

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860789

研究課題名(和文)新規抗骨髄腫薬を用いた T細胞の効率的な増幅と抗骨髄腫活性の増強法の開発

研究課題名(英文)Targeting myeloma progenitors by ex vivo-expanded gamma delta T cell

研究代表者

三木 浩和 (MIKI, Hirokazu)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：50511333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球細胞に新規合成 T細胞リガンド(HMB-PP)とレナリドミド(Len)を添加し、1週間培養したところ、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。T細胞の機能的サブセット解析では、細胞内IFN- $\gamma$ を高発現しており、HMB-PPとLenを用いて誘導した T細胞はTh1様であった。このようにして誘導されたTh1様 T細胞は、抗骨髄腫効果をもたらすとともに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分画細胞を減少させ、SCIDマウスにおいても骨髄腫細胞の腫瘍増殖抑制効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Lenalidomide (Len) was able to expand T cells more robustly in combination with HMB-PP than Zol from PBMCs from the majority of normal donors. However, Len alone did not show any significant effects on T cell expansion and activation, suggesting a costimulatory role of Len on Zol or HMB-PP-primed T cells. The surface expression of LFA-1, NKG2D, DNAM-1 and TRAIL were up-regulated in the expanded T cells. Len in combination with either Zol or HMB-PP enhanced intracellular IFN- $\gamma$  along with the surface NKG2D, suggesting robust induction of Th1-like T cells by Len. Importantly, T cells expanded with the combinatory treatments with Len and Zol or HMB-PP exerted potent cytotoxic activity against multiple myeloma (MM) cells. Interestingly, the expanded T cells markedly suppressed the colony formation in RPMI8226 and KMS-11 cells, and decreased in size their side populations, suggesting targeting a drug-resistant clonogenic MM cells.

研究分野：血液内科

キーワード：多発性骨髄腫 T細胞 lenalidomide

### 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、現行の抗腫瘍療法では治癒の困難な造血器悪性腫瘍であり、免疫療法などの異なった機序による新規治療法の開発が求められている。骨髄腫に治癒がもたらされない大きな原因として、骨髄腫細胞の生存・増殖の場である骨髄微小環境がもたらす骨髄腫細胞の薬剤耐性の獲得とともにNK細胞、細胞障害性T細胞や樹状細胞活性の抑制などによる免疫監視機構からのエスケープが考えられる。末梢血単核球にゾレドロン酸およびIL-2を添加し1週間培養すると体外で $\gamma\delta$ T細胞が活性化し100倍以上に増幅する。これまでの検討により、体外増幅ヒト $\gamma\delta$ T細胞は短時間で骨髄腫細胞を死滅させることより、体外増幅ヒト $\gamma\delta$ T細胞を用いた免疫療法は、エフェクター細胞の機能不全を併発する骨髄腫に有効であることを示した (Cui Q, et al. *Int J Hematol.* 2011)。しかしながら、この抗骨髄腫活性は骨髄間質細胞の共存下では減弱することが明らかとなり、骨髄間質細胞は腫瘍細胞の生存を直接促進させるだけでなく $\gamma\delta$ T細胞の活性も抑制することにより、 $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果を抑制していることが考えられた。体外で増幅させたヒト $\gamma\delta$ T細胞を用いた免疫療法は、主として固形癌を対象にその臨床応用が進められているが、 $\gamma\delta$ T細胞免疫療法の骨髄腫に対する治療効果を最大限に誘導するためには、骨髄腫細胞の生存・増殖の場である骨髄微小環境がもたらす $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍活性に及ぼす影響の実態を明らかにし、骨髄微小環境で $\gamma\delta$ T細胞が効率よく高い抗腫瘍活性を発揮できる治療戦略の構築が必要である。

Thalidomideの誘導体である新規抗骨髄腫薬 lenalidomide は、直接的な抗腫瘍作用とともにユニークな免疫調節作用を有しNK細胞や細胞傷害性T細胞の活性を高め、抗腫瘍活性や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。我々は最近、lenalidomide とゾレドロン酸の併用により末梢血単核細胞より $\gamma\delta$ T細胞が効率よく活性化され増幅することを見出した。このようにして誘導した $\gamma\delta$ T細胞には接着分子 DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1; CD226)が高発現しており、DNAM-1を介する副刺激が $\gamma\delta$ T細胞の骨髄腫細胞に対する細胞障害活性の発揮に重要な関与をすることが示唆された。骨髄間質細胞の共存下では、 $\gamma\delta$ T細胞のDNAM-1の発現が減少したが、lenalidomideの添加により $\gamma\delta$ T細胞のDNAM-1の発現とともに抗骨髄腫活性が回復・維持され、lenalidomideは $\gamma\delta$ T細胞の骨髄内での活性の維持に有用と考えられた。また、プロテアソーム阻害薬 bortezomib は骨髄腫細胞に $\gamma\delta$ T細胞の活性化に関与するHLA関連蛋白やheat shock proteinなどの発現を亢進させるため、骨髄腫細胞の $\gamma\delta$ T細胞に対する感受性を高める可能性が期待出来る。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞は抗体依存性細胞障害活性(ADCC)の惹起に必要なFc $\gamma$ 受容体(CD16)を

高発現しており、我々が作成しているヒト型化抗骨髄腫IgG抗体(HM1.24; *Blood.* 90(8): 3179-3186, 1997)と併用すれば $\gamma\delta$ T細胞によるADCC活性を誘導できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゾレドロン酸と新規抗骨髄腫薬 lenalidomide を併用した $\gamma\delta$ T細胞の効率的な増幅と抗腫瘍活性の維持増強法を開発することを目的に、1) lenalidomideの免疫増強作用を利用した $\gamma\delta$ T細胞の増幅と抗腫瘍活性増強法の開発とlenalidomideによる $\gamma\delta$ T細胞の活性化の機序の検討、2) lenalidomideによる骨髄腫細胞の $\gamma\delta$ T細胞に対する感受性の亢進法、3) 動物モデルにおける $\gamma\delta$ T細胞の抗骨髄腫効果の検討

### 3. 研究の方法

1) lenalidomideの免疫増強作用を利用した $\gamma\delta$ T細胞の増幅と抗腫瘍活性増強法の開発とlenalidomideによる $\gamma\delta$ T細胞の活性化の機序の検討

末梢血単核球にゾレドロン酸とlenalidomideあるいはゾレドロン酸とIL-2を添加培養後誘導された $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率とその骨髄腫細胞株に対する細胞障害活性を比較する。 $\gamma\delta$ T細胞の活性化は、interferon- $\gamma$ 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。骨髄腫細胞特異的障害活性は、蛍光色素PKH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、ゾレドロン酸とlenalidomideあるいはゾレドロン酸とIL-2の添加刺激による接着分子で細胞障害活性に関わるDNAM-1、LFA-1やNKG2DおよびCD26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し、 $\gamma\delta$ T細胞の骨髄腫細胞に対する細胞障害活性の機序を検討する。これまでの検討で誘導した $\gamma\delta$ T細胞には細胞傷害性Tリンパ球やNK細胞の活性化に関わる接着分子であるLFA-1とDNAX accessory molecule-1 (DNAM-1; CD226)が高発現していたため、これらの因子に特に着目し、これらの中和抗体を添加による $\gamma\delta$ T細胞の抗骨髄腫細胞活性への影響を検討する。

$\gamma\delta$ T細胞の骨髄腫骨髄微小環境に及ぼす影響を明らかにするために、単離骨髄間質細胞および末梢血由来単球にsRANKLおよびM-CSFを添加し形成させた破骨細胞と $\gamma\delta$ T細胞を異なるE:T比で共培養し、これらの細胞に対する細胞障害活性を調べる。また、免疫

抑制活性を持つ骨髄間質細胞の共存下での効率のよい  $\gamma\delta T$  細胞の増幅、活性化維持の条件を検討する。骨髄間質細胞存在下での末梢血単核球にゾレドロン酸と lenalidomide あるいはゾレドロン酸と IL-2 の末梢血単核球からの  $\gamma\delta T$  細胞の増幅効率と骨髄腫細胞に対する障害活性を解析する。骨髄間質細胞の共存下での  $\gamma\delta T$  細胞の DNAM-1、LFA-1 や NKG2D および CD26 など細胞障害活性に関わる因子の発現を広くフローサイトメトリーで解析する。

## 2) lenalidomide による骨髄腫細胞の $\gamma\delta T$ 細胞に対する感受性の亢進法

骨髄腫細胞に lenalidomide を添加後、 $\gamma\delta T$  細胞上の発現亢進する DNAM-1 のリガンドであるポリオウイルス受容体 (PVR) や Nectin-2、 $\gamma\delta T$  細胞の活性化をもたらす NKG2D リガンド、MICA や MICB など各種 HLA 関連因子やストレス関連蛋白および副刺激分子 CD80、CD86 の発現の変化をフローサイトメトリーで解析する。また、lenalidomide で前処理した骨髄腫細胞株の  $\gamma\delta T$  細胞に対する感受性を、無処理の骨髄腫細胞株と比較し検討する。

## 3) 動物モデルにおける $\gamma\delta T$ 細胞の抗骨髄腫効果の検討

ルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した RPMI8226 細胞を用いて、コントロール群には、この RPMI8226 細胞を SCID マウスの皮下に移植し、 $\gamma\delta T$  細胞群では、*in vitro* で、骨髄腫細胞と  $\gamma\delta T$  細胞とをインキュベーターで処理させ、SCID マウスの皮下に移植し、腫瘍径に関しては、*in vivo* イメージングシステムを用いて、解析する。 $\gamma\delta T$  細胞の投与細胞数、投与経路は既報の固形癌動物モデルのものを参考にしながら、この点は予備検討を行いながら評価する。また lenalidomide や bortezomib などの抗骨髄腫薬を併用した動物実験に関しても並行して検討する。

## 4. 研究成果

1) 2) 末梢血単核球細胞に新規合成  $\gamma\delta T$  細胞リガンド (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) と lenalidomide (1  $\mu M$ ) 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。 $\gamma\delta T$  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- $\gamma$  を高発現しており、一方で Foxp3 の発現はわずかであり、HMB-PP と lenalidomide を用いて誘導した  $\gamma\delta T$  細胞は Th<sub>1</sub> 様であった。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。

このようにして誘導された Th<sub>1</sub> 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。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 [RPMI 8226: 81 $\pm$ 1 (平均 $\pm$ SD) vs 0 $\pm$ 0; KMS-11: 40 $\pm$ 1 vs 16 $\pm$ 4 コロニー数/dish, それぞれ  $p < 0.01$ ]。

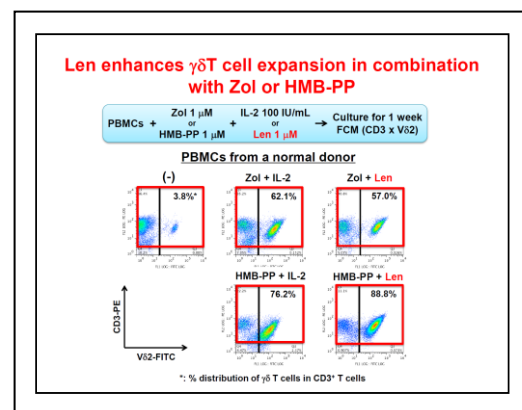
さらに薬剤耐性細胞を含むと考えられる side population (SP) 分画細胞に及ぼす影響についても検討を加えた。 $\gamma\delta T$  細胞と RPMI8226、KMS-11 細胞とを共培養し、Hoechst33342 染色を用いて、SP 分画に及ぼす影響を検討したところ、 $\gamma\delta T$  細胞は、骨髄腫細胞株の SP 分画のサイズを著明に減少させた。

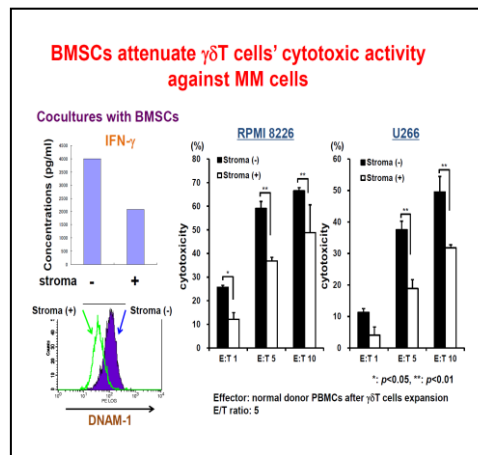
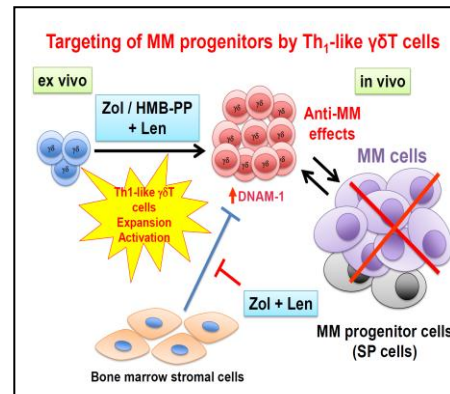
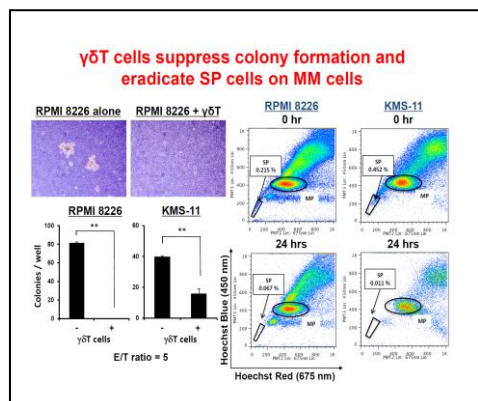
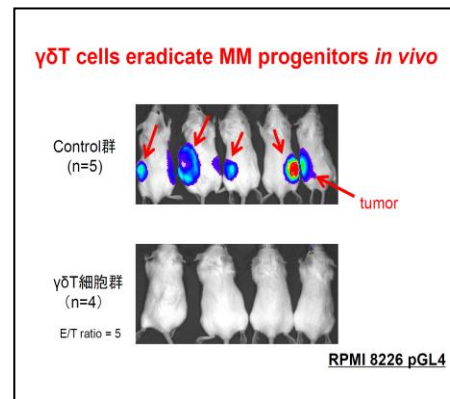
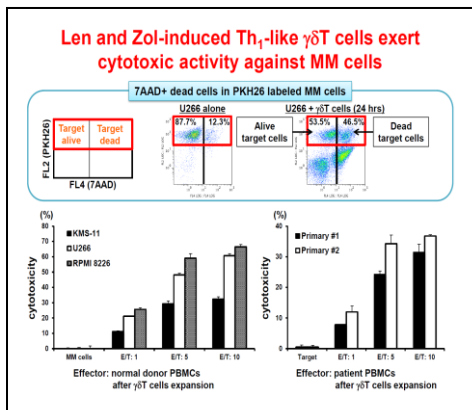
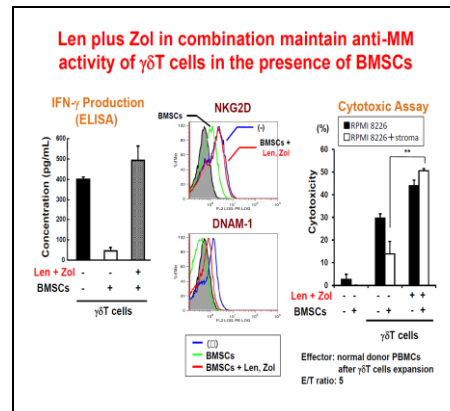
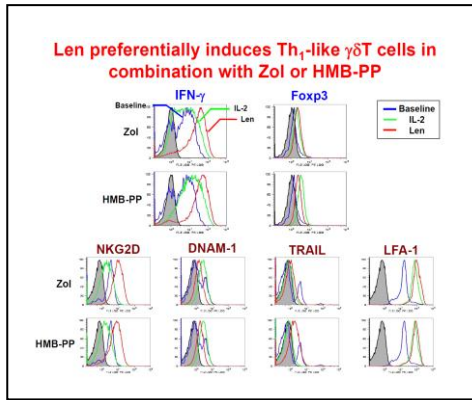
$\gamma\delta T$  細胞は骨髄間質細胞と共培養することで、 $\gamma\delta T$  細胞の DNAM-1 や細胞内 IFN- $\gamma$  濃度が低下し、抗骨髄腫活性が減弱した。しかし、Len と Zol の添加により、骨髄間質細胞存在下においても  $\gamma\delta T$  細胞の DNAM-1 や細胞内 IFN- $\gamma$  濃度の回復とともに、抗骨髄腫活性も回復した。

$\gamma\delta T$  細胞は骨髄間質細胞と共培養することで、 $\gamma\delta T$  細胞の DNAM-1 や細胞内 IFN- $\gamma$  濃度が低下し、抗骨髄腫活性が減弱した。しかし、Len と Zol の添加により、骨髄間質細胞存在下においても  $\gamma\delta T$  細胞の DNAM-1 や細胞内 IFN- $\gamma$  濃度の回復とともに、抗骨髄腫活性も回復した。

3) ルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した RPMI8226 細胞を、SCID マウスの皮下に移植したコントロール群に比較して、 $\gamma\delta T$  細胞で処理した (E/T=5) RPMI8226 細胞は、腫瘍形成能が著明に抑制されていた。

これらの結果から、 $\gamma\delta T$  細胞は、骨髄腫細胞に対して、抗骨髄腫効果を示し、骨髄腫前駆細胞にも強い細胞傷害をもたらす可能性が示唆された。





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 1 件)

1. Harada T, Ozaki S, Oda A, Fujii S, Nakamura S, Miki H, Kagawa K, Takeuchi K, Matsumoto T, Abe M. Association of Th1 and Th2 cytokines with transient inflammatory reaction during lenalidomide plus dexamethasone therapy in

multiple myeloma. International Journal of Hematology. 97(6):743-748,2013.査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

1. Takeshi Harada, Hirokazu Miki, Cui Qu, Shingen Nakamura, Asuka Oda, Mamiko Takahashi, Kengo Udaka, Masami Iwasa, Ryota Amachi, Masami Iwasa, Kengo Udaka, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Shuji Ozaki, Koichiro Hayashi, Michihiro Nakamura, Yoshimasa Tanaka, Toshio Matsumoto and Masahiro Abe. Targeting of myeloma progenitors by Th<sub>1</sub>-like  $\gamma\delta$ T cells and hyperthermia. 第 76 回日本血液学会学術集会 2014 年 11 月 1 日(大阪府大阪市)大阪国際会議場
2. 原田武志, 三木浩和, 崔衢, 中村信元, 小田明日香, 高橋真美子, 岩佐昌美, 宇高憲吾, 藤井志朗, 賀川久美子, 尾崎修治, 林幸彦郎, 中村教泰, 田中義正, 松本俊夫, 安倍正博. 体外増幅 Th<sub>1</sub> 様  $\gamma\delta$ T 細胞による骨髄腫前駆細胞を標的とした治療の開発. 第 39 回日本骨髄腫学会学術集会 2014 年 5 月 17 日(静岡県掛川市) 掛川グランドホテル
3. 三木浩和 骨髄腫の分子病態 最近のトピックス; 骨髄腫細胞の骨微小環境への順応と生存 第 39 回日本骨髄腫学会学術集会 2014 年 5 月 17 日(静岡県掛川市) 掛川グランドホテル
4. Takeshi Harada, Cui Qu, Shingen Nakamura, Hirokazu Miki, Asuka Oda, Ryota Amachi, Masami Iwasa, Kengo Udaka, Shiro Fujii, Kumiko Kagawa, Shuji Ozaki, Yoshimasa Tanaka, Toshio Matsumoto, Masahiro Abe. Robust induction of Th<sub>1</sub>-like  $\gamma\delta$ T cells with anti-myeloma activity by lenalidomide in combination with HMB-PP and zoledronic acid. 55<sup>th</sup> ASH annual meeting 2013.12.7~12.10. (New Orleans, Louisiana, U.S.A.)

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

三木 浩和 (MIKI, Hirokazu)

徳島大学・病院・助教

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

中村 信元 (NAKAMURA, Shingen)

原田 武志 (HARADA, Takeshi)