivo における腫瘍増殖後期では、メトホルミン服用により G-MDSC が優位に減少することが明らかになった。また、M1 マクロファージの比率が上昇した。

B) 臨床研究

メトホルミン非投与による臨床研究を実施した。即ち、がん患者末梢血から採取したリンパ球を PMA/ionomycin で 6 時間刺激培養する。培養後細胞を回収し、CD8T 細胞における IL-2、IFN γ 、TNF α の細胞内サイトカイン染色を行なった。これにより末梢血の免疫疲弊の程度が明らかにされる。さらに T 細胞の疲弊分子 PD-1、Tim-3 発現に加え、多機能性、TCM/TEM 比を解析し、免疫学的病態を明らかにした。がん患者末梢血 CD8T 細胞は、*in vitro* でメトホルミンと短時間共培養することで、その多機能性が回復した。これは肺がん患者 (転移性肺腫瘍を含む 42 症例) および消化器がん患者 (主に胃がん患者を含む 34 症例) の両方でその傾向が観察された。一方で健常人 (20 名) の末梢血 CD8T 細胞では回復傾向は見られなかった。即ち、がん患者の CD8T 細胞は末梢血であっても既に疲弊傾向に陥っており、メトホルミンで機能回復 (多機能性の回復) させることが考えられた。

4. その他

メトホルミン介入試験は、既に一部のがん患者 (肺がん患者6名) で施行中である。