

氏名	齋藤 晶
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 655 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 石橋 俊 (委員) 准教授 鈴木 浩一 講師 唐澤 直義

論文内容の要旨

1 研究目的

糖尿病は様々な癌の発症リスクを高め、担癌患者における予後不良因子である。疫学調査によって抗糖尿病薬メトホルミンは様々ながんの予後を改善することが示唆されているが、近年、メトホルミンは腫瘍免疫を活性化することにより抗腫瘍効果を発揮することが解ってきた。がん微小環境には、リンパ球(TIL)、好中球(TAN)やマクロファージ(TAM)が存在し、高密度の TAN や TAM の浸潤は予後不良因子とされているが、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不明である。そこで、本研究では、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調査するとともに、切除標本の免疫組織化学染色(IHC)を施行し、メトホルミンがヒト大腸癌のがん免疫微小環境に与える影響を明らかにする。また、近年糖尿病治療薬として DPP-4 阻害薬が広く使用されているが、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。そこで、同様の方法で DPP-4 阻害薬の患者予後およびがん免疫微小環境に与える影響を検討する。

2 研究方法

1. 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を施行した 2 型糖尿病合併大腸癌患者を選択し、メトホルミン内服・DPP-4 阻害薬内服の有無を調査した。これらの患者における臨床病理学的因子および予後について解析した。また、メトホルミン内服群 40 人とメトホルミン非内服群から傾向スコアマッチング法によって背景を一致させた 40 人の切除標本を用いて IHC により浸潤免疫細胞 (TIL、TAM、TAN、Tertiary Lymphoid Structure(TLS)) を同定し、2 群間でその分布状況を比較検討した。DPP-4 阻害薬内服群 40 人と非内服群 40 人においても同様の方法で評価を行った。

2. 健常人末梢単核球(PBMC)と多形核細胞(PMN)を採取し、PBMC から CD14(+)単核(PBMo)とリンパ球(PBL)を分離した。PBMo を M-CSF と IL-10+IL-4 で刺激し M2 型マクロファージに分化誘導させる実験系にメトホルミン(100 μ M~1mM)を添加し、フローサイトメトリーで表面抗原の発現を定量した。また、これらのマクロファージの共存下に PBL を抗 CD3 抗体で刺激し、その分裂を CFSE 希釈アッセイにより検討した。また、末梢血好中球 (PMN) を LPS で刺激し、NETs の放出を SYTOX Green

により発色させ同定する実験系に、メトホルミン(10 μ M~100 μ M)を添加し NETs 産生に与える影響を検討した。

3 研究成果

1. 治癒切除を受けた糖尿病を合併大腸癌症例 267 例中 52 例(19.4%)が手術時にメトホルミンを内服しており、メトホルミン非内服群と比べて有意に若く(p<0.05)、pN ステージが有意に低かった(p<0.05)。両群間で全生存率(OS)に有意差は認めなかったが、無病生存率(DFS)はメトホルミン内服群が有意に良好であった(p<0.05)。切除標本の IHC では、CD3(+)/TIL \cdot CD8(+)/TIL の密度は共にメトホルミン内服群で有意に増加して(p<0.01)おり、CD8/CD3 比はメトホルミン内服群で有意に高かった(p<0.001)。また、メトホルミン内服群では、CD68(+)/TAM は、有意に増加していた(p<0.01)が、CD163(+)/M2 マクロファージ減少傾向を認め(p=0.10)、TAM 中の M2 マクロファージの比率は有意に低下していた(p<0.001)。さらに、メトホルミン内服群では TLS と胚中心を伴った TLS はメトホルミン内服群で有意に増加しており(p<0.05)、CD66b(+)/TAN とシトルリン化ヒストン H3(+)/NETosis は有意に減少していた(p<0.001)。

2. PBMo を M-CSF と IL-4+IL-10 を用いて培養すると、M2 マクロファージのマーカーである CD206 と CD163 の発現増強が確認されたが、この分化の過程でメトホルミンを添加すると CD206、CD163 の発現は用量依存性に低下する傾向が認められた。また、CFSE 希釈アッセイでは、M2 マクロファージと共培養した場合、CD4(+)/CD8(+)/T リンパ球の増殖は抑制されたが、メトホルミンで前処理したマクロファージと共培養するとその抑制が解除されるだけでなく、高濃度のメトホルミンを用いた場合は T リンパ球の分裂・増殖を増強する傾向を認めた。LPS で刺激した PMN は NETs を放出したが、メトホルミンにて用量依存性に抑制された。

3. DPP-4 阻害薬内服症例は 132 例で糖尿病症例中 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であった(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。2 群間では OS に有意差は認めなかったが、DFS は DPP-4 阻害薬内服群が有意に悪かった(p<0.05)。切除標本の IHC では DPP-4 阻害薬内服群で、Zeb1 陽性腫瘍細胞が有意に多かった(p<0.01)。また内服群では、CD3(+)/CD8(+)/T リンパ球は有意に減少し(p<0.01)、CD8/CD3 比は有意に低く(p<0.001)、TLS や胚中心を伴う TLS は有意に少なかった(p<0.01)。CD68(+)/TAM に関しては 2 群間で有意差を認めなかったが、CD163(+)/M2 マクロファージは内服群で有意に増加していた(p<0.001)。

4. 最後に、DPP-4 阻害薬内服患者 132 名中 30 名がメトホルミンを併用しており、その患者群の DFS 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。

4 考察

メトホルミンの内服がヒト大腸癌組織における TIL 数、特に CD8(+)/T リンパ球を増加させること、腫瘍間質における TLS および胚中心を伴う TLS の密度を増加させることが確認された。TLS は局所の免疫応答を反映すると考えられ、本研究でも TLS 数と総 TIL 数または CD8(+)/T リンパ球数に正の相関があったことから、メトホルミンは TLS の誘導を介して CD8(+)/T リンパ球の浸潤を増強させる効果を有していることが推測された。近年、マウスを用いた動物実験にて、メトホルミンががん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により抗腫瘍効果を発揮することが報告されているが、本研究結果はこれらの報告と合致し、メトホルミンの抗腫瘍効果に

は宿主の免疫が関与していることがヒトでも確認された。

また、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有意に減少していた。In vitro においてメトホルミンは M2 マクロファージへの分化を抑制し、T リンパ球の分裂・増殖を促進させることが確認された。マクロファージは STAT3 のリン酸化を介して M2 マクロファージへ分化するが、メトホルミンは STAT3 のリン酸化を抑制し、M2 への分化を抑制することが既に報告されており、本研究結果はこれと一致する。前述のメトホルミンの疲弊 T リンパ球の再活性化のプロセスには、マクロファージを介した機序が深く関与している可能性があると考えられた。更に、メトホルミンは TAN の NETs 形成にも抑制的な作用を持つことも確認できた。以上の結果から、メトホルミンがヒトの大腸癌組織の免疫学的微小環境を抗腫瘍的に変化させており、これが大腸癌根治切除後の患者予後の改善に繋がっ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。IHC では、DPP-4 阻害薬は EMT を誘導することに加え、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。DPP-4 阻害薬の腫瘍細胞への直接的作用として CXCL12/CXCR4/mTOR 経路を介して EMT を促進させる作用あること、DPP-4 により分解される GLP-1 が JNK/STAT3 経路を介して M2 マクロファージへ分化誘導すること、PI-3 キナーゼ活性を阻害することで T リンパ球の遊走を阻害すること等が報告されている。これらの結果は本研究結果と合致し、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、予後を増悪させる可能性があることが考えられた。これまでの疫学研究のメタアナリシスの結果から、DPP-4 阻害薬は現時点でがんの罹患率や死亡率には有意な影響は与えないということが提唱されている。しかし、本研究結果から、DPP-4 阻害薬にはがんの進行を促進する効果を有している可能性があり、少なくとも治癒切除された大腸癌に限っては、DPP-4 阻害剤の服用に関しては慎重に対応する必要があると考えられた。

5 結論

糖尿病合併大腸癌患者においては、メトホルミンは術後再発を減少させ、DPP-4 阻害薬は術後再発を増悪させる作用が確認され、薬剤の選択が治癒切除後の患者予後に大きな影響を与える可能性が考えられた。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、前向き臨床研究により、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。

論文審査の結果の要旨

経口血糖降下剤メトホルミンの抗腫瘍効果を示す症例対象研究が報告されている。メトホルミンには腫瘍細胞増殖抑制作用以外に、腫瘍免疫活性化作用が報告されている。そこで、申請者は糖尿病を既往に有する大腸癌症例の中で、メトホルミンか DPP-4 阻害薬投与群とそれ以外の症例の予後を比較し、さらに薬剤投与群と傾向スコアマッチングした対照群の腫瘍組織における腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)・腫瘍関連マクロファージ・tertiary lymphoid structure (TLS)・間質の線維化を免疫組織学的手法で比較した。さらに、培養細胞を用いた in vitro の実験系で、マクロフ

アージュの分化・Tリンパ球サブセット・マクロファージと共培養したリンパ球増殖能・NETs 放出能に対するメトホルミンの効果を検討した。

メトホルミン投与群は全生存率 (OS) に有意差はなかったが、Disease free survival (DFS) を改善した。術後継続内服群では顕著に DFS が改善した。一方、Stage IV の OS は両群間で有意差はなかった。一方、DPP-4 阻害薬内服群では OS に有意差はなかったが、DFS は悪化した。

メトホルミン投与群では CD3 陽性リンパ球数・CD8 陽性リンパ球数・CD8/CD3 比の増加と CD68 陽性細胞増加・CD163 陽性細胞減少・CD164/CD68 比の減少とが観察された。メトホルミン投与群では TLS が増加し、腫瘍関連好中球 (TAN) と NETosis が減少した。一方、線維化に差はなかった。DPP-4 阻害薬投与群では上皮間葉転換 (EMT) マーカーの Zeb1 陽性細胞が増加し、CD3 陽性リンパ球数・CD8 陽性リンパ球数・CD8/CD3 比は減少した。CD163 陽性細胞増加・CD164/CD68 比増加・TLS 抑制が観察された。

メトホルミンはマクロファージ M2 マーカーや免疫チェックポイント分子の発現を抑制し、CD4/CD8 Tリンパ球増殖を抑制し、M2 マクロファージと共培養した CD4/CD8 Tリンパ球増殖を促進し、NET 放出を抑制した。

以上のように、メトホルミンと DPP4-阻害薬は腫瘍免疫の活性・抑制作用があり、それぞれ大腸癌の予後に関して改善・悪化作用を有することが示された。

メトホルミンと DPP-4 阻害薬の腫瘍免疫への作用を多角的アプローチにより証明した独創性が高い意欲的な研究である。一方、後ろ向き研究であり、in vitro で使用された薬剤が極めて高濃度である点などの問題点が指摘された。指摘事項に対して適切に改訂され、学位に相応しい内容であると全員一致で判断した。

最終試験の結果の要旨

申請者から研究の背景・方法・結果・考察について必要十分な発表がなされた。

特に DPP-4 阻害薬が大腸癌の予後を悪化させる可能性はこれまでに指摘されておらず、その臨床的意義の解明は今後の重要な研究課題である。

審査員から以下の質疑があった：1) メトホルミンの作用機序、2) メトホルミンの標的細胞、3) 糖尿病以外の患者に対するメトホルミンや DPP-4 阻害薬の効果、4) メトホルミンの投与量と投与期間、DPP-4 阻害薬の内訳、投与量ないし投与期間。以上の質疑を理解し、応答も適切であった。

研究に関連する周辺領域の知識も十分であった。

以上のように、申請者の研究遂行能力および科学的素養・態度は学位に値すると全員一致で判断した。