

# 主論文

## Metformin induces CD11b<sup>+</sup> cell-mediated growth inhibition of an osteosarcoma: implications for metabolic reprogramming of myeloid cells and antitumor effects

(メトホルミンによる CD11b 陽性細胞を介した骨肉腫増殖抑制作用: 骨髄球系細胞の代謝制御と抗腫瘍効果の関係)

### [緒言]

骨髄球系細胞(CD11b 陽性細胞)は骨髄由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)や腫瘍関連マクロファージ(tumor-associated macrophages, TAMs)を含み、腫瘍微小環境を構成する。MDSCs と免疫抑制性 TAMs はさらに腫瘍内へ制御性 T 細胞を誘導し、これらが T 細胞を介した抗腫瘍免疫の主要な抑制因子となる。

MDSCs は polymorphonuclear-MDSC(PMN-MDSC, CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>)と monocytic-MDSC (Mo-MDSC, CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>)に大別される。未熟骨髄球はマクロファージ、好中球、樹状細胞などへ分化するが、腫瘍存在下ではその分化が阻害され、結果的に MDSCs が増殖する。腫瘍局所は低酸素環境であるため骨髄系細胞が集まり、そこで MDSCs は活性酸素種(reactive oxygen species, ROS), inducible NO synthase (iNOS), arginaseなどを産生しエフェクター T 細胞の機能を抑制する。

マクロファージは一般に M1(activated)と M2(alternatively activated)に大別され、M1 は炎症性、M2 は抗炎症性や組織修復といった用語でその機能が表現される。TAMs は M2 マクロファージと似た機能を有し vascular endothelial growth factor (VEGF) や interleukin(IL)-10 を産生し腫瘍増殖を促進するため、TAMs の増加はがん患者の予後不良因子の一つとされる。逆に M1 様マクロファージは tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ), IL-12などを産生し腫瘍抵抗性を発揮するため、TAMs の減少あるいは再分化の誘導は新規治療開発のターゲットとなる。

T 細胞と同様、自然免疫細胞もその機能と分化が細胞内代謝と密接に関係する。M1 様マクロファージでは Lipopolysaccharide(LPS)と type1 interferon(IFN)による刺激が、酸化リン酸化(oxidative phosphorylation(OXPHOS))から解糖系(glycolysis)への代謝転換を惹起する。逆に M2 様マクロファージでは OXPHOS が亢進し、TNF $\alpha$  産生の減少と IL-10 産生の増加を示す。このような細胞内代謝を制御することで、腫瘍免疫の抑制的な性質が変化する可能性がある。我々は先行研究において 2 型糖尿病薬メトホルミン (metformin, Met) が腫瘍浸潤 CD8T 細胞(tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes, CD8TILs)の免疫疲弊を解除し、腫瘍増殖を抑制することを複数の同系腫瘍モデルにおいて報告した。CD8TILs は Met により central memory T cells(CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>high</sup>)から effector memory T cells(CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>)へ移行し、これは Met による OXPHOS から glycolysis への代謝リプログラミングによると考えられた。さらに Treg では Met が glycolysis の亢進と mTORC1 経路の活性化をもたらし、アポトーシスを誘導することを報告した。今回、CD11b 陽性の骨髄系細胞、特に MDSCs と TAMs に着目し、その発生と機能に対する Met の効果を同系骨肉腫モデルにて評価した。骨肉腫モデルでは T 細胞機能が欠損した SCID マウスであっても Met の腫瘍の成長抑制効果が保たれ、抗 CD11b 抗体の投与によりそれが消失した。Met により腫瘍と脾臓の双方で MDSCs、特に PMN-MDSC が減少し、さらに M2 様マクロファージも減少した。代謝評価では Met により CD11b 陽性細胞の OXPHOS が低下し、この代謝リプログラミングが MDSCs, TAMs の変化に関与したと考えられた。

### [材料と方法]

#### 動物実験

8 週齢 Balb/c あるいは SCID マウスの皮下に骨肉腫細胞株(K7M2neopCl, 4×10<sup>5</sup>cells)を接種し、day7 より Met 5mg/ml あるいは水を投与し腫瘍体積を計測した。T 細胞、CD11b 陽性細胞除去試験では抗 CD4、抗 CD8 あるいは抗 CD11b 抗体 100 $\mu$ g を 4-5 日おきに静注した。線維肉腫株 MethA も同時に投与し腫瘍体積を比較した。Day35 にて腫瘍と脾臓を摘出し重量を計測した。

#### 細胞増殖アッセイ

96well プレートに K7M2neo 5×10<sup>3</sup> cells/100 $\mu$ L で蒔き、Met を 0-10mM で添加した。48 時間培養の後細胞増殖評価試薬(WST-1) 10 $\mu$ L を 120 分反応させ、450nm 波長の吸光度を計測した。

#### フローサイトメリー

腫瘍および脾臓を細片化し細胞懸濁液を作成した。1×10<sup>6</sup> cells に調製し各種蛍光抗体を用い表面抗原を染色した。マクロファージのサイトカイン測定では腫瘍由来の細胞懸濁液をLPS 1μg/mlおよびIFN gamma(γ) 10 ng/mlの存在下で24時間培養し、モノニン添加後LPS 1μg/ml, IFNγ 10ng/mlおよびIL-4 10 ng/mlにて6時間刺激した。表面抗原および細胞内サイトカインを蛍光抗体で染色しフローサイトメーターFACSCantollで蛍光を測定、FlowJoソフトウェアにてデータ解析を行った。

#### 細胞内 reactive oxygen species(ROS)の測定

腫瘍および脾臓の細胞懸濁液を1×10<sup>6</sup> cells に調製、表面抗原の染色後20 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)を添加し、20分間37°Cで反応させDCFDAの蛍光(FITC)をFACSCantollで測定した。

#### CD11b 陽性細胞の代謝解析

腫瘍および脾臓から磁気ビーズを用いてCD11b 陽性細胞を単離し細胞外フラックスアナライザー(seahorse analyzer)のMito Stress Test protocolを実施した。酸素消費速度(oxygen consumption rate, OCR)と細胞外酸性化速度(extracellular acidification rate, ECAR)を測定した。

#### CD11b<sup>+</sup>細胞の糖および脂肪酸の取り込み解析

腫瘍から細胞懸濁液を作成し、グルコースの蛍光(FITC)アナログ 2-NBDG および脂肪酸の蛍光(PE)アナログ BODIPY を15分間取り込ませ、MDSCs, TAMs への取り込みをFACSCantollで評価した。

### [結果]

#### Met による CD11b 陽性細胞を介した骨肉腫の成長抑制

Met 群においてK7M2neoの成長は有意に抑制された。Day35の非Met群では脾臓重量が増加したがMet群では認めなかった。K7M2neoに対するMetの直接的な増殖抑制効果は10mMで出現した。in vivo 試験のMet濃度は10μM以下であり、Metの直接作用とは考えにくい結果であった。

#### SCID マウスにおける Met による K7M2neo の腫瘍成長抑制

WT マウスにおけるT細胞依存性の抗腫瘍免疫応答を評価するため抗CD8および抗CD4抗体をin vivoに投与した。T細胞依存性免疫を評価するためのコントロールとして用いたMethAでは、Metによる腫瘍縮小効果は抗体投与により予想どおり完全に消失したが、K7M2neoでは腫瘍縮小効果が維持された。T細胞機能が欠損したSCIDマウスでも同様の腫瘍縮小効果が観察されたことより、骨肉腫K7M2neoにおけるT細胞非依存性の腫瘍抑制機構の存在が示唆された。SCIDマウスに抗CD11b抗体を投与することでMetの腫瘍抑制効果が消失したことから、CD11b陽性細胞もエフェクター細胞になりうる事が考えられた。Natural killer(NK)細胞の割合はMet投与では変化せず、エフェクター機構には関与していないと考えられた。

#### Met による MDSCs と TAMs の変化

担がんマウスの腫大した脾臓ではCD11b陽性細胞が増加しているが、Metにより脾臓および腫瘍でのCD11b陽性細胞が減少した。CD11b陽性細胞のうちMDSCsはday29およびday36においてPMN-MDSCが腫瘍内と脾臓の双方で減少していた。次いでTAMs(CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>low</sup>F4/80<sup>high</sup>)に関して検討したが、腫瘍中のTAMsの割合はMetによる変化はなかった。腫瘍より回収したTAMsを刺激し、サイトカイン産生を評価すると非Met群ではIL-10を産生するTAMsが優位だったがMet群ではIL-12とTNFαを産生するTAMsが有意に増加していた。これはMetによりTAMsがM2様からM1様マクロファージに誘導されたことを強く示す結果であり、さらにTAMs表面のMHC class II発現の上昇、CD206発現の低下もその傍証であると考えられた。これらの結果からMet群ではTAMsの免疫抑制効果が減弱する一方、M1様マクロファージが増加することがK7M2neoにおける抗腫瘍効果の本態であることが推測された。

#### CD11b 陽性細胞における Met による代謝変化

ROSはMDSCsによるT細胞免疫の抑制因子とされるが、ROS産生はミトコンドリア呼吸のbiomarkerでもある。ROSレベルはMetにより腫瘍内MDSCsおよびTAMsでは有意に低下したが、脾臓内MDSCsおよびTAMsでは低下しなかった。腫瘍および脾臓から単離したCD11b陽性細胞では、ミトコンドリア基礎呼吸量(basal respiration capacity, BRC)は腫瘍ではMetにより低下したが、脾臓では変化せず、予備呼吸能(spare respiratory capacity)は逆に脾臓ではMetにより増加したが腫瘍内では変化しなかった。このことからCD11b陽性細胞は周囲の環境により代謝様式が異なることが確認された。Met群ではミトコンドリア脱共役(proton leak)が腫瘍内で低下しており、ROS産生の低下と合致した。ECARは脾臓内・腫瘍ともにMetによる変化はなかった。CD11b陽性細胞全体ではMetによるglycolysis活性化

というよりも BRC の低下が目立った。代謝の観点からは M2 あるいは M1 様マクロファージの機能と OXPHOS あるいは glycolysis の利用は密接に関連することから Met による腫瘍内 CD11b 陽性細胞の BRC の低下は相対的な glycolysis の増加, すなわち M1 様マクロファージの割合増加を示すと考えられた。

#### MDSCs と TAMs におけるグルコースおよび脂肪酸利用の Met による変化

MDSCs と TAMs の代謝様式を 2-NBDG(蛍光グルコースアナログ)および BODIPY(蛍光脂肪酸アナログ)の細胞内取り込みとして評価した。MDSCs では PMN-と Mo-の双方ともグルコースと脂肪酸の取り込みが Met により低下し, エネルギーレベルの低い静止状態にあることが示唆された。TAMs では Met によりグルコース取り込みは変化しなかったが, 脂肪酸取り込みが低下した。前項で認めた BRC すなわち OXPHOS の低下は脂肪酸酸化(fatty acid oxidation, FAO) の低下に因ることが明らかとなった。

#### [考察]

本研究では Met は腫瘍微小環境での PMN-MDSC の減少と TAMs の M1 へのシフトをもたらす骨肉腫 K7M2neo の増殖を抑制した。MDSCs と TAMs の変化は Met による FAO の抑制と関連することが明らかとなった。再発・転移を生じた骨肉腫患者に対する有効な治療は確立されておらず, 本研究のような免疫治療は効果的なアプローチとなり得る。

Gordon らは免疫チェックポイント分子 PD-1 が T 細胞のみならず TAM の多くで発現し, PD-1<sup>+</sup>TAM は CD206<sup>high</sup> であり M2 様の性質を有すること, TAM 上の PD-1 を阻害することで食細胞機能が回復し CT26 担がん Rag2 欠損マウスの生存を延長させることを示した。この T 細胞非依存性の抗腫瘍効果は本研究と類似し, Met による TAM の PD-1 発現の変化を観察する必要がある。

Scharping らは Met による低酸素の改善が PD-1 阻害薬の効果を増強することを報告した。腫瘍低酸素環境では CD8TILs 機能の低下や M2 様マクロファージの集積がみられ, 逆に M1 様マクロファージは低酸素環境を避ける。本研究での腫瘍内 M1 様マクロファージの増加は Met による腫瘍内の低酸素環境改善を示唆する可能性がある。

MDSCs に関しては Met が AMPK リン酸化を介した HIF1 $\alpha$  の抑制により, MDSCs 上の CD39 および CD73 の発現低下と MDSCs の機能低下を生じさせるという卵巣癌患者を対象とした報告や, NF- $\kappa$ B を抑制し MDSC の腫瘍への集積を減少させるというヌードマウスを使用した報告がある。我々は MDSCs と TAMs の代謝調節に着目して同系マウス腫瘍モデルでの研究を行った。

脾臓では酸素や栄養が十分に供給されるが腫瘍微小環境では低酸素, 低グルコース, 低 pH など, 腫瘍免疫が抑制される環境が形成されている。CD11b 陽性細胞の代謝は周辺環境により大きな変化を生じた。2-NBDG と BODIPY の細胞内取り込みを評価することで MDSCs と TAMs の代謝と抗腫瘍効果との関係を検討した。細胞内への BODIPY および 2-NBDG の取り込みの変化をそれぞれ OXPHOS と glycolysis の変化として評価した。MDSCs と TAMs の双方で BODIPY の取り込みが低下し OXPHOS, すなわち FAO の抑制が示唆された。特に TAMs の M2 様機能は FAO に依存することが知られており, Met による FAO の低下と glycolysis の維持が TAMs の抗腫瘍効果の維持を可能としたことが考えられた。先行研究と併せ, Met は T 細胞依存性および非 T 細胞依存性腫瘍免疫の双方で代謝リプログラミングによる抗腫瘍効果向上を示すことが確認された。

#### [結論]

マウス腫瘍モデルにおいて Met は腫瘍内 CD11b 陽性細胞の減少, MDSCs と TAMs に対する代謝リプログラミングを通じた分化制御により T 細胞に依存しない腫瘍増殖抑制を示した。この結果を通じ, 既存治療で治療困難な骨肉腫に対して Met を含む免疫治療が有用な可能性を示唆すると考えられる。