

受賞対象論文

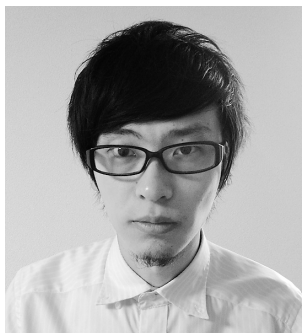
Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H : Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. Proc Natl Acad Sci U S A (2015) 112, 1809-1814.

榮川伸吾

Shingo Eikawa

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 免疫学

Department of Immunology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



<プロフィール>

昭和56年生まれ

平成18年3月 岡山大学工学部 生物機能工学科卒業

平成20年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科課程修士修了

平成24年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科課程博士修了

平成24年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 免疫学 助教
現在に至る

研究の背景と経緯

4年前、2012年の4月、免疫学教室で助教として勤めさせて頂くことになりました。その際に鶴殿教授から、「メトホルミンとがん免疫の研究をやってみませんか?」とお声をかけて頂いたのが本研究の始まりです。私は大学院生時代(2006~2012)に免疫学前教授中山睿一先生のもとでヒトの検体を用いてがんワクチンの研究を行って参りましたので、引き続きがん免疫の研究ができること、またメトホルミンを用いたマウスの腫瘍実験、免疫学的解析は、これまでの経験を活かすことができる研究テーマであると期待しておりました。

私が免疫学教室で勤務し始めた少し前の同年の2月、鶴殿教授が米国 Keystone シンポジウム 'Cancer Metabolism' に参加されました。癌に対する免疫応答を現行よりも改善するためには癌細胞そのものの代謝経路を改変する必要性を感じてのことだったようです。癌細胞の代謝が変更を余儀なくされれば、癌組織による様々な免疫逃避機構に影響が出るのでは?ということでした。シンポジウムでは癌細胞の代謝を解糖系優位から TCA 回路へシフトさせる薬剤の一つにメトホルミンがあること、前立腺癌の患者でメトホルミン服用していた場合は生存期間が長いこと etc. が喧伝されていたそうです。理由はわかりませんでした。我

々は直に実験を開始し、一旦生着したマウスの腫瘍塊がメトホルミン服用で徐々に退縮するという驚愕の事実を目の当たりにします。そして後述するように、メトホルミンによる CD8 T 細胞の直接的な活性化という思いもよらない発見に繋がりました。ほぼ時を同じくして、免疫チェックポイント阻害剤(抗体医薬)が癌治療に変革をもたらすという時代が到来し、この騒動と相まってメトホルミン研究は一躍日の目を見ることになります。

メトホルミンはがん細胞の増殖を抑制する、メトホルミン服用糖尿病患者では、非服用群と比較して、多くの癌種でその発がん・がん死のリスクが軽減する¹⁾といった、多数の報告があることは実験開始後に初めて知りました。しかし、その抗腫瘍作用のメカニズムは不明だったわけです。研究が始まった当初、糖尿病患者は易感染性であることから、何らかの免疫低下、しいてはその免疫低下が糖尿病患者における癌増悪にも関与しているのではないかと考えておりました。

当時、immune exhaustion (免疫疲弊) というウイルス感染免疫で提唱された概念が、がん免疫においても重要であることが明らかにされつつありました。免疫疲弊とは、T細胞が繰り返す抗原刺激を受ける中で段階的に機能喪失する過程・状態を指します。疲弊T細胞は本来有している細胞増殖能、サイトカイン産生

能を失い、最終的にはアポトーシスにより死滅します。この過程でT細胞表面上に疲弊分子（免疫チェックポイント分子）が発現上昇し、疲弊分子とそのリガンドによる結合によりT細胞は更なる疲弊に陥ります。がん免疫の分野においても疲弊T細胞の機能を特異的阻害抗体により制御し、がん治療に活かそう、抗体療法を開発しようという流れがありました。現在では、抗PD-1抗体（ニボルマブ）や抗CTLA-4抗体（イピリムマブ）といった疲弊分子の阻害抗体により劇的な抗腫瘍効果が報告²⁾され、抗体による疲弊T細胞の機能制御はがん治療において大きなブレイクスルーとなりました。免疫学教室ではメトホルミンの抗腫瘍効果と腫瘍局所の免疫疲弊（免疫低下）を関連付けた研究を進め、結果として驚きの研究結果が得られました。

研究成果の内容

1. 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

最初に、メトホルミンが担癌マウスの免疫細胞に作用しているかどうかを明らかにするために、野生型BALB/cマウス、SCIDマウス（免疫不全マウス）を用いてRLmale1（マウス白血病細胞株）の腫瘍移植実験を行いました。腫瘍形成後、メトホルミンは自由飲水という形でマウスに投与しました。野生型マウスのメトホルミン投与群では明らかな腫瘍縮小効果が観察

されました。一方でSCIDマウスでは縮小効果が全く観察されませんでした。この結果から、メトホルミンは免疫細胞に作用し、腫瘍増殖を抑制する可能性が考えられました。次にメトホルミンの抗腫瘍効果においてどの免疫細胞が重要かを明らかにするために、CD8 T細胞（キラー細胞）、CD4 T細胞（ヘルパー細胞）を体内から除去する抗体を用いて同様の腫瘍移植実験を行いましたところ、CD8 T細胞除去抗体を投与した群ではメトホルミンの抗腫瘍効果が得られませんでした。以上の結果より、メトホルミンはCD8 T細胞の機能を介した抗腫瘍作用を有することが明らかとなりました。また、野生型マウスに発癌物質のメチルコラントレンを皮下投与し、メトホルミンを飲水しますと非飲水マウス群と比較して、顕著に発癌を抑制しました。これら実験には非糖尿病マウスを使用していますので、メトホルミンは血中の糖濃度とは無関係に移植腫瘍細胞の増殖、発癌を抑制したと考えられます。

2. メトホルミンは腫瘍浸潤CD8 T細胞上の疲弊分子の発現制御には影響しないが、細胞死を阻害、抗原特異的応答を維持する

メトホルミンがCD8 T細胞に作用する可能性を見出すことができたので、腫瘍局所のCD8 T細胞を解析してみようというのが次のステップでした。メトホルミン投与開始後3日目、6日目でRLmale1腫瘍組織を切除し、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）についてCD8 T細胞の割合、また同細胞上の疲弊分子PD-1、Tim-3の発

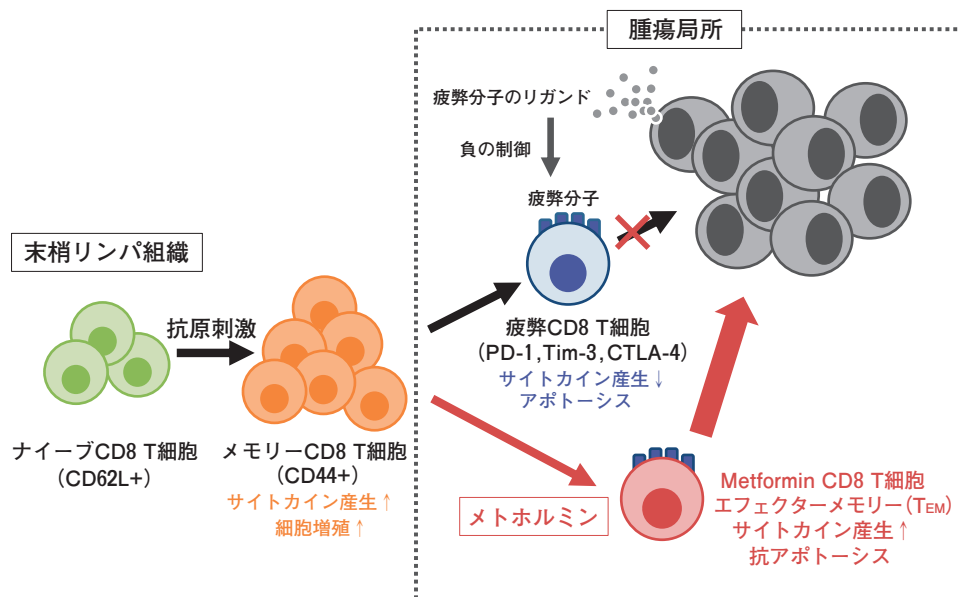


図 メトホルミンのCD8 T細胞を介した抗腫瘍作用

現割合をフローサイトメーターにより解析しました。疲弊分子の発現割合に変化があればということを目指しましたが、メトホルミン投与による変化は観察されませんでした。しかしながら、腫瘍内の CD8 T 細胞数は上昇しており、AnnexinV を用いて早期アポトーシス（細胞死）を検出しましたところ、メトホルミン投与マウスの TIL CD8 T 細胞において劇的な細胞死の減少が観察されました。また、メラノーマ細胞株 MO-5（OVA 抗原発現株）を用いて同様の腫瘍移植実験を行ったところ、メトホルミン投与により腫瘍局所には MO-5 腫瘍細胞を傷害することが可能な OVA 抗原特異的な CD8 T 細胞の割合が上昇し、多機能性（サイトカイン同時産生能）が維持されました。TIL 解析より、腫瘍局所の CD8 T 細胞は疲弊分子を発現し、その多くがアポトーシスを起こしていること、メトホルミン処置により細胞死が抑制され、疲弊分子が発現しているにも関わらずサイトカイン産生能が回復していることが明らかになりました。

3. メトホルミンは腫瘍浸潤 CD8 T 細胞においてエフェクターメモリー形質の T 細胞を誘導する

腫瘍環境下の CD8 T 細胞におけるメモリー T 細胞の分化・誘導については十分な解析がなされていないのが現状です。マウスにおけるウイルス感染の研究では、セントラルメモリー（central memory : T_{CM}, CD62L+CD44+）、エフェクターメモリー（effector memory : T_{EM}, CD62L-CD44+）の分類が提唱されています。このウイルス感染のメモリー T 細胞の知見を基に、RLmale1 および MO-5 腫瘍移植実験において、腫瘍浸潤 CD8 T 細胞におけるメモリー T 細胞形質を解析しました。メトホルミン非投与マウス群の腫瘍浸潤 CD8 T 細胞においては、大部分が T_{CM} の形質を示し、メトホルミン投与マウス群の同細胞は、T_{EM} の形質を示しました。またメトホルミンにより誘導された腫瘍局所の T_{EM} は非常に高い多機能性を示しました。

4. メトホルミンの抗腫瘍作用において抗原特異的 CD8 T 細胞の AMPK 活性化が重要

メトホルミンの標的分子はミトコンドリアの呼吸鎖 complex I であることが知られています。メトホルミンは complex I の阻害を介して ATP 合成を抑制します。その結果、AMP/ATP 比が上昇し、AMPK（AMP キナーゼ）が活性化します。以上から、CD8 T 細胞における AMPK 活性化がメトホルミンの抗腫瘍効果に必要なかどうかを検討しました。OVA 抗原特異的 TCR

トランスジェニックマウス OT-I の脾臓から単離した CD8 T 細胞（CD45.1+）を *in vitro* でメトホルミン、AMPK 阻害剤 Compound C 存在下、非存在下で培養し、MO-5 担癌マウス（CD45.2+）に養子移入しました。移入後 2 日目に腫瘍組織を回収し、MO-5 腫瘍組織に浸潤した OT-I の割合とサイトカイン産生能をフローサイトメーターにより解析しました。メトホルミン処置した OT-I CD8 T 細胞においては未処置の OT-I CD8 T 細胞と比較して優位な浸潤が観察されました。また、Compound C 処置によりその浸潤が消失しました。メトホルミン処置した OT-I CD8 T 細胞は、腫瘍局所で非常に高いサイトカイン産生能を示しました。以上より、CD8 T 細胞の AMPK 活性化がメトホルミンの抗腫瘍作用に必要なことが示唆されました。

研究成果の意義

2013年、悪性黒色腫患者においてニボルマブ、イピリムマブを用いた臨床試験が行われ、劇的な治療効果が報告されました。2014年9月には米食品医薬局（FDA）は米国で初めての承認となる抗PD-1抗体製剤を進行もしくは切除不能の悪性黒色腫の治療薬として承認しました。その後、進行扁平上皮肺がん、非小細胞肺癌に対しても承認されました。国内でも2014年7月製造販売が承認され、9月小野薬品工業から販売が開始されました。現在では、抗PD-1抗体と既存の治療を併用することで更なる治療効果が得られる可能性がある併用療法の開発が進んでいます。疲弊分子の阻害抗体によるがん治療はまさにブレイクスルーであると言えます。しかしながら、別の問題も生じております。それは薬価です。

本研究では、マウスの腫瘍移植実験ではありますが、2型糖尿病薬メトホルミンにより疲弊分子阻害抗体治療と非常に似通った効果が得られたと考えております。メトホルミンは非常に安価な薬剤であるため、本研究で得られたような CD8 T 細胞の機能を介した抗腫瘍作用がヒトの臨床研究においても明らかになれば、多くの患者に提供可能な治療薬に成る可能性があります。疲弊分子阻害抗体との併用も考えられ、併用により抗体使用量の軽減も可能になるかもしれません。また腫瘍局所の CD8 T 細胞の機能調節が可能であることから、既存の CD8 T 細胞活性型の免疫療法（がんワク

チン、樹状細胞ワクチン、細胞移入療法など)の効果を劇的に変えることができる可能性もあります。現在は、メトホルミンが作用したCD8 T細胞内で何が起きているのか?つまりメトホルミンのCD8 T細胞における作用機構を解明する研究を進めています。メトホルミンの抗腫瘍作用の分子メカニズムが明らかになれば、別の強力な疲弊T細胞の機能回復薬を創る創薬にも繋がることも期待されます。

今後の展開や展望

上述の通りメトホルミンの標的分子はミトコンドリアの呼吸鎖 complex I であり、メトホルミンは complex I の阻害を介して ATP 合成を抑制します。その結果、AMPK が活性化します。活性化 AMPK は糖、脂肪酸、アミノ酸代謝などの様々な細胞内代謝を調節します。近年、T細胞分化と代謝に関する研究が盛んに行われ、メモリーT細胞の分化、活性化には細胞内代謝調節が非常に重要であることが報告されています。このようなメモリーT細胞分化と代謝の報告から、AMPK の活性化を介した CD8 T 細胞内代謝調節、また代謝調節によるエフェクターメモリーの誘導が、メ

トホルミンの抗腫瘍作用には重要ではないかと考えられます。今後は、メトホルミンによる CD8 T 細胞の代謝変化に焦点を当てて研究を進めたいと考えています。また、メトホルミンの CD8 T 細胞機能を介した抗腫瘍作用、また将来的にヒトの治療に応用することを意識して、マウス腫瘍モデルにおいてメトホルミンと既存の免疫療法の併用効果を明らかにしていきたいと思えます。

文 献

- 1) Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD : Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* (2005) 330, 1304-1305.
- 2) Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, et al. : Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* (2013) 369, 122-133.

平成27年9月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7188 FAX：086-235-7193

E-mail：eikawa@cc.okayama-u.ac.jp