

201438002A

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

メトホルミンによる腫瘍局所免疫
疲弊解除に基づく癌免疫治療研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 鵜 殿 平一郎

平成27年(2015)3月

厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業

メトホルミンによる腫瘍局所免疫
疲弊解除に基づく癌免疫治療研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 鵜 殿 平一郎

平成27年(2015) 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療
実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人岡山大学（鵜殿 平
一郎）が実施した平成 26 年度「メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解
除に基づく癌免疫治療研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に 基づく癌免疫治療研究	----- 1
鵜殿 平一郎	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 研究統括、免疫学的解析	----- 9
鵜殿 平一郎	
2. 肺悪性腫瘍採取・管理、倫理委員会対応	----- 11
豊岡伸一	
3. 癌性胸水採取・管理	----- 13
木浦勝行	
4. 消化器癌採取・管理	----- 15
藤原俊義	
5. 副作用管理	----- 17
和田 淳	
6. 生物統計学に関する検討	----- 20
樋之津史郎	
7. 治験プロトコルに関する検討	----- 22
平田泰三	
III. 学会等発表実績	----- 25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 31

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に基づく癌免疫治療に関する研究

業務主任者 鵜殿 平一郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：

がんに対する免疫応答は患者体内で誘導されるが、腫瘍内ではその機能が発揮できない。これは CD8T 細胞が腫瘍局所で免疫チェックポイント分子 PD-1, Tim-3 などを発現し、一方腫瘍ではそれぞれのリガンドである PD-L1, ガレクチン 9 が発現し、分子間会合により CD8T 細胞が疲弊することが原因である。2 型糖尿病治療薬メトホルミンの抗腫瘍効果は、CD8T 細胞の免疫疲弊を回避し、制御性 T 細胞 (Treg) と骨髄由来抑制性マクロファージ (MDSC) の機能を抑制することが主要なメカニズムである。CD8T 細胞の免疫疲弊解除のメカニズムを細胞及び分子レベルで解明する。次に動物モデルで証明された内容が、ヒト腫瘍でも同じであることを証明し、新たな癌治療の方向性を提示する。

研究分担者

豊岡伸一 (岡山大院医歯薬学・教授)
木浦勝行 (岡山大学病院・教授)
藤原俊義 (岡山大院医歯薬学・教授)
和田 淳 (岡山大院医歯薬学・准教授)
樋之津史郎 (岡山大学病院・教授)
平田泰三 (岡山大学病院・准教授)

A. 研究目的

現在、本邦における死因の第一位は悪性新生物、即ち癌であり 3 人のうち 1 人が癌により死亡し、また生涯において 2 人に 1 人は癌に罹患する時代である。治療としては外科的手術、抗癌剤などの化学療法、放射線の 3 大療法に加えて昨今では副作用の軽微な免疫療法が注目を集めている。しかし残念ながら免疫治療の成績は、これまでに期待した程の効果を上げていない。例えば「がんワクチン」なども当初は大変期待された。しかし、がんワクチンにより確かに癌を攻撃できる T 細胞を増やすことができるが、癌の縮小効果及び 5 年生存率の向上を見るまでには至っていない。

体の中に癌を攻撃できる T 細胞が存在するにもかかわらず何故、癌は小さくならないのか、その理由が分子レベルで解明されつつある。活性化された T 細胞をもってしても固形癌の拒絶は容易ではない。何故なら腫瘍組織という特殊な環境が禍いしているからである。

T 細胞は癌塊内に入り込み莫大な数の癌細胞と遭遇する。癌組織内での繰り返す抗原認識の過程で T 細胞は疲弊し、本来あるべき機能を喪失する。この疲弊(exhaustion)と呼ばれる現象は、T 細胞に発現する複数の免疫抑制性分子-免疫チェックポイント分子-と腫瘍に発現するそのリガンドの結合によってもたらされる。代表的なチェックポイント分子 (CTLA-4、 PD-1 など) の機能を抑制し、癌を攻撃するエフェクター T 細胞が疲弊することなくその機能を長く維持できれば、これからのがん免疫治療に飛躍的な進展がみられる可能性がある。

「腫瘍局所の免疫疲弊を解除できる薬物」があれば、状況は一変する。世界はまさにそのような薬の発見に心血を注いでいる。その中で我々は、2 型糖尿病の治療薬として既に最も多く世界で処方されているメトホルミンという薬剤

にこのような効果があることを見いだした（特許申請中）。この1錠10円足らずの薬剤は腫瘍局所の免疫疲弊を解除し、従来の癌治療の概念を大幅に変えうる可能性を秘めている。従ってメトホルミンの固形癌に対する適応拡大の認可を目指す。

2型糖尿病の治療薬メトホルミンの抗がん作用については既に十分に注目が集まっている。国立国際医療研究センターは、メトホルミンと癌との関連について解析し、「メトホルミンを服用していた糖尿病患者では、服用していなかった患者と比較して癌死・発癌とも確実に減少していた」との研究結果を発表した。糖尿病と発癌の関連性を報告した論文10件の対象者は総数21万892人で、そのなかの5.3%の人が癌を発症した。統合解析の結果、メトホルミンを服用していた糖尿病患者では、服用していなかった患者と比較して癌死・発癌とも確率が確実に減少していた（癌死倍率0.66倍、発癌倍率0.67倍）。さらに臓器ごとの発癌率を解析したところ、メトホルミン服用者では大腸直腸癌（倍率0.68倍）、肝臓癌（倍率0.20）、肺癌（倍率0.67倍）であった。ハーバード大学のDr. Kevin Struhl PhD.が、メトホルミンが「癌幹細胞を傷害する」ということを発表し、抗がん作用のメカニズムにつき非常に注目を集めている

DNA構造を発見したノーベル賞受賞者のワトソン博士（Dr. James Watson）は、2012年3月にエール大学において「メトホルミンの癌増殖に及ぼす効果」について科学者は真剣に考えるべきであると述べ（Yale Journal of Biology and Medicine, 85: 417-419, 2012）、我々は2013年10月にコールドスプリングハーバー研究所で博士が秘密裏に開催した”Biguanides and Neoplasia”に招待され、研究発表を行った。我々の免疫学的研究の結果は、メトホルミンによる抗腫瘍効果は癌細胞の直接的な殺傷効果によるものではなく、腫瘍局所におけるT細胞の免疫疲弊を回避、さらに疲弊状態からの解除を起こすこと、また免疫抑制のもう一つの大きな存在であるTregとMDSCの機能をメト

ホルミンが抑制することが主要なメカニズムであることを明らかにしつつある。本研究課題ではCD8T細胞の免疫疲弊に加えて腫瘍拒絶を負に制御する2つの細胞集団Treg及びMDSCに与えるメトホルミンの効果を明らかにする。次に動物実験で得られたこれらの知見がヒトにも適用するのかを検討する。もし適用されれば、既存の癌治療法と組み合わせ、飛躍的な治療効果をもたらすことを目指す。

B. 研究方法

担癌マウスにメトホルミンを投与すると、腫瘍は拒絶される。拒絶はSCIDマウスでは起こらない。また抗CD8抗体を投与し体内のCD8T細胞を除去すると、拒絶はキャンセルされるためエフェクター細胞はCD8T細胞である。TILを回収してPD-1、Tim-3疲弊分子の発現を調べ、さらにAnnexin Vによりアポトーシスの有無を検討した。メトホルミン飲水では疲弊分子を発現しているものの、アポトーシスが大幅に回避された。さらにCD8 TILをPMAとイオノマイシンで刺激し、その多機能性（IL-2, TNF α , IFN γ の同時産生能）を観察した。通常TILは多機能性を消失しているが、メトホルミン投与により回復していた。以上の事実を踏まえ、メトホルミン効果の分子機構を解明し、ヒトでの臨床研究を行うため年次計画を立てた。

平成26年度は、メトホルミンによる免疫疲弊解除の分子メカニズムの解明に取り組んだ。IRF4欠損マウスではメトホルミンによる腫瘍拒絶が消失することを既に見いだした。IRF4欠損CD8T細胞の腫瘍内浸潤能、多機能性、について検討した。さらにメトホルミン投与、非投与時のCD8T細胞に加え、腫瘍局所に浸潤したTreg, MDSCを同様にフローサイトメーターで解析を行った。

また、臨床研究を開始するために、岡山大学倫理委員会にて承認を得た（臨床検体のストック、メトホルミン非投与臨床研究の一部スタート）。癌または肉腫と診断された時点から手術直前までメトホルミン服用を行う。服用前後の末梢血CD8T細胞、また、腫瘍の一部からリンパ球を回収

し、その表面形質の変化と多機能性についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

(倫理面への配慮)

本研究で最も注意しなければならないことは、メトホルミンのがん患者への投与である。メトホルミンの投与は2型糖尿病だけに限られているため適応外使用となる。そのため、不利益・危険性について患者説明をしっかりと行い、きちんと同意を得た上で開始する。がん患者のメトホルミン介入試験の前に健常人で研究を行い、予め参考となるデータを取得し、患者への説明に役立てる。

メトホルミンは極めて安全な薬として2型糖尿病治療として世界で最も多く処方されている薬だが、乳酸アシドーシスの副作用がある。高齢者、腎機能・肝機能の低下が疑われる患者には特に慎重な投与ないし服用中止を即断する。

また、動物実験については動物愛護の観点から十分に注意を払い、動物実験の実施に関する指針・規定に則り慎重に実験を行っていく。

C. 研究結果

増大する腫瘍塊の中には、腫瘍浸潤 CD8T (CD8 TILs) はセントラル・メモリーT細胞 (TCM) として存在している。しかし、メトホルミン服用により TCM は減少し、エフェクター・メモリーT細胞 (TEM) さらにエフェクターT細胞 (T eff) が増加し、腫瘍増大に抑制がかかる。これはメトホルミン服用時の TEM および T eff の Bcl2 発現増加とそれに伴う active caspase 3 の減少がみられることから、アポトーシスが抑制されるためと考えられる。抗原特異的 CD8T 細胞の養子移入実験においても同様のことが観察される。即ち、移入 CD8T 細胞は腫瘍に浸潤しても通常はほとんどは TCM の状態であるが、メトホルミン服用ないし ex vivo で予め移入 CD8T 細胞をメトホルミン処理しておけば、腫瘍浸潤後に TEM として存在し、抗腫瘍効果を示す。TEM と T eff は抗原刺激により複数のサイトカイン産生能 (多機能性) を有する。

ここで既に結果が得られた中で、メカニズム解明に重要なことは下記になる。

1. ex vivo で CD8T 細胞のメトホルミン処理時

に AMPK 阻害剤 compound C を加えると、一連の事象は全て消失した。

2. 移入 CD8T 細胞が IRF4 を欠損していれば、メトホルミン処理効果は全て消失する。
3. 移入 CD8T 細胞のメタボローム解析の結果、メトホルミン処理で旺盛なアミノ酸代謝活性が認められた。これらのアミノ酸代謝経路は解糖系および酸化リン酸化経路に合流するため、さらなる ATP 産生を促すために必要な事柄だと考えられる。

さらにメカニズム解明のため、

4. 移入 CD8T 細胞の網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq.) を 3. と同様の条件で現在解析中である。
5. 移入 CD8T 細胞のリン酸化分子の網羅的同定を、3. と同様の条件下でアレイ解析中である。

上記結果のうち、一部は誌上に発表した。

(PNAS10;112(6):1809-14, 2015)

また、腫瘍局所に浸潤したTregの数はメトホルミン投与により、一過性に減少することがわかった。さらに腫瘍増殖後期では、M-MDSC, G-MDSCのうちのG-MDSCが優位に減少することが明らかになった。従って、CD8T細胞の機能回復に加え、Treg, MDSCの数的抑制作用が抗腫瘍効果に影響を及ぼす可能性が十分に考えられる。

臨床研究においては、

原発性肺癌および転移性肺腫瘍の患者15名から腫瘍組織の採取を行い、腫瘍浸潤リンパ球を分離してフローサイトメーターにて表面形質および多機能性の解析を行った。このうち3名において、腫瘍浸潤リンパ球を凍結保存し、約1週間後に解凍して表面形質の変化がないかどうか、また多機能性解析に耐えうるか否かを検討した。その結果、一度凍結保存した腫瘍浸潤リンパ球の表面形質は凍結前と比較して大きく変化しているということ、多機能性も変化しているということが分かった。従って、腫瘍浸潤リンパ球は採取後に一旦凍結保存する、という当初の予定を変更することとなった。即ち、腫瘍浸潤リンパ球は採取したその日のうちに表面形質及び多機能性を解析することとした。

また、メトホルミンを服用した20名の健常人リンパ球を凍結保存した。腫瘍局所のリンパ球は凍結保存後に解凍して実験に使うことが出来ないことが新たに判明した。以上は、肺癌グループ、消化器癌グループと共同で行った。

D. 考察

上記の結果より、メトホルミンによる CD8T 細胞の活性化には、AMPK 活性化、IRF4 発現、代謝亢進（解糖系と酸化的リン酸化）が必須である可能性が高い。またメタボローム解析結果からこれだけ多くのアミノ酸が増加していることは、活発な蛋白分解（オートファジーetc.）によるアミノ酸リサイクルが行われていることが推測される。機能的な記憶 CD8T 細胞へ分化するためには、TCR 刺激後の clonal expansion につづき、一過性のオートファジー活性の上昇が必須であることが最近、発表された（Nature Immunology 15: online November 2014）。

以上のことから分子メカニズム解明のためには、AMPK 活性化、IRF4 発現、解糖系と酸化的リン酸化、オートファジー機能に焦点を当てて進める事も必要であると考え。IRF4 が記憶 T 細胞への分化に必須であること（Nature Immunology 14:1155-1165, 2013）、AMPK の活性化がオートファジーを誘導すること（Nature Cell Biology 13:132-141, 2011）、AMPK 活性化と IRF4 発現レベルが相関する可能性（Diabetes, Obesity and Metabolism 13:1097-1104, 2011）などが、本研究の方向性をサポートする。

また、養子移入実験は極めて有用な手段であり、compound C と同様に様々な阻害剤を用いた実験に応用可能である。従って、メトホルミンと各種阻害剤で処理した CD8T 細胞を養子移入し、浸潤後の TEM 分化を解析する。阻害剤としては、mTORC 阻害剤（ラパマイシン、mTOR 経路は AMPK 活性化で抑制される）、HIF1 阻害剤（解糖系阻害）、酸化的リン酸化阻害剤、オートファジー阻害剤（3MA）などを使用することが考えられる。さらに、移入後経時的に AMPK リン酸化、IRF4 発現レベル、グルコース取り込み活性、オ

ートファジー活性を TCM, TEM, TEff に分けてフローサイトメトリー解析することも必要だろう。

また、臨床研究を進めるための試行錯誤の予備検討ではあったが、ヒト腫瘍浸潤リンパ球は既に疲弊しているため、回収・凍結保存後の生存率が悪く、機能解析に向かないと考えられた。

E. 結論

メトホルミンによる免疫疲弊解除の分子メカニズムは、IRF4 及び AMPK 依存性であり、解糖系のみならず酸化的リン酸化経路の双方の活性化が必要と考えられる。さらに踏み込んだ分子解明が必要である。

臨床研究については、

末梢血リンパ球の凍結保存→解凍→実験は可能だが、ヒト腫瘍局所から回収したリンパ球は凍結せず、その日のうちに解析を終了する必要がある、という結論に達した。

F. 健康危険情報

がん患者のメトホルミン服用は、1日500mgから開始し、1500mgまでを漸増することにより消化管症状は回避できると考えられる。また、乳酸アシドーシスは、メトホルミン服用の禁忌事項をそのまま対象者の除外基準として適応すれば、全く問題ないと考えられた（研究分担者 和田の業務項目を参照のこと）。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

1. 論文発表

- (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 10;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) Ichiiyanagi T, Ichiiyanagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Uono H. HSP90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 42(19):11903-11, 2014.
- (4) Eikawa S, Uono H. Monitoring multifunctionality of immune-exhausted CD8 T cells in cancer bearing patients. *Methods in Mol Biol.*, 1142:11-7, 2014.
- (5) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Uono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Doki Y, Oka M, Nakayama E. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing NY-ESO-1 antigen. *Journal of Immunotherapy*, 37(2): 84-92, 2014.
- (6) Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS ONE* 9(6), e100777, 2014.
- (7) Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K. Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality and aging. *Eur J Neurol* Feb;22(2):313-21. 2015.
- (8) Shigeyasu, K., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., Kagawa, S., Fujiwara, T. Fluorescent virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumor cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut*, 64: 627-635, 2015.
- (9) Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Nagasaka, T., Shirakawa, Y., Kagawa, S., Urata, Y., Hoffman, R.M., Fujiwara, T. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. *Mol. Ther.*, 23: 501-509, 2015.
- (10) Toshihiro Iguchi, Takao Hiraki, Hideo Gobara, Hiroyasu Fujiwara, Yusuke Matsui, Junichi Soh, Shinichi Toyooka, Katsuyuki Kiura, Susumu Kanazawa. Percutaneous Radiofrequency Ablation of Lung Cancer Presenting as Ground-Glass Opacity. *CardioVascular and Interventional Radiology*. 2014, 38(2) 409-415.
- (11) Seiichiro Sugimoto, Takahiro Oto, Shinichi Toyooka, Shinichiro Miyoshi. Kissing-stents technique after living-donor lobar lung transplantation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 21 Aug 2014 doi:10.1093/ejcts/ezu314
- (12) Shinichi Toyooka, Junichi Soh, Hiromasa Yamamoto, Masaomi Yamane, Shigeru Hattori, Kazuhiko Shien, Kentaroh Miyoshi, Seiichiro Sugimoto, Takahiro Oto, Shinichiro Miyoshi. Extended sleeve lobectomy after induction chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer. *Surgery Today* 12 Sep 2014 DOI 10.1007/s00595-014-1025-y
- (13) Shinsuke Hashida, Hiromasa Yamamoto, Kazuhiko Shien, Tomoaki Ohtsuka, Ken Suzawa, Yuho Maki, Masashi Furukawa, Junichi Soh, Hiroaki Asano, Kazunori Tsukuda, Shinichiro Miyoshi, Susumu Kanazawa, Shinichi Toyooka. Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances the radiation sensitivity of lung cancer cell

lines with acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Oncology Reports* 20 Jan 2015 doi.org/10.3892/or.2015.3735

2. 学会発表

- (1) Uono H, Nishida M, Eikawa S. Metformin-induced reversion of exhausted CD8T cells in tumor microenvironment. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Core-Symposium), Yokohama, 2014.
- (2) 鶴殿平一郎、榮川伸吾：メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除. 第87回日本生化学会大会（シンポジウム）、京都、2014.
- (3) 鶴殿平一郎：エネルギーセンサーを介したストレス応答と腫瘍免疫の関わり. 第9回臨床ストレス応答学会（シンポジウム）、岡山 2014年
- (4) 鶴殿平一郎：メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除. 第12回日本免疫治療学研究会学術集会（教育講演）、東京 2015 2月
- (5) Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Ichiyangi T, Yamazaki C, Uono H. Metformin-induced tumor infiltrating CD8 T cells with effector memory phenotype and multi-functional reversion. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (oral presentation), Yokohama, 2014.
- (6) 鶴殿平一郎：腫瘍局所免疫疲弊解除によるがん免疫治療研究. 第13回国際バイオテクノロジー展／技術会議. 東京 2014 5月
- (7) 榮川伸吾, 根川真実, 國定勇希, 上原健敬, 一柳朋子, 山崎千尋, 鶴殿平一郎：腫瘍浸潤 CD8T 細胞の免疫疲弊解除における活性化 AMPK の役割. 日本がん免疫学会 愛媛 2014
- (8) Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Ichiyangi T, Yamazaki C, Uono H. Activated AMPK induced tumor infiltrating CD8 T-cells with effector memory phenotype and functional reversion. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014.
- (9) 榮川伸吾. 2 型糖尿病薬メトホルミンの腫瘍局所における CD8 T 細胞疲弊解除 第 11 回 臨床ストレス応答学会、岡山. 2014.
- (10) Negawa M, Eikawa S, Uehara T, Kunisada Y, Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Uenaka A, Kakimi K, Wada H, Oka M, Nakayama E, Uono H. Immunomonitoring multifunctionality of exhausted CD8 T-cells in cancer patients. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, 2014.
- (11) Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y, Uehara T, Nishida M, Ichiyangi T, Yamazaki C, Uono H. Metformin induced tumor infiltrating CD8 T effector memory cells with multiple cytokine producing ability. 日本免疫学会総会・学術集会, 京都 2014.
- (12) ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の一次繊毛機能を介した脂肪細胞分化と肥満症における意義 村上 和敏、和田 淳、佐藤 美和、江口 潤、布上 朋和、片山 晶博、中司 敦子、小川 大輔、四方 賢一、槇野 博史 第57回日本糖尿病学会総会 大阪国際会議場 平成 26 年 5 月 24 日
- (13) メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) の意義 中司 敦子、和田 淳、村上 和敏、勅使川原 早苗、片山 晶博、渡邊 真由、樋口 千草、天田 雅文、布上 朋和、江口 潤、小川 大輔、槇野 博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 大阪国際会議場 平成 26 年 5 月 24 日
- (14) 肥満により脂肪組織に誘導される膜蛋白 Gpnb の脂肪肝炎抑制 片山 晶博、和田 淳、中司 敦子、江口 潤、村上 和敏、勅使川原 早苗、樋口 千草、布上 朋和、天田 雅文、肥田 和之、槇野 博史 第 57 回日本糖尿病学会総会大阪国際会議場 平成 26 年 5 月 24 日
- (15) ワークショップ 2 動物モデルを用いた NASH 病態解析脂肪肝炎における Pemt の意義 中司敦子、松山誠、村上和敏、勅使川原早苗、江口潤、小川大輔、高木章乃夫、福島

- 正樹、山本和秀、槇野博史、和田淳第1回
肝臓と糖尿病・代謝研究会 東京 平成26年
7月4日伊藤謝恩ホール
- (16) Watanabe, M., Kagawa, S., Ishida, M.,
Hori, N., Kikuchi, S., Kuroda, S.,
Kishimoto, H., Nishizaki, M., Tazawa, H.,
Fujiwara, T. Virus-guided fluorescence
imaging of intraperitoneal free gastric
cancer cells as a potential clinical
biomarker. Annual Meeting of American
Association for Cancer Research 2014, San
Diego, 2014.
- (17) 永坂岳司、母里淑子、稲田涼、岸本浩行、
近藤喜太、浅野博昭、佃和憲、西崎正彦、
香川俊輔、藤原俊義：Genetic/epigenetic
変異を基盤とした大腸癌個別化治療の構築。
第69回日本消化器外科学会総会（シンポジ
ウム）、郡山、2014年7月。
- (18) 菊地寛次、岸本浩行、田澤大、黒田新士、
西崎正彦、香川俊輔、浦田泰生、Robert
Hoffman、藤原俊義：消化器がんにおける遺
伝子改変ウイルスを用いたセンチネルリン
パ節転移アブレーション。第16回SNNS研
究会学術集会（シンポジウム）、鹿児島、2014
年9月。
- (19) Watanabe, M., Kagawa, S., Ishida, M.,
Hashimoto, Y., Hori, N., Kikuchi, S.,
Kuroda, S., Kishimoto, H., Nishizaki, M.,
Tazawa, H., Urata, Y., Fujiwara, T. A
feasibility study To visualize
intraperitoneal disseminated gastric
cancer by fluorescence-emitting virus,
TelomeScan. 第73回日本癌学会学術総会、
横浜、2014年9月。
- (20) 豊岡 伸一. 悪性胸膜中皮腫におけるマイ
クロ RNA 異常 悪性胸膜中皮腫におけるマ
イクロ RNA 異常 第87回 日本産業衛生学
会（岡山）平成26年5月15日
- (21) 豊岡 伸一. 肺癌新規遺伝子異常の発見—
最適化医療時代における外科医の役割を考
える—第31回日本呼吸器外科学会総会（東
京）平成26年5月30日
- (22) 豊岡 伸一. 呼吸器外科領域における周術
期管理について 第108回 臨床呼吸生理
研究会学術集会（東京）平成26年6月21
日
- (23) 豊岡 伸一. 肺癌治療の発展における外科
医の役割 第73回日本癌学会学術総会（横
浜）第73回日本癌学会学術総会（横浜）平
成26年9月。
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
特願 2014-166593「免疫評価方法とその評価
された免疫活性化剤」 出願日：平成26年8
月19日 鶴殿平一郎、榮川伸吾、豊岡伸一。
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に基づく癌免疫治療に関する研究

業務項目： 研究統括・免疫学的解析

担当責任者 鷓殿 平一郎 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

がんに対する免疫応答は患者体内で誘導されるが、腫瘍内ではその機能が発揮できない。これは CD8T 細胞が腫瘍局所で免疫チェックポイント分子 PD-1, Tim-3 などを発現し、一方腫瘍ではそれぞれのリガンドである PD-L1, ガレクチン 9 が発現し、分子間会合により CD8T 細胞が疲弊することが原因である。この疲弊現象はメトホルミンで回復することが動物モデルで証明されたが、ヒト腫瘍でも同じであることを証明し、新たな癌治療の方向性を提示する。

A. 研究目的

メトホルミン服用により、ヒト腫瘍局所浸潤 CD8T 細胞の疲弊が解除され、多機能性が回復することを証明する。

B. 研究方法

癌または肉腫と診断された時点から手術直前までメトホルミン服用を行う。服用前後の末梢血 CD8T細胞、また、腫瘍の一部からリンパ球を回収し、その表面形質の変化と多機能性についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

（倫理面への配慮）がん患者のメトホルミン介入試験の前に健常人で研究を行い、予め参考となるデータを取得し、患者への説明に役立てる。

C. 研究結果

メトホルミンを服用した20名の健常人リンパ球を凍結保存した。腫瘍局所のリンパ球は凍結保存後に解凍して実験に使うことが出来ないことが新たに判明した。肺癌グループ、消化器癌グループと共同で行った。

D. 考察

ヒト腫瘍浸潤リンパ球は既に疲弊しているため、

回収・凍結保存後の生存率が悪く、機能解析に向かないと考えられた。

E. 結論

末梢血リンパ球の凍結保存→解凍→実験は可能だが、ヒト腫瘍局所から回収したリンパ球は凍結せず、その日のうちに解析を終了する必要がある。

F. 健康危険情報 総括の項を参照

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

1. 論文発表

- (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 10;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) Ichiyanagi T, Ichiyanagi K, Ogawa A, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Chuma S, Sasaki H, Udono H. HSP90 α plays an

important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 42(19):11903-11, 2014.

- (4) Eikawa S, Udono H. Monitoring multifunctionality of immune-exhausted CD8 T cells in cancer bearing patients. *Methods in Mol Biol.*, 1142:11-7, 2014.
- (5) Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Udono H, Seto Y, Yamada K, Nishikawa H, Pan L, Venhaus R, Doki Y, Oka M, Nakayama E. Vaccination with NY-ESO-1 overlapping peptides mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing NY-ESO-1 antigen. *Journal of Immunotherapy*, 37(2): 84-92, 2014.

2. 学会発表

- (1) Udono H, Nishida M, Eikawa S. Metformin-induced reversion of exhausted CD8T cells in tumor microenvironment. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Core-Symposium), Yokohama, 2014.
- (2) 鶴殿平一郎、榮川伸吾：メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除。第 87 回日本生化学会大会(シンポジウム)、京都、2014。
- (3) 鶴殿平一郎：エネルギーセンサーを介したストレス応答と腫瘍免疫の関わり。第 9 回臨床ストレス応答学会 (シンポジウム)、岡山、2014 年。
- (4) 鶴殿平一郎：メトホルミンによる腫瘍局所の免疫疲弊解除。第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会 (教育講演)、東京、2015 2 月。
- (5) Eikawa S, Negawa M, Kunisada Y,

Uehara T, Ichianagi T, Ymazaki C.

Udono H. Metformin-induced tumor infiltrating CD8 T cells with effector memory phenotype and multi-functional reversion. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (oral presentation), Yokohama, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特願 2014-166593 「免疫評価方法とその評価された免疫活性化剤」 出願日：平成 26 年 8 月 19 日 鶴殿平一郎、榮川伸吾、豊岡伸一。

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 該当なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に基づく癌免疫治療に関する研究

業務項目：肺悪性腫瘍採取・管理、倫理委員会対応

担当責任者 豊岡 伸一 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

がんに対する免疫応答は患者体内で誘導されるが、腫瘍内ではその機能が発揮できない。これはCD8T細胞が腫瘍局所で免疫チェックポイント分子PD-1, Tim-3などを発現し、一方腫瘍ではそれぞれのリガンドであるPD-L1, ガレクチン9が発現し、分子間会合によりCD8T細胞が疲弊することが原因である。この疲弊現象はメトホルミンで回復することが動物モデルで証明されたが、肺癌患者でも同じであることを証明し、新たな肺癌治療の方向性を提示する。

A. 研究目的

メトホルミン服用により、腫瘍局所浸潤CD8T細胞の疲弊が解除され、多機能性が回復することを証明する。

B. 研究方法

肺癌と診断された時点から手術直前までメトホルミン服用を行う。服用前後の末梢血CD8T細胞、また、腫瘍の一部からリンパ球を回収し、その表面形質の変化と多機能性についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

（倫理面への配慮）がん患者へのメトホルミン投与試験の前に健常人において投与試験を行い、予め参考となる安全性の確保およびデータを取得し、患者への説明に役立てる。

C. 研究結果

メトホルミンを服用した20名の健常人のリンパ球を凍結保存した。また、腫瘍局所のリンパ球は凍結保存後に解凍して実験に使うことが出来ないことが新たに判明した。

D. 考察

腫瘍浸潤リンパ球は既に疲弊しているため、回収・凍結保存後の生存率が悪く、機能解析に向かないと考えられた。

E. 結論

末梢血リンパ球の凍結保存→解凍→実験は可能だが、腫瘍局所から回収したリンパ球は凍結せず、その日のうちに解析を終了する必要がある。

F. 健康危険情報 総括の項を参照

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

1. 論文発表

- (1) Toshihiro Iguchi, Takao Hiraki, Hideo Gobara, Hiroyasu Fujiwara, Yusuke Matsui, Junichi Soh, Shinichi Toyooka, Katsuyuki Kiura, Susumu Kanazawa. Percutaneous Radiofrequency Ablation of Lung Cancer Presenting as Ground-Glass Opacity. CardioVascular and Interventional Radiology. 2014, 38(2) 409-415.
- (2) Seiichiro Sugimoto, Takahiro Oto, Shinichi Toyooka, Shinichiro Miyoshi. Kissing-stents technique after living-donor lobar lung transplantation. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 21 Aug 2014
doi:10.1093/ejcts/ezu314

- (3) Shinichi Toyooka, Junichi Soh, Hiromasa Yamamoto, Masaomi Yamane, Shigeru Hattori, Kazuhiko Shien, Kentaroh Miyoshi, Seiichiro Sugimoto, Takahiro Oto, Shinichiro Miyoshi. Extended sleeve lobectomy after induction chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer. *Surgery Today* 12 Sep 2014 10.1007/s00595-014-1025-y
- (4) Shinsuke Hashida, Hiromasa Yamamoto, Kazuhiko Shien, Tomoaki Ohtsuka, Ken Suzawa, Yuho Maki, Masashi Furukawa, Junichi Soh, Hiroaki Asano, Kazunori Tsukuda, Shinichiro Miyoshi, Susumu Kanazawa, Shinichi Toyooka. Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances the radiation sensitivity of lung cancer cell lines with acquired resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Oncology Reports* 20 Jan 2015 DOI 10.1007/s00595-014-1025-y
- (5) Kazuhiko Shien, Shinichi Toyooka, Junichi Soh, Katsuyuki Hotta, Kuniaki Katsui, Takahiro Oto, Susumu Kanazawa, Katsuyuki Kiura, Hiroshi Date, Shinichiro Miyoshi. Lower lobe origin is a poor prognostic factor in locally advanced non-small-cell lung cancer patients treated with induction chemoradiotherapy. *Molecular and Clinical Oncology* 11 Feb 2015 doi.org/10.3892/or.2015.3735
- (3) 豊岡 伸一. 肺癌新規遺伝子異常の発見—最適化医療時代における外科医の役割を考える—第 31 回日本呼吸器外科学会総会（東京）平成 26 年 5 月 30 日
- (4) 豊岡 伸一. 呼吸器外科領域における周術期管理について 第 108 回 臨床呼吸生理研究会学術集会（東京）平成 26 年 6 月 21 日
- (5) 豊岡 伸一. 肺癌治療の発展における外科医の役割第 73 回日本癌学会学術総会（横浜）第 73 回日本癌学会学術総会（横浜）平成 26 年 9 月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
特願 2014-166593「免疫評価方法とその評価された免疫活性化剤」豊岡伸一 他。
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

2. 学会発表

- (1) 豊岡 伸一. 最適化医療時代における外科医—研究心という剪刀を携える—第 114 回日本外科学会定期学術集会（京都）平成 26 年 4 月 3 日
- (2) 豊岡 伸一. 悪性胸膜中皮腫におけるマイクロ RNA 異常悪性胸膜中皮腫におけるマイクロ RNA 異常 第 87 回 日本産業衛生学会（岡山）平成 26 年 5 月 15 日

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に基づく癌免疫治療に関する研究

業務項目：癌性胸水採取・管理

担当責任者 木浦 勝行 岡山大学病院 教授

研究要旨

がんに対する免疫応答は患者体内で誘導されるが、腫瘍内ではその機能が発揮できない。これは CD8T 細胞が腫瘍局所で免疫チェックポイント分子 PD-1, Tim-3 などを発現し、一方腫瘍ではそれぞれのリガンドである PD-L1, ガレクチン 9 が発現し、分子間会合により CD8T 細胞が疲弊することが原因である。この疲弊現象はメトホルミンで回復することが動物モデルで証明されたが、癌性胸水を伴う肺癌でも同じであることを胸水中 CD8T 細胞解析で証明する。

A. 研究目的

メトホルミン服用により、癌性胸水の浸潤 CD8T 細胞の疲弊が解除され、多機能性が回復することを証明する。

B. 研究方法

癌性胸水を伴う肺癌と診断された時点からメトホルミン服用を行う。服用前後の末梢血 CD8T 細胞、また、胸水からリンパ球を回収し、その表面形質の変化と多機能性についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

（倫理面への配慮）がん患者のメトホルミン介入試験の前に健常人で研究を行い、予め参考となるデータを取得し、患者への説明に役立てる。

C. 研究結果

メトホルミンを服用した 20 名の健常人リンパ球を凍結保存した。腫瘍局所のリンパ球は凍結保存後に解凍して実験に使うことが出来ないが、胸水中の CD8T 細胞は解析可能であった。

D. 考察

胸水中の CD8T 細胞は癌細胞との接触が少なく、生存率が良好で、機能解析は可能と考えられた。

E. 結論

末梢血リンパ球および癌性胸水中の CD8T 細胞の凍結保存→解凍→実験は可能である。

F. 健康危険情報 総括の項を参照

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

1. 論文発表

- (1) Ichihara E, Hotta K, Nogami N, Kuyama S, Kishino D, Fujii M, Kozuki T, Tabata M, Harada D, Chikamori K, Aoe K, Ueoka H, Hosokawa S, Bessho A, Hisamoto-Sato A, Kubo T, Oze I, Takigawa N, Tanimoto M, Kiura K. Phase II Trial of Gefitinib in Combination with Bevacizumab as First-Line Therapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Activating EGFR Gene Mutations: The Okayama Lung Cancer Study Group Trial 1001. J Thorac Oncol. 2015;10(3):486-91
- (2) Isozaki H, Yasugi M, Takigawa N, Hotta K, Ichihara E, Taniguchi A, Toyooka S, Hashida S, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. A new human lung adenocarcinoma cell line harboring the EML4-ALK fusion gene. Jpn J Clin Oncol. 2014;44(10):963-8.

(3) Nogami N, Takigawa N, Hotta K, Segawa Y, Kato Y, Kozuki T, Oze I, Kishino D, Aoe K, Ueoka H, Kuyama S, Harita S, Okada T, Hosokawa S, Inoue K, Gemba K, Shibayama T, Tabata M, Takemoto M, Kanazawa S, Tanimoto M, Kiura K. A phase II study of cisplatin plus S-1 with concurrent thoracic radiotherapy for locally advanced non-small-cell lung cancer: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 0501. Lung Cancer. 2015 ;87(2):141-7.

(4) Aoe K, Takigawa N, Hotta K, Maeda T, Kishino D, Nogami N, Tabata M, Harita S, Okada T, Kubo T, Hosokawa S, Fujiwara K, Gemba K, Yasugi M, Kozuki T, Kato Y, Katsui K, Kanazawa S, Ueoka H, Tanimoto M, Kiura K. A phase II study of S-1 chemotherapy with concurrent thoracic radiotherapy in elderly patients with locally advanced non-small-cell lung cancer: the Okayama Lung Cancer Study Group Trial 0801. Eur J Cancer. 2014;50(16):2783-90.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括・業務項目）

メトホルミンによる腫瘍局所免疫疲弊解除に基づく癌免疫治療に関する研究

業務項目： 消化器癌採取・管理

担当責任者 藤原 俊義 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

がんに対する免疫応答は患者体内で誘導されるが、腫瘍内ではその機能が発揮できない。これはCD8T細胞が腫瘍局所で免疫チェックポイント分子PD-1, Tim-3などを発現し、一方腫瘍ではそれぞれのリガンドであるPD-L1, ガレクチン9が発現し、分子間会合によりCD8T細胞が疲弊することが原因である。この疲弊現象はメトホルミンで回復することが動物モデルで証明されたが、消化器癌でも同じであることを証明し、新たな消化器癌治療の方向性を提示する。

A. 研究目的

メトホルミン服用により、消化器癌局所浸潤CD8T細胞の疲弊が解除され、多機能性が回復することを証明する。

B. 研究方法

消化器癌と診断された時点から手術直前までメトホルミン服用を行う。服用前後の末梢血CD8T細胞、また、腫瘍の一部からリンパ球を回収し、その表面形質の変化と多機能性についてフローサイトメトリーを用いて解析する。

（倫理面への配慮）がん患者のメトホルミン介入試験の前に健常人で研究を行い、予め参考となるデータを取得し、患者への説明に役立てる。

C. 研究結果

メトホルミンを服用した20名の健常人リンパ球を凍結保存した。腫瘍局所のリンパ球は凍結保存後に解凍して実験に使うことが出来ないことが新たに判明した。肺癌グループと共同で行った。

D. 考察

消化器癌浸潤リンパ球は既に疲弊しているため、回収・凍結保存後の生存率が悪く、機能解析に向かないと考えられた。

E. 結論

末梢血リンパ球の凍結保存→解凍→実験は可能だが、消化器癌局所から回収したリンパ球は凍結せず、その日のうちに解析を終了する必要がある。

F. 健康危険情報 総括の項を参照

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年記入）

1. 論文発表

- (1) Shigeyasu, K., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., Kagawa, S., Fujiwara, T. Fluorescent virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumor cells for non-invasive companion diagnostics. Gut, 64: 627-635, 2015.
- (2) Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Nagasaka, T., Shirakawa, Y., Kagawa, S., Urata, Y., Hoffman, R.M., Fujiwara, T. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. Mol. Ther., 23: 501-509, 2015.