

氏名 (生年月日) ^{きの} 佐野 ^{ゆうすけ} 友亮 (1994年1月7日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第223号

学位授与の日付 2023年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 低酸素環境下における多発性骨髄腫細胞の $\gamma\delta$ T細胞抵抗性の機序解明

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 藤室 雅弘

論文内容の要旨

序章

多発性骨髄腫 (MM) は形質細胞のがんであり、骨髄内で増殖し、造血抑制や免疫機能障害を引き起こす。近年の分子標的治療薬を用いた新たな治療法の拡充により、MMの治療成績は改善されたが、根治できる症例は一部である。その要因の1つとして、低酸素環境 (<1.3% O₂) である骨髄ニッチに存在する MM 幹細胞が既存の治療薬に抵抗性を示すことが示唆されており、MM 幹細胞に対する新規治療法の開発は MM 治療において最重要課題の1つである。今までの検討により、低酸素環境 (1% O₂) で長期間生存する MM 細胞 (MM-HA 細胞) 株は幹細胞性を示すことが明らかとなっている。

T細胞は $\alpha\beta$ T細胞と $\gamma\delta$ T細胞の2種類に大別でき、 $\alpha\beta$ T細胞は末梢血における主なT細胞集団であるが、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 拘束性にかん細胞を認識するため、MHC を欠失したがん細胞に対しては抗腫瘍効果を発揮することができない。一方、 $\gamma\delta$ T細胞は末梢血中にわずか数%しか存在しないが、ゾレドロン酸 (ZOL) などの窒素含有ビスホスホネート製剤により体外増幅できる。増幅された $\gamma\delta$ T細胞は、がん細胞表面の Butyrophilin 3A1 (BTN3A1) を認識し、MHC 非拘束性に抗腫瘍活性を發揮する。BTN3A1 は、ZOL などにより、がん細胞内にメバロン酸経路中間生成物イソペンテニルピロリン酸 (IPP) が蓄積することで構造が変化し、 $\gamma\delta$ T細胞受容体を介して $\gamma\delta$ T細胞に認識され細胞障害を受ける。本研究では、「 $\gamma\delta$ T細胞は、既存の治療薬に抵抗性を示す MM 幹細胞に対しても抗腫瘍効果を發揮する」と仮説を立て、幹細胞の性状を有する MM-HA 細胞に対する $\gamma\delta$ T細胞による抗腫瘍効果を検討した。

第1章 $\gamma\delta$ T細胞を用いた MM 細胞に対する抗腫瘍効果

末梢血中に少数存在する $\gamma\delta$ T細胞は ZOL と IL-2 を用いて体外増幅することができる。初めに、インフォームド・コンセントが得られた健常ボランティアから密度勾配遠心法により末梢血単核球 (PBMCs) を分離した。PBMCs に ZOL を1日間処置し、翌日より IL-2 を処置して10日間培養した。その結果、培養前はわずか1%程度だった $\gamma\delta$ T細胞は約90%まで増加し、かつ細胞数も約2400倍に増幅した。本培養法により $\gamma\delta$ T細胞は選択的に増幅された。次に、上述の方法により体外増幅させた $\gamma\delta$ T細胞を用いて、以降の実験を行った。通常酸素環境下 (20% O₂) で培養した MM 細胞株

(MM-Normo: RPMI8226-Normo、EJM-Normo、U266-Normo) および1か月以上低酸素環境下で培養したMM細胞株(MM-HA: RPMI8226-HA、EJM-HA、U266-HA)をそれぞれの酸素濃度環境下において $\gamma\delta$ T細胞と4時間共培養し、flow cytometry (FCM)法により抗腫瘍効果を評価した。その結果、 $\gamma\delta$ T細胞による抗腫瘍効果は、RPMI8226細胞では、通常酸素環境下および低酸素環境下で、それぞれ $56.4\pm 4.2\%$ 、 $25\pm 0.7\%$ 、EJM細胞ではそれぞれ $26.8\pm 4.6\%$ 、 $9.4\pm 0.9\%$ と、低酸素環境下では減少した。U266-Normo細胞への抗腫瘍効果は弱く、変化は認めなかった。また、通常酸素環境下と低酸素環境下における $\gamma\delta$ T細胞が産生する細胞傷害性分子等(perforin、granzyme B、IFN- γ)の発現をFCM法により比較したが、差は認められなかった。またMM細胞認識のための $\gamma\delta$ T細胞に発現する接着因子(LFA-1、NKG2D、DNAM-1)の発現量にも差を認めなかった。これらのことから、低酸素環境下で認めた $\gamma\delta$ T細胞に対する抵抗性の獲得は $\gamma\delta$ T細胞が要因ではないことが示唆された。

第2章 低酸素環境に適応したMM細胞の $\gamma\delta$ T細胞による細胞傷害性機能に対する抵抗性獲得機序

本章では、前章で明らかとなった低酸素環境下での $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果減弱のMM細胞における要因を探索した。まず、MM細胞の細胞接着分子(ICAM-1、MIC A/B、PVR)の細胞表面発現をFCM法で測定したが、環境間で発現強度に差は認められなかった。これらの接着分子以外にも、 $\gamma\delta$ T細胞のがん細胞認識には、がん細胞のBTN3A1の発現とIPPの蓄積が重要な役割を担っているため、次にBTN3A1の発現を検討したが、MM-Normo細胞とMM-HA細胞で変化はなかった。一方、IPPの蓄積量はLC-MS/MSにより測定したところ、RPMI8226細胞では通常酸素環境下で 7.1 ± 1.6 ngであったが、低酸素環境下では 0.47 ± 0.3 ngまで減少した。また、EJM細胞では通常酸素環境下では 2.8 ± 0.2 ngであったが、低酸素環境下では 0.2 ± 0.04 ngまで減少した。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞のMM細胞への遊走能を向上させるがん培養上清中のIPP量も、これら2株のMM-HA細胞では減少していた。また、IPP合成酵素(MVD)、IPP代謝酵素(FDPS)の発現量を比較したところ、MM-HA細胞においてタンパク発現量が低下していた。以上の結果から、MM-HA細胞はメバロン酸経路が抑制されることでIPPの産生量が減少し、 $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果に対して抵抗性をもつことが明らかとなった。

近年、BTN3A1が $\gamma\delta$ T細胞に認識されるための構造変化には、IPPの細胞内蓄積だけでなく、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質RhoBも寄与していることが報告されている。そこで、MM-HA細胞におけるRhoBのタンパク質発現を比較したところ、MM-HA細胞ではMM-Normo細胞よりもタンパク質発現が低下していた。以上の結果から、MM細胞は低酸素環境に適応することで、IPP産生量減少とRhoBの発現低下がもたらされ、BTN3A1の構造変化が抑制され、 $\gamma\delta$ T細胞からの攻撃を減弱させている可能性が示唆された。

総括

本研究により、低酸素環境に適応した幹細胞様MM-HA細胞では、メバロン酸代謝経路が抑制されIPP産生量が減少し、さらにRhoBのタンパク質発現量が低下することで、 $\gamma\delta$ T細胞のがん細胞認識機構から逃避する可能性が示された。これらのことから、 $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害性機能に対する抵抗性を獲得していると考えられる。本研究により明らかとなった幹細胞様MM細胞の $\gamma\delta$ T細胞による抗腫瘍効果抵抗性の獲得機序は、幹細胞様MM細胞に対する $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果を向上させるための足掛かりになると考える。本研究が、MM幹細胞の根絶を目指した新たな治療戦略の開発に貢献できることを期待する。

審査の結果の要旨

《緒言》

多発性骨髄腫（MM）は形質細胞のがんであり、骨髄内で増殖し、造血抑制や免疫機能障害を引き起こす。MM の治療成績は改善されたが、未だに難治性である要因の1つとして、MM 幹細胞が既存の治療薬に抵抗性を示すことが示唆されており、MM 幹細胞に対する新規治療法の開発はMM 治療において最重要課題の1つである。また、今までの検討により、低酸素環境（1% O₂）で長期間生存するMM 細胞（MM-HA 細胞）株は幹細胞性を示すことが明らかとなっている。

T 細胞の1種である $\gamma\delta$ T 細胞は、主要組織適合遺伝子複合体拘束性にかん細胞を認識する。がん細胞内のRhoB とイソペンテニルピロリン酸（IPP）が、がん細胞表面のButyrophilin 3A1（BTN3A1）の構造を変化させ、 $\gamma\delta$ T 細胞受容体を介して $\gamma\delta$ T 細胞がBTN3A1 を認識し、細胞障害機能を発揮する。本研究では、「 $\gamma\delta$ T 細胞は、既存の治療薬に抵抗性を示すMM 幹細胞に対しても抗腫瘍効果を発揮する」と仮説を立て、幹細胞の性状を有するMM-HA 細胞に対する $\gamma\delta$ T 細胞による抗腫瘍効果を検討した。

《審査結果》

第1章では、幹細胞様MM-HA 細胞に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。ヒト末梢血単核球にZOL とIL-2 を処置することで、 $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に体外増幅可能であることを示した。また、MM 細胞を低酸素環境下で1か月以上培養することで低酸素適応させ、MM-HA 細胞を樹立した。樹立したMM-HA 細胞と体外増幅した $\gamma\delta$ T 細胞を用いて抗腫瘍効果を検討した。その結果、 $\gamma\delta$ T 細胞が腫瘍効果を発揮するMM 細胞であっても、低酸素環境下に適応することで $\gamma\delta$ T 細胞による抗腫瘍活性に抵抗性を示すことが明らかとなった。抗腫瘍効果減弱要因の探索のため、 $\gamma\delta$ T 細胞の接着分子や細胞傷害性分子等の産生等を通常酸素環境下と低酸素環境下で比較したが変化はなかった。

第2章では、第1章の結果を踏まえ、MM-HA 細胞の $\gamma\delta$ T 細胞抵抗性獲得はMM-HA 細胞側に要因があるのではないかと推測し、 $\gamma\delta$ T 細胞抵抗性獲得機序を探索した。MM-HA 細胞の接着分子の発現に差は認められなかったが、BTN3A1 の構造変化に必要であるIPP の産生量をLC-MS/MSにより測定したところ、MM-HA 細胞で細胞内IPP が減少していた。また、 $\gamma\delta$ T 細胞のがんへの遊走に参与する培養上清中のIPP 量もMM-HA 細胞で減少していた。また、メバロン酸経路関連酵素もMM-HA 細胞で減少していた。さらに、IPP と同様にBTN3A1 の構造変化に参与しているRhoB もMM-HA 細胞においてタンパク発現量が減少していた。以上の結果から、MM-HA 細胞は、メバロン酸代謝経路が抑制されIPP 産生量が減少し、さらにRhoB のタンパク質発現量が低下することで、 $\gamma\delta$ T 細胞のがん細胞認識機構から逃避する可能性が示された。

《審査の結論》

本論文では、低酸素環境に適応した幹細胞様MM-HA 細胞は、 $\gamma\delta$ T 細胞による抗腫瘍効果に耐性を示すことを明らかとした。さらに、MM-HA 細胞はIPP 産生量を減少及びRhoB のタンパク質発現量を低下することで、 $\gamma\delta$ T 細胞のがん細胞認識機構から逃避していることが示唆された。本論文で明らかとした $\gamma\delta$ T 細胞による抗腫瘍効果抵抗性の獲得機序が、幹細胞様MM 細胞に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を向上させるための足掛かりになり、本研究がMM 幹細胞の根絶を目指した新たな治療戦略の開発に貢献できることを期待している。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。