

表 題 糖尿病薬治療薬のがん免疫微小環境に及ぼす影響の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 齋藤 晶

担当指導教員氏名 佐田 尚宏 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 消化器疾患学
専攻科 消化器外科学

2022年1月7日申請の学位論文

目次

略語一覧	4
1. はじめに	6
2. 実験材料と方法	11
2-1. 末梢血由来免疫細胞を用いた基礎的検討	
2-1-1. 試薬と抗体	
2-1-2. 末梢血からの細胞分離	
2-1-3. M2 マクロファージの分化誘導	
2-1-4. T リンパ球の細胞増殖アッセイ	
2-1-5. 好中球細胞外トラップ (NETs) の形成	
2-1-6. フローサイトメトリー	
2-2. ヒト大腸癌組織を用いた組織学的検討	
2-2-1. 試薬と抗体	
2-2-2. 対象症例	
2-2-3. 免疫組織化学染色 (IHC)	
2-2-4. 多重免疫組織化学染色 (Multiplex IHC)	
2-2-5. 組織線維化の評価	
2-3. 統計学的解析	

3. 結果 26

3-1. 糖尿病合併大腸癌患者の予後に及ぼすメトホルミンの影響

3-1-1.大腸癌根治切除症例の再発・予後に及ぼすメトホルミンの影響

3-1-2. Stage IV 症例の予後に及ぼすメトホルミンの影響

3-2. メトホルミン内服患者の大腸癌組織におけるがん微小環境の変化

3-2-1. 対象

3-2-2. 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の検討

3-2-3. 腫瘍関連マクロファージ(TAM)の検討

3-2-4. 腫瘍関連好中球(TAN)、好中球細胞外トラップ(NETs)の検討

3-2-5. Tertiary Lymphoid structure (TLS) の検討

3-2-6. 間質の線維化の評価

3-3.大腸癌免疫学的微小環境に及ぼすメトホルミンの作用機序

3-3-1. 単球からマクロファージの分化に及ぼすメトホルミンの影響

3-3-2. メトホルミン存在下マクロファージの T リンパ球増殖に対する
影響

3-3-3. メトホルミンの NET 形成能に及ぼす影響

3-4. 糖尿病合併大腸癌患者の予後に及ぼす DPP-4 阻害薬の影響

3-5. DPP-4 阻害薬内服患者の大腸癌組織におけるがん微小環境

の変化

3-5-1. 対象

3-5-2. 癌細胞の上皮間葉転換の検討

3-5-3. 腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の検討

3-5-4. 腫瘍関連マクロファージ（TAM）の検討

3-5-5. Tertiary Lymphoid structure（TLS）の検討

3-6. 糖尿病合併大腸癌治癒切除術症例の予後に及ぼすメトホルミン

と DPP-4 阻害薬の影響

4. 考察	71
5. おわりに	80
6. 謝辞	82
7. 参考文献	83

略語一覧

略語	名称
APC	Allophycocyanin
AMPK	5'Adenosine monophosphate-activated protein kinase
BSA	Bovine serum albumin
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DFS	Disease-free survival
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GC	Germinal center
HPF	High Power Field
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
IHC	Immunohistochemistry
NETs	Neutrophil extracellular traps
OS	Overall survival
PBS	Phosphate buffered saline

PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBMo	Peripheral blood monocyte
PD-1	Programmed death-1
PD-L1	Programmed death-Ligand1
PE	Phycoerythrin
PMN	Polymorphonuclear cell
rhIL-4	Recombinant human interleukin-4
rhIL-10	Recombinant human interleukin-10
SCID	Severe combined immunodeficiency
TAM	Tumor associated macrophage
TAN	Tumor associated neutrophil
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TIL	Tumor infiltrated lymphocyte
VEGF	Vascular endothelial growth factor

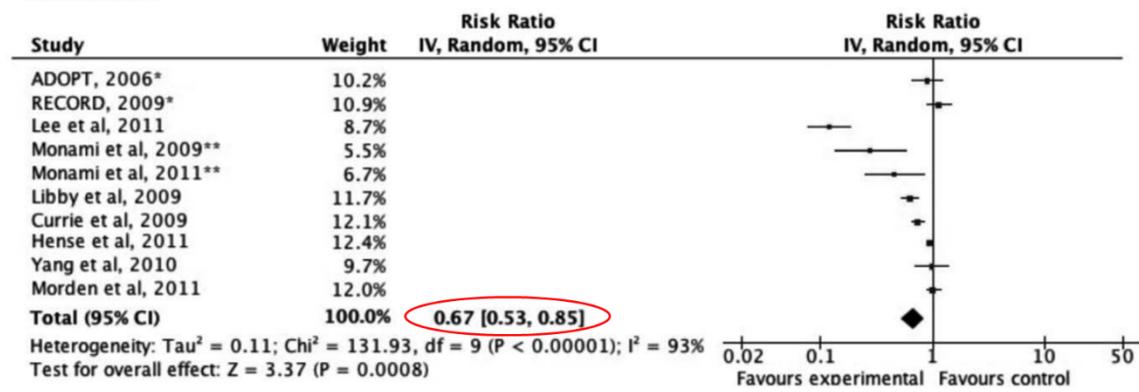
第1章 はじめに

糖尿病は様々な癌の発症リスクを高めるだけでなく、担癌患者における予後不良因子になることが知られている(1-4)。これまでの研究で、高血糖やインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症、インスリン様成長因子の血中レベルの上昇や肥満に伴うサイトカイン（アディポカイン）の増加が、腫瘍形成および腫瘍細胞の増殖の促進に主要な役割を果たしていると考えられている(1,2)。

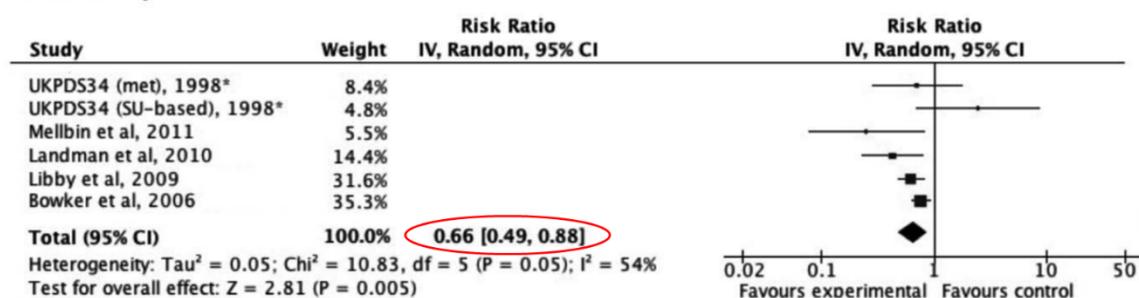
近年、糖尿病を有する癌患者の予後が内服している糖尿病治療薬の種類によって大きく異なることが明らかになってきた(5)。その中でも、臨床的に有用な薬剤で古くから使用されているメトホルミンに抗腫瘍効果があることが複数の研究で報告され注目されている(6-14)。これまでの疫学研究をまとめたメタアナリシスでは、メトホルミンを使用している糖尿病患者では他の治療薬を使用している患者と比べ、がんの発生率と死亡率ともに約 2/3 程度に減少することが解っている(8) (図 1)。しかし、メトホルミン使用群で悪性腫瘍の発症や死亡率が減少するという retrospective な研究が多数報告された際に、immortality bias を反映したに過ぎないみかけ上の positive results であるという批判が提起された(15)。メトホルミンの抗腫瘍効果は prospective な RCT で証明されねばならないとされたが、その後説得力のある RCT は報告されていない。従って、担癌患者に対してメトホルミン投与を推奨するガイドラインは今のところ

ないと思われる。

Incidence



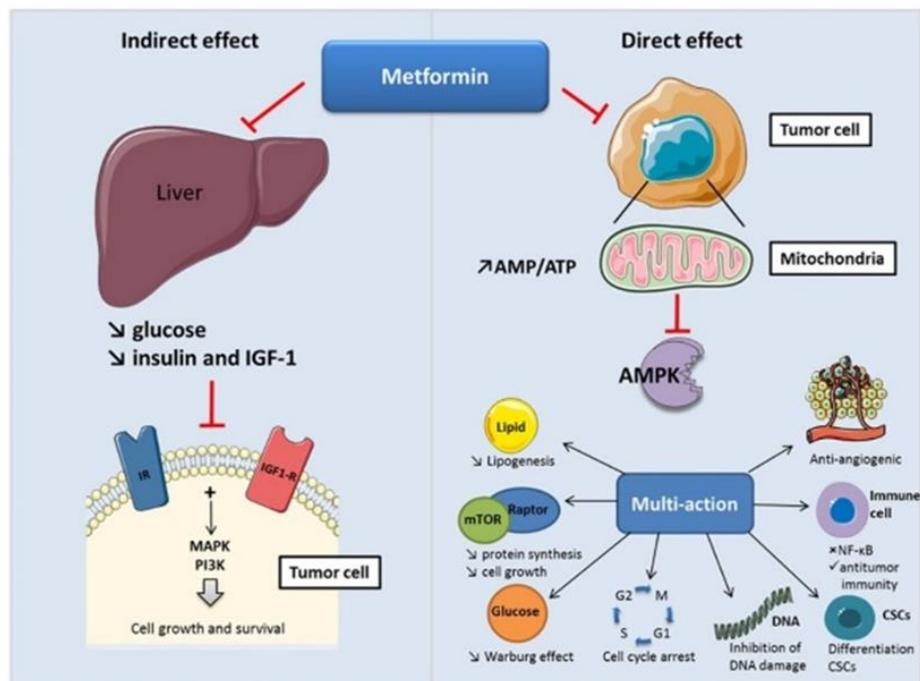
Mortality



(Noto H, PLoS ONE 2012, 7(3): e33411 より引用)

図1 糖尿病を有する担癌患者のメトホルミン内服による発生率と死亡率

メトホルミンのがん抑制機序としては、血中のグルコースやインスリン様成長因子レベルを減少させることにより、腫瘍細胞の増殖を抑制する間接的経路と、がん細胞の AMP dependent kinase (AMPK) を活性化させることにより mTOR 経路を阻害することによって増殖を抑制する直接的経路の二つの機序があると考えられてきた(9-12) (図2)。



(Marie Daugan, *Pharmacological Research*. 2016;113:675-685.より引用)

図2 メトホルミンの抗腫瘍作用

しかし近年、マウスを用いた動物実験から、メトホルミンは腫瘍免疫に対しても大きな影響を与えていることが判明し、注目されている。例えば、マウス白血病細胞 RLmale1 を皮内注射した wild type の BALB/ c マウスに対して、メトホルミンを経口投与すると腫瘍は縮小効果を示すが、同様の実験を重症複合免疫不全症 (SCID) マウスや CD8 Tリンパ球を除去させた状態で行うと全く抗腫瘍効果は示さない(13, 14)。また、メトホルミンが腫瘍細胞の細胞死受容体リガンド-1 (Programmed death-ligand 1: PD-L1) 発現を低下させることによ

り、Tリンパ球を介した細胞障害を増強する効果も報告されている(16-18)。これらの事実から、メトホルミンの抗腫瘍効果の機序には、担癌生体においてTリンパ球におけるPD-1-PD-L1経路を介した疲弊シグナルの解除が関与していることが明らかとなってきた。

がんの浸潤・転移は、がん微小環境におけるがん細胞とがん微小環境を構成する細胞（免疫細胞・血管内皮細胞・線維芽細胞など）の相互作用により制御されている(19, 20)。がん微小環境に浸潤した免疫細胞には、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）以外にも、腫瘍関連マクロファージ（TAM）、腫瘍関連好中球（TAN）などが存在する。近年の研究で、TAMやTANには様々なサブタイプが存在し、がんの進行を抑制する場合と促進的な作用を発揮するケースがあることが知られている(21, 22)。しかし、メトホルミンがヒトのがん微小環境においてこれらの免疫細胞の浸潤や機能をどのように調節しているかは明らかにされていない。

そこで、本研究では、まず当科で2型糖尿病を合併した大腸癌症例において、メトホルミン服用が予後に与える影響を検討するとともに、切除標本の免疫組織化学染色（IHC）を施行し、腫瘍細胞および腫瘍浸潤免疫細胞の表現型を解析し、メトホルミンがヒト大腸癌の免疫学的微小環境に与える影響を明らかにすることとした。また、その免疫学的機序についてマクロファージ、好中

球に焦点を絞って検討した。

さて、近年、糖尿病治療において DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 阻害薬が広く使用されてきている。しかし、DPP-4 阻害薬のがんの予後に与える影響に関しては一定の見解が得られていない。最近の疫学研究のメタアナリシスでは、DPP-4 阻害薬は癌の発生率とは有意に関連していないとされているが(23-25)、基礎研究では、DPP-4 阻害薬が癌の転移を抑制する(26, 27)、または促進する(28-30)ことを示唆する報告もある。そこで、次に、前述の糖尿病合併大腸癌患者を対象として、DPP-4 阻害薬が根治切除後の患者予後に与える影響を検討するとともに、切除組織切片を使用して多重免疫組織化学染色 (Multiple IHC) を行い、浸潤免疫細胞のフェノタイプをより詳細に検討し、腫瘍免疫に対する DPP-4 阻害薬の影響を検討することにした。

第2章 実験材料と方法

2-1. 末梢血由来免疫細胞を用いた基礎的検討

2-1-1. 試薬と抗体

表1 in vitro で使用した試薬・抗体

N/A: Not Applicable

商品名	clone/一般名	会社
Anti-human CD4 (FITC)	RPA-T4	BioLegend
Anti-human CD8 (APC)	RPA-T8	BioLegend
Anti-human CD206 (FITC)	RUO	BD Biosciences
Anti-human CD163 (PE)	REA812	Miltenyi Biotec
Anti-human CD86 (FITC)	FM95	Miltenyi
Anti-human PD-L2 (PE)	24F.10C12	BioLegend
Anti-human PD-L1 (APC)	29E.2A3	BioLegend
Anti-Biotin Micro Beads	N/A	Miltenyi
Anti-CD3 mAb GMP grade	OKT3	Takara Bio
Biotin Anti-human CD14	61D3	eBioscience
Biotin Anti-human CD16	3G8	BioLegend
Biotin Anti-human CD19	HIB19	eBioscience
CellTrace CFSE	-	Life technology
Fc-block reagent	N/A	Miltenyi
M-CSF	N/A	Protein Tech
rhIL-4	N/A	R&D systems
rhIL-10	N/A	R&D systems
Isotype control IgG1k (FITC)	N/A	BioLegend
Isotype control IgG1 (PE)	M0PC-21	BioLegend
Isotype control IgG2b	MPC-11	BioLegend
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D	Invitrogen
MACS buffer	N/A	Miltenyi Biotec
SYTOX green	N/A	Thermo Fisher Scientific
RBC lysis buffer 10x	N/A	BioLegend

2-1-2. 末梢血からの細胞分離

健康人より末梢血を 20 ml 採取しデキストラン 5 ml とサイトレート 3.5 ml 溶液と混和し、赤血球を沈殿させた後に上清を、Ficoll-Paque PLUS (GE, Healthcare) 上に添加し、3000 rpm, 15 分間で遠心後、末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMC) 層と多形核細胞 (Polymorphonuclear cells; PMN) 層に分離した。PBMC 層に含まれる細胞を回収し、0.02% EDTA 添加 PBS 2 ml に懸濁後、1800 rpm, 7 分間、さらに同様の方法で懸濁後 800 rpm, 7 分間で再度遠心し、細胞をカウントした。

(i) 単球

PBMC 層から得られた細胞を MACS buffer 溶液 (Miltenyi Biotec, MACS) 60 μ l で懸濁後、Fc block (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) で 4 °C, 10 分間で処理後、Anti-human CD14 Micro beads (Miltenyi Biotec, MACS) を細胞数 1×10^7 個当たり 20 μ l 添加、4 °C, 5 分間で結合させ、MACS buffer 溶液で洗浄後、再度 buffer 溶液 500 μ l 溶液にして、分離用磁石セパレーターに取り付けた LS column (Miltenyi Biotec, MACS) に注入した。カラム 3 ml の MACS buffer で 3 回洗浄し、カラムを磁石から外し、カラムに結合した CD14 陽性細胞を positive selection 法で回収し単球 (peripheral blood monocyte; PBMo) として実験に用いた。

(ii) T リンパ球

PBMC 層から得られた細胞を MACS buffer 溶液 (Miltenyi Biotec, MACS) 60 μ l で懸濁後、Fc block (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) で 4 °C, 10 分間で処理後、Biotin 標識した Anti-human CD14 抗体、Anti-human CD16 抗体、Anti-human CD19 抗体を 5 μ l ずつ加え、4 °C, 10 分間静置、MACS buffer 液で洗浄後 Anti-Biotin MicroBeads を 20 μ l 加えて 4 °C, 15 分間で結合させ、磁気分離システムを用いて CD14, CD16, CD19 陽性細胞を Negative selection 法で除去して T リンパ球を回収した。

(iii) 好中球

PMN 層に含まれる細胞を回収し、RBC lysis buffer 10x (BioLegend, USA) を用いて 4 °C, 5 分間溶血処理後、0.02 %EDTA 添加 PBS 8 ml で洗浄・遠心 (1500 rpm 5 分間) し末梢血好中球を回収した。

2-1-3. M2 マクロファージの分化誘導

PBMo を 24 well プレートに 5.0×10^5 個/well 播種させ、M-CSF (終濃度 50 ng/ml)(peprotech, Japan)を添加した RPMI1640 培地 (10 % FBS) を用いて 5% CO₂, 37 °C で培養した。5 日間培養後、rhIL-4 (終濃度 20 ng/ml) (R&D systems, USA) + rhIL-10 (終濃度 20 ng/ml) (R&D systems, USA)、更にメトホルミン

塩酸塩（終濃度 0, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM）（Fujifilm, Japan）を添加しさらに 37 $^{\circ}$ C, 2 日間培養を行った。培養後 Accutase solution (Sigma-Aldrich, Missouri) を用いて 37 $^{\circ}$ C, 15 分間処理後、細胞を剥がし回収した（図 3）。

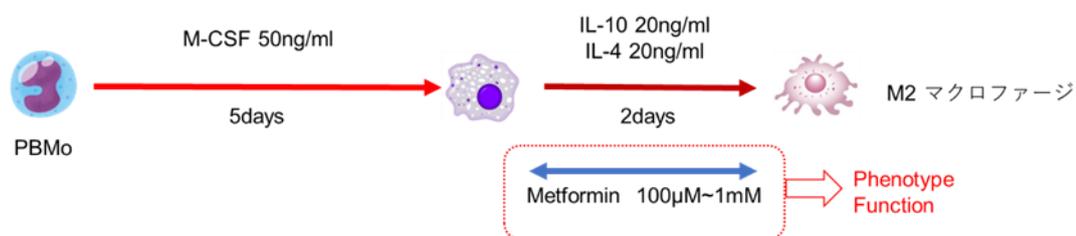


図 3 マクロファージに対するメトホルミンの影響を検討した実験デザイン

回収した細胞を、抗 CD86(FITC)抗体、抗 CD206(FITC)抗体、抗 CD163(PE)抗体、抗 PD-L2(PE)抗体、抗 PD-L1(APC)抗体を用いて染色し、フローサイトメトリー（FACS Calibur, BD）を用いて、マクロファージの表現型を評価した。

2-1-4. T リンパ球の細胞増殖アッセイ

T リンパ球を CellTrace CFSE (5 μ g/ml)(Life technology, USA)で 37 $^{\circ}$ C, 15 分間染色し、PBS で洗浄・遠心（1500 rpm 5 分間 \times 3 回）した。染色した T リンパ球を RPMI1640 培地(10% FBS)で 1.0×10^6 個/well に再懸濁し、Anti-human CD3 抗体（OKT3）（5 μ g/ml）でコーティングした 24 well plate に播種させ、メトホルミン塩酸塩（終濃度 0, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM）を添加し 3 日

間培養後、細胞を回収した。抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体で染色し、それぞれの分画の T リンパ球の増殖をフローサイトメトリーで評価した。

また、抗 CD3 抗体をコーティングした 24 well plate に 4.0×10^5 個/well の CFSE 染色した T リンパ球と 2.0×10^5 個/well のメトホルミン（終濃度 0, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM）で処理した M2 マクロファージを共培養させ、T リンパ球の増殖に対する影響を検討した。

2-1-5. NETosis 形成アッセイ

好中球を RPMI1640 培地（FBS(-)）で 1×10^6 個/well に調整し 6 well plate に播種した。LPS（終濃度 5 μ g/ml）（Sigma-Aldrich, Missouri）とメトホルミン塩酸塩（終濃度 0, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M）を添加し 37 °C, 3 時間培養後、SYTOX Green（Thermo Fisher Scientific, Massachusetts）を添加後に蛍光顕微鏡で観察し比較検討した。

2-1-6. フローサイトメトリー

使用する細胞を Fc block で 4 °C, 10 分間で処理後、抗体（Anti-human CD86(FITC)抗体、Anti-human CD206(FITC)抗体、Anti-human CD163(PE)抗体、Anti-human PD-L2(PE)抗体、Anti-human PD-L1(APC)抗体、Anti-human

CD4 抗体(PE)、Anti-human CD8 抗体(APC)) を用いて 4°C, 30 分間で染色した。染色後 PBS で洗浄・遠心後 (1500 rpm 5 分×3 回)、7-AAD による死細胞染色を行い、フローサイトメトリー (FACS Calibur, BD) で測定し、CellQuest Pro Software (BD)を用いて解析した。

2-2. ヒト大腸癌組織を用いた組織学的検討

2-2-1. 試薬と抗体

表 2 免疫組織化学染色で使用した試薬・抗体

商品名	clone/一般名	会社
Rabbit mAbs to CD3	SP7	Thermo Fisher Scientific
Mouse mAb to CD8 α	1G2B10	Protein Tech
Mouse mAbs to CD68	KP1	Abcam
Mouse mAbs to CD163	OTI2G12	Abcam
Mouse mAbs to CD20	L26	Abcam
Mouse mAbs to Zeb	2A8A6	Abcam
Rabbit mAbs to Ki67	SP6	Abcam
Mouse mAbs to pan Cytokeratin	C-11	Abcam
Rabbit pAb to HistoneH3	N/A	Abcam
Blocking One Histo	N/A	Nacalai Tesque
HistoVT One	N/A	Nacalai Tesque
DAKO REAL™ Envision™ Detection system	N/A	DAKO
DAKOREAL™EnVision™/ HRP, Rabbit/Mouse	N/A	DAKO
ImmPACT®AMECRed Substrate Kit (AEC)	N/A	Vector Laboratories

2-2-2. 対象症例

自治医科大学の倫理委員会（承認番号臨 A20-110）によって承認され、ヘルシンキ宣言の指針に従って行った。2009年1月から2020年3月までに自治医科大学附属病院 消化器一般移植外科で治癒切除術を施行された大腸癌（病理学的進行度 I-III）患者の中で、既往症に2型糖尿病をもつ患者を抽出した。これらの患者におけるメトホルミン内服またはDPP-4阻害薬内服の有無、性別、年齢、疾患名、手術日、術式、病理学的所見（組織型、腫瘍の深さ、リンパ節転移、血管浸潤、リンパ管浸潤）及び予後に関するデータを、診療録から抽出し解析した。

その中から、メトホルミン内服群40人・非内服群40人、DPP-4阻害薬内服群40人・非内服群40人を選択し、外科的に切除された標本を用いて組織切片を作成した。各々の患者の選択方法を以下に記す。

（i）メトホルミン

メトホルミン内服群40人とメトホルミン非内服群215人から傾向スコアマッチング法によって選択された40人を対照群として使用した。傾向スコアマッチングのために使用した交絡因子は年齢、性別、腫瘍部位、組織型、深達度、リンパ節転移、病理学的進行度、術後補助化学療法の有無とした。

（ii）DPP-4阻害薬

DPP-4阻害薬内服群133人のうち2017年7月31日から2020年3月31日

に手術を施行された 40 人と DPP-4 阻害薬非内服群 126 人から傾向スコアマッチング法によって選択された 40 人を対照群として使用した。傾向スコアマッチングのために使用した交絡因子は年齢、性別、腫瘍部位、組織型、深達度、リンパ節転移、病理学的進行度、術後補助化学療法の有無、およびメトホルミン内服の有無とした。

2-2-3 免疫組織化学染色 (IHC)

手術標本から代表切片を選択し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から 4 μm の厚さの切片に薄切した。IHC は、DAKOREAL™Envision™検出システム (Glostrup、Denmark) を使用して実施した。

キシレン 7 分間 \times 4 により脱パラフィンを行い、100 %エタノール 5 分間 \times 2, 100 %エタノール 3 分間, 90 %エタノール 3 分間, 80 %エタノール 3 分間, 70 %エタノール 3 分間の処理により再水和した後、切片を流水で 10 分間洗浄した。抗原賦活化には、HistoVT One (nacalai tesque, Japan) を用いて抗原を賦活化し、0.3 %過酸化水素 (30 % 過酸化水素 1.5 ml+100 % メタノール 148.5 ml) で内因性ペルオキシダーゼブロックを 30 分間行った。PBS で洗浄した後、非特異的染色に対するブロッキングを Blocking One Histo を使用して 10 分間行った。次に、切片に抗体希釈液 (Signal Enhancer HIKARI for Immunostain

Solution B)で希釈した1次抗体を室温で30分間反応させた。

切片をPBSで洗浄し、二次抗体(DAKOREAL™EnVision™/HRP、Rabbit/Mouse (DakoCytomation、Denmark))を室温で30分間反応後にDako Envisionキットで発色し可視化させた。

組織に浸潤した免疫細胞の評価は、標本を400倍の顕微鏡下で観察し、癌組織と正常組織の境界領域(invasive front)を無作為に5視野選択し、1視野あたりの染色された陽性細胞をカウントし、5視野の平均値を浸潤細胞数とした。三次リンパ様構造(Tertiary lymphoid structure: TLS)は、CD20陽性Bリンパ球がTリンパ球に囲まれた胚中心(germinal center: GC)として凝集する形態として検出される。TLSの総数は、40倍の顕微鏡下で観察し、無作為に選択した5つの視野に存在するTLS数の合計とした。

2-2-4. 多重免疫組織化学染色 (Multiplex IHC)

同様に、パラフィン切片を作成した。キシレン7分間×4により脱パラフィンを行い、100%エタノール5分間×2, 100%エタノール3分間, 90%エタノール3分間, 80%エタノール3分間, 70%エタノール3分間処理により再水和した後、切片を流水で5分間洗浄した。脱パラフィン後、スライドをマイヤーヘマトキシリンで1分間染色し、水溶性封入材(VectaMount AQ Aqueous

Mounting Medium (Vector Laboratories, California)) を使用し、封入した。

OlyVIA®SLIDEVIEWWS200 (OLYMPUS、日本) を使用して組織全体をスキャンした。画像取り込み後、Tween 20 を含む Tris Buffered Saline (TBS-T) に 15 分間浸してカバーガラスを取り外した。内因性ペルオキシダーゼブロックは、0.3 %過酸化水素 (30 % 過酸化水素 1.5 ml+100 % メタノール 148.5 ml) を使用し 30 分間行った。抗原賦活化には、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0) を使用し、電子レンジによるマイクロウェーブ処理を 10 分間 (1000 W で 3 分後に 200 W で 7 分) 行った。TBS-T で洗浄した後、非特異的染色に対するブロッッキングを Blocking One Histo を使用して、10 分間行った。次に、一次抗体を室温で 30 分間反応させた。切片を TBS-T で洗浄し、二次抗体 (Rabbit または Mouse の Histofine Simple Stain PO (M) キット (ニチレイ, Japan)) を室温で 30 分間反応させ、ImmPACT®AMECRed Substrate Kit (AEC) (Vector Laboratories, California) を用いて発色した。スライドを再び VectaMountAQ Aqueous Mounting Medium で封入し、OlyVIA® SLIDEVIEWWS200 を使用してスキャンした。

画像取り込み後、カバーガラスを TBS-T で取り外し、染色されたスライドを、2 分毎に 90 %エタノール、80 %エタノールおよび 70 %エタノールを用いて脱色し、マイクロ波法を使用して、切片を 10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液

(pH6.0) を用いて電子レンジによるマイクロウェーブ処理を 10 分間 (1000 W で 3 分後に 200 W で 7 分) 行い、抗体をストリッピング処理した。次に、上記の、ブロッキングから始めて、組織に異なる 1 次抗体を反応させ再染色した。この染色→ストリッピング→染色→ストリッピングのサイクルを繰り返し行い全ての抗体を染色した。

すべてのサイクルで 1 次抗体が完全に除去されていることを、ストリッピング後に一次抗体処理の過程を省き二次抗体の反応後 AEC により発色しないことを確認した (ストリッピングテスト)。染色は 3 通りのパネルで構成した。(表

3) 全ての過程において 1 次抗体が除去できていることを確認した。

Multiplex IHC は、①免疫細胞パネル②腫瘍細胞パネル③NETs パネルの 3 種類のパネルで行い、各パネルにてストリッピングテストを行い 1 次抗体/2 次抗体が除去されていることを確認した (図 4)。

《免疫細胞パネル》

		Round 1	Round 2	Round 3	Round 4	Round 5
1 次抗体	Hematoxylin	CD3	CD68	CD163	CD8 α	CD20
抗体希釈率		1:150	1:100	1:300	1:2000	1:100
2 次抗体		Rabbit	Mouse	Mouse	Mouse	Mouse
AEC 反応時間		10 分	15 分	15 分	5 分	5 分

《癌細胞パネル》

		Round 1	Round 2
1次抗体	Hematoxylin	Zeb1	pan Cytokeratin
抗体希釈率		1:200	1:400
2次抗体		Mouse	Mouse
AEC 反応時間		15 分	5 分

《NETs パネル》

		Round 1	Round 2
1次抗体	Hematoxylin	Cit H3	CD66b
抗体希釈率		1:50	1:600
2次抗体		Rabbit	Mouse
AEC 反応時間		15 分	5 分

表3 Multiplex IHC に使用したパネル

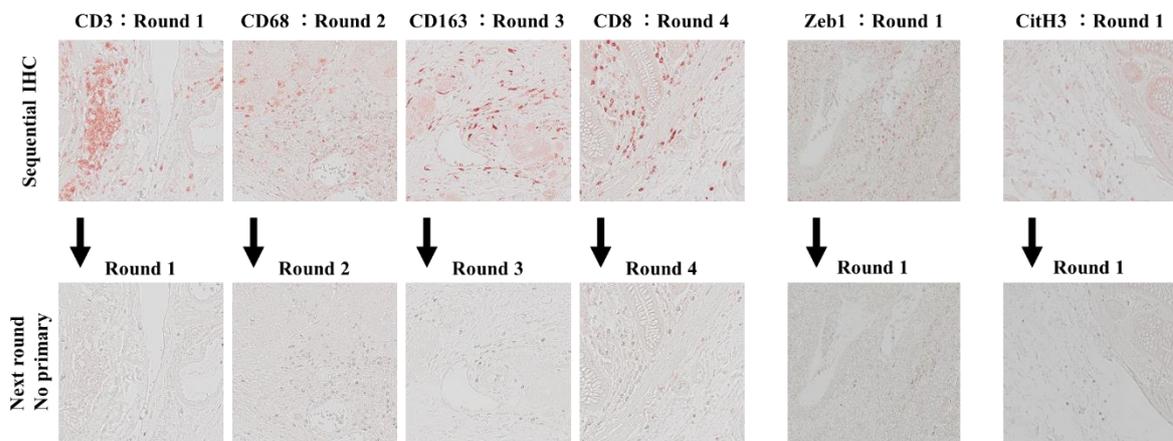


図4 免疫細胞パネル (左)、腫瘍細胞パネル (中央)、NETs パネル (右) に

おけるストリッピングテスト

全ての染色と画像取り込みが終了後以下の方法で画像処理を行った。

GPLv2 (General Public License バージョン 2.0) で利用可能な CellProfiler バージョン 2.1.1 パイプライン「Alignment_Batch.cppipe」を使用して、単一細胞ごとに重なるように、画像をデジタル化した。細胞は抗体ごとに疑似カラーで視覚化し、ImageJ Fiji (National Institutes of Health, MD) によって重ね合わせた (図 5)。

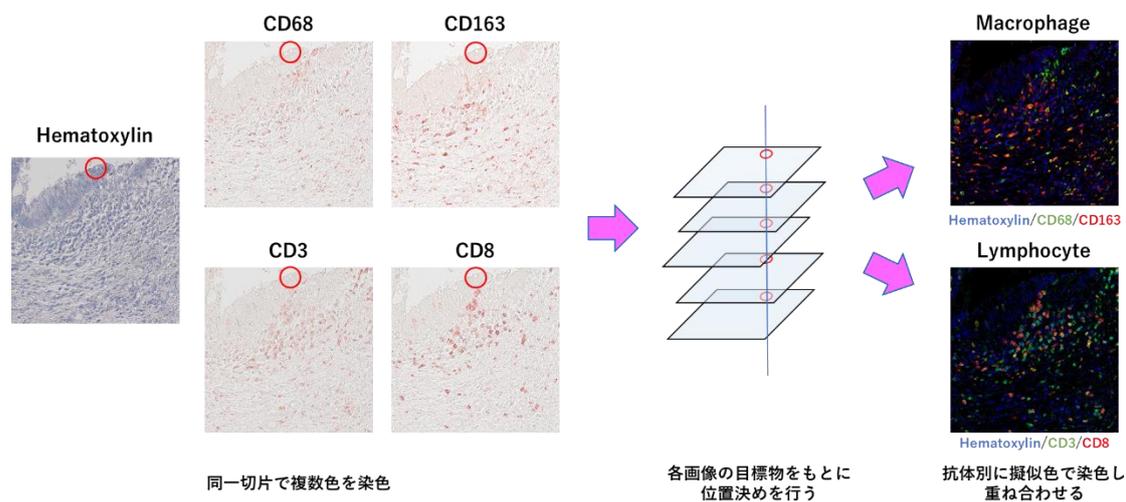


図 5 Multiplex IHC の画像処理過程の概略

浸潤免疫細胞数の評価は、invasive front で無作為に選択された 1 領域を $1.0 \times 1.0 \text{ mm}^2$ とした 3 領域で陽性細胞数の平均とした。CD3 陽性 T リンパ球または CD68 陽性マクロファージは単一染色画像でカウントし、CD3 陽性 CD8 陽性 T リンパ球または CD68 陽性 CD163 陽性マクロファージは二重染色画像

でカウントした。TLS は、CD20 陽性 B リンパ球が CD3 陽性 T リンパ球に囲まれたクラスターとして定義した。TLS の総数は、40 倍の顕微鏡下で観察し、無作為に選択した 5 つの視野に存在する TLS 数の合計とした。Zeb1 陽性癌細胞数の評価は、invasive front で無作為に選択された 1 領域を $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ とした 3 領域で陽性細胞数の合計とした。

2-2-5. 組織線維化の評価

Masson trichrome 染色を用いて膠原線維を染色し線維化の評価を行った。キシレン 7 分間 \times 4 により脱パラフィンを行い、100 %エタノール 5 分間 \times 2, 100 %エタノール 3 分間 \times 4 処理により再水和した後、切片を流水で 10 分間洗浄した。10 %重クロム酸カリウムと 10 %トリクローム酢酸の混合液 (1 : 1) を用いて 20 分間反応させ、流水で 5 分間洗浄した。次にワイトゲルトの鉄ヘマトキシレン液を用いて 10 分間反応させ、流水で 5 分間洗浄した。次に 2.5 % リンタングステン酸を用いて 45 秒、0.75 % オレンジ G 液を用いて 1 分間反応させ 2 相に分けて 1 % 酢酸で洗浄した。次に ポンソー・キシリジン・酸フクシン・アゾフロキシジン混合液 で 30 分間反応させ、2 相に分けて 1 % 酢酸で洗浄した。次に 2.5 % リンタングステン酸を用いて 10 分間反応させ、2 相に分けて 1 % 酢酸で洗浄した。

次にアニリン青液を用いて5分間反応させ、2相に分けて1% 酢酸で洗浄した。

最後に100% エタノール 3分間、5分間×2 処理後キシレン 5分間×4で脱水・透徹しマリノールで封入した。

線維化の評価は、染色による線維化の程度を Grade 0 から 3 までスコアリングし (fibrosis score)、4 人の評価者が invasive front を 40 倍の顕微鏡下で観察して決定した fibrosis score の平均値で行った。

2-3. 統計学的検討

データは Prism8 (Graph Pad Software, USA)、IBM SPSS Statistics version 21 (IBM, Armonk, NY, USA) 用いて解析し、値は平均値±標準偏差、または、中央値 (最小値-最大値) で表記した。統計解析は、独立 2 群間の比較には student-t 検定または Mann-Whitney 検定を行った。無再発生存期間 (Disease free survival) については logrank 検定を行い、各因子の関連性について単変量解析は Fisher's 正確検定または Mann-Whitney 検定を、多変量解析は cox 比例ハザード検定を用いた。各検定では、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

第3章 結果

3-1. 糖尿病合併大腸癌患者の予後に及ぼすメトホルミンの影響

3-1-1. 大腸癌根治切除症例の再発・予後に及ぼすメトホルミンの影響

2009年1月から2019年6月に自治医科大学附属病院 消化器一般移植外科で施行された糖尿病を有する大腸癌の治癒切除症例は1781例だった。そのうち、糖尿病を合併した症例は267例で全体の15.0%であり、メトホルミン内服症例は52例で糖尿病症例中19.4%であった。臨床病理学的因子を両群間で比較すると、メトホルミン内服群が有意に若く (Median (M) =66 (42-79) vs M=70 (42-91) , p<0.05)、pN ステージが有意に低かった (p<0.05) が、その他の因子は2群間で有意差を認めなかった (表4)。

Clinical and pathological factors	Metformin		P value
	taken (n=52)	not-taken (n=215)	
Age	67 (42-79)	70 (42-91)	P<0.05
Gender (Male/Female)	37/15	146/69	P=0.74
Tumor site (Right/Left)	17/35	74/141	P=0.87
Histological type (tub,pap/por,muc)	50/2	206/9	P>0.99
pT category (t1/t2/t3/t4)	13/9/23/7	51/32/72/60	P=0.19
pN category (n0,n1,n2,n3)	42/8/2/0	140/56/17/2	P<0.05
pStage (I/II/III)	20/21/11	71/70/74	P=0.14
p-lymphatic invasion (Y/N/unknown)	23/28/1	102/107/2	P=0.65
p-vascular invasion (Y/N/unknown)	37/14/1	152/59/2	P>0.99
Serum HbA1c level	6.9 (5.3-11.3)	6.7 (5.3-9.4)	P=0.11

表4 メトホルミン内服群・非内服群の臨床病理学的因子

また、メトホルミン使用量を検討した結果、250mg: 2例、500mg: 13例、750mg: 8例、1000mg: 9例、1500mg: 8例、2000mg: 2例、不明: 10例であり、使用量別にDFSとOSを検討したが使用量と予後の間には明らかな相関は認めなかった。また、正確な使用期間がわかった症例は3例しかなく、メトホルミンの投与総量と予後の関係については検討できなかった。

2群間でリンパ節転移数を比較すると、メトホルミン内服群の転移リンパ節の数は、メトホルミン非内服群の転移リンパ節の数よりも減少する傾向を認め、全ての深達度で同様の傾向がみられた(図6)。

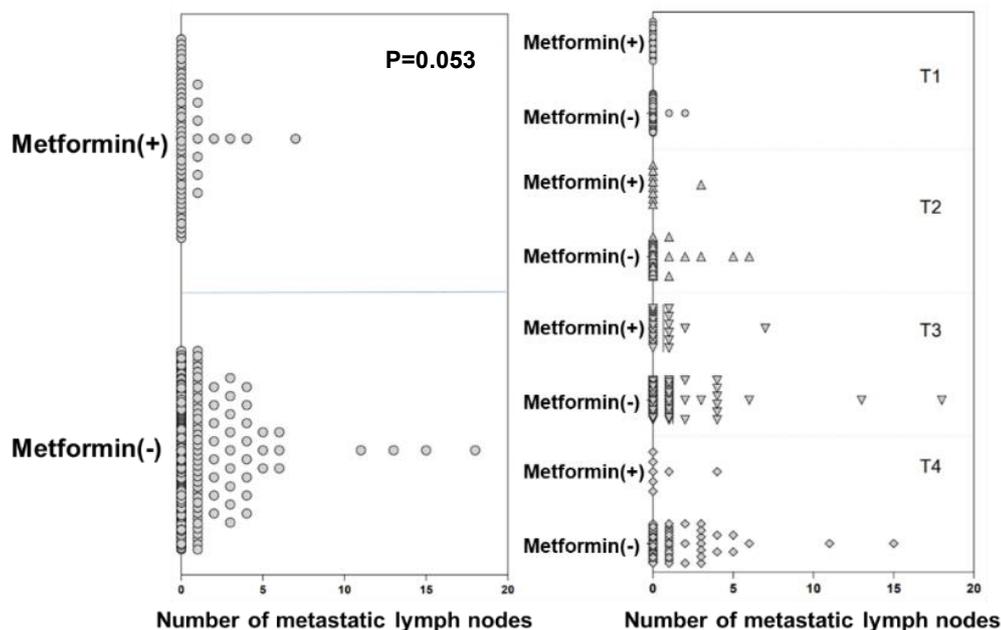


図6 大腸癌症例のメトホルミン内服群・非内服群の転移リンパ節数の比較

メトホルミン内服群 (n = 52) と非内服群 (n = 215) の転移性リンパ節数全体と深達度別に比較した。P値はMann-Whitney U検定で解析した。

予後を見てみると、メトホルミン内服群および非内服群でそれぞれ 215 例中 38 例 (17.8 %)、52 例中 3 例 (5.6 %) に再発がみられ、27 例 (12.6 %)、4 例 (7.5 %) が死亡していた。メトホルミン内服群と非内服群の 2 群を Cox 比例ハザードモデルで予後を比較した結果、2 群間で全生存率 (Overall survival; OS) に差は認めなかった (HR=0.59, 95% CI : 0.22 - 1.57, p=0.38) が、無病生存率 (Disease free survival; DFS) はメトホルミン内服群で有意に良好であった (HR=0.33, 95% CI : 0.15 - 0.71, p=0.0496) (図 7)。一方で、多変量 Cox 回帰分析において、メトホルミン内服は DFS と独立した相関関係を認めなかった (表 5)。

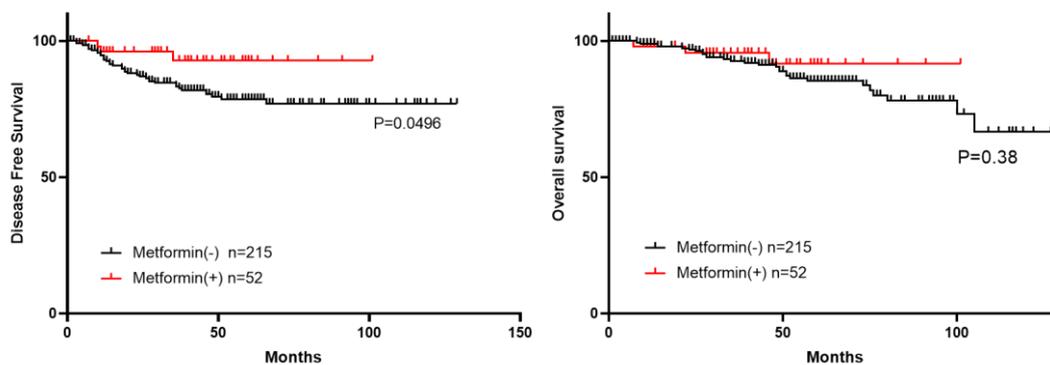


図 7 メトホルミン内服群・非内服群間での予後比較

メトホルミン内服群 (n = 52) と非内服群 (n = 215) の術後無病生存率 (DFS) と術後全生存率 (OS) を比較した。Kaplan-Meier 曲線を使用して評価し、P 値は logrank 検定で解析した。

Variables	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Age	1.401 (0.759-1.055)	0.279		
Gender(M/F)	1.039 (0.530-2.037)	0.911		
Pathological t stage	2.590 (1.729-3.879)	<0.001	2.095 (1.372-3.199)	<0.001
Pathological n stage	2.948 (2.072-4.194)	<0.001	2.124 (1.451-3.109)	<0.001
Adjuvant therapy	1.811 (0.907-3.615)	0.092		
Metformin intake	0.338 (0.1550-0.7401)	0.0496	0.494 (0.150-1.627)	0.21

表5 DFS と関連する因子における単変量および多変量解析

大腸癌症例の交絡因子（年齢、性別、深達度、リンパ節転移、術後補助化学療法の有無、メトホルミン内服の有無）と術後無病生存率との相関関係を単変量解析と多変量解析を行った。P 値は Fisher's 正確検定、多変量解析は cox 比例ハザード検定で解析した。

術後の投薬状況を可能な限り調査した結果、メトホルミンは 52 例中 42 例追跡可能であり、継続内服している症例は 30 例であった。そこで術後継続内服している患者だけにしぼって非内服患者と比較すると DFS の差がより顕著になった（図 8）。したがって、継続内服することによって予後に与える影響がより強くなることが判明した。

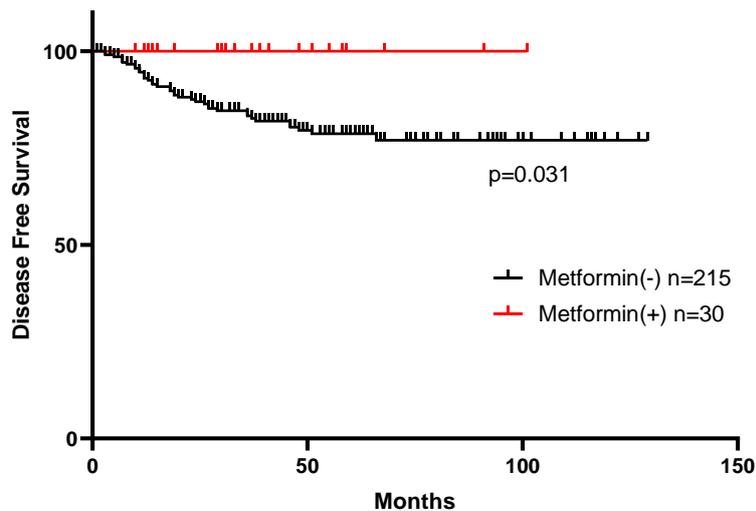


図8 メトホルミン継続内服群・非内服群間での予後比較

メトホルミンを術後に継続内服していたことを確認できた群 ($n = 30$) と非内服群 ($n = 215$) の術後無病生存率 (DFS) を比較した。Kaplan-Meier 曲線を使用して評価し、 P 値は logrank 検定で解析した。

3-1-2. Stage IV 症例の予後に及ぼすメトホルミンの影響

2010 年 4 月から 2020 年 3 月までに姑息的切除を行った糖尿病を合併した Stage IV 大腸癌症例をメトホルミン内服の有無・臨床病理学的因子・OS について追加で調査した。姑息的切除症例は全部で 125 症例だった。そのうち、糖尿病を合併した症例は 22 例と全体の 17.6% であり、メトホルミン内服症例は 5 例で糖尿病症例中 22.7% であった。全症例の臨床病理学的因子を表 6 に示す。

Clinical and pathological factors	Metformin		P value
	Taken (n=5)	not-taken (n=17)	
Age	68 (53-78)	65 (48-79)	P=0.47
Gender (Male/Female)	3/2	11/6	P=0.86
Tumor site (Right/Left)	2/3	6/11	P=0.86
Surgery (Curative/Palliative)	1/4	5/12	P=0.70
Metastasis			
Liver (Yes/No)	5/0	17/0	P>0.99
Lung (Yes/No)	2/3	5/12	P=0.86
Chemotherapy or Adjuvant therapy			P=0.40
None	1	4	
FOLFOX	2	3	
FOLFOX + Bmab	2	4	
FOLFOX + Cmab	0	1	
FOLFILI	0	2	
SOX	0	1	
CAPE	0	2	
Serum HbA1c level	7.1 (5.6-9.6)	6.6 (5.2-10.0)	P=0.75

表6 Stage IV大腸癌症例におけるメトホルミン内服別臨床病理学的因子の比較

2群間における深達度（pT）と肝転移（pH）を比較すると、メトホルミン内服群では全員が深達度 pT4 であるのに対して、非内服群では半数以上が pT2-3 に留まっていた。

しかしながら、肝転移の程度は、メトホルミン非内服群は半数以上が H2-3 であったのに対し、メトホルミン内服群では全員 H1 に留まっていた。

しかし、メトホルミン内服群と非内服群の OS に有意差は認めなかった

(HR=0.86, 95 %CI : 0.30 – 2.46, p=0.76) (図 9)。

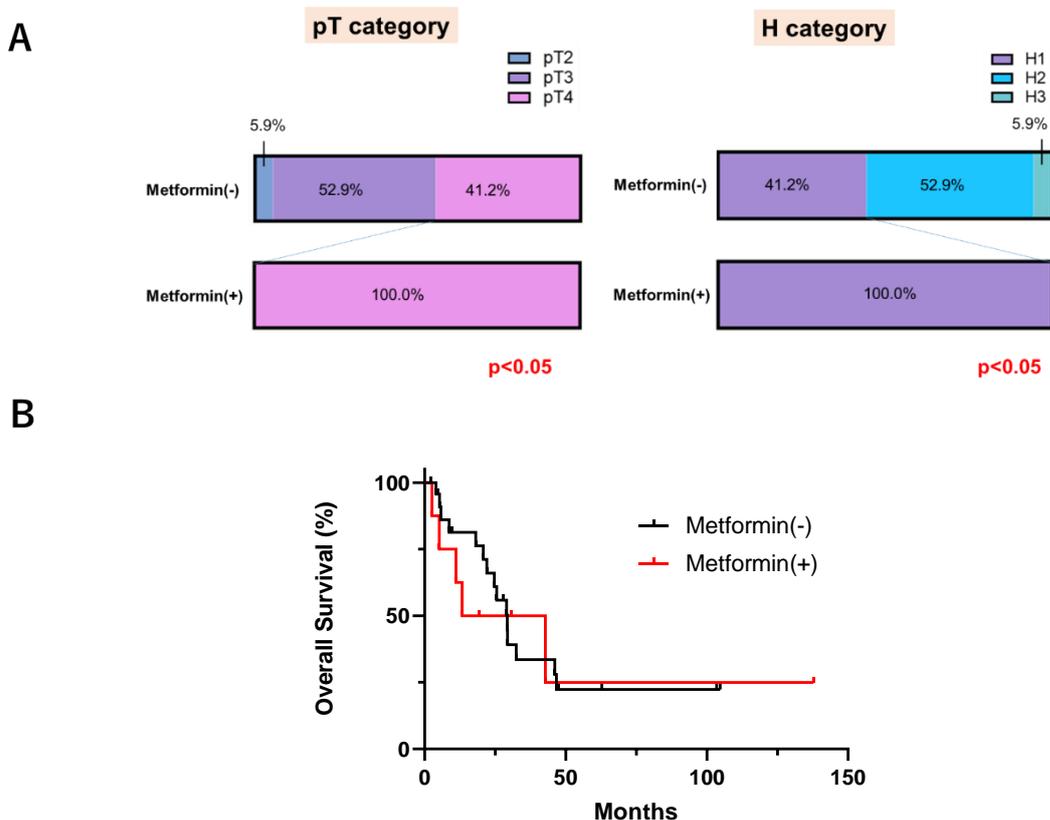


図 9 メトホルミン内服群と非内服群の 2 群間で pT category と H category

(A)、SatageIV大腸癌姑息切除後の OS (B) の比較

(A) メトホルミン内服群 (n = 5) と非内服群 (n = 17) の深達度と肝転移を比較した。

P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。

(B) メトホルミン内服群 (n = 5) と非内服群 (n = 17) の無病全生存率を比較した。

Kaplan-Meier 曲線を使用して評価し、P 値は logrank 検定で解析した。

3-2. メトホルミン内服患者の大腸癌組織におけるがん微小環境の変化

3-2-1. 対象

手術標本を用いて免疫細胞に対するメトホルミンの影響を調べることにした。

メトホルミン内服群 40 例に対して傾向スコアマッチング法により一致させた

メトホルミン非内服群 40 例を選択し、免疫組織学的に検討した（表 7）。

	Metformin(+) (n=40)	Metformin(-) (n=40)	p-value
Tumor site			
Cecum/Ascending/Transverse	16(40.0%)	18(45.0%)	p>0.99
Descending/Sigmoid	9(22.5%)	8(20.0%)	
Rectum	15(37.5%)	14(35.0%)	
Histological type			
tub1/tub2/pap	39(97.5%)	39(97.5%)	p>0.99
muc/por	1(2.5%)	1(2.5%)	
Pathological T category			
t1	6(15.0%)	12(30.0%)	p=0.83
t2	8(20.0%)	5(12.5%)	
t3	19(47.5%)	12(30.0%)	
t4	7(17.5%)	11(27.5%)	
Pathological N category			
n0	32(80.0%)	32(80.0%)	p>0.99
n1	8(20.0%)	8(20.0%)	
Pathological stage			
I	13(32.5%)	14(35.0%)	p>0.99
II	19(47.5%)	18(45.0%)	
III	8(20.0%)	8(20.0%)	

表 7 メトホルミン内服群と非内服群における臨床病理学的因子の比較

3-2-2. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の検討

組織学的な評価は、まず 10 倍の弱拡大で大腸癌の invasive front を同定後に、400 倍の強拡大で無作為に 5 視野選択し、各視野で染色された細胞を浸潤細胞としてカウントした。細胞数はカウントした 5 視野の平均とした (図 10)。

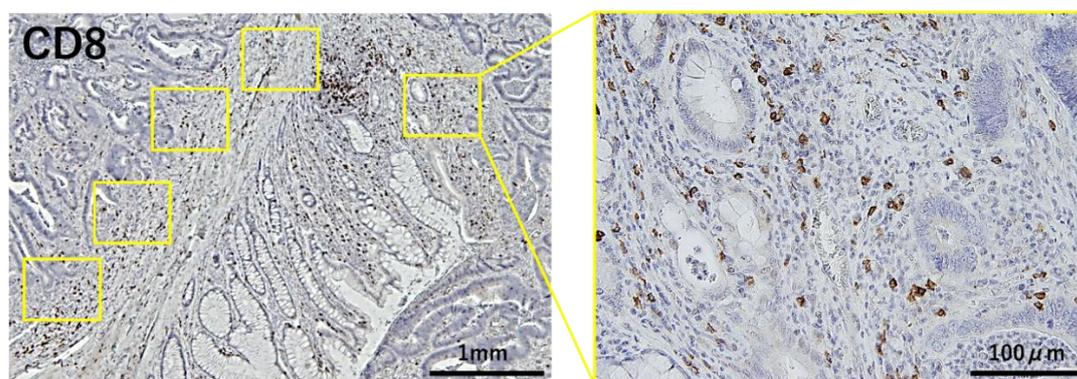


図 10 大腸癌組織に浸潤する免疫細胞の密度の評価方法の代表図

浸潤する T リンパ球の表面抗原を抗 CD3 抗体・抗 CD8 抗体を使用して IHC を行った。CD3 陽性細胞を腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor-infiltrated lymphocyte : TIL) と定義したところ、TIL はメトホルミン内服群で非内服群に比べて有意に増加していた。(中央値(範囲); 147 (78-389) / High Power Field (HPF) vs 121 (30-229) / HPF, $p < 0.05$)。更に、CD8 陽性 T リンパ球もメトホルミン内服群で有意に増加し (100 (57-320) / HPF vs 60 (14-182) / HPF, $p < 0.01$)、CD8 陽性 T リンパ球/TIL 比はメトホルミン内服群で有意に高かった (74% (36%-86%) / HPF vs 50% (33%-86%) / HPF, $p < 0.001$) (図 11 A,B)。

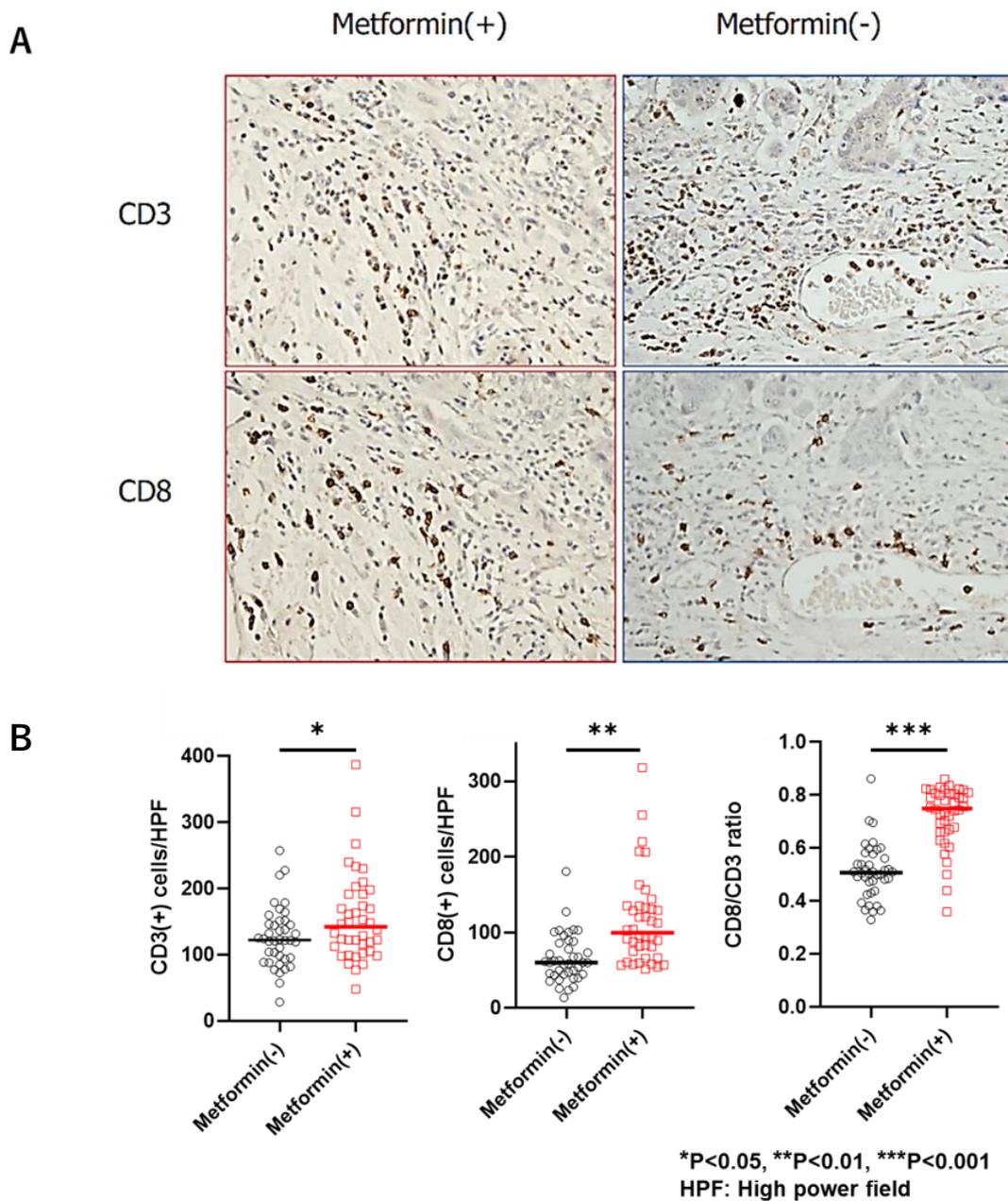


図11 (A) メトホルミン内服群・非内服群の大腸癌組織 IHC における TIL 像の比較 (B) 大腸癌組織における TIL 数、CD8 陽性 T リンパ球数、CD8/CD3 比をメトホルミン内服群 (n=53) と非内服群 (n=214) で定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。

* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001。

3-2-3. 腫瘍関連マクロファージ (TAM) の検討

大腸がん組織での invasive front における CD68 陽性細胞を腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophage : TAM)、CD163 陽性細胞を M2 マクロファージと定義した。TAM は、メトホルミン内服群で浸潤が有意に増加していた (107 (67-161) / HPF vs 82 (56-158) / HPF, $p < 0.01$)。しかし、CD163 陽性マクロファージ (M2 マクロファージ) はメトホルミン内服群で浸潤が減少している傾向があり (56 (27-96) / HPF vs 67 (33-125) / HPF, $p = 0.10$)、M2 マクロファージ/TAM の比率は、メトホルミン内服群で有意に低下していた。(57 % (33 %-79 %) / HPF vs 77 % (58 %-85 %) / HPF, $p < 0.001$) (図 12A,B)。

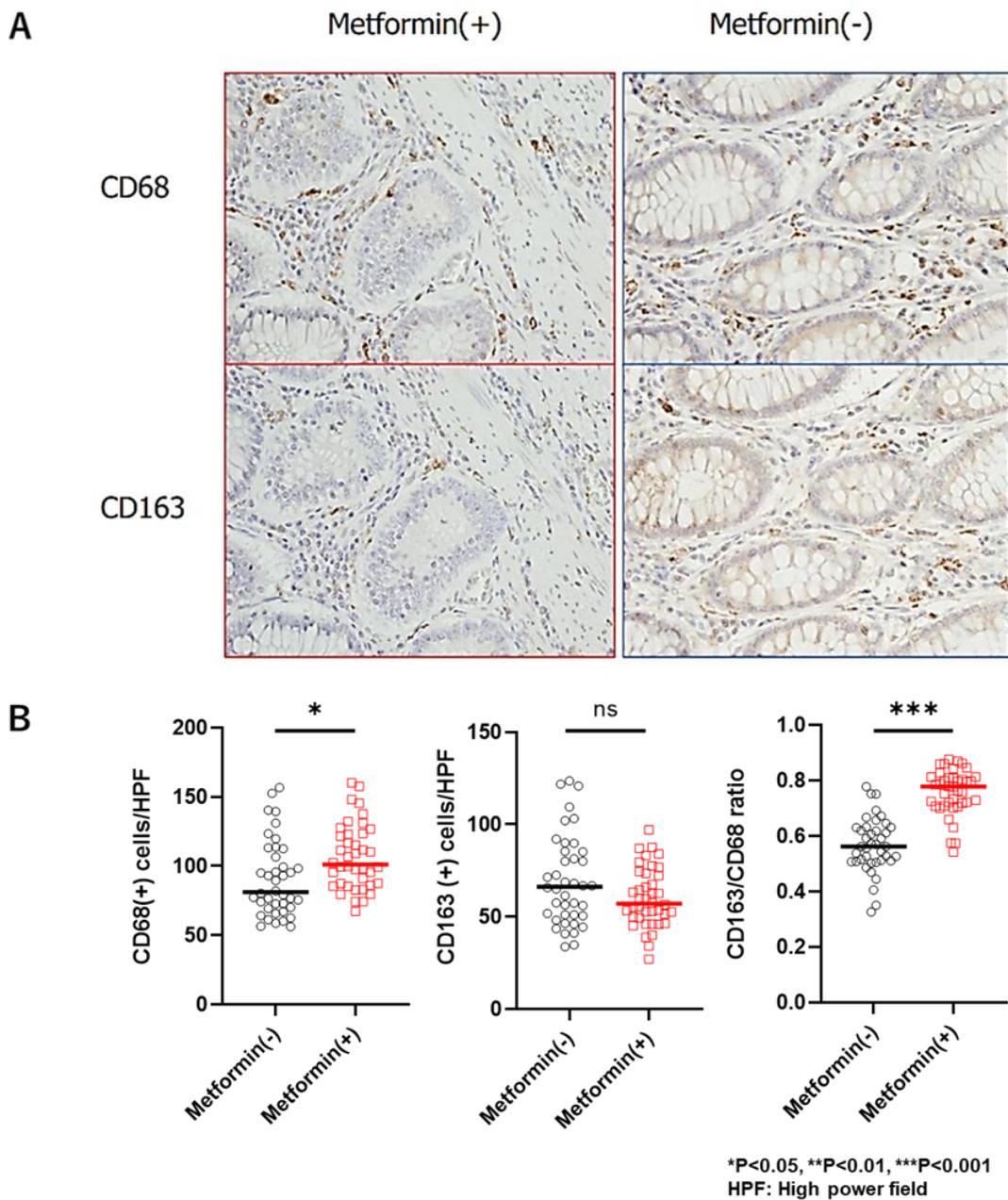


図 12 (A) メトホルミン内服群・非内服群の大腸癌組織 IHC における TAM 像の比較 (B) 大腸癌組織における TAM 数、M2 マクロファージ数、M2 マクロファージ/TAM 比をメトホルミン内服群 (n=53) と非内服群 (n=214) で定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。

* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001。

全 80 例で CD8 陽性 T リンパ球/TIL 比と M2 マクロファージ/TAM 比の間に
明確な逆相関の関係だった ($r = -0.60, p < 0.001$)。更に、メトホルミン内服群と
非内服群で明らかに異なる集団に分かれる結果となった (図 13)。

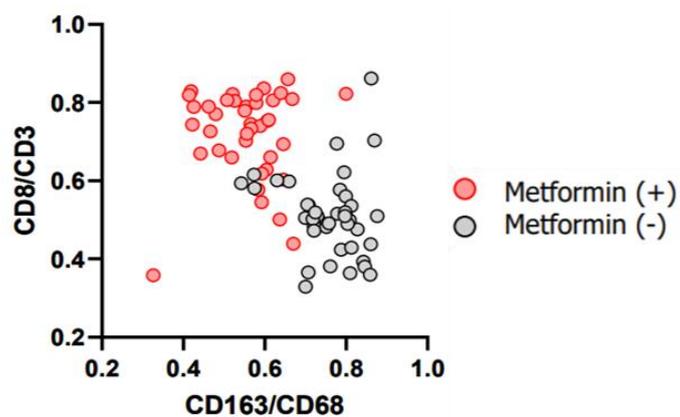


図 13 CD8 陽性 T リンパ球/TIL 比と M2 マクロファージ/TAM 比の相関

3-2-4. Tertiary Lymphoid structure (TLS) の検討

TLS は、腫瘍抗原に対する免疫応答のために腫瘍の間質に発生する異所性リンパ節様構造である。図 14 に示すように、一部の TLS は、CD20 陽性 B リンパ球が T リンパ球に囲まれた胚中心 (Germinal center: GC) として凝集する形態として検出され、がん微小環境における免疫応答と関連する現象と言われている。

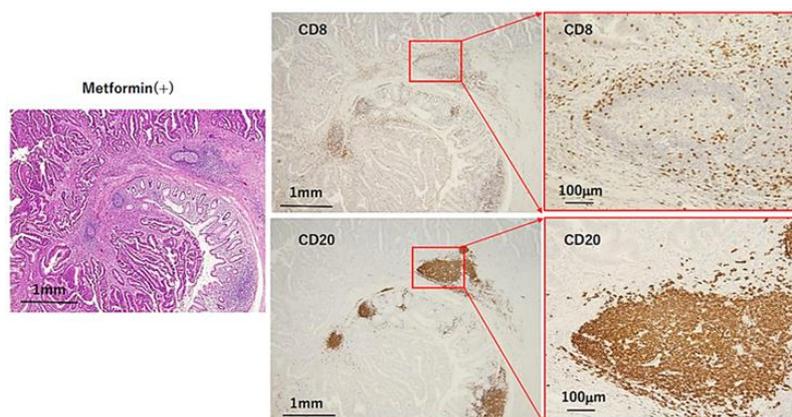


図 14 大腸癌における胚中心を伴う TLS の代表的な顕微鏡写真 (HE および IHC)

そこで、TLS との関連を評価することとした。評価方法は、顕微鏡を用いて 10 倍の弱拡大で大腸癌の invasive front を無作為に 5 視野選択し TLS 数をカウントした合計とした。TLS の総数は、メトホルミン内服群が有意に多く (10 (1-21) vs 5 (0-19) , $p < 0.001$)、GC を形成した TLS 数も同様の傾向を示した (2.5 (0-13) vs 1 (0-12) , $p < 0.05$) (図 15)。

全 80 例において TLS 数は TIL 数 ($r = 0.30, p = 0.0061$) および CD8 陽性 T リンパ球数 ($r = 0.36, p = 0.0011$) と正の相関を認めていた (図 16)。

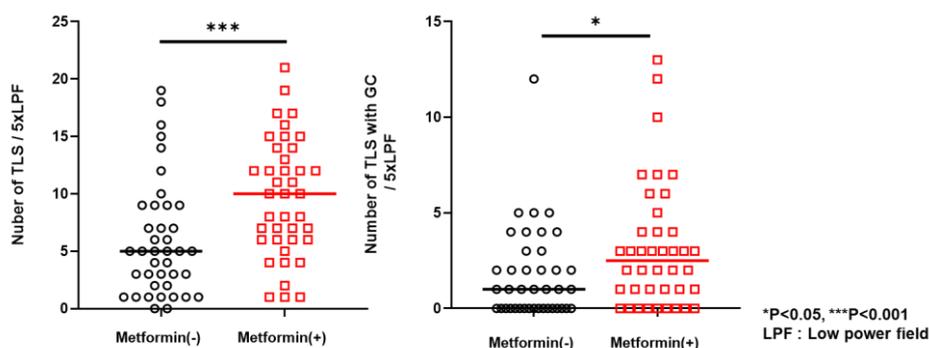


図 15 メトホルミン内服群と非内服群の総 TLS 数と GC を伴う TLS 数の比較

メトホルミン内服群 ($n=53$) と非内服群 ($n=214$) で TLS 数と GC を伴う TLS 数を定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。* : $P<0.05$, *** : $P<0.001$ 。

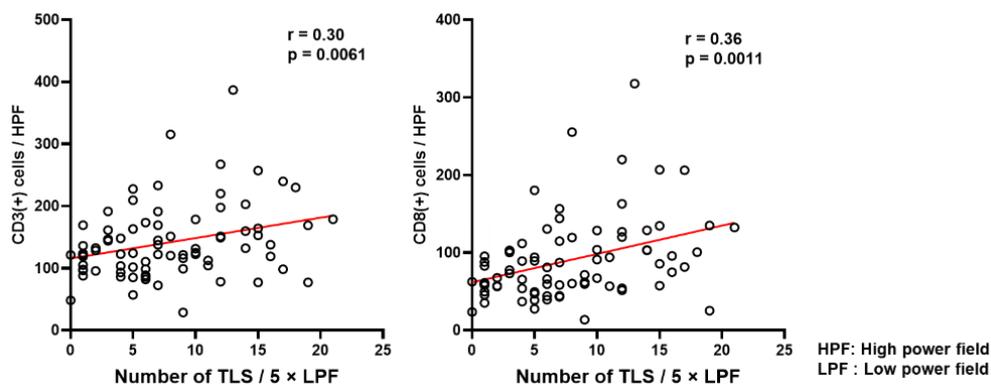


図 16 大腸癌組織における総 TLS 数と TIL 数・CD8 陽性 T リンパ球数の相関

大腸癌症例 ($n=80$) の大腸癌組織における TLS 数と総 TIL 数と CD8 陽性 T リンパ球の相関関係を散布図を用いて評価し、 r 値と p 値はピアソン積率相関係数の検定で解析した。

3-2-5. 腫瘍関連好中球 (TAN) および好中球細胞外トラップ (NETs) の検討

同一細胞での表面抗原を評価するために多重免疫組織染色 (Multiplex IHC) を用いて評価した。Multiplex IHC で使用した組織切片は、表 5 で示した症例のものを使用した。大腸癌組織の invasive front において NETosis のマーカーであるシトルリン化ヒストン H31 (CitH3) を共発現している好中球数を検討した。好中球は CD66 b 抗体を用いて染色し細胞膜を緑色に視覚化した。

CitH3 は核領域で検出され赤色に視覚化し、青色に視覚化したヘマトキシリン陽性ヌクレアーゼと一部共局在していた (図 17)。

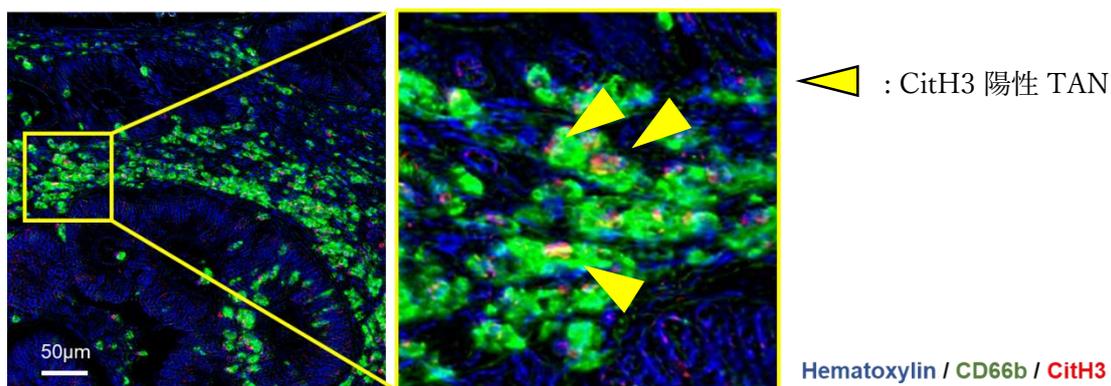


図 17 大腸癌の CitH3 陽性 TAN (NETosis TAN)

メトホルミン内服群では、非内服群よりも TAN 数が有意に減少しており (100.0 (34-322) /0.5×0.5mm² vs 169.0 (36-553) /0.5×0.5mm², p <0.001)、CitH3 陽性 TAN (NETosis TAN) も同様に有意に少なかった (20.0 (0-104))

/0.5×0.5mm² vs 36.0 (8-272) /0.5×0.5mm², p <0.001) (図 18)。

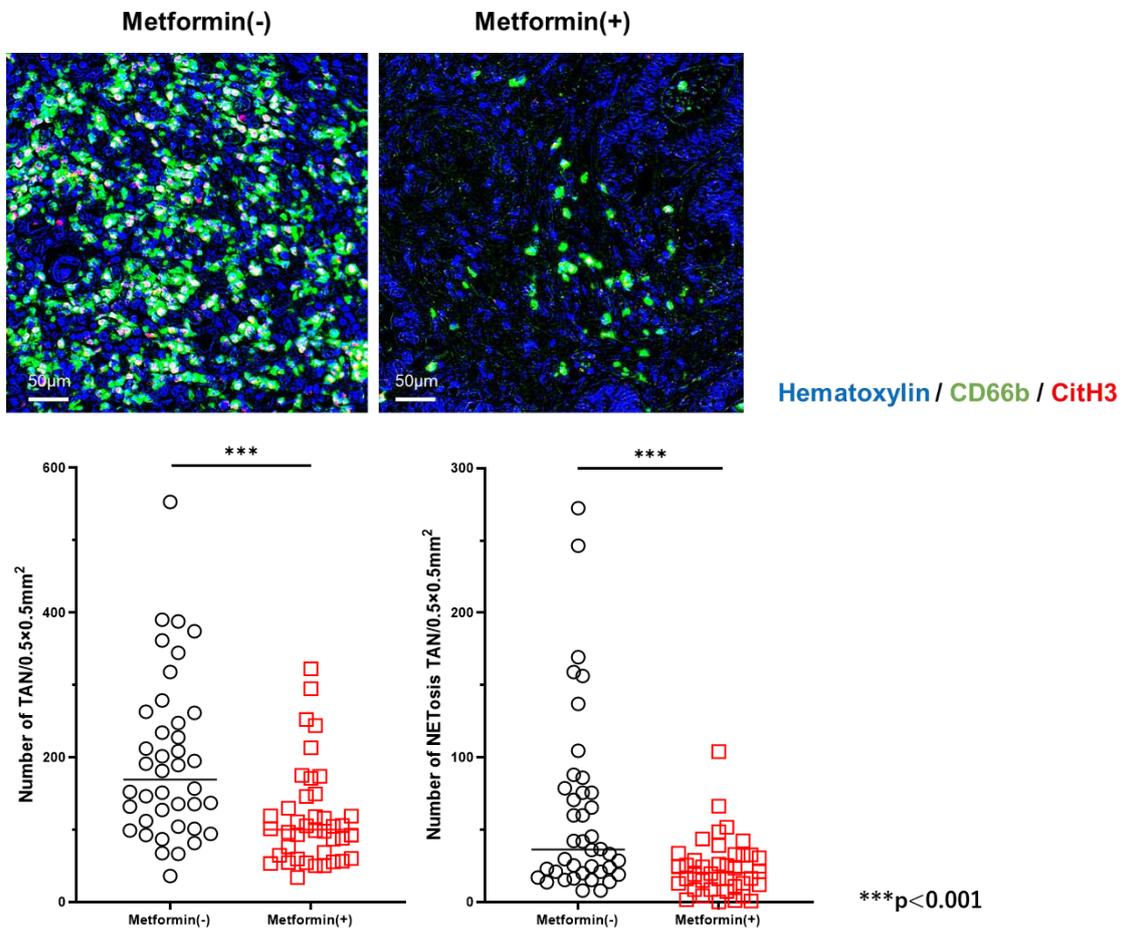


図 18 メトホルミン内服群と非内服群の 2 群間で大腸癌組織における TAN と NETosis TAN を比較。

メトホルミン内服群 (n=53) と非内服群 (n=214) で TAN と NETosis TAN を定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。*** : P<0.001。

3-2-6. 間質の線維化の評価

Masson trichrome 染色法を用いて膠原線維を染色し線維化の評価を行った。

線維化の評価は、invasive front の領域を 40 倍の顕微鏡下で観察し、Masson trichrome 染色法による膠原繊維の Grade 0 から 3 までスコアリングした（図

19) 染色強度で評価した

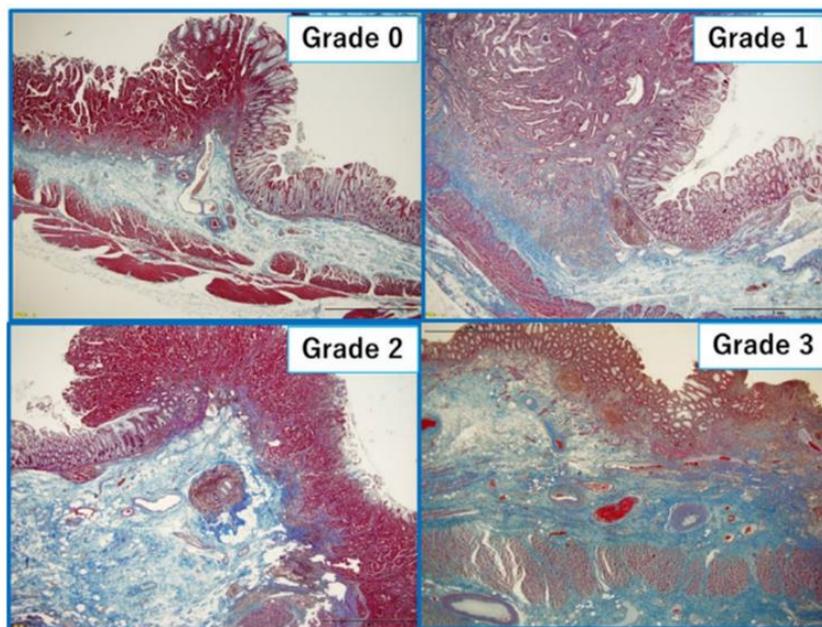


図 19 Masson trichrome 染色法による fibrotic score

図 20 に示すように、メトホルミン内服群の平均線維化スコアは、メトホルミン非内服群の平均線維化スコアよりも低い傾向を認めた ($p = 0.051$)。

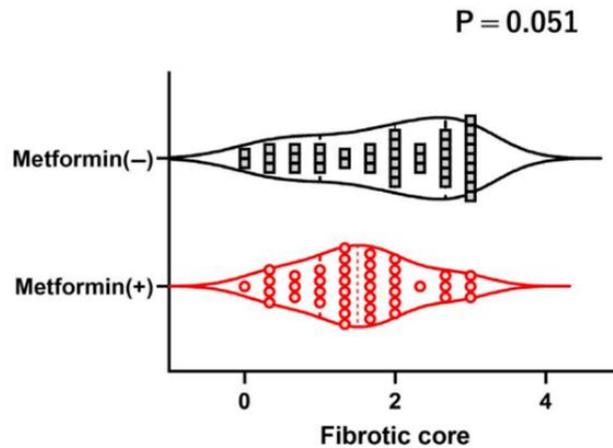


図 20 メトホルミン内服群と非内服群の大腸癌組織における線維化の比較

メトホルミン内服群 (n=40) と非内服群 (n=40) で fibrotic score を比較した。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。

3-3. In vitro におけるミエロイド細胞に対するメトホルミンの作用

3-3-1. 単球からマクロファージの分化に及ぼすメトホルミンの影響

PBMC から精製した PBMo を抗 CD14 抗体、抗 IgG1 抗体を用いて、フローサイトメトリー (FACS Calibur, BD) で測定し、PBMC 中の PBMo と分離した PBMo を比較し positive selection の精製度を検討した。PBMC 中に 21.5 % 存在した PBMo は、分離後に 97.3 % まで精製したことを確認した (図 21)。

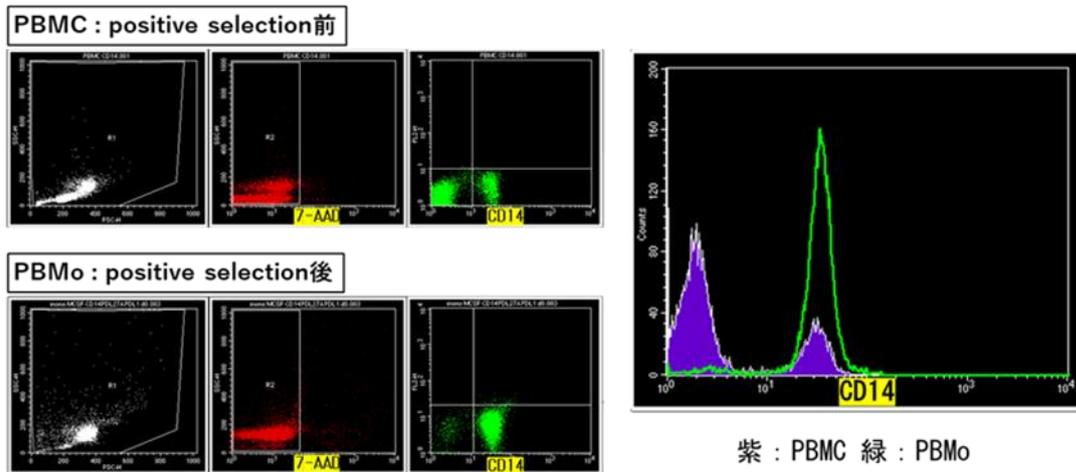


図 21 抗 CD14 抗体による positive selection 前後の PBMo 比率

左上が PBMC、左下が PBMo 中の CD14 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した dot plot を示す。右に dot plot の結果を比較してヒストグラム表示したものを示す。

M-CSF で 5 日間、IL-4 + IL-10 で刺激した PBMo は、分化誘導前の PBMo と比較して細胞が大きくなり、半数以上の形態が紡錘形に変化していた。表面抗原は、M1 マクロファージのマーカである CD86 の発現に変化は認めなかったが、M2 マクロファージのマーカである CD206 と CD163 の発現は増強していた (図 22 A,B)。

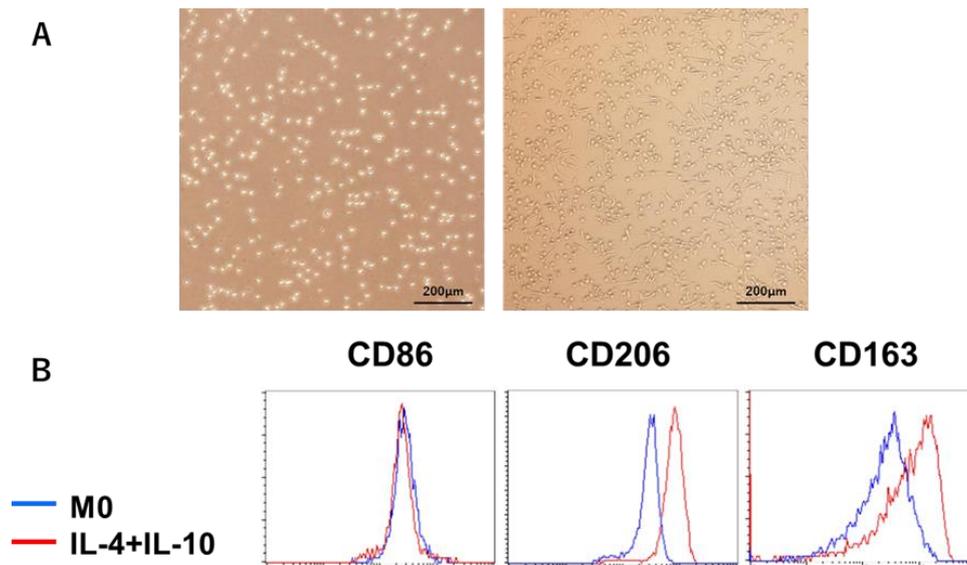


図 22 (A) 左：分化誘導前の PBMO、右：M2 マクロファージの顕微鏡像

(B) IL-4 および IL-10 による M2 マクロファージの分化誘導の代表図

M-CSF で 5 日間、IL-4 + IL-10 で刺激して得られた M2 マクロファージは約半数以上が細長く紡錘形に変化しているのに対して、メトホルミン処理を行ったマクロファージは用量依存性に形態変化を起こした細胞は減少し、500 μM 以上の濃度では大部分のマクロファージで紡錘形への変化が見られなかった (図 23)。

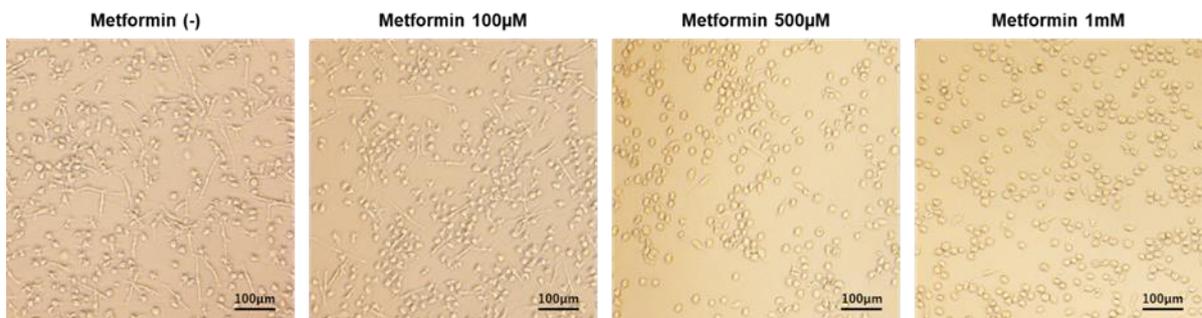


図 23 メトホルミン処理した M2 マクロファージの顕微鏡像

また、フローサイトメトリーでは、メトホルミン処理によって、M1 マクロファージのマーカである CD86 の発現に変化は認めなかったが、M2 マクロファージのマーカである CD206 と CD163 の発現は 500 μ M 以上のメトホルミン濃度で有意に低下する傾向が認められた。また、同濃度で PD-L1 と PD-L2 の発現は約半分程度まで低下した (図 24)。

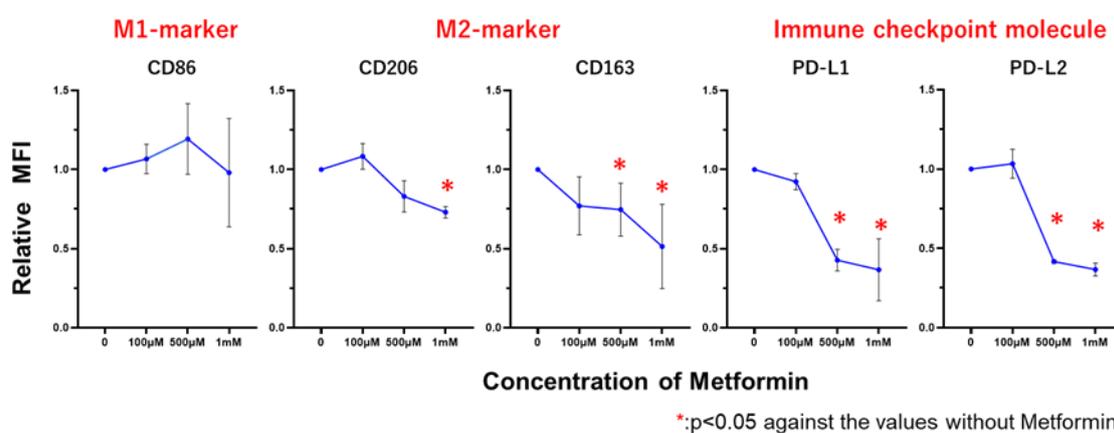


図 24 メトホルミン処理による M2 マクロファージの表面抗原の変化

24 well plate に PBMo (5×10^5 cells/well) を M-CSF(100 ng/ml)で培養後に IL-4 (20 ng/ml)・IL-10 (20 ng/ml) と、記載のメトホルミン濃度でさらに 2 日間培養後にフローサイトメトリーで解析した。Y 軸は、メトホルミンなしで培養されたマクロファージに対する相対平均 MFI の比率とした。データは、3 つの異なる実験の平均 \pm SD を示した。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。* : p<0.05

3-3-2. メトホルミンの T リンパ球増殖に対する影響

(i) T リンパ球への直接的な作用

OKT-3 で T リンパ球を刺激すると、刺激なしの T リンパ球に対して刺激ありの T リンパ球は増殖し複数のクラスターを形成した。フローサイトメトリーにおいても、OKT 刺激により CD4 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球共に非刺激時に比べて盛んに分裂し増殖していることが示された (図 25 A,B)。

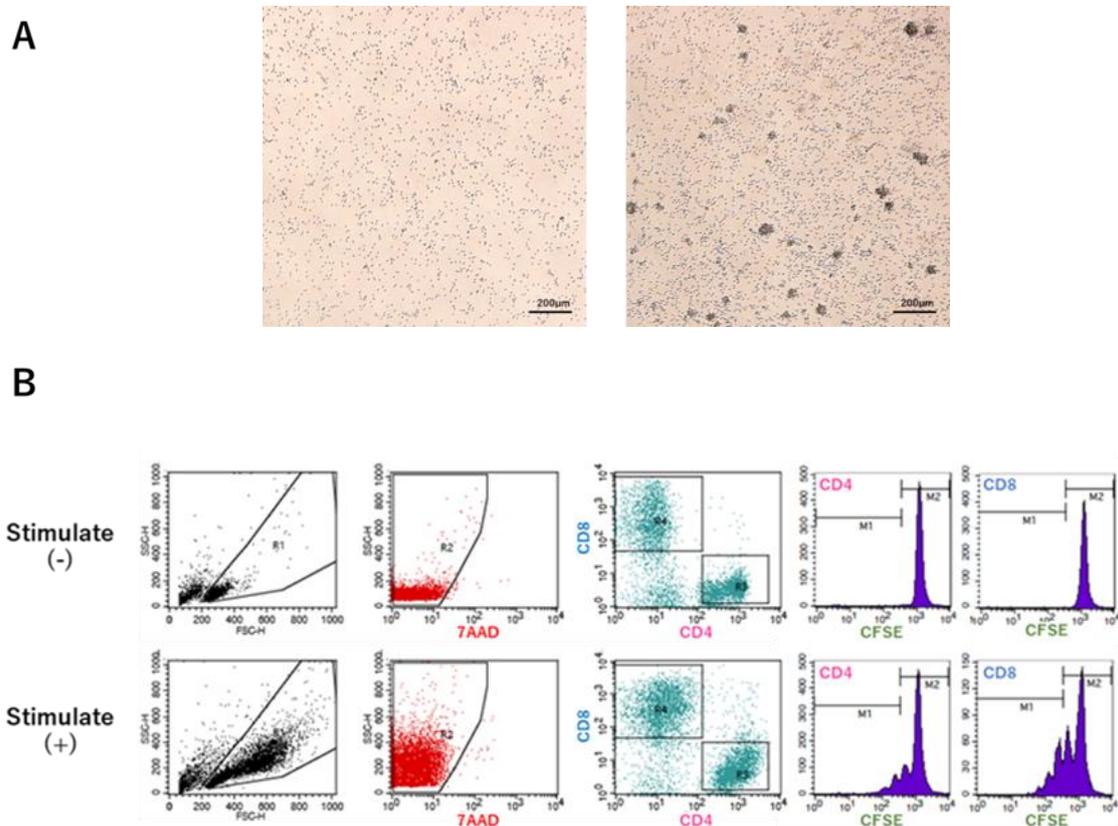


図 25 (A) OKT-3 刺激 (右) と非刺激 (左) T リンパ球の顕微鏡像

(B) 細胞増殖アッセイのフローサイトメトリー

24well plate に 1.0×10^6 cells/well を播種し、OKT3 (5 $\mu\text{g/ml}$) でコーティングした

well とコーティングしていない well で T リンパ球を 3 日間培養しフローサイトメトリーで分裂・増殖を測定した。(A) 左側に非刺激 T リンパ球、右側に刺激した T リンパ球の 3 日後の代表顕微鏡像を示す。(B) 上に非刺激 T リンパ球を、下に刺激した T リンパ球を、培養 3 日後に CD4 陽性 T リンパ球と CD8 陽性 T リンパ球の分裂・増殖をフローサイトメトリーで測定した結果を示す。

しかし、メトホルミンを添加すると、T リンパ球は分裂・増殖を抑制する傾向を示し、CD8 陽性 T リンパ球は 1mM のメトホルミンで有意に抑制された (図 26 A,B)。

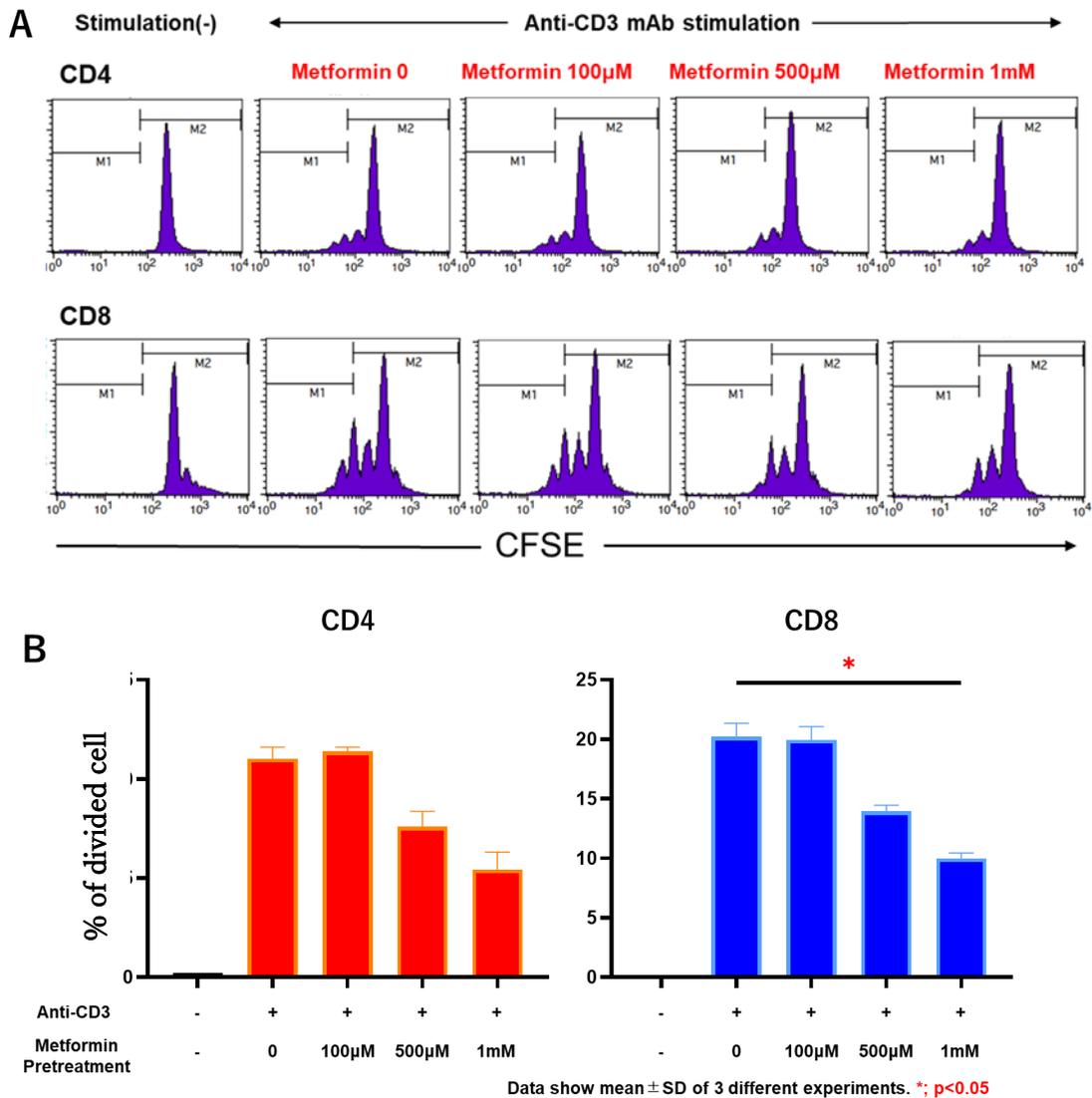


図 26 (A) メトホルミン処理した T リンパ球の細胞増殖アッセイ

(B) CD4 陽性 T リンパ球と CD8 陽性 T リンパ球の分裂増殖率

24well plate に 1.0×10^6 cells/well を播種し、OKT3 の刺激なし、刺激ありの T リンパ球の分裂・増殖に対して刺激した T リンパ球に記載量のメトホルミンを添加することによる影響を検討。データは、3つの異なる実験の平均 \pm SD を示した。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。* : $p < 0.05$

(ii) メトホルミン処理した M2 マクロファージを介した間接的作用

M2 マクロファージと T リンパ球を共培養すると、非共培養下のリンパ球と比較しクラスターがほとんど消失したが、メトホルミン処理した M2 マクロファージとの共培養では用量依存的に増加していた (図 27)。

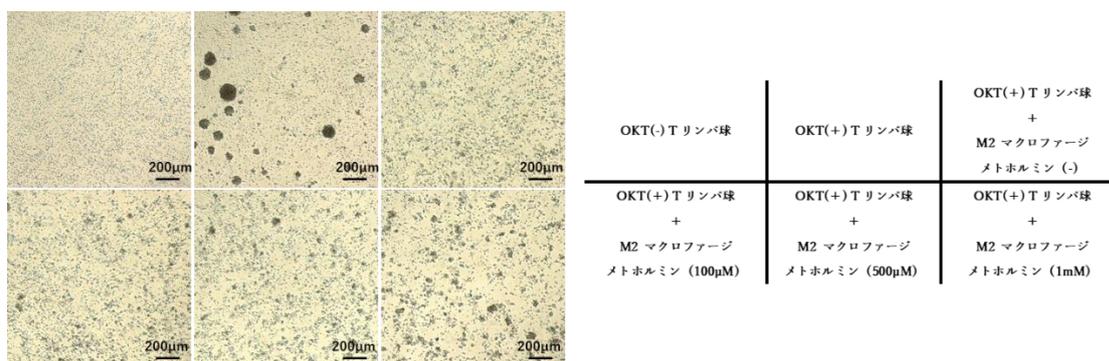


図 27 メトホルミン処理したマクロファージと T リンパ球との共培養後のクラスター形成像

T リンパ球を 24well plate に 4.0×10^5 cells/well を播種し、M2 マクロファージを 2.0×10^5 cells/well を追加播種させ、3 日間共培養させた。M2 マクロファージは記載のメトホルミン濃度で処理したものを使用した。培養 3 日後の代表顕微鏡像を示す。

非共培養下の T リンパ球と比較して M2 マクロファージと共培養すると CD4、CD8 陽性 T リンパ球の分裂・増殖は有意に抑制された。しかし、100 μ M で処理した M2 マクロファージと共培養すると、その抑制はやや解除され、500 μ M 以上のメトホルミン処理した M2 マクロファージでは T リンパ球の分裂・増殖はむしろ増加する傾向が認められた (図 28,29)。

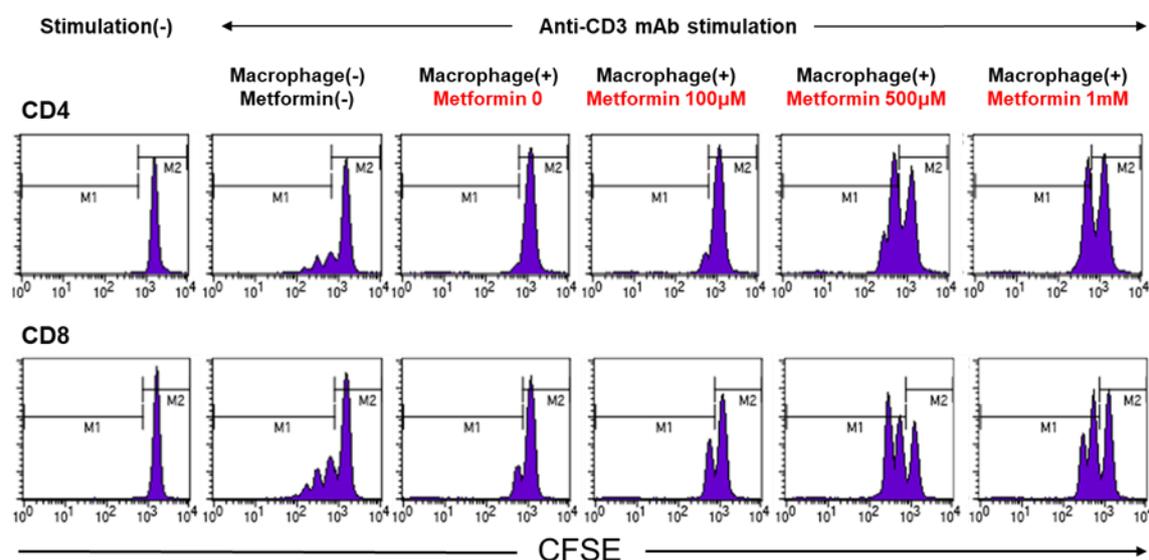


図 28 メトホルミン処理したマクロファージと共培養した T リンパ球の細胞増殖

アッセイ

T リンパ球と M2 マクロファージを 3 日間共培養し T リンパ球の分裂・増殖をフローサイトメトリーで測定結果をヒストグラム表示したものの代表結果を示す。M2 マクロファージは記載のメトホルミン濃度で処理したものを使用した。

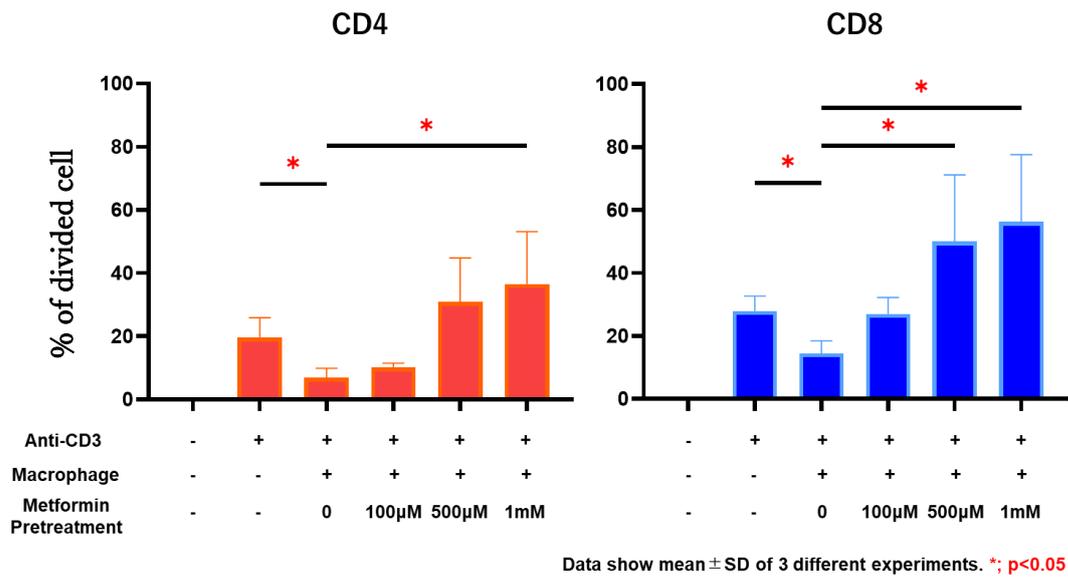


図 29 マクロファージとの共培養下における CD4 陽性 T リンパ球と CD8 陽性 T リンパ球の分裂増殖率

図 28 の実験結果を定量しグラフ表示した。データは、3 つの異なる実験の平均 \pm SD を示した。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。* : $p < 0.05$

3-3-3. メトホルミンの NETs 形成能に及ぼす影響

LPS 刺激好中球は非刺激好中球に比べて、NETs 放出を促進した (図 30)。

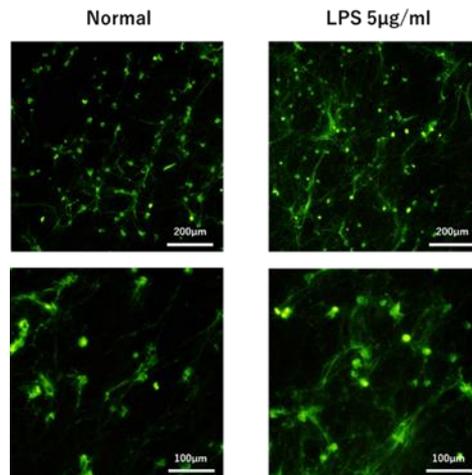


図 30 LPS 刺激による NETs の放出の亢進

6 well plate に好中球を 1×10^6 cell/well に調整した RPMI1640 培地 (FBS(-)) で懸濁し播種した。LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) あり、なしで分類し 3 時間培養した。3 時間培養後に SYTOX Green 添加後の代表的な蛍光顕微鏡像を示す

しかし、メトホルミンを添加すると、LPS 刺激好中球と比較して NETs の放出は用量依存性に抑制されることが観察された (図 31)。

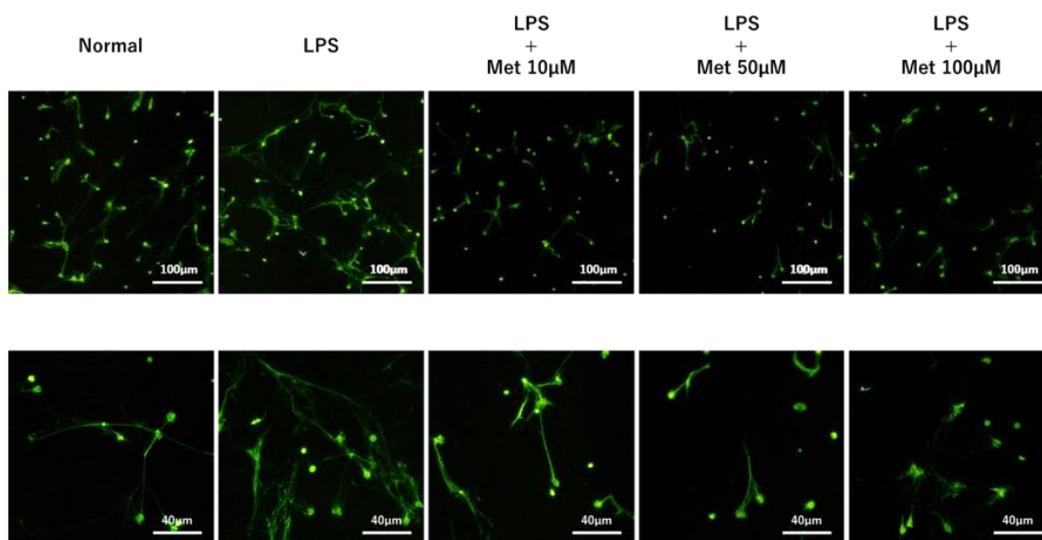


図 31 LPS 刺激末梢血好中球に対してメトホルミンによる NETs 放出の抑制

6 well plate に好中球を 1×10^6 cell/well に調整した RPMI1640 培地 (FBS(-)) で懸濁し播種した。LPS (5 μ g/ml) で刺激したものに記載のメトホルミン濃度で 3 時間培養した。3 時間培養後、SYTOX Green 添加後の代表的な蛍光顕微鏡像を示す。上段が 40 倍、下段が 200 倍で観察したものとする。

3-4. 糖尿病合併大腸癌患者の予後に及ぼす DPP-4 阻害薬の影響

2010 年 4 月から 2020 年 3 月に自治医科大学附属病院 消化器一般移植外科で施行された糖尿病を有する大腸癌の治癒切除症例を対象として予後を検討した。調査項目は DPP-4 阻害薬の服薬状況、臨床病理学的因子、DFS、OS とした。治癒切除症例は 1696 例のうち、糖尿病を合併した症例は 258 例で全体の 15.2% であり、DPP-4 阻害薬内服症例は 132 例で糖尿病合併症例中 51.2 %であった。

臨床病理学的因子は DPP-4 阻害薬内服群が有意に高齢 ($p<0.05$) だったが、その他の因子は 2 群間で有意差を認めなかった (表 8)。

Clinical and pathological factors	DPP-4 inhibitor		P value
	taken (n=132)	not-taken (n=126)	
Age	71 (44-91)	69 (42-88)	P<0.05
Gender (Male/Female)	85/47	89/37	P=0.29
Tumor site (Right/Left)	47/85	41/85	P=0.64
Histological type (tub,pap/por,muc)	119/6	127/6	P=0.91
pT category (t1/t2/t3/t4)	30/23/50/29	34/17/42/33	P=0.93
pN category (n0,n1,n2,n3)	87/34/10/1	87/30/8/1	P=0.58
pStage (I/II/III)	46/41/45	48/39/39	P=0.54
p-lymphatic invasion (Y/N/unknown)	74/50/1	65/67/1	P=0.28
p-vascular invasion (Y/N/unknown)	36/88/1	42/90/1	P=0.44
Serum HbA1c level	6.9 (5.4-11.3)	6.8 (5.3-9.9)	P=0.83
Adjuvant (Y/N)	26/106	22/104	P=0.65

表 8 大腸癌症例におけるメトホルミン内服別臨床病理学的因子の比較

DFS と OS を DPP-4 阻害薬内服群と非内服群の予後を比較検討した (図 32)。OS に差は認めなかった (HR=1.47, 95%CI : 0.68 - 3.19, $p=0.31$) が、DFS は DPP-4 阻害薬内服群で有意に劣った (HR=2.23, 95%CI : 1.18 - 4.21, $p<0.05$)。

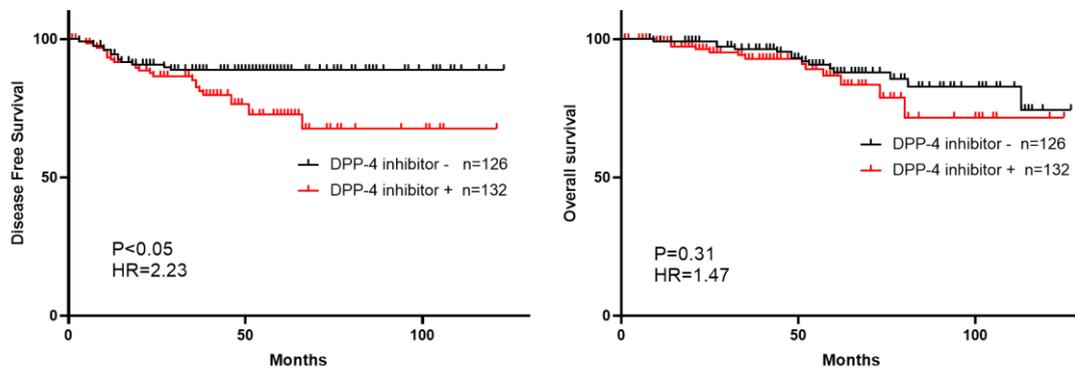


図 32 DPP-4 阻害薬内服群・非内服群間の予後比較

DPP-4 阻害薬内服群 ($n = 132$) と非内服群 ($n = 126$) の術後無病生存率 (DFS) と術後全生存率 (OS) を比較した。Kaplan-Meier 曲線を使用して評価し、 P 値は logrank 検定で解析した。

DPP-4 阻害薬の内訳は Sitagliptin : 67 例、Vildagliptin : 20 例、Saxagliptin : 1 例、Alogliptin : 12 例、Linagliptin : 27 例、Teneligliptin : 2 例、Anagliptin : 2 例、Omarigliptin : 1 例であり、Alogliptin、Teneligliptin、Omarigliptin 服用患者では再発は認めなかった。患者数の多かった Sitagliptin と Vildagliptin に関して、各々使用量と予後との関連性を検討したが、DFS と OS の間に明らかな相関は認めなかった。

また、多変量解析において DPP-4 阻害薬は DFS の独立したリスク因子であることが示された (表 9)。

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	P-value	HR (95% CI)	P-value
Age	1.332 (0.704-2.522)	0.378		
Gender (Male/Female)	0.905 (0.455-1.799)	0.787		
Pathological T-stage	8.639 (4.541-16.43)	<0.001	2.201 (1.394-3.476)	0.001
Pathological N-stage	4.722 (2.300-9.693)	<0.001	2.179 (1.481-3.207)	<0.001
Adjuvant therapy	1.677 (0.721-3.898)	0.185		
DPP-4 inhibitor intake	2.229 (1.173-4.217)	0.016	1.962 (1.001-3.846)	0.050

表9 DFSと関連する因子における単変量および多変量解析

さらに、術後の投薬状況を可能な限り調査した結果、DPP-4阻害薬は132例中107例が追跡可能であり、継続内服している症例は92例であった。術後メトホルミンを継続内服している患者と非内服患者でDFSを比較すると、継続内服することによりDFSの差がより顕著になった(図33)。したがって、DPP-4阻害薬を継続的に内服することによって、予後に与える影響が強くなると考えられる。

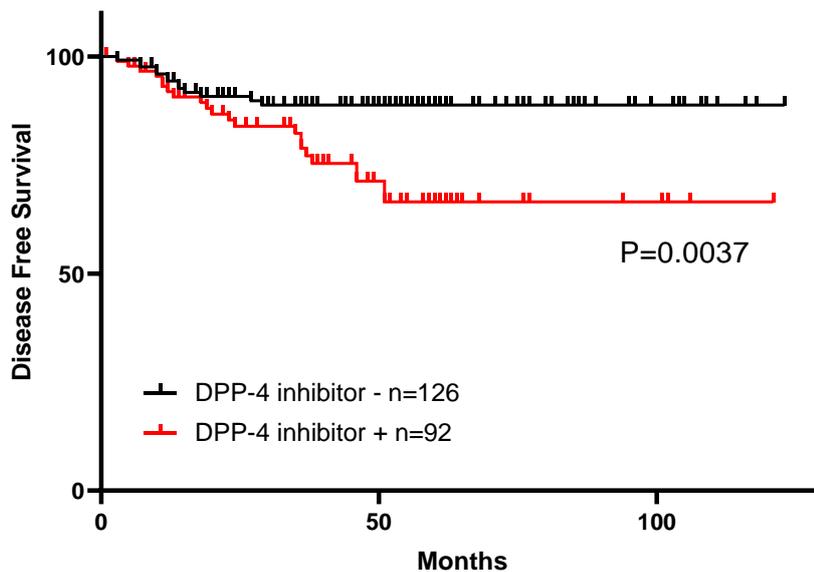


図 33 DPP-4 阻害薬継続内服群・非内服群間での予後比較

DPP-4 阻害薬を術後に継続内服していたことを確認できた群 ($n = 92$) と非内服群 ($n = 126$) の術後無病生存率 (DFS) を比較した。Kaplan-Meier 曲線を使用して評価し、 P 値は logrank 検定で解析した。

3-5. DPP-4 阻害薬内服患者の大腸癌組織におけるがん微小環境の変化

3-5-1. 対象

DPP-4 阻害薬内服群 40 例に対して傾向スコアマッチング法により一致させた DPP-4 阻害薬非内服群 40 例を選択し、免疫組織学的に検討した (表 10)。

	DPP-4阻害薬(+) (n=40)	DPP-4阻害薬(-) (n=40)	p-value
Tumor site			
Cecum/Ascending/Transverse	16	19	p>0.53
Descending/Sigmoid	12	11	
Rectum	12	10	
Histological type			
tub1/tub2/pap	39	39	p>0.99
muc/por	1	1	
Pathological T category			
t1	6	5	p=0.64
t2	7	7	
t3	22	21	
t4	5	7	
Pathological N category			
n0	25	24	p>0.99
n1	15	16	
Pathological stage			
I	12	11	p=0.83
II	13	13	
III	15	16	
Adjuvant			
Yes	6	6	p>0.99
No	34	34	
Metformin intake			
Yes	9	11	p=0.80
No	31	29	

表 10 Multiplex IHC で用いた DPP-4 阻害薬内服別臨床病理学的因子の比較

3-5-2. 癌細胞の上皮間葉転換の検討

大腸癌組織の invasive front において上皮間葉転換 (EMT) のマーカーである Zeb1 を共発現している腫瘍細胞の数を検討した。腫瘍細胞は pan-Cytokeratin 抗体を用いて染色し細胞膜を緑色に視覚化した。Zeb1 は核領域で検出され赤色に視覚化し、緑色に視覚化したヘマトキシリンで染色された核領域と共局在していた (図 34)。

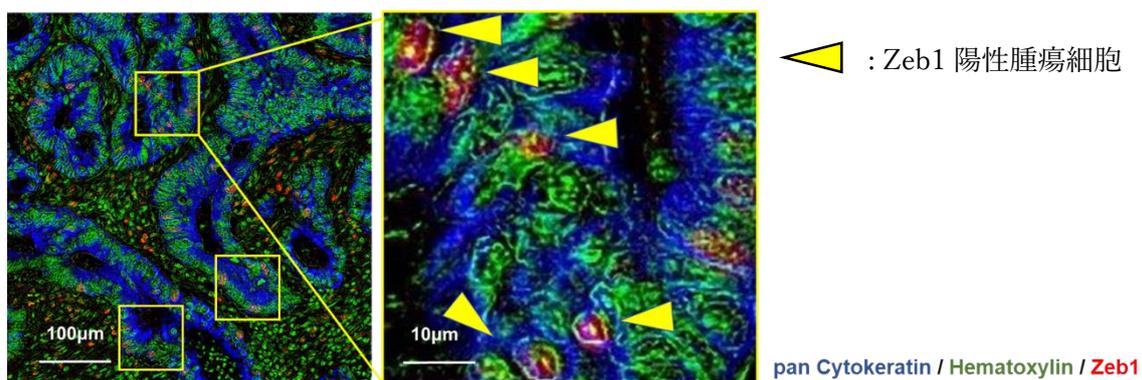


図 34 大腸癌の Zeb1 陽性腫瘍細胞の代表的な顕微鏡写真

DPP-4 阻害薬内服群では、非内服群よりも Zeb1 陽性腫瘍細胞が有意に多かった(29.0 (0-189) / 0.5×0.5 mm² vs 9.0 (0-71) /0.5×0.5 mm², p <0.01) (図 35)。

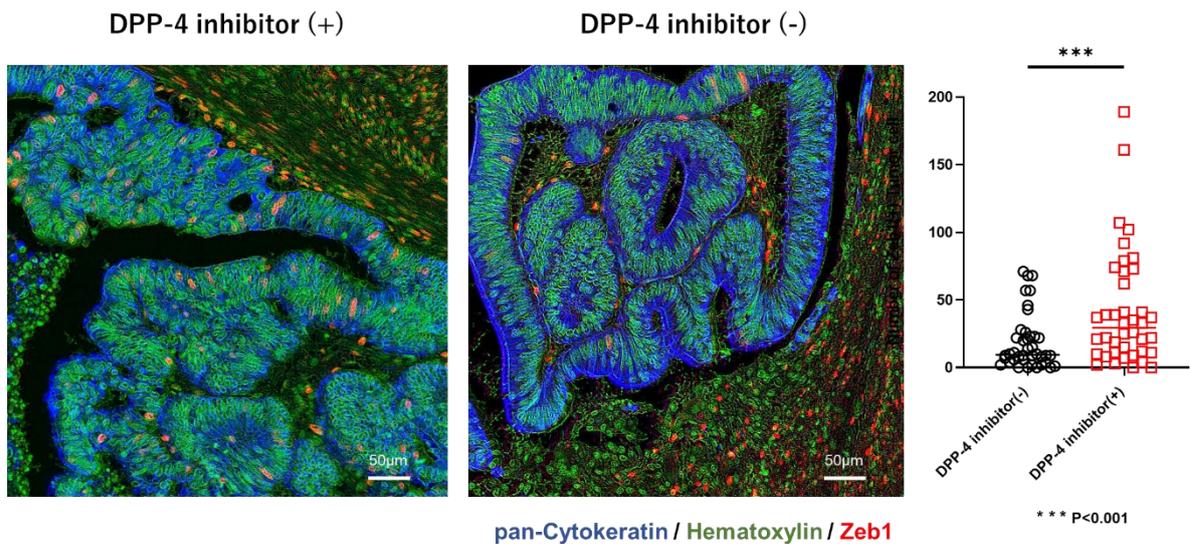


図 35 DPP-4 阻害薬内服群と非内服群の 2 群間で大腸癌組織における Zeb1

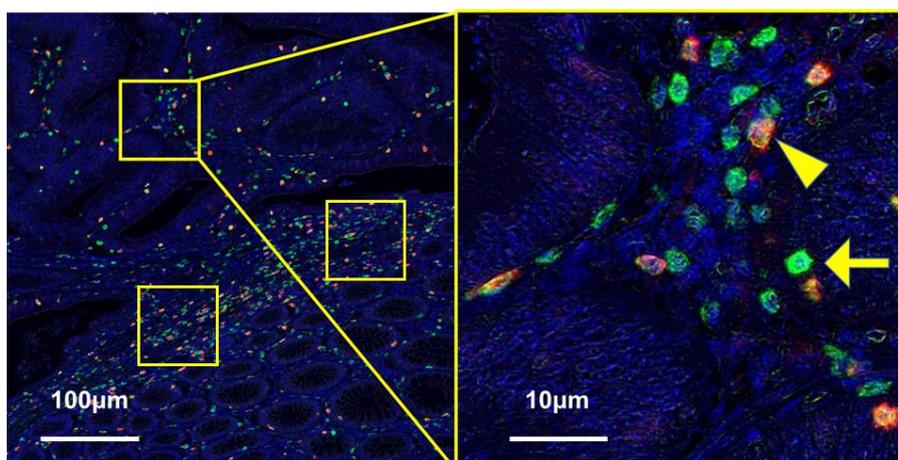
陽性腫瘍細胞数の比較

DPP-4 阻害薬内服群 (n=40) と非内服群 (n=40) で大腸癌辺縁に存在する Zeb1 陽性腫瘍細胞数を定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。*** : P<0.001。

3-5-3. 腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の検討

次に、Invasive front における腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) と腫瘍関連マクロファージ (TAM) について調査した。

TIL は、CD3 および CD8 に対する抗体を使用して染色し CD3 陽性 T 細胞 (TIL) はで緑色に視覚化し、CD8 陽性 T リンパ球は CD3 陽性 T リンパ球と共局在し、2 重染色で黄色として検出された (図 36)。



Hematoxylin / CD3 / CD8

◀ : CD3 陽性 CD8 陽性 T リンパ球

← : CD3 陽性 CD8 陰性 T リンパ球

図 36 大腸癌の CD3 陽性 CD8 陰性 T リンパ球 (緑) と CD3 陽性 CD8 陽性 T リンパ球 (黄) の代表的な顕微鏡写真

全 TIL 数は非内服群と比較し DPP-4 阻害薬内服群で有意に少なかった(388 (169-834) / mm² vs 550 (278-1003) / mm², p < 0.01)。加えて、CD8 陽性 T リンパ球は、DPP-4 阻害薬内服群において更に減少し(33.0 (88-535) / mm² vs 400 (232-699) / mm², p < 0.01)、CD8 陽性 T リンパ球/ 全 TIL 比は、DPP-4 阻害薬内服群で有意に低かった(60.1 % (46.8 %-80.4 %) vs 73.7 % (57.9 %-83.4 %), p < 0.001) (図 37 A,B)。

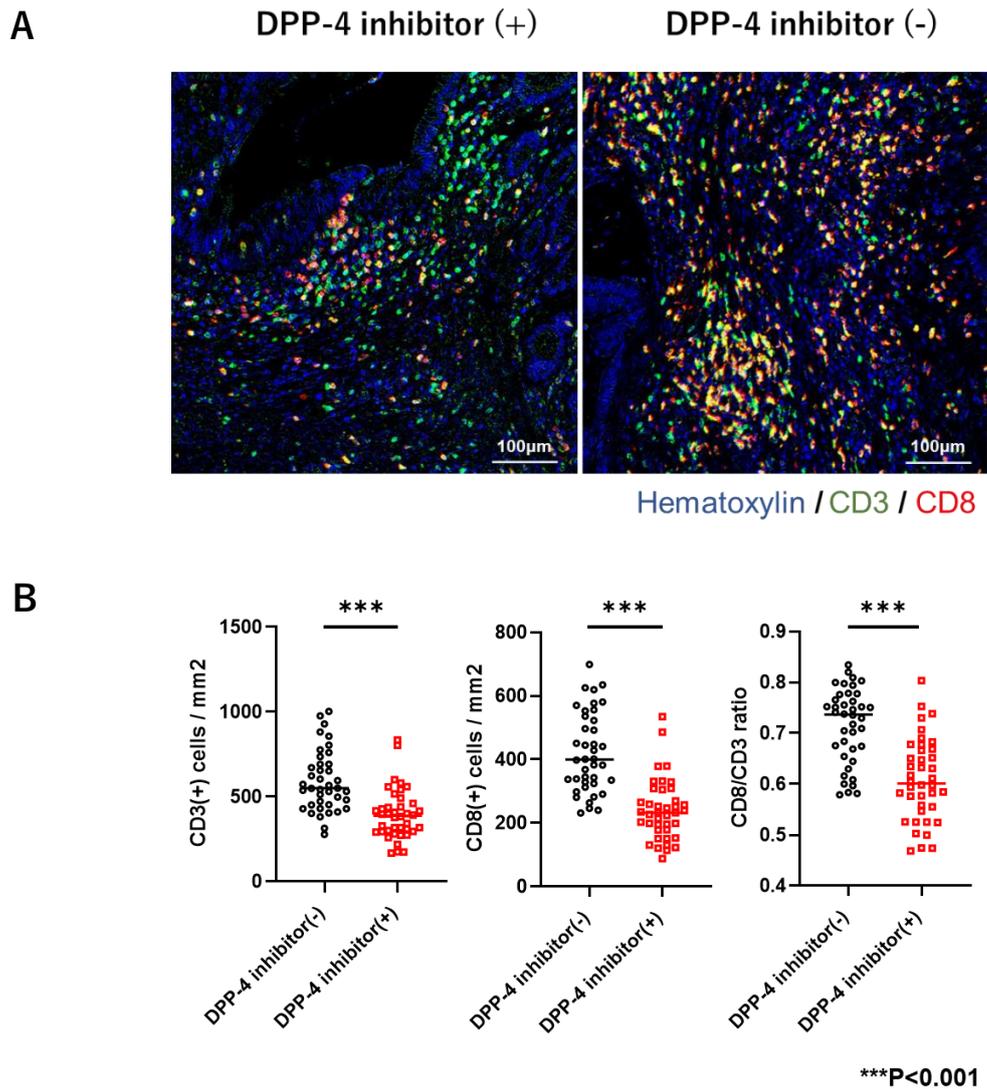
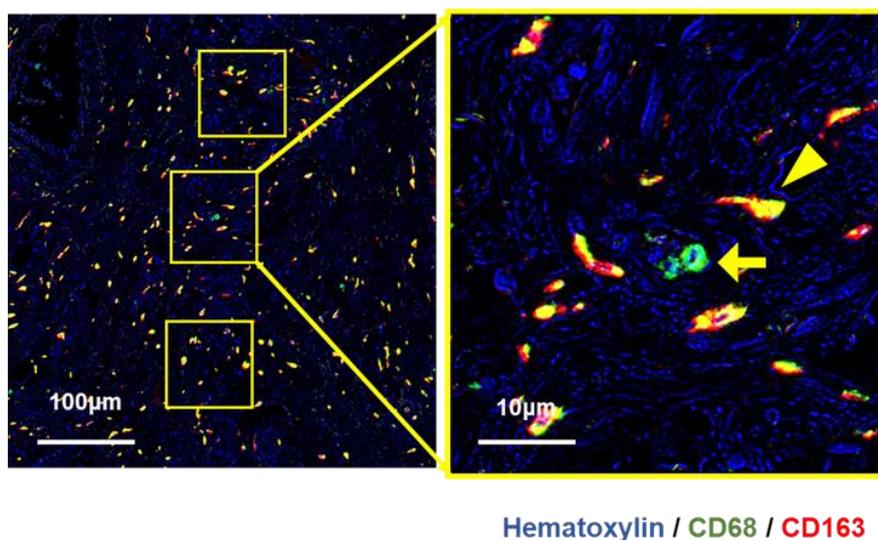


図 37 DPP-4 阻害薬内服群と非内服群の 2 群間で大腸癌組織における TIL 数 CD8 陽性 T リンパ球数、CD8/TIL 比の比較 (A) 画像と (B) グラフ

DPP-4 阻害薬内服群 (n=40) と非内服群 (n=40) で大腸癌の浸潤した TIL、CD8 陽性 T リンパ球、CD8 陽性 T リンパ球/TIL を定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。*** : P<0.001。

3-5-4. 腫瘍関連マクロファージ (TAM) の検討

CD68 および CD163 に対する抗体を使用して CD68 陽性マクロファージ (TAM) を緑色、CD163 陽性マクロファージ (M2 マクロファージ) を赤色に視覚化したところ、M2 マクロファージは CD68 陽性マクロファージと共局在し、2重染色で黄色として検出された (図 38)。



- ▲ : CD68 陽性 CD163 陽性マクロファージ
- : CD68 陽性 CD163 陽性マクロファージ

図 38 大腸癌の CD68 陽性マクロファージ (緑) と CD163 陽性マクロファージ (黄) の代表的な顕微鏡写真

全 TAM 数は 2 群間で差を認めなかった(288 (150-579) / mm² vs 285.8 (156-519) / mm², p=0.76)。しかし、CD163 陽性マクロファージ (M2 マクロファージ)

ジ) は、DPP-4 阻害薬内服群が非内服群と比較し有意に増加しており (217.7 (96.7-408) / mm² vs 178.5 (93.0-323) / mm², p < 0.001)、M2 マクロファージ / 全 TAM 比は、DPP-4 阻害薬内服群で有意に高かった (76.7 % (54.2 %-85.9 % vs 62.5 % (30.0 %-76.9 %), p < 0.001) (図 39 A, B)。

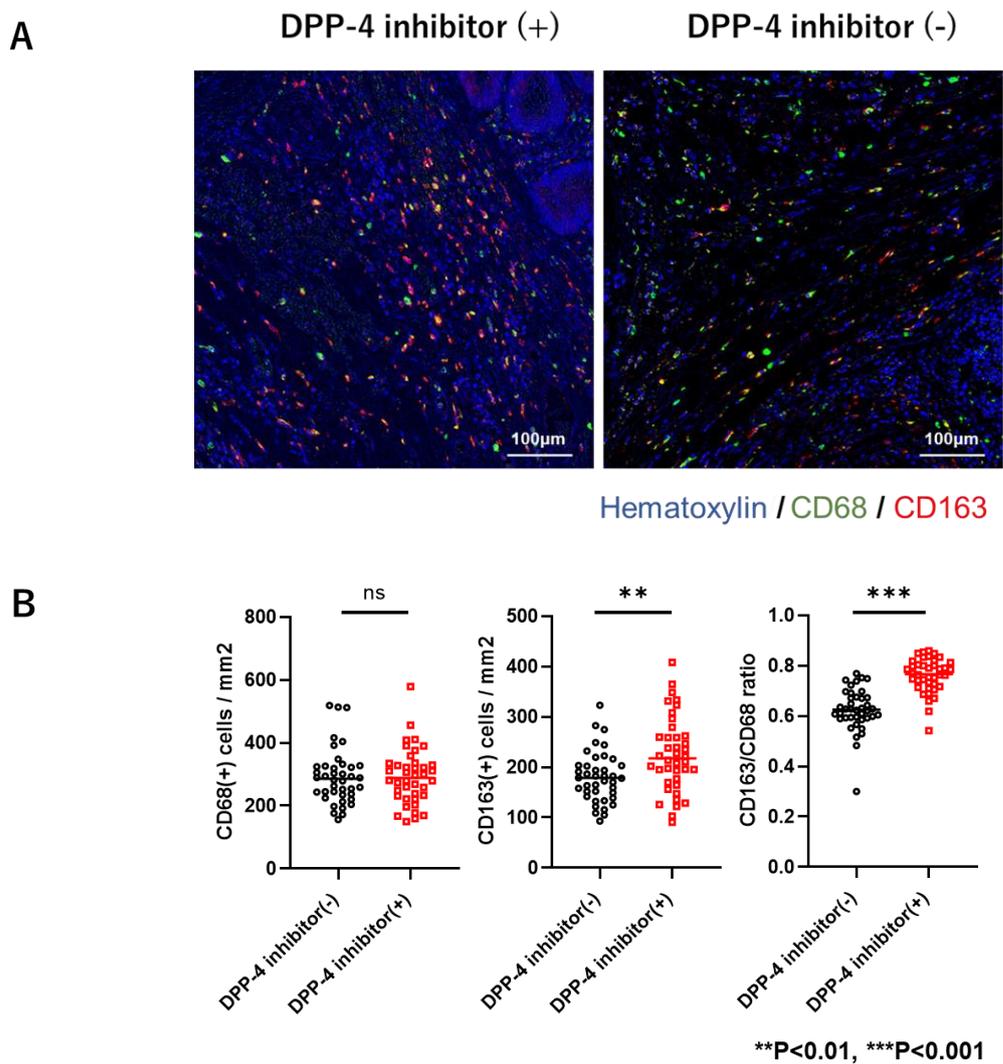


図 39 DPP-4 阻害薬内服群と非内服群の 2 群間で大腸癌組織における TAM 数、M2 マクロファージ数、M2 マクロファージ / TAM 比の比較 (A) 画像と (B) グラフ

DPP-4 阻害薬内服群 (n=40) と非内服群 (n=40) で大腸癌の浸潤した TAM、M2 マクロファージ、M2 マクロファージ/TAM 比を定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。** : P<0.01, *** : P<0.001。

3-5-5. Tertiary Lymphoid structure (TLS) の検討

図 40 に Multiplex IHC による TLS の代表画像を示す。胚中心 (Germinal center : GC) を形成した TLS における GC の B リンパ球は Ki-67 が高度に染色された。

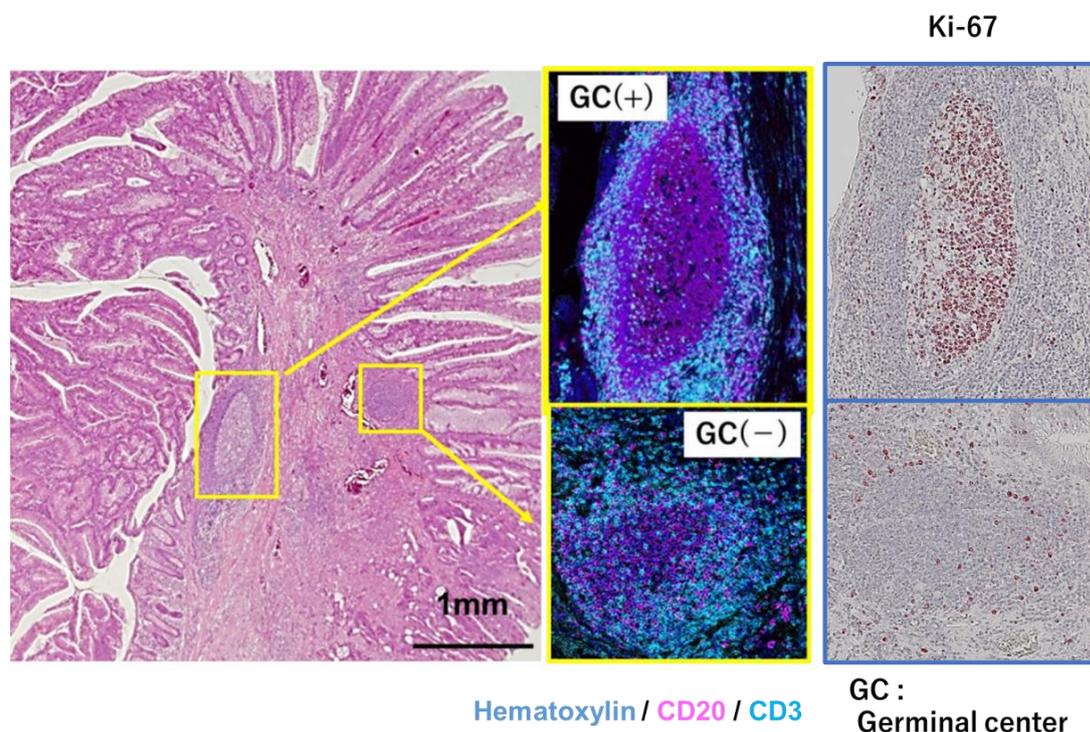


図 40 大腸癌の GC(+)TLS と GC(-)TLS の代表的な顕微鏡写真

大腸癌の invasive front において無作為に選択された 5 視野の TLS の総数は、DPP-4 阻害薬内服群で有意に少なかった (M=4 (0-14) vs M=6 (0-22), $p < 0.001$)。さらに、胚中心を伴った TLS 数も同じ傾向を示した (M=0 (0-7) vs M=2 (0-12), $p < 0.001$) (図 41)。

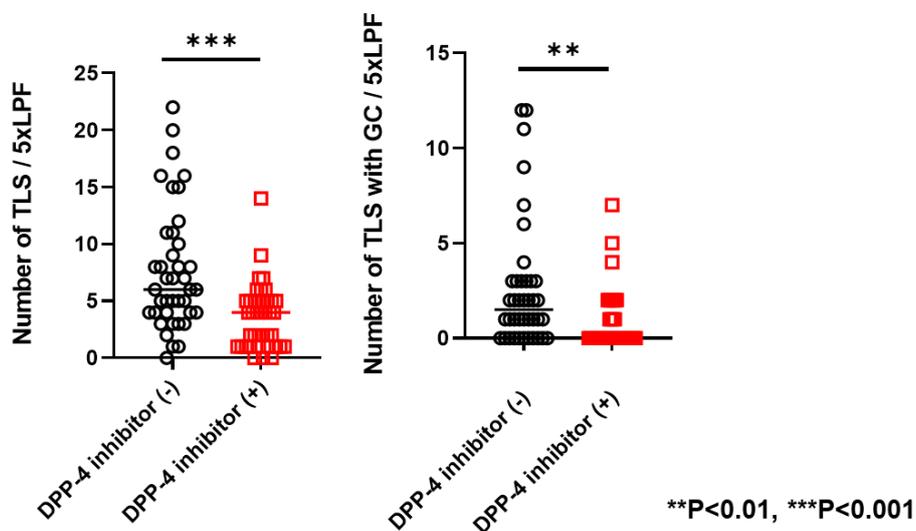


図 41 DPP-4 阻害薬内服群と非内服群の 2 群間で大腸癌の invasive front における GC(-)TLS 数と GC(+)TLS 数を比較

DPP-4 阻害薬内服群 ($n=40$) と非内服群 ($n=40$) で大腸癌組織に存在する TLS 数、GC を伴う TLS 数を定量比較。P 値は Mann-Whitney U 検定で解析した。** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ 。

また、TLS の数は、CD3 陽性 T リンパ球および CD8 陽性 T リンパ球の密度と正の相関を認めた (図 42)。これらの結果から、DPP-4 阻害剤は局所におけ

る TLS を減少させることで、浸潤リンパ球の数を減少させ、腫瘍促進的な作用を發揮するのではないかと考えられた。

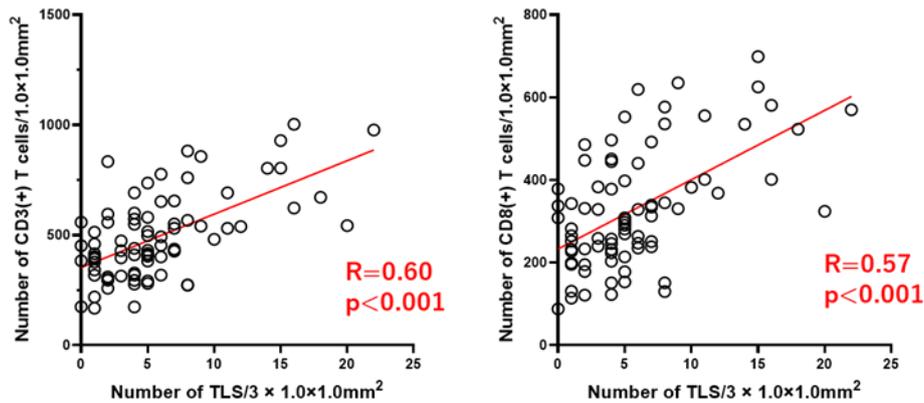


図 42 大腸癌組織における総 TLS 数と TIL 数・CD8 陽性 T リンパ球数の相関

大腸癌症例 (n=80) の大腸癌組織における TLS 数と総 TIL 数と CD8 陽性 T リンパ球の相関関係を散布図を用いて評価し、*r* 値と *p* 値はピアソン積率相関係数の検定で解析した。

3-6. 糖尿病合併大腸癌治癒切除術症例の予後に及ぼすメトホルミンと

DPP-4 阻害薬の影響

以上の研究内容から、メトホルミンと DPP-4 阻害薬は根治切除後の大腸癌患者の予後に対して相反する影響を持つことが判明した。そこで、最後に糖尿病合併大腸癌の治癒切除症例の DFS を DPP-4 阻害薬非内服群、メトホルミンと

DPP-4 阻害薬 2 剤内服群、DPP-4 阻害薬単独内服群の 3 群に分けて検討した (図 43)。

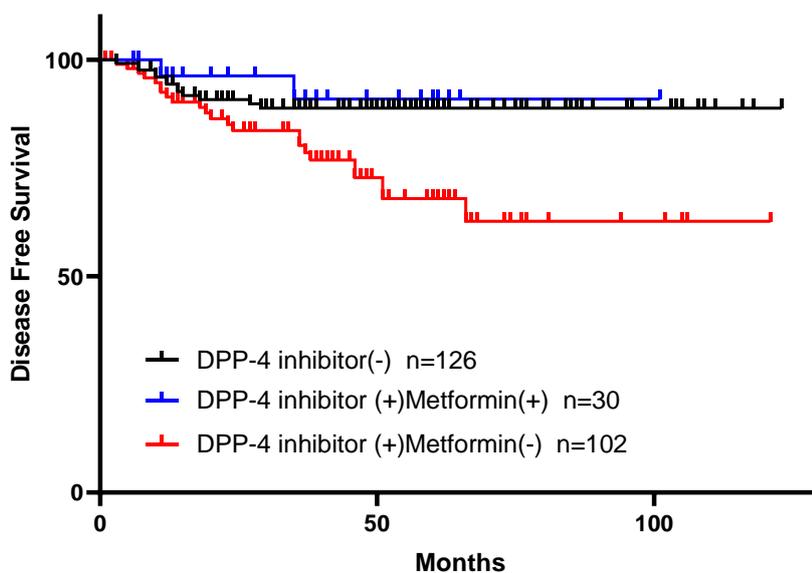


図 43 大腸癌根治手術後に対する DPP-4 阻害薬非内服群、メトホルミンと

DPP-4 阻害薬の 2 剤内服群、DPP-4 阻害薬単独内服群の DFS の比較

DPP-4 阻害薬単独内服群 ($n = 102$)、DPP-4 阻害薬+メトホルミン内服群 ($n = 30$)、

DPP-4 阻害薬非内服群 ($n = 126$) の術後無病生存率 (DFS) を比較した。

DPP-4 阻害薬内服患者 132 人中 30 名がメトホルミンを内服しており、その予後は DPP-4 阻害薬非内服群とほぼ同等なレベルに改善していた。

第4章 考察

近年、がんの発生、進行におよぼす糖尿病治療薬の影響が注目されている。そこで、本研究では大腸癌患者の予後に与えるメトホルミンと DPP-4 阻害薬の影響とそのメカニズムについて検討した。

(1) 糖尿病合併大腸癌に対するメトホルミンの影響

過去の疫学研究では、メトホルミンが大腸癌の発症リスクを低減するだけでなく、特に p StageII および p StageIII の腫瘍の治癒的手術を受けた患者の予後を改善する可能性があることが示唆されている(31-33)。本研究でも、根治手術を受けた2型糖尿病合併大腸癌患者の中で、メトホルミン内服群は非内服群と比べて DFS が有意に良好であり、過去の研究結果と一致していた。また、切除標本の臨床病理学的因子では、メトホルミン内服群の病理学的深達度、リンパ節転移および進行度は非内服群と比較して低い傾向にあり、リンパ節転移状況はメトホルミン内服群で有意に低かった。メトホルミンの服用は大腸癌の進行に対して抑制的な作用を有する可能性があることが示唆された。また、遠隔転移を伴う Stage IV大腸癌では、メトホルミン内服群は原発腫瘍の病理学的深達度がより進行しているにもかかわらず、肝転移個数と大きさを表される肝転移進行度は非内服群に比べて低かった。この事実は、メトホルミンは原発巣だけ

ではなく遠隔臓器における転移巣の成長に対しても抑制的に働いている可能性があると考えられた。

大腸癌手術標本を免疫組織学的に検討したところ、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 数、特に CD8 陽性 T リンパ球がメトホルミン内服群で増加していたことがヒトの癌組織にて初めて明確に示された。

今回の研究結果では、メトホルミン内服群では腫瘍間質における TLS および胚中心を伴う TLS の密度が大幅に増加していた。また、TLS 数と総 TIL 数または CD8 陽性 T リンパ球数に正の相関があることを確認した。がん微小環境における TLS は、癌を含む慢性炎症を伴う末梢組織で発生し、腫瘍内でさまざまな成熟状態で存在し、胚中心形成に至る異所性リンパ器官である(34, 35)。最近の研究では、がん微小環境における TLS の密度は、大腸癌を含むさまざまな固形悪性腫瘍の患者の予後良好である因子とされている(34)。TLS 密度は、初期段階の非小細胞肺癌(36) および大腸癌(33)における CD4 陽性 T リンパ球および CD8 陽性 T リンパ球の密度と相関することが示されている。

本研究の結果は過去の報告とほぼ一致しており、メトホルミンの抗腫瘍効果が TLS の誘導を通じて TIL または CD8 陽性 T リンパ球を増加させることを示唆している。

一般に、マクロファージは M1/M2 の二つのサブタイプに分類される。M1 マクロファージは表面抗原として CD80、CD86 を強く発現し、IL-1・IL-6・TNF α ・IL-12・IL-23 などの炎症性サイトカインを分泌し、M2 マクロファージは表面抗原として CD204、CD206、CD163 を強く発現し IL-10・IL-4・Arginase1・VEGF・TGF β などのサイトカインや酵素が活性化されており、抗炎症作用に働くとされている(37-39)。がん微小環境に浸潤している腫瘍関連マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) は、その多くが癌免疫に抑制的に働く M2 マクロファージとして存在しているとされている(40)。様々な固形癌において高密度の M2 マクロファージが予後不良因子とされ(41-43)、がん微小環境において M2 マクロファージの減少が予後改善に関与することが報告されている。

本研究では、CD163 (+) /CD68 (+) 比によって定義される TAM 中の M2 マクロファージの割合はメトホルミン内服群で減少したという研究結果もこれと合致しており、メトホルミンは通常 TAM に多く存在する M2 マクロファージを M1 マクロファージ様に変化させ、がん微小環境を抗腫瘍的に変化させる作用があるのではないかと推測された。

また、がん微小環境における線維化は、主に癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF) によって産生されるコラーゲンマトリックスの沈

着に起因し、腫瘍細胞の転移挙動に重大な影響を及ぼす(44, 45)。メトホルミンは、主に AMPK を介した TGF- β 産生の抑制を通じて、さまざまな臓器の線維化を予防することが示されている(46-48)。TGF- β は M2 マクロファージによっても多く産生されることが知られている。本研究結果では、メトホルミン内服群の invasive front では非内服群に比べて M2 マクロファージが少なく、線維化が進んでいなかった。したがって、メトホルミンは TAM を機能的に変化させ、TGF- β の産生を抑制することで線維化を抑制した機序が考えられる。

以上から、メトホルミンは、大腸癌のがん微小環境において CD3 陽性 T リンパ球・CD8 陽性 T リンパ球数およびがん微小環境における免疫応答を示す TLS を増加させ、M2 マクロファージの割合を減少させることで間質の線維化を減少させると考えられた。このような、メトホルミンによるがん免疫微小環境に及ぼす変化が大腸癌患者の予後改善に大きく関与していると考えられた。

現在、さまざまな癌に対するメトホルミンと化学療法剤の相乗効果を調べるために、多くの臨床試験が活発に行われている(49)。メトホルミンが大腸癌に対する補助化学療法の効果が高めること(50, 51) や、進行大腸癌に対する 5-FU ベースの化学療法に対するメトホルミンの効果は中程度であることが報告されている(52)。

今回の調査結果では、肝転移のある大腸癌症例においてメトホルミン内服群で肝転移の進行度が低かったが、生存成績に差はなかった。メトホルミンは大腸癌を発症するリスクを減少させるだけでなく、大腸癌（StageII および III）の治癒切除症例の予後を改善することが示されている(53-55)が、進行大腸癌症例における抗腫瘍効果はそれほど顕著ではないことが報告されている(56)。私の結果も同様に肝転移症例におけるメトホルミンの内服効果は認めなかったが、明確な結論を引き出すにはサンプルサイズが不十分であり、今後、Stage IVの大腸癌症例におけるメトホルミンの治療可能性を確認するには、多施設共同観察研究などでサンプル数を増やして検証する過程が必要だと考えられた。

(2) メトホルミンのマクロファージへの分化制御について

メトホルミンががん微小環境において、M2 マクロファージの割合を増加させる機序について in vitro 実験で検討した。健常人の末梢血より PBMo を分離し M-CSF を用いてマクロファージに分化させたのちに IL-4 と IL-10 で刺激すると、CD163、CD206 の発現が上昇し T リンパ球の増殖を抑制し、M2 マクロファージへの分化が誘導されることが確認された。

この実験系において、M2 マクロファージをメトホルミン処理することで CD86 の発現に変化はなかったが、CD206、CD163 の発現に低下がみられた。

また、メトホルミン処理した M2 マクロファージを活性化リンパ球と共培養すると、M2 マクロファージによる活性化 T リンパ球の分裂・増殖の抑制が見られなくなり、用量依存性にむしろ促進した。これらの結果から、メトホルミンにより M2 マクロファージへの分化は抑制されることを見出した。

メトホルミンが STAT3 のリン酸化を抑制することで M2 マクロファージへの分化を抑制する報告があることは既に報告されており(57-59)、本研究結果と一致した。ただし、実臨床におけるメトホルミン塩酸塩の添付文書にはメトホルミン 250mg 1 錠を内服した際の最高血中濃度は通常 4.8 μ M とされており、*in vitro* 実験におけるメトホルミンの濃度は血中濃度と比較するとはるかに高い濃度となる。血中と組織中のメトホルミン濃度の関係については報告がないが、本研究の評価には慎重になる必要が考えられた。

(3) メトホルミンの好中球細胞外トラップへの影響について

好中球が、核内の DNA をミエロペルオキシダーゼや好中球エラスターゼなどの細胞質内顆粒の酵素と共に細胞外に放出し、細菌などの異物を捕捉し殺菌する現象を好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) という。近年、NETs は宿主の免疫防御機構の武器となる一方で、血小板を捕捉し、血栓や塞栓の原因となること(60)、また癌細胞を捕捉し、癌細胞の接着・浸潤・増殖

に寄与し、癌転移形成にも関与することが解ってきた(61-63)。また、癌組織内には一般に多数の好中球 (TAN) も浸潤しており(64)、TAN が高密度に浸潤した症例の予後が増悪すること(65, 66) が報告されており、TAM と同様に TAN の高密度の浸潤も予後不良因子として考えられている(67)。NETs は IL-8、LPS、G-CSF、TNF α などの刺激により好中球より放出され、がん微小環境においてもその現象は確認されている(68)。NETs ががんの転移を促進させることが報告されている(69)。健常人からの採取した末梢血より分離した好中球を LPS で刺激し、SYTOX green で DNA を染色することで NETs を視覚的にとらえることができる。好中球に対してメトホルミンを作用させることで NETs の放出が抑えられることが確認された。近年、メトホルミンが PKC-NADPH オキシダーゼ経路を抑制し、NETs の放出を抑制することが報告されたが本研究結果と矛盾しないものであった。(70)

(4) 糖尿病合併大腸癌の根治切除症例に対する DPP-4 阻害薬の影響

最近のメタアナリシスと大規模コホート研究では、2 型糖尿病合併癌患者の予後に対する DPP-4 阻害薬の使用は予後に有意な影響を与えないことが報告されている(23-25)。一方、DPP-4 阻害薬が腫瘍細胞の生存率と増殖を増加させ、in vitro および in vivo の両方で CXCL12 / CXCR4 / mTOR 経路を介して EMT

を促進し、がんを促進する作用があることも報告されている(30, 71)。今回の研究結果では、大腸癌手術症例のうち DPP 阻害薬内服群は、再発率が高く、DFS が有意に短い結果であり、多変量解析の結果より DPP-4 阻害薬の使用は独立した予後因子であることが示された。免疫組織学的検討では、大腸癌の invasive front における Zeb1 陽性腫瘍細胞数が、DPP-4 阻害薬内服群で有意に増加しており、これまでの報告と一致し、DPP 阻害薬が癌細胞の EMT を促進し、遠隔転移を誘導した結果、再発率の増加につながった可能性があると考えられた。

一方、免疫細胞のうちマクロファージに注目すると、DPP-4 阻害薬内服群の大腸癌組織では、CD163(+)CD68(+)M2 マクロファージの割合が大幅に増加した。過去の報告において、Glucagon-like peptide(GLP)-1 が JNK / STAT3 経路を介してヒトマクロファージを M2 マクロファージへ分化誘導することが示されている(72, 73)ことから、DPP-4 阻害薬を内服することで DPP-4 によって分解される GLP-1 の大腸癌組織中の濃度が上昇し、TAM の極性がより M2 優位な状態になる機序が考えられた。腫瘍組織における CD163(+)/CD68(+) 比が、大腸癌患者の生存の独立した予後因子であることも既に報告されている(41)。

また、CD3(+)CD8(+)エフェクターT リンパ球数は、DPP-4 阻害薬内服群の大腸癌組織で有意に少なかった。これまでに、可溶性 CD26 / DPP-4 の添加が

ヒト T リンパ球の経内皮移動を促進することや(74)、GLP-1 が PI-3 キナーゼ活性の阻害を通じてケモカインによって誘導されるヒト T リンパ球の遊走を阻害することが報告されている(75)。本研究の IHC の所見はこれらの報告と一致しており、DPP-4 の阻害が大腸癌組織における T リンパ球の浸潤を抑制していることが考えられた。

糖尿病治療薬と発癌との関係に関する報告は pioglitazone と膀胱癌(76)との関係や glargine と乳癌(77)との関係が有名であるが、その後その関係を否定する報告が多数発表されたため、薬剤の認可は撤回されていない。そのため、DPP-4 阻害薬の癌に対する作用についても様々な側面からの検討が必要になり、癌に対して促進的に作用するのか抑制的に作用するのかを言及するにはより多くの症例での追加検討が必要と考えられる。

第5章 おわりに

メトホルミンは M2 マクロファージへの分化を抑制し、T リンパ球の分裂・増殖を促進させた。また、大腸癌組織の免疫組織化学染色にて矛盾しない結果が得られた。近年、メトホルミンはがん免疫微小環境において疲弊した T リンパ球の再活性化を促すことで抗腫瘍効果を発揮することが示唆されているが、このプロセスには T リンパ球への直接的な作用だけでなくマクロファージを介した機序も関与している可能性があると考えられた。

一方、DPP-4 阻害薬は大腸癌治癒切除後の DFS を増悪させた。免疫組織化学染色では、DPP-4 阻害薬は EMT を誘導することに加え、腫瘍内の免疫細胞に対してメトホルミンと全く逆の作用をもたらすという結果が得られた。この研究は後ろ向きコホートであり、患者背景において統一されていないため、今後前向きコホートによる再検討の必要があると思われるが、メトホルミンとの併用により DPP-4 阻害の腫瘍促進効果はキャンセルされるという事実からも、治癒切除された大腸癌に限っては、DPP-4 阻害薬ががん免疫微小環境を腫瘍促進的な環境に変化させることにより、再発率を高め予後を増悪させた可能性があることが示唆された。

いずれにせよ、糖尿病治療薬の選択が、糖尿病合併大腸癌症例において治癒切除後の予後に大きな影響を与えていることが明らかとなった。これまでのメタ

アナリシスではDPP-4阻害薬は癌の発症に対して有意な影響を与えないとされているが、本薬剤を使用中の大腸癌症例に対しては、治療薬の変更やメトホルミンの併用などの検討が必要になるかもしれない。糖尿病合併患者の数は年々増加傾向にあり、今後、医療経済の観点からも深刻な社会問題になっていくことが予想される。前向き臨床研究の実施により、多種の癌腫におけるこれらの薬剤の予後に対する影響を検討するとともにその薬理作用に関するより詳細なメカニズムの解明が望まれる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導を頂いた自治医科大学大学院消化器一般移植外科 佐田尚宏教授、北山丈二教授、臨床腫瘍科 大澤英之先生、宮戸秀世先生に深く感謝致します。

また、多重免疫組織化学染色で御指導いただいた、歯科口腔外科学講座 川嶋理恵先生に深く感謝致します。

そして、研究の計画・遂行にあたり様々なご助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学消化器一般移植外科学教室の皆様、臨床研究支援センターの篠原淳子さん、畠山浩美さん、贄田育子さんに心より御礼申し上げます。

参考文献

1. E. Orgel, S. D. Mittelman, The links between insulin resistance, diabetes, and cancer. *Curr Diab Rep* **13**, 213-222 (2013).
2. A. J. Klil-Drori, L. Azoulay, M. N. Pollak, Cancer, obesity, diabetes, and antidiabetic drugs: is the fog clearing? *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 85-99 (2017).
3. G. Eibl *et al.*, Diabetes Mellitus and Obesity as Risk Factors for Pancreatic Cancer. *J Acad Nutr Diet* **118**, 555-567 (2018).
4. Y. Gu *et al.*, Incidence and Mortality Risks of Cancer in Patients with Type 2 Diabetes: A Retrospective Study in Shanghai, China. *Int J Environ Res Public Health* **13**, (2016).
5. A. Emami-Riedmaier, E. Schaeffeler, A. T. Nies, K. Morike, M. Schwab, Stratified medicine for the use of antidiabetic medication in treatment of type II diabetes and cancer: where do we go from here? *J Intern Med* **277**, 235-247 (2015).
6. A. Dulskas *et al.*, Metformin increases cancer specific survival in colorectal cancer patients-National cohort study. *Cancer Epidemiol* **62**, 101587 (2019).
7. F. Meng, L. Song, W. Wang, Metformin Improves Overall Survival of Colorectal Cancer Patients with Diabetes: A Meta-Analysis. *J Diabetes Res* **2017**, 5063239 (2017).
8. H. Noto, A. Goto, T. Tsujimoto, M. Noda, Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **7**, e33411 (2012).
9. S. Del Barco *et al.*, Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget* **2**, 896-917 (2011).
10. M. Daugan, A. Dufay Wojcicki, B. d'Hayer, V. Boudy, Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol Res* **113**, 675-685 (2016).
11. M. Li, X. Li, H. Zhang, Y. Lu, Molecular Mechanisms of Metformin for Diabetes and Cancer Treatment. *Front Physiol* **9**, 1039 (2018).
12. M. N. A. Kamarudin, M. M. R. Sarker, J. R. Zhou, I. Parhar, Metformin in colorectal cancer: molecular mechanism, preclinical and clinical aspects. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 491 (2019).
13. S. Eikawa *et al.*, Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 1809-1814 (2015).
14. T. Hirayama *et al.*, Metformin Prevents Peritoneal Dissemination via Immune-suppressive Cells in the Tumor Microenvironment. *Anticancer Res* **39**, 4699-4709 (2019).
15. S. Suissa, L. Azoulay, Metformin and the risk of cancer: time-related biases in observational studies. *Diabetes Care* **35**, 2665-2673 (2012).
16. J. H. Cha *et al.*, Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell* **71**, 606-620 e607 (2018).

17. Y. Han *et al.*, Metformin reverses PARP inhibitors-induced epithelial-mesenchymal transition and PD-L1 upregulation in triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res* **9**, 800-815 (2019).
18. A. Sica *et al.*, Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* **18**, 349-355 (2008).
19. L. Shen *et al.*, Crosstalk between Macrophages, T Cells, and Iron Metabolism in Tumor Microenvironment. *Oxid Med Cell Longev* **2021**, 8865791 (2021).
20. X. Jiang *et al.*, The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* **39**, 204 (2020).
21. J. Kim, J. S. Bae, Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators Inflamm* **2016**, 6058147 (2016).
22. L. Wu, X. H. Zhang, Tumor-Associated Neutrophils and Macrophages-Heterogenous but Not Chaotic. *Front Immunol* **11**, 553967 (2020).
23. M. Abd El Aziz, O. Cahyadi, J. J. Meier, W. E. Schmidt, M. A. Nauck, Incretin-based glucose-lowering medications and the risk of acute pancreatitis and malignancies: a meta-analysis based on cardiovascular outcomes trials. *Diabetes Obes Metab* **22**, 699-704 (2020).
24. I. Dicembrini, B. Nreu, C. Monteregegi, E. Mannucci, M. Monami, Risk of cancer in patients treated with dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: an extensive meta-analysis of randomized controlled trials. *Acta Diabetol* **57**, 689-696 (2020).
25. S. Chai *et al.*, Effect of incretin-based therapies on cancers of digestive system among 101 595 patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and network meta-analysis combining 84 trials with a median duration of 30 weeks. *BMJ Open Diabetes Res Care* **7**, e000728 (2019).
26. J. H. Jang *et al.*, Suppression of lung metastases by the CD26/DPP4 inhibitor Vildagliptin in mice. *Clin Exp Metastasis* **32**, 677-687 (2015).
27. R. Barreira da Silva *et al.*, Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy. *Nat Immunol* **16**, 850-858 (2015).
28. K. Masur, F. Schwartz, F. Entschladen, B. Niggemann, K. S. Zaenker, DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regul Pept* **137**, 147-155 (2006).
29. M. Bai *et al.*, Metformin sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy through IDH1-induced Nrf2 expression via an epigenetic mechanism. *Oncogene* **37**, 5666-5681 (2018).
30. E. Kawakita *et al.*, Metformin Mitigates DPP-4 Inhibitor-Induced Breast Cancer

- Metastasis via Suppression of mTOR Signaling. *Mol Cancer Res* **19**, 61-73 (2021).
31. R. Ramjeesingh, C. Orr, C. S. Bricks, W. M. Hopman, N. Hammad, A retrospective study on the role of diabetes and metformin in colorectal cancer disease survival. *Curr Oncol* **23**, e116-122 (2016).
 32. Y. J. Ki *et al.*, Association between Metformin Use and Survival in Nonmetastatic Rectal Cancer Treated with a Curative Resection: A Nationwide Population Study. *Cancer Res Treat* **49**, 29-36 (2017).
 33. Z. B. Mei *et al.*, Survival benefits of metformin for colorectal cancer patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **9**, e91818 (2014).
 34. G. Di Caro *et al.*, Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res* **20**, 2147-2158 (2014).
 35. F. Posch *et al.*, Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer. *Oncoimmunology* **7**, e1378844 (2018).
 36. J. Goc *et al.*, Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8+ T cells. *Cancer Res* **74**, 705-715 (2014).
 37. Y. Yao, X. H. Xu, L. Jin, Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol* **10**, 792 (2019).
 38. P. J. Murray, Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol* **79**, 541-566 (2017).
 39. C. C. Stempin, L. R. Dulgerian, V. V. Garrido, F. M. Cerban, Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 683485 (2010).
 40. K. Y. Lee, M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering* **2**, 1-5 (2019).
 41. C. Yang *et al.*, Elevated CD163(+)/CD68(+) Ratio at Tumor Invasive Front is Closely Associated with Aggressive Phenotype and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci* **15**, 984-998 (2019).
 42. J. Hu *et al.*, M2 Macrophage-Based Prognostic Nomogram for Gastric Cancer After Surgical Resection. *Front Oncol* **11**, 690037 (2021).
 43. H. Hu *et al.*, The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumour Biol* **37**, 8657-8664 (2016).
 44. M. Yamauchi, T. H. Barker, D. L. Gibbons, J. M. Kurie, The fibrotic tumor stroma. *J Clin Invest* **128**, 16-25 (2018).
 45. D. Thomas, P. Radhakrishnan, Tumor-stromal crosstalk in pancreatic cancer and tissue fibrosis. *Mol Cancer* **18**, 14 (2019).

46. Y. Kita *et al.*, Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* **7**, e43056 (2012).
47. H. Xiao *et al.*, Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res* **87**, 504-513 (2010).
48. F. Ursini *et al.*, Oral Metformin Ameliorates Bleomycin-Induced Skin Fibrosis. *J Invest Dermatol* **136**, 1892-1894 (2016).
49. P. Saraei, I. Asadi, M. A. Kakar, N. Moradi-Kor, The beneficial effects of metformin on cancer prevention and therapy: a comprehensive review of recent advances. *Cancer Manag Res* **11**, 3295-3313 (2019).
50. P. P. Singh *et al.*, Relationship Between Metformin Use and Recurrence and Survival in Patients With Resected Stage III Colon Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy: Results From North Central Cancer Treatment Group N0147 (Alliance). *Oncologist* **21**, 1509-1521 (2016).
51. C. Coyle, F. H. Cafferty, C. Vale, R. E. Langley, Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* **27**, 2184-2195 (2016).
52. V. C. Miranda *et al.*, Phase 2 Trial of Metformin Combined With 5-Fluorouracil in Patients With Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* **15**, 321-328 e321 (2016).
53. L. Du *et al.*, Prognostic role of metformin intake in diabetic patients with colorectal cancer: An updated qualitative evidence of cohort studies. *Oncotarget* **8**, 26448-26459 (2017).
54. W. K. Huang *et al.*, Postdiagnostic metformin use and survival of patients with colorectal cancer: A Nationwide cohort study. *Int J Cancer* **147**, 1904-1916 (2020).
55. C. R. Garrett *et al.*, Survival advantage observed with the use of metformin in patients with type II diabetes and colorectal cancer. *Br J Cancer* **106**, 1374-1378 (2012).
56. D. J. Lee *et al.*, [The effect of metformin on responses to chemotherapy and survival in stage IV colorectal cancer with diabetes]. *Korean J Gastroenterol* **60**, 355-361 (2012).
57. L. Ding *et al.*, Metformin prevents cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of tumor associated macrophages. *Oncotarget* **6**, 36441-36455 (2015).
58. Z. Yin *et al.*, IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* **119**, 9419-9432 (2018).
59. S. B. Vasamsetti *et al.*, Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes* **64**, 2028-2041 (2015).
60. T. A. Fuchs *et al.*, Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15880-15885 (2010).

61. J. Cools-Lartigue *et al.*, Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*, (2013).
62. N. Rocks *et al.*, Ozone-primed neutrophils promote early steps of tumour cell metastasis to lungs by enhancing their NET production. *Thorax* **74**, 768-779 (2019).
63. Z. Q. Chu, K. C. Zhang, L. Chen, Neutrophil extracellular traps in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* **27**, 5474-5487 (2021).
64. L. Wu, S. Saxena, M. Awaji, R. K. Singh, Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
65. S. Li *et al.*, Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* **38**, 6 (2019).
66. M. Shen *et al.*, Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **9**, e98259 (2014).
67. M. T. Masucci, M. Minopoli, M. V. Carriero, Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol* **9**, 1146 (2019).
68. Q. Chen, L. Zhang, X. Li, W. Zhuo, Neutrophil Extracellular Traps in Tumor Metastasis: Pathological Functions and Clinical Applications. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
69. L. Menegazzo *et al.*, The antidiabetic drug metformin blunts NETosis in vitro and reduces circulating NETosis biomarkers in vivo. *Acta Diabetol* **55**, 593-601 (2018).
70. M. T. Masucci, M. Minopoli, S. Del Vecchio, M. V. Carriero, The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol* **11**, 1749 (2020).
71. F. Yang *et al.*, Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 Accelerates Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer Metastasis via the CXCL12/CXCR4/mTOR Axis. *Cancer Res* **79**, 735-746 (2019).
72. S. Wan, H. Sun, Glucagon-like peptide-1 modulates RAW264.7 macrophage polarization by interfering with the JNK/STAT3 signaling pathway. *Exp Ther Med* **17**, 3573-3579 (2019).
73. D. Shiraishi, Y. Fujiwara, Y. Komohara, H. Mizuta, M. Takeya, Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **425**, 304-308 (2012).
74. S. Iwata *et al.*, CD26/dipeptidyl peptidase IV differentially regulates the chemotaxis of T cells and monocytes toward RANTES: possible mechanism for the switch from innate to acquired immune response. *Int Immunol* **11**, 417-426 (1999).
75. N. Marx *et al.*, Glucagon-like peptide-1(1-37) inhibits chemokine-induced migration of human CD4-positive lymphocytes. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3549-3555 (2010).
76. E. Ripamonti, L. Azoulay, M. Abrahamowicz, R. W. Platt, S. Suissa, A systematic review

of observational studies of the association between pioglitazone use and bladder cancer.
Diabet Med **36**, 22-35 (2019).

77. Insulin glargine increases cancer risk? *Reactions Weekly* **1259**, 5-5 (2009).