

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09956

研究課題名(和文)新規抗骨髄腫薬を用いたTh1様 T細胞の誘導法とその抗骨髄腫活性の増強法の開発

研究課題名(英文)Expansion of Th1-like gamma delta T cells by new generation IMiDs and their cytotoxicity against myeloma progenitors

研究代表者

三木 浩和(MIKI, Hirokazu)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50511333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：健康人から採取した末梢血単核球からZOLとIMiDs、HMB-PPとIMiDsを用いて体外で大量の T細胞が誘導可能で、ZOLとIL-2を用いた手法よりも効率的であった。IMiDsを用いて誘導した T細胞は細胞内IFN-濃度が高いTh1様であり、DNAM-1、NKG2D、LFA-1などが高発現していた。Th1様 T細胞は、腫瘍前駆細胞にも細胞傷害をもたらし、動物モデルでも腫瘍形成抑制効果を認めた。新規抗骨髄腫薬を用いた検討では、Pim阻害薬(SMI-16a)が骨髄腫細胞のHSPの発現を誘導し、SMI-16aで前処理をした骨髄腫細胞と T細胞との併用では抗骨髄腫活性の増強作用を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Th1機能を増強させた抗腫瘍活性のより強い T細胞を体外で大量に誘導するため合成IPPIによるTCRの直接刺激と免疫拮抗作用を有する抗骨髄腫薬(IMiDs)という新規の併用法を用いる点、誘導したTh1様 T細胞の抗腫瘍効果を高めるためにADCC活性を惹起する新規抗骨髄腫薬を用いる点、 T細胞を腫瘍残存部で活性化させ残存腫瘍細胞を駆逐しようとする点に独創性を有している。免疫調節薬を用い癌前駆細胞や癌幹細胞の T細胞への感受性を高める試みはこれまでになく、これらの研究により得られる成果は、悪性腫瘍全般に応用可能な新規免疫療法として発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：After PBMCs isolated from normal donors were incubated for one week with Zol and IMiDs (LEN or POM) in combination, T cells were robustly expanded. The expanded T cells expressed intracellular IFN- but not Foxp3 along with increased surface expression of NKG2D and DNAM-1, indicating induction of Th1-like T cells. Interestingly, the expanded T cells also markedly minimized the sizes of side populations in RPMI8226 and KMS-11 cells, and suppressed their clonogenic capacity as determined by in vitro colony formation and tumorigenic capacity in SCID mice, suggesting targeting a drug-resistant clonogenic MM cells. SMI-16a, Pim inhibitor, upregulated surface expression of HSP70 on MM cells. Pretreatment with SMI-16a further potentiate the cytotoxic activity of T cells against MM cells. Combination with novel anti-MM agents warrants further study in terms of further enhancement of anti-MM effects with the ex-vivo expanded Th1-like T cells.

研究分野：血液内科学

キーワード： T細胞 多発性骨髄腫 免疫調節薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

血中や骨髄に存在するヒト V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T ( $\gamma\delta$ T) 細胞は、体外でゾレドロン酸 (ZOL) および IL-2 の添加により著明に増幅するが、このようにして誘導した  $\gamma\delta$ T 細胞は骨髄腫細胞に対して特異的かつ強力な細胞傷害を発揮する。一方、この抗骨髄腫活性は骨髄間質細胞の共存により減弱したが、その原因として、骨髄間質細胞との共存により  $\gamma\delta$ T 細胞の細胞傷害関連因子 DNAM-1 の発現が低下することを見出した (Int. J Hematol. 2011)。しかし、新規免疫調節薬 (IMiDs) である lenalidomide (LEN) を添加すると、骨髄間質細胞存在下でも  $\gamma\delta$ T 細胞の DNAM-1 の発現が回復し、低下した  $\gamma\delta$ T 細胞の抗骨髄腫活性が回復することを報告した。さらに我々は、新規抗骨髄腫薬として臨床応用されている第 2 世代 IMiDs の LEN や pomalidomide (POM) が ZOL との併用で、単離末梢血単核細胞から Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞を活性化し増幅させるという興味深い IMiDs の新しい免疫賦活作用を見出し報告した (Leukemia 2017)。そこで、体外増幅効率をさらに強めるために、 $\gamma\delta$ T 細胞受容体( $\gamma\delta$ TCR)に効率よく認識され、Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞を刺激する新規に合成したリコンビナントリン酸化抗原 (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) と IMiDs とを併用するという  $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅法の開発の検討に至った。このような背景から、HMB-PP と IMiDs を併用した Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞の新規誘導法と、Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞と新規抗骨髄腫薬 (bortezomib, carfilzomib, Panobinostat, HM1.24 抗体など) の併用による免疫抗体療法の着想に至った。そして、IMiDs を併用することにより IMiDs による直接的な抗骨髄腫作用の増強とともに Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞側の抗腫瘍活性と ADCC などのエフェクター機能の増強が期待出来る。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) HMB-PP と IMiDs を用いた効率的な Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞の誘導法と共刺激の制御による増幅・活性化増強法の開発、(2) Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞を介する新規抗骨髄腫薬の ADCC 活性とその増強法の開発、(3) Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞と抗骨髄腫薬の腫瘍前駆細胞に対する傷害活性の誘導、(4) Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞と新規抗骨髄腫薬の抗骨髄腫活性の生体内効果の検討、などを検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究の方法・手順を下記に示す。

検討(1) 末梢血単核球細胞に HMB-PP もしくは ZOL と IMiDs (LEN or POM) を種々の濃度(0.1 から 1 $\mu$ M)で添加培養後 1、2、3 週目の  $\gamma\delta$ T 細胞の機能的サブセットの誘導・増幅効率を経時的に解析し、従来の ZOL と IL-2 により誘導した  $\gamma\delta$ T 細胞と比較検討する。Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞は IFN- $\gamma$ 、制御性  $\gamma\delta$ T 細胞は Foxp3 の細胞内染色を行い評価する。 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化は、IFN- $\gamma$  や IL-2 の産生量および CD25、CD26 の発現で評価する。また、 $\gamma\delta$ T 細胞は非接着下では骨髄腫細胞株をほとんど傷害しておらず、 $\gamma\delta$ T 細胞の標的細胞に対する障害活性の発現には両者の接着が必須であったため、接着分子で細胞障害活性に関わる DNAM-1、LFA-1 や NKG2D などの  $\gamma\delta$ T 細胞における発現レベルの変化をフローサイトメトリーで解析する。

検討(2) IMiDs である LEN, POM は、T 細胞や NK 細胞に作用し、これらの Th<sub>1</sub> サイトカインの産生やエフェクター機能を増強させる。検討 1)で増幅した Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞および新規抗骨髄腫薬と IMiDs (LEN, POM) を併用した骨髄腫細胞に対する ADCC 活性の誘導、さらに抗 PD-1 阻害抗体を併用した増強法の治療効果を検討する。Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞と PKH26 で標識した骨髄腫細胞株を種々の E:T 比で培養し、新規抗骨髄腫薬の添加の有無で、骨髄腫細胞株に対する細胞傷害活性を調べ、ADCC 活性を評価する。PKH26 陽性骨髄腫細胞における死細胞の割合は 7AAD 染色で死細胞を染色しフローサイトメトリーで算定する。

検討(3) Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞と骨髄腫細胞株を共培養後、腫瘍前駆細胞の特徴である自己複製能をコロニーアッセイおよび SP 分画のサイズをフローサイトメトリーにて解析し、腫瘍前駆細胞への影響を明らかにする。骨髄腫細胞株 RPMI8226 や KMS-11 は SP 分画を認めソーティングできるためこれらの細胞株を中心に解析する (Leukemia 2012)。

検討(4) すでに作製している luciferase 導入ヒト骨髄腫細胞株 (RPMI 8226/luc) を移植した骨髄腫マウスモデルに、上記のようにして体外で増幅した Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞および新規抗骨髄腫薬を尾静脈もしくは左室腔から投与する。そして、*in vivo* イメージングを用いて、生体内での抗腫瘍効

果を評価し、さらに病理組織学的解析を行う。

#### 4. 研究成果

検討(1) 健常人から採取した末梢血単核球細胞に HMB-PP と LEN を添加し、1 週間培養すると  $\gamma\delta$ T 細胞が誘導された (図 1)。また ZOL と免疫調節薬 (LEN or POM) を用いて同様の検討をしたところ HMB-PP を用いた場合と同等に  $\gamma\delta$ T 細胞が誘導され、ZOL と IL-2 を用いて誘導したものより効率よく増幅した (図 2)。同様の実験を合計 11 人の健常ドナーから採取した末梢血単核球を使用して行ったが、ZOL と IMiDs (LEN or POM) を用いることで効率的に  $\gamma\delta$ T 細胞が誘導可能だった。一方で骨髄腫患者から採取した末梢血では  $\gamma\delta$ T 細胞の誘導効率は悪く、特に化学療法歴 (bortezomib など) を有する骨髄腫患者では、その傾向が強かった (図 3)。IMiDs を用いて誘導した  $\gamma\delta$ T 細胞は、IL-2 を用いて誘導したものより細胞内 IFN- $\gamma$  を高発現し、一方で Foxp3 の発現はわずかな Th<sub>1</sub> 様であった。さらに IMiDs を用いて誘導した  $\gamma\delta$ T 細胞では、細胞傷害関連因子である DNAM-1、NKG2D、perforin、granzyme B や細胞接着分子である LFA-1 などが高発現していた。一方で PD-1 mRNA も高発現していた。

検討(2) 健常人の末梢血単核球から誘導された Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞は、骨髄腫細胞株 (KMS-11、RPMI8226、U266) に対して抗骨髄腫活性をもたらした。これまでに我々は新規抗骨髄腫薬の候補として Pim 阻害薬の可能性について検討してきた。Pim 阻害薬である SMI-16a は、骨髄腫細胞の HSP70 の発現を誘導し、また ICAM-1、PVR の発現を保っていた (図 4 左)。SMI-16a の前処理の有無で骨髄腫細胞を洗浄した後に、IMiDs を用いて誘導した Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞を共培養し、抗骨髄腫活性を検討したところ、SMI-16a と Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞との sequential treatment の有効性が示された (図 4 右)。Bortezomib や carfilzomib などのプロテアソーム阻害薬は、骨髄腫細胞表面の HSP の発現を誘導したが、 $\gamma\delta$ T 細胞との併用効果は明らかではなかった。一方で HDAC 阻害薬である panobinostat は、骨髄腫細胞表面の NKG2D リガンド (MICA/B、ULBP) の発現を誘導させた (図 5)。今後は panobinostat による前処理の有無で骨髄腫細胞を洗浄した後に、Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞を共培養した実験を予定している。

検討(3) Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞と骨髄腫細胞株 (RPMI8226、KMS-11) とを共培養し、Hoechst33342 染色を用いて、SP 分画に及ぼす影響を検討したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞はこれらの骨髄腫細胞の SP 分画のサイズを著明に減少させた。さらに Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞が骨髄腫細胞の自己複製能にもたらす影響に関して、コロニーアッセイを用いて検討したところ、RPMI8226、KMS-11 のいずれの細胞株に対してもコロニー形成を著明に抑制した。

検討(4) RPMI 8226/luc を用いて、コントロール群ではこの RPMI8226 細胞を SCID マウスの皮下に移植し、 $\gamma\delta$ T 細胞治療群では、骨髄腫細胞と  $\gamma\delta$ T 細胞とを *in vitro* で培養し、SCID マウスの皮下に移植したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞治療群では *in vivo* イメージングシステムにおいて著明な腫瘍形成抑制効果を認めた (図 6)。

#### 研究の総括

本研究では、健常人から採取した末梢血単核球から ZOL と IMiDs もしくは HMB-PP と IMiDs を用いて体外で大量の  $\gamma\delta$ T 細胞が誘導され、従来の ZOL と IL-2 を用いた手法と比較しても効率的であった。さらに IMiDs を用いて誘導した  $\gamma\delta$ T 細胞は細胞内 IFN- $\gamma$  濃度が高い Th<sub>1</sub> 様であり、細胞傷害関連因子である DNAM-1、NKG2D や細胞接着分子である LFA-1 などが高発現していた。さらに Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞は、薬剤耐性細胞集団や腫瘍前駆細胞にも細胞傷害活性をもたらした (図 7)、 $\gamma\delta$ T 細胞は動物モデルにおいても腫瘍形成抑制効果をもたらすことが示唆された。新規抗骨髄腫薬を用いた検討では、Pim 阻害薬である SMI-16a が骨髄腫細胞表面の HSP の発現を誘導し、SMI-16a で前処理をした骨髄腫細胞と  $\gamma\delta$ T 細胞との併用では抗骨髄腫活性の増強作用を認めた。Panobinostat は骨髄腫細胞表面の MICA/B、ULBP などの発現を増強させるため、 $\gamma\delta$ T 細胞との併用効果が期待されるが、骨髄腫細胞表面の PD-L1 の発現を高め、活性化した  $\gamma\delta$ T 細胞は、PD-1 を発現している。Panobinostat を用いた場合、 $\gamma\delta$ T 細胞による細胞免疫療法の効果を高めるためには、PD-1/PD-L1 による腫瘍免疫の回避が重要であり、抗 PD-1 阻害抗体や免疫チェックポイント阻害薬の併用が重要と考えられ、今後の検討課題である

図 1

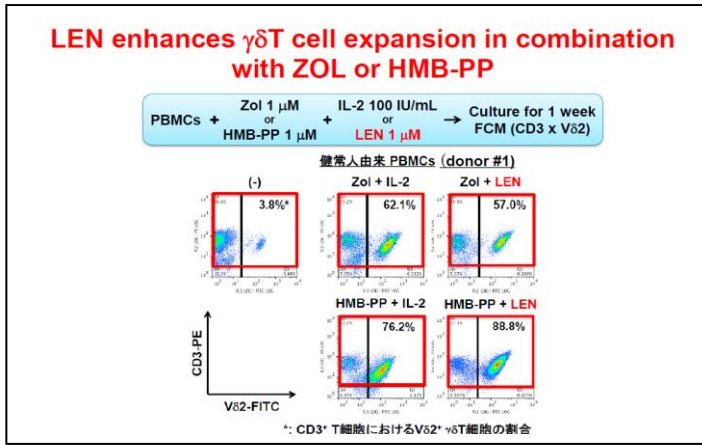


図 2

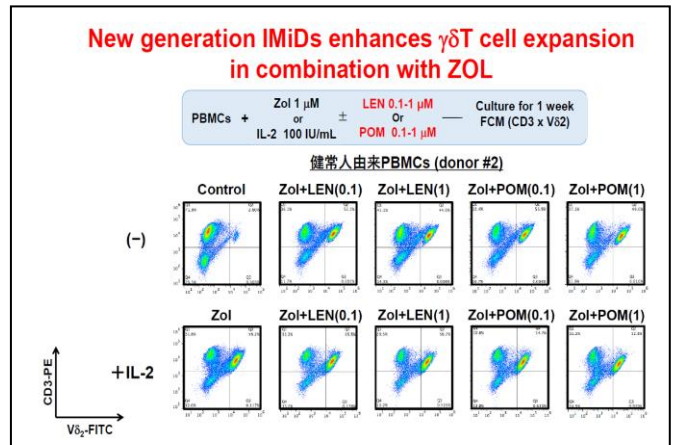


図 3

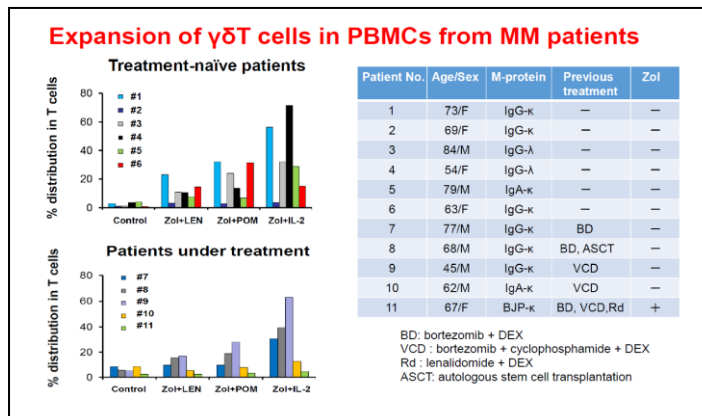


図 4

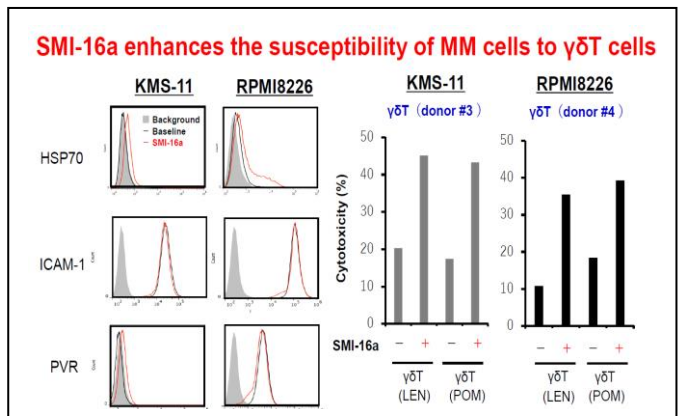


図 5

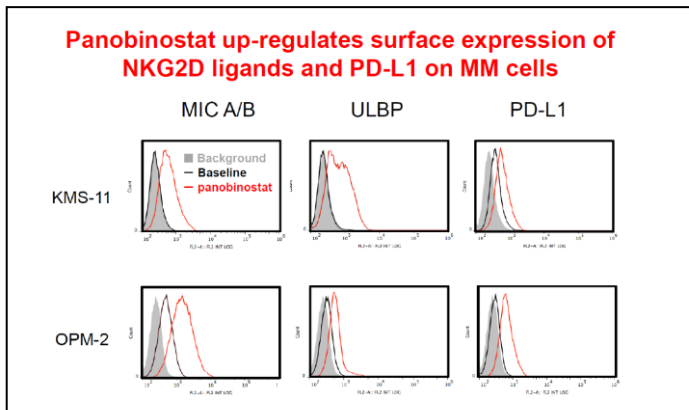


図 6

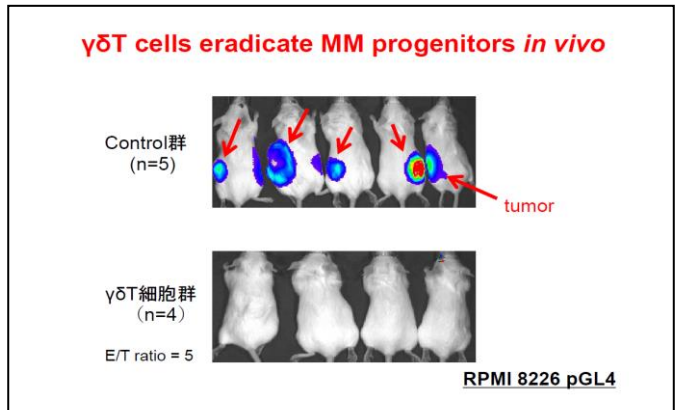
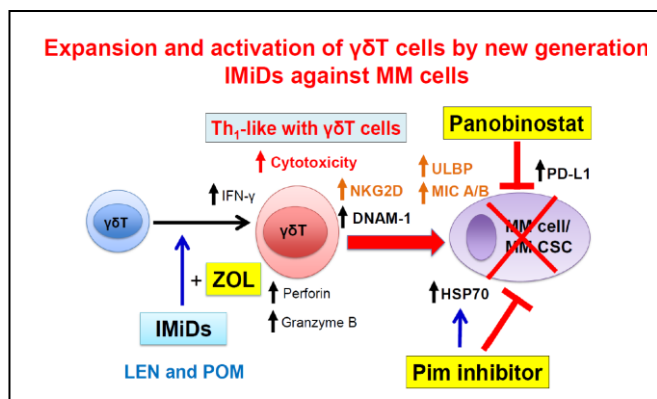


図 7



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Miki H, Nakamura S, Oura M, Hamano H, Ikuta K, Okada N, Okamoto Y, Sogabe K, Takahashi M, Iwasa M, Udaka K, Harada T, Kurahashi K, Fujii S, Yoshida S, Kagawa K, Endo I, Aihara KI, Abe M. | 4. 巻<br>186           |
| 2. 論文標題<br>Correlation between high serum alkaline phosphatase levels and denosumab-related hypocalcemia in patients with multiple myeloma.  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Haematology   | 6. 最初と最後の頁<br>355-358 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/bjh.15837   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Miki H, Nakamura S, Oda A, Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Maeda Y, Oura M, Takahashi M, Iwasa M, Harada T, Fujii S, Kurahashi K, Yoshida S, Kagawa K, Endo I, Aihara K, Ikuo M, Itoh K, Hayashi K, Nakamura M, Abe M | 4. 巻<br>12                |
| 2. 論文標題<br>Enhancement of myeloma cell drug susceptibility and targeting myeloma progenitors by hyperthermia.  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Oncotarget   | 6. 最初と最後の頁<br>10307-10316 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.18632/oncotarget.23121   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujii S, Nakamura S, Oda A, Miki H, Tenshin H, Teramachi J, Hiasa M, Bat-Erdene A, Maeda Y, Oura M, Takahashi M, Iwasa M, Endo I, Yoshida S, Aihara KI, Kurahashi K, Harada T, Kagawa K, Nakao M, Sano S, Abe M. | 4. 巻<br>180           |
| 2. 論文標題<br>Unique anti-myeloma activity by thiazolidine-2,4-dione compounds with Pim inhibiting activity.  | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Haematology   | 6. 最初と最後の頁<br>246-258 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/bjh.15033   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Tenshin H, Teramachi J, Oda A, Amachi R, Hiasa M, Bat-Erdene A, Watanabe K, Iwasa M, Harada T, Fujii S, Kagawa K, Sogabe K, Nakamura S, Miki H, Kurahashi K, Yoshida S, Aihara K, Endo I, Tanaka E, Matsumoto T, Abe M. | 4. 巻<br>1               |
| 2. 論文標題<br>TAK1 inhibition subverts the osteoclastogenic action of TRAIL while potentiating its antimyeloma effects.  | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Blood advances  | 6. 最初と最後の頁<br>2124-2137 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1182/bloodadvances.2017008813.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三木浩和, 中村信元, 大浦雅博, 前田悠作, 高橋真美子, 岩佐昌美, 原田武志, 藤井志朗, 賀川久美子, 遠藤逸朗, 栗飯原賢一, 安倍正博 |
| 2. 発表標題<br>高ALP血症は骨病変を有する骨髄腫患者のデノスマブ関連低カルシウム血症の発症予測因子である                             |
| 3. 学会等名<br>日本骨髄腫学会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>三木浩和                      |
| 2. 発表標題<br>多発性骨髄腫における溶骨性病変の発症機序とその治療 |
| 3. 学会等名<br>第57回日本リンパ網内系学会総会 (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2017年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三木浩和                        |
| 2. 発表標題<br>ALアミロイドーシスに対する治療戦略          |
| 3. 学会等名<br>第5回日本アミロイドーシス研究会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2017年                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|