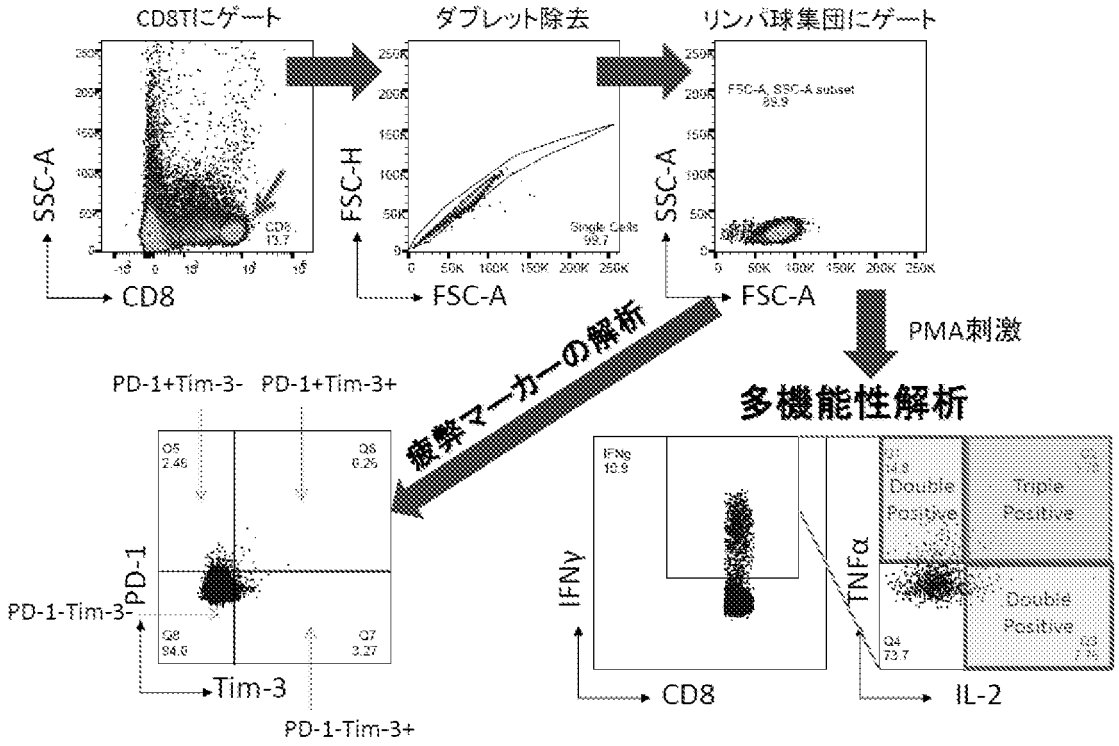
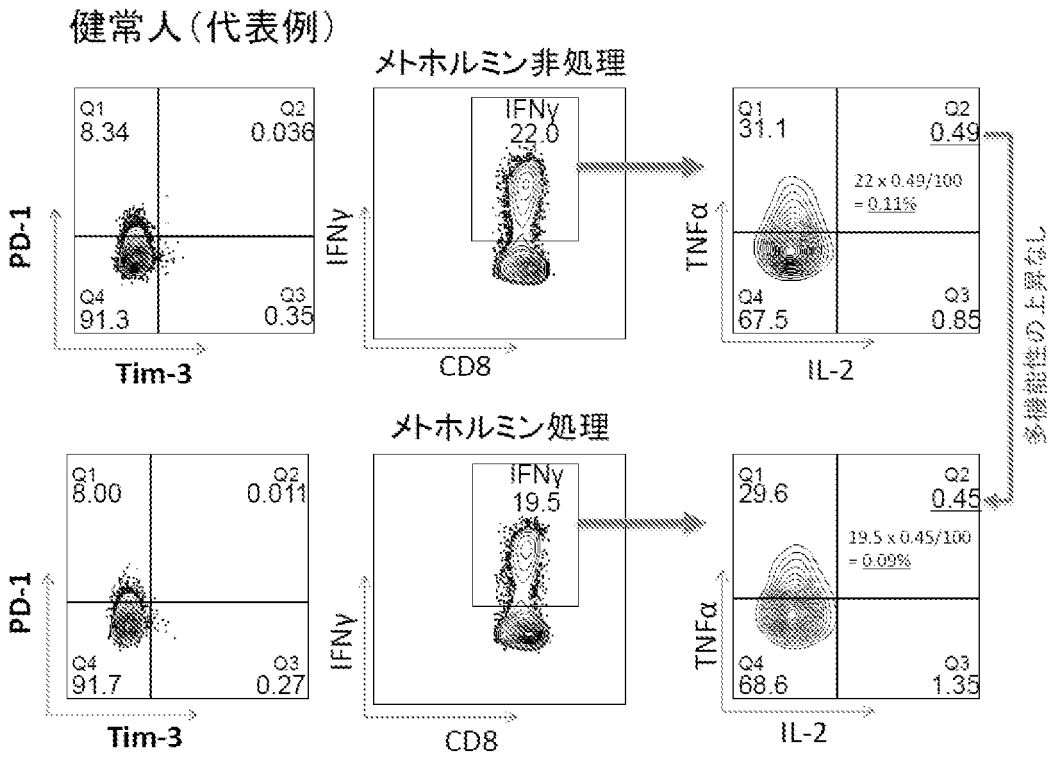
[図1]

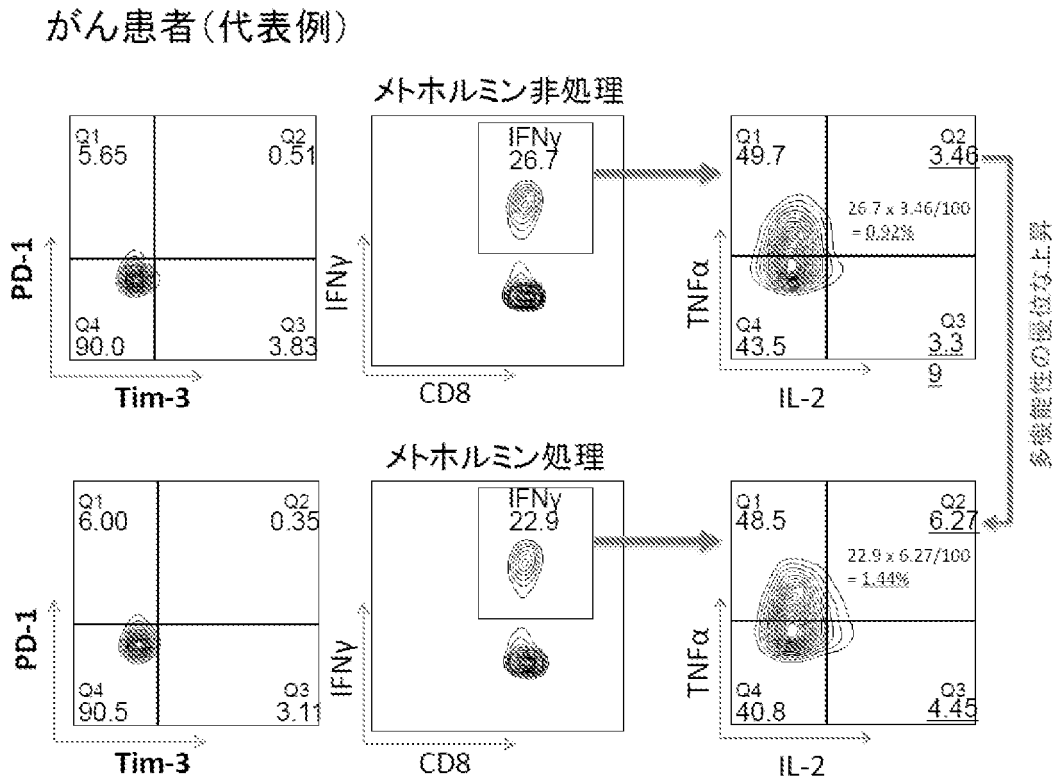



[図2]



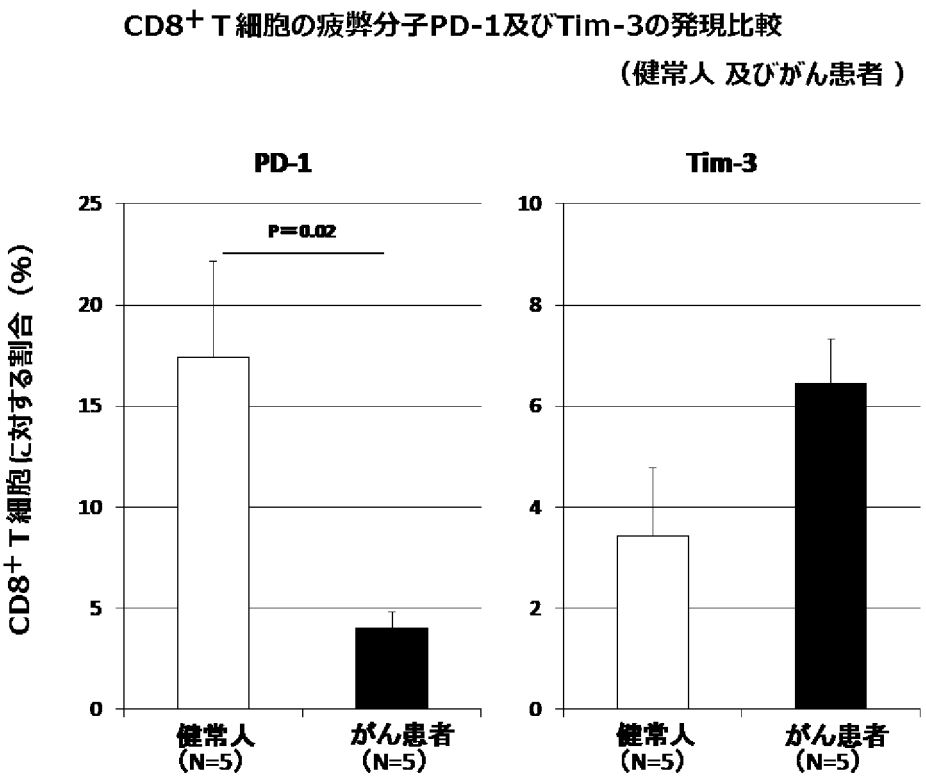

健常人のCD8T細胞はメトホルミン処理により多機能性の上昇を認める場合は少ない。

[図3]



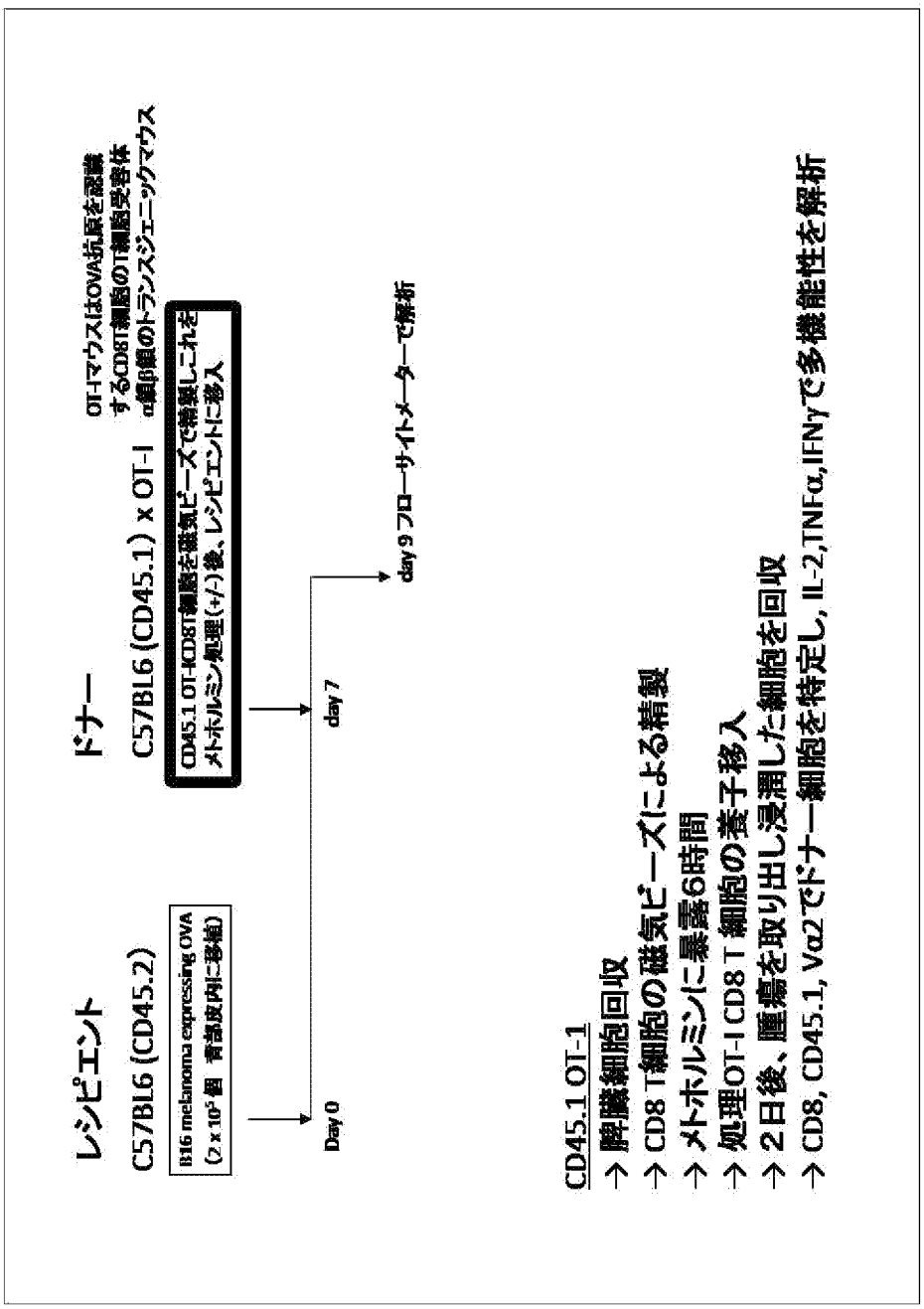

がん患者のCD8T細胞はメトホルミン処理により多機能性の上昇を認める場合が多い。

[図4]

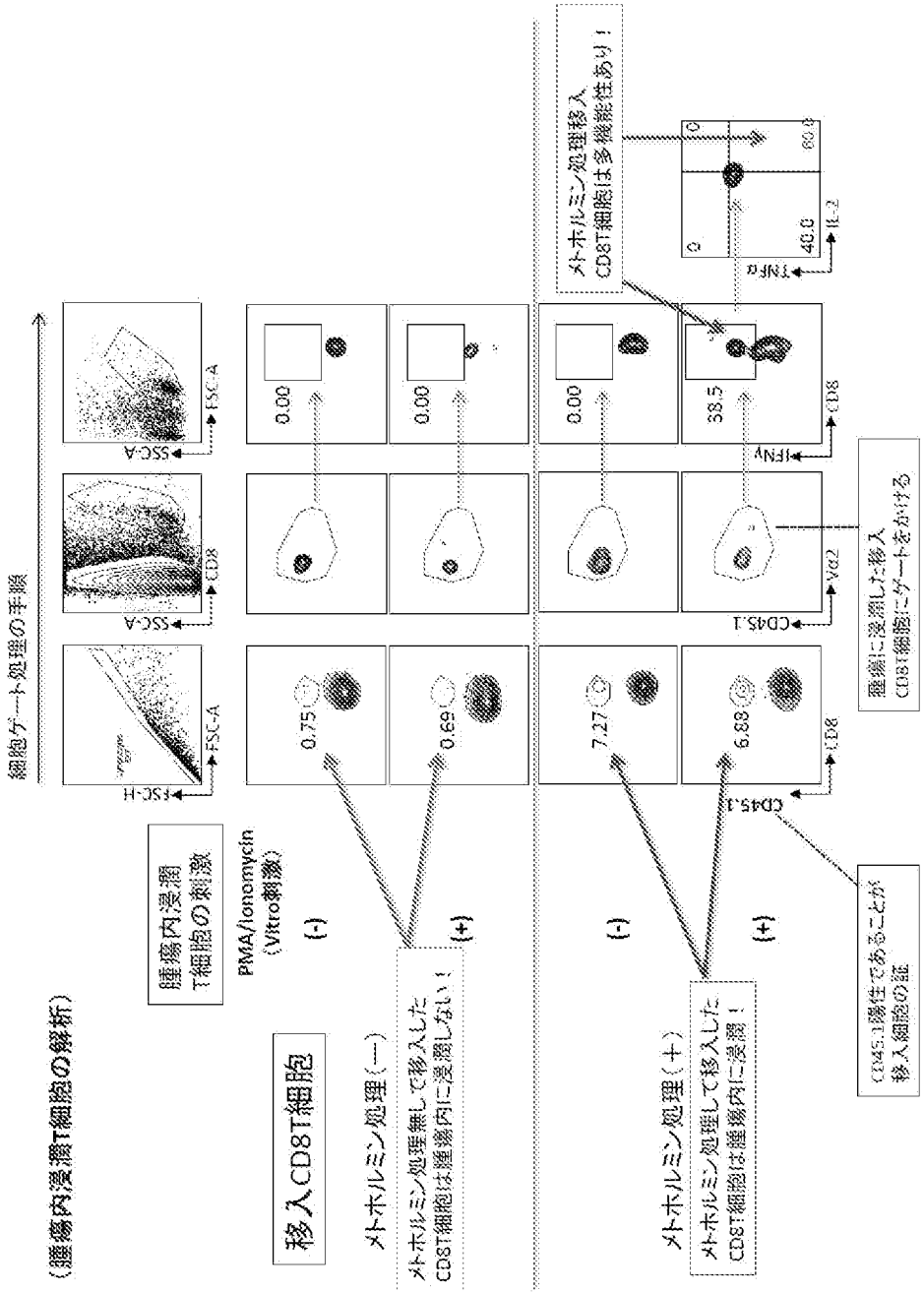



PD-1 の発現頻度は、がん患者では優位に低い。一方、Tim-3の発現は
がん患者で高い傾向にある。

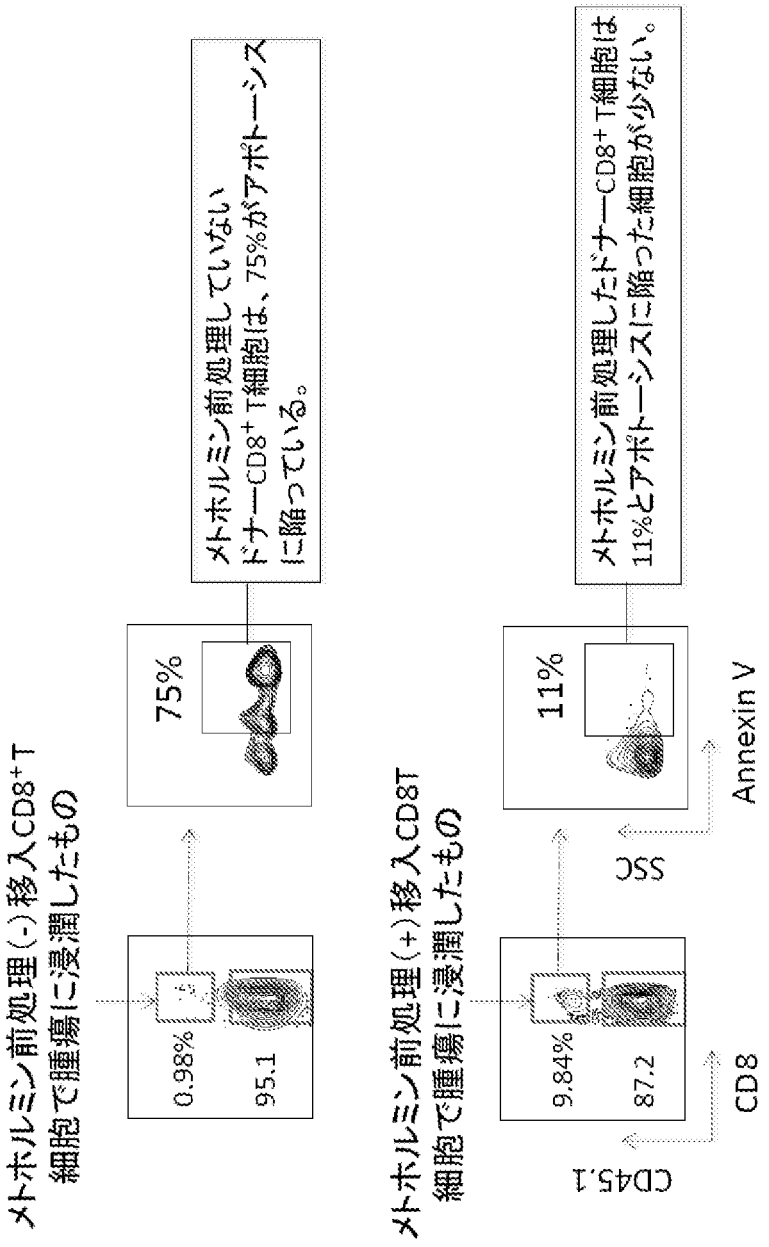
[図5]


レシピエント
C57BL6 (CD45.2)
ドナー
C57BL6 (CD45.1) x OT-I
OT-Iマウスはova抗原を認識するCD8T細胞のT細胞受容体α鎖β鎖のトランスジェニックマウス
B16 melanoma expressing OVA
(2 x 10⁵個 背部皮内に移植)
CD45.1 OT-ICD8T細胞を磁気ビーズで精製しこれをメトホルミン処理(+/-)後、レシピエントに移入
Day 0
day 7
day 9 フローサイトメーターで解析
CD45.1 OT-1
→ 脾臓細胞回収
→ CD8 T細胞の磁気ビーズによる精製
→ メトホルミンに暴露6時間
→ 処理OT-I CD8 T 細胞の養子移入
→ 2日後、腫瘍を取り出し浸潤した細胞を回収
→ CD8, CD45.1, Vα2でドナー細胞を特定し, IL-2,TNFα,IFNγで多機能性を解析

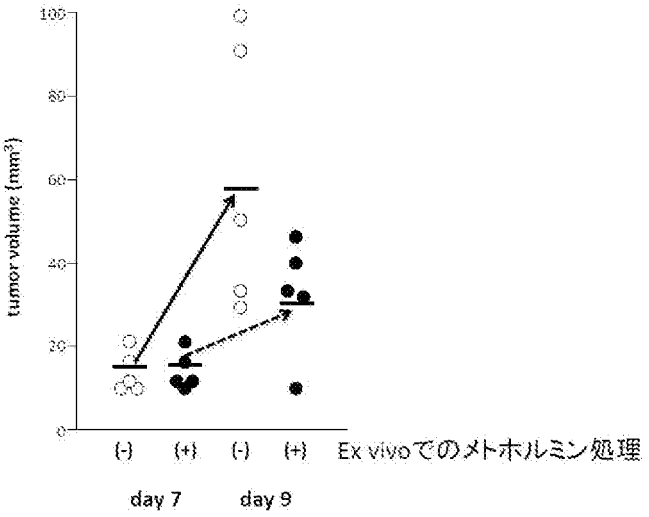
[図6]


（腫瘍内浸潤T細胞の解析）
細胞ゲート処理の手順
FSC-H
FSC-A
SSC-A
CD8
FSC-A
腫瘍内浸潤
T細胞の刺激
PMA/Ionomycin
（Vitro刺激）
移入CD8T細胞
メトホルミン処理（—）
メトホルミン処理無しで移入した
CD8T細胞は腫瘍内に浸潤しない！
(-)
(+)
0.75
0.69
0.00
0.00
メトホルミン処理（＋）
メトホルミン処理して移入した
CD8T細胞は腫瘍内に浸潤！
7.27
6.68
CD45.1
CD8
Vα2
IFNγ
38.5
メトホルミン処理移入
CD8T細胞は多機能性あり！
TNFα
IL-2
40.0
腫瘍に浸潤した移入
CD8T細胞にゲートをかける
CD45.1陽性であることが
移入細胞の証

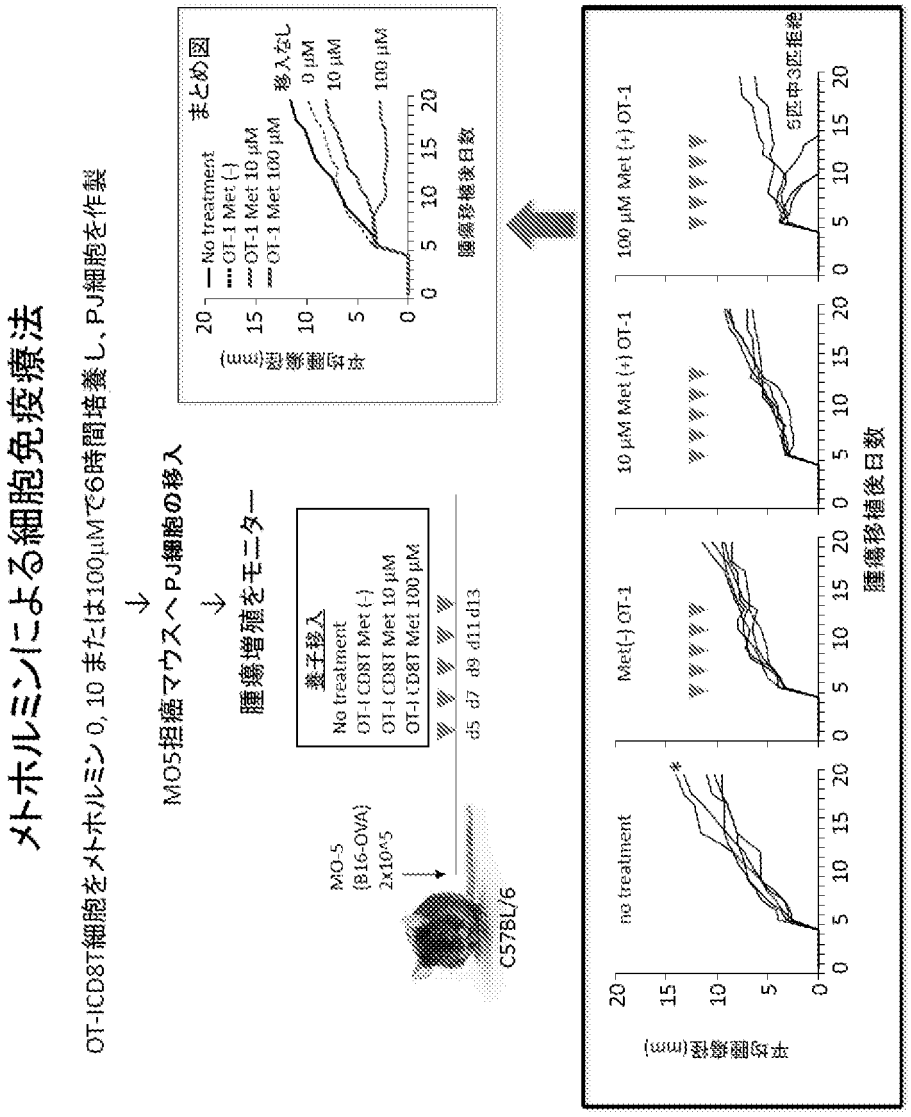
[図7]


メトホルミン前処理(-)移入CD8+T
細胞で腫瘍に浸潤したもの
0.98%
95.1
CD45.1
CD8
75%
SSC
Annexin V
メトホルミン前処理してない
ドナーCD8+T細胞は、75%がアポトーシス
に陥っている。
メトホルミン前処理(+)移入CD8T
細胞で腫瘍に浸潤したもの
9.84%
87.2
CD45.1
CD8
11%
SSC
Annexin V
メトホルミン前処理したドナーCD8+T細胞は
11%とアポトーシスに陥った細胞が少ない。

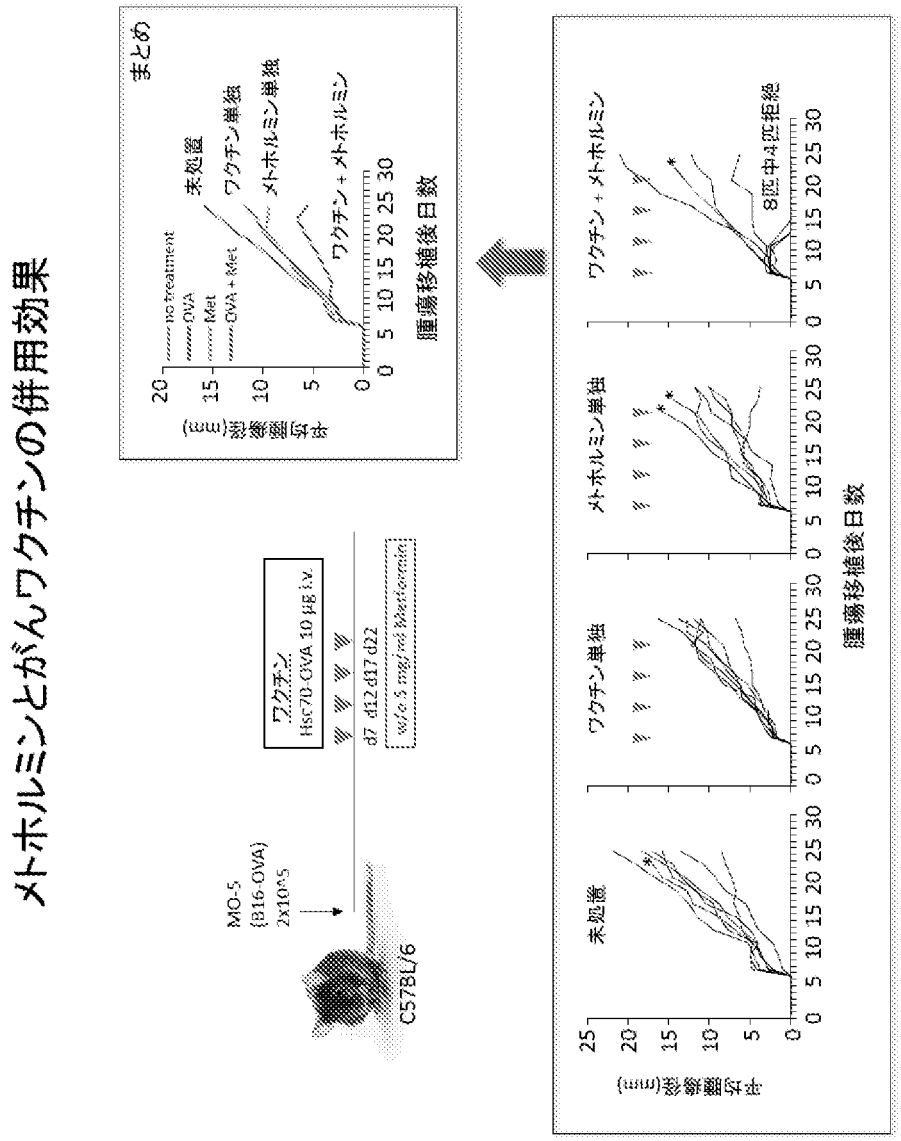
[図8]


tumor volume (mm³)
(-)
(+)
(-)
(+)
Ex vivoでのメトホルミン処理
day 7
day 9

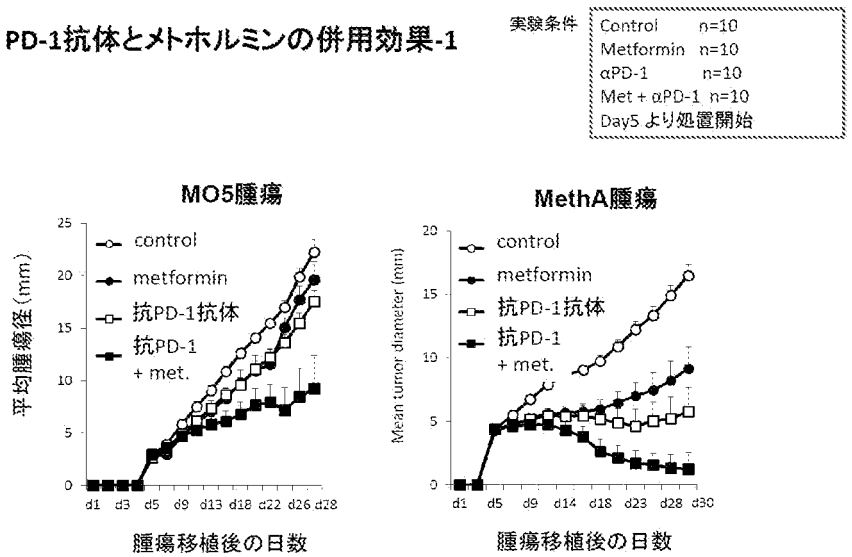
[図9]


メトホルミンによる細胞免疫療法
OT-1CD8T細胞をメトホルミン 0, 10 または100μMで6時間培養し、PJ細胞を作製
MO5担癌マウスへPJ細胞の移入
腫瘍増殖をモニター
養子移入
No treatment
OT-1 CD8T Met (-)
OT-1 CD8T Met 10 μM
OT-1 CD8T Met 100 μM
MO-5
(B16-OVA)
2x10^5
C57BL/6
d5 d7 d9 d11 d13
まとめ図
No treatment
OT-1 Met (-)
OT-1 Met 10 μM
OT-1 Met 100 μM
移入なし
0 μM
10 μM
100 μM
平均腫瘍径(mm)
腫瘍移植後日数
no treatment
Met(-) OT-1
10 μM Met (+) OT-1
100 μM Met (+) OT-1
6匹中3匹拒絶

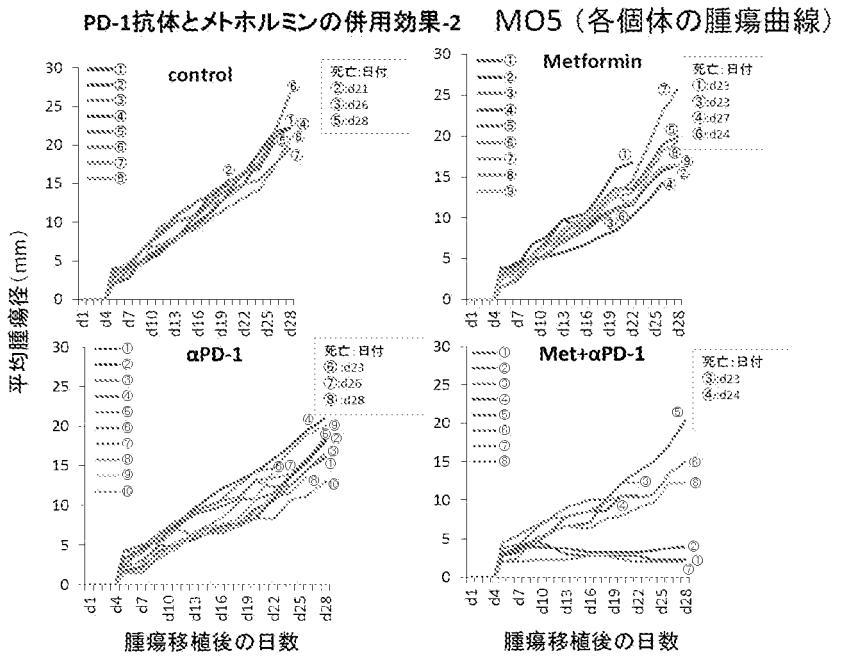
[図10]


メトホルミンとがんワクチンの併用効果
まとめ
no treatment
OVA
Met
OVA + Met
未処置
ワクチン単独
メトホルミン単独
ワクチン＋メトホルミン
平均腫瘍径(mm)
腫瘍移植後日数
MO-5
(B16-OVA)
2x10^5
C57BL/6
ワクチン
Hsc70-OVA 10 μg i.v.
d7 d12 d17 d22
w/o 5 mg/ml Metformin
8匹中4匹根絶

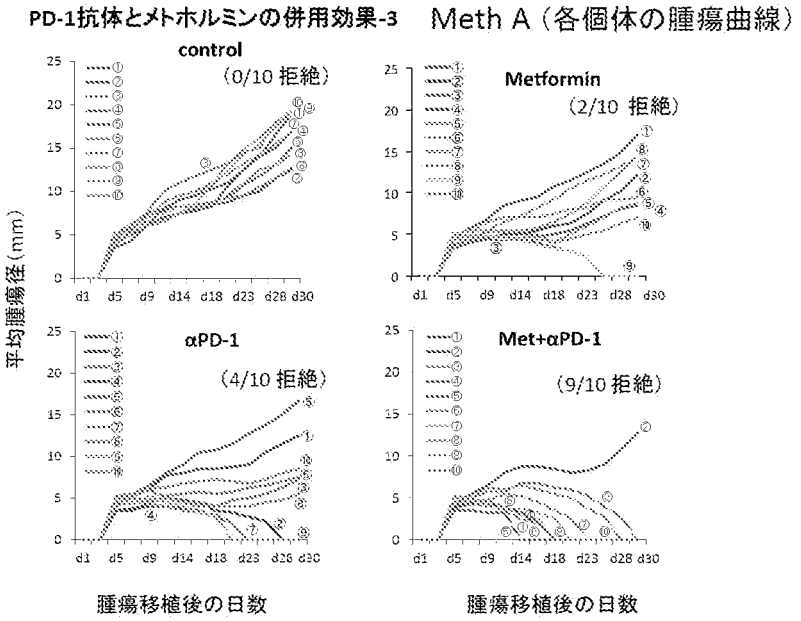
[図11]


PD-1抗体とメトホルミンの併用効果-1
実験条件
Control n=10
Metformin n=10
αPD-1 n=10
Met + αPD-1 n=10
Day5 より処置開始
MO5腫瘍
MethA腫瘍
control
metformin
抗PD-1抗体
抗PD-1
+ met.
平均腫瘍径（mm）
Mean tumor diameter (mm)
腫瘍移植後の日数

[図12]


PD-1抗体とメトホルミンの併用効果-2 MO5（各個体の腫瘍曲線）
control
死亡：日付
②：d21
③：d26
⑤：d28
Metformin
死亡：日付
①：d23
③：d23
④：d27
⑥：d24
αPD-1
死亡：日付
⑨：d23
⑦：d26
⑧：d28
Met+αPD-1
死亡：日付
③：d23
④：d24
平均腫瘍径（mm）
腫瘍移植後の日数
腫瘍移植後の日数

[図13]


PD-1抗体とメトホルミンの併用効果-3 Meth A（各個体の腫瘍曲線）
control
（0/10 拒絶）
Metformin
（2/10 拒絶）
αPD-1
（4/10 拒絶）
Met+αPD-1
（9/10 拒絶）
平均腫瘍径（mm）
腫瘍移植後の日数
腫瘍移植後の日数