

氏名	國定 勇希
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5311号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	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
論文審査委員	飯田 征二 教授      小崎 健一 教授      佐々木 朗 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

腫瘍の治療方法として、今までは外科的療法，化学療法，放射線療法が一般的であったが，近年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集積しており，抗腫瘍活性を持つ細胞と免疫抑制に働きかける細胞が混在している。制御性T細胞(Regulatory T cell : Treg)も免疫抑制能を持つ細胞であり，抗腫瘍活性を有する細胞の活性を抑制することが知られている。腫瘍によっては腫瘍局所でTregが有意に増加するという報告もあり，腫瘍局所内のTregを除去することが出来れば，腫瘍増殖を抑制するとも報告されている。しかし，全身的にTregの除去を行うと自己免疫疾患を発症するリスクもあるため，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いる薬であり，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もある。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。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の有無で比較を行い，ナイーブCD4T細胞(CD4+CD25-)からiTregを誘導する刺激前にメトホルミン処置を行った。

### 【材料および方法】

#### 1. 実験動物

BALB/c雌マウスにRLmale1の皮内注射を行い，腫瘍を移植し，7日目からコントロール群とメトホルミン群に分けた。メトホルミン群では餌に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から，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、各群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蛍光標識抗体を使用した。細胞分裂の確認には CFSE を用いた。細胞の解析は BD FACS CANTO II を用いて行い、データは Flow Jo で処理した。

## 4. T細胞の単離と Treg 誘導

マウスの脾臓から CD4+CD25-T 細胞を分離した。分離後メトホルミン処置と非処置に分け、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、刺激培養して iTreg を誘導した。

### 【結果】

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。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。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 において高割合の細胞死が認められた。メトホルミンによる Treg/CD4T 細胞割合の減少はこの結果であることが示唆された。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。

vivo の腫瘍環境を模倣して実験を組み、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 や Cd25 の発現に変化は認められなかった。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なかった。TGF- $\beta$  非存在下では Foxp3 の発現はほぼ認めず、濃度が増加するにつれて Foxp3 の発現量の増加を認めたが、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。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 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。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。

## 論文審査結果の要旨

近年、新たな癌治療法として癌免疫療法が注目されている。腫瘍組織内とその周囲組織には様々な免疫細胞が集積しており、抗腫瘍活性を持つ細胞と免疫抑制活性を持つ細胞が混在している。制御性 T 細胞(Regulatory T cell: Treg)も免疫抑制活性を持つ細胞であり、抗腫瘍活性を有する細胞の活性を抑制することが知られている。腫瘍局所内の Treg を除去することが可能となれば、腫瘍増殖を抑制するとも報告されている。

糖尿病薬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して、発癌率ならびに癌死が有意に減少していることが知られている。さらに、メトホルミンがマウス腫瘍内に浸潤している CD8<sup>+</sup>T 細胞を活性化させ、抗腫瘍効果を示すことも報告されている。これらの作用機序について、メトホルミンによる CD4<sup>+</sup>T 細胞、特に Treg に対する抑制効果と考え、マウスモデルにおける脾臓、腫瘍所属リンパ節、腫瘍局所の Treg に対するメトホルミンの効果を検討した。

RLmale1(Leukemia)を右背部に皮内注射した担癌マウスへ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増殖が抑制された。T 細胞における Treg/CD4<sup>+</sup>T 細胞の分画比については、脾臓組織内ならびに腫瘍所属リンパ節内ではメトホルミン投与群と非投与群で変化を認めなかったが、腫瘍局所に浸潤した T 細胞では Treg/CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合がメトホルミン投与群で減少していた。また、各実験群における Treg/CD4<sup>+</sup>T 細胞の細胞死を検討したところ、脾臓とリンパ節では変化を認めなかったが、メトホルミン投与群の腫瘍局所で増大していた。さらに、Treg 誘導に対するメトホルミンの直接的な作用を *ex vivo* で検討したところ、メトホルミン添加によりナイーブ CD4<sup>+</sup>T 細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>)からの Treg 誘導が抑制され、且つ Treg 機能を有しない non Treg 細胞への誘導も認められた。

本研究結果から、メトホルミンは Treg 誘導を抑制することが示唆された。また、メトホルミンによる Treg 分画比の減少が、抗腫瘍作用の一部を担っていることが示唆された。メトホルミンによって Treg 以外の non Treg 細胞が誘導されるメカニズムは未だ不明であるが、今後は腫瘍内 Treg の代謝制御に関する検討が必要であると考えられる。

本学位論文の内容は、糖尿病薬メトホルミンが腫瘍局所においてのみ制御性 T 細胞(Treg)に細胞死を誘導することを明らかとした点が新規知見である。また今後、腫瘍局所 Treg への細胞死誘導メカニズムを解明することにより、新たな癌治療薬開発への発展性をも期待できる。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。