

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19551

研究課題名(和文) Th1様 T細胞の効果的な増幅法と抗骨髄腫活性の増強法の開発

研究課題名(英文) Effective expansion of Th1-like gdT cells and anti-myeloma effects

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) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球細胞にゾレドロン酸と免疫調節薬(レナリドミド、ポマリドミド)を添加し、1週間培養したところ効率よくTh1様 T細胞が誘導・増幅された。このように誘導されたTh1様 T細胞は、骨髄腫細胞株の自己複製能を消失させ、薬剤耐性細胞を含むside populationを減少させた。しかし骨髄腫患者から採取した末梢血では T細胞の誘導は乏しかった。また温熱療法は骨髄腫細胞および骨髄腫前駆細胞に細胞傷害をもたらすが、温熱処理により骨髄腫細胞のHSPやULBPの発現は上昇し、また T細胞のDNAM-1の発現も上昇するため、 T細胞の骨髄腫細胞への感受性が高まることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：After PBMCs isolated from 10 normal donors were incubated for one week with Zol and lenalidomide (LEN) or pomalidomide (POM) in combination, T cells were robustly expanded as observed with Zol and IL-2 in combination. The expanded T cells expressed intracellular IFN- γ but not Foxp3, indicating induction of Th1-like T cells. The expansion efficiency with Zol plus these IMiDs appeared to be weaker in PBMCs from a majority of patients with multiple myeloma (MM) than those from normal donors. Such expanded Th1-like T cells exerted potent cytotoxic activity against MM 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. Hyperthermia induces MM cell death and up-regulated the surface expression of HSP and ULBP on MM cells. These results suggest that hyperthermia might enhance the susceptibility of MM cells to T-mediated immunotherapy.

研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 T細胞 温熱療法 腫瘍前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植や新規治療薬の導入などにより、多発性骨髄腫の生命予後は改善されつつあるが、骨髄腫は依然難治であり、新たな治療戦略の開発が必要である。骨髄腫が難治である原因として、本症に伴う免疫不全に加え化学療法やステロイドによる免疫担当細胞の機能の抑制が考えられる。従って、骨髄腫を治癒にもたすためには抗腫瘍薬による腫瘍の抑制に加え、腫瘍免疫の再構築・増強が不可欠と思われる。

血中や骨髄に存在する $V\gamma 9V\delta 2$ T (以下 $\gamma\delta$ T)細胞は、体外でゾレドロン酸および 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ヒト $\gamma\delta$ 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發揮することを報告した。一方、この抗骨髄腫活性は骨髄微小環境内において骨髄間質細胞の共存により減弱することも明らかとなり、その原因の1つとして、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。従って、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いた抗腫瘍免疫療法の治療効果を向上させるためには、より高い活性の $\gamma\delta$ T 細胞を十分量投与すること、腫瘍微小環境内で抗腫瘍活性を高く維持すること、そして標的の骨髄腫細胞の $\gamma\delta$ T 細胞への感受性を高めることが課題である。

そこで $\gamma\delta$ T 細胞の増幅法の検討を行い、NK 細胞を賦活し抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) の増強効果が注目されている新規抗骨髄腫薬の免疫調節薬 lenalidomide (LEN) とゾレドロン酸との併用、さらに LEN と $\gamma\delta$ T 細胞受容体 ($\gamma\delta$ TCR) の新規合成リガンドである (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) (長崎大学、田中義正先生より供与) を併用することにより、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を大幅に高めることに成功した。このようにして誘導された $\gamma\delta$ T 細胞は、増幅能が強く細胞傷害関連因子の NKG2D、DNAM-1 などを高発現し IFN- γ を産生する Th_1 様であった。本研究では第二世代免疫調節薬 (LEN、POM) を用いた体外での効率的な $\gamma\delta$ T 細胞の活性化および増幅法の開発と活性維持のための治療戦略を構築する。

さらに我々は、腫瘍組織をターゲティングし、T2 強調 MRI での腫瘍の局在診断が可能な酸化鉄を含有するマルチモーダルナノ粒子の作成に成功した。骨髄腫マウスモデルにこのナノ粒子を投与し磁場をかけると腫瘍病変部位が特定できるとともに、酸化鉄ナノ粒子から熱が発生するため腫瘍部位に限局

した細胞傷害を与えるという腫瘍選択的な温熱療法を開発した。熱処理は、骨髄腫細胞だけでなく腫瘍幹細胞を含む SP 分画にも細胞傷害をもたらす、骨髄腫細胞に $\gamma\delta$ T 細胞に抗原として認識される熱ショック蛋白 (HSP) の発現誘導とともに Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞の活性を高める NKG2D リガンドなどの発現を増強させることを見出した。従って、温熱療法を組み合わせた Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞による免疫療法は、骨髄腫細胞とともに腫瘍幹細胞をも標的とする革新的な新規治療法としての可能性が期待される。

2. 研究の目的

- (1) ゾレドロン酸と免疫調節薬 (IMiDs) による効率的な Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞の誘導法と共刺激分子の制御による増幅・活性化増強法の開発
- (2) 温熱療法による Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞の腫瘍前駆細胞に対する抗腫瘍効果の誘導
- (3) 温熱療法の併用による Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性増強効果の検討

3. 研究の方法

- (1) ゾレドロン酸と IMiDs による効率的な Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞の誘導法と共刺激分子の制御による増幅・活性化増強法の開発

末梢血単核球細胞にゾレドロン酸と IMiDs (LEN, POM) を種々の濃度および投与期間で添加培養後、 $\gamma\delta$ T 細胞の機能的サブセットの誘導・増幅効率と骨髄腫細胞株に対する細胞傷害活性を、従来のゾレドロン酸と IL-2 により誘導した $\gamma\delta$ T 細胞と比較検討する。 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化は、IFN- γ や IL-17 の産生量および CD25 の発現で評価し、副刺激分子として $\gamma\delta$ T 細胞の細胞障害活性に関わる DNAM-1、LFA-1 や NKG2D および CD26 の $\gamma\delta$ T 細胞における発現レベルをフローサイトメトリーで解析する。 Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞は IFN- γ 、制御性 $\gamma\delta$ T 細胞は Foxp3 の細胞内染色を行い評価する。骨髄腫細胞特異的障害活性は、蛍光色素 PKH26 で標識した骨髄腫細胞株を $\gamma\delta$ T 細胞と共培養後、7AAD 染色を行い PKH26 陽性骨髄腫細胞における死細胞の割合を算定し評価する。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。

- (2) 温熱療法による Th_1 様 $\gamma\delta$ T 細胞の腫瘍前

駆細胞に対する抗腫瘍効果の誘導
各種骨髄腫細胞株を遠心管に入れ熱処理 (39 ~ 43) を加え、経時的に回収し、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で評価し、また side population (SP) 分画のサイズをフローサイトメトリーにて解析し、熱処理による腫瘍前駆細胞への影響を明らかにする。さらに、このような熱処理後の骨髄腫細胞と共存培養すると、Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞の活性が高まり、腫瘍前駆細胞をも強力に傷害することをコロニーアッセイで評価する。そして、このような抗腫瘍効果を増強させる機序に関して、熱処理後の骨髄腫細胞での $\gamma\delta$ T 細胞の抗原となる熱ショック蛋白群の発現誘導の関与や、NKG2D ligand の ULBP 1/2/3 や MICA/B などの細胞傷害関連因子や ICAM-1、LFA-1 などの接着分子および PD-L1、CD28、PVR などの副刺激因子の発現変化の関与を検討する。また小胞体ストレスの誘導の有無やアポトーシス関連の蛋白発現なども評価検討する。

(3) 温熱療法の併用による Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性増強効果の検討

Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞の DNAM-1、PD-1、CD137 (4-1BB) などの共刺激分子の発現の変化を手がかりに、対応するリガンドの発現やこれらの発現調節に関わる機序を検討し、骨髄間質細胞がもたらす Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞の活性抑制機序の検討を進める。そして、PD-1 の阻害抗体 (AF1086) などの併用や、熱処理を加えた骨髄腫細胞株を共存させ、骨髄間質細胞との共培養により低下した $\gamma\delta$ T 細胞の DNAM-1 の発現や interferon の産生が回復するか否か、さらには抗骨髄腫活性を増強するかを検討する。

4. 研究成果

(1) 健常人から採取した末梢血単核球細胞にゾレドロン酸と LEN (1 μ M) もしくは POM (0.1 or 1 μ M) を添加し、1 週間培養したところ、 $\gamma\delta$ T 細胞が誘導され、IL-2 やゾレドロン酸を用いて誘導したものより効率よく増幅した (図 1)。一方で、骨髄腫患者から採取した末梢血では $\gamma\delta$ T 細胞の誘導効果は乏しく (図 2) 特に化学療法歴のある患者からのサンプルでは誘導効率は低下していた (図 3)。 $\gamma\delta$ T 細胞の機能的サブセット解析では、IL-2 を用いて誘導したものより細胞内 IFN- γ を高発現しており、一方で Foxp3 の発現はわずかであり、Th₁ 様であった (図 4)。また細胞傷害関連因子である DNAM-1、NKG2D や接

着分子 LFA-1 なども高発現していた (図 4)。

健常人の末梢血単核球から誘導された Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞は、KMS-11、RPMI8226、U266 などの骨髄腫細胞株や患者由来の骨髄腫細胞に対して、E/T 比依存的に抗骨髄腫効果をもたらした (図 5)。また $\gamma\delta$ T 細胞骨髄腫細胞株の自己複製能をコロニーアッセイを用いて検討したところ、RPMI8226、KMS-11 細胞において、いずれの細胞株においてもコロニー形成を著明に抑制した (図 5)。

さらに薬剤耐性細胞を含むと考えられる side population (SP) 分画細胞に及ぼす影響についても検討を加えた。 $\gamma\delta$ T 細胞と RPMI8226、KMS-11 細胞とを共培養し、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、骨髄腫細胞株の SP 分画のサイズを著明に減少させた (図 5)。

(2) 骨髄腫細胞株に温熱処理を加えたところ、時間および温度依存的に細胞死が誘導され (図 6) また RPMI8226、KMS-11 細胞において、温度依存的にコロニー形成を著明に抑制した (図 7)。さらに SP 分画のサイズも著明に減少させた (図 7)。温熱処理は小胞体ストレス関連因子である ATF4、CHOP などとともに HSP60、70、90 や ULBP などの発現を誘導し、その一方で IRF4、Pim-2、c-Myc などの発現は低下した (図 8)。さらに温熱療法は Pim 阻害薬 (SMI-16a) や bortezomib との併用により協調的に抗骨髄腫効果がもたらした。

(3) $\gamma\delta$ T 細胞に温熱処理を加えたところ $\gamma\delta$ T 細胞の DNAM-1 の発現は上昇した。さらに $\gamma\delta$ T 細胞は骨髄間質細胞と共培養した際に、DNAM-1 の発現は低下したが、温熱療法は、低下した $\gamma\delta$ T 細胞の DNAM-1 の発現を回復させ、抗骨髄腫活性も増強させた (図 9)。

これらの結果から、ゾレドロン酸と IMiDs を用いることで細胞傷害活性が高い Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞が体外で大量に増幅可能であること、さらに温熱療法は、骨髄腫細胞および骨髄腫前駆細胞にも強い細胞傷害をもたらす、かつ $\gamma\delta$ T 細胞の骨髄腫細胞に対する感受性を高めることが示唆された。また温熱療法は、骨髄腫骨髄微小環境においても $\gamma\delta$ T 細胞の骨髄腫細胞に対する抗腫瘍活性を維持できると考えられ、難治性造血器腫瘍である骨髄腫に対する新たな治療戦略となりうる可能性が示唆された。

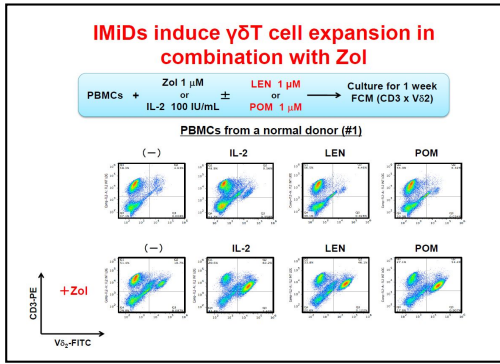


Fig 1

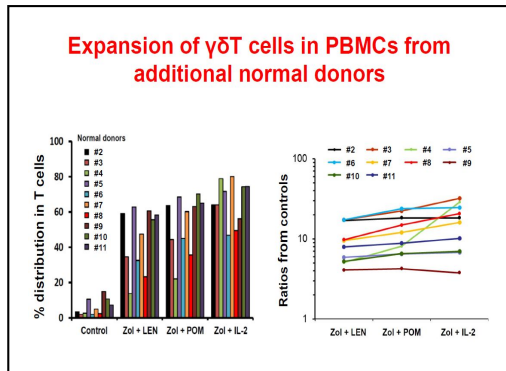


Fig 2

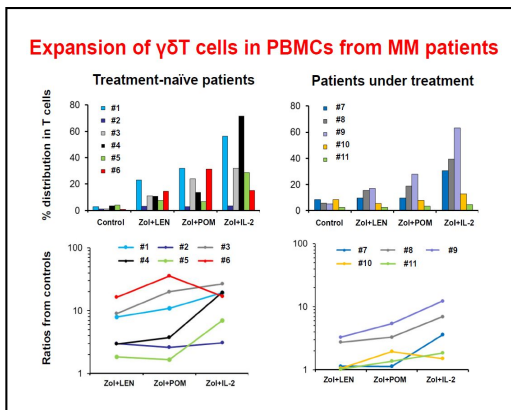


Fig 3

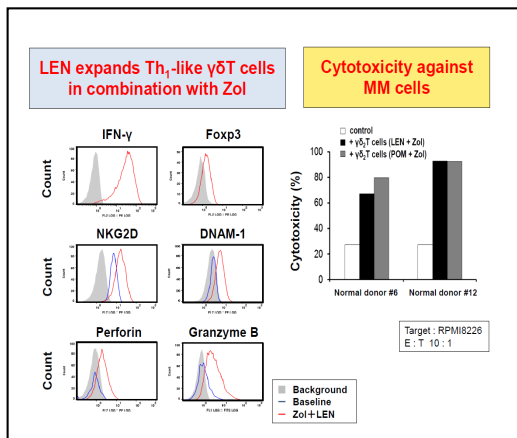


Fig 4

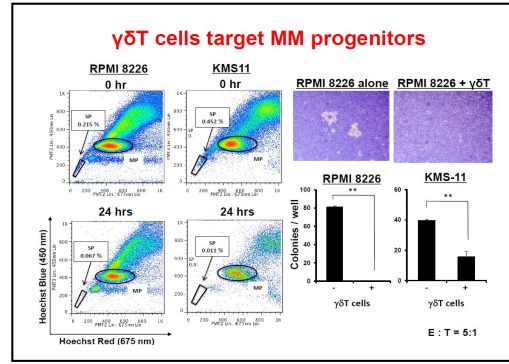


Fig 5

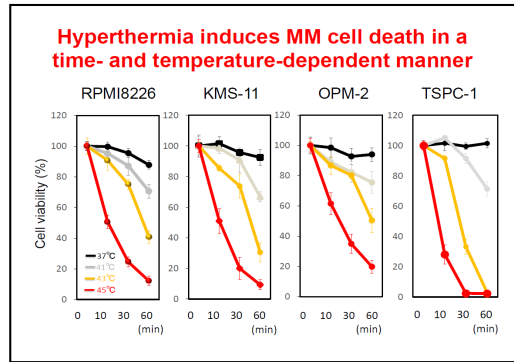


Fig 6

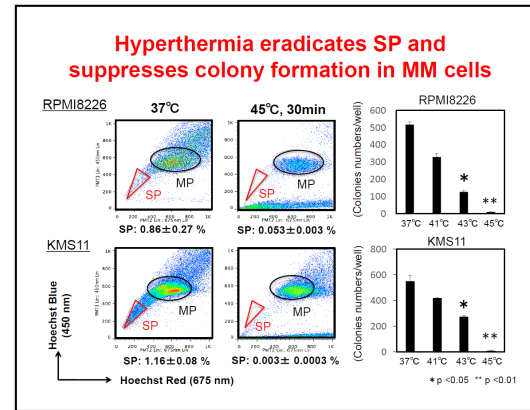


Fig 7

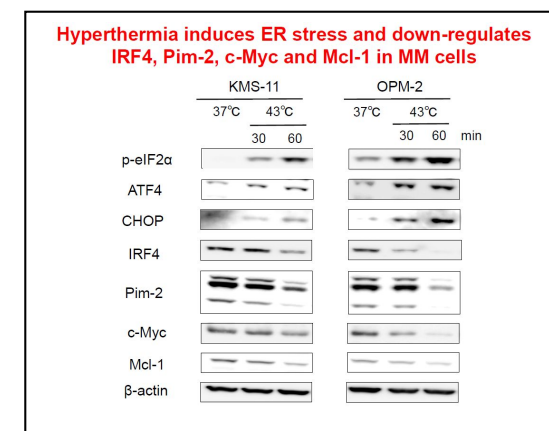


Fig 8

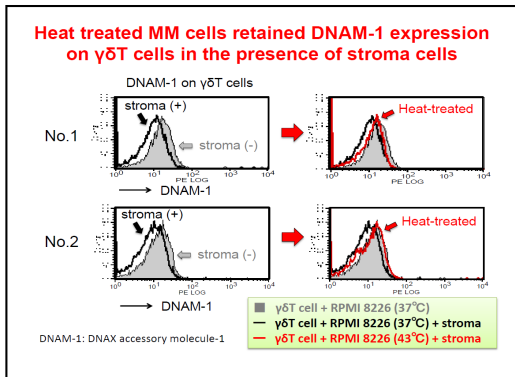


図 9

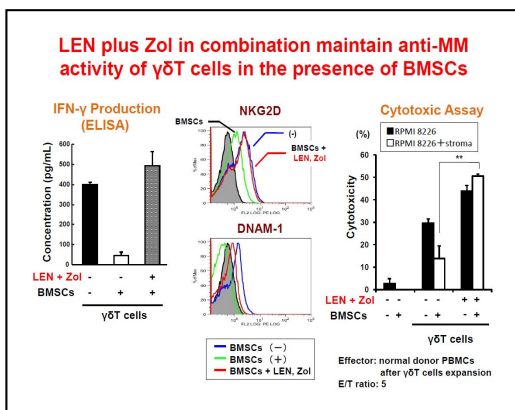


図 10

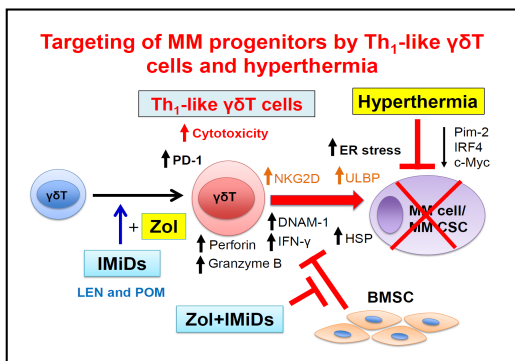


図 11

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Takeshi Harada* Hirokazu Miki*, (*equally contributed), Qu Cui, Asuka Oda, Ryota Amachi, Jumpei Teramachi J, Ariuzaya Bat-Erdene, Kimiko Sogabe, Masami Iwasa, Shiro Fujii, Shingen Nakamura, Kumiko Kagawa, Sumiko Yoshida, Itsuro Endo, Kenichi Aihara, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe. Expansion of Th1-like V γ 9V δ 2T cells by new generation IMiDs, lenalidomide and pomalidomide, in combination with zoledronic acid. **Leukemia**, 31(1):258-262, 2017 査読有
2. Ariunaya Bat-Erdene, Hirokazu Miki, Asuka Oda, Shingen Nakamura, Jumpei Teramachi, Ryota Amachi, Hirofumi Tenshin, Masahiro Hiasa, Masami Iwasa, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Kimiko Sogabe, Kumiko Kagawa, Itsuro Endo and Masahiro Abe. Synergistic targeting of transcription factor specificity protein 1, a critical transcription factor for myeloma cell growth and survival, by panobinostat and proteasome inhibitors. **Oncotarget**, 29;7(48):79064-79075, 2016 査読有
3. Ryota Amachi, Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Takeshi Harada, Asuka Oda, Shingen Nakamura, Derek Hanson, Keiichiro Watanabe, Shiro Fujii, Hirokazu Miki, Kumiko Kagawa, Masami Iwasa, Itsuro Endo, Takeshi Kondo, Sumiko Yoshida, Kenichi Aihara, Kiyoe Kurahashi, Yoshiaki Kuroda, Hideaki Horikawa, Eiji Tanaka, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe. A vicious cycle between acid sensing and survival signaling in myeloma cells: acid-induced epigenetic alteration. **Oncotarget**, 25;7(43):70447-70461, 2016 査読有
4. Derek James Hanson, Shingen Nakamura, Ryota Amachi, Masahiro Hiasa, Asuka Oda, Daisuke Tsuji, Koji Itoh, Takeshi Harada, Kazuki Horikawa, Jumpei Teramachi, Hirokazu Miki, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of

monocarboxylate transportation. **Oncotarget**. 6(32):33568-86, 2015 査読有

5. Hirokazu Miki, Shingen Nakamura, Asuka Oda, Ryota Amachi, Keiichiro Watanabe, Derek James Hanson, Jumpei Teramachi, Masahiro Hiasa, Hikaru Yagi, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Kengo Udaka, Takeshi Harada, Shiro Fujii, Ayako Nakano, Kumiko Kagawa, Masaki Ri, Shinsuke Iida, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe. Induction of endoplasmic reticulum stress by bortezomib sensitizes myeloma cells to DR5-mediated cell death. **International Journal of Myeloma** 5(1): 1-7, 2015 査読有
6. Masahiro Hiasa, Jumpei Teramachi, Asuka Oda, Ryota Amachi, Takeshi Harada, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Keiichiro Watanabe, Itsuro Endo, Yoshiaki Kuroda, Toshiyuki Yoneda, Daisuke Tsuji, Michiyasu Nakao, Eiji Tanaka, Kenichi Hamada, Shigeki Sano, Koji Itoh, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe M. Pim-2 kinase is an important target of treatment for tumor progression and bone loss in myeloma. **Leukemia** 29:207-217: 2015 査読有

[学会発表](計6件)

1. Expansion of $\gamma\delta$ T cells by new generation IMiDs and their cytotoxicity against myeloma progenitors. Hirokazu Miki, Takeshi Harada, Qu Cui, Asuka Oda, Hirofumi Tenshin, Ryota Amachi, Ryohei Sumitani, Munenori Uemura, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Masami Iwasa, Shiro Fujii, Jumpei Teramachi, Shingen Nakamura, Kumiko Kagawa, Shuji Ozaki, Masahiro Abe. 58th ASH annual meeting 2016.12.3 ~ 12.6. San Diego, USA
2. Expansion of Th₁-like $\gamma\delta$ T cells by lenalidomide or pomalidomide in combination with zoledronic acid. Hirokazu Miki, Takeshi Harada, Cui Qu, Hirofumi Tenshin, Ryota Amachi, Ryohei Sumitani, Munenori Uemura, Hikaru Fujino, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Masami Iwasa, Shiro Fujii, Jumpei Teramachi, Shingen Nakamura, Kumiko Kagawa, Masahiro Abe. 第78回日本血液学会学術集会2016年10月13日 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
3. 体外増幅 Th₁ 様 $\gamma\delta$ T 細胞の骨髄腫前駆細胞への抗腫瘍効果
三木浩和, 原田武志, 中村信元, 小田明日香, 藤野ひかる, 曾我部公子, 高橋真美子,

- 丸橋朋子, 藤井志朗, 天真寛文, 天知良太, 渡邊佳一郎, 寺町順平, 賀川久美子, 安倍正博 第41回日本骨髄腫学会学術集会2016年5月28日 徳島県徳島市あわぎんホール
4. Enhancement of myeloma cell drug susceptibility and targeting myeloma progenitors by hyperthermia Hirokazu Miki, Takeshi Harada, Shingen Nakamura, Asuka Oda, Hirofumi Tenshin, Ryota Amachi, Keiichiro Watanabe, Derek Hanson, Jumpei Teramachi, Hikaru Fujino, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Masaki Ri, Shinsuke Iida, Michihiro Nakamura, Yoshihiro Tsuruo, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe. 第77回日本血液学会学術集会2015年10月16日 石川県金沢市 ホテル日航金沢
 5. Effective impairment of myeloma progenitors by hyperthermia: augmentation with bortezomib and Pim inhibition in combination. Hirokazu Miki, Takeshi Harada, Shingen Nakamura, Hirofumi Tenshin, Ryota Amachi, Keiichiro Watanabe, Derek Hanson, Jumpei Teramachi, Hikaru Fujino, Kimiko Sogabe, Mamiko Takahashi, Tomoko Maruhashi, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Michihiro Nakamura, Yoshihiro Tsuruo, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe. 15th International Myeloma Workshop. 2015.9.23-26. Rome, Italy.
 6. 温熱療法は薬剤耐性骨髄腫前駆細胞を効率的に障害する
三木 浩和, 原田 武志, 藤井 志朗, 天知良太, 天真 寛文, 渡邊 佳一郎, Derek Hanson, 寺町 順平, 八木 ひかる, 曾我部 公子, 高橋 真美子, 丸橋 朋子, 宇高憲吾, 中村 信元, 賀川 久美子, 中村 教泰, 松本 俊夫, 安倍 正博 第40回日本骨髄腫学会学術集会2015年5月17日 熊本県熊本市 熊本森都心プラザ

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

藤井 志朗 (FUJII, Shiro)