

メトホルミン服用における健常人および肺癌患者の CD8T細胞の多機能性調査

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・免疫学分野

教授 鵜殿 平一郎

(共同研究者)

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・臨床遺伝子医療学分野 教授 豊岡 伸一

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・免疫学分野 助教 榮川 伸吾

はじめに

メトホルミンはグアニジンを基に合成したピグアナイドと呼ばれる2型糖尿病に対する治療薬で、世界で最も多く使用されている副作用の極めて少ない安価な薬である。これまでに世界各国から、メトホルミンで治療した2型糖尿病の患者はそれ以外の治療法を施行した患者よりも発癌率、癌死率が30～40%減少することが明らかとなっている。

腫瘍内微小環境では、腫瘍特異的エフェクター CD8⁺ T細胞は疲弊マーカー PD-1、Tim-3を発現し、増殖能の低下、サイトカイン (IL-2、TNF α 、IFN γ) 産生能の低下 (多機能性の低下)、アポトーシス方向へと進むために癌組織は一向に小さくならない。この免疫疲弊と呼ばれる状態を解除できれば、がん免疫治療に飛躍的な進展がみられることになる。

我々は、メトホルミンにより腫瘍浸潤CD8T細胞のメトホルミンによる多機能性 (IL-2、TNF α 、IFN γ 同時産生能) 回復が抗腫瘍効果に関係していることを誌上で発表した (PNAS 112 (6) : 1809, 2015)。この前臨床研究の結果は、癌患者においてもCD8T細胞の多機能性がその予後を左右する可能性があることを示唆する。従って、本調査研究では、健常人および肺癌患者のメトホルミン服用によるCD8T細胞の多機能性変動について調査し、メトホルミン服用患者の免疫系が回復・亢進することを証明する。

しかしながら、がん患者に糖尿病薬メトホルミンを服用していただくにあたり、倫理上の問題が存在する事が判明し、本格的なメトホルミン介入試験に入る前に、患者末梢血リンパ球をメトホルミンと共培養し、CD8T細胞の多機能性が回復する事をまずはじめに解析することとした。

結 果

図1にフローサイトメーターによる、CD8⁺ T細胞の多機能性解析結果の手順を示す。PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate) /イオノマイシン (ionomycin) 処理した末梢血単核

球 (PBMC) について、まずCD8⁺T細胞にゲートを掛け、次にFSC-A、FSC-Hでダブルット細胞を除去した。次にFSC-A、SSC-Aのパラメーターを用いて、生細胞中のリンパ球領域にゲートを掛け、PD-1及びTim-3の発現を解析した。また、細胞内サイトカインIFN γ 、TNF α 、IL-2を染色し、多機能性の検出を行った。

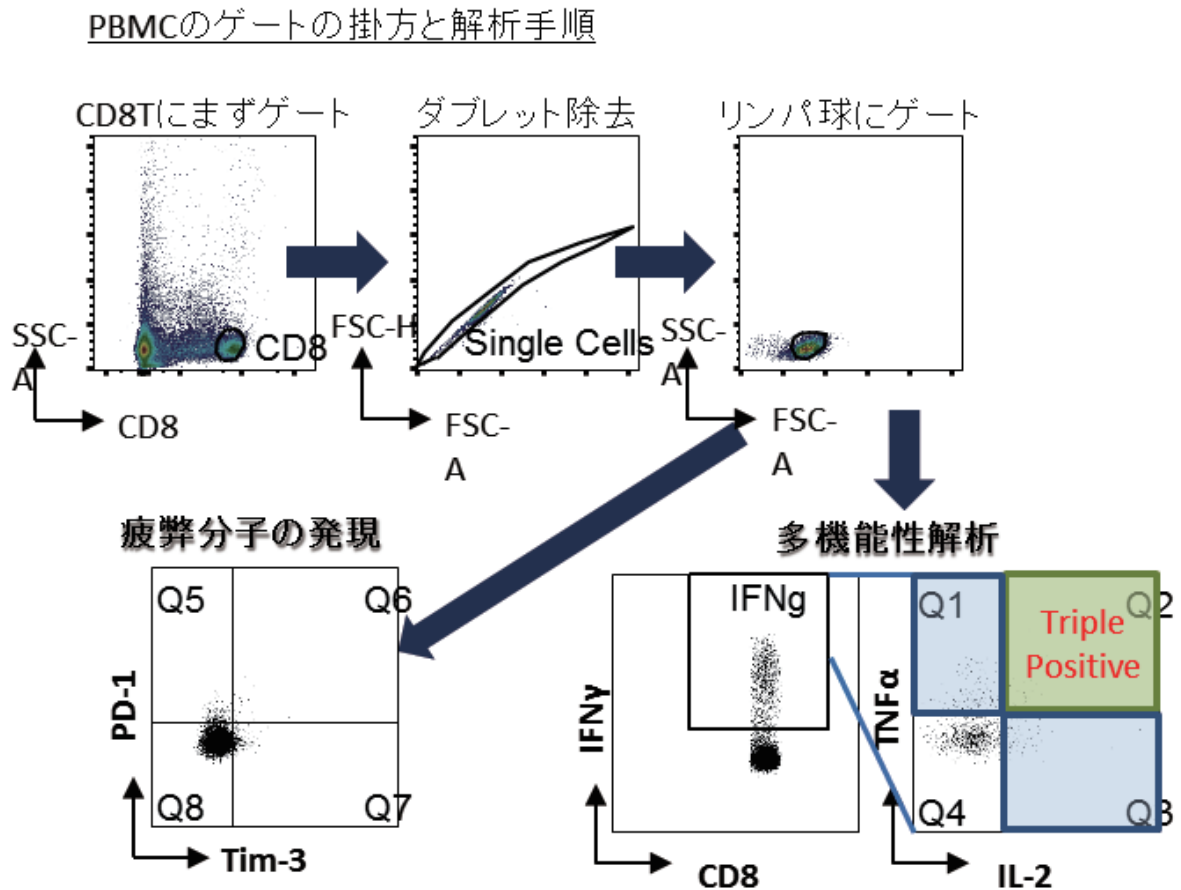


図1

図2は、がん患者の末梢血単核球 (PBMC) を用いて解析した結果を示す図である。PBMCをメトホルミン存在下又は非存在下で数時間培養し、メトホルミンを除去したものを、PMA/イオノマイシンで処理した細胞のCD8⁺T細胞のうち、IFN γ 、TNF α 、IL-2を同時に産生できる細胞を検出した。がん患者のCD8T細胞はメトホルミン処理により多機能性の上昇を認める場合が多い。

図3は、健常人のPBMCをメトホルミン存在下又は非存在下で数時間培養し、メトホルミンを除去したものを、PMA /イオノマイシンで処理した細胞のCD8⁺T細胞のうち、IFN γ 、TNF α 、IL-2を同時に産生できる細胞を検出した結果を示す図である。健常人のCD8T細胞はメトホルミン処理により多機能性の上昇を認める場合は少ない。

がん患者(代表例)

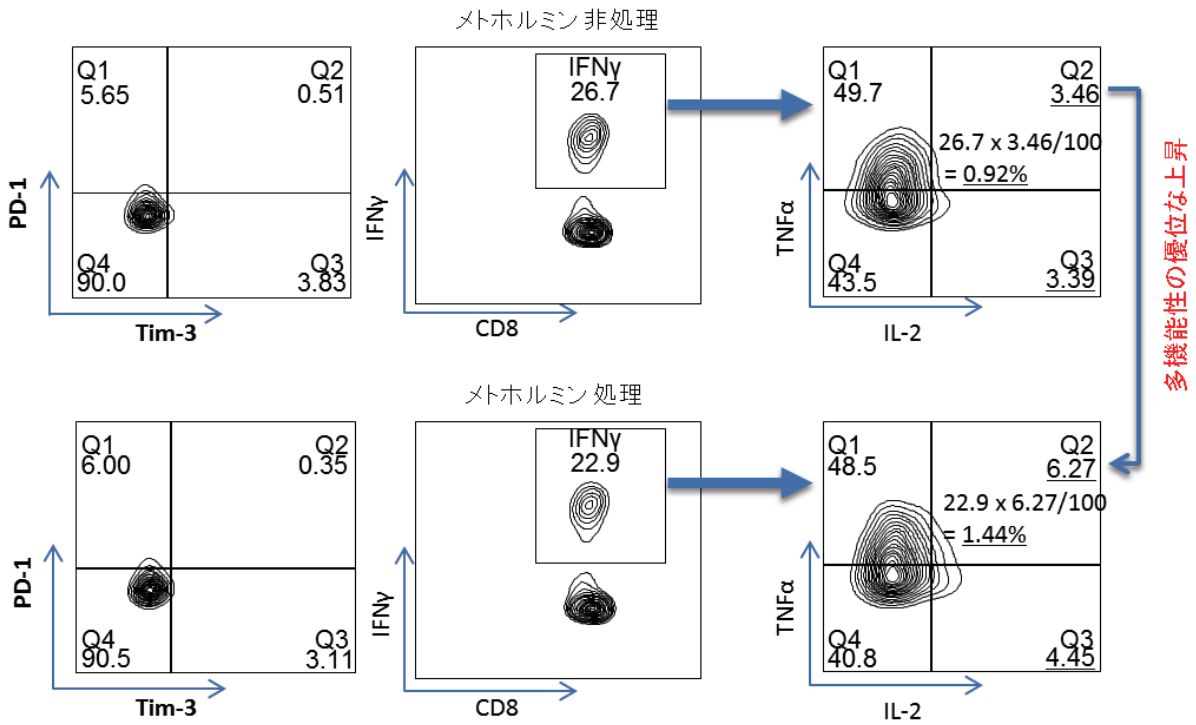


図2

健常人(代表例)

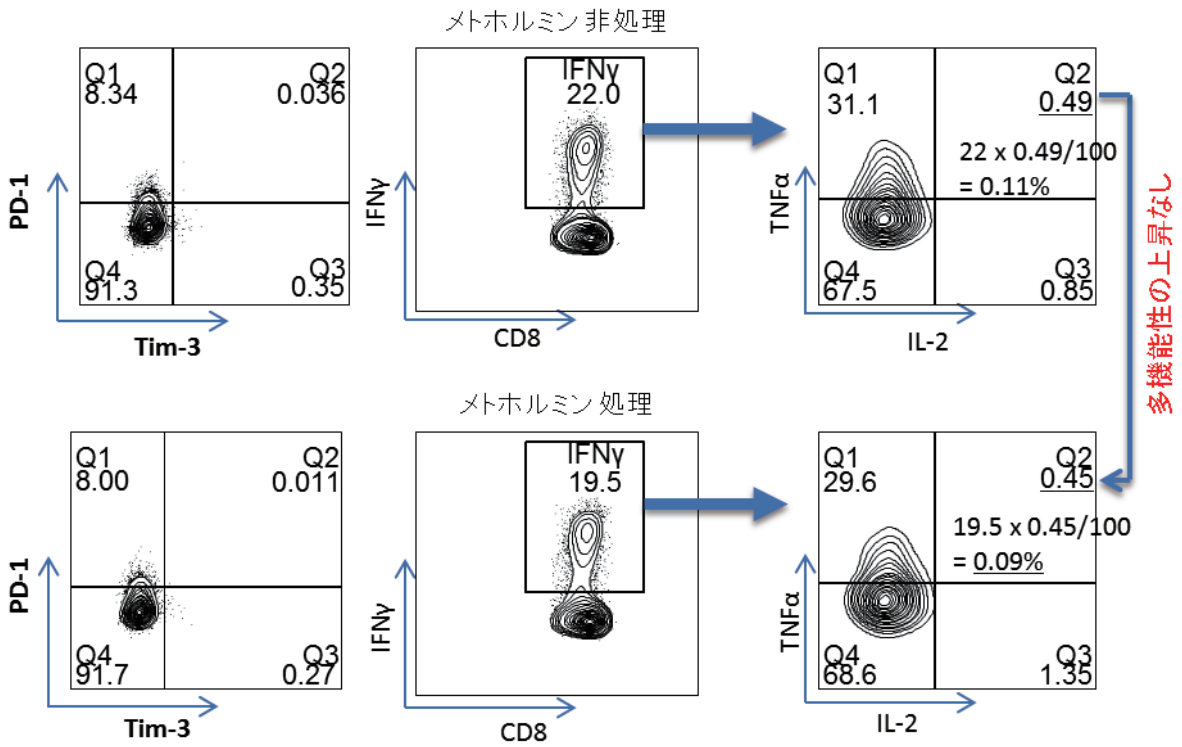


図3

表1は、健常人10名と患者36名（ステージI 31名、ステージIV 5名）の解析結果をまとめたものである。メトホルミン処理により多機能性が上昇した、もしくは不変であった頻度を解析した。なお、「上昇」とは10%以上多機能性頻度が増加したものとした。10%以上低下したものは「減少」と判断した。その間は「不変」とした。

IFN γ /TNF α /IL2	上昇 + 不変		
	健常人	患者 (stage I)	患者 (stage IV)
Total CD8T	3/10 (30%)	19/31 (61.3%)	5/5 (100%)

表1

考 察

近年、免疫疲弊のメカニズムが明らかにされ、疲弊分子の阻害ががん治療において重要であることが報告されている。今回我々が用いた検査方法では、3種類のサイトカインの同時産生細胞群の検出と疲弊分子の検出を組み合わせることができ、患者の免疫細胞、具体的にはCD8⁺T細胞の免疫状態を容易に検出することが可能であった。PD-1やTim-3などの疲弊分子を発現していれば即ち疲弊した細胞であるが、メトホルミン処理によりその細胞集団の多機能性が回復すれば、間違いなく疲弊が解除された（免疫能が回復した）と判断される。

メトホルミン共培養による、Total CD8T における3種類のサイトカイン産生の（上昇+不変）の群だけに絞って比較すると、健常人は30%、がん患者ではstage Iで61.3%、stage IVで100%であった。つまり、健常人とがん患者では優位差があると考えられる。

がん患者の場合、病期（ステージ）の進行に伴い、疲弊CD8T細胞の潜在的増加が起こり、この疲弊集団がメトホルミン処理により多機能性の上昇ないし不変という形で検出された、と考えられる。

以上の結果より、がん患者のCD8T細胞におけるメトホルミン依存的な多機能性回復を検出できたと考えられる。これらの結果を説明することで、がん患者へのインフォームドコンセントを行い、診断から手術前の数週間間にメトホルミンを服用していただき、服用前後における末梢血リンパ球CD8T細胞の多機能性回復の有無について最終的に検証を行ないたい。

要 約

がん患者の末梢血リンパ球CD8T細胞をメトホルミンと共培養することにより、その多機能性が回復することを明らかにした。一方、健常人の末梢血リンパ球CD8T細胞の場合、その多機能性はむしろ低下することがわかった。がん患者に多く存在すると考えられる疲弊

CD8T細胞集団がメトホルミン処理により多機能性の上昇ないし不変という形で検出された、と考えられた。

文 献

1. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E and Udono H. Immune-mediated anti-tumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. Proc Natl Acad Sci USA, 112 (6) : 1809-14, 2015.
2. Uehara T, Fujiwara T, Takeda K, Kunisada T, Ozaki T, Udono H. Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas. BioMed Research International, Article ID 820813, 2014.
3. Eikawa S, Udono H. Monitoring multifunctionality of immune-exhausted CD8 T cells in cancer bearing patients. Methods in Mol Biol, 1142: 11-7, 2014.