

氏 名	佐 藤 澄
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1943 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Cytotoxic effects of $\gamma\delta$ T cells expanded <i>ex vivo</i> by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy (ビスフォスフォネートで <i>ex vivo</i> 増幅した $\gamma\delta$ T 細胞による免疫細胞療法)

論文調査委員 (主 査) 教 授 長 澤 丘 司 教 授 清 水 章 教 授 湊 長 博

論 文 内 容 の 要 旨

【背景】骨粗鬆症の治療薬として幅広く使用されているビスホスホネート (BP) は Ras 関連蛋白を非活性化することによる直接的な抗腫瘍効果を有する。直接的な抗腫瘍効果に加え、最近 T 細胞のひとつである $\gamma\delta$ T 細胞を特異的に増幅させる免疫的な作用があることがわかってきた。ヒト $\gamma\delta$ T 細胞は機能的には自然免疫系の一員であり、MHC 非拘束性に抗原を認識し強い腫瘍細胞障害性を示す。BP はメバロン酸代謝経路でファルネシルピロリン酸合成酵素を阻害するが、これにより代謝経路上流にあるイソペンテニルピロリン酸が細胞内に蓄積し、何らかの経路で細胞表面に提示され、いわゆる腫瘍抗原として $\gamma\delta$ T 細胞に認識される可能性が報告されている。つまり、BP で前処理しておくことで、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が増強される可能性が考えられた。

【目的】この仮説を検証するため、①第 3 世代 BP であるゾレドロンート (ZOL) で $\gamma\delta$ T 細胞を体外 (*ex vivo*) で特異的に誘導できるかどうか、②誘導可能なら、*ex vivo* 増幅された $\gamma\delta$ T 細胞をエフェクター細胞として用い、抗腫瘍効果が得られるか否か、さらに、③その効果が ZOL のがん細胞に対する前処理で増強されるかを、*in vitro* およびマウスモデルを用いて研究を行った。また、 $\gamma\delta$ T 細胞および ZOL による癌免疫療法の臨床応用への可能性についても検討を加えることを目的とした。

【方法】実験 1. 健康人の末梢血より分離した単核球を IL-2+ZOL の存在下で 2 週間培養し、ZOL による $\gamma\delta$ T 細胞の誘導効果をフローサイトメトリーで測定した。実験 2. 増幅した $\gamma\delta$ T 細胞をエフェクターとし、肺癌細胞株 SBC-5、線維肉腫細胞株 HT1080、白血病細胞株 K562 に対する *in vitro* での抗腫瘍効果を ^{51}Cr 放出試験で検討した。特に、標的がん細胞に対し ZOL の前処理の有無が *in vitro* での $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果に影響するかについて注目した。また同時に、ビデオ顕微鏡で経時的に $\gamma\delta$ T 細胞が標的細胞を攻撃する様子を観察した。実験 3. ルシフェラーゼ遺伝子を導入した SBC-5 をヌードマウスの皮下に移植し、i) 無治療群、ii) ZOL 単独群、iii) $\gamma\delta$ T 細胞単独群、iv) $\gamma\delta$ T+ZOL 群 の 4 群に分け、*in vivo* imaging system で経時的に $\gamma\delta$ T 細胞の効果を評価した。

【結果】実験 1 では、ZOL を $0.5\sim 1\ \mu\text{M}$ 加えた群で培養前と比較して 300~800 倍と著明な *ex vivo* 増幅効果が見られた。実験 2 では、いずれの細胞株に対しても ZOL を前処理することで明らかに細胞障害効果が増強した。また、ビデオ顕微鏡撮影では無処理群と比較して、ZOL 前処理群で $\gamma\delta$ T 細胞が標的細胞をより効率的に攻撃していることが確認された。実験 3 では、 $\gamma\delta$ T 細胞と ZOL の併用マウス群で、他の群と比較し有意に腫瘍の増殖が抑制された。

【結論】 $\gamma\delta$ T 細胞は *in vitro* のみならず、がん細胞移植マウスモデルでも強い抗腫瘍効果を示し、この効果はがん細胞自身を ZOL で前処理することで増強されることをはじめて証明した。以上の検討から、ZOL を併用した $\gamma\delta$ T 細胞によるがんの免疫療法は非常に強力な免疫療法になりうると考えられ、今後多くの疾患に対し臨床応用が可能と期待される。

論文審査の結果の要旨

申請者は、ビスホスホネート（BP）により特異的に増幅できる $\gamma\delta$ T 細胞による癌免疫療法の有効性について検討した。骨粗鬆症治療薬である BP は、MHC 非拘束性に抗原を認識し強い抗腫瘍効果を示す $\gamma\delta$ T 細胞を特異的に増幅させることが知られている。また、BP によりメバロン酸代謝経路でファルネシルピロリン酸（FPP）合成酵素が阻害され、細胞内でイソペンテニルピロリン酸（IPP）が蓄積するが、その IPP を $\gamma\delta$ T 細胞は抗原として認識すると言われている。申請者は癌細胞を BP で前処理することで $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が増強されるという仮説を検証するため、①第 3 世代 BP のゾレドロネート（ZOL）で $\gamma\delta$ T 細胞を特異的に増幅し得るか、②増幅された $\gamma\delta$ T 細胞を用い抗腫瘍効果が得られるか、さらにその効果が ZOL の前処理で増強されるかを、*in vitro* と *in vivo* で検討した。その結果、① ZOL で培養前より 300～800 倍と著明な増幅効果が得られ、② *in vitro* で ZOL の前処理にて明らかに細胞障害効果が増強し、マウス皮下移植モデルでも $\gamma\delta$ T 細胞と ZOL の併用群で、各々の単独群、無治療群と比較し有意に腫瘍の増殖が抑制されることを証明した。

本研究は ZOL を併用した $\gamma\delta$ T 細胞による癌の免疫療法の推定されるメカニズムと有用性を詳細に検討したものであり、今後の臨床応用へ寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）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 19 年 11 月 1 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。