

2 型糖尿病薬メトホルミンの制御性 T 細胞抑制による抗腫瘍効果

國定 勇希

Metformin induced anti-tumor effect through  
suppression of regulatory T cell function.

Yuki KUNISADA

(平成 27 年 12 月 14 日受付)

## 緒 言

腫瘍の治療方法として、手術による外科療法、抗癌剤などによる化学療法、放射線治療に加えて、近年では腫瘍免疫療法が新たな治療方法として注目されている。腫瘍環境には様々な免疫細胞が認められており (1, 2), その中に免疫抑制に働きかける細胞も混在しており, 制御性 T 細胞 (Regulatory T cell : Treg) もそのうちの一つである。Treg はヒト末梢血 CD4T 細胞にわずか 10%程度しか存在しない細胞であるが, 免疫抑制の機能を持っており, 自己抗原応答に対する免疫寛容の他, 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ホメオスターシスの維持という重要な役割を担っている (3-7)。しかし, 腫瘍環境においては CD8T 細胞をはじめ, NKT 細胞, 樹状細胞, 単球/マクロファージなどの抗腫瘍活性を有する細胞の活性を抑制することが報告されており (8-13), その結果, 腫瘍増殖を促進すると言われている (14-16)。癌種によっては腫瘍環境において制御性 T 細胞が有意に増加することが知られており (17, 18), Treg を抗体などで除去すると, 腫瘍の増殖を抑制するという報告もされている (19-21)。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可能性がある (22)。従い, 腫瘍局所に限局した Treg の除去が望ましく, 今後の課題となっている。

メトホルミンは 2 型糖尿病薬として世界で最も多く使用されており, 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に比較し, 発癌率, 癌死が有意に減少したという報告がある (23-25)。マウスでは既にメトホルミンが腫瘍内に浸潤している CD8T 細胞を活性化させ, 抗腫瘍効果を認めることが報告された (26)。同時に腫瘍に浸潤した CD8T 細胞のアポトーシスも抑制されているため, メトホルミンが CD4T 細胞, 特に Treg の活性を腫瘍局所で抑制しているのではないかと考え, マウスモデルにおいて脾臓, 腫瘍所属リンパ節, 腫瘍浸潤 Treg に対するメトホルミンの影響についてフローサイトメーターを用いて解析した。また, メトホルミンが Treg を誘導

時に直接的な作用があるかを確認するために、ex vivo でメトホルミン処置と非処置で比較を行い、メトホルミンの Treg への直接的な作用を確認した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

BALB/c 雌 8-10 週齢マウス (CLEA) 20 匹の右背部に RLmale1 (Leukemia)  $2.0 \times 10^5$  の皮内注射を行い、腫瘍を移植した。移植後 7 日目からコントロール群とメトホルミン群に分け、メトホルミン群では餌に 0.5% のメトホルミンを添加し、自由摂取させた。移植後、10 日目、13 日目にそれぞれの群のマウスを頸椎脱臼させ、脾臓、腫瘍所属リンパ節、腫瘍を回収した。

### 2. T 細胞の回収

それぞれの組織を回収し、コントロール群、メトホルミン群のそれぞれ 5 匹の脾臓、腫瘍所属リンパ節、腫瘍をそれぞれ混合した。脾臓は赤血球を取り除き、腫瘍所属リンパ節と腫瘍は medicon® と medimachine® (アズワン) を用いて、ホモジナイズを行い、細胞を回収した。

### 3. 染色と解析

フローサイトメーター解析には表 1 の蛍光標識抗体を使用した。表面抗体には CD3, CD4, CD25 を、細胞死の確認には AnnexinV を使用した。Treg の特異的遺伝子である細胞核内転写因子の Foxp3 (forkhead box P3) 染色には Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) を用いて行った。細胞分裂の確認には CFSE (Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimidyl ester) を用いた。CFSE の染色は 0.1% BSA/PBS で洗浄後、37℃で事前に温めておいた同じバッファーに CFSE (10 $\mu$ M) を加え、20 分間培養後、急冷し、洗浄して染色を行った。細胞の解析は BD FACS CANTO II を用いて行い、データは Flow Jo (トミーデジタル) で処理した。

#### 4. T細胞の単離とTreg誘導

ナイーブ CD4T 細胞 (CD4+CD25<sup>-</sup>) は BALB/c マウスの脾臓から anti-mouse CD25 (BD Biosciences) と anti-mouse CD4 (Miltenyl Biotec) を用いて分離した (図 5A, CD4+CD25<sup>-</sup> >95%)。分離後メトホルミン処置 (10 $\mu$ M) と非処置に分け, 6 時間培養した後, CFSE で細胞分裂を確認できるように染色を行い, 固相化した anti-CD3 抗体 (3mg/ml) と可溶性 anti-CD28 抗体 (2mg/ml), TGF- $\beta$  (0 or 2.5 or 5ng/ml) を RPMI 培地 (10%FBS, ピルビン酸, ペニシリン/ストレプトマイシン, HEPES,  $\beta$ -メルカプトエタノール含有) で 72 時間刺激培養し, 細胞を 1/3 にして新しい培地で hIL-2 (5IU) を加え, 48 時間培養して Treg を誘導した。

### 結 果

#### メトホルミンは腫瘍組織内の Treg の細胞死を誘導する

RLmale1 を移植して, 7 日目からメトホルミンを経口投与した結果, メトホルミン投与群では有意に腫瘍の増殖が抑制された (図 1)。この結果は以前, 榮川らによって行われたメトホルミン 5mg/ml の自由飲水の結果と同様であった (26)。Treg の分化や機能には Foxp3 遺伝子の発現が必要であり, Foxp3 は Treg の特異的マーカーであると報告されている (27-30)。今回の実験では, 主に CD4+CD25<sup>+</sup> で Treg と称しているが, 実際に, 脾臓, 腫瘍所属リンパ節, 腫瘍浸潤 Treg において, CD4+CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>  $\equiv$  CD4+CD25<sup>+</sup> であったため (図 2, 腫瘍所属リンパ節は省略), CD4+CD25<sup>+</sup> を Treg とした。マウスに腫瘍を移植して 10 日目, 13 日目にマウスの脾臓, 腫瘍所属リンパ節, 腫瘍浸潤 Treg を回収し, フローサイトメーターで解析を行った。腫瘍の増殖には有意差が認められたが脾臓組織内, 腫瘍所属リンパ節内の Treg/CD4T 細胞の割合はメトホルミン処置群とコントロール群で変化が認められなかった (図 3A)。しかし, 腫瘍局所に浸潤した Treg/CD4T 細胞の割合はメトホルミン処置群で減少していた。また, それらの Treg の細胞死を

AnnexinV による染色で確認したところ、脾臓、リンパ節では変化が認められなかったが、メトホルミン処置を行った腫瘍に浸潤した CD4T 細胞、特に Treg において高割合の AnnexinV 陽性が認められた (図 3B)。図 3A のメトホルミンによる Treg/CD4T 細胞割合の減少は図 3B の結果であることが示唆された。腫瘍局所には胸腺由来の内在性の制御性 T 細胞 (Naturally Occurring Regulatory T cell : nTreg) ナイーブ CD4T 細胞 (CD4+CD25-) から誘導される誘導性 T 細胞 (Inducible Regulatory T cell : iTreg) が存在すると言われている (15, 31)。今回の実験では末梢の脾臓、腫瘍所属リンパ節における Treg には特に影響を認めなかったため、Treg/CD4T 細胞割合の変化は nTreg ではなく、iTreg の減少かを確認するために、またメトホルミンが直接 Treg へ作用しているかを確認するために、ex vivo で実験を行った。

#### メトホルミンは誘導性 Treg の増殖を阻害し、non Treg の増殖を促進する

iTreg の誘導には TGF- $\beta$  が必要であり、また腫瘍局所では TGF- $\beta$  の産生も認めると報告されている (16)。そこで、vivo の腫瘍環境を模倣して図 4 のように実験を組み、BALB/c マウスの脾臓からナイーブ CD4T 細胞を分離し、iTreg の誘導にメトホルミンがどのような影響を与えるか実験を行った。メトホルミンで 6 時間培養したのみでは、Foxp3 の発現や CD25 の発現は認められなかった (図 5A)。その後、刺激培養を加えて 5 日後にフローサイトメーターで解析を行った。細胞分裂した細胞はメトホルミンの有無では変化は認めず、TGF- $\beta$  濃度が増加するに従って、やや分裂が減少していた (図 5B)。これは TGF- $\beta$  によって、細胞分裂が抑制されたと思われる (32)。TGF- $\beta$  非存在下では Foxp3 の発現はほぼ認められず、濃度が増加するにつれて Treg の特異的遺伝子である Foxp3 の発現の増加が認められたが、メトホルミン処置をした CD4T 細胞では Foxp3 の発現量がコントロール群と比較して少なかった (図 5C)。メトホルミン処置をすることにより、iTreg のみならず、Foxp3 (-) の non Treg の誘導が認められ、相対的に Foxp3 (+)

の Treg 発現量が減少した。これらから、メトホルミンによって処置することにより、iTreg の相対的な減少が認められた。

## 考 察

in vivo, in vitro の結果より、メトホルミンは Treg に直接作用するというよりは、むしろ iTreg の誘導を抑制することが示唆された。特に、脾臓あるいは、腫瘍に近接しており T 細胞プライミングの場であると言われている腫瘍所属リンパ節では特に影響を認めず、腫瘍局所でのみ Treg の細胞死が誘導された。これは、腫瘍局所の特殊な環境におけるサイトカインや細胞間での刺激によって、Treg が誘導あるいは活性化され、その時にメトホルミンの作用が発現しているのではないかと思われる。実際に、in vitro で iTreg を誘導する前にメトホルミンで処置を行うことによって、Foxp3 (-) の non Treg が高頻度に誘導された。

メトホルミンの標的分子はミトコンドリアの呼吸鎖 complexI であることが報告されており (33), complexI の阻害により ATP 合成を抑制し、AMP/ATP を上昇させ、AMPK 分子を活性化する (34, 35)。活性化した AMPK は糖代謝、脂質代謝を含め様々な代謝経路を調節する (36)。近年、T 細胞をはじめ多くの免疫細胞の分化、機能には代謝制御が非常に重要であることが明らかとなっている (37)。エフェクター T 細胞の分化、機能には糖代謝が重要であり (37), Treg の機能・誘導には脂肪酸酸化 (Fatty acid oxidation) が関与していることが報告されている (38)。さらに、Michalek らは、nTreg, iTreg の両細胞で AMPK の活性が高いことを示し、in vitro のメトホルミン処置により T 細胞において脂肪酸化が亢進することを明らかにしている (38)。喘息モデルにおいては、メトホルミンは Treg の増殖を促進するとの報告もある (38)。以上の報告は、今回得られたメトホルミン処置担癌マウスの腫瘍内 Treg の細胞死による減少とは相反する結果であると考えられる。しかしながら、メトホルミンにより AMPK 活性を高められた Treg もし

くは Treg の前駆細胞が腫瘍内でどのような動態を示すかは不明である。特に代謝の観点から考察すると、炎症組織と腫瘍内では脂質や糖の構成が違い、同様の細胞集団が機能しているとは考えられない。炎症部位では Th1 や Th17 が、腫瘍局所では iTreg の誘導が報告されている (39)。Treg は一般的に TCA 回路による酸化的リン酸化によってエネルギーを得るが、Th1 や Th17 は解糖系によりエネルギーを得ると報告されている (38, 40)。TCA 回路を亢進するアセチル CoA は解糖系の代謝産物であるピルビン酸からも生成され、ピルビン酸からアセチル CoA 代謝を促進する酵素である PDH により、より Treg が誘導されると報告されている。一方、PDH を阻害する酵素である PDHK により、ピルビン酸から乳酸が生成され Th17 への誘導が促進すると報告されている (41)。今回の実験により、メトホルミン処置によって Treg 以外の non Treg 細胞が誘導されているメカニズムはまだ不明であるが、今後は腫瘍内の Treg の代謝制御に焦点を当て、研究を進めていく必要があると考えられる。しかし、Treg の割合が減少することは、in vivo, in vitro の系でも同様に認められ、それが抗腫瘍作用の一部を担っていることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導と御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科免疫学分野、鵜殿平一郎教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野、佐々木朗教授に深甚なる敬意と感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導・御助言下さいました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科免疫学分野、榮川伸吾助教に心から感謝の意を表します。さらに、様々な面で多くの貴重な御援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科免疫学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. *Cancer research*. 2012;72(13):3125-30.
2. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.
3. Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Current opinion in immunology*. 2001;13(6):644-9.
4. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(2):287-96.
5. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*. 1995;155(3):1151-64.
6. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*. 2004;22:531-62.
7. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
8. Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, et al. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of*

- leukocyte biology. 2007;81(1):144-53.
9. Lim HW, HILLSAMER P, BANHAM AH, KIM CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Journal of immunology. 2005;175(7):4180-3.
  10. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress NKT cell functions. Cancer research. 2003;63(15):4516-20.
  11. Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Human immunology. 2005;66(3):222-30.
  12. Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. Seminars in immunology. 2004;16(2):81-8.
  13. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nature reviews Immunology. 2004;4(11):841-55.
  14. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(51):18538-43.
  15. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. Frontiers in immunology. 2013;4:190.
  16. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-

- secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. The Journal of experimental medicine. 2005;202 (7) :919-29.
17. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nature reviews Immunology. 2006;6 (4) :295-307.
18. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4+CD25- T Cells into CD4+CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- The Journal of Immunology. 2007;178 (5) :2883-92.
19. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. Journal of immunology. 1999;163 (10) :5211-8.
- 20.utmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. The Journal of experimental medicine. 2001;194 (6) :823-32.
21. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. Cancer research. 1999;59 (13) :3128-33.
22. Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gistera A, Strodthoff D, Ketelhuth DF, et al. Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. The Journal of clinical investigation. 2013;123 (3) :1323-34.

23. Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2012;7 (3) :e33411.
24. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2009;32 (9) :1620-5.
25. Mei ZB, Zhang ZJ, Liu CY, Liu Y, Cui A, Liang ZL, et al. Survival benefits of metformin for colorectal cancer patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9 (3) :e91818.
26. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112 (6) :1809-14.
27. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology*. 2007;8 (12) :1353-62.
28. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, NY)*. 2003;299 (5609) :1057-61.
29. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*. 2007;446 (7136) :685-9.
30. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*.

2003;4 (4) :330-6.

31. Zhou G, Levitsky HI. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *Journal of immunology*. 2007;178 (4) :2155-62.
32. Thomas DA, Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*. 2005;8 (5) :369-80.
33. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*. 2000;348 Pt 3:607-14.
34. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108 (8) :1167-74.
35. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277 (28) :25226-32.
36. Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochemical Society transactions*. 2003;31 (Pt 1) :162-8.
37. Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annual review of immunology*. 2014;32:609-34.
38. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic

programs are essential for effector and regulatory CD4<sup>+</sup> T cell subsets.

Journal of immunology. 2011;186 (6) :3299-303.

39. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity. 2006;24 (6) :677-88.
40. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., Faubert B, Villarino AV, O'Sullivan D, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell. 2013;153 (6) :1239-51.
41. Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, Macintyre AN, Inoue M, Ilkayeva O, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4<sup>+</sup> T cell subsets and inflammation. The Journal of clinical investigation. 2015;125 (1) :194-207.

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 免疫学

(主任：鵜殿 平一郎教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔顎顔面外科学分野

(主任：佐々木 朗教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 19 回 日本がん免疫学会総会 (2015 年 7 月)

第 74 回 日本癌学会学術総会 (2015 年 10 月)

第 44 回 日本免疫学会学術集会 (2015 年 11 月)

# 表1

表1 本研究で使用了抗体

| Antibody | Clone   | Fluorescent labeling | Company     |
|----------|---------|----------------------|-------------|
| AnnexinV | -       | PE, FITC             | BioLegend   |
| CD3      | 17A2    | BV510                | BioLegend   |
| CD4      | RM4-5   | PE-Cy7               | BioLegend   |
| CD25     | PC61    | BV421                | BioLegend   |
| Foxp3    | FJK-16S | APC                  | eBioscience |

図1

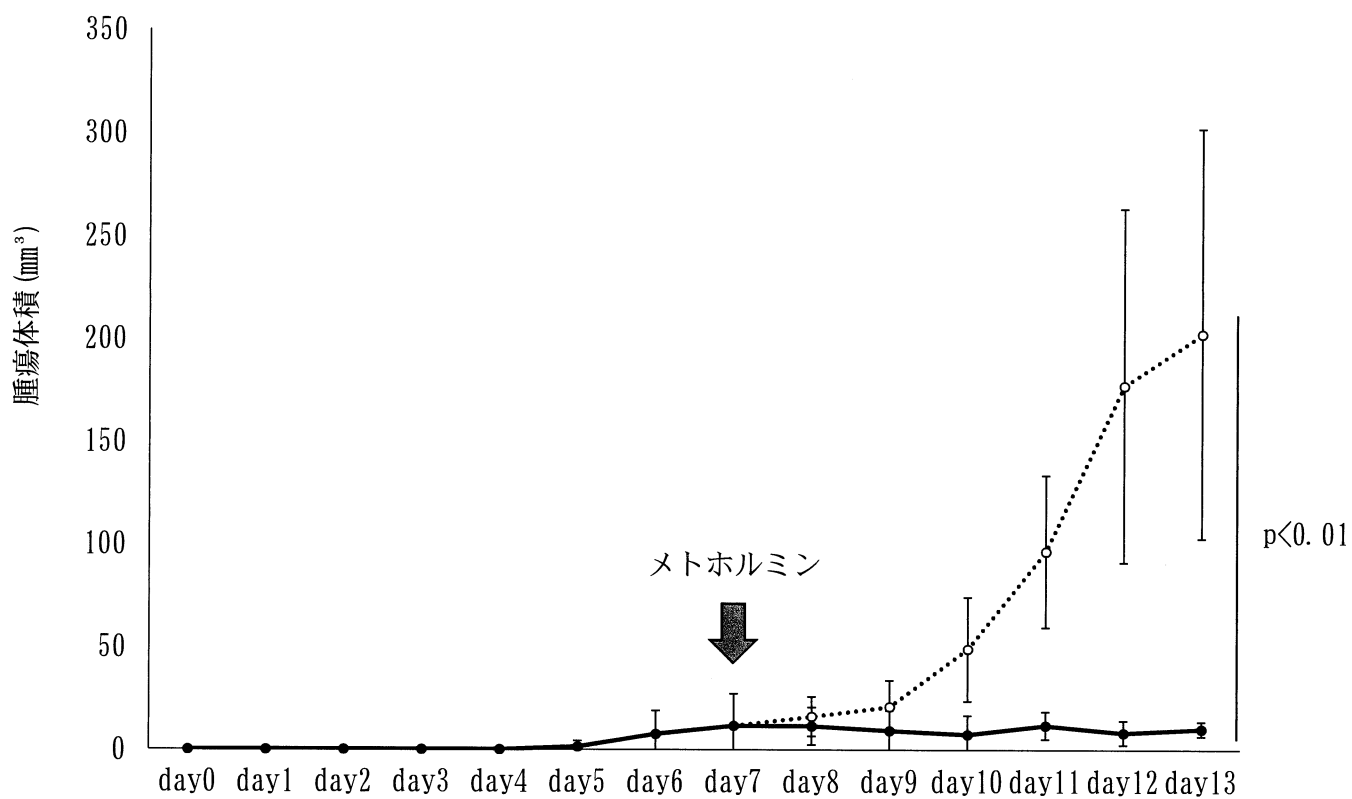


図1 メトホルミンは腫瘍増殖を抑制する

BALB/cマウスの右背部に $2.0 \times 10^5$ のRLmale1を皮内注射して腫瘍移植した。移植後、day7から0.5%メトホルミン含有のエサを投与する群としない群に分けた。腫瘍径を毎日計測し、腫瘍体積 $=1/2 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$ で計算し、標準誤差で表示した。

(各群n=5, 点線：コントロール群；実線：メトホルミン群)

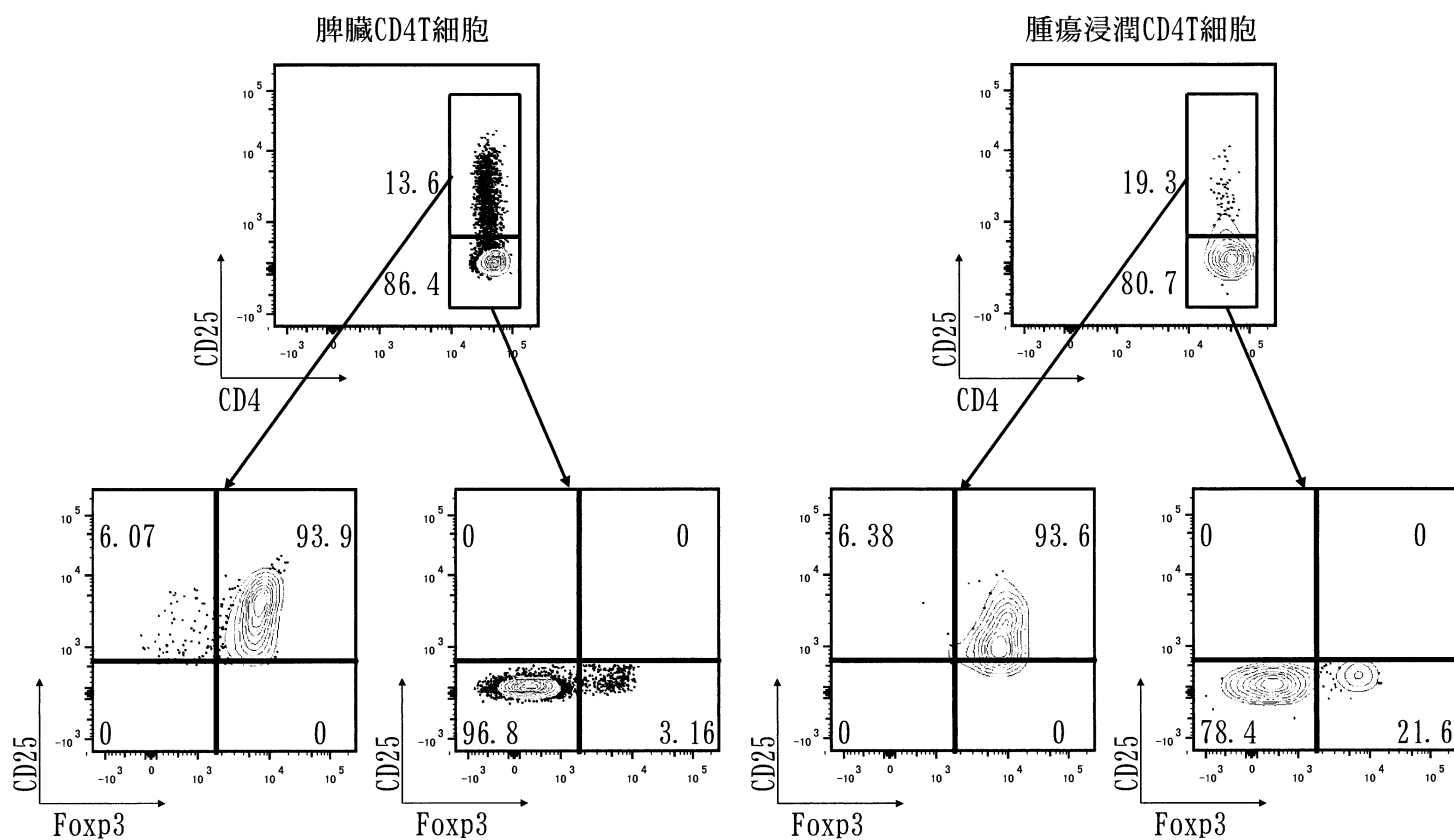
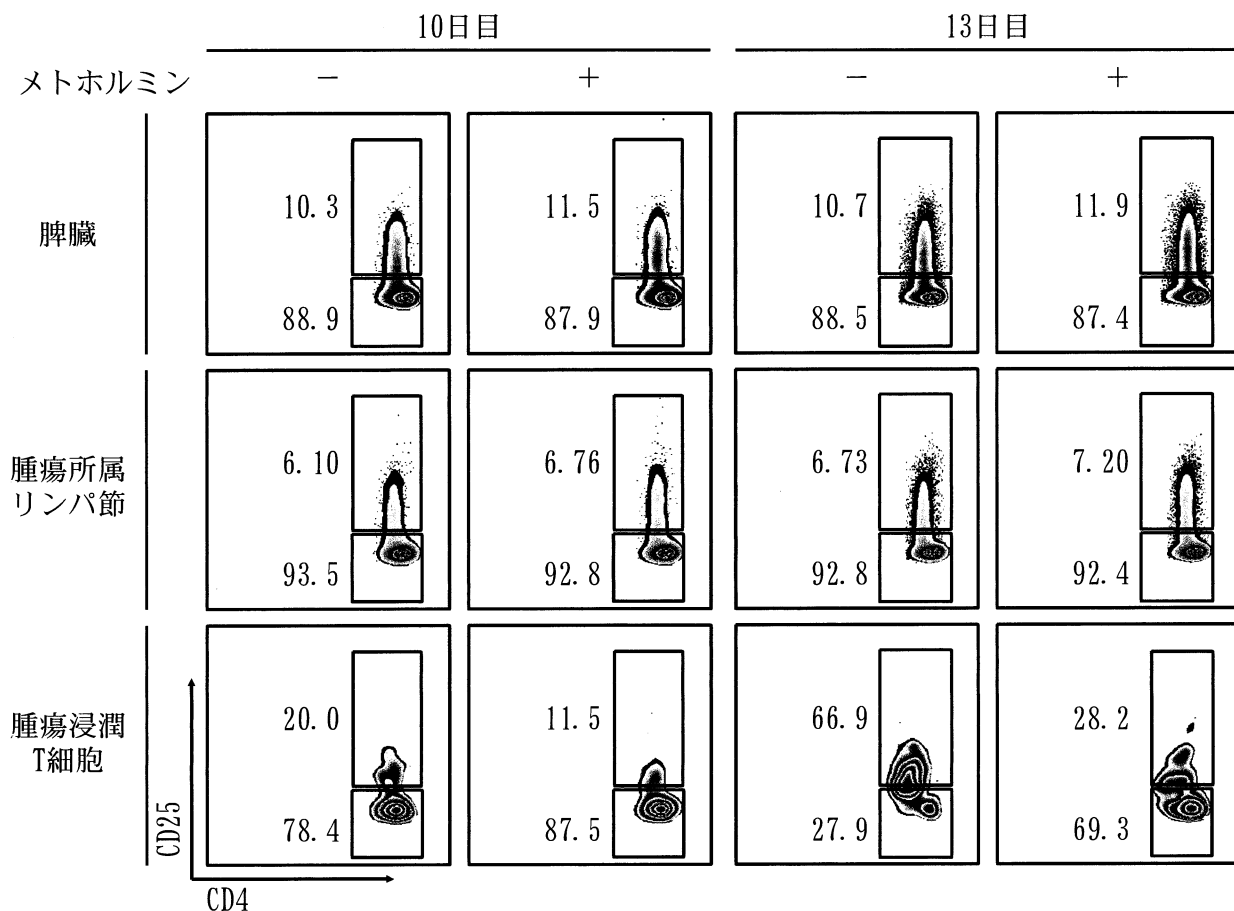


図2 CD4+CD25<sup>+</sup>T細胞は脾臓，腫瘍浸潤T細胞ともに制御性T細胞 (Foxp3+CD25<sup>+</sup>) である

担癌BALB/cマウスの脾臓T細胞，腫瘍浸潤T細胞を回収し蛍光標識抗体で染色後，フローサイトメーターで解析し，データをFlowJoを用いて処理した。CD3T細胞，単一細胞，リンパ球にgateし，CD4とCD25で表示した。

図3

A



B

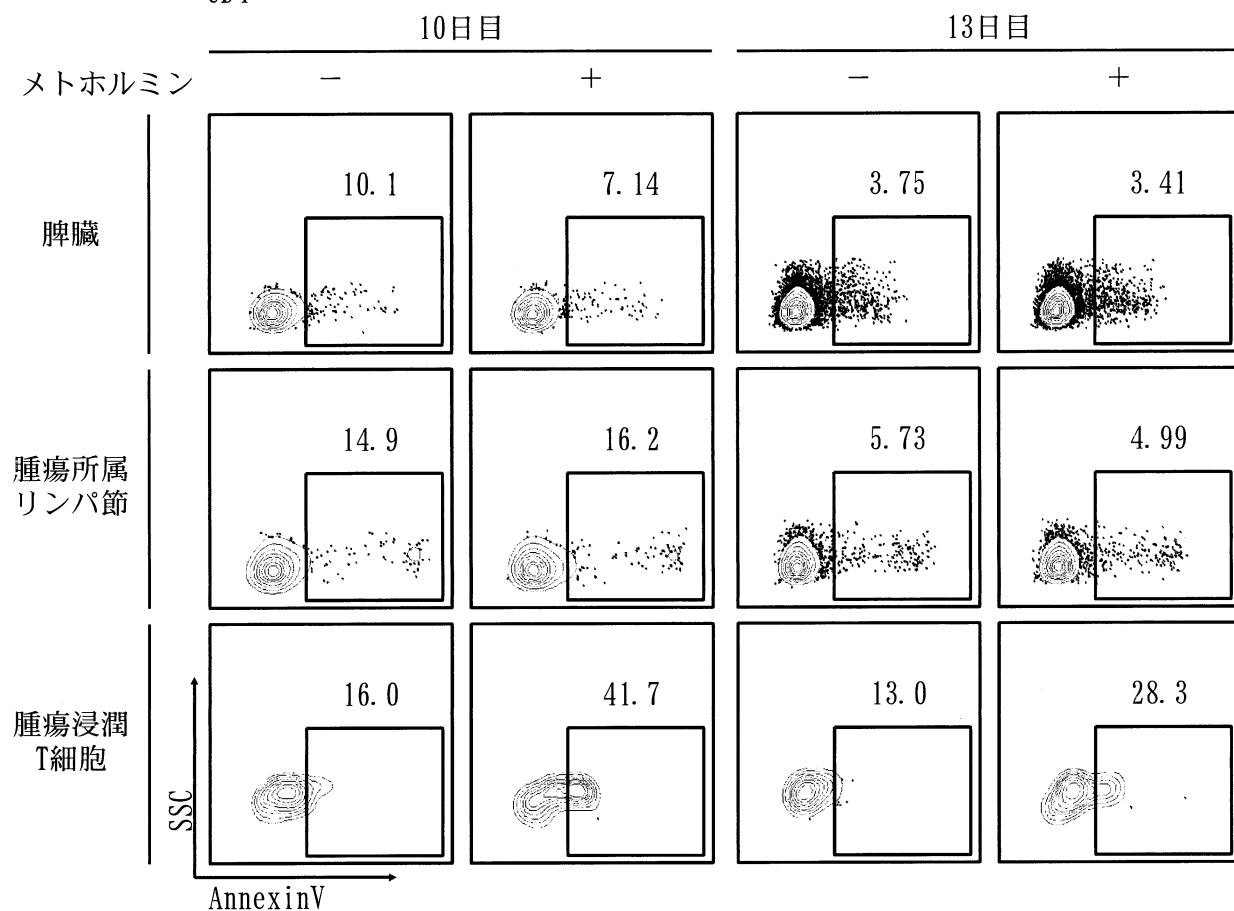


図3 メトホルミンは腫瘍局所のTregの細胞死を誘導し、Treg/CD4T細胞の割合を減少させる  
 コントロール群とメトホルミン群の担癌BALB/cマウスの脾臓、腫瘍所属リンパ節、腫瘍浸潤T細胞を回収し、それぞれを混合した。それぞれ蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。CD3T細胞、単一細胞、リンパ球、CD4T細胞にgateし、CD4とCD25で展開した(A)。(A)の制御性T細胞をAnnexinVで展開した(B)。

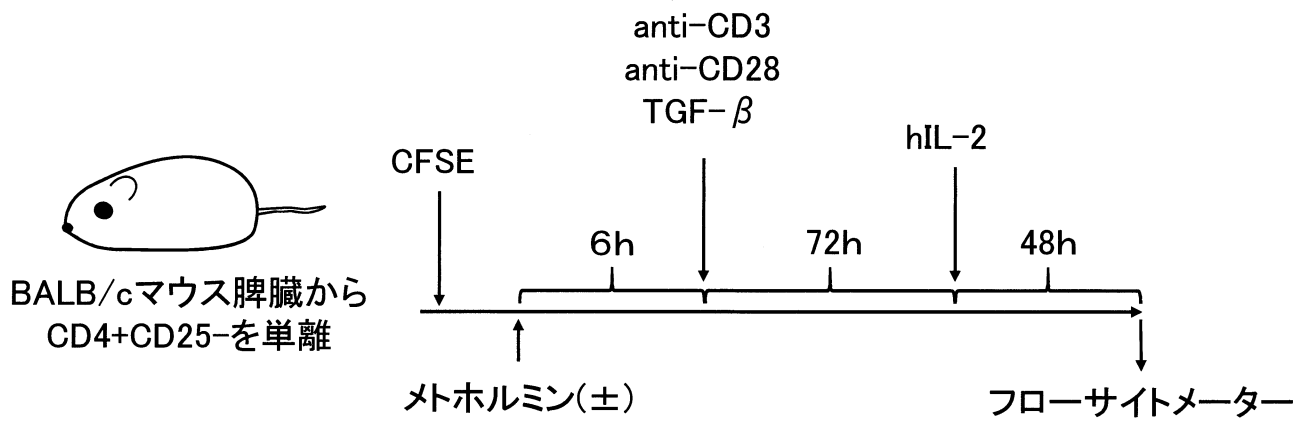


図4 in vitroの実験系

図5

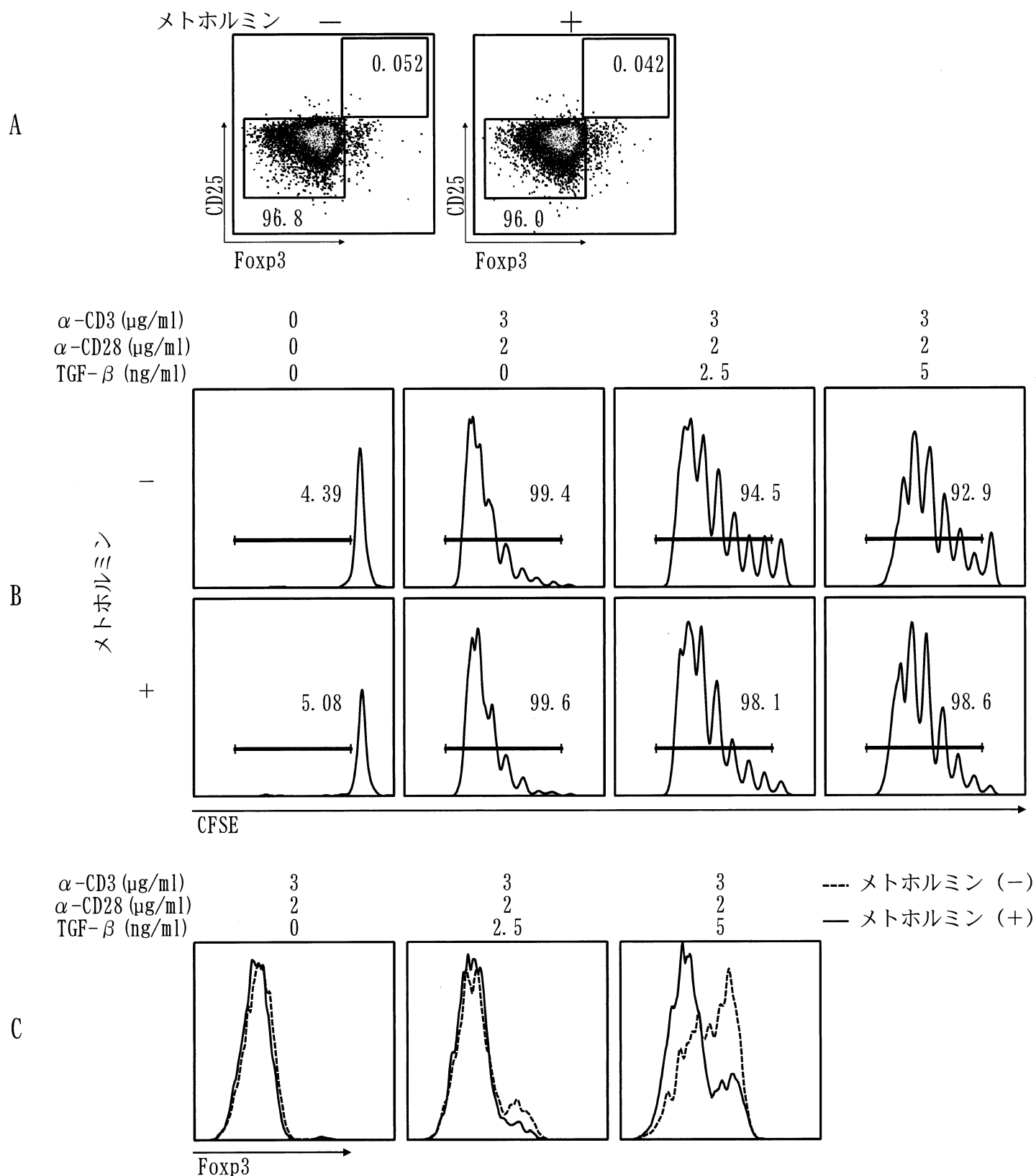


図5 メトホルミンはナイーブCD4T細胞から誘導性Tregの分化を抑制する

BALB/cマウスの脾臓を回収し、赤血球を除去してCD25<sup>+</sup>T細胞をマグネットビーズで除去した。その後、CD4<sup>+</sup>T細胞をマグネットビーズで回収した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞を単離し、CFSEで染色後、メトホルミン (10μM) ±で6時間培養した。培養後、蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した (A)。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T細胞にそれぞれ刺激培養を行い、72時間後に細胞を回収し洗浄して、IL-2単独でさらに48時間刺激培養を行い、その後同様にフローサイトメーターで解析した。単一細胞、リンパ球、CD4<sup>+</sup>にgateしてCFSEで表示し、細胞分裂を確認した (B)。Bの細胞分裂している細胞にgateして、Foxp3の発現を確認した (C)。