

京都大学	博士（医科学）	氏 名	Atif Saeed Mohammed Idrees
論文題目	Comparison of $\gamma\delta$ T cell responses and farnesyl diphosphate synthase inhibition in tumor cells pretreated with zoledronic acid (ゾレドロン酸処理した腫瘍に対する $\gamma\delta$ 型 T 細胞反応性とファーンシルニリン酸合成酵素阻害の比較)		
(論文内容の要旨)			
【目的】 窒素含有型ビスホスホン酸(N-BP)の一種であるゾレドロン酸 (Zol) を薬物治療に併用することによって乳がんの予後が改善することが知られている。この Zol の抗腫瘍効果に関しては、様々な作用機序が提唱されているが、一定の見解が得られていない。Zol を乳がんなどの腫瘍細胞に作用させると、エンドサイトーシスにより取り込まれ、ファーンシルニリン酸合成酵素 (FPPS) を特異的に阻害し、直上流に位置するイソペンテニルニリン酸 (IPP) の細胞内濃度が上昇する。また、N-BP 処理された腫瘍細胞はヒト $V\gamma 2V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を特異的に刺激し、サイトカイン産生、増殖誘導、細胞傷害性を惹起することが知られている。ここで、$V\gamma 2V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は IPP を特異的に認識することから、N-BP による FPPS 阻害が $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化に密接に関係していることが示唆されている。本研究では、$\gamma\delta$ 型 T 細胞に着目し、Zol の FPPS 阻害作用と $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化を定量的に比較することにより、Zol のもつ免疫細胞生物学的活性の解明を目指した。 【方法】 Zol による FPPS 阻害を定量化するために、下流の Rap1A グラニルゲラニル化阻害を定量化した。乳がん細胞を含む 73 種の腫瘍細胞を Zol の希釈系列で処理し、Rap1A のグラニルゲラニル化阻害をウエスタンブロッティング法により定量化し、IC₅₀ 値を得た。次に、Zol 処理した腫瘍細胞に対する $\gamma\delta$ 型 T 細胞の反応性を定量化するために、京大倫理委員会の承認を得たプロトコル G 280 に従い同意書を得た乳がん患者から末梢血より調整した末梢血単核球を Zol によって刺激して $\gamma\delta$ 型 T 細胞を誘導した。この $\gamma\delta$ 型 T 細胞を Zol 系列希釈で処理した腫瘍細胞に作用させ、TNF-α 産生を ELISA で測定し、EC₅₀ 値を得た。次に、これら IC₅₀ 値と EC₅₀ 値を比較し、FPPS 阻害と $\gamma\delta$ 型 T 細胞活性化との定量的相関関係を検討した。また、$\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体遺伝子導入の系を用いて、$\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体の役割についても検討した。最後に、$\gamma\delta$ 型 T 細胞の示す Zol 処理した腫瘍細胞への細胞傷害性について検討を行った。 【結果】 各種腫瘍細胞を Zol 希釈系列で処理し、FPPS 阻害作用を Rap1A のグラニルゲラニル化阻害作用を指標に定量化した結果、ほとんどの腫瘍細胞で IC₅₀ 値が 100 μ M 以下であったのに対して、リンパ系腫瘍やミエロイド系腫瘍では半数以上が 100 μ M 以上であった。乳がんはそれらの中間に位置していた。また、$\gamma\delta$ 型 T 細胞を Zol 希釈系列で処理した各種腫瘍細胞に作用させた際の TNF-α 産生を検討した結果、同様にリンパ系腫瘍やミエロイド系腫瘍で高い EC₅₀ 値が得られ、その他の腫瘍では 100 μ M 以下であった。乳がんは中間的な値を示した。各腫瘍細胞に関して IC₅₀ 値と EC₅₀ 値を比較すると、高い相関性が見られ、Zol による FPPS 阻害と $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化が密接に相関していることが明らかになった。また、$\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体の遺伝子導入の系を用いた結果から、$\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体からのシグナル伝達と IC₅₀ 値、EC₅₀ 値との相関も確認された。			

これにより、Zol による FPPS 阻害により細胞内に蓄積された IPP が $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化に関与していることが強く示唆された。また、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞による Zol 処理された腫瘍細胞に対する細胞障害性も IC₅₀ 値および EC₅₀ 値と相関することが明らかとなった。

【結論】腫瘍細胞を Zol 処理すると FPPS が阻害され、IPP が細胞内に蓄積する。この際に必要な Zol 濃度は、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の示す TNF- α 産生、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞受容体シグナル伝達、腫瘍細胞傷害性に必要な Zol 濃度と一致することから、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化は、Zol による腫瘍細胞の FPPS 阻害作用に密接に関与することが明らかとなった。これらの結果により、Zol の抗腫瘍効果として、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化が関与する可能性が強く示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

本研究は Zol の抗腫瘍効果について腫瘍に対する直接作用と $\gamma\delta$ 型 T 細胞を介する間接作用をそれぞれ定量的に評価し、両者の相関関係を検討したものである。Zol の FPPS 阻害作用に関して、RAP1A のグラニルゲラニ化を代替指標とし、非グラニルゲラニル RAP1A を測定することによって IC₅₀ を算出した。その結果、Zol に対する FPPS 阻害作用は腫瘍細胞によって差があるが、直接的な増殖抑制作用については差がないことを系統的に明らかにした。次に Zol 処理された腫瘍細胞を $\gamma\delta$ 型 T 細胞で共培養すると、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞からは殺細胞効果のある TNF α が産生されるが、算出した TNF α の EC₅₀ は、FPPS の IC₅₀ と正の相関がしていた。さらに $\gamma\delta$ 型 T 細胞の細胞傷害活性は Zol で処理された腫瘍細胞に効率よく誘導され、その誘導に必要な Zol 濃度は前出の IC₅₀, EC₅₀ とほぼ一致していた。以上の結果から Zol の抗腫瘍効果は直接作用よりはむしろ $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性化を介した間接作用よるところが大きく、その作用機序については Zol によって腫瘍細胞にリガンドである IPP が蓄積されていることが間接的にしめされている。この評価法を用いると、Zol の抗腫瘍効果を期待できるがんを予測することが可能となる。

以上の研究はゾレドロン酸による $\gamma\delta$ 型 T 細胞の活性の解明に貢献し乳癌の新たな治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医科学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 2 5 年 3 月 2 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである