

氏名	東 條 峰 之
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 660 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	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検討
論文審査委員	(委員長) 教授 西野 宏 (委員) 教授 眞嶋 浩聡 教授 白井 克幸

論文内容の要旨

1 研究目的

直腸癌患者の予後は他の大腸癌と比べて不良であるが、この原因として術後の高い局所再発率が挙げられる。術前放射線療法は局所再発率の低下をもたらす有用な治療法であるが、予後の延長効果は認められていない。放射線照射は、DNA の損傷による癌細胞の直接障害だけでなく、宿主の免疫応答を介した間接的な癌細胞の障害を誘導する事で腫瘍縮小をきたすことが知られている。近年の研究から、糖尿病治療薬・メトホルミンは疲弊状態にある T 細胞を再活性化することで抗腫瘍効果を発揮することが解ってきた。そこで、局所の放射線照射にメトホルミンを併用することで放射線照射の抗腫瘍効果、特に非照射野に存在する遠隔転移に対する治療効果にどのような変化がみられるかを、マウスモデルを用いて検討した。

2 研究方法

1. 治療プロトコール

皮下接種にて自然肺転移を高頻度に来すマウス大腸がん細胞株である LuM1 を 7 週齢の BALB/c マウスに皮下注射し、13 日目と 15 日目に皮下腫瘍に局限して 4Gy×2 回の局所放射線照射を行った。メトホルミンは 13 日目より 1mg/ml の濃度で自由飲水による経口投与を行い 28 日目に犠牲死させ、皮下腫瘍と肺転移結節数を測定した。一群 5 匹で同様の実験を繰り返し行い、2 回の実験の結果を統合することにより各群 n=10 での結果を解析した。

2. 全身の免疫細胞の評価

28 日目に犠牲死させたマウスの脾臓における T 細胞、制御性 T 細胞、Natural Killer(NK)細胞、B 細胞、骨髄由来抑制細胞(MDSC)、樹状細胞の割合、T 細胞における PD-1 発現、血液中の patrolling monocytes の割合に加えて、脾臓細胞を PMA+イオノマイシンで刺激した後の T 細胞の IFN- γ 産生能を、フローサイトメトリーを用いて評価した。

3. 肺転移巣に浸潤した免疫細胞の評価

切除した肺組織のホルマリン固定標本の組織切片を作成し、抗 CD8a 抗体、抗 CD335 抗体、抗 Gr-1 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、肺転移内に浸潤した T 細胞、NK 細胞および G-MDSC の密度を評価した。

3 研究成果

1. 放射線照射とメトホルミン併用療法の皮下腫瘍および肺転移への影響

皮下腫瘍は放射線照射群で非治療群と比べて有意に減少していたが (2151.1±765.4mg vs 990.5±625.7mg ; p=0.0182)、放射線照射/メトホルミン投与併用群ではさらに減少していた (2151.1±765.4mg vs 643.6±517.7mg ; p=0.0009)。肺転移結節数は、放射線単独では有意な減少を認めなかったが、メトホルミンを併用することにより有意に減少した(109.4±64.7(個) vs 25.4±28.3(個) ; p=0.018)。

2. 放射線照射とメトホルミン併用療法の全身の免疫細胞への影響

放射線照射により脾臓中の CD3 陽性、CD4 陽性、および CD8 陽性 T 細胞の割合は減少する傾向を示したが、メトホルミンを併用することで増加し、CD4 陽性 T 細胞上の PD-1 の発現は有意に低下した(15.4±6.7 vs 9.4±1.7 (%) ; p=0.032)。また、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脾臓中 T 細胞の IFN- γ の産生能の上昇を認めた(CD4 ; 6.8±2.4(%) vs 9.6±1.8(%) ; p=0.033, CD8 ; 24.1±3.6(%) vs 37.6±10.0(%) ; p=0.0096)。脾臓中の CD49b(+)CD335(+)の活性型 NK 細胞の割合も有意に増加していた(1.1±0.2(%) vs 2.8±1.0(%) ; p=0.032)。全マウスにおいて脾臓中 T 細胞の IFN- γ 産生能および活性型 NK 細胞の割合は肺転移結節数と負の相関を示した(CD4 ; r=-0.58, p=0.0069, CD8 ; r=-0.63, p=0.0029, 活性型 NK 細胞 ; r=-0.69, p=0.0006)。

3. 放射線照射とメトホルミン併用療法の転移巣内浸潤免疫細胞への影響

非治療群と比べて併用群では肺転移巣内の CD335(+)NK 細胞の割合は増加し (45.5±47.9/mm² vs 316.9±175.0/mm² ; p=0.014)、G-MDSC の割合は減少していた (246.9±56.8/mm² vs 70.8±54.0/mm² ; p=0.003)。全マウスにおいて、肺転移結節数は活性型 NK 細胞の細胞密度と負の相関を示し (r=-0.69, p<0.001)、G-MDSC の細胞密度とは正の相関を示した(r=0.49, p=0.03)。

4 考察

本研究で用いた LuM1 の皮下腫瘍モデルでは、メトホルミンは単独では原発巣、肺転移に有意な影響を与えなかったが、放射線照射と併用することで照射腫瘍のみならず、肺転移をも抑制する効果があることが確認された。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、メトホルミンはいわゆる *abscopal effect* を介して、放射線非照射部位に存在する癌細胞の退縮を誘導したと考えられる。放射線照射/メトホルミン投与併用群のマウスの脾臓中の T 細胞の割合は放射線単独群と増加し、PD-1 の発現が減少傾向を示し、また非治療群と比較して IFN- γ 産生能が上昇していた。これらの結果は過去の報告と合致し、メトホルミンは放射線照射を受けた担癌マウスにおける T 細胞の疲弊状態を解除することで肺転移を抑制したと考えられた。また、放射線照射/メトホルミン投与併用群では活性型 NK 細胞の割合が脾臓、肺転移巣で有意に増加していたことから、肺における微小転移の抑制には T 細胞だけでなく NK 細胞が重要な役割を果たしていると考えられた。一方、併用群における G-MDSC の割合は、脾臓内で減少傾向を認め、肺転移巣では有意に減少していたことから、免疫抑制性の G-MDSC の減少が肺転移の抑制に深く関与していると考えられた。以上の結果から、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、活性化 NK 細胞の増加、免疫抑制性 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。

5 結論

大腸癌マウス自然肺転移モデルを用いて、メトホルミンが宿主の免疫細胞に影響を与えることで放射線による **abscopal effect** の顕在化を誘導することが判明した。メトホルミンは、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。

論文審査の結果の要旨

学位論文の内容

局所再発率が高い直腸癌では、術前放射線治療を行うことにより局所再発率を低下させることができた。しかし遠隔転移により全生存率の改善は限定的であった。そこで東條氏は遠隔転移の制御のため担癌宿主の抗腫瘍免疫に着眼した。そしてメトホルミンと放射線治療の併用を着想した。メトホルミンは 1961 年に開発された経口糖尿病薬治療薬である。この薬剤に抗腫瘍効果としてがん細胞のアポトーシス誘導、増殖抑制、担がん宿主の免疫抑制系細胞の減少、疲弊した T 細胞の機能回復作用が期待され、同薬剤内服者のコホート研究や抗がん薬との併用に関する論文が短期間で多々報告された。しかし氏が着想したメトホルミンと放射線治療の併用に関する基礎的研究の報告は現時点ではない。氏は自然肺転移を生じるマウス大腸がん細胞株 LuM1 を用いた動物実験モデルを構築した。マウス皮下移植腫瘍に放射線照射を行いメトホルミン投与群と非投与群の下記の項目を検討した。1：腫瘍体積、2：皮下腫瘍の重さ、3：肺転移結節数、4：マウス脾臓中の免疫系細胞の変動、5：肺転移巣内への免疫系細胞浸潤の程度である。その結果、メトホルミンを投与したマウスでは放射線治療単独群より肺転移数が減少した。マウス脾臓中細胞において、免疫担当細胞数の回復、疲弊リンパ球の減少、リンパ球の INF- γ 産生能の亢進を認めた。また肺転移巣内への活性型 NK 細胞の増多も認めた。氏は皮下移植腫瘍に放射線照射を行い肺転移数が減少した **abscopal effect** を明確に示し、その機序は担がん宿主の抗腫瘍免疫特に活性型 NK 細胞の転移巣内への浸潤の機序によるものであることを初めて明らかにした。

学問的意義、新規制、独創性

メトホルミンの抗腫瘍効果に関する論文が多い中、放射線治療併用に関する基礎研究の報告は少ない。現在免疫チェックポイント阻害薬を併用する免疫放射線治療の臨床試験が行われているが、同薬剤は高価な薬剤である。免疫チェックポイント阻害薬と同等の臨床効果がメトホルミンに期待できるならば医療経済にも貢献できる。また免疫チェックポイント阻害薬が投与できない患者にとって治療の選択肢はひろがることとなる。意義のある基礎的研究と判断した。

問題点と改訂の内容

本論文の趣旨はメトホルミンと放射線治療を併用することにより、**abscopal effect** が認められ、その機序は担がん宿所の免疫能活性による NK 細胞浸潤がその機序であることである。初版ではその点が読者に伝わりにくい記載であった。結果の解釈において推測の範囲内の考察を、断定的に述べていた。読者にわかりやすく、また誤解を招かないように改訂をしてもらった。一部図がわかりにくい体裁であったため改訂してもらった。

本学論文の可否とその理由：合格

メトホルミンの抗腫瘍効果に関する論文が多い中、放射線治療の併用に関する基礎研究の報告

は少ない。今まさにメトホルミンを併用する放射線治療の臨床試験が始まろうとしているが、その根拠を示す貴重な基礎的研究と思われる。また免疫チェックポイント阻害薬と同等の臨床効果がメトホルミンに認められるならば、医療経済にも貢献は多大である。さらに免疫チェックポイント阻害薬が投与できない患者にとっての治療の選択肢はひろがることとなる。以上の点より意義のある基礎的研究と判断した。

提出された学位論文の評価

指摘事項が的確に改訂されていた。

最終試験の結果の要旨

申請者の発表は研究の背景・目的・方法・結果・考察について必要十分な内容であったか。

東條氏は結腸癌と直腸癌治療を専門にしている。術前放射線治療を行うことにより直腸癌の局所再発率を低下させることができたが全生存率の改善は限定的で臨床背景がある。その理由は遠隔転移の存在であった。遠隔転移の制御に関し担癌宿主の腫瘍免疫に氏は着目し、メトホルミンと放射線治療の併用に着眼した。メトホルミンは1961年に開発された経口糖尿病薬治療薬である。このメトホルミンに多くの抗腫瘍効果が期待できることが報告されている。しかし氏が着眼したメトホルミンと放射線治療の併用に関する基礎的研究はない。氏は自然肺転移を生じるマウス大腸がん細胞株 LuM1 を用いた動物実験モデルを構築した。その結果メトホルミンを投与したマウスでは放射線治療単独群より肺転移数が減少する事実を発見した。マウス脾臓 CD3+および CD4+リンパ球数が回復していること、PD-1+CD4+リンパ球が減少していること、リンパ球の INF- γ 産生能が亢進していること、活性型 NK 細胞の割合が増多していること、肺転移巣内の活性型 NK 細胞数が増多していることを示した。皮下移植腫瘍に放射線照射を行い肺転移数が減少した *abscopal effect* を明確に示し、その機序は担がん宿主の抗腫瘍免疫特に活性型 NK 細胞の転移巣内への浸潤の機序によるものであることを初めて明らかにした。メトホルミンの抗腫瘍効果に関する論文が多い中、放射線治療の併用に関する基礎研究の報告はない。現在免疫チェックポイント阻害薬を併用する免疫放射線治療の臨床試験が行われているが、同薬剤は高価な薬剤である。免疫チェックポイント阻害薬抗 PD-1 抗体と同等の臨床効果がメトホルミンに期待できるならば医療経済にも貢献できる。また免疫チェックポイント阻害薬が投与できない患者にとって治療の選択肢はひろがることとなる。意義のある基礎研究と判断した。

申請者の今後の研究についての展望を示すことができたか。

免疫チェックポイント阻害薬と同等の臨床効果がメトホルミンに期待できるならば医療経済学的にも貢献できる。また免疫チェックポイント阻害薬が投与できない患者にとって治療の選択肢はひろがることとなる。今まさにメトホルミンを併用する放射線治療の臨床試験が始まろうとしているが、その根拠を示す貴重な基礎的研究と思われる。将来的な臨床研究へつなげる展望を示した。

申請者は質疑についてその内容を正しく理解し、適切に応答できたか。

腫瘍免疫に関する結果の解釈に関する質問についての的確に答えられた。

申請者の研究に関連する周辺領域の知識は十分であったか。

メトホルミンの薬理作用、放射線の生物学活性への影響、腫瘍免疫に関する知識は十分と判断した。

申請者の研究能力及び科学的素養・態度は学位に値するものと言えるか。

発表における臨床及び研究に対する態度は真摯なものであり、真面目な人格が感じられた。臨床より見出された問題点を解決するために的確な実験モデルを構築できる研究能力は高いものがある。以上より学位授与に値する研究者と審査委員一同判断した。