

表 題 直腸がん自然肺転移モデルを用いた
メトホルミン併用放射線療法の評価

論文の区分 博士課程

著 者 名 東條 峰之

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	3
第1章 はじめに	5
第2章 実験材料と方法	8
2-1 細胞培養.....	8
2-2 自然肺転移モデルの作成、放射線照射およびメトホルミン投与の方法、 治療スケジュール	9
2-2-1 大腸がん細胞株 LuM1 の自然肺転移モデルの作成.....	9
2-2-2 放射線照射の方法と治療スケジュール	10
2-2-3 メトホルミンの投与方法と治療スケジュール	12
2-3 脾臓細胞の単細胞処理	14
2-4 血液細胞の分離、溶血処理	14
2-5 フローサイトメトリーによる解析のための脾臓細胞・血液細胞の表面抗 原の染色方法	15
2-6 脾臓細胞の IFN- γ 産生能の測定と細胞内染色方法.....	17
2-7 脾臓細胞の抗 FoxP3 抗体を用いた細胞内染色方法.....	19
2-8 肺の組織標本の作成方法と免疫組織化学染色	20
2-9 統計学的解析	21

第3章	結果	22
3-1	皮下腫瘍の体積、飲水量、体重の変化の推移	22
3-2	皮下腫瘍の重さおよび肺転移結節数の比較	24
3-2-1	皮下腫瘍の重さの検討	24
3-2-2	肺転移結節数の検討	26
3-3	各治療群間での脾臓中の免疫細胞の割合の違いについての検討	28
3-3-1	T細胞についての評価	28
3-3-3	骨髄球系細胞についての評価	36
3-4	末梢血液中における単球の評価	38
3-5	脾臓中の免疫細胞と肺転移結節数の相関	40
3-6	免疫組織化学染色を用いた肺転移巣内への免疫細胞の浸潤についての 検討	42
3-7	肺転移巣内へ浸潤する免疫細胞の密度と肺転移結節数の相関	48
第4章	考察	50
第5章	おわりに	57
第6章	謝辞	58
第7章	引用文献	59

略語一覽

略語	名称
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovine serum albumin
BV	Brilliant Violet
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
CRT	Chemoradiotherapy
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte(associated)antigen 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DNA	Deoxyribonucleic acid
FBS	Fetal Bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FVS	Fixable Viability Stain
Gr-1	Granulocyte-differentiation antigen-1
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
IFN- γ	Interferon- γ
IHC	Immunohistochemistry
NK cells	Natural killer cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS-T	Phosphate-buffered saline Twin 20
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD-1	Programmed death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RBC	Red blood cell
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medium 1640
SPF	Specific pathogen free

TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
WT	Wild type

第1章 はじめに

日本における大腸癌の罹患数は、全ての癌種の中で男性では3位、女性では2位となっており、最も頻度の高い癌種の一つである。また、臓器別癌死亡率でも男性で3位、女性では1位となっている(1)。中でも直腸癌の予後は不良であり、結腸癌と比較して5年生存率が5-10%程度低くなっている。その理由の一つとして、直腸癌は局所再発率が高いことが挙げられる(2)。近年、本邦においても局所進行直腸癌に対し術前に化学放射線療法を行い、腫瘍の縮小を得たのちに根治手術を行うという治療戦略を取る施設が増えつつある。これまでの報告において術前放射線療法の併用は、手術単独による治療と比べて局所再発率を低下させるものの、直腸癌患者の全生存率を改善する効果までは認められていないのが現状である。このため、局所制御に加え遠隔転移の制御、生存率の改善を得ることのできる治療法の開発が必要と考えられる(3-6)。

In vitro 実験において癌細胞に対して放射線照射を行うと、2本鎖DNAが損傷されアポトーシスの誘導が起こることが報告されており、これが放射線による抗腫瘍効果の中心的な機序と考えられてきた(7)。しかし、近年の in vivo 実験の結果から、放射線による腫瘍の縮小には、宿主の免疫応答を介した間接的な腫瘍細胞の障害が大きく関与することが解ってきた(8)。一般に、放射線治療を行うと一時的な免疫抑制が誘導されるが、その一方で細胞死に至った癌細胞

から腫瘍関連抗原が放出され、腫瘍特異的な免疫応答の誘導により照射範囲の外に存在する遠隔転移巣の退縮をもたらすという現象が存在することが確認されている(9)。これは、1953年にDr. Moleによって提唱された abscopal effect という現象であるが、実臨床でこの現象が見られることは稀であり、これまであまり注目されてこなかった。しかし、放射線療法に抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤を併用することにより、この abscopal effect が増強されるという報告がなされ、免疫放射線療法という治療戦略が注目を集めている(10-12)。ただし、抗 PD-1 抗体薬などの免疫チェックポイント阻害剤が明らかな治療効果を示すのは一部の患者に留まることが報告されている。したがって、これらの高価な薬剤を使用した免疫放射線療法をすべての患者に応用することは医療費を大幅に増大させる可能性が考えられる。このため、免疫チェックポイント阻害剤以外の薬剤を使用した免疫放射線療法を開発することは、医療経済上の観点からも意義のある研究であると考えられる。

メトホルミンは、1961年に使用が開始されたビグアナイド系に分類される経口糖尿病治療薬であり、日常臨床で最も頻繁に使用される薬剤の一つである(13, 14)。その作用機序として、肝臓での糖新生を抑制するだけでなく、細胞内の AMP 活性プロテインキナーゼ (AMPK) による基質分子のリン酸化亢進を介して糖代謝を改善することが示されている(15)。以前からメトホルミンに

抗腫瘍効果が存在することが指摘されていたが、その作用機序として AMPK の活性化による癌幹細胞のアポトーシス誘導や分化誘導とともに(16, 17)、IGF-1 および炎症性サイトカインの産生低下による腫瘍の増殖抑制などが関与することが指摘されている(18, 19)。近年、メトホルミンは担癌状態で増殖する MDSC やマクロファージなどの免疫抑制性の細胞を減少させることや(20-24)、疲弊状態にある T 細胞の AMPK を活性化し、IFN- γ や TNF- α などのサイトカイン産生能を回復させたり、アポトーシスを抑制すること(20, 23, 25)などが報告され、メトホルミンの抗腫瘍効果に宿主免疫の活性化が深く関与していることが解ってきた。

以上の知見を踏まえて、放射線療法にメトホルミン投与を併用することで、免疫チェックポイント阻害剤を併用した免疫放射線療法に変わる治療法となりうるのではないか？という仮説を設定し、自然肺転移をきたす syngeneic なマウス大腸癌モデルを用いて検証するとともに、その免疫学的機序を解明することにした。

第2章 実験材料と方法

2-1 細胞培養

BALB/c マウスの syngeneic な大腸がん細胞株として、colon26 の亜型で自然肺転移を高頻度に発症する細胞株の LuM1（皮下接種後 10 日後には肺に微小転移を形成し、28 日を過ぎると呼吸不全にて死亡する細胞株(26)）を使用した。LuM1 は、小栗先生（愛知県立がんセンター）より供与を受けた。培養液として 10% ウシ胎仔血清(FBS) (HyClone, Tauraga, New Zealand)、100U/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma, St. Louis, Mo, USA) を含む RPMI-1640 Medium (Sigma, St. Louis, Mo, USA) を用い、温度 37°C、5 %CO₂ の条件下のインキュベータ内で培養を行った。マイコプラズマ検出キット (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて、3 か月ごとにマイコプラズマ感染のないことを確認し、3~5 継代目の細胞を実験に使用した。

2-2 自然肺転移モデルの作成、放射線照射およびメトホルミン投与の方法、

治療スケジュール

2-2-1 大腸がん細胞株 LuM1 の自然肺転移モデルの作成

培養した LuM1 が 80% 程度コンフルエントになった時点で TrypLE™ Express (gibco, Carlsbad, CA, USA) を用いて 37°C で 2 分間処理し、ディッシュから剥離した細胞を回収し実験に使用した。5~6 週齢の雌性の野生型(WT)の BALB/c マウスを日本クレア社 (静岡、日本) より購入し、特定病原体フリー (SPF) 条件で飼育した。LuM1 をハンクス平衡塩溶液 (HBSS(+)) (ナカライテスク, 京都, 日本) に 1×10^7 個/ml の割合で懸濁し、 1×10^6 個/ $100 \mu\text{l}$ を 6~7 週齢の BALB/c マウスの右側腹部に皮下注射することにより皮下腫瘍を形成させた。皮下注射後 7 日目にほぼ全てのマウスで皮下腫瘍が形成されていることが、肉眼的に確認された。腫瘍径に関して各群間で差が出ないように、治療開始前の 13 日目の時点で皮下腫瘍が形成されたマウスを非治療群、メトホルミン投与群、放射線照射群、放射線照射/メトホルミン投与併用群の 4 群に均等に割り付けた上で、治療を行った。腫瘍径を 13 日目から 3 日ごとに測定し、腫瘍体積 (tumor volume) = 長径 \times 短径 \times 高さ \times 1/2 (mm^3) の計算式を用いて腫瘍体積を算出した。LuM1 の皮下接種から 28 日目に犠牲死させ、皮下腫瘍の重さと肉眼的に観察できる肺転移結節の個数を測定した。また脾臓と血液を採取し、

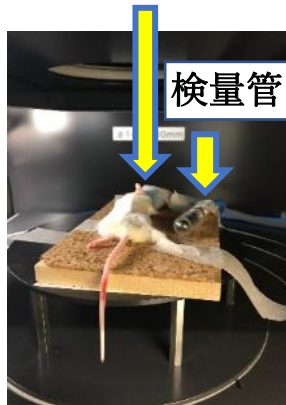
フローサイトメトリーを用いて脾臓細胞と血液細胞のフェノタイプを解析した。

2-2-2 放射線照射の方法と治療スケジュール

2%イソフルランを吸入させることによりマウスに全身麻酔をかけ、伏臥位とした。マウスの体を鉛板によって遮蔽し、皮下腫瘍の部分だけに放射線照射を行った。LuM1の皮下接種を行ってから13日目と15日目の2回、4Gy/回のX線照射を行った。X線照射装置は、MX160Labo（メディエックスステック、松戸,日本）を使用した(図1)。まず、照射量に関する検討を行った。Abscopal effectsに関する過去の論文に記載されている方法に基づいて(27)、8Gy/回の3回の照射を行うと皮下腫瘍とともに肺転移も消失し、その効果を確認することができなかった。このため、1回の照射量は4Gyとした。また、4Gy/回の照射を3回行った場合と2回行った場合を検討したが、2回の照射にて十分な皮下腫瘍の縮小効果が得られたことから、4Gy/回×2回と定め実験を行った。また、当科の先行研究で、LuM1は皮下接種後10日目には顕微鏡的肺転移を来すことが確認されていることから(26)、本実験モデルではabscopal effectsが得られるかを調査するために、放射線照射開始時期を肺転移が形成された後と考えられる13日目とした。

図1 放射線照射の様子

Isoflurane による吸入麻酔



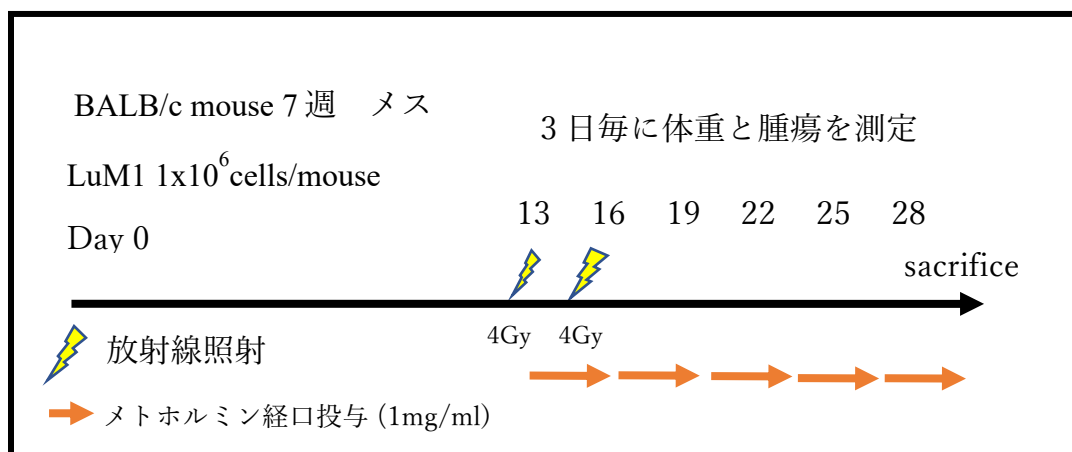
鉛版による遮蔽



2-2-3 メトホルミンの投与方法と治療スケジュール

メトホルミンは、1mg/ml の濃度にて飲料水に溶解し、自由飲水させることにより、13日目から犠牲死させるまで連日投与した(図2)。ケージごとに飲水量をチェックし、1匹あたりの飲水量およびメトホルミン投与量を算出した。光によるメトホルミンの分解を抑えるため、メトホルミンを溶解した水を入れた吸水ボトルはアルミホイルにて遮光した状態で使用した。飲水ボトルは3日ごとに交換し、新鮮な状態の水を摂取させた。メトホルミンの経口摂取量は、過去の報告に従い(28)、1mg/ml と 5mg/ml の濃度について検討を行った。非治療群と比較して、5mg/ml では飲水量の減少を認めたが、1mg/ml では飲水量の減少は認めなかった。また、糖尿病患者におけるメトホルミンの内服量は750mg/日から1500mg/日が標準的な量であるが、血中濃度の推移に関する検討にて、マウスにおける1mg/ml の摂取はヒトにおける750mg/日の内服量に相当することが報告されている(29)ことから、メトホルミン1mg/ml を採用した。

図2 治療プロトコール



本研究におけるすべての動物実験は自治医科大学動物実験規定（平成22年規定第51号）に従って施行し、自治医科大学動物実験委員会による承認（承認番号 19035-01）を受けた上で施行した。

2-3 脾臓細胞の単細胞処理

イソフルランを用いた深麻酔にて犠牲死させた後、正中切開にて開腹した。下大静脈から血液を 1ml ほど採取後に脾臓を摘出し、5 %FBS 含有 PBS 中に氷上で 1 時間以内に脾臓細胞の単細胞処理を行った。脾臓周囲の組織を除去した後、5ml シリンジの内筒を用いて脾臓を破砕した。5%FBS 含有 PBS 中に脾臓細胞を懸濁し、70 μ m メッシュにて細胞懸濁液を濾過することにより、脾臓細胞を回収した。回収した脾臓細胞は RBC Lysis buffer を用いて 4°Cにて 5 分間、溶血処理を行った。5%FBS 含有 PBS にて 2 回洗浄することにより Lysis buffer を中和したのち、細胞数のカウントを行った。

2-4 血液細胞の分離、溶血処理

血液細胞の凝集を防ぐため 0.1ml のクエン酸含有 PBS を 1ml のインスリン用の注射筒に吸引しておき、マウスを深麻酔にて犠牲死させたのち、この注射筒にて、下大静脈から 1ml の採血を行なった。採取した血液は 1.5ml のマイクロチューブに移し、室温に 1 時間ほど静置した。5000rpm で 10 分間遠心を行い、血球成分を回収した。採血量と等量の 2 × 溶血剤を添加し、室温で 5 分間静置したのち、PBS（添加剤なし）を 9ml 添加し混合した。室温にて 2000rpm で 5 分遠心を行い、上清を除去した。この操作を 2 回繰り返すことにより赤血球の

溶血を行った後、5%FBS含有PBSを用いて2回洗浄し細胞数のカウントを行った。

2-5 フローサイトメトリーによる解析のための脾臓細胞・血液細胞の表面抗原の染色方法

得られた細胞は、FVS780あるいはFVS700を用いて室温にて15分間処理して死細胞の染色を行った。5%FBS含有PBSにて2回洗浄を行い、非特異的結合を防ぐためにFcR Blocking 試薬(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を添加し、4℃にて10分間反応させた。表1に示した所定の抗体を用いて4℃にて30分間反応させ多重染色を行った。5%FBS含有PBSを用いて2回洗浄した後、Fixation buffer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ USA)を用いて4℃にて20分間静置し細胞固定を行った。BD LSR Fortessa X-20を用いて、表面抗原の発現の測定を行った。フェノタイプの解析は、FlowJo10.6.1 (BD Biosciences)を用いて行った。

表 1. 表面抗原の染色パネル

T 細胞における PD-1 発現の測定に用いた抗体（脾臓細胞）

	BV421	FITC	PE	APC	APC/Fire750	死細胞
抗体	PD-1	CD4	CD8a	CD3	CD45	FVS700
Clone	29F.1A12	GK1.5	53-6.7	17A2	30-F11	
会社	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BD

NK 細胞と B 細胞の表面抗原の測定に用いた抗体（脾臓細胞）

	Pacific blue	FITC	PE	APC	Dead cell
抗体	CD45	CD49b	CD19	CD335	FVS780
Clone	29F.1A12	DX5	6D5	29A1.4	
会社	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BD

MDSC と樹状細胞の表面抗原の測定に用いた抗体（脾臓細胞）

	BV421	FITC	PE	APC	Dead cell
抗体	Gr-1	Ly6c	CD11c	CD11b	FVS780
Clone	RB6-8C5	HK1.4	N418	M1/70	
会社	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BD

MDSC と monocyte の表面抗原の測定に用いた抗体（血液細胞）

	BV421	FITC	PE	APC	Dead cell
抗体	Gr-1	Ly6c	CX3CR1	CD11b	FVS780
Clone	RB6-8C5	HK1.4	SA011F11	M1/70	
会社	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BD

2-6 脾臓細胞の IFN- γ 産生能の測定と細胞内染色方法

脾臓細胞に刺激を加えて IFN- γ の産生を誘導すると同時に IFN- γ の細胞外への分泌を抑制するため、終濃度 50ng/ml の PMA (FUJIFILM, Osaka, Japan)、終濃度 1 μ g/ml のイオノマイシン (FUJIFILM, Osaka, Japan) および終濃度 5 μ g/ml のブレフェドリン A (BioLegend, San Diego, CA USA、Golgi stop 試薬) を添加した RPMI-1640 の培養液中にて、37°C にて 4 時間培養した。その後、EDTA 含有 PBS を用いて細胞を回収し 5%FBS 含有 PBS で 3 回洗浄した。回収した脾臓細胞は FVS780 を添加した PBS 中で室温にて 15 分間反応させ死細胞の染色を行い、5 %FBS 含有 PBS で 2 回洗浄した後、FcR Blocking 試薬を添加し 4°C にて 10 分間反応させた。表 2 の抗体を用いて 4°C にて 30 分間反応させ、表面抗原の多重染色を行った。5 %FBS 含有 PBS で 2 回細胞を洗浄後、fixation and permeabilization solution (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA) で 4°C、20 分処理し、細胞膜の固定と膜透過を行なった。1 \times perm wash buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA) で 2 回洗浄した後、抗 IFN- γ 抗体を添加し室温にて 40 分間反応させ、2 回洗浄した後、BD LSR Fortessa X-20 を用いて IFN- γ の発現を測定した。FlowJo10.6.1 を用いて IFN- γ 産生細胞の割合の解析を行なった。

表 2. T 細胞における IFN- γ 産生能の測定に用いた抗体

	BV421	FITC	PE	APC	Dead cell
抗体	CD4	CD8a	IFN- γ	CD3	FVS780
Clone	GK1.5	53-6.7	XMG1.2	17A2	
会社	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BD

2-7 脾臓細胞の抗 FoxP3 抗体を用いた細胞内染色方法

得られた脾臓細胞を Zombie UV 染色液と室温にて 15 分間反応させ、死細胞の染色を行なった。染色した細胞は 5 %FBS 含有 PBS で 2 回洗浄を行った。FcR Blocking 試薬を添加し、4°Cにて 10 分間反応させた後、表 3 の抗体を用いて 4°Cにて 30 分間反応させ、表面抗原の多重染色を行った。5 %FBS 含有 PBS で 2 回洗浄後に True-Nuclear Transcription Factor Buffer set (BioLegend, San Diego, CA USA) を用いて室温にて 60 分間処理し、細胞固定と膜透過処理を行った。1 ×perm buffer にて 2 回洗浄した後、抗 FoxP3 抗体を添加し室温にて 40 分間反応させた。1 ×perm buffer にて 2 回洗浄した後、5 %FBS 含有 PBS 中に細胞を懸濁し、BD LSR Fortessa X-20 用いて FoxP3 陽性 CD25 陽性 T 細胞の割合を測定した。得られたデータは FlowJo10.6.1 を用いて解析を行った。

表 3. T 細胞における FoxP3 の発現の測定に用いた抗体

	BV421	FITC	PE	APC	APC/Fire750	BV785	Dead cell
抗体	FoxP3	CD4	CD8a	CD3	CD25	CD45	Zombie
Clone	MF-14	GK1.5	53-6.7	17A2	PC61	30-F11	
会社	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend	BioLegend

2-8 肺の組織標本の作成方法と免疫組織化学染色

28 日目にマウスを犠牲死させた後、4%ホルマリンを気管より肺の中へ注入することにより内固定を行った。その後、肺を胸郭ごと摘出し、一晩ホルマリン溶液中に浸漬し固定を行った。周囲の胸郭を除去し、肉眼的に確認できる肺転移の個数を計測し、パラフィン包埋を行った。パラフィンブロックより 4 μ m の厚みでスライスした組織切片を貼付したスライドガラスを作成し、免疫組織化学染色を行った。キシレンとエタノールで脱パラフィン後に、メタノールと 30%過酸化水素水を 100:1 の割合で混合した溶液に室温にて 15 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼの除去を行った。流水で 5 分間、PBS で 3 分間洗浄した後、クエン酸緩衝液（武藤化学株式会社、東京、日本）中でマイクロウェーブ処理を行うことにより抗原賦活化を行った。室温にて 10 分静置し冷却した後、PBS-T を用いて 2 回、5 分間洗浄を行った。湿潤箱中にスライドガラスを静置し、5%BSA 含有 PBS-T またはブロッキングワゴン Histo（ナカライテスク、京都、日本）でブロッキング後、一次抗体溶液を添加し 4°Cにて一晩反応させた。抗 CD8a モノクローナル抗体(4SM15, Rat IgG2a, Invitrogen, Santa Clara, USA)は 1:100 の濃度で、抗 Ly-6G/Ly-6c モノクローナル抗体(RB6-8C5, Rat IgG2b, Invitrogen, Santa Clara, USA)は 1:50 の濃度で、抗 NCR1 抗体 (CD335)(EPR23097-35, Rabbit IgG, Abcam, Cambridge, UK))は 1:500 の濃度

で使用した。翌日切片ののったスライドを PBS-T で 2 回洗浄した後、抗ラット二次抗体（または抗ウサギ二次抗体）とペルオキシダーゼが結合した polymer を添加し室温にて 30 分間反応させた。いずれも Dako REAL EnVision Detection System (Dako, Denmark) を用いて DAB による発色を行った。対比染色にはマイヤーのヘマトキシリンを用い、脱水・透徹後マリノールで封入した。得られた標本において、ランダムに選択した 5 箇所肺転移巣に対して ImageJ を用いて腫瘍面積を計測し、その中に浸潤している免疫細胞数をカウントし、腫瘍内細胞密度を算出した。

2-9 統計学的解析

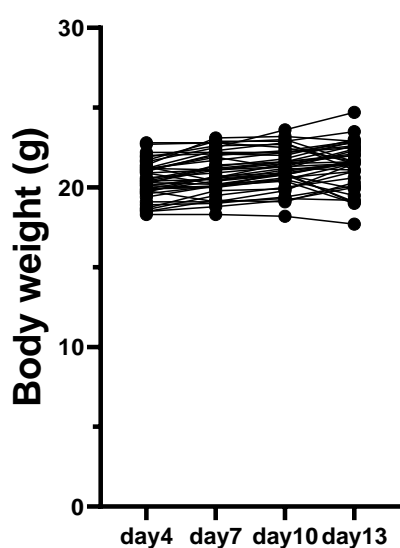
数値データは、平均値±標準偏差、または中央値（最小値—最大値）で表記した。統計解析を行うにあたり、独立 2 群間の比較には、Student の t 検定または Mann-Whitney 検定を、3 群間以上の比較には、Kruskal-Wallis 検定を用いた。相関関係の比較は、線形単回帰分析を用いた。統計解析ソフト GraphPad Prism 8(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて解析を行い、P 値<0.05 を統計学的に有意差があると判断した。

第3章 結果

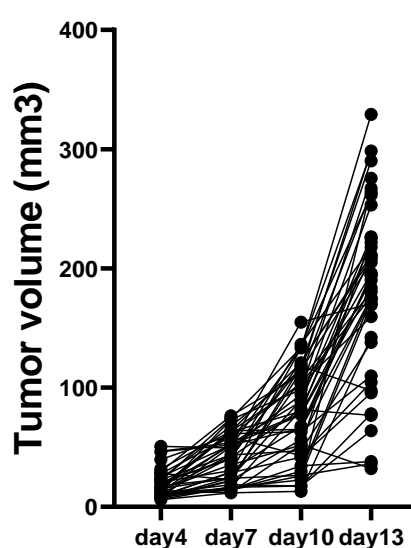
3-1 皮下腫瘍の体積、飲水量、体重の変化の推移

マウスに LuM1 を皮下注射してから、7 日目ごろより皮下腫瘍が確認できるようになり、13 日目に腫瘍体積が 100~300mm³ にまで増大した。13 日目までの間に個体間で体重の変化に違いを認めなかった(図 3)。腫瘍体積の変化の時間経過を図 4 に示した。腫瘍体積にばらつきを認めたため、この時点で腫瘍体積に偏りが出ないように、非治療群、メトホルミン投与群、放射線照射群、放射線照射/メトホルミン投与併用群の 4 群に振り分けた。1 群に対し 5 匹を割り当て 1 回の実験に 20 匹を使用した。同様の実験を 2 回行い、各群 n=10 での結果を示した。

(図 3) 治療開始前の体重の推移

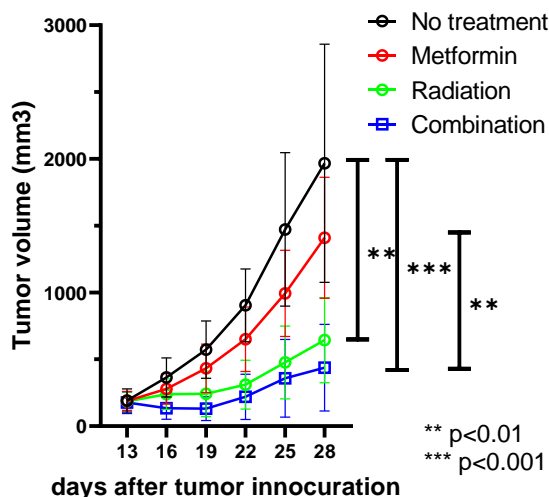


(図 4) 治療開始前の腫瘍径の推移

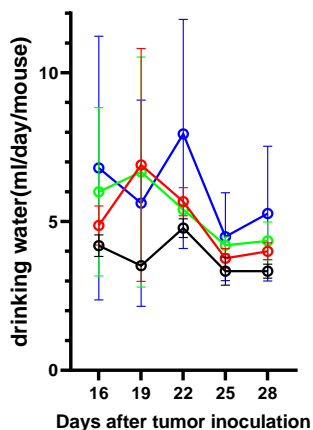


皮下腫瘍の体積は、非治療群と比較して放射線照射群で有意に抑制されていた(非治療群 vs 放射線照射群 $1966.2 \pm 891.0\text{mm}^3$ vs $643.3 \pm 318.0\text{mm}^3$, $p=0.0011$)。放射線照射にメトホルミンを併用することにより皮下腫瘍の体積はさらに抑制されていた(非治療群 vs 放射線照射メトホルミン投与併用群 $1966.2 \pm 891.0\text{mm}^3$ vs $437.7 \pm 323.8\text{mm}^3$, $p<0.0001$)(図 5)。飲水量および体重の変化に関して、4 群間で有意な差は認めなかった(図 6、7)。

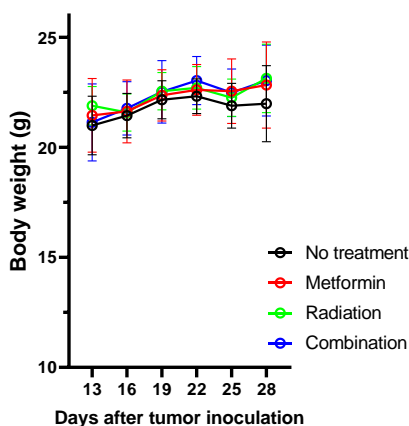
(図 5)
腫瘍径の推移



(図 6) 飲水量



(図 7) 体重の推移



3-2 皮下腫瘍の重さおよび肺転移結節数の比較

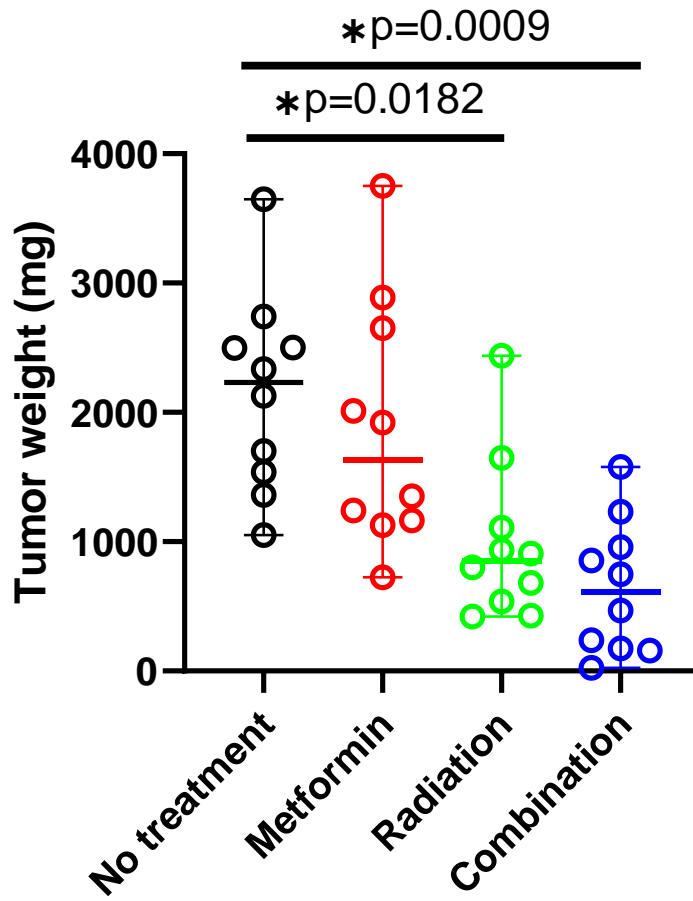
3-2-1 皮下腫瘍の重さの検討

メトホルミン投与群は、非治療群と比較して腫瘍の重さに有意差を認めなかったが、放射線照射群では非治療群と比較して皮下腫瘍の重さは減少していたが（非治療群 vs 放射線照射群 $2151.1 \pm 765.4\text{mg}$ vs $990.5 \pm 625.7\text{mg}$; $p = 0.0182$ ）、放射線照射にメトホルミンを併用することにより皮下腫瘍の重さはさらに減少していた。（非治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群 $2151.1 \pm 765.4\text{mg}$ vs $643.6 \pm 517.7\text{mg}$; $p=0.0009$ ）(図 9)。

(図 8) 皮下腫瘍



(図 9) 皮下腫瘍の重さ



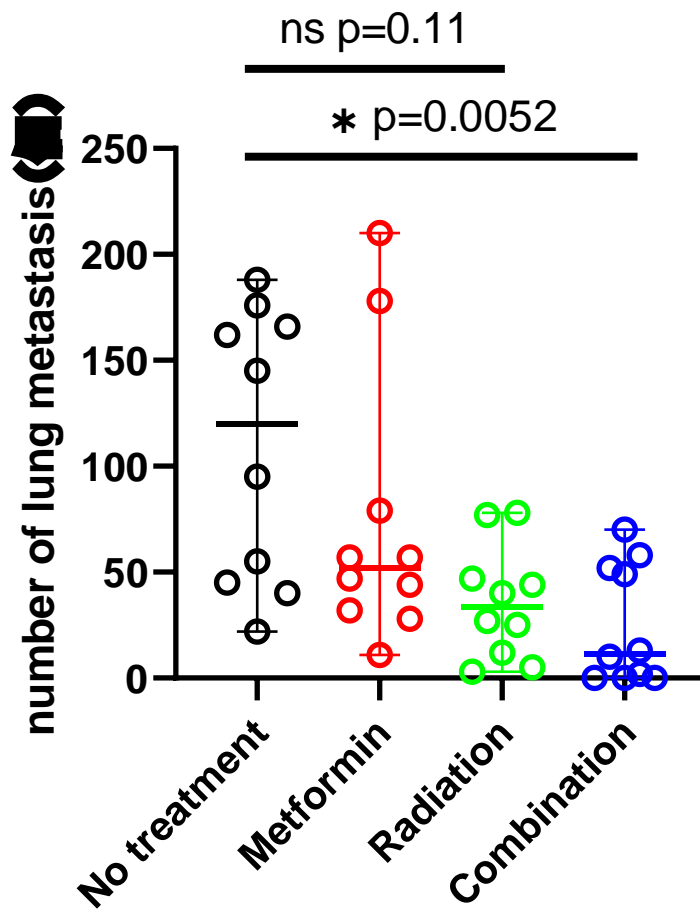
3-2-2 肺転移結節数の検討

放射線照射単独群は、非治療群と比較して肺転移結節数はやや減少しているものの、有意差は認めなかった(非治療群 vs 放射線照射群 109.4 ± 64.7 (個) vs 35.8 ± 26.8 (個); $p=0.11$)。これに対し、放射線照射/メトホルミン投与併用群では、放射線照射単独群よりも肺転移結節数が減少し、非治療群との間に有意差を認めた(非治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群 109.4 ± 64.7 (個) vs 25.4 ± 28.3 (個) ; $p=0.018$)(図 11)。

(図 10) 肺転移結節



(图 12) 肺转移结节数



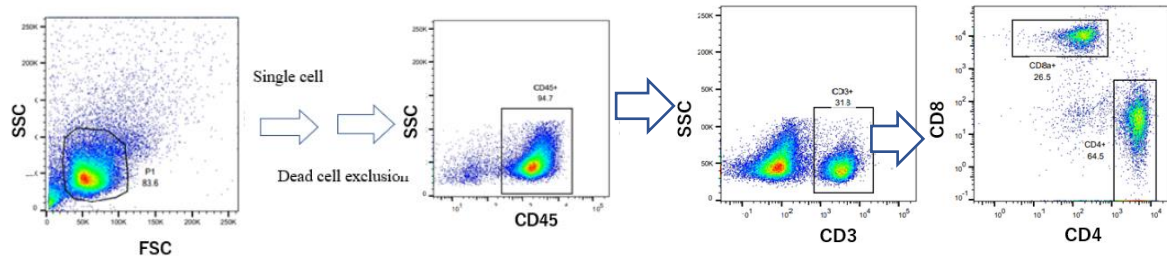
3-3 各治療群間での脾臓中の免疫細胞の割合の違いについての検討

28 日目の時点でマウスを犠牲死させた後に、脾臓細胞を単細胞処理し表面抗原の発現についてフローサイトメトリーを用いて測定することにより、4 群間の全身の免疫機能の違いを比較検討した。

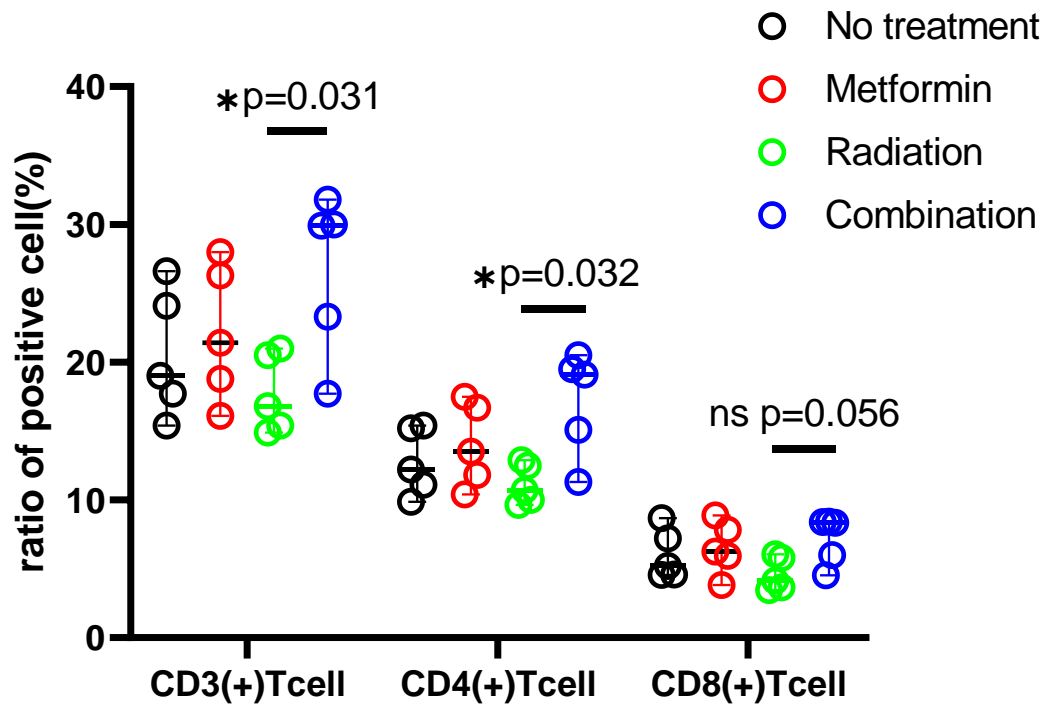
3-3-1 T 細胞についての評価

放射線照射群は非治療群に比べて CD3 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、および CD8 陽性 T 細胞の割合はわずかながら低下する傾向を認めた。これに対し、メトホルミンを併用すると、CD3 陽性 T 細胞と CD4 陽性 T 細胞の割合は放射線照射単独群と比較して、有意に増加していた (CD3 陽性 T 細胞 ; 放射線照射群 vs 放射線照射 / メトホルミン投与併用群 $17.7 \pm 2.9(\%)$ vs $26.5 \pm 5.9(\%)$; $p=0.031$ 、CD4 陽性 T 細胞 ; 放射線照射群 vs 放射線照射 / メトホルミン投与併用群 $11.5 \pm 1.5(\%)$ vs $17.1 \pm 3.8(\%)$; $p=0.032$)。CD8 陽性 T 細胞においても有意差は認めなかったものの同様の傾向を認めた (放射線照射 vs 放射線照射 / メトホルミン投与併用群 $4.6 \pm 1.2(\%)$ vs $7.1 \pm 1.8(\%)$; $p=0.056$)。一方、非治療群と比較すると併用治療群では有意差は認めなかった。(CD3 陽性 T 細胞 ; $20.6 \pm 4.6(\%)$ vs $26.5 \pm 5.9(\%)$; $p=0.17$ 、CD4 陽性 T 細胞 ; $12.8 \pm 2.5(\%)$ vs $17.1 \pm 3.8(\%)$; $p=0.15$ 、CD8 陽性 T 細胞 ; $6.1 \pm 1.8(\%)$ vs $7.1 \pm 1.8(\%)$; $p=0.69$)(図 13)。

(図 13)脾臓中の T 細胞の測定

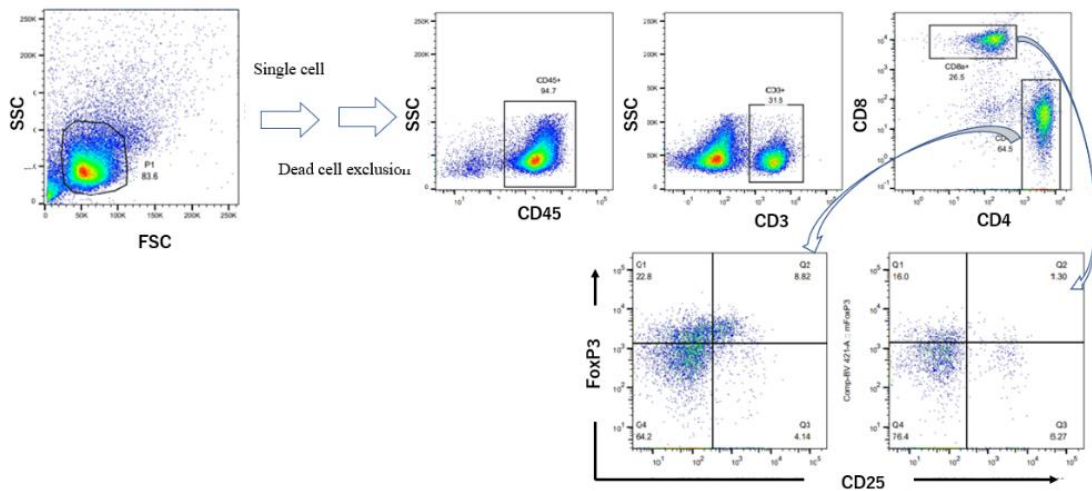


(図 14)

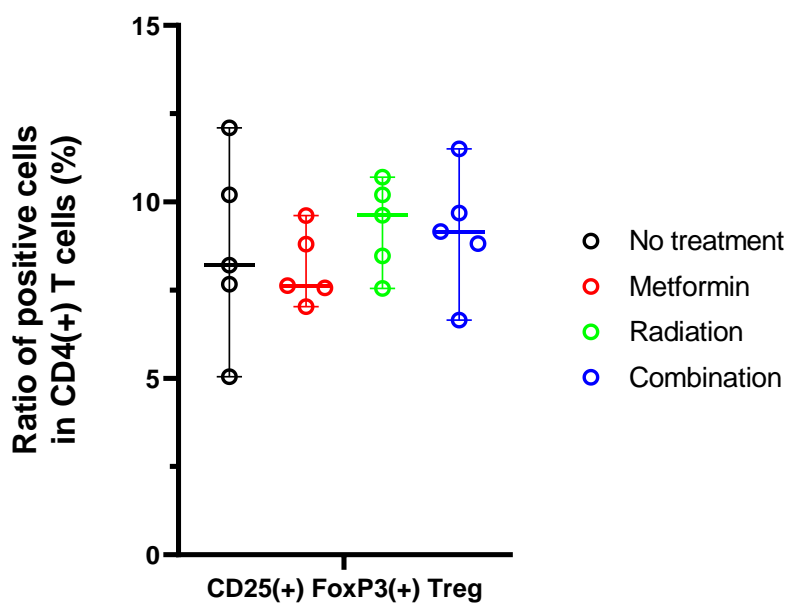


T 細胞の免疫抑制状態に関する評価として、CD4(+)CD25(+)FoxP3(+)の表現型を示す制御性 T 細胞 (Treg) の CD4 陽性 T 細胞中の割合を測定したが、4 群間で有意な差は認めなかった(図 16)。

(図 15) 脾臓中の制御性 T 細胞の測定



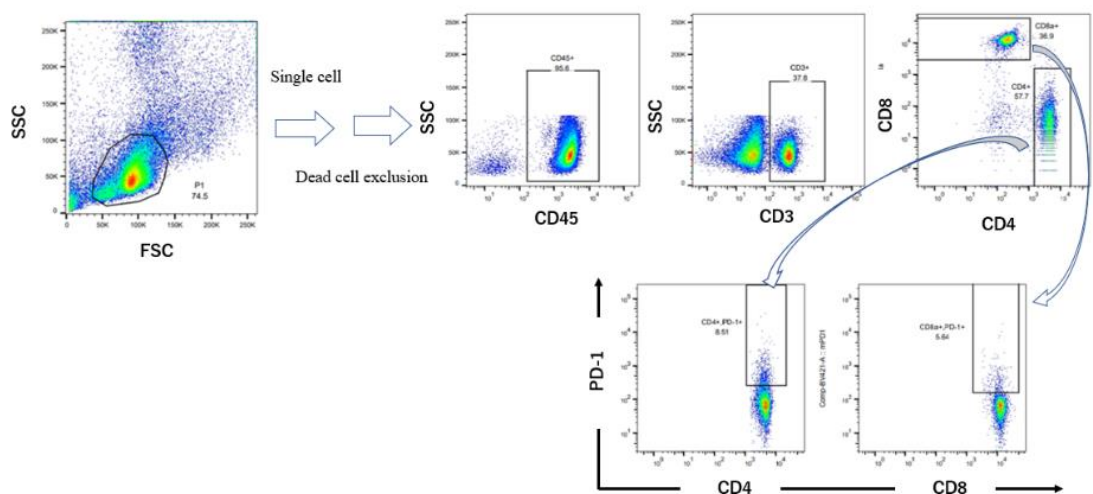
(図 16)



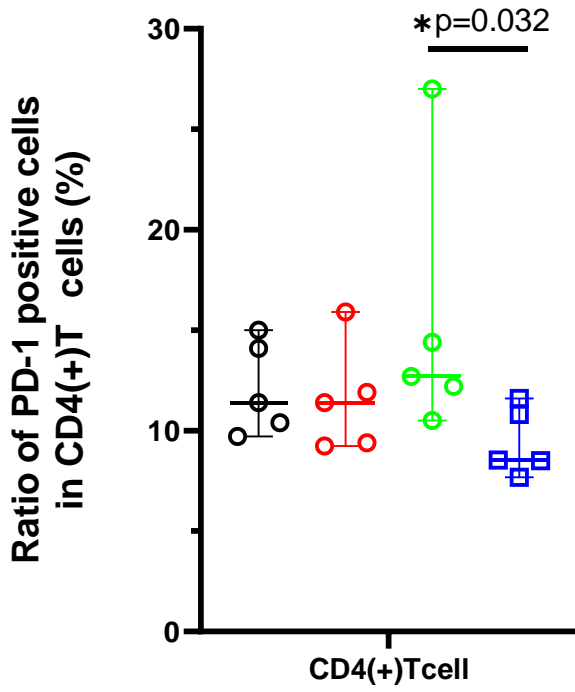
次に、T細胞の疲弊の程度を評価するためPD-1の発現について検討を行った。CD4陽性T細胞のPD-1の発現は、メトホルミン群、放射線照射群では非治療群と比較して変化は認めなかったが、放射線照射／メトホルミン投与併用群では放射線照射単独群と比べて有意に低下していた(放射線照射群 vs 放射線照射／メトホルミン投与併用群 15.4 ± 6.7 vs 9.4 ± 1.7 (%); $p=0.032$)(図18)。

同様の傾向はCD8陽性T細胞でも認められた(放射線照射群 vs 放射線照射／メトホルミン投与併用群 5.4 ± 1.0 (%) vs 4.2 ± 0.8 (%); $p=0.15$)(図19)。

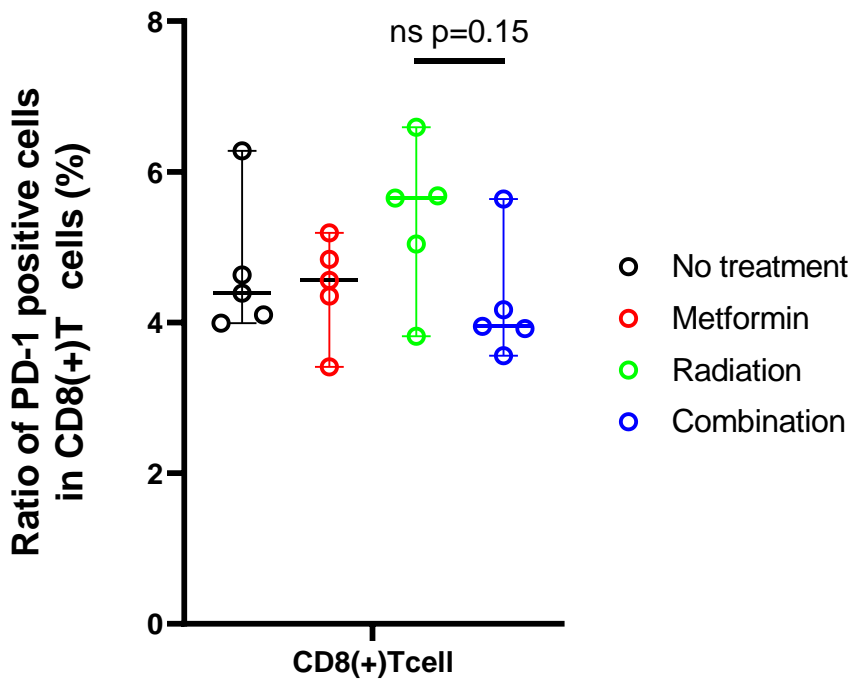
(図17) 脾臓中のCD4T細胞、CD8T細胞におけるPD-1発現の測定



(图 18)

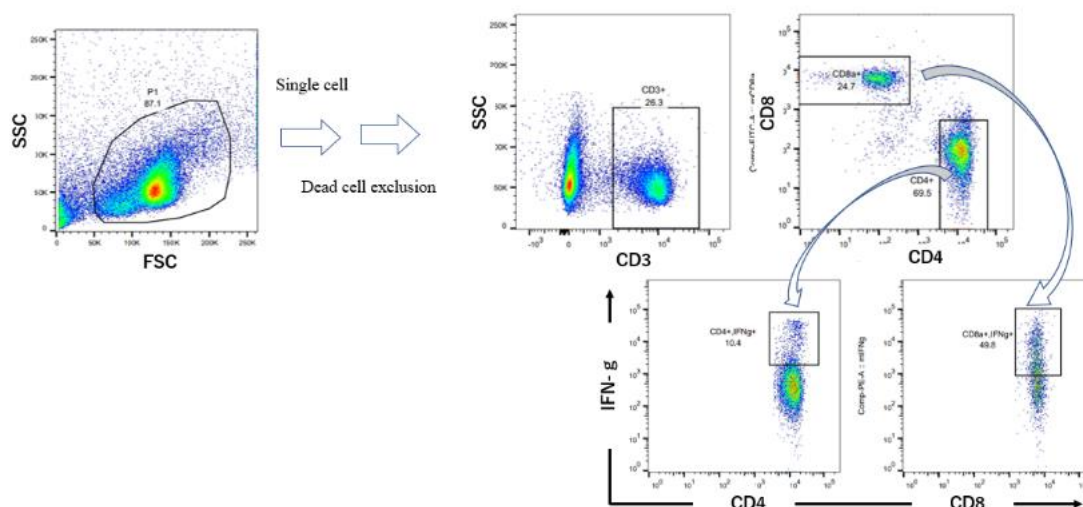


(图 19)

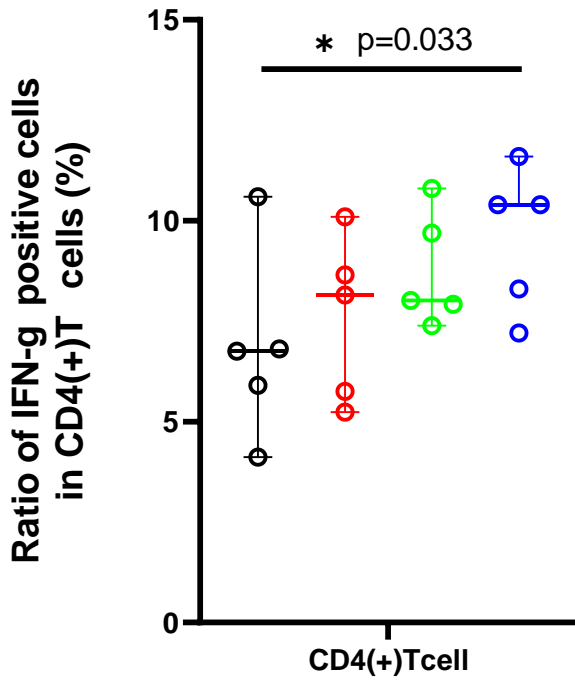


最後に、単細胞化した脾臓細胞を PMA とイオノマイシンで刺激した状態で 4 時間培養を行い、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ 産生能を検討し、T 細胞の疲弊度の評価を行った。IFN- γ 産生細胞の割合は、CD8 陽性 T 細胞において非治療群と比較して、メトホルミン投与群で有意に増加していた (CD8 陽性 T 細胞；非治療群 vs メトホルミン投与群 $24.1 \pm 3.6(\%)$ vs $34.3 \pm 3.5(\%)$ ； $p=0.008$)。また、放射線照射／メトホルミン投与併用群では非治療群と比較して CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の両方において有意に増加していた (CD4 陽性 T 細胞；非治療群 vs 放射線照射／メトホルミン投与併用群 $6.8 \pm 2.4(\%)$ vs $9.6 \pm 1.8(\%)$ ； $p=0.033$) (図 21) (CD8 陽性 T 細胞；非治療群 vs 放射線照射／メトホルミン投与併用群 $24.1 \pm 3.6(\%)$ vs $37.6 \pm 10.0(\%)$ ； $p=0.0096$) (図 22)。

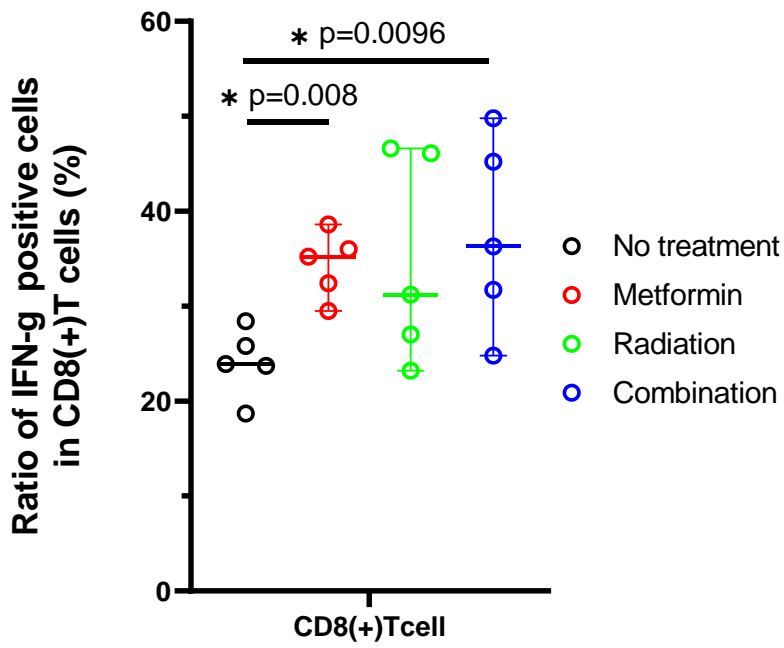
(図 20) CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の測定



(图 21)



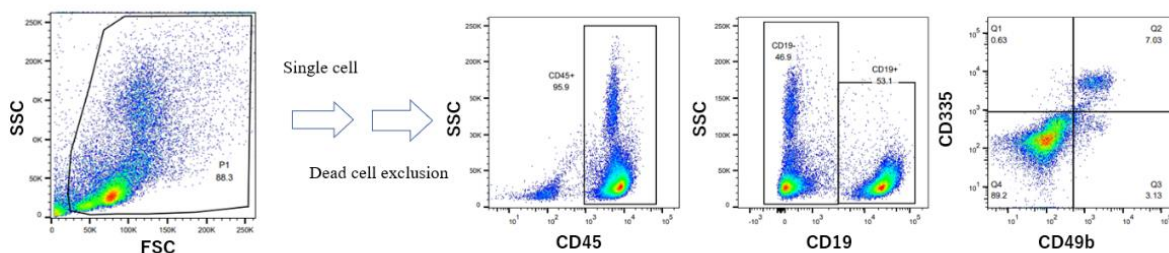
(图 22)



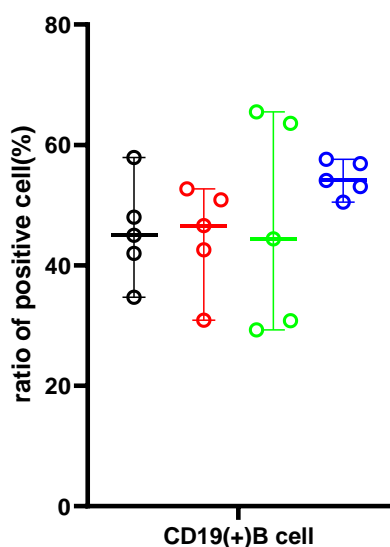
3-3-2 B細胞、NK細胞の評価

CD19(+)の表現型を示すB細胞の割合について比較したが、4群間で有意差は認めなかった(図24)。CD49b(+)CD335(+)の表現型を示す活性型NK細胞の割合は、放射線照射/メトホルミン投与併用群が非治療群と比較して有意に増加していた(非治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群 $1.1 \pm 0.2(\%)$ vs $2.8 \pm 1.0(\%)$; $p=0.032$)(図25)。

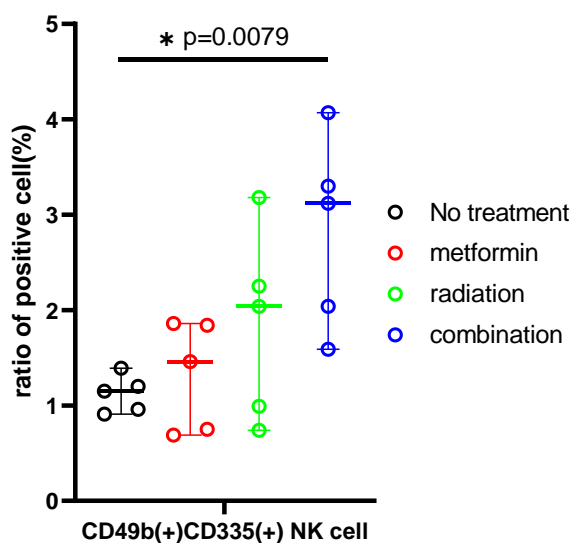
(図23) 脾臓中のB細胞及びNK細胞の表面抗原の測定



(図24)



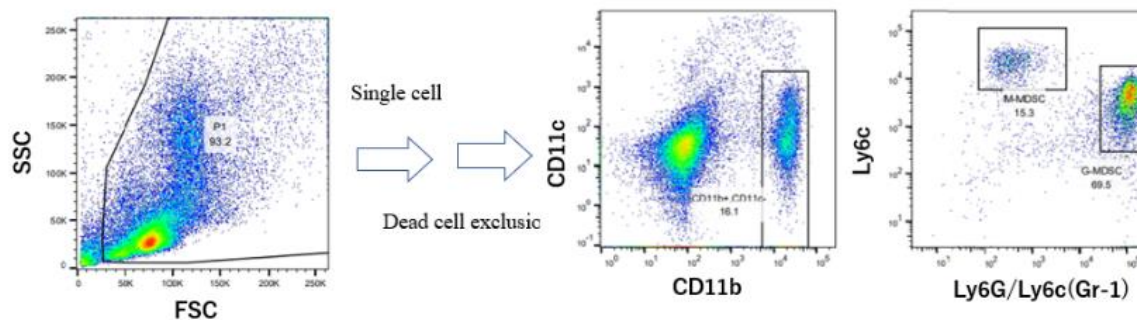
(図25)



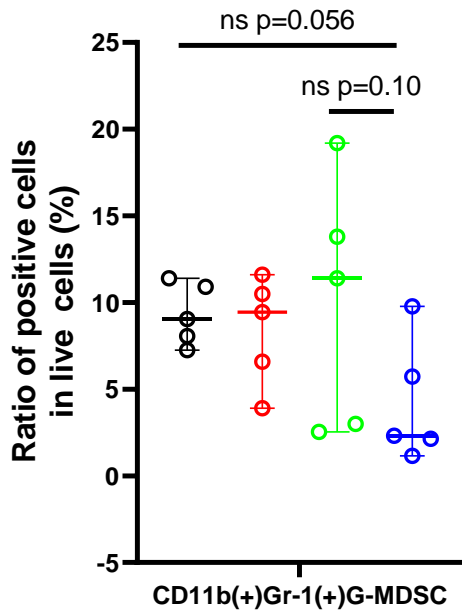
3-3-3 骨髓球系細胞についての評価

CD11b(+)Gr-1(+)の表現型を示す G-MDSC の割合については、4 群間で有意差を認めなかったが、放射線照射／メトホルミン投与併用群は、非治療群、放射線照射群と比較して減少する傾向を示した(非治療群 vs 放射線照射／メトホルミン投与併用群 $9.3 \pm 1.8(\%)$ vs $4.2 \pm 3.6(\%)$; $p=0.056$, 放射線照射群 vs 放射線照射／メトホルミン投与併用群 $10.0 \pm 7.2(\%)$ vs $4.2 \pm 3.6(\%)$; $p=0.10$)(図 27)。CD11b(+)Ly6C(+)Gr-1(-)の表現型を示す M-MDSC、CD11c(+)の表現型を示す樹状細胞の割合については 4 群間で有意差を認めなかった(図 28, 29)。

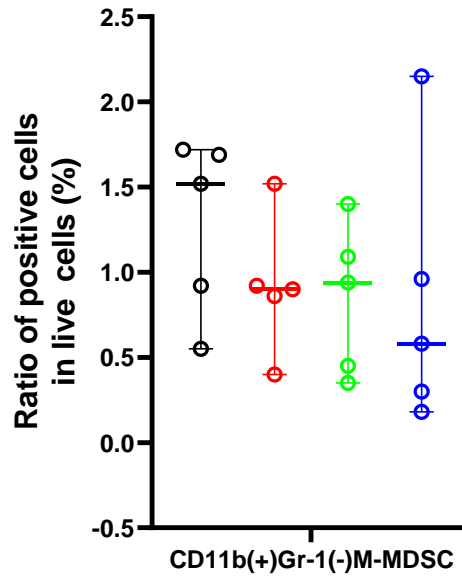
(図 26) 脾臓中の骨髓球系細胞の表面抗原の測定



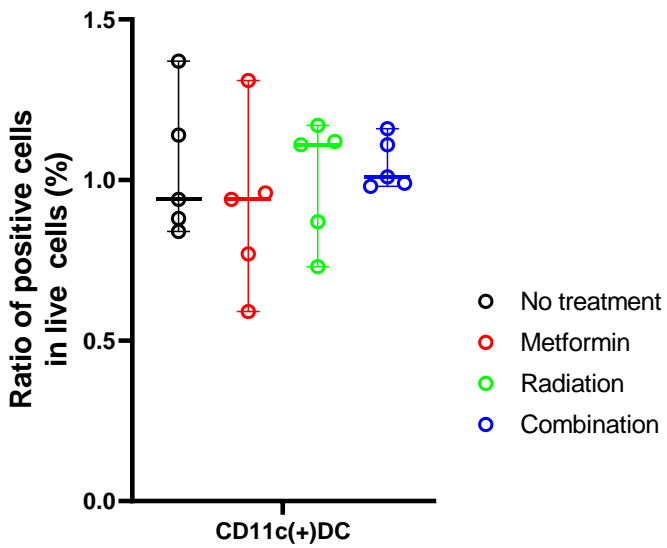
(图 27)



(图 28)



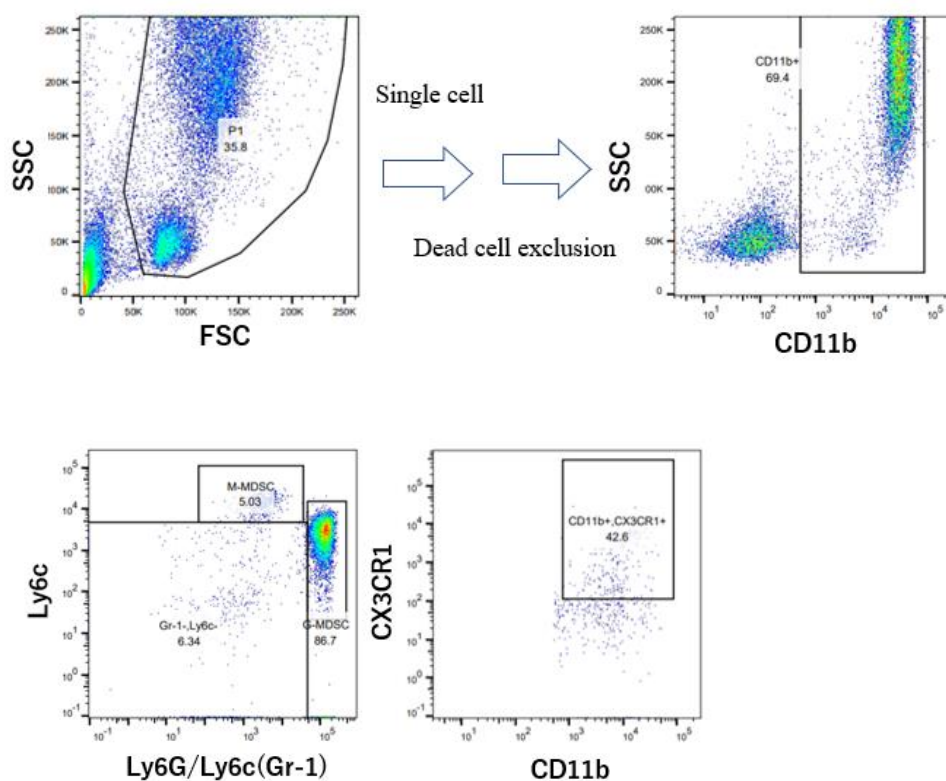
(图 29)



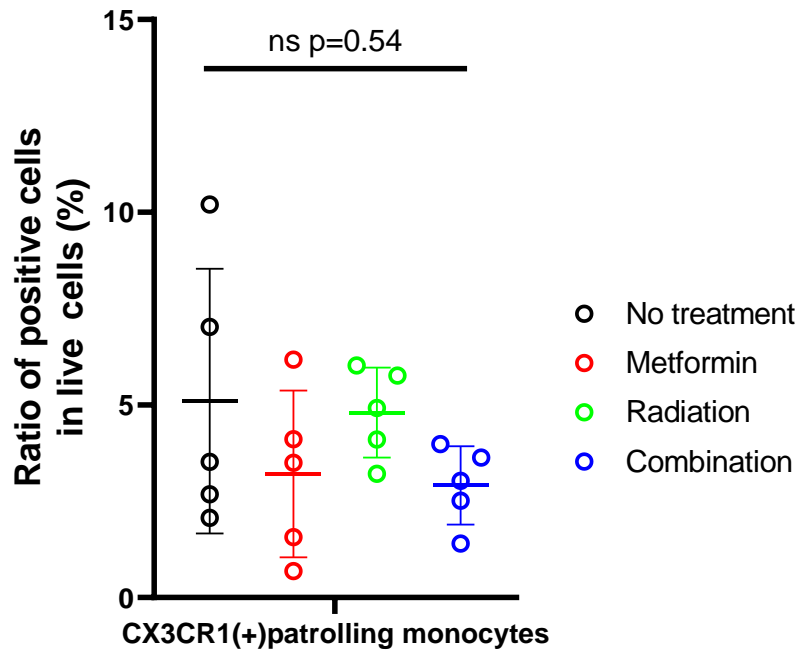
3-4 末梢血液中における単球の評価

CD11b(+)が陽性となる骨髄球系の細胞の中で Gr-1(-)Ly6c(-)CX3CR1(+)の表現型を示す細胞は、循環血液中に長く止まり、血管内で異物を認識して排除する役割を有しており patrolling monocyte と定義されている(30)。この細胞は、腫瘍細胞を貪食し、NK 細胞を誘導する事が報告されているため(31)、血液中の patrolling monocyte の割合について追加で比較検討を行ったが、4 群間で有意な差は認めなかった(図 31)。

(図 30) 血液中の patrolling monocyte の表面抗原の測定



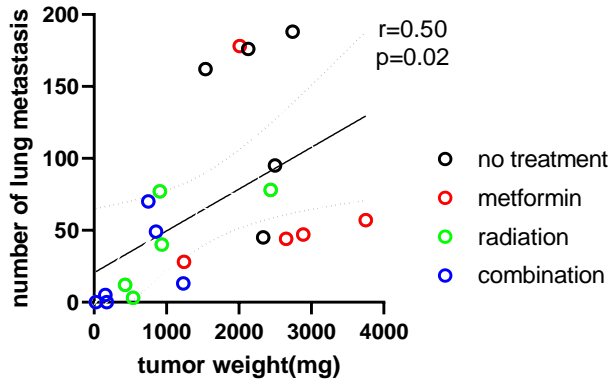
(图 31)



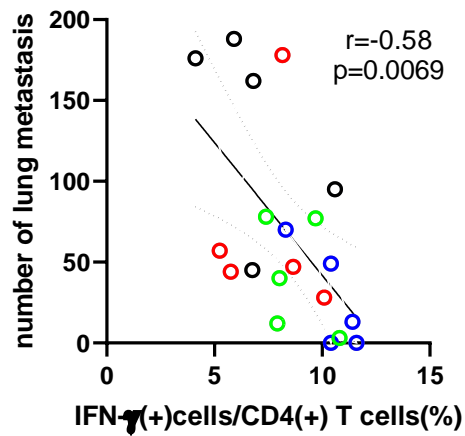
3-5 脾臓中の免疫細胞と肺転移結節数の相関

免疫細胞が肺転移に与える影響を調査するために、調査した全マウスにおいて脾臓中の免疫細胞の割合と肺転移結節数の間の相関について検討を行った。皮下腫瘍の重さと肺転移結節数には、正の相関を認めた($r=0.50$, $p=0.02$)(図 32)。CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞中の IFN- γ 産生細胞の割合と肺転移結節数の間には負の相関を認めた (CD4 陽性 T 細胞 : $r=-0.58$, $p=0.0069$ 、CD8 陽性 T 細胞 : $r=-0.63$, $p=0.0029$)(図 33、図 34)。また、CD49b(+)/CD335(+)⁺の活性化型 NK 細胞と肺転移結節数の間にも同様に負の相関を認めた ($r=-0.69$, $p=0.0006$)(図 35)。

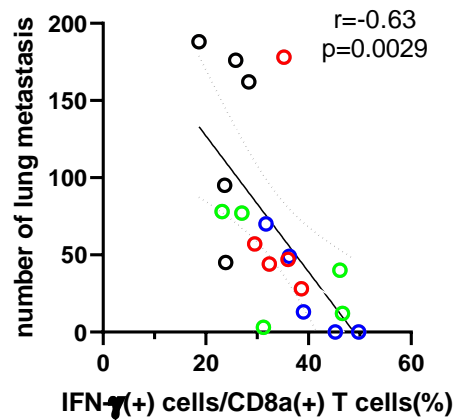
(图 32)



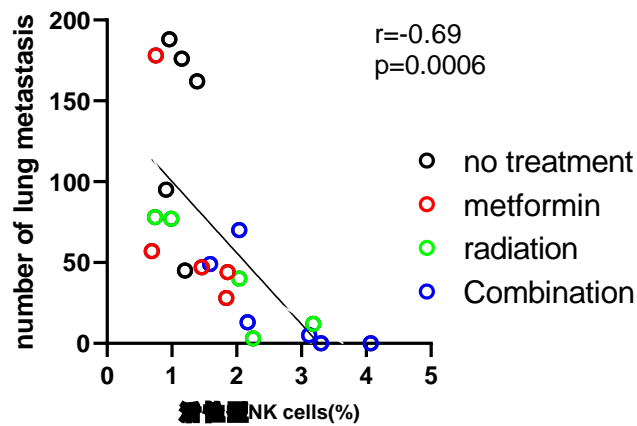
(图 33)



(图 34)



(图 35)

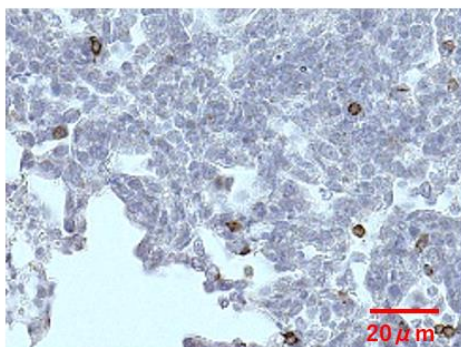


3-6 免疫組織化学染色を用いた肺転移巣内への免疫細胞の浸潤についての検討

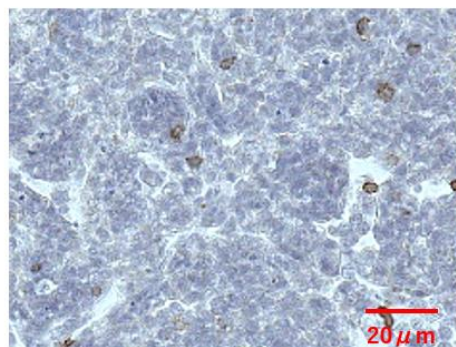
最後に肺転移巣内への免疫細胞の浸潤の程度を免疫組織化学染色を用いて検討し、4群間の比較を行った。抗 CD8a 抗体で染色された細胞の数を腫瘍面積で割って得られた CD8a 陽性 T 細胞の密度は、4群間で有意な差は認めなかった。(非治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群 88.0 ± 30.0 (個/mm²) vs 139.1 ± 97.1 (個/mm²) ; p=0.78)(図 37)

(図 36) 抗 CD8a 抗体の肺転移巣の免疫組織化学染色

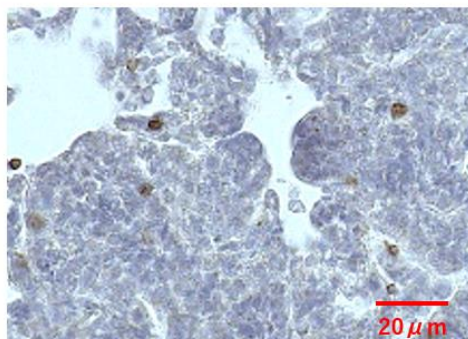
非治療群



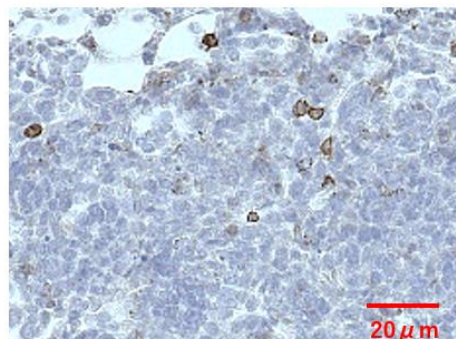
メトホルミン群



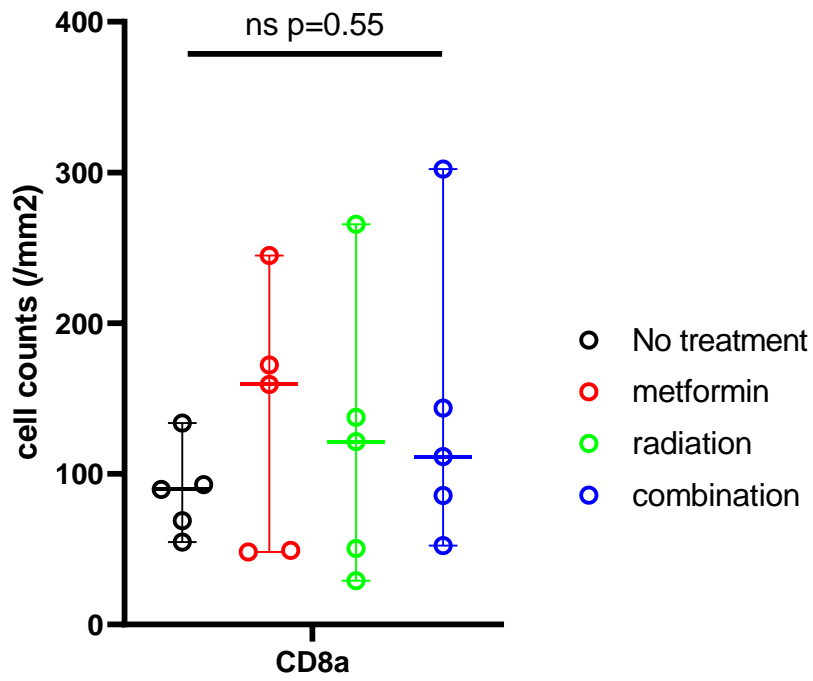
放射線照射群



放射線照射/メトホルミン投与併用群



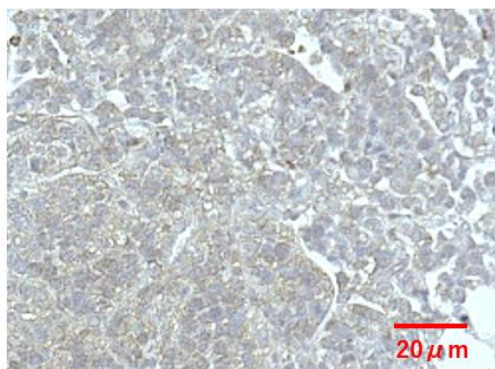
(图 37)



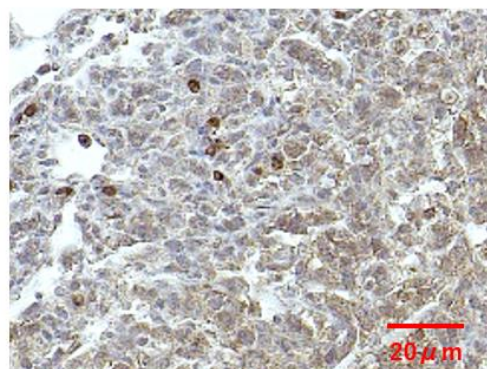
これに対し、抗 NCR1(CD335)抗体で染色される NK 細胞の密度は、放射線治療/メトホルミン投与併用群が非治療群と比較して有意に増加しており、脾臓中の NK 細胞の割合に関する結果と一致した。(非治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群 45.5 ± 47.9 (個/mm²) vs 316.9 ± 175.0 (個/mm²) ; p=0.014)(図 39)

(図 38) 抗 NCR1(CD335)抗体の肺転移巣の免疫組織化学染色

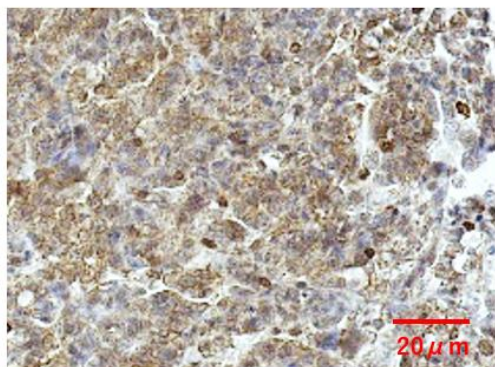
非治療群



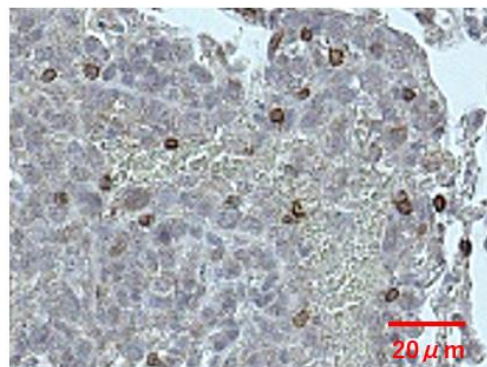
メトホルミン群



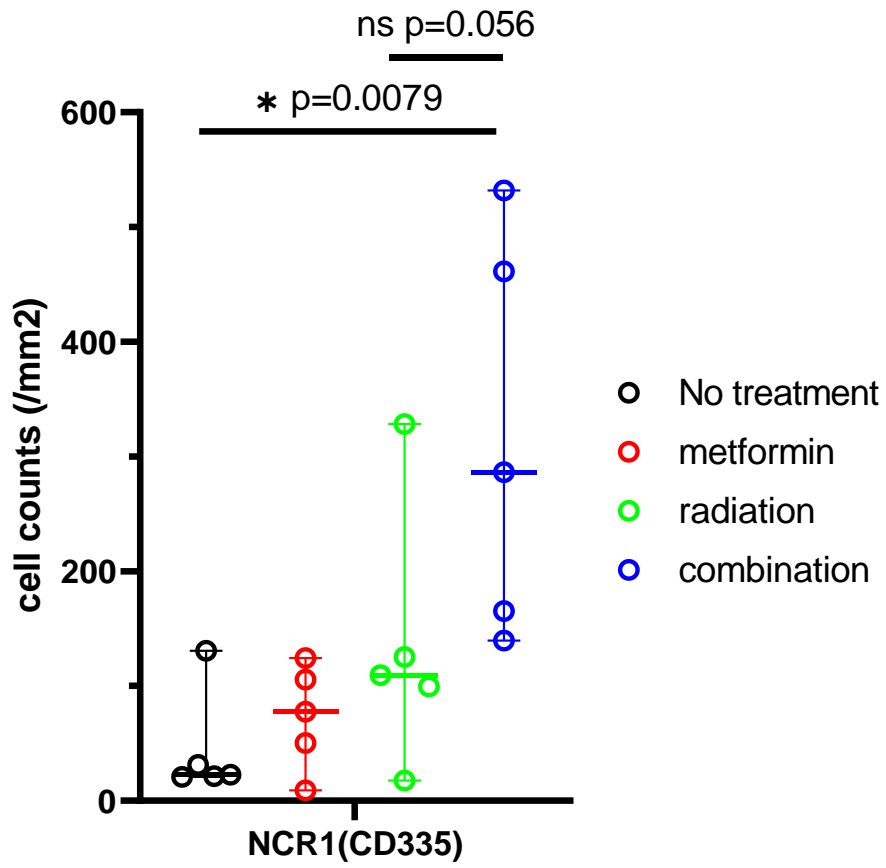
放射線照射群



放射線照射/メトホルミン投与併用群



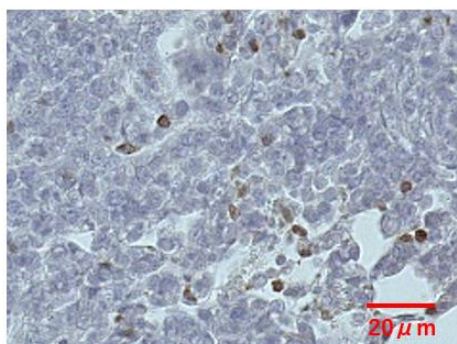
(图 39)



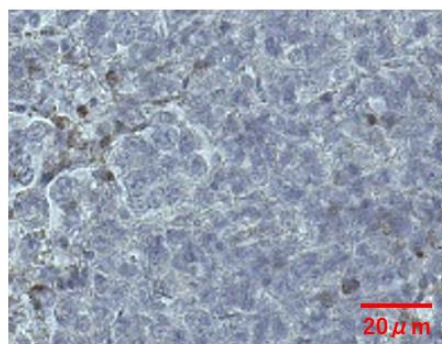
一方、メトホルミン投与群、および放射線照射/メトホルミン投与併用群は非治療群と比較して、肺転移巣における Gr-1 陽性細胞の密度が有意に低下しており（非治療群 vs トホルミン投与群; 246.9 ± 56.8 (個/mm²) vs 159.7 ± 29.4 (個/mm²) ; p=0.032、非治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群; 246.9 ± 56.8 (個/mm²) vs 70.8 ± 54.0 (個/mm²) ; p=0.0046)、放射線照射/メトホルミン投与併用群は放射線治療群と比較しても有意に減少していた（放射線治療群 vs 放射線照射/メトホルミン投与併用群; 197.2 ± 102.0 (個/mm²) vs 70.8 ± 54.0 (個/mm²) ; p=0.016)。(図 41)

(図 40) 抗 Ly6G/Ly6c(Gr-1) 抗体の肺転移巣の免疫組織化学染色

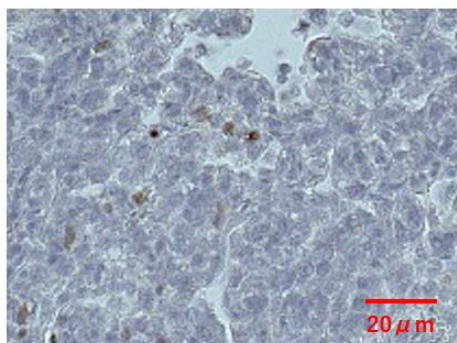
非治療群



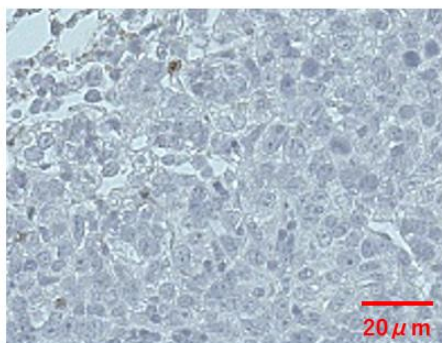
メトホルミン群



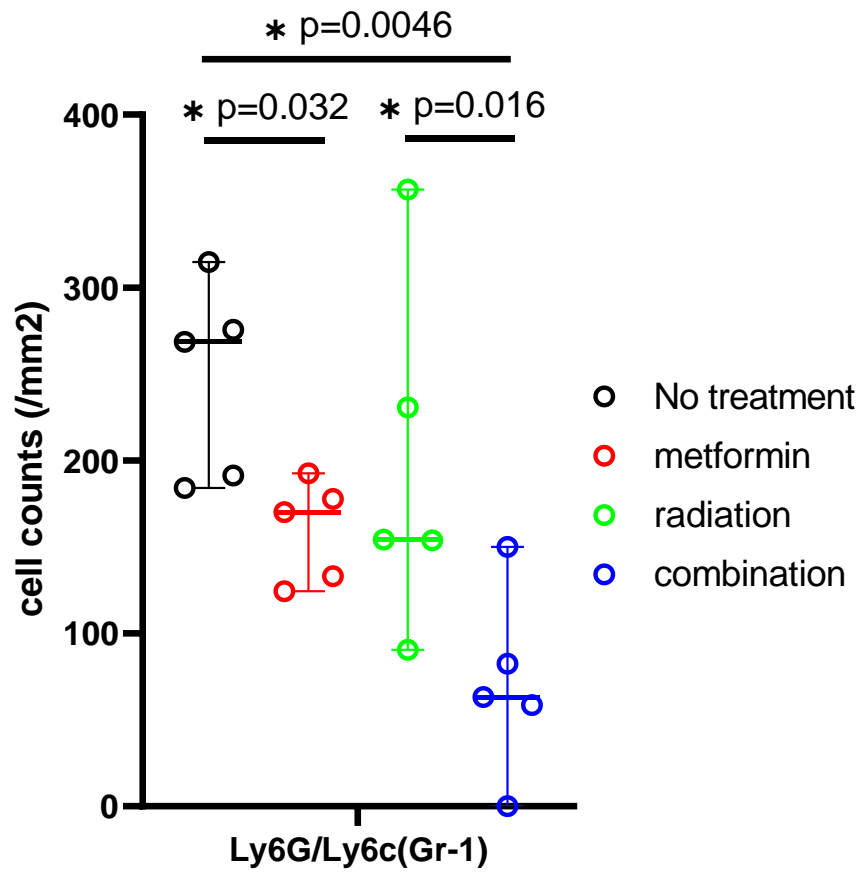
放射線照射群



放射線照射/メトホルミン投与併用群



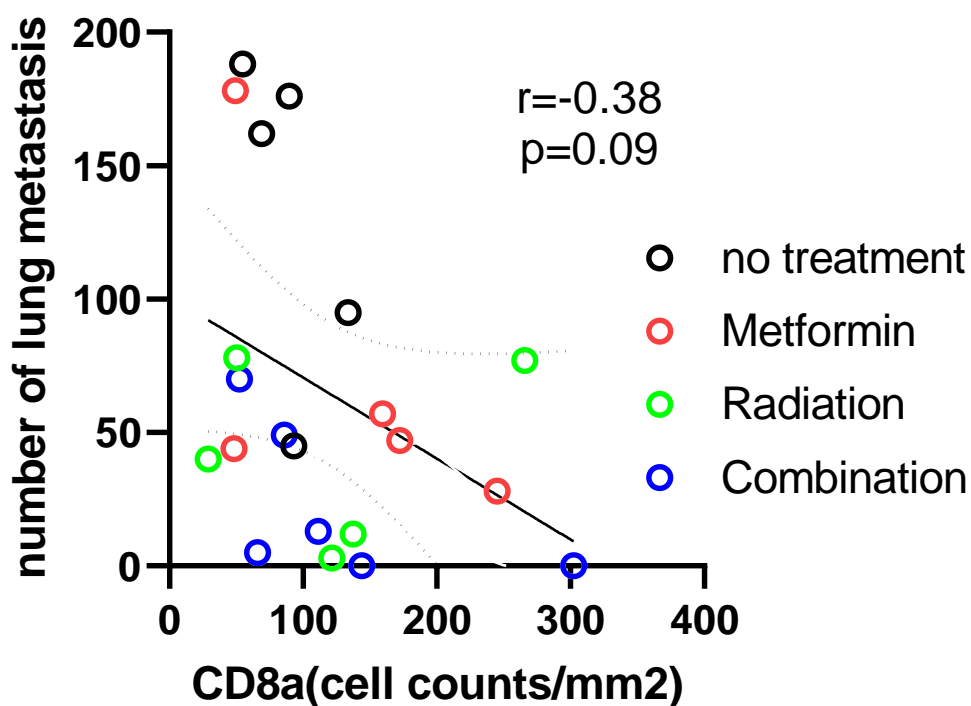
(图 41)



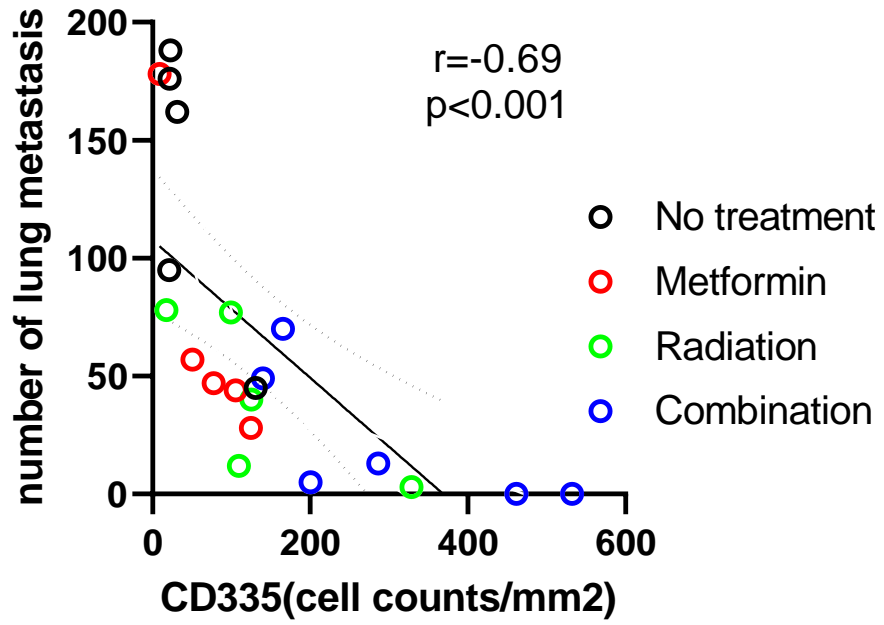
3-7 肺転移巣内へ浸潤する免疫細胞の密度と肺転移結節数の相関

肺転移結節への免疫細胞の浸潤の程度と肺転移結節数との間の相関について検討を行った。CD8a 陽性 T 細胞の密度と肺転移結節数の間には弱い負の相関が存在する傾向を示した($r=-0.38$, $p=0.09$)(図 42)。また、NK 細胞の密度と肺転移結節数との間に強い負の相関を認めた($r=-0.69$, $p<0.001$)(図 43)。一方、Gr-1 陽性細胞の密度と肺転移結節数の間にも弱いながら正の相関を認めた($r=0.49$, $p=0.03$)(図 44)。

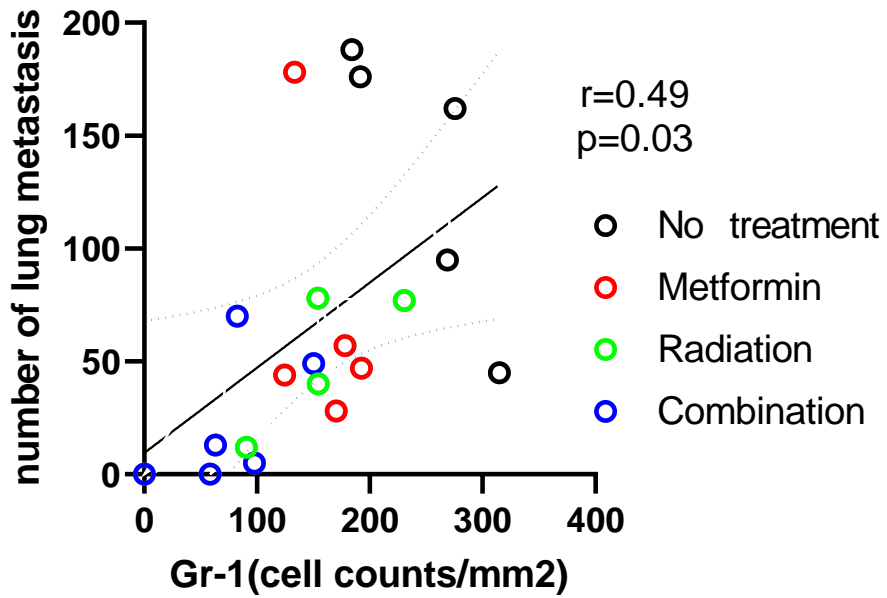
(図 42)



(图 43)



(图 44)



第4章 考察

術前放射線化学療法は、欧米では遠隔転移を伴わない局所進行直腸癌に対する標準的な治療方法となっている(32-34)。本邦では、標準治療として位置づけられるまでには至っていないが、直腸癌術後局所再発のコントロールは重要な課題であり、臨床試験による評価が進められている(2, 35, 36)。放射線療法の主な目的は照射部位における腫瘍の局所コントロールにあるが、照射を受けた腫瘍から腫瘍抗原が放出されることにより惹起される免疫反応が、抗腫瘍効果に大きな影響を与えていることが解ってきた(8, 37)。その一方で、腫瘍に対する放射線照射は、一時的な免疫抑制も同時に引き起こす。これに対し、放射線療法に免疫チェックポイント阻害剤を併用することで腫瘍に対する免疫反応を惹起できる事実が報告され、その臨床的有効性も示唆されてきている(10, 11, 38)。

メトホルミンは、2型糖尿病に対する第一選択薬の一つであるが、さまざまながん種に対する抗腫瘍効果があることが多数報告されている(39-44)。この機序についてはまだ十分に解明されていないが、近年、メトホルミンが宿主の免疫を賦活して抗腫瘍効果を示すことが報告された(25, 45-50)。また、皮下腫瘍への放射線照射にメトホルミン投与を併用すると、癌幹細胞のアポトーシスが誘導され、放射線感受性が高まることも示唆されている(40, 51, 52)。そこで、

本研究では局所の放射線照射にメトホルミン投与を付加すると、抗腫瘍免疫および抗腫瘍効果にどのような変化をもたらすかを動物モデルにて検討した。

正常な免疫能を有するマウスにおける大腸癌の自然肺転移モデルにおいて、放射線照射は単独でも皮下腫瘍の増大を有意に抑制したが、メトホルミンを併用した場合、その腫瘍縮小効果はさらに増強された。一方、照射範囲に含まれない肺転移に関しては、メトホルミン投与単独では全く変化なく、放射線単独ではやや抑制傾向が認められたが有意には至らなかった。しかし、放射線照射にメトホルミン投与を併用すると肺転移は有意に抑制される結果が得られた。特記すべき点として、他の 3 群では全てのマウスにおいて肺転移が認められたのに対し、放射線照射／メトホルミン投与併用群では 10 匹のうち 3 匹において肉眼的転移が認められなくなっていた。当科の先行研究で、LuM1 は皮下接種後 10 日目には顕微鏡的肺転移を来すことが確認されていることから(26)、メトホルミンはいわゆる abscopal effect(10, 53)を介して、放射線非照射部位に存在する腫瘍細胞の退縮を誘導したと考えられる。

そこで、放射線照射＋メトホルミン投与併用療法が、マウスの全身および肺局所における免疫能に与える影響を、脾臓細胞、肺組織切片を用いて検討した。T 細胞、B 細胞、NK 細胞、骨髄球系細胞について解析を行い、併用療法において有意差を認めた G-MDSC、T 細胞、NK 細胞についての考察を加える。

① G-MDSC についての考察

MDSC は、肺などの標的臓器内に転移が形成される前から集積し、pre-metastatic niche を形成した後、TGF- β や TNF- α を放出し EMT を誘導したり、マトリックス分解酵素の発現を亢進したりすることにより、転移巣での癌細胞の増殖、浸潤を促進するといわれている(55)。一方、メトホルミンは、G-MDSC の AMPK を活性化させ、JAK-STAT や NF- κ B の経路を抑制し G-MDSC の分化を抑制すること、これにより脾臓および腫瘍中の G-MDSC の増加を抑制し、colon26 の皮下腫瘍を縮小させることが報告されている(20)。本研究では、メトホルミン単独投与により非治療群と比較して脾臓中の G-MDSC は有意な変化を認めないものの、肺転移結節中の G-MDSC において有意な減少を認めた。

肺転移巣の結果はこれまでの報告と矛盾しないものである一方、脾臓で G-MDSC が減少しなかった原因としてメトホルミン投与開始時期を 13 日目と設定しており、皮下腫瘍や肺転移モデルにおいて腫瘍を移植した直後からメトホルミン投与を開始している過去の報告と比較すると、開始時期が遅くメトホルミンの効果が十分に現れなかった可能性が考えられた。併用治療群は非治療群、放射線療法群のいずれと比較しても、脾臓中の G-MDSC は減少する傾向を認め、肺転移結節中に浸潤する G-MDSC の有意な減少を認めた。このことから、

メトホルミンは放射線照射と併用する場合においても局所および全身での G-MDSC を減少させ、肺転移結節数を抑制する効果があることが示唆された。

② T 細胞についての考察

脾臓中の CD 3 陽性、CD 4 陽性 T 細胞の割合は、メトホルミン投与を追加することで放射線照射群と比較して有意に増加していた。CD 8 陽性 T 細胞の割合についても有意差はないもののメトホルミンの併用で増加する傾向を認めた。今回の実験において放射線治療群において脾臓の G-MDSC は増加する傾向を、T 細胞は減少する傾向を示す一方、併用治療群において脾臓の G-MDSC は減少する傾向を認め、T 細胞は放射線治療群と比較して有意に増加していた。近年、G-MDSC による T 細胞の増殖抑制をメトホルミンが解除することが報告された(54)。このことから、放射線治療群においては G-MDSC により脾臓の T 細胞の増殖が抑制される一方、併用治療群においてはメトホルミン投与の追加により T 細胞の増殖の抑制が解除されたのではないかと考えられた。

一方、本実験モデルにおいては非治療群と比較してメトホルミン単独投与で脾臓 T 細胞の増加が認められなかった。これは、メトホルミン投与により T 細胞が増加するとする過去の報告と異なる。本実験モデルでは Abscopal effects が得られることを示すために、メトホルミン投与開始時期を肺転移が形成された後と考えられる 13 日目と遅く設定しており、メトホルミンによる T 細胞の活

活性化が得られにくかったのではないかと考えられた。

また、本研究では非治療群と比較して放射線照射群、併用治療群において肺転移巣内に浸潤する CD8 陽性 T 細胞の密度の増加を認めなかった。これまでの abscopal effects に関する報告では放射線照射を終了してから 7~10 日目に secondary tumor 内へのリンパ球の浸潤を評価し、増加することを報告しているのに対し、今回は放射線照射終了から 13 日目と遅いタイミングで評価しており、放射線照射を行ってから時間が経過すると、惹起されている免疫反応が減弱する可能性があるのではないかと推測された。また、これまでの abscopal effect に関する報告では、secondary tumor として対側の皮下腫瘍を用いているのに対し、今回の研究では皮下腫瘍からの自然肺転移を用いて評価している。腫瘍内の微小環境が異なることも、これまでの報告と異なる結果が得られた原因となった可能性が考えられた。

さらに、重要な点としてメトホルミンの単独投与、あるいは放射線照射にメトホルミン投与を追加することで T 細胞における IFN- γ 産生能の上昇を認めた。一方、放射線照射単独では非治療群と比較して有意な上昇は認めていない。この結果は、メトホルミンが AMPK-ACC 経路を介して T 細胞を活性化することにより腫瘍を退縮させるというこれまでの報告と合致している (25, 46, 49)。この T 細胞機能の改善が abscopal effect の顕在化に関わっている可能性が考え

られた。

③ NK 細胞についての考察

NK 細胞は、細胞障害性を示す自然免疫系に属する細胞であり、肺の血管内における癌細胞のクリアランスに働くことにより、肺転移を抑制することが報告されている(53)。近年、メトホルミンが脾臓中の NK 細胞を増加させるとともに、p38 MAPK の活性化を介して NK 細胞の細胞障害性を高めることにより、B16F10 メラノーマの肺転移を抑制するということが報告された(22, 54)。本研究モデルでは治療開始時期が 13 日目と遅いためにメトホルミン投与単独では NK 細胞の増殖に対する効果が十分に得られなかった可能性が考えられる。

一方、低用量の放射線照射単独で NK 細胞が増加することが報告されている(55)。本研究では、放射線照射／メトホルミン投与併用群において CD49 陽性 CD335 陽性のフェノタイプを示す脾臓の活性型 NK 細胞の割合が増加し、肺転移巣内に浸潤する CD335 陽性 NK 細胞の割合も併用群で有意に増加していた。

メトホルミン投与と放射線照射が相乗的に作用し、NK 細胞の活性化が得られた可能性が示唆された。また、今回の研究モデルは自然肺転移が形成される時期より後にメトホルミンの内服、放射線照射を開始しており、その結果は NK 細胞が活性化することにより abscopal effects が誘導され、肺転移を抑制する可能性を示唆するものであった。NK 細胞は自然免疫系に属する細胞であり、腫

瘍抗原により T 細胞が活性化され abscopal effects が誘導されるとするこれまでの報告とは異なるものであり、興味深いものであった。

以上、放射線単独は皮下腫瘍に対して直接的な作用を介して腫瘍抑制効果を示したが、肺転移を抑制することができなかった。一方、メトホルミン投与単独は、肺転移巣、皮下腫瘍ともに有意な抗腫瘍効果は示さなかったものの、肺転移巣における G-MDSC の減少を認めた。これに対し、放射線療法にメトホルミン投与を併用すると、脾臓、肺転移巣における活性化型 NK の増加、脾臓における T 細胞の IFN- γ 産生能の上昇、肺転移巣における G-MDSC の更なる減少といった免疫細胞の変化が認められ、皮下腫瘍の増大が抑制されるとともに有意な肺転移の抑制が認められた。G-MDSC は T 細胞を疲弊状態に導くことから、肺における G-MDSC の減少は T 細胞の IFN- γ 産生能の上昇に働き、T 細胞の IFN- γ 産生能の上昇は NK 細胞の活性化を促進すると考えられる。メトホルミンは、局所照射後の担癌マウスにおけるこれらの免疫細胞の挙動に重大な影響を与え、結果として非照射野に存在する微小肺転移の成長の抑制に繋がったと推測される。

第5章 おわりに

マウス大腸癌の自然肺転移モデルを用いて皮下腫瘍への放射線照射にメトホルミン投与を併用することにより、全身の T 細胞の質的变化、全身および肺転移巣での活性化 NK 細胞の増加、免疫抑制性の G-MDSC の減少を介して、非照射部位に存在する肺転移に対して抗腫瘍効果を発揮しうることが確認された。

現在、放射線療法に免疫チェックポイント阻害剤を上乗せすることで、abscopal effect を誘導し、遠隔転移にも有効な新規治療法が模索されている。しかし、個々の患者で免疫状態が大きく異なるために、明らかな有効性を示す臨床研究の結果は未だに得られていない(56-59)。メトホルミンはこれらの免疫チェックポイント阻害剤とは異なる機序で免疫を賦活するため(18, 23)、局所進行直腸癌患者に対する術前放射線免疫療法として臨床応用できる可能性があると考えられた。実際、進行直腸癌に対して、術前放射線化学療法にメトホルミンを併用する第 I / II 相臨床試験が現在、国内外で進行中である(60, 61)。Wang らは 500mg/day のメトホルミンを術前放射線化学療法に付加することで pCR 率が向上したことを既に報告している。これらの試験にて、メトホルミンが腫瘍縮小だけでなく予後に関しても良い影響を与えることが証明されれば、今後、メトホルミンが進行直腸癌に対する標準治療として臨床応用される可能性がある。本研究結果はその際の理論的裏づけになるという点で意義深いもの

と考える。

第6章 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学外科学講座消化器一般移植外科部門教授 佐田尚宏主任教授、北山丈二教授、堀江久永教授に深く感謝いたします。

また、放射線実験を行うにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学外科学講座形成外科部門 吉村浩太郎教授、フローサイトメトリー法を行うにあたりご指導を頂いた自治医科大学学生化学講座病態生化学部門 早川裕子先生に深く感謝いたします。

最後に、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外科学講座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贅田育子さん、篠原淳子さん、畠山浩美さんに心よりお礼申し上げます。

第7章 引用文献

1. 厚生労働省健康局がん・疾病対策課. 平成 30 年 全国がん登録 罹患数・率 報告. 2018.
2. 大腸癌研究会. 大腸癌治療ガイドライン. 2019.
3. TRIAL SRC. IMPROVED SURVIVAL WITH PREOPERATIVE RADIOTHERAPY IN RESECTABLE RECTAL CANCER. the New England Journal of Medicine. 1997.
4. ELLEN K APITEIJN MD, CORRIE A.M. M ARIJNEN MD, IRIS D. N AGTEGAAL MD, HEIN P UTTER PHD, WILLEM H. S TEUP MD, PH .D., THEO W IGGERS MD, PH .D., et al. PREOPERATIVE RADIOTHERAPY COMBINED WITH TOTAL MESORECTAL EXCISION FOR RESECTABLE RECTAL CANCER. The New England Journal of Medicine. 2001.
5. Jean-Francois Bosset MD, Laurence Collette PD, Gilles Calais MD, Laurent Mineur MD, Philippe Maingon MD, 22921 FERGT. chemotherapy with preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. the New England Journal of Medicine. 2006.
6. Sugihara K, Kobayashi H, Kato T, Mori T, Mochizuki H, Kameoka S, et al. Indication and benefit of pelvic sidewall dissection for rectal cancer. Dis Colon

Rectum. 2006;49(11):1663-72.

7. Schae D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(9):527-40.

8. Carvalho HA, Villar RC. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. *Clinics (Sao Paulo)*. 2018;73(suppl 1):e557s.

9. Ngwa W, Irabor OC, Schoenfeld JD, Hesser J, Demaria S, Formenti SC. Using immunotherapy to boost the abscopal effect. *Nat Rev Cancer*. 2018;23:313–22.

10. Park SS, Dong H, Liu X, Harrington SM, Krco CJ, Grams MP, et al. PD-1 Restrains Radiotherapy-Induced Abscopal Effect. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(6):610-9.

11. Baba K, Nomura M, Ohashi S, Hiratsuka T, Nakai Y, Saito T. experimental model for the irradiation-mediated abscopal effect and factors influencing this effect. *Am J Cancer Res*. 2020;14:440-53.

12. Trommer M, Yeo SY, Persigehl T, Bunck A, Grull H, Schlaak M, et al. Abscopal Effects in Radio-Immunotherapy-Response Analysis of Metastatic Cancer Patients With Progressive Disease Under Anti-PD-1 Immune Checkpoint Inhibition. *Front Pharmacol*. 2019;10:511.

13. Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J*. 2020;41(2):255-323.
14. Partners MLHP. <MLHPPDiabetesMedicationGuideline020620.pdf>. 2020;25.
15. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-85.
16. Sato A, Sunayama J, Okada M, Watanabe E, Seino S, Shibuya K, et al. Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(11):811-24.
17. Zou G, Bai J, Li D, Chen Y. Effect of metformin on the proliferation, apoptosis, invasion and autophagy of ovarian cancer cells. *Exp Ther Med*. 2019;18(3):2086-94.
18. Saini N, Yang X. Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2018;50(2):133-43.
19. Chen GG, Woo PYM, Ng SCP, Wong GKC, Chan DTM, van Hasselt CA, et al. Impact of metformin on immunological markers: Implication in its anti-

tumor mechanism. *Pharmacol Ther.* 2020;213:107585.

20. Xu P, Yin K, Tang X, Tian J, Zhang Y, Ma J, et al. Metformin inhibits the function of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Biomed Pharmacother.* 2019;120:109458.

21. Wu Z, Zhang C, Najafi M. Targeting of the tumor immune microenvironment by metformin. *J Cell Commun Signal.* 2021.

22. Wei Z, Zhang X, Yong T, Bie N, Zhan G, Li X, et al. Boosting anti-PD-1 therapy with metformin-loaded macrophage-derived microparticles. *Nat Commun.* 2021;12(1):440.

23. Ma R, Yi B, Riker AI, Xi Y. Metformin and cancer immunity. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2020;41(11):1403-9.

24. Nishida M, Yamashita N, Ogawa T, Koseki K, Warabi E, Ohue T, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger metformin-dependent antitumor immunity via activation of Nrf2/mTORC1/p62 axis in tumor-infiltrating CD8T lymphocytes. *J Immunother Cancer.* 2021;9(9).

25. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Uono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(6):1809-14.

26. Tsukui H, Horie H, Koinuma K, Ohzawa H, Sakuma Y, Hosoya Y, et al. CD73 blockade enhances the local and abscopal effects of radiotherapy in a murine rectal cancer model. *BMC Cancer*. 2020;20(1):411.
27. Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, Dewyngaert JK, Babb JS, Formenti SC, et al. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5379-88.
28. Memmott RM, Mercado JR, Maier CR, Kawabata S, Fox SD, Dennis PA. Metformin prevents tobacco carcinogen--induced lung tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(9):1066-76.
29. ビグアナイド系経口血糖降下剤 日本薬局方 メトホルミン塩酸塩錠 添付文書. 2015.
30. Fu MS, Drummond RA. The Diverse Roles of Monocytes in Cryptococcosis. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(3).
31. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science*. 2015;350(6263):985-90.
32. Excellence NifHaC. Colorectal cancer (update)

Preoperative radiotherapy and chemoradiotherapy for rectal cancer

NICE guideline NG151. 2020.

33. Jennifer Y. Wo M, Christopher J. Anker M, Jonathan B. Ashman M, PhD, Nishin A. Bhadkamkar M, Lisa Bradfield BDTC, MD, Jennifer Dorth M. Radiation Therapy for Rectal Cancer: An ASTRO Clinical Practice Guideline. Practical Radiation Oncology. 2020.

34. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology. 2017;28:iv22-iv40.

35. 大矢雅敏, 鮫島伸一, 奥山隆, 瀬瀬真一郎, 竹下恵美子. 進行直腸癌に対する術前化学放射療法. 日本大腸肛門病会誌. 2014;67:888-96.

36. Traial JRoC. 局所進行直腸癌を対象とした術前放射線療法ならびに術前化学療法後の根治切除の有効性・安全性を検討する臨床第II相試験. 臨床研究実施計画・研究概要公開システム. 2021.

37. Kaur P, Asea A. Radiation-induced effects and the immune system in cancer. Frontiers in Oncology. 2012;2.

38. Pfannenstiel LW, McNeilly C, Xiang C, Kang K, Diaz-Montero CM, Yu JS, et al. Combination PD-1 blockade and irradiation of brain metastasis induces

an effective abscopal effect in melanoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(1):e1507669.

39. Gandini S, Puntoni M, Heckman-Stoddard BM, Dunn BK, Ford L, DeCensi A, et al. Metformin and cancer risk and mortality: a systematic review and meta-analysis taking into account biases and confounders. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2014;7(9):867-85.

40. Koritzinsky M. Metformin: A Novel Biological Modifier of Tumor Response to Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015;93(2):454-64.

41. Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(11):1451-61.

42. Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(3):e33411.

43. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer Discov*. 2012;2(9):778-90.

44. JosieMMEvans, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005;330(7503):1304-5.

45. Chiang C-F, Chao T-T, Su Y-F, Hsu C-C. Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- κ B signaling. *Oncotarget*. 2017.
46. Wang Z, Saha S, Van Horn S, Thomas E, Traini C, Sathe G, et al. Gut microbiome differences between metformin- and liraglutide-treated T2DM subjects. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2018;1(1):e00009.
47. Hirayama T, Nagata Y, Nishida M, Matsuo M, Kobayashi S, Yoneda A, et al. Metformin Prevents Peritoneal Dissemination via Immune-suppressive Cells in the Tumor Microenvironment. *Anticancer Res*. 2019;39(9):4699-709.
48. Wang JC, Sun X, Ma Q, Fu GF, Cong LL, Zhang H, et al. Metformin's antitumour and anti-angiogenic activities are mediated by skewing macrophage polarization. *J Cell Mol Med*. 2018.
49. Uehara T, Eikawa S, Nishida M, Kunisada Y, Yoshida A, Fujiwara T, et al. Metformin induces CD11b⁺-cell-mediated growth inhibition of an osteosarcoma: implications for metabolic reprogramming of myeloid cells and anti-tumor effects. *Int Immunol*. 2019;31(4):187-98.
50. Zhang Z, Li F, Tian Y, Cao L, Gao Q, Zhang C, et al. Metformin Enhances the Antitumor Activity of CD8(+) T Lymphocytes via the AMPK-miR-107-

Eomes-PD-1 Pathway. *J Immunol.* 2020;204(9):2575-88.

51. Song CW, Lee H, Dings RP, Williams B, Powers J, Santos TD, et al. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci Rep.* 2012;2:362.

52. Mortezaee K, Shabeeb D, Musa AE, Najafi M, Farhood B. Metformin as a Radiation Modifier; Implications to Normal Tissue Protection and Tumor Sensitization. *Curr Clin Pharmacol.* 2019;14(1):41-53.

53. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *The Lancet Oncology.* 2009;10(7):718-26.

54. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res.* 2010;70(1):68-77.

55. Makowska A, Lelabi N, Nothbaum C, Shen L, Busson P, Tran TTB, et al. Radiotherapy Combined with PD-1 Inhibition Increases NK Cell Cytotoxicity towards Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cells.* 2021;10(9).

56. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1919-29.

57. Shaverdian N, Lisberg AE, Bornazyan K, Veruttipong D, Goldman JW, Formenti SC, et al. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(7):895-903.
58. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJM, et al. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(7):700-12.
59. Luke JJ, Lemons J, Karrison TG, Pitroda SP, M.Melotek J, Zha Y. Safety and Clinical Activity of Pembrolizumab and Multisite Stereotactic Body Radiotherapy in Patients With Advanced Solid Tumors. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. 2018;11:1611-8.
60. C.S. Wong a, WCa, SAb, DFb, SBc, AKd, et al. Metformin with neoadjuvant chemoradiation to improve pathologic response in rectal cancer: A pilot phase I/II trial. *Clinical and Translational Radiation Oncology*. 2021.

61. 紹信 武. 非糖尿病患者を対象とした局所進行直腸癌に対するメトホルミン併用術前化学放射線療法の安全性・有効性を検討する多施設共同臨床第 I/II 相試験<臨床研究実施計画・研究概要公開システム CRB1180001>. 特定臨床研究. 2021.