

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

2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

佐野 友亮

## 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程  
氏名 (英字名) : 佐野友亮 (Yusuke Sano)  
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

### 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%  $O_2$ ) 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%  $O_2$ ) 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) 拘束性にご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発揮する。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。

### 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 (PBMNCs) を分離した。PBMNCs 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%  $O_2$ ) 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- $\gamma$ ) 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  $7.1 \pm 1.6$  ng であったが、低酸素環境下では  $0.47 \pm 0.3$  ng まで減少した。また、EJM 細胞では通常酸素環境下では  $2.8 \pm 0.2$  ng であったが、低酸素環境下では  $0.2 \pm 0.04$  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。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また、本論文は、一部、未発表データも含んでいる。

- 1) Yusuke Sano, Naoko Kuwabara, Saori Nakagawa, Yuki Toda, Shigekuni, Hosogi, Shinji Sato, Eishi Ashihara. Hypoxia-adapted multiple myeloma stem cells resist  $\gamma\delta$ -T-cell-mediated killing by modulating the mevalonate pathway. *Anticancer Res.* 2023, 43 (2), 547-555, doi: 10.21873/anticancerres.16191. [第 1、2 章]. Copyright HighWire Press

## 目次

### 略語一覧

序論 (はじめに) .....	1
第1章 $\gamma\delta$ T細胞を用いた MM 細胞に対する抗腫瘍効果 .....	4
第1節 緒言 .....	4
第2節 実験方法 .....	7
1. 試薬 .....	7
2. $\gamma\delta$ T細胞培養 .....	7
3. 細胞培養 .....	8
4. フローサイトメトリー法による $\gamma\delta$ T細胞の解析 .....	9
4-1. 末梢血単核球の表面抗原解析 .....	9
4-2. $\gamma\delta$ T細胞の接着分子の発現解析 .....	9
4-3. $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害性分子等の発現解析 .....	9
5. $\gamma\delta$ T細胞による MM 細胞に対する抗腫瘍効果の検討 .....	10
6. 統計解析 .....	10
第3節 実験結果 .....	11
1. ZOL と rhIL-2 を用いた $\gamma\delta$ T細胞の体外増幅 .....	11
2. 多発性骨髄腫細胞の低酸素適応 .....	13
3. $\gamma\delta$ T細胞の多発性骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果の検討 .....	14
4. $\gamma\delta$ T細胞の接着分子の比較 .....	16
5. $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害性分子等の発現比較 .....	17
第4節 考察 .....	19
第5節 小括 .....	21
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 .....	22
第1節 緒言 .....	22
第2節 実験方法 .....	23
1. 試薬 .....	23
2. 細胞培養 .....	23
3. フローサイトメトリー .....	23
4. 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析によるメバロン酸代謝経路における代謝 産物の定量 .....	23
5. ウェスタンブロッティング法による解析 .....	24
5-1. メバロン酸経路関連タンパク質の発現比較 .....	24

5-2. RhoB 及びヒストンのアセチル化の発現比較.....	25
6. 統計解析.....	26
第3節 実験結果.....	27
1. MM 細胞における細胞表面分子の発現解析.....	27
2. MM 細胞内 IPP および培養上清中 IPP 量の比較.....	29
3. MM-HA 細胞におけるメバロン酸経路の活性比較.....	34
4. MM-HA 細胞における RhoB のタンパク発現量比較.....	36
第4節 考察.....	37
第5節 小括.....	39
総括.....	40
謝辞.....	43
引用文献.....	43
Supplementary information.....	51

## 略語一覽

Ab	antibody
ABC	ATP binding cassette
Akt	protein kinase B
ALDH	aldehyde dehydrogenase
APC	allophycocyanin
ATCC	american type culture collection
BM	bone marrow
BSA	bovine serum albumin
BTN	butyrophilin
CAR	chimeric antigen receptor
CDKN	cyclin dependent kinase inhibitor
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CR	complete response
CSC	cancer stem cell
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DMAPP	dimethylallyl diphosphate
DNAM-1	DNAX accessory molecule-1
ET	effector cell: target cell
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
FDPS	farnesyl diphosphate synthase
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FPP	farnesyl pyrophosphate
Erk	extracellular signal-regulated kinase
GDP	guanosine diphosphate
GGPP	geranyl-geranyl pyrophosphate
GPP	geranyl pyrophosphate
GTP	guanosine triphosphate
HA	hypoxia adapted
HAT	histone acetyltransferase
HDAC	histone deacetylase
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon

ICAM	intercellular adhesion molecule
IG	immunoglobulin
IL-2	interleukin-2
IPP	isopentenyl pyrophosphate
LFA	lymphocyte function-associated antigen
MEK	mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
MGUS	monoclonal gammopathy of undetermined significance
MHC	major histocompatibility complex
MIC	MHC class I chain related gene
MM	multiple myeloma
MP	melphalan • prednisone
MRM	multiple reaction monitoring
MVD	mevalonate decarboxylase
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NFDM	non-fat dry milk
NKG2D	natural killer group 2 member D
Normo	normoxia
ORR	overall response rate
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PD	progressive disease
PE	phycoerythrin
PI	propidium iodide
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PR	partial response
PTA	tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino) ethylidene-1,1-bisphosphonate
PVDF	poly vinylidene difluoride
PVR	poliovirus receptor
Rh	recombinant human
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean
TCR	T cell receptor
VGPR	very good partial response
ZOL	zoledronic acid

## 序論 (はじめに)

多発性骨髄腫 (multiple myeloma; MM) は、抗体産生細胞である形質細胞性の腫瘍である。健常人の骨髄では未熟 B 細胞が造血幹細胞から分化し、その後未熟 B 細胞は末梢リンパ節に移動し、胚中心 (germinal center) において樹状細胞表面の抗原と反応して活性化され増殖する。この過程で体細胞超突然変異やクラススイッチを起こし、抗体産生能をもつ B 細胞へと成熟する。分化・成熟した B 細胞は骨髄に移動し、持続的に抗体を産生する形質細胞に分化していき、液性免疫能が発揮される。正常な形質細胞は複数種類の免疫グロブリン (IgG、IgA、IgM、IgD、IgM) を産生するが、形質細胞が腫瘍化した MM 細胞は単クローン性の免疫グロブリン (M タンパク) を産生するため外来微生物に対する免疫応答が出来ず、免疫機能が低下する。また、M タンパクは腎臓の糸球体や尿細管に沈着し、その結果、腎不全を引き起こす。さらに、MM が骨髄内 (bone marrow; BM) で増殖すると、造血機能の低下や破骨細胞の活性化による骨破壊なども引き起こす。MM は全悪性腫瘍の約 1%、造血腫瘍約 10%を占めている (1)。本邦の 2019 年の MM 罹患率は人口 10 万人あたり 6.0 例 (2)、また、2020 年の死亡率は人口 10 万あたり 3.4 人である (3)。

MM 細胞の起源は、post-germinal center B 細胞由来の長寿命型形質細胞へ分化する形質芽球であると考えられている。また、これまでは、MM 発症には免疫グロブリン領域 (immunoglobulin; IG) 転座が関与しており、この転座は体細胞超突然変異やクラススイッチに伴い生じるとされてきた (4)。次世代シーケンサーを用いた解析により、これらの IG 転座のうち約 2 割は骨髄の pro-B 細胞が DJ 再構成することで生じると明らかにされた (5)。このように発症した MM 細胞が増加していくことで、血清中に M タンパクが増加する monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) の状態となる。MGUS は MM の前がん病態とされており、MGUS がさらに進展することで症候性 MM となる (6)。MGUS から MM に移行するにつれて、がん遺伝子 KRAS の活性型変異、fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) の活性型点突然変異や cyclin dependent kinase inhibitor (CDKN) の不活性化がみられるようになる (7)。このように、MM は複数の遺伝子変異の蓄積により発症するものであり、多種多様な遺伝子異常が複雑に関わるため、1 個の細胞から発症した MM であっても、MM 腫瘍内は極めて不均一であることが明らかにされた (8-10)。

アルキル化剤であるメルファランは、1962 年に MM 治療薬としての有効性が認められた (11)。その後、登場したプロドニゾロン (12) との併用療法であるメルファラン+プレドニゾロン (melphalan・prednisone; MP) 療法が有効性を示した以降 (13)、長年にわたり、この MP 療法が MM 治療に用いられてきた。しかしながら、MP 療法の完全奏効率 (complete response; CR) は 5%未満、全生存期間中央値は約 3 年であり、治療成績は決して高くなかった (14)。その後、MM の分子病態が解明され、これらの病態に基づいた分子標的薬が開発されてきた。2000 年代には、免疫調整薬であるサリドマイドやレナリドミド (15)、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブ (16) などの登場に加え、2015 年以降に抗体薬であるエロツズマブ、ダラツズマブ (17) が登場し、MM 患者の 5 年生存期間が 50%となり (18)、MM に対する治療成績は大きく改善された (Table1)。ダラツズマブ、ボルテゾミブとデキサメタゾンの併用療

法では、CR が 14.6%、部分奏効 (partial response; PR) が 18% (19)、イキサゾミブとレナリドミドの併用療法では、最良部分奏効 (very good partial response; VGPR) 以上の反応が 48%を示している (20)。しかしながら、全生存率は未だに低く、根治は困難であるとされている。

**Table 1. Clinical studies novel molecular targeted agents against MM**

Therapies	Clinical outcomes	References
Daratumumab	CR: 14.6%、PR: 23.8%、SD: 10%、PD: 2.1%	(21)
Daratumumab +Pomalidomide +Dexamethasone	ORR: 60%、CR: 9%、PR: 18%	(19)
Lenalidomid	ORR: 72%、 $\geq$ VGPR: 39%、 $\geq$ CR: 7%	(20)
Ixazomib + Lenalidomid	ORR: 78%、 $\geq$ VGPR: 48%、 $\geq$ CR: 12%	(20)

ORR, overall response rate; CR, complete response; PR, partial response; VGPR, very good partial response; PD, progressive disease

MM を含め、がん治療における治療抵抗性の要因の 1 つとして、がん幹細胞 (cancer stem cell: CSC) の存在が考えられている。CSC は、正常幹細胞と同様に自己複製と多分化能を併せ持つ細胞で、細胞増殖が静止状態である G0 期の細胞集団を多く含み (22)、既存の治療薬に抵抗性を示し、その結果、がんの再発をもたらす。MM 幹細胞においても、デキサメタゾンやボルテゾミブなどの既存治療薬に抵抗性を示すことが明らかとなっている (23)。CSC の形成には、現在 2 種類の仮説が提唱されている。1 つ目は、正常幹細胞が加齢や炎症などさまざまなストレスを持続的に受けることで、変異することによる CSC 化である。2 つ目は前駆細胞や成熟・分化した細胞に遺伝子変異が生じ、がん化するとともにリプログラミングを受けることで幹細胞性を獲得し CSC と変化する仮説であり (24)、MM 幹細胞は後者の幹細胞化が考えられる。正常幹細胞がその幹細胞性を維持し生存するためには微小環境 (ニッチ) が必要であるのと同様に、CSC においてもニッチが重要な役割を果たしている (24)。

MM 細胞は BM (酸素濃度 10%未満) に主に存在し (25)、さらに造血幹細胞が住みかとする低酸素状態の BM ニッチ (酸素濃度 1.3%未満) においても存在している (26)。この BM ニッチに存在する MM 細胞のモデルとして、長期間 1%酸素環境下で培養した MM 細胞の性状を解析した。がん幹細胞は「細胞増殖速度の低下」、「G0 期の細胞分画の増加」、「自己複製能」、「多分化能」などの性質を持ち、MM-HA 細胞は通常酸素環境下で培養した MM 細胞と比較して「増殖速度の低下」、「G0 期の細胞分画の増加」、「自己複製能の上昇」の特性を持つことが明らかとなった。すなわち、低酸素環境下に適応した MM 細胞は幹細胞性を示すことが明らかとなった (26)。上述のように、MM の治療は分子標的治療薬の拡充により近年大きく変化し、病態コントロールが実現されつつある。しかしながら、MM 幹細胞は既存治療に対して高い抵抗性を示すこと (23)から、未だに根治には至っておらず、MM の根治を目指すためにはこれまでとは異なる治療アプローチが必要である。そこで、我々は MM の根治を目指し

た新たな治療アプローチとして、がん免疫療法に着目した。

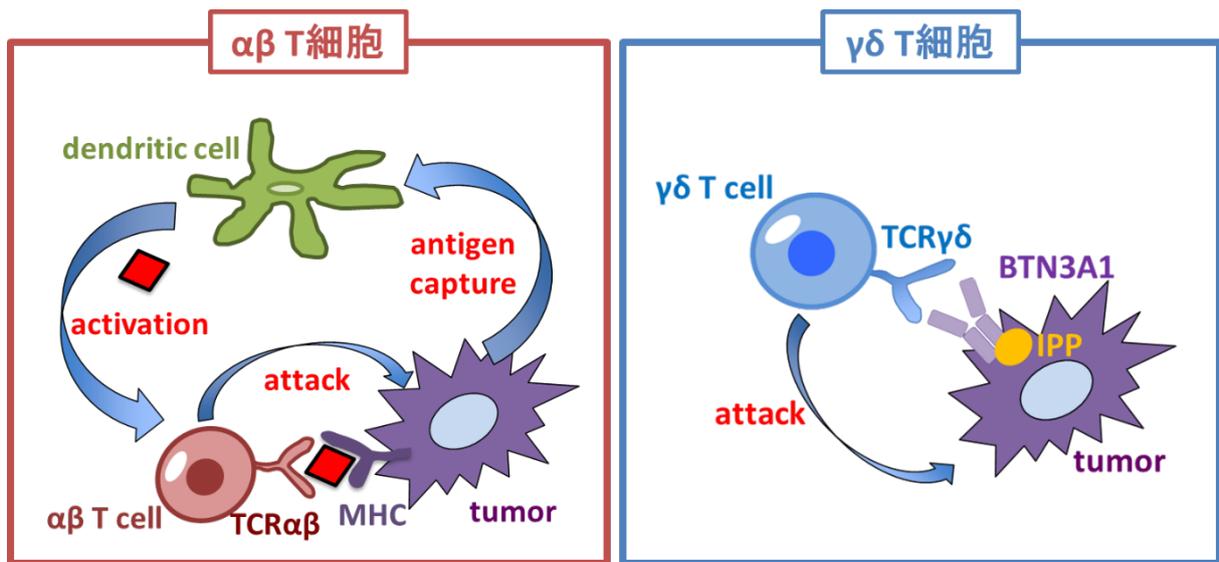
がん免疫療法は、1891年にアメリカの外科医 William B. Coley が細菌感染による悪性腫瘍の縮小を発見したことから始まったとされている (27)。それ以降、多くの研究者によりがん免疫研究が行われ、1950年代には、本来は自己の細胞であるがん細胞が非自己と認識されるがん抗原を有するために、自己の免疫機構により排除されるがん免疫応答が「がん免疫監視機構」として提唱され (28)、現在では「がん免疫編集」という概念に発展している (29)。この概念では、免疫細胞による監視機構が存在するにもかかわらず、がん細胞が腫瘍抗原の発現低下や免疫抑制能を獲得すると、免疫監視機構を回避できるようになったがん細胞が生き残り、腫瘍が進展していくとされている。免疫反応の中で細胞性免疫に関わる T 細胞は、非自己抗原を認識し外来異物に攻撃をする自然免疫と、非自己抗原が major histocompatibility complex (MHC) 分子により抗原提示されることで惹起される獲得免疫の 2 種類の作用を持つ。T 細胞はその細胞表面に発現する受容体により、 $\alpha\beta$  T 細胞と  $\gamma\delta$  T 細胞の 2 種類に大別される。 $\alpha\beta$  T 細胞はがん細胞膜に発現する MHC クラス I 上に提示された腫瘍抗原を認識し、抗腫瘍活性を示す。しかしながら、がんはその進展に伴い MHC 分子が欠失するものが現れ、これらのがん細胞は  $\alpha\beta$  T 細胞の免疫機能から逃避してしまう。一方、 $\gamma\delta$  T 細胞はがん細胞の産生するピロリン酸モノエステルを抗原として活性化され、MHC 非拘束性にごん細胞に抗腫瘍活性を示す。そのため、既存治療薬に対して抵抗性を示す MM 幹細胞に対しても  $\gamma\delta$  T 細胞は抗腫瘍効果を発揮すると推測し、本研究では MM 幹細胞に対する  $\gamma\delta$  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

### 第1節 緒言

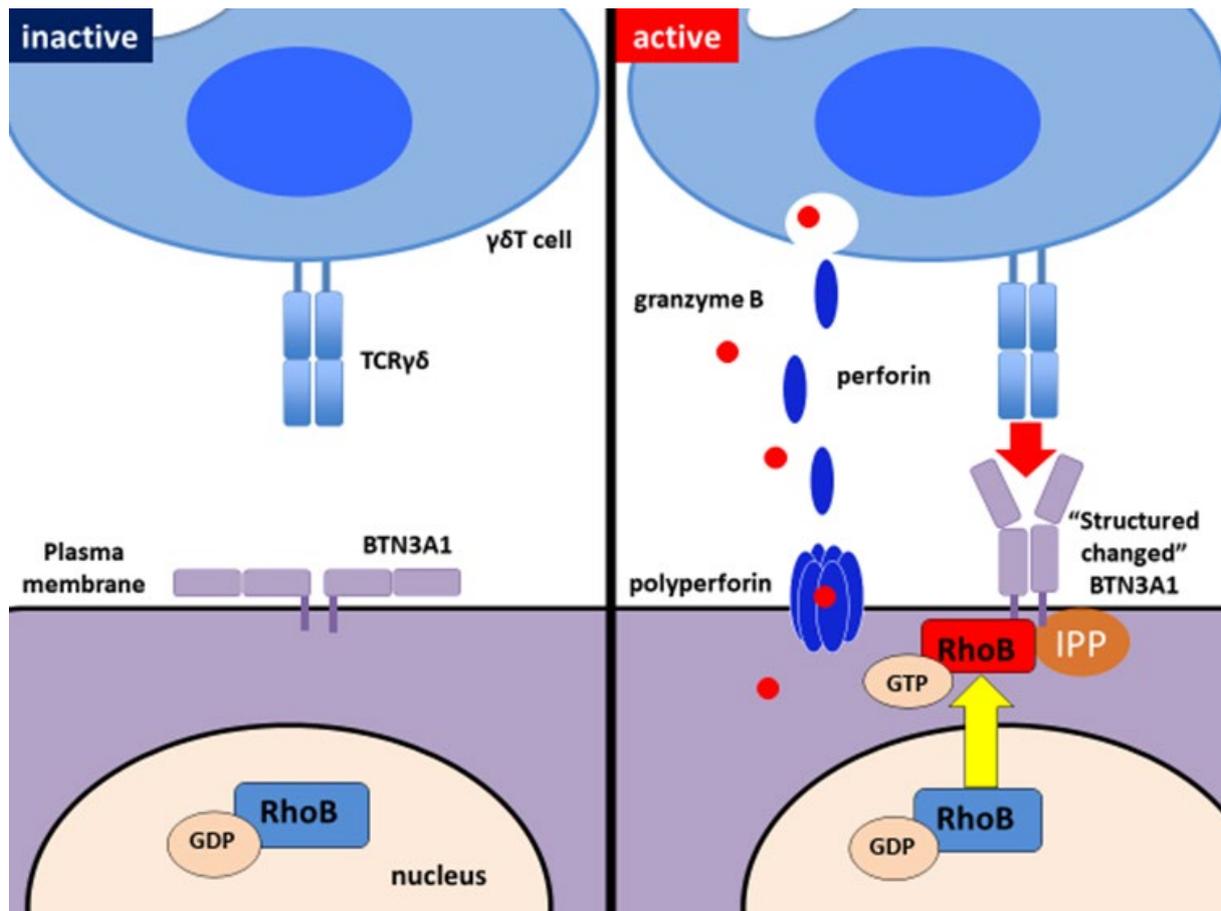
MM は形質細胞のがんであり、MM 細胞は BM 内で増殖し、造血を抑制して免疫機能障害を引き起こす。MM 細胞は M タンパク質を産生・分泌し、腎臓障害を誘発する。近年、MM に対する新しい分子標的薬の適用により、本疾患の予後が改善されている (30–33)。しかし、これらの新規治療薬の登場にもかかわらず、MM は依然として不治の病である。MM の根治が困難である理由の一つは、MM 幹細胞が既存の治療薬に抵抗性を示すことがある (34)。したがって、MM の根治を目指す上で、MM 幹細胞を根絶することを目的とした治療戦略の開発は必要不可欠な問題である。我々は以前、低酸素状態の BM ニッチに存在する MM 細胞は低酸素状態 (1% O<sub>2</sub>) に適応しており、幹細胞様の特性を示すことを明らかにした (26)。

T 細胞は、T cell receptor (TCR) の種類により  $\alpha\beta$  T 細胞と  $\gamma\delta$  T 細胞に分類される。 $\alpha\beta$  T 細胞は末梢血中の主たる T 細胞集団であり、樹状細胞上の MHC 分子上に提示された抗原を  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖からなる TCR により認識し、非自己を攻撃する。一方、 $\gamma\delta$  T 細胞は末梢血中の存在量が非常に少なく、ほとんどが腸管や皮膚に存在し、外来微生物に対する生体防御として働いている。ヒト  $\gamma\delta$  T 細胞の V $\gamma$  遺伝子は 6 種類、V $\delta$  遺伝子は 3 種類しかなく、腸管や皮膚上の  $\gamma\delta$  T 細胞は V $\delta$ 1 T 細胞、末梢血液中の  $\gamma\delta$  T 細胞は主に V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 (または V $\gamma$ 2V $\delta$ 2) T 細胞である (35)。この V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T 細胞 (以下、 $\gamma\delta$  T 細胞は V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T 細胞を示す) は  $\gamma$  鎖と  $\delta$  鎖からなる TCR (TCR $\gamma\delta$ ) を有し、細菌等では非メバロン酸経路の中間代謝産物 (E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルニリン酸を抗原として認識し、また真核生物ではメバロン酸代謝経路の中間代謝産物 isopentenyl pyrophosphate (IPP) を抗原として認識し、増幅・活性化されると報告された (36,37) (Figure 1)。また、 $\gamma\delta$  T 細胞はビスホスホネート製剤と Interleukin-2 (IL-2) を用いることで体外増幅でき、ビスホスホネート製剤を前処置したがん細胞に対して MHC 非拘束性に抗腫瘍効果を発揮することが明らかにされてきた (38–41)。これは、ゾレドロン酸 (zoledronic acid; ZOL) などの含窒素ビスホスホネート製剤が、メバロン酸経路の farnesyl diphosphate synthase (FDPS) を阻害し、標的細胞に IPP を蓄積させ、これを  $\gamma\delta$  T 細胞が認識するためであると考えられていた (42,43)。しかしながら、近年、 $\gamma\delta$  T 細胞は標的細胞の細胞表面上に発現する糖タンパク質であるブチロフィリン (Butyrophilin; BTN) 3A1 や BTN2A1 を認識してがん細胞に接着することが明らかにされ (44)、さらに標的細胞に蓄積した IPP が BTN3A1 の B30.2 ドメインに結合し、BTN3A1 の構造変化が誘導される。構造変化した BTN3A1 は、TCR $\gamma\delta$  と結合する能力を獲得し、最終的に  $\gamma\delta$  T 細胞の活性化を誘導することが明らかとなった (45–47) (Figure 2)。これらの知見をふまえ、これまで様々ながん種に対して  $\gamma\delta$  T 細胞を用いた免疫療法の臨床試験が行われており、その安全性が示されてきた (48–51)。がん細胞においては、正常細胞と比較してメバロン酸経路が活性化していることから IPP が多く蓄積しており (52)、 $\gamma\delta$  T 細胞ががん細胞を特異的に認識可能である。そのため、 $\gamma\delta$  T 細胞が MM 幹細胞に対する有効な治療法になり得ると考えた。本章では、MM 幹細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞免疫療法の開発に向け、幹細胞様 MM 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞による細胞傷害性を検討した。



**Figure 1. Antigen recognition mechanisms of  $\alpha\beta$  T cells and  $\gamma\delta$  T cells**

$\alpha\beta$  T cells recognize cancer cells in a major histocompatibility complex (MHC)-restricted manner. By contrast,  $\gamma\delta$  T cells perform their antitumor cytotoxic functions independently of MHCs. TCR, T cell receptor; BTN, butyrophilin; IPP, isopentenyl pyrophosphate.



**Figure 2. Conformational changes in BTN3A1 by RhoB and IPP**

GTP-bound RhoB binds to the intracellular domain of BTN3A1 and modulate the mobility of BTN3A1 in the cellular membrane. Additionally, the binding of intracellular IPP to the intracellular domain induces the conformational change of BTN3A1. Consequently,  $\gamma\delta$  T cells recognize BTN3A1 protein. GTP, guanosine triphosphate; GDP, guanosine diphosphate; IPP, isopentenyl pyrophosphate; BTN, butyrophilin.

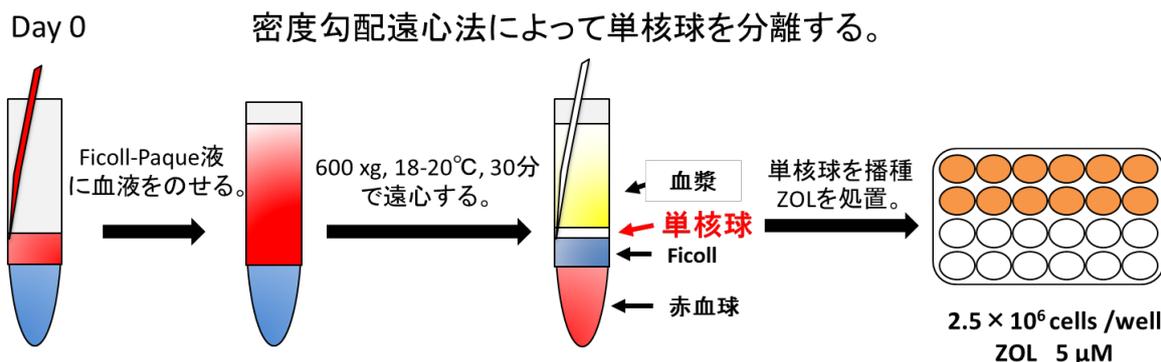
## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

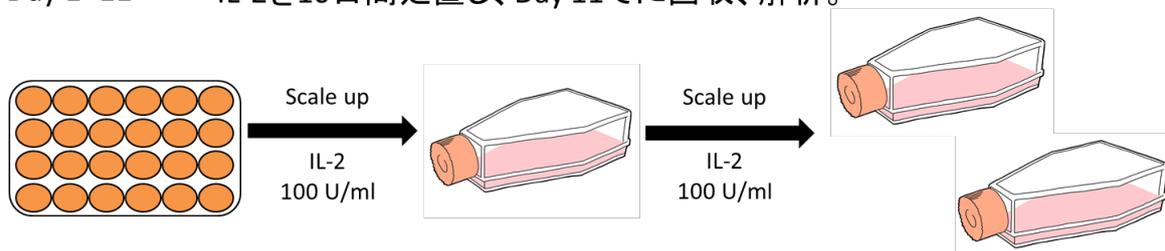
ZOL は Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) より購入した。Recombinant human (rh) IL-2 は FUJIFILM 和光純薬 (大阪) より購入した。

### 2. $\gamma\delta$ T 細胞培養

健常人ドナーからヘパリンナトリウム (持田製薬、東京) を用いて凝固阻止した血液 20 mL を等量の phosphate-buffered saline (PBS) (-) (KCl: 200 mg,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 200 mg, NaCl: 8 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 4.86 g / 滅菌蒸留水 1 L) で希釈した。その後、3 mL の希釈血液を 4 mL の Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK) に重層し、600  $\times$ g、室温、30 分間の密度勾配遠心分離を行った。密度勾配遠心分離によって形成される末梢血単核球層をスポイト (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で採取し、4°C であらかじめ冷却した cold PBS (-) に回収した。分離した末梢血単核球を 10% ヒト AB 型血清含有 ALyS505N-0 培地 (フナコシ、東京) に懸濁し、5  $\mu\text{M}$  ZOL を処置し、24 well プレート (Thermo Fisher Scientific) に末梢血単核球を  $2.5 \times 10^6$  / well (1.5 mL ALyS505N-0 / well) の条件で播種し、37°C、5%  $\text{CO}_2$  の環境下で培養した。24 時間後、培養上清 1.3 mL を 10% ヒト AB 型血清含有 ALyS505N-0 培地で培地交換を行い、rhIL-2 (100 IU/mL) を添加した。培養 2 日目から培養 4、5 日目まで rhIL-2 (100 IU/mL) を添加した。それ以降では、10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン：富士フィルム和光純薬、大阪) を含む RPMI1640 を加え、24 well プレートまたは T-75 フラスコ (Thermo Fisher Scientific) にスケールアップし、rhIL-2 (100 IU/mL) を添加し、10% FBS 含有 RPMI1640 を用いて増幅培養した (Figure 3)。本研究で使用した検体 (京都薬科大学：16-09、E21-006) および AB 型血清 (京都薬科大学：20-30、佐賀大学：2019-12-02) は所属機関の倫理委員会において承認され、インフォームド・コンセントを得た上で採取した。



Day 1~11 IL-2を10日間処置し、Day 11で回収、解析。



本研究は京都薬科大学倫理委員会の承認を得ている (E21-006-02)。

### Figure 3. *Ex vivo* expansion of human $\gamma\delta$ T cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using the Ficoll-Paque density gradient centrifugation. The  $\gamma\delta$  T cells were expanded from cultured PBMCs using zoledronic acid (ZOL) and interleukin (IL) -2. ZOL, zoledronic acid; IL, interleukin

### 3. 細胞培養

ヒト多発性骨髄腫細胞株 (RPMI8226、EJM、U266) は、American Type Culture Collection (ATCC、Manassas、VA、USA) より購入した。これらの細胞株は、37°C、20% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、75% N<sub>2</sub> (MM-Normoxia; Normo) の環境下で維持培養した。その後、MM細胞を1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub>の環境下で1ヶ月以上培養し、低酸素適応したRPMI8226 (RPMI8226-hypoxia adapted; HA)、EJM (EJM-HA)、U266 (U266-HA) の細胞株を樹立した。RPMI8226-Normo およびRPMI8226-HA細胞は、20% FBS (Sigma-Aldrich) および抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび100 μg/mL ストレプトマイシン：富士フィルム和光純薬) を含むRPMI1640培地 (富士フィルム和光純薬) 中で培養した。EJM-Normo およびEJM-HA細胞は、4 mM L-グルタミン (ナカライテスク、京都)、10% FBS (Sigma-Aldrich) および抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび100 μg/mL ストレプトマイシン：富士フィルム和光純薬) を含むIscove's modified Dulbecco's medium培地 (Sigma-Aldrich) 中で培養した。U266-Normo およびU266-HA細胞は、10% FBS (Sigma-Aldrich) および抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび100 μg/mL ストレプトマイシン：富士フィルム和光純薬) を含むRPMI1640培地 (富士フィルム和光純薬) 培養した。

#### 4. フローサイトメトリー法による $\gamma\delta$ T 細胞の解析

##### 4-1. 末梢血単核球の表面抗原解析

ヒト末梢血単核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) 中の  $\alpha\beta$  T 細胞と  $\gamma\delta$  T 細胞の割合をフローサイトメトリー法により解析した。100  $\mu$ L の PBS (-) に細胞を懸濁し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収し、以下の抗体と反応させた。抗 CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC) 抗体 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, #555332)、抗 TCR $\alpha\beta$ -phycoerythrin (PE) 抗体 (BD Biosciences #564728)、抗 TCR $\gamma\delta$ -allophycocyanin (APC) 抗体 (BD Bioscience, #555718) を処置し、20 分間、4°C、遮光で反応させた。その後、300  $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。

##### 4-2. $\gamma\delta$ T 細胞の接着分子の発現解析

$\gamma\delta$  T 細胞における細胞接着分子の発現強度をフローサイトメトリーにより解析した。100  $\mu$ L の PBS (-) に細胞を懸濁し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、抗 lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-FITC 抗体 (BD Biosciences, #555379)、抗 natural killer group 2 member D (NKG2D)-FITC 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA, #11-5878), anti-DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1)-PE 抗体 (Biolegend, San Diego, CA, USA, #338305)、抗 CD107a-PE 抗体 (BD Biosciences, #555801) を処置し、20 分間、4°C、遮光で反応させた。その後、300  $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。ネガティブコントロールには、抗体未染色細胞を用いた。

##### 4-3. $\gamma\delta$ T 細胞の細胞傷害性分子等の発現解析

$\gamma\delta$  T 細胞が産生する細胞傷害性分子等の発現を細胞内染色または表面抗原染色を行い、フローサイトメトリーにより解析した。細胞内染色は以下のように行った。初めに  $\gamma\delta$  T 細胞に T 細胞刺激試薬 Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) /ionomycin (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail 500 $\times$ ) を処置し、通常酸素環境下と低酸素環境下で 4 時間刺激を行った。次に Cell Stimulation Cocktail 処置 2 時間後にタンパク質輸送阻害薬モネンシンを含む Golgiprot Protein Transport Inhibitor (BD Biosciences) を処置することで、細胞傷害性分子等を細胞内に蓄積させた。4 時間の反応後、4% パラホルムアルデヒドと 0.2% Tween 20 により細胞の固定、膜透過処理をし、100  $\mu$ L の PBS (-) に細胞を懸濁し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、抗 perforin-Alexa Fluor 488 抗体 (BD Biosciences, #563764)、抗 granzyme B-PE 抗体 (BD Biosciences, #561142)、抗 interferon (IFN)- $\gamma$ -PE 抗体 (Biolegend, #506506) を処置し、20 分間、4°C、遮光で反応させた。その後、300  $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。また表面抗原の染色は、以下のように行った。 $\gamma\delta$  T 細胞に T 細胞刺激試薬 Cell Stimulation Cocktail (eBioscience) を処置し、通常酸素環境下と低酸素環境下で 4 時間刺激を行い、100  $\mu$ L の PBS (-) に細胞を懸濁し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、抗 CD107a-PE 抗体 (BD Biosciences, #555801) を処置し、20 分間、4°C、遮光で反応させた。その後、300  $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。ネガティブコントロールには、抗体未染色細胞を用いた。

“4-1. 末梢血単核球の表面抗原解析” “4-2.  $\gamma\delta$  T 細胞の接着分子の発現解析” “4-3.  $\gamma\delta$  T 細胞の細胞接着分子等の発現解析” における細胞懸濁液を 70  $\mu$ m 径のナイロンメッシュ

(共進理工、東京)に通した後、FACSCalibur (BD Biosciences)、LSR Fortessa X-20 (BD Bioscience) を用いてデータを取得し、解析は FlowJo (BD Bioscience) により実施した。

#### 5. $\gamma\delta$ T 細胞による MM 細胞に対する抗腫瘍効果の検討

MM-Normo 細胞と MM-HA 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果をフローサイトメトリーにより解析した。各 MM 細胞を PBS (-) に懸濁し、0.5  $\mu$ M の carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE : 同仁堂、熊本) で 30 分間、37°C、遮光で染色した。その後、200  $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、各培養液に交換し、24 well プレート (Thermo Fisher Scientific) に  $1 \times 10^5$  cells/well ずつ播種した。次に ZOL 処置群では 1  $\mu$ M 処置し、それぞれの酸素濃度環境下で 20 時間培養した。その後、 $\gamma\delta$  T 細胞未処置群、 $\gamma\delta$  T 細胞 : MM 細胞の effector cell: target cell (ET) 比が 10:1 となるように  $\gamma\delta$  T 細胞を処置し、それぞれの酸素濃度環境下で 4 時間共培養した。各 well の共培養後のサンプルをすべて回収し、200  $\times$ g、5 分間の遠心分離を行い、500  $\mu$ L の PBS (-) と培養液に懸濁した。 $\gamma\delta$  T 細胞の細胞傷害による死細胞は、フローサイトメトリーの解析前に Propidium iodide (PI : 富士フィルム和光純薬) を 20  $\mu$ g/mL 処置後、LSR Fortessa X-20 (BD Bioscience) を用いてデータを取得した。また、 $\gamma\delta$  T 細胞による MM 細胞の死細胞の割合は以下の計算式で算出し、データ解析は FlowJo (BD Bioscience) により実施した。

$$\text{Dead cells (\%)} = (\text{CFSE}^+\text{PI}^+ \text{ cancer cells} / \text{CFSE}^+ \text{ cancer cells}) \times 100$$

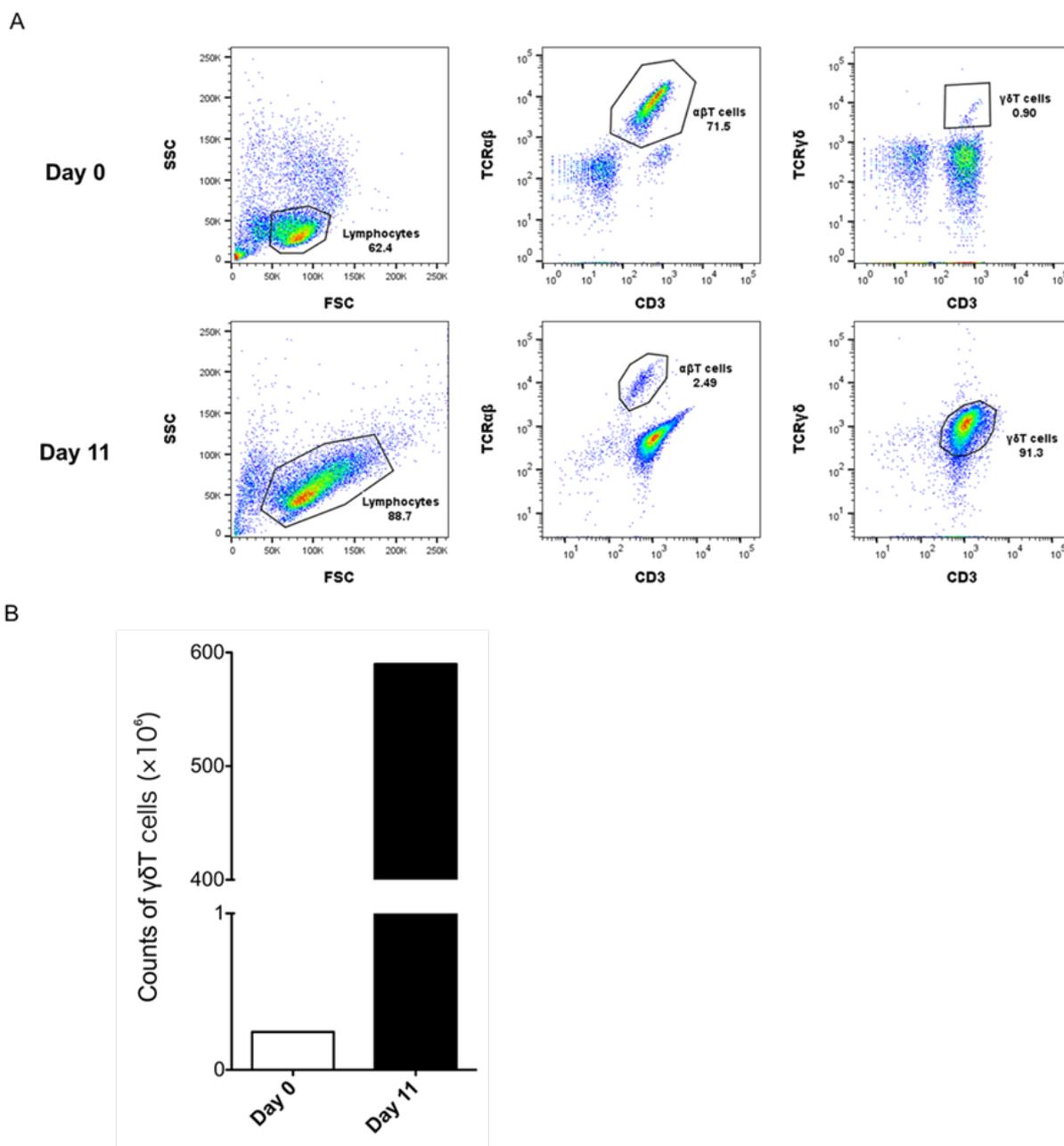
#### 6. 統計解析

複数群間の比較での統計学的解析は、Two-way ANOVA を用い、検定には Bonferroni 検定を使用した。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 (GraphPad Software、San Diego、CA、USA) を使用した。 $p < 0.05$  を統計的に有意とした。

### 第3節 実験結果

#### 1. ZOL と rhIL-2 を用いた $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅

健常人末梢血内に存在する  $\gamma\delta$  T 細胞はごく微量である。そのため、第1節で記載した方法により  $\gamma\delta$  T 細胞の体外増幅培養を行った。11日間の培養後に FCM 法により増幅効率を解析した。培養開始前の PBMCs の  $\alpha\beta$  T 細胞の割合は 71.5%、 $\gamma\delta$  T 細胞は 0.9% であり、 $\alpha\beta$  T 細胞が大部分を占めていた。しかしながら培養 11 日目では、 $\alpha\beta$  T 細胞は 2.5% に減少し、 $\gamma\delta$  T 細胞は 91.3% にまでその割合が上昇した (Figure 4A)。また、 $\gamma\delta$  T 細胞の細胞数も 11 日間の体外増幅により約 2400 倍まで増加した (Figure 4B)。以上の結果から、末梢血中の  $\gamma\delta$  T 細胞は ZOL と rhIL-2 を用いることで、選択的に体外増幅可能であることが明らかとなった。



**Figure 4. Ex vivo expansion of  $\gamma\delta$  T cells with ZOL (5  $\mu$ M) and rhIL-2 (100 IU/ml).**

(A) Flow cytometry analysis of the percentage of  $\gamma\delta$  T cells on day 0 (upper panels) and day 11 (lower panels), expanded from healthy-donor-derived peripheral blood mononuclear cells.  $\gamma\delta$  T cells were defined as the CD3<sup>+</sup>/TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> population. (B) The number of expanded  $\gamma\delta$  T cells after 11 days of in vitro culture. The number of  $\gamma\delta$  T cells was calculated by multiplying the overall cell count by the percentage of CD3<sup>+</sup>/TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells.

Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

## 2. 多発性骨髄腫細胞の低酸素適応

これまでに、低酸素環境下で長期間培養した MM 細胞は幹細胞性を示すことが明らかとなっている (26)。そこで、細胞の増殖速度を通常酸素環境下で培養した MM 細胞 (MM-Normo 細胞) と低酸素環境下で1か月以上培養した MM 細胞 (MM-HA 細胞) の倍加時間 ( $\tau$ ; doubling time) を算出し、細胞の増殖速度を比較した。継代培養の間隔は3 また 4 日とし、細胞数を計測し、以下の計算式に従い倍加時間を算出した。

$$N_T = N_0 \times 2^{T/\tau}$$

( $N_T$  : T 時間後の細胞数、 $N_0$  : 培養開始時の細胞数、 $\tau$  : 倍加時間)

その結果、MM-HA 細胞では細胞増殖速度が大きく減少していた (Table 2)。MM 細胞は 1%酸素環境下で 1 か月培養することで、既報 (26) 同様に増殖速度は低下したが増殖は続けたことから、低酸素環境下に適応したと判断し、以降の実験に使用した。

	RPMI8226		EJM		U266	
	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia	Normoxia	Hypoxia
Doubling time (hours)	40.7 ± 5.4	98.9 ± 21.2	49.8 ± 9.7	81.9 ± 16.1	41.7 ± 3.1	81.5 ± 25.6

**Table 2. The doubling times of MM-Normo cells and MM-HA cells.**

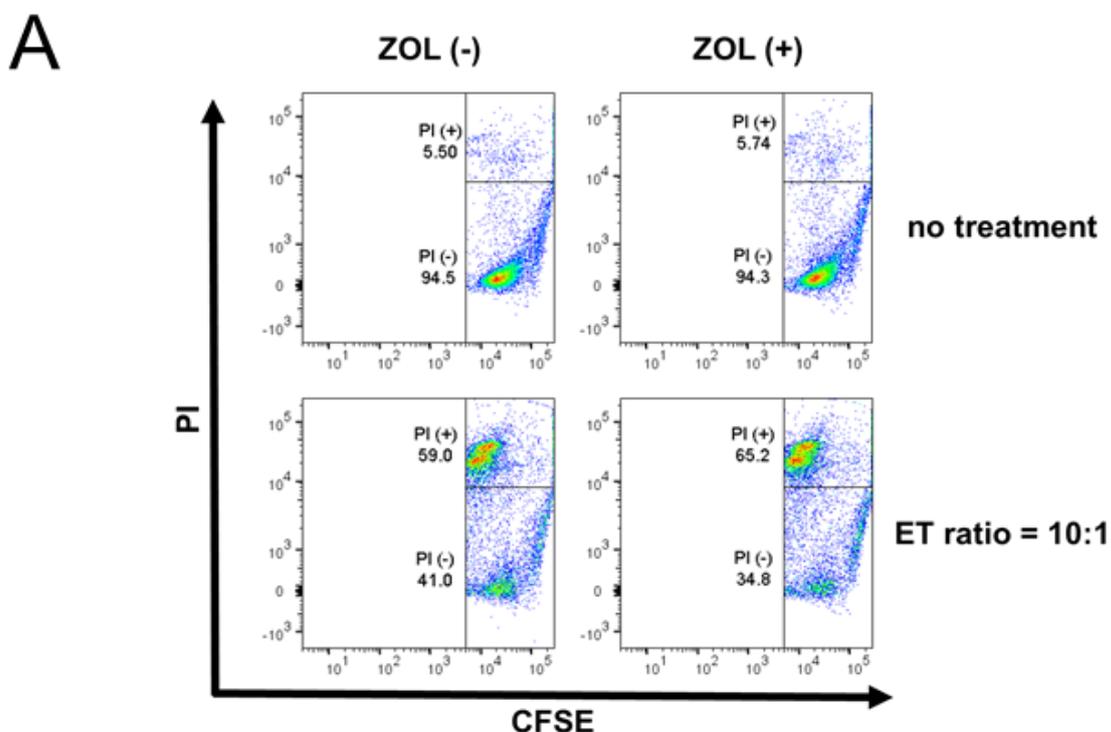
The number of cells was calculated by multiplying the cell count. Data represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

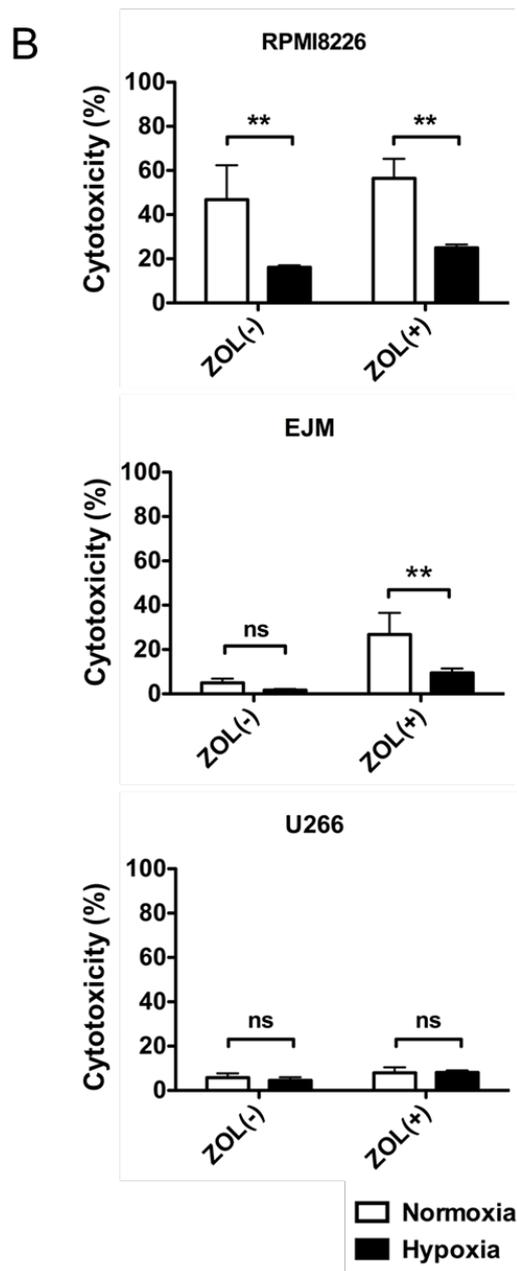
### 3. $\gamma\delta$ T 細胞の多発性骨髄腫細胞に対する抗腫瘍効果の検討

体外増幅した  $\gamma\delta$  T 細胞を用いて通常酸素環境下と低酸素環境下で培養した MM 細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。 $\gamma\delta$  T 細胞と MM 細胞を区別するために MM 細胞を生細胞染色試薬 CFSE で染色した後に、 $\gamma\delta$  T 細胞を MM 細胞に処置し、通常酸素環境下と低酸素環境下でそれぞれ 4 時間共培養した。PI により死細胞の核酸を染色することで、MM 細胞の死細胞を  $\text{Dead cells (\%)} = (\text{CFSE}^+\text{PI}^+ \text{ cancer cells} / \text{CFSE}^+ \text{ cancer cells}) \times 100$  を用いて算出した。MM 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を抗腫瘍効果は以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \text{Dead cells (\gamma\delta T 細胞処置群) (\%)} - \text{Dead cells (\gamma\delta T 細胞未処置群) (\%)}$$

その結果、RPMI8226-Normo 細胞では、ZOL 処置に関係なく高い抗腫瘍効果を認めたが、RPMI8226-HA 細胞では RPMI8226-Normo 細胞と比較して抗腫瘍効果が有意に減少した。また、EJM-Normo 細胞では、ZOL 未処置時は抗腫瘍効果が認められなかったが、ZOL 処置により抗腫瘍効果が確認できた。しかしながら、ZOL 処置時の EJM-HA 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果は、EJM-Normo 細胞と比較して有意に減弱した。U266-Normo 細胞への抗腫瘍効果は弱く、低酸素環境適応による抗腫瘍効果の変化は認められなかった (Figure 5B)。以上の結果から、 $\gamma\delta$  T 細胞が腫瘍効果を発揮する MM-Normo 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。





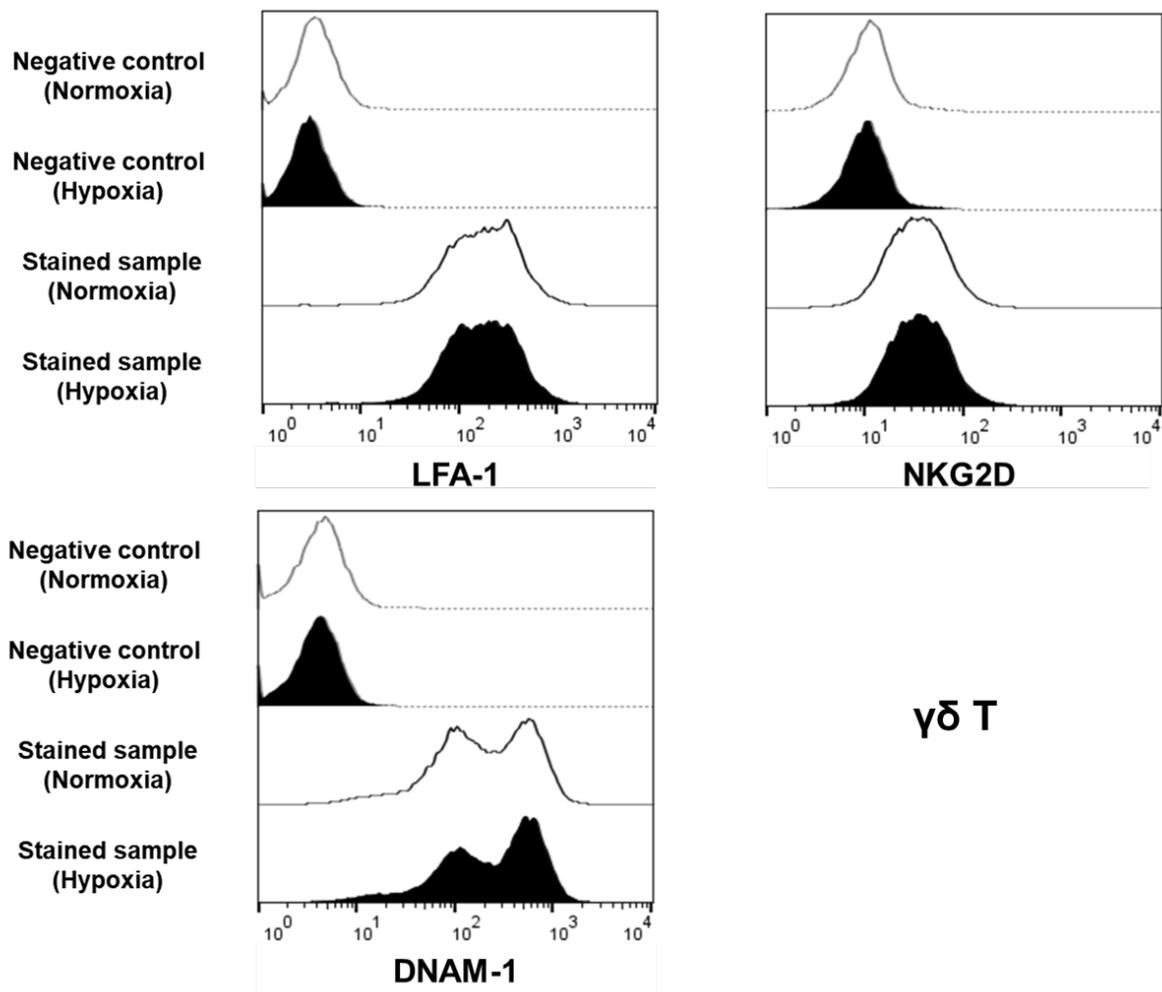
**Figure 5. Cytotoxicity of  $\gamma\delta$  T cell against multiple myeloma cell lines cultured under normoxic conditions (MM-Normo) and prolonged hypoxic conditions (MM-HA).**

(A) MM cells were stained with 0.5  $\mu$ M CFSE and either treated with ZOL (1  $\mu$ M) overnight or left untreated. The MM cells were then co-cultured with  $\gamma\delta$  T cells for 4 h in normoxic or hypoxic conditions. Results of the flow cytometric analysis of  $\gamma\delta$  T cell cytotoxicity against RPMI8226-Normo cells are shown. (B) Cytotoxicity (on the y-axis) was calculated by subtracting the cytotoxicity value of the control condition (i.e., without  $\gamma\delta$  T cells). Comparison of the  $\gamma\delta$ -T-cells-mediated killing of MM-Normo and MM-HA cells. Data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. The statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test (\*\* $p < 0.01$ , MM-Normo vs. MM-HA). ns, not significant.

Sano, Y., et al., *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

#### 4. $\gamma\delta$ T 細胞の接着分子の比較

$\gamma\delta$  T 細胞は、がん細胞膜上の特定の接着分子を認識することにより、抗腫瘍効果を発揮する (53–55)。そこで、 $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果に対し、MM-HA 細胞が抵抗性を示す要因を探索するために、MM 細胞が発現する接着分子の発現強度をフローサイトメトリー法で比較した。しかしながら、LFA-1、NKG2D、DNAM-1 の発現強度は、それぞれの環境下で差は認められなかった (Figure 6)。



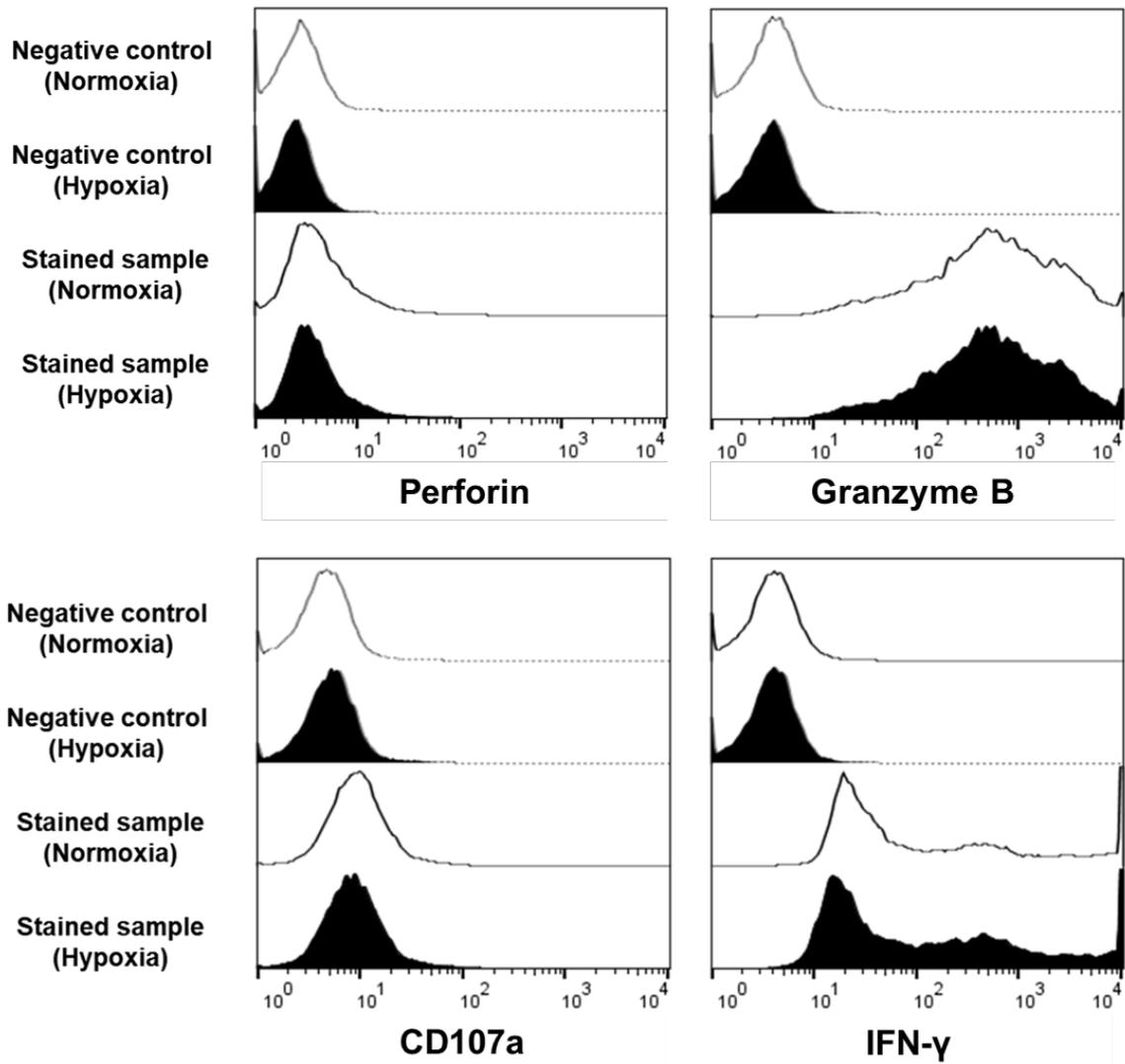
**Figure 6. Expression levels of adhesion molecules in  $\gamma\delta$  T cells.**

Flow cytometry analysis of expression levels of cell surface molecules by  $\gamma\delta$  T cells (NKG2D, LFA-1, DNAM-1). White and black histograms represent normoxic and hypoxic conditions, respectively. Dotted lines indicate negative controls, and solid lines indicate stained samples.

Modified from Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

## 5. $\gamma\delta$ T 細胞の細胞傷害性分子等の発現比較

$\gamma\delta$  T 細胞は、活性化されるとパーフォリンを放出し、がん細胞表面に穴をあけ、さらにグランザイム B をがん細胞内に放出することでがん細胞のアポトーシスを誘導する。そこで、T 細胞活性化試薬 Cell Stimulation Cocktail を  $\gamma\delta$  T 細胞に処置し、通常酸素環境下と低酸素環境下で 4 時間インキュベートした。また、Cell Stimulation Cocktail 処置 2 時間後に Goldi stop を処置し、細胞内に細胞傷害性分子等を蓄積させた。その後に細胞内を免疫蛍光染色し、それぞれの環境下での細胞傷害性分子等の産生をフローサイトメトリー法で比較した (Figure 7)。その結果、通常酸素環境下と低酸素環境下では産生に差は認められなかった。また、脱顆粒マーカーである CD107a の  $\gamma\delta$  T 細胞表面における発現も変化が認められなかった。以上の結果から、低酸素環境下においても、 $\gamma\delta$  T 細胞は通常酸素環境下と同程度の細胞傷害性分子等を産生できると考えられる。



**Figure 7. Expression levels of cell surface molecule and cytokines in  $\gamma\delta$  T cells.**

Flow cytometry analysis of CD107a and intracellular perforin, granzyme B, and IFN- $\gamma$  expression by  $\gamma\delta$  T cells.  $\gamma\delta$  T cells were stimulated with Cell Stimulation Cocktail (500 $\times$ ). White and black histograms represent normoxic and hypoxic conditions, respectively. Dotted lines indicate negative controls, and solid lines indicate stained samples.

Modified from Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

#### 第4節 考察

今回の検討では、ヒト PBMC に IL-2 と ZOL を処置し、 $\gamma\delta$  T 細胞の体外増幅を行った。IPP と IL-2 により、 $\gamma\delta$  T 細胞の Mitogen-activated Extracellular signal-regulated Kinase (MEK) / Extracellular Signal-regulated Kinase (Erk) 経路と phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) 経路が活性化される(56,57)。また、 $\gamma\delta$  T 細胞は IL-2 により増幅する (58) が、PBMCs に IL-2 のみを処置しても  $\gamma\delta$  T 細胞のサイトカイン産生は誘導されない。IPP を添加することによる  $\gamma\delta$  T 細胞の nuclear factor of activated T cells (NFAT) (59) の活性化が、サイトカイン産生誘導には必要であることも明らかとなっている (57)。以上のことから、ZOL 処置により PBMCs 中の単球から産生された IPP により、 $\gamma\delta$  T 細胞における MEK/Erk、PI3K/Akt の経路および NFAT が活性化し、 $\gamma\delta$  T 細胞が増幅、活性化すると考えられる。単球はエンドサイトーシスが活性化しているため ZOL を細胞内に取り込みやすく (60)、ZOL は細胞内 IPP 量を増加させるため (43)、ZOL を処置した単球は他の PBMCs より IPP を多く蓄積する (60)。また、 $\gamma\delta$  T 細胞の増殖に単球が必須であることも明らかとなっている (61,62)。以上のことから、PBMCs に ZOL を処置することで、単球内に IPP を蓄積させ  $\gamma\delta$  T 細胞が単球を認識する。それにより、 $\gamma\delta$  T 細胞の NFAT の核内移行が促進され、また MEK / Erk 経路と PI3K / Akt 経路が活性化し、IL-2 によりこれら全ての経路がさらに活性化されることで、 $\gamma\delta$  T 細胞は増殖促進すると推察される。

MM 幹細胞が既存治療薬に抵抗性を示す機序としては、薬剤排出トランスポーターである ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターの発現上昇 (63) やアルデヒド脱水酵素 (aldehyde dehydrogenase; ALDH) の活性化 (64) が考えられる。よって、MM の根治を目指す上では、このような抵抗性に影響を受けない新たな治療アプローチが必要である。これまでに、我々を含む多くの研究者が、 $\gamma\delta$  T 細胞が MM 細胞に対して細胞傷害性を発揮し、MM 細胞が  $\gamma\delta$  T 細胞免疫療法の標的となり得ることを示している (54,65–68)。したがって、 $\gamma\delta$  T 細胞免疫療法には MM 幹細胞に対して有効性を示し、MM 患者の予後を改善する可能性がある。と仮説を立て、幹細胞の特徴を持つ MM-HA 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。初めに、MM 幹細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞による抗腫瘍効果の検討を目的として、MM 細胞の幹細胞への誘導を行った。これまでの研究により、MM 細胞は長期間 1%酸素濃度環境下で培養することで、幹細胞性を獲得することが明らかとなっている (26)。そこで既報 (26) に従い、MM 細胞を 1%酸素濃度環境下で 1 か月以上維持培養を行い、低酸素環境に適応した MM-HA 細胞を樹立した。その結果、RPMI8226-HA、EJM-HA、U266-HA 細胞のいずれにおいても各 MM-Normo 細胞と比較して、細胞増殖速度が低下していた。また、NANOG や CD24 などの MM 幹細胞マーカーの発現 (69) が MM-HA 細胞で上昇していた (データ未発表)。以上の結果から、MM 細胞を 1 か月間低酸素環境下で培養することで、幹細胞様の性質を獲得したと考えられる。続いて、これらの MM-Normo 細胞と MM-HA 細胞を用いて  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。その結果、RPMI8226 細胞は、通常酸素環境下において ZOL の処置に関わらず、高い抗腫瘍効果が認められ、低酸素環境下で抗腫瘍効果が減弱していた。また、EJM 細胞は ZOL 処置時のみ通常酸素環境下で抗腫瘍効果が確認でき、低酸素環境下で減弱していた。一方で、U266 細胞は ZOL 処置時でも、酸素濃度に関わらず抗腫瘍効果が確認できなかつ

った。以上の結果のように、細胞株において抗腫瘍効果の表れ方が様々であり、さらに MM-HA 細胞は  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果に抵抗性を示した。これまでに、MM 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果は MM 細胞膜上の intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の発現量と正の相関関係にあり、今回使用した細胞株 (RPMI8226、EJM、U266) の ICAM-1 の発現量の大小関係は、RPMI8226>EJM $\approx$ U266 の順になっていることも明らかとなっている (41)。今回の著者の実験結果においても、ZOL 未処置時の MM-Normo 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果の大小関係も RPMI8226>EJM $\approx$ U266 の順であった。そのため、細胞株間の抗腫瘍効果の違いは ICAM-1 の発現量の差に起因すると考えられ、さらに MM-HA 細胞の  $\gamma\delta$  T 細胞抵抗性も ICAM-1 の発現量減少による影響であると推測した。また、 $\gamma\delta$  T 細胞は、標的細胞内 IPP により構造変化した BTN3A1 を認識することで活性化することが明らかとなっている。また、低酸素環境下においては、hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) が hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase の分解を促進することが示されている (70)。そのため、MM-Normo 細胞株間での抗腫瘍効果の違いと MM-HA 細胞における抗腫瘍効果の減弱は、MM-HA 細胞内のメバロン酸経路が抑制されることによる IPP 量の減少に起因すると予測した。また、BTN3A1 が  $\gamma\delta$  T 細胞に認識されるためには構造変化が必要であるが、そのためには 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 (71)。これらに基づき、低酸素環境下における  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果に対する抵抗性獲得の機序には、MM-HA 細胞では BTN3A1 ならびに RhoB タンパク質の発現減少が関与すると仮説を立てた。次章では、これらの仮説を明らかにするため、MM 細胞の ICAM-1 などの接着分子の発現量、細胞内 IPP 量や BTN3A1、ならびに RhoB の発現量に着目し、 $\gamma\delta$  T 細胞に対する抵抗性獲得機序を明らかとしていく。

## 第5節 小括

本章では幹細胞様 MM 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を検討し、以下の知見を得た。

1. *ex vivo* において IL-2 と ZOL を用いることで、 $\gamma\delta$  T 細胞を選択的に増幅可能である。
2. MM-HA 細胞は  $\gamma\delta$  T 細胞による抗腫瘍活性に抵抗性を獲得している。
3. 低酸素環境下において  $\gamma\delta$  T 細胞の細胞傷害性機能は低下しない。

## 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

### 第1節 序章

BTN3A1 は免疫グロブリンスーパーファミリーであり、2 つの細胞外免疫グロブリンドメインで構成された糖タンパク質である (72)。細胞内に蓄積した IPP は BTN3A1 の B30.2 ドメインに結合し、TCR $\gamma\delta$  を介して  $\gamma\delta$  T 細胞の活性化を誘導する。ヒトでは BTN3A サブファミリーとして、BTN3A1、3A2、3A3 が存在するが、この中で細胞内ドメイン B30.2 を有するのは BTN3A1 と BTN3A3 のみであり (72)、BTN3A3 は B30.2 ドメインを持つが、IPP による刺激を受けない (73)。B30.2 ドメインを持たない BTN3A2 は BTN3A1 とヘテロダイマーを形成することで、 $\gamma\delta$  T 細胞の認識機構に関わっている (74)。このように、 $\gamma\delta$  T 細胞の活性化には BTN3A1 が必要不可欠である。しかしながら BTN3A1 は、正常細胞とがん細胞のどちらにおいても幅広く発現している (75)。そのため、 $\gamma\delta$  T 細胞は何かしらの方法で、正常細胞とがん細胞の BTN3A1 を判別していると考えられる。Sebestyen らは、Rho ファミリー G タンパク質であるがん細胞内の RhoB ががん細胞表面の BTN3A1 を介した、 $\gamma\delta$  T 細胞の活性化に関与していることを明らかにした (71)。Rho タンパク質は活性型である guanosine triphosphate (GTP) 結合型になると、核内から核外へと移行する (76)。活性型 RhoB が BTN3A1 の細胞内ドメインに結合することで、BTN3A1 を細胞膜上に固定する。さらに細胞内 IPP が細胞内ドメインに結合することで、BTN3A1 の構造を変化させ、 $\gamma\delta$  T 細胞は構造変化したがん細胞の BTN3A1 を認識する (71)。がん細胞は正常細胞と比較してメバロン酸経路が活性化しており、IPP が多く蓄積しているため (52)、BTN3A1 の構造変化が活発に行われていると考えられる。このような機構により、 $\gamma\delta$  T 細胞はがん細胞の BTN3A1 を特異的に認識している (Figure 2)。

前章では、今回用いた細胞株 3 株は MM-HA 細胞において、いずれも抗腫瘍効果に抵抗性を示すことが明らかとなった。しかしながら  $\gamma\delta$  T 細胞では、低酸素環境下においても抗腫瘍活性が減弱しなかった。そのため、MM-HA 細胞の  $\gamma\delta$  T 細胞に対する抵抗性獲得は、がん細胞側に要因があると考えられる。 $\gamma\delta$  T 細胞の活性化にはがん細胞内の IPP 量、BTN3A1、RhoB の発現が大きく関わっている。MM-Normo 細胞の抗腫瘍効果の違いと MM-HA 細胞における抗腫瘍効果の減弱は MM-HA 細胞内の IPP 量、BTN3A1、RhoB の発現減少によると仮説を立て、本章では、これらの分子の発現量を解析した。

## 第2節 実験方法

### 1. 試薬

Isopentenyl pyrophosphate (IPP)、geranyl pyrophosphate (GPP)、farnesyl pyrophosphate (FPP)、geranyl-geranyl pyrophosphate (GGPP) および炭酸水素アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) は、Sigma Aldrich より購入した。アセトニトリル、メタノール、2-プロパノールおよび28%アンモニア溶液は、富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

### 2. 細胞培養

ヒト多発性骨髄腫細胞株として、第1章と同じく RPMI8226、EJM、U266 細胞を用い、同様に培養維持し、検討に用いた。

### 3. フローサイトメトリー

MM 細胞の細胞表面抗原の発現強度を、フローサイトメトリー法を用い第1章と同様に解析した。MM 細胞膜上の受容体および BTN3A1 の発現解析には、ICAM-1-phycoerythrin (PE) 抗体 (BD Biosciences、#560971)、抗 MHC class I chain related gene (MIC) A/B-PE 抗体 (eBioscience、#12-5788)、抗 poliovirus receptor (PVR)-PE 抗体 (Biolegend、#337609)、抗 Butyrophilin Subfamily 3 Member A1 (BTN3A1) -PE (R&D、#FAB7136P) を用いた。ネガティブコントロールには、抗体未染色細胞を用いた。

### 4. 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析によるメバロン酸代謝経路における代謝産物の定量

MM 細胞内および培養上清中の IPP、GPP、FPP、GGPP の量を液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法により測定した。培養上清のサンプル測定は、以下のようにサンプル調製を行った。培養上清を 1 mL の 2-プロパノール: 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1:1 v/v) と 1.5 mL のアセトニトリルを加えてボルテックスで攪拌し、この試料を氷上で 10 分間静置した後、4°C、10000 rpm で 20 分間遠心分離を行い、タンパク質を除いた。遠心分離後、上清を別のチューブに移した後、その上清を室温、窒素気流下で乾固した。その後、残留物を 40  $\mu\text{L}$  の 0.01 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  に溶解し、その溶液の 20  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入した。細胞サンプルは以下のようにサンプル調製した。まず、細胞サンプルを、250  $\mu\text{L}$  の 2-propanol: 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1:1 v/v) と混合し、氷上で 20 分間超音波処理した。次に、除タンパク化のために 375  $\mu\text{L}$  のアセトニトリルを加え、試料を氷上で 10 分間静置した。その後、サンプルを 4°C 下、13000 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を別のチューブに移し、その上清を室温、窒素気流下で乾固した。その後、残留物を 80  $\mu\text{L}$  のメタノール: 0.01 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  (7:3 v/v) に溶解し、その溶液の 20  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS に注入した。EJM 細胞の培養上清中の IPP、GPP、FPP、GGPP の定量は標準添加法で行い、その他の定量は回収率が良好であったため絶対検量線法で行った。LC システムは、グラジエントポンプ、真空脱気装置、カラム温調装置、オートサンプラー (島津製作所、京都) から構成されている。カラム温度はサーモスタットにより 30°C に維持した。Inert Sustain C18 metal-free PEEK column (2.1  $\times$  150 mm; 粒子径 5  $\mu\text{m}$ ; 島津ジーエルサイエン

ス、東京) に試料を注入した。IPP、GPP、FPP、GGPP の分離は、移動相 A (0.1% トリエチルアミン含有 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)、と移動相 B (0.1% トリエチルアミン含有アセトニトリル) 間の線形グラジエントによって行った。グラジエントは以下の通りであった。0-5 分、100%A から 20%A; 5-7 分 20%A; 7-7.01 分、20%A から 100%A; 7.01-10 分、100%A; 100%A で 5 分平衡化。流量を 0.4 mL/min に設定した。MS 検出は、API 3200 MS/MS システム (SCIEX, Framingham, MA, USA) を用いて、ネガティブエレクトロスプレーイオン化モードで行った。イオンスプレー電圧は -4500 V、キャピラリー温度は 700°C に設定し、定量においては、IPP は m/z 245.01 → m/z 79.00、GPP は m/z 313.11 → m/z 78.80、FPP は m/z 381.16 → m/z 79.10、GGPP は m/z 449.27 → m/z 79.10 の遷移をそれぞれ多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring; MRM) によりモニターすることで高感度定量を行った。本 LC-MS/MS 法では、IPP と dimethylallyl diphosphate (DMAPP) のアイソフォームを分離・同定することができなかった。そのため、IPP は IPP と DMAPP の合計量 (IPP/DMAPP) として表した (Supplementary Figure 1)。

## 5. ウェスタンブロット法による解析

### 5-1. メバロン酸経路関連タンパク質の発現比較

各 MM 細胞に ZOL を 24 時間処置後、細胞を回収した。PBS (-) で洗浄後、Lysis buffer に懸濁し、20 分間氷冷し、5 分毎にボルテックスを用いて攪拌し、十分に混和した。その後、13000 ×g、4°C の環境下で 20 分間遠心し、その上清をサンプルとして回収した。回収したサンプルは Pierce BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) およびマイクロプレートリーダー Glomax<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI, USA) を用いて定量を行い、1 μg/μL になるように Sample Buffer Solution (富士フィルム和光純薬)、滅菌超純水と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。

調製したサンプルを用い、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法にてタンパク質の発現を解析した。9% ポリアクリルアミドゲル、200 V の条件下で電気泳動し、poly vinylidene di fluoride (PVDF) 膜 Immobilon<sup>®</sup>-P membrane (Merck Millipore) に 100 V、90 分間で転写した。非特異的結合を防止するために PVDF 膜を 5% NFD (non-fat dry milk、雪印メグミルク株式会社、東京) 中で 1 時間反応させた。ブロッキング剤は 0.05% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスク) を含む tris-buffer saline (TBS; 20 mM tris、500 mM 塩化ナトリウム (ナカライテスク)、pH 8.0) で溶解した。その後、一次抗体として、抗 mevalonate decarboxylase (MVD) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology、Dallas, TX, USA、#sc-376975)、抗 Farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS/FPS) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK、#ab189874)、抗 β-actin 抗体 (Sigma-Aldrich、#A5441) を使用した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体および抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を二次抗体として使用し、免疫反応性タンパク質に対応するバンドを ECL Prime Western Blotting Detection Kit (Cytiva、Tokyo, Japan) を用いて ImageQuant<sup>TM</sup> LAS 4000 (Cytiva) により検出した。使用した抗体の希釈倍率およびブロッキング剤は Table 3 に示す。

Table 3. Antibodies and blocking agents used in Western Blotting

Primary Ab	Primary Ab concentrations	Secondary Ab	Secondary Ab concentrations	Blocking agents
MVD	1 : 100	anti-mouse IgG	1 : 1000	5% NFDM
FDPS/FPS	1 : 500	anti-rabbit IgG	1 : 1000	5% NFDM
$\beta$ -actin	1 : 10000	anti-mouse IgG	1 : 10000	5% NFDM

Ab, antibody; MVD, mevalonate decarboxylase; FDPS/FPS, farnesyl diphosphate synthase; Ig, immunoglobulin; NFDM, non-fat dry milk.

#### 5-2. RhoB およびヒストンのアセチル化の発現比較

5-1 と同様に調製したサンプルを用い、RhoB およびアセチル化ヒストンの発現量を解析した。ブロッキング剤は 5% non-fat dry milk (NFDM, 雪印メグミルク株式会社、東京) または 5%ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA, 富士フィルム和光純薬) を使用し、0.05% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスク) を含む tris-buffer saline (TBS ; 20 mM tris、500 mM 塩化ナトリウム (ナカライテスク)、pH 8.0) で溶解した。一次抗体として、抗 RhoB 抗体 (abcam、#ab170611)、抗 Histone H3 (acetyl K27) 抗体 (Abcam、#ab4729)、抗 Histone H3 抗体 (Cell Signaling Technology、#9715) を使用した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体および抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を二次抗体として使用し、免疫反応性タンパク質に対応するバンドを ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare、Chicago、IL、USA) を用いて X 線フィルム (ケアストリーム株式会社、東京) に感光させることにより検出した。使用した抗体の希釈倍率およびブロッキング剤は Table 4 に示す。

Table 4. Antibodies and blocking agents in Western Blotting

Primary Ab	Primary Ab concentrations	Secondary Ab	Secondary Ab concentrations	Blocking agents
RhoB	1 : 1000	anti-rabbit IgG	1 : 1000	5% NFDM
Histone H3 (acetyl K27)	1 : 1000	anti-rabbit IgG	1 : 10000	5% BSA
Histone H3	1 : 1000	anti-rabbit IgG	1 : 1000	5% NFDM
$\beta$ -actin	1 : 10000	anti-mouse IgG	1 : 10000	5% NFDM

Ab, antibody; MVD, mevalonate decarboxylase; FDPS/FPS, farnesyl diphosphate synthase; Ig, immunoglobulin; NFDM, non-fat dry milk, BSA, bovine serum albumin.

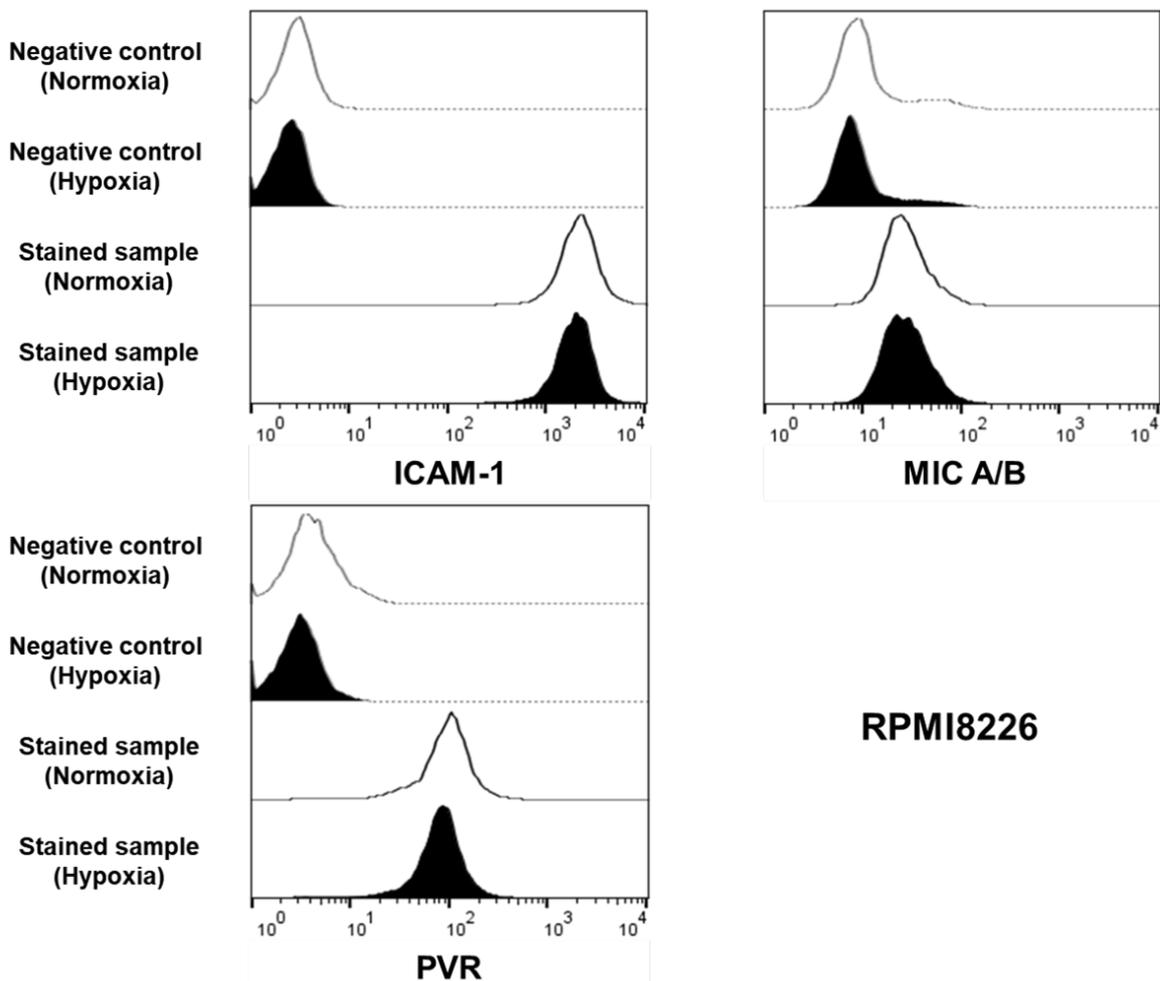
## 6. 統計解析

複数群間の比較での統計学的解析は、Two-way ANOVA を用い、検定には Bonferroni 検定を使用して分析した。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。相関分析では、Pearson の相関係数の検定を用いて有意差検定を行った。p < 0.05 を統計的に有意とした。

### 第3節 実験結果

#### 1. MM細胞における細胞表面分子の発現解析

前章の結果から、低酸素環境下における抗腫瘍効果減弱の要因はがん細胞側にあると考察した。そこで、 $\gamma\delta$  T細胞との結合を介するがん細胞の接着分子の発現強度を、常酸素環境下と低酸素環境下でFCM法を用いて比較した。低酸素環境下で抗腫瘍効果が最も減少していたRPMI8226細胞を用いてICAM-1、MICA/B、PVRの発現強度をフローサイトメトリー法により測定した。しかしながら、その発現強度はそれぞれの環境下間で差は認められなかった(Figure 8)。

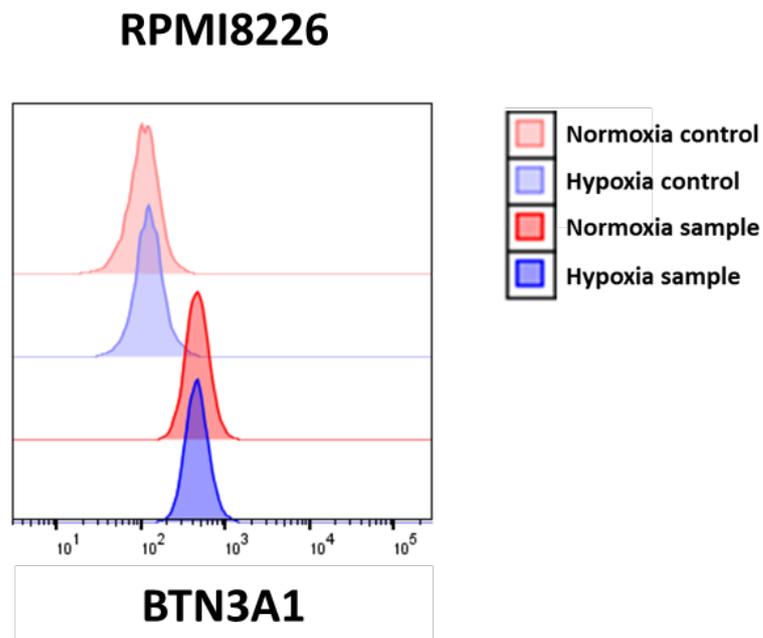


**Figure 8. Expression levels of adhesion molecules and cytokines.**

(A) Flow cytometry analysis of cell surface molecule expression by MM-Normo and MM-HA cells. White and black histograms represent normoxic and hypoxic conditions, respectively. Dotted lines indicate negative controls, and solid lines indicate stained samples.

Modified from Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

これらの接着分子以外にも、 $\gamma\delta$ T 細胞は TCR $\gamma\delta$  を介してがん細胞表面の BTN3A1 を認識する。そのため、RPMI8226 細胞の BTN3A1 の発現強度を通常酸素環境下と低酸素環境下で比較した。しかしながら、細胞接着分子の発現と同様に、それぞれの環境下間で差は認められなかった (Figure 9)。

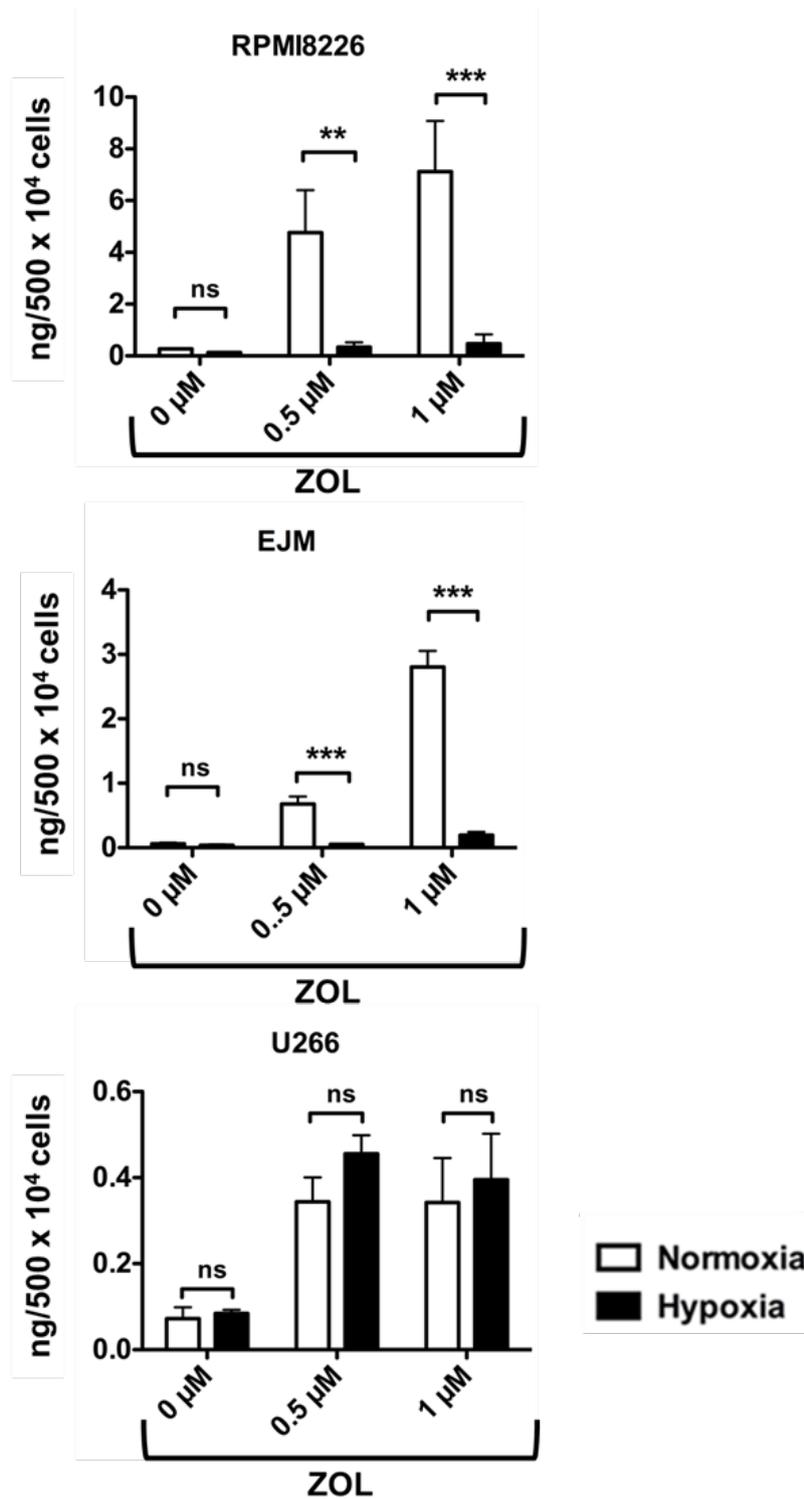


**Figure 9. Expression levels of BTN3A1 in RPMI8226 cells.**

Flow cytometry analysis of cell surface molecule expression in RPMI8226-Normo cells and RPMI8226-HA cells. Red histograms represent normoxic conditions. Blue histograms represent hypoxic conditions. Light color lines indicate negative controls. BTN, butyrophilin

## 2. MM 細胞内 IPP および培養上清中 IPP 量の比較

BTN3A1 は細胞内ドメインに IPP が結合することにより構造が変化し、その結果、 $\gamma\delta$  T 細胞が BTN3A1 を認識し、がん細胞は $\gamma\delta$  T 細胞からの攻撃を受ける (71)。そこで、次に ZOL の処置時と非処置時で、MM-Normo 細胞と MM-HA 細胞の IPP の細胞内量を LC-MS/MS により調べた。その結果、低酸素環境下で抗腫瘍効果減弱が認められた RPMI8226 細胞では、通常酸素環境下では ZOL 処置により IPP 蓄積量が増大した。一方で、RPMI8226-HA 細胞では、ZOL 処置による IPP 蓄積量の増大はほとんど確認できず、RPMI8226-Normo 細胞よりも著しく低い値となった。同様に、ZOL を処置した EJM 細胞でも細胞内 IPP 量が低酸素環境下で有意に減少していた。一方で、いずれの条件においても  $\gamma\delta$  T 細胞による細胞傷害活性に耐性を示した U266 細胞では酸素濃度や ZOL 処置に関係なく、他の 2 細胞株の 1/10 ~ 1/20 程度の IPP 蓄積量であり、U266-Normo 細胞と U266-HA 細胞間で有意差は認められなかった (Figure 10)。

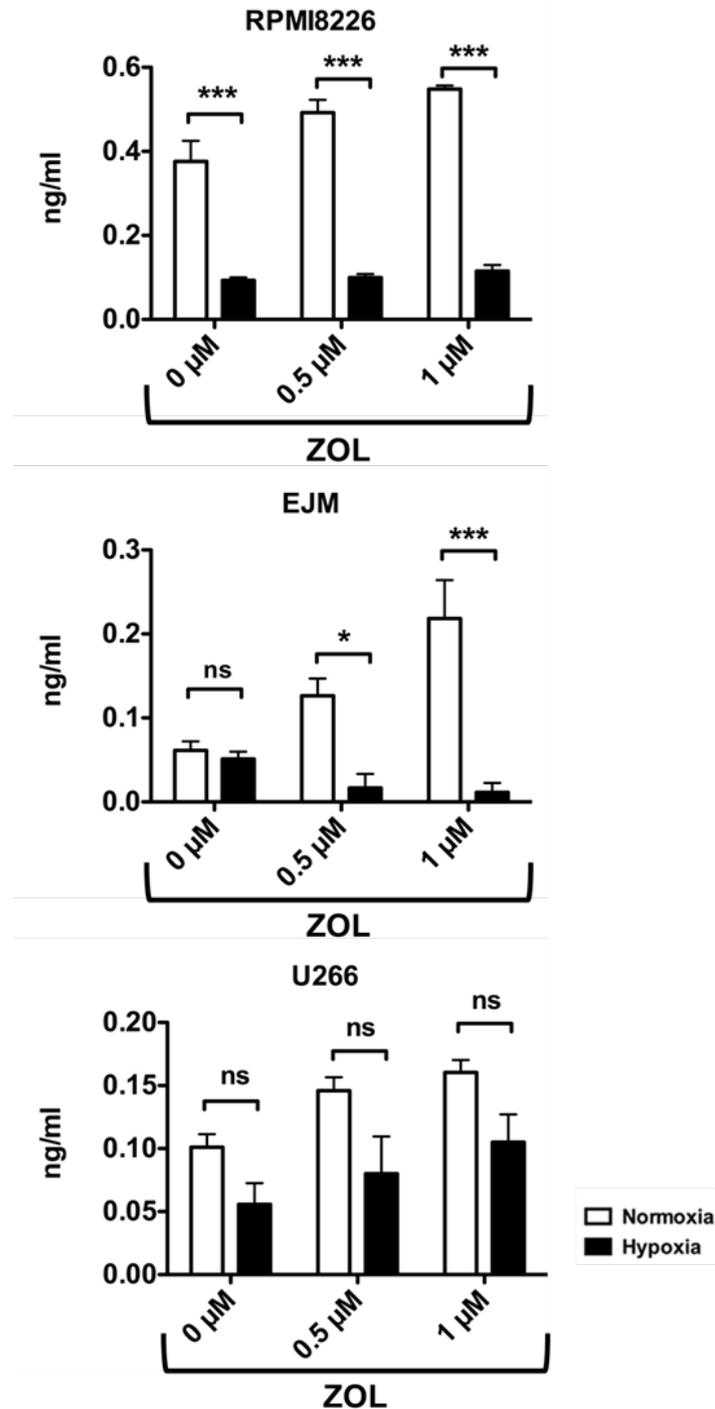


**Figure 10. IPP content of multiple myeloma (MM) cells.**

ZOL was applied to  $5 \times 10^6$  MM cells at the indicated concentrations (0.5 or 1  $\mu$ M) in 5 ml of medium. The MM-Normo and MM-HA cells were then cultured for 24 h. Concentrations of IPP in MM cells were measured using LC-MS/MS. White histograms represent MM-Normo cells, and black histograms represent MM-HA cells. Statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , MM-Normo vs. MM-HA). ns, not significant.

Modified from Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

これまでの研究により、がん細胞から分泌された IPP は、 $\gamma\delta$  T 細胞のがん細胞への遊走を亢進させる (68)。そこで、がん培養上清中の IPP 量も同様に LC-MS/MS を用いて測定した。その結果、MM-HA 細胞で抗腫瘍効果が減弱していた RPMI8226 細胞は、ZOL 処置に関係なく MM-HA 細胞の培養上清中の IPP 量も減少していた。また、EJM 細胞は、抗腫瘍効果の減弱が見られた条件と同様に、ZOL を処置した場合にのみ低酸素環境下で培養上清中の IPP 量が減少していた。一方で、U266 細胞では細胞内 IPP 量と同様に、いずれの条件においても他の 2 細胞株と比較して培養上清中の IPP 量が著しく低くなっており、U266-Normo 細胞と U266-HA 細胞で有意な差は認められなかった (Figure 11)。



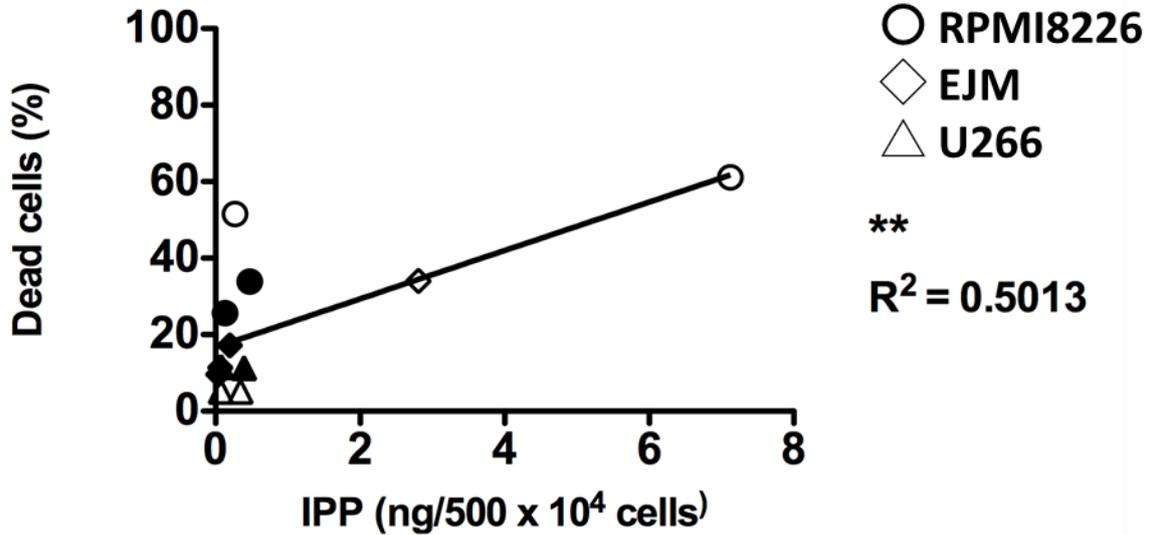
**Figure 11. IPP content of multiple myeloma (MM) cells and their culture supernatants.**

ZOL was applied to  $5 \times 10^6$  MM cells at the indicated concentrations (0.5 or 1  $\mu\text{M}$ ) in 5 ml of medium. The MM-Normo and MM-HA cells were then cultured for 24 h. Concentrations of IPP in MM cells culture supernatants were measured using LC-MS/MS. White histograms represent MM-Normo cells, and black histograms represent MM-HA cells. Statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , MM-Normo vs. MM-HA). ns, not significant.

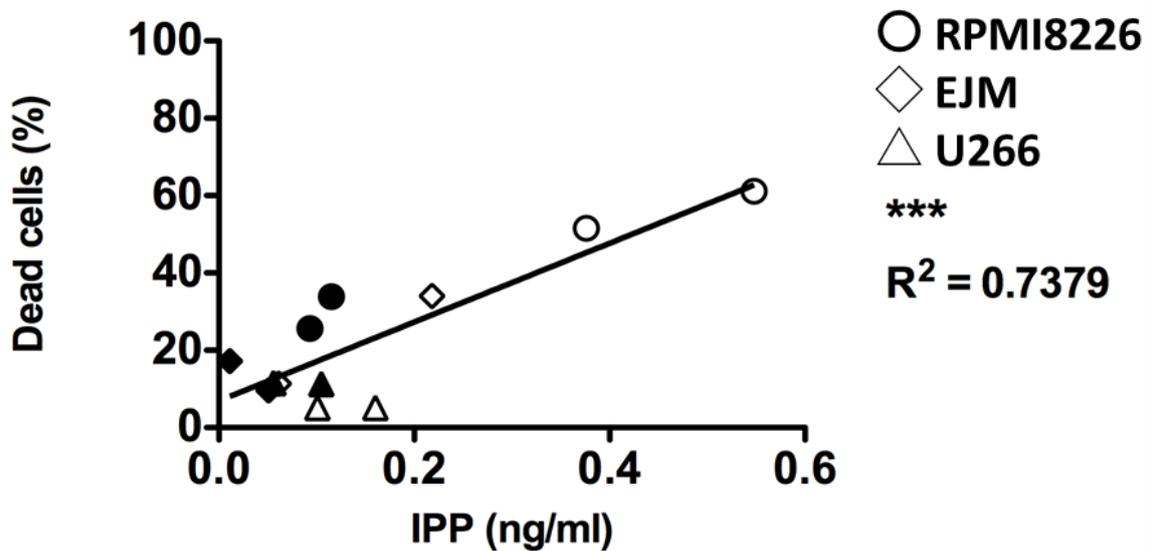
Modified from Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

続いて、 $\gamma\delta$  T 細胞による抗腫瘍効果に対し、MM-HA 細胞が耐性を示す原因が IPP 量の減少であることを明らかとするために、MM 細胞内とその培養上清中のそれぞれの IPP 量と抗腫瘍効果の相関関係を検定した。その結果、細胞内 IPP 量、培養上清中の IPP 量のそれぞれで抗腫瘍効果と相関関係が認められ (Figure 12)、細胞内 IPP と培養上清中の IPP の間にも相関関係が認められた (Supplementary Figure 2)。以上の結果から、MM-HA 細胞は細胞内および培養上清中の IPP が減少することで  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果に対して抵抗性を獲得していることが明らかとなった。

## 細胞内IPP vs Dead cells



## 培養上清中IPP vs Dead cells

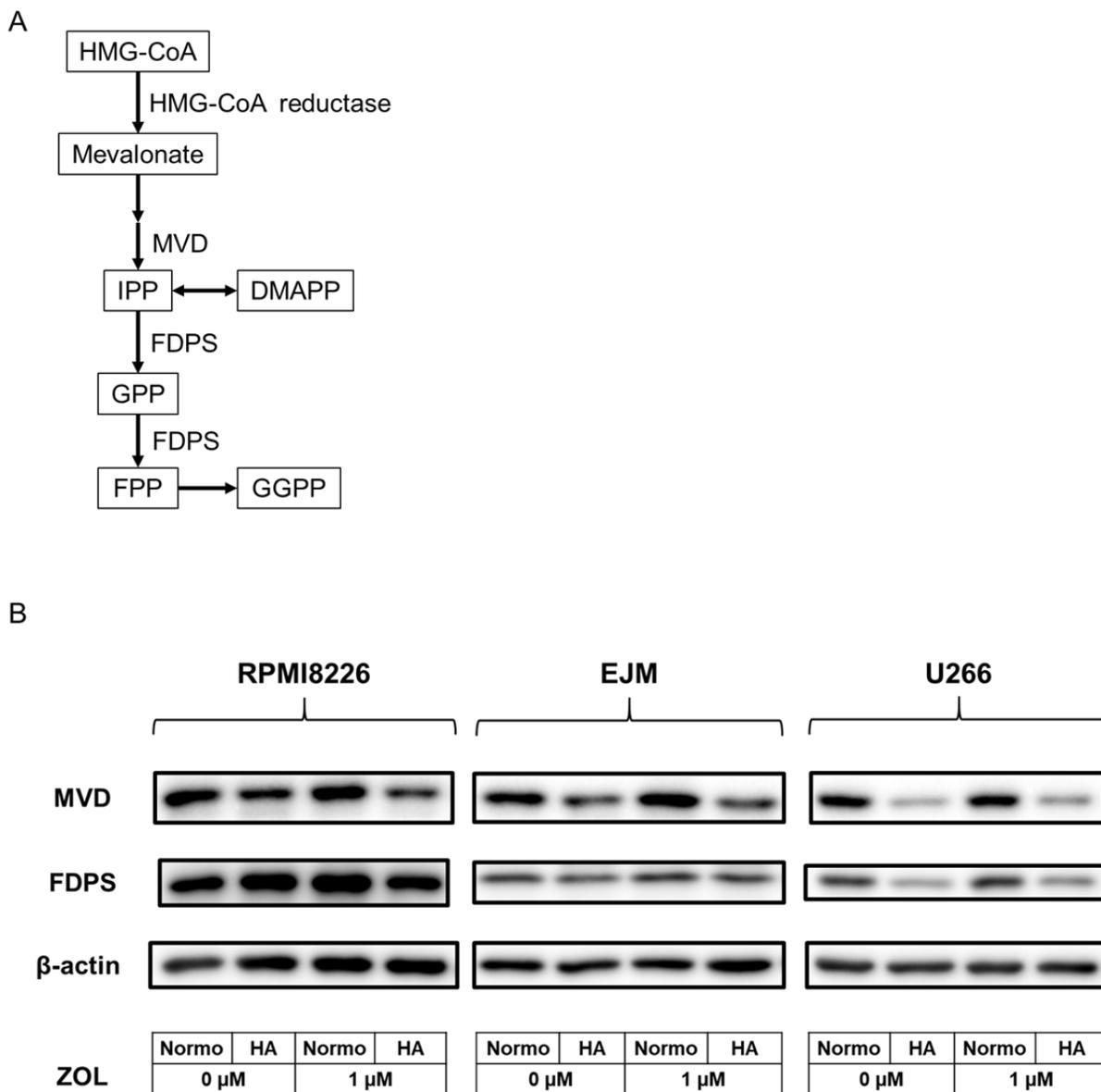


**Figure 12. Correlation between the cytotoxicity of  $\gamma\delta$  T cells and the amount of IPP in multiple myeloma (MM) cells or their culture supernatants.**

The y-axis shows the average cytotoxicity exerted by  $\gamma\delta$  T cells against MM-Normo or MM-HA cells with and without ZOL (1  $\mu$ M). White shapes represent MM-Normo cells, and black shapes represent MM-HA cells. Pearson's correlation analysis:  $R^2 = 0.5013$ ,  $**p < 0.01$  (intracellular) and  $R^2 = 0.7379$ ,  $***p < 0.001$  (supernatant).

### 3. MM-HA 細胞におけるメバロン酸経路の活性比較

メバロン酸経路はさまざまな酵素により調節されている (Figure 14A)。そこで、MM-HA 細胞における IPP 産生量の低下は、これらのメバロン酸経路関連酵素の発現低下によるものではないかと推測し、ウエスタンブロッティング法により IPP 合成酵素 (MVD) と IPP 代謝酵素 (FDPS) のタンパク質発現量を評価した。その結果、ZOL の処置に関わらず、RPMI8226、EJM、U266 細胞のいずれの細胞株において、これらのタンパク質発現が MM-HA 細胞において減少していた。以上の結果から、低酸素環境下において MM 細胞のメバロン酸経路の活性は低下していることが示唆された。



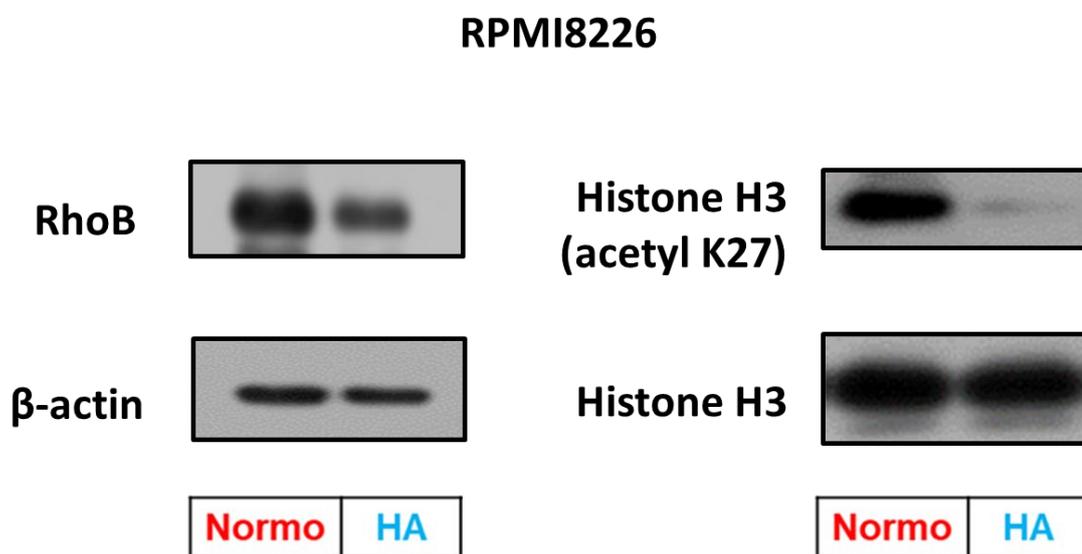
**Figure 14. Expression levels of mevalonate pathway-related proteins in multiple myeloma (MM) cells.**

(A) An outline of the mevalonate pathway and the implicated enzymes. (B) Western blot analysis of MVD and FDPS expression in MM cells with or without ZOL treatment.  $\beta$ -actin was used as a loading control. IPP, isopentenyl pyrophosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; GPP, geranyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranyl-geranyl pyrophosphate; HMG-CoA, hydroxymethylglutaryl-CoA; MVD, mevalonate decarboxylase; FDPS, farnesyl pyrophosphate synthase; ZOL, zoledronic acid.

Modified from Sano, Y., *et al.*, *Anticancer Res.*, **2023**, 43 (2), 547-555.

#### 4. MM-HA 細胞における RhoB のタンパク発現量比較

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 (71)。核内の RhoB が GTP 結合型になり、BTN3A1 の細胞内ドメインに結合することが BTN3A1 の構造変化には重要と考えられている (71)。このことから、低酸素環境下における  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果の減弱の要因として、RhoB の発現の関与を推測した。ウエスタンブロッティング法により、RhoB のタンパク質発現量を MM-Normo 細胞と MM-HA 細胞において比較した。その結果、MM-HA 細胞において MM-Normo 細胞と比較し RhoB のタンパク質発現量が減少していることが明らかとなった。また、RhoB の発現を促進するヒストンのアセチル化 (77) も MM-HA 細胞で減少していることが明らかとなった (Figure 15)。



**Figure 15. Expression levels of RhoB and acetylated Histone H3 in multiple myeloma (MM) cells.**

Western blot analysis of RhoB and acetylated histone H3 expression in RPMI8226 cells. Histone H3 and  $\beta$ -actin were used as a loading control.

#### 第4節 考察

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、MM-HA 細胞が  $\gamma\delta$  T 細胞に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。さらに、 $\gamma\delta$  T 細胞上の MM 細胞認識に必要な接着因子および細胞傷害性分子の発現には変化がなく、MM 細胞の抵抗性獲得の要因が  $\gamma\delta$  T 細胞にないことを明らかにした。そこで、本章では、MM 細胞が  $\gamma\delta$  T 細胞に対する抵抗性を獲得する要因を探索した。まず、ZOL を処置することで、EJM-Normo 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果が増強されることを確認した。しかし、ZOL を処置したにもかかわらず、RPMI-HA および EJM-HA 細胞株の細胞内 IPP 量は、通常酸素環境下の細胞株より著しく低く、 $\gamma\delta$  T 細胞による細胞傷害に対しては抵抗性を示した。一方、U266 細胞における IPP の細胞内蓄積量は、ZOL の処置に関係なく、他の 2 つの MM 細胞株よりも少なく、U266-Normo 細胞および U266-HA 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果も低かった。これらのことから、 $\gamma\delta$  T 細胞の細胞傷害性は標的 MM 細胞による IPP 産生に依存し、MM 細胞の低酸素適応はこれらの細胞内 IPP 量を低下させ、 $\gamma\delta$  T 細胞の細胞傷害性を低下させることが示唆された。また、MM 細胞はその環境に IPP を分泌し、標的 MM 細胞への  $\gamma\delta$  T 細胞の走化性を誘導する可能性がある (68) ため、MM 細胞の培養上清中の IPP 量を測定したところ、RPMI8226-HA および EJM-HA 細胞の培養上清中の IPP 量は、正常酸素濃度で培養した細胞の上清中よりも有意に低下していた。したがって、低酸素条件下では、 $\gamma\delta$  T 細胞の遊走も減少していることが推測される。細胞内 IPP 量と培養上清中 IPP 量がともに  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果と相関関係にあったことは、これらを支持する。

これまでに、我々は前立腺がん幹細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を検討しており、cancer sphere 由来の前立腺がん幹細胞に対する抗腫瘍効果は減弱することを明らかにしている (38)。本研究とはがん種の違いや、cancer sphere 由来の細胞と低酸素環境に適応した細胞との違いはあるが、いずれの細胞も幹細胞マーカーの発現が亢進し、自己複製能を示すことから、がん幹細胞としての性状を有している。先行研究 (38) では、その機序は明らかにされていないが、がん幹細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果は低下しており、この結果は今回のデータを支持するものである。

MM-HA 細胞における IPP 産生量低下の機序を明らかにするために、MM 細胞における MVD および FDPS タンパク質の発現を評価した。MM-HA 細胞では、これらのメバロン酸経路酵素の発現が MM-Normo 細胞よりも低かったことから、低酸素条件下で、MM 細胞は MVD と FDPS の発現を低下させ、その結果 IPP 産生が低下し、 $\gamma\delta$  T 細胞による細胞傷害に対して抵抗性となったことを示唆する。これまでに HIF-1 $\alpha$  によりメバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素のタンパク質発現が低下していることが明らかとなっている (78) が、HIF-1 $\alpha$  と MVD、FDPS の関係は調べられていない。また、これらのメバロン酸経路関連酵素の活性も調べられていない。さらに、IPP とその異性体 dimethylallyl diphosphate (DMAPP) の総量を IPP 量として評価しているが、isopentenyl-diphosphate delta isomerase により相互変化するため、DMAPP への変化が優勢になることで、IPP 量が減少している可能性は否定できない。IPP とその構造異性体 DMAPP であるは同一のピーク保持時間であるため、今回使用したカラムでは分離できなかった。異性体専用カラムの使用によりこれらを分離できるが、このカ

ラムでは GPP、GGPP、FPP の分離が困難となる。または、DMAPP のみが酸加水分解によりイソプレンを生成することを利用し、このイソプレンをガスクロマトグラフィーにより測定し、IPP と DMAPP の総量から差し引きすることで IPP 量を求めることもできる。しかしながら、IPP 以外にも GPP、FPP、GGPP の量も MM-HA 細胞にて減少していたことから、メバロン酸経路全体の活性が低下していることが示唆され、IPP と DMAPP がともに減少していると考えられる。(Supplementary Figures 3、4)。

本研究で明らかとなった MM-HA 細胞の  $\gamma\delta$  T 細胞抵抗性を改善するには、ZOL の処置濃度を増加させることも方法の一つではあるが、ZOL 処置後の MM-HA 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞による細胞傷害性の増加はごくわずかであった。このことは、MM 幹細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を増強するには、ZOL 処置だけでは不十分であり、 $\gamma\delta$  T 細胞の細胞傷害性を増強する追加戦略を発見することが必要であることを示している。Programmed cell death 1 (PD-1) / PD-ligand 1 (PD-L1) 経路は、T 細胞の免疫抑制を誘導する。著者は、RPMI8226-HA 細胞における PD-L1 の発現が、RPMI8226-Normo 細胞よりも低いことを見出した(データ未発表)。Smith らは、膀胱癌における PD-L1 の発現が低酸素条件下で減少することを実証した(79)。我々の研究では、RPMI8226-HA 細胞の PD-L1 の発現が低下しているにも関わらず、 $\gamma\delta$  T 細胞による抗腫瘍効果は増強されなかった(データ未掲載)。さらに、我々は以前、 $\gamma\delta$  T 細胞が PD-L1 の発現とは無関係に抗腫瘍効果を発揮することを報告している(80)。以上の結果から、PD-1 / PD-L1 経路の阻害は、MM 幹細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞による細胞傷害性を増強しないと推測される。また、本研究により、MM-HA 細胞において RhoB が減少していることが示された。RhoB は  $\gamma\delta$  T 細胞の活性化に必要である BTN3A1 の構造変化に関与している。そのため、RhoB のタンパク発現量を上昇させることで、MM-HA 細胞の抵抗性を解除できると推測した。また、RhoB の発現を促進しているヒストンのアセチル化が MM-HA 細胞で減少していた。HIF-1 $\alpha$  複合体の安定化に histone deacetylase (HDAC) の寄与を示唆する報告もされており(81)、HIF-1 $\alpha$  複合体が安定化している低酸素環境下では HDAC が活性化していると推測される。そのため、MM-HA 細胞では HDAC 活性化によりヒストンのアセチル化が減少し、RhoB のタンパク質発現が抑制されていると考えられる。このことから、HDAC 阻害剤を用いることで RhoB のタンパク質発現量を上昇させ、MM-HA 細胞に対する抗腫瘍効果を増強できる可能性がある。

## 第5節 小括

本章では幹細胞様 MM 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果減弱の要因を探索し、以下の知見を得た。

1. MM-Normo 細胞と MM-HA 細胞の細胞接着分子には差は認められなかった。
2. MM-HA 細胞ではメバロン酸経路の活性が低下し、IPP の産生量が減少している。
3. MM-HA 細胞では、ヒストンのアセチル化減少により RhoB のタンパク質発現量が減少している。

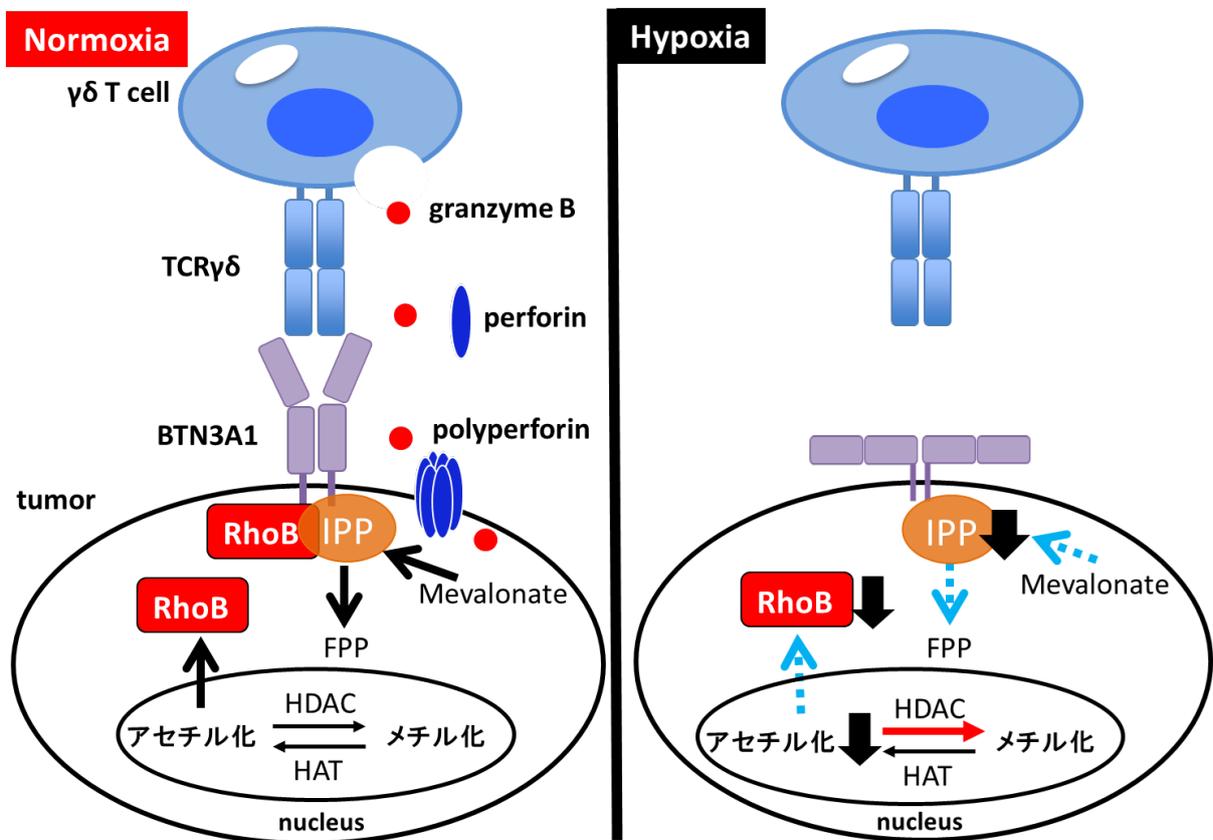
## 総括

MM は難治性の腫瘍とされてきたが、近年の分子標的薬の登場などにより、その治療成績は改善されつつある。しかしながら、MM 幹細胞が既存の治療薬に抵抗性を示すため、今もなお MM 患者の生命予後は不良である。そのため、MM 幹細胞に対する新規治療法の開発は MM の根治を目指す上で、最重要課題の 1 つである。がん幹細胞の薬剤抵抗性の要因の 1 つとして薬剤排出トランスポーターや ALDH の発現上昇が考えられ、新たな治療アプローチが必要である。著者は MHC 非拘束性のがん細胞の BTN3A1 を認識して攻撃する  $\gamma\delta$  T 細胞は、MM 幹細胞に抗腫瘍効果を発揮できると推測した。

本研究では MM 幹細胞に対する免疫療法の確立を目指し、MM-HA 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。第 1 章では、低酸素環境に適応した幹細胞様 MM-HA 細胞を樹立させ、 $\gamma\delta$  T 細胞による抗腫瘍効果を検討した。その結果、MM-HA 細胞は  $\gamma\delta$  T 細胞に対して抵抗性を獲得していることが明らかとなった。しかしながら、低酸素環境下において  $\gamma\delta$  T 細胞の接着分子や細胞傷害性分子等の産生に変化はなかった。第 1、2 章では、この抵抗性獲得機序を探索し、MM-HA 細胞ではメバロン酸代謝経路が抑制され IPP 蓄積量が減少し、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 (Figure 16)、このように、MM 幹細胞は  $\gamma\delta$  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。これらの知見の基づき、今後はこの MM-HA 細胞の  $\gamma\delta$  T 細胞抵抗性の解除を目的として研究を行っていく。具体的には、「MM-HA 細胞内 IPP の上昇」、「RhoB のタンパク発現亢進」により目的を達成できると考える。本研究では、ZOL 処置時でも MM-HA 細胞の細胞内 IPP 量はそれほど上昇しなかった。しかしながら、現在では、新規プロドラッグ型ビスホスホネート製剤が開発されており (82)、tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino) ethylidene-1,1-bisphosphonate (PTA) は ZOL と比較して、かなり強力に  $\gamma\delta$  T 細胞を活性化する (83)。リンパ腫細胞株 Raji 細胞に対して 1000  $\mu$ M ZOL を 2 時間処置すると細胞内 IPP 濃度が  $0.07 \pm 0.0$  nmole であったのに対して、PTA 100 nM 処置では  $0.222 \pm 0.005$  nmole であり、ZOL よりはるかに低い濃度で、約 3 倍量の IPP を蓄積させる (84)。以上のことから、PTA を用いることで MM-HA 細胞の IPP 蓄積量も上昇させる可能性がある。また、MM-HA 細胞においてヒストンのアセチル化減少が、RhoB の発現を減少させていることが示唆されているため、HDAC 阻害剤の処置により、RhoB の発現を亢進できると考える。以上のような方法を用いることで、幹細胞様 MM 細胞の BTN3A1 の構造変化を促進させ、幹細胞様 MM 細胞に対する  $\gamma\delta$  T 細胞の抗腫瘍効果を増強可能であると考えられる。

現在は、新たな免疫療法として、chimeric antigen receptor (CAR) を  $\alpha\beta$  T 細胞に導入した CAR-T 療法が行われている。現在、臨床応用されている  $\alpha\beta$  T 細胞をベースとした CAR-T 細胞療法では、PD-1/PD-L1 経路による免疫抑制を受ける (85)。しかしながら、我々はこれまでに  $\gamma\delta$  T 細胞は PD-1/PD-L1 経路の影響を受けないことを明らかとしている (80)。 $\gamma\delta$  T 細胞に CAR を導入して CAR- $\gamma\delta$  T 細胞とすることで、PD-1/PD-L1 経路による問題が改善できると考えられる。以上のことから、著者は  $\gamma\delta$  T 細胞を用いた免疫療法は拡大していくと考える。本研究で明らかとした  $\gamma\delta$  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。



**Figure 16. The mechanism of resistance for  $\gamma\delta$  T cell in MM-HA cells.**

The cytotoxicity of ex vivo expanded  $\gamma\delta$  T cells against MM-HA cells was attenuated by the suppression of IPP production via the mevalonate pathway and by reduction of RhoB expression. TCR, T cell receptor; BTN, butyrophilin; IPP, isopentenyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate; HDAC, histone deacetylase; HAT, histone acetyltransferase

## 謝辞

本研究を終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生理学分野 芦原英司 教授、細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学 生化学分野 中山祐治 教授、同細胞生物学分野 藤室雅弘 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究を推進するにあたりご指導およびご助言いただき、また本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただきました次の方々に、心より感謝申し上げます。

新潟薬科大学 薬品分析化学研究室

中川沙織 准教授

桑原直子

京都薬科大学 病態生理学分野

杉山雄輝 学士

清水大器 学士

松井透磨 学士

吉澤正人 学士

藤堂暢久 学士

羽立祐貴 学士

最後に、この4年間の大学院生活を支えてくれた両親に心から深く感謝いたします。

## 引用文献

1. 造血器腫瘍診療ガイドライン 2018年版補訂版 一般社団法人 日本血液学会
2. Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (National Cancer Registry, Ministry of Health, Labour and Welfare)
3. Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (Vital Statistics of Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare)
4. Kuehl, W. M.; Bergsagel, P. L. Multiple Myeloma: Evolving Genetic Events and Host Interactions. *Nat. Rev. Cancer* 2002 23 **2002**, 2 (3), 175–187.
5. Walker, B. A.; Wardell, C. P.; Johnson, D. C.; Kaiser, M. F.; Begum, D. B.; Dahir, N. B.; Ross, F. M.; Davies, F. E.; Gonzalez, D.; Morgan, G. J. Characterization of IGH Locus Breakpoints in Multiple Myeloma Indicates a Subset of Translocations Appear to Occur in Pregerminal Center B Cells. *Blood* **2013**, 121 (17), 3413–3419.
6. Hanamura, I.; Iida, S.; Taniwaki, M. 多発性骨髄腫の分子病態 *Int. J. Myeloma* **2013**, 3 (1), 35–46.
7. Abe, M. 多発性骨髄腫の病態解明と治療の進歩 *J Jpn Soc Int Med* **2015**, 104 (2), 305–313.
8. Keats, J. J.; Chesi, M.; Egan, J. B.; Garbitt, V. M.; Palmer, S. E.; Braggio, E.; Van Wier, S.; Blackburn, P. R.; Baker, A. S.; Dispenzieri, A.; Kumar, S.; Rajkumar, S. V.; Carpten, J. D.; Barrett, M.; Fonseca, R.; Stewart, A. K.; Bergsagel, P. L. Clonal Competition with Alternating Dominance in Multiple Myeloma. *Blood* **2012**, 120 (5), 1067–1076.
9. Pawlyn, C.; Morgan, G. J. Evolutionary Biology of High-Risk Multiple Myeloma. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, 17 (9), 543–556.
10. Egan, J. B.; Shi, C. X.; Tembe, W.; Christoforides, A.; Kurdoglu, A.; Sinari, S.; Middha, S.; Asmann, Y.; Schmidt, J.; Braggio, E.; Keats, J. J.; Fonseca, R.; Bergsagel, P. L.; Craig, D. W.; Carpten, J. D.; Stewart, A. K. Whole-Genome Sequencing of Multiple Myeloma from Diagnosis to Plasma Cell Leukemia Reveals Genomic Initiating Events, Evolution, and Clonal Tides. *Blood* **2012**, 120 (5), 1060–1066.
11. Hoogstraten, B.; Sheehe, P. R.; Cuttner, J.; Cooper, T.; Kyle, R. A.; Oberfield, R. A.; Townsend, S. R.; Harley, J. B.; Hayes, D. M.; Costa, G.; Holland, J. F. Melphalan in Multiple Myeloma. *Blood* **1967**, 30 (1), 74–83.
12. McIntyre, O. R.; Pajak, T. F.; Kyle, R. A.; Cornwell, G. G.; Leone, L. Response Rate and Survival in Myeloma Patients Receiving Prednisone Alone. *Med. Pediatr. Oncol.* **1985**, 13 (5), 239–243.
13. R, A.; A, H.; AU, K.; M, L.; EM, M.; PJ, M.; WJ, S.; HE, W. Treatment for Multiple Myeloma. Combination Chemotherapy with Different Melphalan Dose Regimens. *JAMA* **1969**, 208 (9), 1680–1685.
14. Wood, A. J. J.; Alexanian, R.; Dimopoulos, M. The Treatment of Multiple Myeloma. <https://doi.org/10.1056/NEJM199402173300709> **1994**, 330 (7), 484–489.
15. Thomas, S. K.; Richards, T. A.; Weber, D. M. Lenalidomide in Multiple Myeloma. *Best Pract.*

- Res. Clin. Haematol.* **2007**, *20* (4), 717–735.
16. Terpos, E.; Roussou, M.; Dimopoulos, M. A. Bortezomib in Multiple Myeloma. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4* (5), 639–654.
  17. Zamagni, E.; Tacchetti, P.; Pantani, L.; Cavo, M. Anti-CD38 and Anti-SLAMF7: The Future of Myeloma Immunotherapy. *Expert Rev. Hematol.* **2018**, *11* (5), 423–435.
  18. Ozaki, S.; Handa, H.; Saitoh, T.; Murakami, H.; Itagaki, M.; Asaoku, H.; Suzuki, K.; Isoda, A.; Matsumoto, M.; Sawamura, M.; Konishi, J.; Sunami, K.; Takezako, N.; Hagiwara, S.; Kuroda, Y.; Chou, T.; Nagura, E.; Shimizu, K. Trends of Survival in Patients with Multiple Myeloma in Japan: A Multicenter Retrospective Collaborative Study of the Japanese Society of Myeloma. *Blood Cancer J.* **2015**, *5* (9), e349.
  19. Chari, A.; Suvannasankha, A.; Fay, J. W.; Arnulf, B.; Kaufman, J. L.; Ifthikharuddin, J. J.; Weiss, B. M.; Krishnan, A.; Lentzsch, S.; Comenzo, R.; Wang, J.; Nottage, K.; Chiu, C.; Khokhar, N. Z.; Ahmadi, T.; Lonial, S. Daratumumab plus Pomalidomide and Dexamethasone in Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Blood* **2017**, *130* (8), 974–981.
  20. Mateos, M. V.; Masszi, T.; Grzasko, N.; Hansson, M.; Sandhu, I.; Pour, L.; Viterbo, L.; Jackson, S. R.; Stoppa, A. M.; Gimsing, P.; Hamadani, M.; Borsaru, G.; Berg, D.; Lin, J.; Bacco, A. Di; Van De Velde, H.; Richardson, P. G.; Moreau, P. Impact of Prior Therapy on the Efficacy and Safety of Oral Ixazomib-Lenalidomide-Dexamethasone vs. Placebo-Lenalidomide-Dexamethasone in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma in TOURMALINE-MM1. *Haematologica* **2017**, *102* (10), 1767–1775.
  21. Palumbo, A.; Chanan-Khan, A.; Weisel, K.; Nooka, A. K.; Masszi, T.; Beksac, M.; Spicka, I.; Hungria, V.; Munder, M.; Mateos, M. V.; Mark, T. M.; Qi, M.; Schecter, J.; Amin, H.; Qin, X.; Deraedt, W.; Ahmadi, T.; Spencer, A.; Sonneveld, P. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375* (8), 754–766.
  22. Visvader, J. E.; Lindeman, G. J. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell* **2012**, *10* (6), 717–728.
  23. Matsui, W.; Wang, Q.; Barber, J. P.; Brennan, S.; Smith, B. D.; Borrello, I.; McNiece, I.; Lin, L.; Ambinder, R. F.; Peacock, C.; Watkins, D. N.; Huff, C. A.; Jones, R. J. Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties, and Drug Resistance. *Cancer Res.* **2008**, *68* (1), 190–197.
  24. Clarke, M. F.; Fuller, M. Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve. *Cell* **2006**, *124* (6), 1111–1115.
  25. Hu, J.; Van Valckenborgh, E.; Menu, E.; De Bruyne, E.; Vanderkerken, K. Understanding the Hypoxic Niche of Multiple Myeloma: Therapeutic Implications and Contributions of Mouse Models. *Dis. Model. Mech.* **2012**, *5* (6), 763–771.
  26. Nakagawa, Y.; Ashihara, E.; Yao, H.; Yokota, A.; Toda, Y.; Miura, Y.; Nakata, S.; Hirai, H.; Maekawa, T. Multiple Myeloma Cells Adapted to Long-Exposure of Hypoxia Exhibit Stem Cell Characters with TGF- $\beta$ /Smad Pathway Activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *496*

- (2), 490–496.
27. McCarthy, E. F. The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Iowa Orthop. J.* **2006**, *26*, 154.
  28. Burnet, M. Cancer—A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *Br. Med. J.* **1957**, *1* (5022), 779.
  29. Schreiber, R. D.; Old, L. J.; Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity’s Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* (80-. ). **2011**, *331* (6024), 1565–1570.
  30. Björkstrand, B.; Gahrton, G. High-Dose Treatment with Autologous Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma: Past, Present, and Future. *Semin. Hematol.* **2007**, *44* (4), 227–233.
  31. Richardson, P. G.; Mitsiades, C.; Schlossman, R.; Munshi, N.; Anderson, K. New Drugs for Myeloma. *Oncologist* **2007**, *12* (6), 664–689.
  32. Vij, R.; Wang, M.; Kaufman, J. L.; Lonial, S.; Jakubowiak, A. J.; Stewart, A. K.; Kukreti, V.; Jagannath, S.; McDonagh, K. T.; Alsina, M.; Bahlis, N. J.; Reu, F. J.; Gabrail, N. Y.; Belch, A.; Matous, J. V.; Lee, P.; Rosen, P.; Sebag, M.; Vesole, D. H.; Kunkel, L. A.; Wear, S. M.; Wong, A. F.; Orlowski, R. Z.; Siegel, D. S. An Open-Label, Single-Arm, Phase 2 (PX-171-004) Study of Single-Agent Carfilzomib in Bortezomib-Naive Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Blood* **2012**, *119* (24), 5661–5670.
  33. Lacy, M. Q.; Hayman, S. R.; Gertz, M. A.; Dispenzieri, A.; Buadi, F.; Kumar, S.; Greipp, P. R.; Lust, J. A.; Russell, S. J.; Dingli, D.; Kyle, R. A.; Fonseca, R.; Bergsagel, P. L.; Roy, V.; Mikhael, J. R.; Stewart, A. K.; Laumann, K.; Allred, J. B.; Mandrekar, S. J.; Rajkumar, S. V. Pomalidomide (CC4047) plus Low-Dose Dexamethasone as Therapy for Relapsed Multiple Myeloma. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27* (30), 5008–5014.
  34. Magee, J. A.; Piskounova, E.; Morrison, S. J. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* **2012**, *21* (3), 283–296.
  35. Kabelitz, D.; Wesch, D.; Pitters, E.; Zöller, M. Potential of Human  $\Gamma\delta$  T Lymphocytes for Immunotherapy of Cancer. *Int. J. Cancer* **2004**, *112* (5), 727–732.
  36. Tanaka, Y.; Tanaka, Y.; Bloom, B. R.; Morita, C. T.; Brenner, M. B.; Nieves, E. Natural and Synthetic Non-Peptide Antigens Recognized by Human Gamma Delta T Cells. *Nature* **1995**, *375* (6527), 155–158.
  37. Gober, H. J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; De Libero, G. Human T Cell Receptor  $\Gamma\delta$  Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J. Exp. Med.* **2003**, *197* (2), 163.
  38. Miyashita, M.; Tomogane, M.; Nakamura, Y.; Shimizu, T.; Fujihara, A.; Ukimura, O.; Ashihara, E. Sphere-Derived Prostate Cancer Stem Cells Are Resistant to  $\Gamma\delta$  T Cell Cytotoxicity. *Anticancer Res.* **2020**, *40* (10), 5481–5487.
  39. Shimizu, T.; Tomogane, M.; Miyashita, M.; Ukimura, O.; Ashihara, E. Low Dose Gemcitabine Increases the Cytotoxicity of Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells in Bladder Cancer Cells in Vitro and in an Orthotopic Xenograft Model. *Oncoimmunology* **2018**, *7* (5), e1424671.

40. Yuasa, T.; Sato, K.; Ashihara, E.; Takeuchi, M.; Maita, S.; Tsuchiya, N.; Habuchi, T.; Maekawa, T.; Kimura, S. Intravesical Administration of Gammadelta T Cells Successfully Prevents the Growth of Bladder Cancer in the Murine Model. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58* (4), 493–502.
41. Uchida, R.; Ashihara, E.; Sato, K.; Kimura, S.; Kuroda, J.; Takeuchi, M.; Kawata, E.; Taniguchi, K.; Okamoto, M.; Shimura, K.; Kiyono, Y.; Shimazaki, C.; Taniwaki, M.; Maekawa, T. Gamma Delta T Cells Kill Myeloma Cells by Sensing Mevalonate Metabolites and ICAM-1 Molecules on Cell Surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *354* (2), 613–618.
42. Morita, C. T.; Jin, C.; Sarikonda, G.; Wang, H. Nonpeptide Antigens, Presentation Mechanisms, and Immunological Memory of Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells: Discriminating Friend from Foe through the Recognition of Prenyl Pyrophosphate Antigens. *Immunol. Rev.* **2007**, *215* (1), 59–76.
43. Gober, H. J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; De Libero, G. Human T Cell Receptor Gammadelta Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J. Exp. Med.* **2003**, *197* (2), 163–168.
44. Rigau, M.; Ostrouska, S.; Fulford, T. S.; Johnson, D. N.; Woods, K.; Ruan, Z.; McWilliam, H. E. G.; Hudson, C.; Tutuka, C.; Wheatley, A. K.; Kent, S. J.; Villadangos, J. A.; Pal, B.; Kurts, C.; Simmonds, J.; Pelzing, M.; Nash, A. D.; Hammet, A.; Verhagen, A. M.; Vairo, G.; Maraskovsky, E.; Panousis, C.; Gherardin, N. A.; Cebon, J.; Godfrey, D. I.; Behren, A.; Uldrich, A. P. Butyrophilin 2A1 Is Essential for Phosphoantigen Reactivity by  $\Gamma\delta$  T Cells. *Science* **2020**, *367* (6478), eaay5516.
45. Wang, H.; Morita, C. T. Sensor Function for Butyrophilin 3A1 in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells. *J. Immunol.* **2015**, *195* (10), 4583–4594.
46. Wang, H.; Henry, O.; Distefano, M. D.; Wang, Y.-C.; Räikkönen, J.; Mönkkönen, J.; Tanaka, Y.; Morita, C. T. Butyrophilin 3A1 Plays an Essential Role in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells. *J. Immunol.* **2013**, *191* (3), 1029–1042.
47. Sandstrom, A.; Peigné, C. M.; Léger, A.; Crooks, J. E.; Konczak, F.; Gesnel, M. C.; Breathnach, R.; Bonneville, M.; Scotet, E.; Adams, E. J. The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells. *Immunity* **2014**, *40* (4), 490–500.
48. Fazzi, R.; Petrini, I.; Giuliani, N.; Morganti, R.; Carulli, G.; Dalla Palma, B.; Notarfranchi, L.; Galimberti, S.; Buda, G. Phase II Trial of Maintenance Treatment With IL2 and Zoledronate in Multiple Myeloma After Bone Marrow Transplantation: Biological and Clinical Results. *Front. Immunol.* **2021**, *11*.
49. Ji, N.; Mukherjee, N.; Reyes, R. M.; Gelfond, J.; Javors, M.; Meeks, J. J.; McConkey, D. J.; Shu, Z. J.; Ramamurthy, C.; Dennett, R.; Curiel, T. J.; Svatek, R. S. Rapamycin Enhances BCG-Specific  $\Gamma\delta$  T Cells during Intravesical BCG Therapy for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: A Randomized, Double-Blind Study. *J. Immunother. cancer* **2021**, *9* (3), e001941.

50. Aoki, T.; Matsushita, H.; Hoshikawa, M.; Hasegawa, K.; Kokudo, N.; Kakimi, K. Adjuvant Combination Therapy with Gemcitabine and Autologous  $\Gamma\delta$  T-Cell Transfer in Patients with Curatively Resected Pancreatic Cancer. *Cytotherapy* **2017**, *19* (4), 473–485.
51. Kakimi, K.; Matsushita, H.; Masuzawa, K.; Karasaki, T.; Kobayashi, Y.; Nagaoka, K.; Hosoi, A.; Ikemura, S.; Kitano, K.; Kawada, I.; Manabe, T.; Takehara, T.; Ebisudani, T.; Nagayama, K.; Nakamura, Y.; Suzuki, R.; Yasuda, H.; Sato, M.; Soejima, K.; Nakajima, J. Adoptive Transfer of Zoledronate-Expanded Autologous  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Cells in Patients with Treatment-Refractory Non-Small-Cell Lung Cancer: A Multicenter, Open-Label, Single-Arm, Phase 2 Study. *J. Immunother. cancer* **2020**, *8* (2), e001185.
52. Gruenbacher, G.; Thurnher, M. Mevalonate Metabolism in Cancer. *Cancer Lett.* **2015**, *356* (2 Pt A), 192–196.
53. Märten, A.; von Lilienfeld-Toal, M.; Büchler, M. W.; Schmidt, J. Soluble MIC Is Elevated in the Serum of Patients with Pancreatic Carcinoma Diminishing Gammadelta T Cell Cytotoxicity. *Int. J. cancer* **2006**, *119* (10), 2359–2365.
54. Niu, C.; Jin, H.; Li, M.; Zhu, S.; Zhou, L.; Jin, F.; Zhou, Y.; Xu, D.; Xu, J.; Zhao, L.; Hao, S.; Li, W.; Cui, J. Low-Dose Bortezomib Increases the Expression of NKG2D and DNAM-1 Ligands and Enhances Induced NK and  $\Gamma\delta$  T Cell-Mediated Lysis in Multiple Myeloma. *Oncotarget* **2017**, *8* (4), 5954–5964.
55. Liu, Z.; Guo, B.; Lopez, R. D. Expression of Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 or ICAM-2 Is Critical in Determining Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Cytolysis by Human Gammadelta-T Cells: Implications in the Design of Gammadelta-T-Cell-Based Immunotherapies for Pancreas. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24* (5), 900–911.
56. Correia, D. V.; D'Orey, F.; Cardoso, B. A.; Lança, T.; Grosso, A. R.; DeBarros, A.; Martins, L. R.; Barata, J. T.; Silva-Santos, B. Highly Active Microbial Phosphoantigen Induces Rapid yet Sustained MEK/Erk- and PI-3K/Akt-Mediated Signal Transduction in Anti-Tumor Human  $\Gamma\delta$  T-Cells. *PLoS One* **2009**, *4* (5), e5657
57. Li, H.; David Pauza, C. Interplay of T-Cell Receptor and Interleukin-2 Signalling in  $V\gamma 2V\delta 2$  T-Cell Cytotoxicity. *Immunology* **2011**, *132* (1), 96–103.
58. Ribot, J. C.; deBarros, A.; Mancio-Silva, L.; Pamplona, A.; Silva-Santos, B. B7-CD28 Costimulatory Signals Control the Survival and Proliferation of Murine and Human  $\Gamma\delta$  T Cells via IL-2 Production. *J. Immunol.* **2012**, *189* (3), 1202–1208.
59. Macian, F. NFAT Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5* (6), 472–484.
60. Roelofs, A. J.; Jauhainen, M.; Mönkkönen, H.; Rogers, M. J.; Mönkkönen, J.; Thompson, K. Peripheral Blood Monocytes Are Responsible for Gammadelta T Cell Activation Induced by Zoledronic Acid through Accumulation of IPP/DMAPP. *Br. J. Haematol.* **2009**, *144* (2), 245–250.
61. Nerdal, P. T.; Peters, C.; Oberg, H.-H.; Zlatev, H.; Lettau, M.; Quabius, E. S.; Sousa, S.;

- Gonnermann, D.; Auriola, S.; Olive, D.; Määttä, J.; Janssen, O.; Kabelitz, D. Butyrophilin 3A/CD277-Dependent Activation of Human  $\Gamma\delta$  T Cells: Accessory Cell Capacity of Distinct Leukocyte Populations. *J. Immunol.* **2016**, *197* (8), 3059–3068.
62. Tomogane, M.; Omura, M.; Sano, Y.; Shimizu, D.; Toda, Y.; Hosogi, S.; Kimura, S.; Ashihara, E. Expression Level of BTN3A1 on the Surface of CD14(+) Monocytes Is a Potential Predictor of  $\Gamma\delta$  T Cell Expansion Efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *588*, 47–54.
63. Zhou, S.; Schuetz, J. D.; Bunting, K. D.; Colapietro, A. M.; Sampath, J.; Morris, J. J.; Lagutina, I.; Grosveld, G. C.; Osawa, M.; Nakauchi, H.; Sorrentino, B. P. The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 Is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and Is a Molecular Determinant of the Side-Population Phenotype. *Nat. Med.* **2001**, *7* (9), 1028–1034.
64. Xu, X.; Chai, S.; Wang, P.; Zhang, C.; Yang, Y.; Wang, K. Aldehyde Dehydrogenases and Cancer Stem Cells. *Cancer Lett.* **2015**, *369* (1), 50–57.
65. Kunzmann, V.; Bauer, E.; Feurle, J.; Weissinger, F.; Tony, H. P.; Wilhelm, M. Stimulation of Gammadelta T Cells by Aminobisphosphonates and Induction of Antiplasma Cell Activity in Multiple Myeloma. *Blood* **2000**, *96* (2), 384–392.
66. Mariani, S.; Muraro, M.; Pantaleoni, F.; Fiore, F.; Nuschak, B.; Peola, S.; Foglietta, M.; Palumbo, A.; Coscia, M.; Castella, B.; Bruno, B.; Bertieri, R.; Boano, L.; Boccadoro, M.; Massaia, M. Effector Gammadelta T Cells and Tumor Cells as Immune Targets of Zoledronic Acid in Multiple Myeloma. *Leukemia* **2005**, *19* (4), 664–670.
67. Burjanadzé, M.; Condomines, M.; Reme, T.; Quittet, P.; Latry, P.; Lugagne, C.; Romagne, F.; Morel, Y.; Rossi, J. F.; Klein, B.; Lu, Z. Y. In Vitro Expansion of Gamma Delta T Cells with Anti-Myeloma Cell Activity by Phosphostim and IL-2 in Patients with Multiple Myeloma. *Br. J. Haematol.* **2007**, *139* (2), 206–216.
68. Ashihara, E.; Munaka, T.; Kimura, S.; Nakagawa, S.; Nakagawa, Y.; Kanai, M.; Hirai, H.; Abe, H.; Miida, T.; Yamato, S.; Shoji, S.; Maekawa, T. Isopentenyl Pyrophosphate Secreted from Zoledronate-Stimulated Myeloma Cells, Activates the Chemotaxis of  $\Gamma\delta$ T Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *463* (4), 650–655.
69. Guo, W.; Wang, H.; Chen, P.; Shen, X.; Zhang, B.; Liu, J.; Peng, H.; Xiao, X. Identification and Characterization of Multiple Myeloma Stem Cell-Like Cells. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13* (14), 3523.
70. Hwang, S.; Nguyen, A. D.; Jo, Y.; Engelking, L. J.; Brugarolas, J.; DeBose-Boyd, R. A. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Activates Insulin-Induced Gene 2 (Insig-2) Transcription for Degradation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)-CoA Reductase in the Liver. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292* (22), 9382–9393.
71. Sebestyen, Z.; Scheper, W.; Vyborova, A.; Gu, S.; Rychnavska, Z.; Schiffler, M.; Cleven, A.; Chéneau, C.; van Noorden, M.; Peigné, C.-M.; Olive, D.; Lebbink, R. J.; Oostvogels, R.; Mutis, T.; Schuurhuis, G. J.; Adams, E. J.; Scotet, E.; Kuball, J. RhoB Mediates Phosphoantigen Recognition by V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cell Receptor. *Cell Rep.* **2016**, *15* (9), 1973–1985.

72. Redwan, E. M.; Al-Hejin, A. M.; Almehdar, H. A.; Elsaway, A. M.; Uversky, V. N. Prediction of Disordered Regions and Their Roles in the Anti-Pathogenic and Immunomodulatory Functions of Butyrophilins. *Molecules* **2018**, *23* (2), 328.
73. Harly, C.; Guillaume, Y.; Nedellec, S.; Peigné, C. M.; Mönkkönen, H.; Mönkkönen, J.; Li, J.; Kuball, J.; Adams, E. J.; Netzer, S.; Déchanet-Merville, J.; Léger, A.; Herrmann, T.; Breathnach, R.; Olive, D.; Bonneville, M.; Scotet, E. Key Implication of CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A) in Cellular Stress Sensing by a Major Human  $\Gamma\delta$  T-Cell Subset. *Blood* **2012**, *120* (11), 2269–2279.
74. Vantourout, P.; Laing, A.; Woodward, M. J.; Zlatareva, I.; Apolonia, L.; Jones, A. W.; Snijders, A. P.; Malim, M. H.; Hayday, A. C. Heteromeric Interactions Regulate Butyrophilin (BTN) and BTN-like Molecules Governing  $\Gamma\delta$  T Cell Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (5), 1039–1044.
75. Compte, E.; Pontarotti, P.; Collette, Y.; Lopez, M.; Olive, D. Frontline: Characterization of BT3 Molecules Belonging to the B7 Family Expressed on Immune Cells. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34* (8), 2089–2099.
76. Kranenburg, O.; Poland, M.; Gebbink, M.; Oomen, L.; Moolenaar, W. H. Dissociation of LPA-Induced Cytoskeletal Contraction from Stress Fiber Formation by Differential Localization of RhoA. *J. Cell Sci.* **1997**, *110* (19), 2417–2427.
77. Gutierrez, E.; Cahatol, I.; Bailey, C. A. R.; Lafargue, A.; Zhang, N.; Song, Y.; Tian, H.; Zhang, Y.; Chan, R.; Gu, K.; Zhang, A. C. C.; Tang, J.; Liu, C.; Connis, N.; Dennis, P.; Zhang, C. Regulation of RhoB Gene Expression during Tumorigenesis and Aging Process and Its Potential Applications in These Processes. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (6), 818.
78. Minegaki, T.; Koiki, S.; Douke, Y.; Yamane, C.; Suzuki, A.; Mori, M.; Tsujimoto, M.; Nishiguchi, K. Augmentation of the Cytotoxic Effects of Nitrogen-Containing Bisphosphonates in Hypoxia. *J. Pharm. Pharmacol.* **2018**, *70* (8), 1040–1047.
79. Smith, V.; Mukherjee, D.; Lunj, S.; Choudhury, A.; Hoskin, P.; West, C.; Illidge, T. The Effect of Hypoxia on PD-L1 Expression in Bladder Cancer. *BMC Cancer* **2021**, *21* (1), 1271.
80. Tomogane, M.; Sano, Y.; Shimizu, D.; Shimizu, T.; Miyashita, M.; Toda, Y.; Hosogi, S.; Tanaka, Y.; Kimura, S.; Ashihara, E. Human  $V\gamma 9V\delta 2$  T Cells Exert Anti-Tumor Activity Independently of PD-L1 Expression in Tumor Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *573*, 132–139.
81. Liang, D.; Kong, X.; Sang, N. Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on HIF-1. *Cell Cycle* **2006**, *5* (21), 2430.
82. Matsumoto, K.; Hayashi, K.; Murata-Hirai, K.; Iwasaki, M.; Okamura, H.; Minato, N.; Morita, C. T.; Tanaka, Y. Targeting Cancer Cells with a Bisphosphonate Prodrug. *ChemMedChem* **2016**, *11* (24), 2656–2663.
83. Tanaka, Y.; Iwasaki, M.; Murata-Hirai, K.; Matsumoto, K.; Hayashi, K.; Okamura, H.; Sugie, T.; Minato, N.; Morita, C. T.; Toi, M. Anti-Tumor Activity and Immunotherapeutic Potential of a Bisphosphonate Prodrug. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 5987.
84. Okuno, D.; Sugiura, Y.; Sakamoto, N.; Tagod, M. S. O.; Iwasaki, M.; Noda, S.; Tamura, A.;

- Senju, H.; Umeyama, Y.; Yamaguchi, H.; Suematsu, M.; Morita, C. T.; Tanaka, Y.; Mukae, H. Comparison of a Novel Bisphosphonate Prodrug and Zoledronic Acid in the Induction of Cytotoxicity in Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1405.
85. McGowan, E.; Lin, Q.; Ma, G.; Yin, H.; Chen, S.; Lin, Y. PD-1 Disrupted CAR-T Cells in the Treatment of Solid Tumors: Promises and Challenges. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *121*, 109625.

Supplementary information

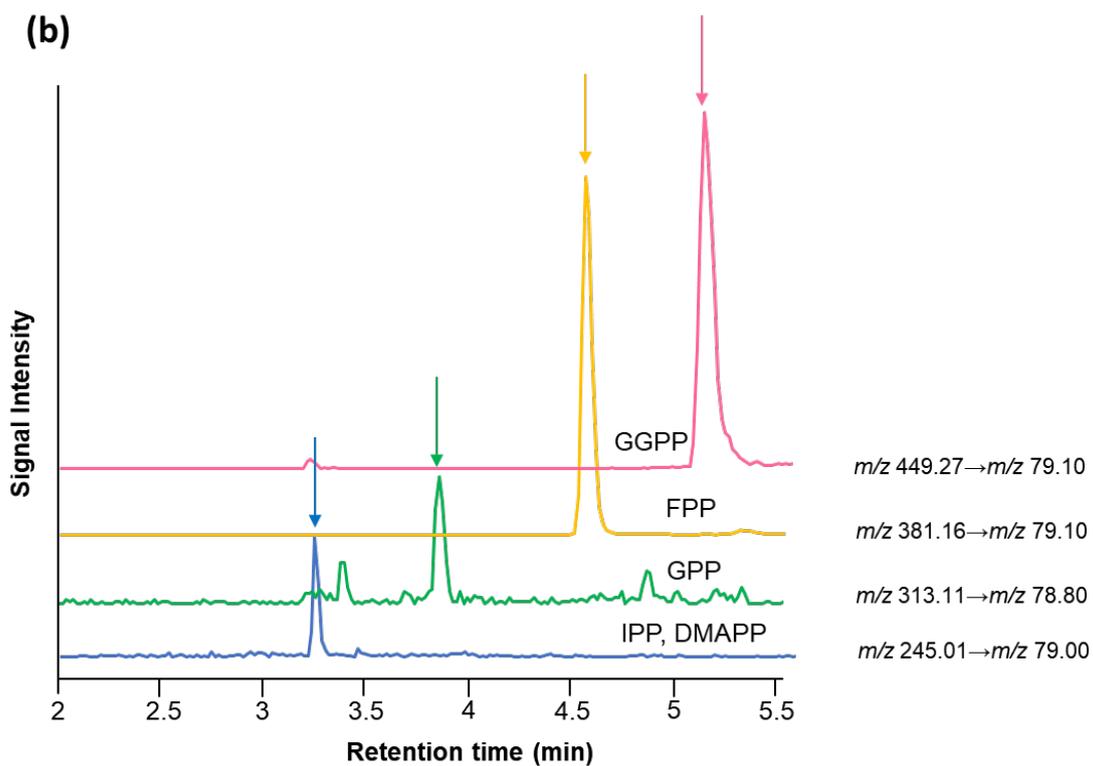
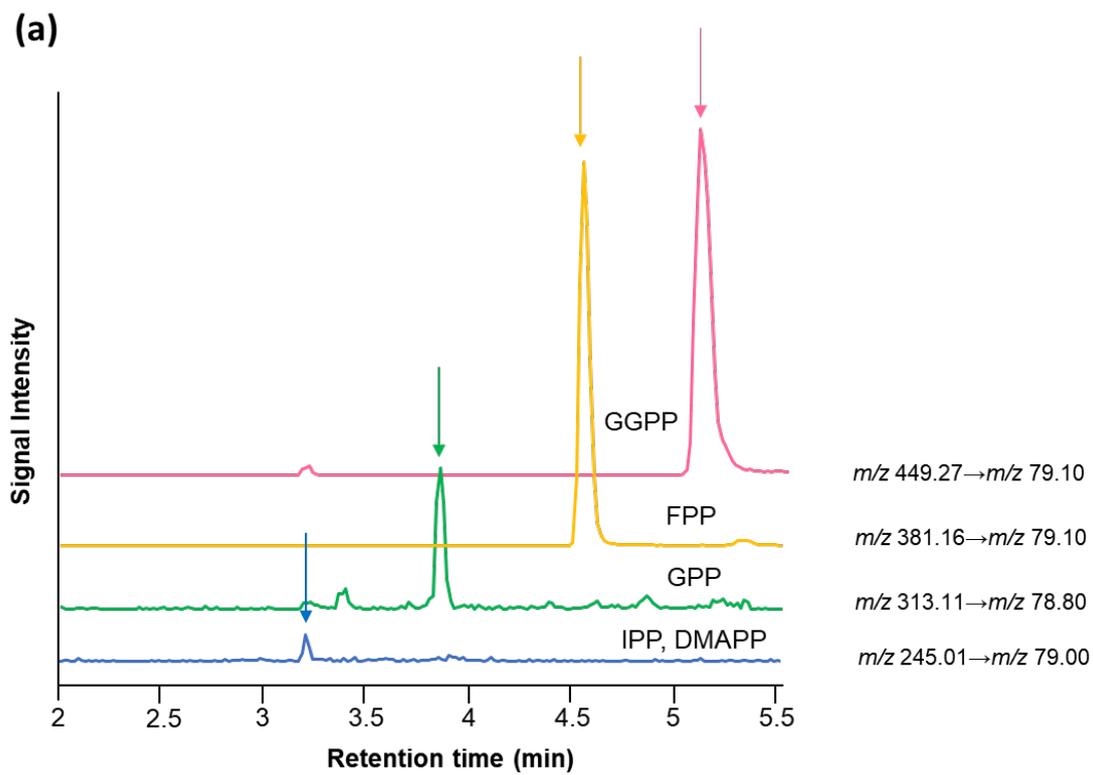
低酸素環境下における多発性骨髄腫細胞の  
 $\gamma\delta$  T 細胞抵抗性の機序解明

2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

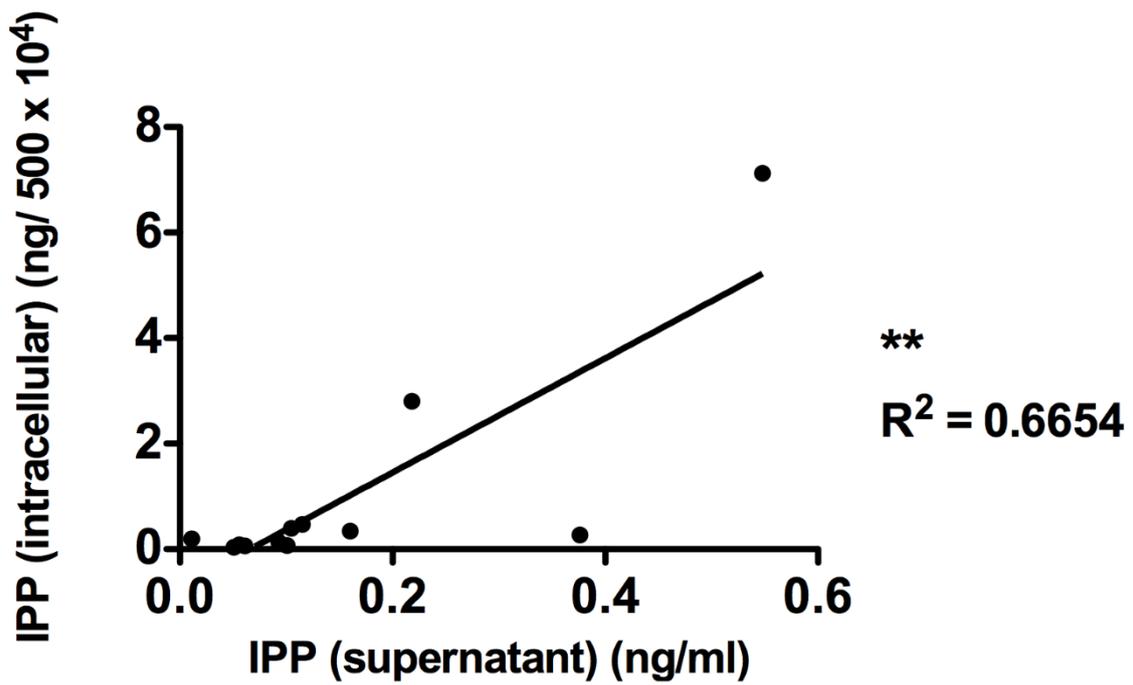
【薬学】病態生理学分野

佐野 友亮



**Supplementary Figure 1. Chromatograms of zoledronic acid-treated or untreated U266 (Normoxia) cell lysates.**

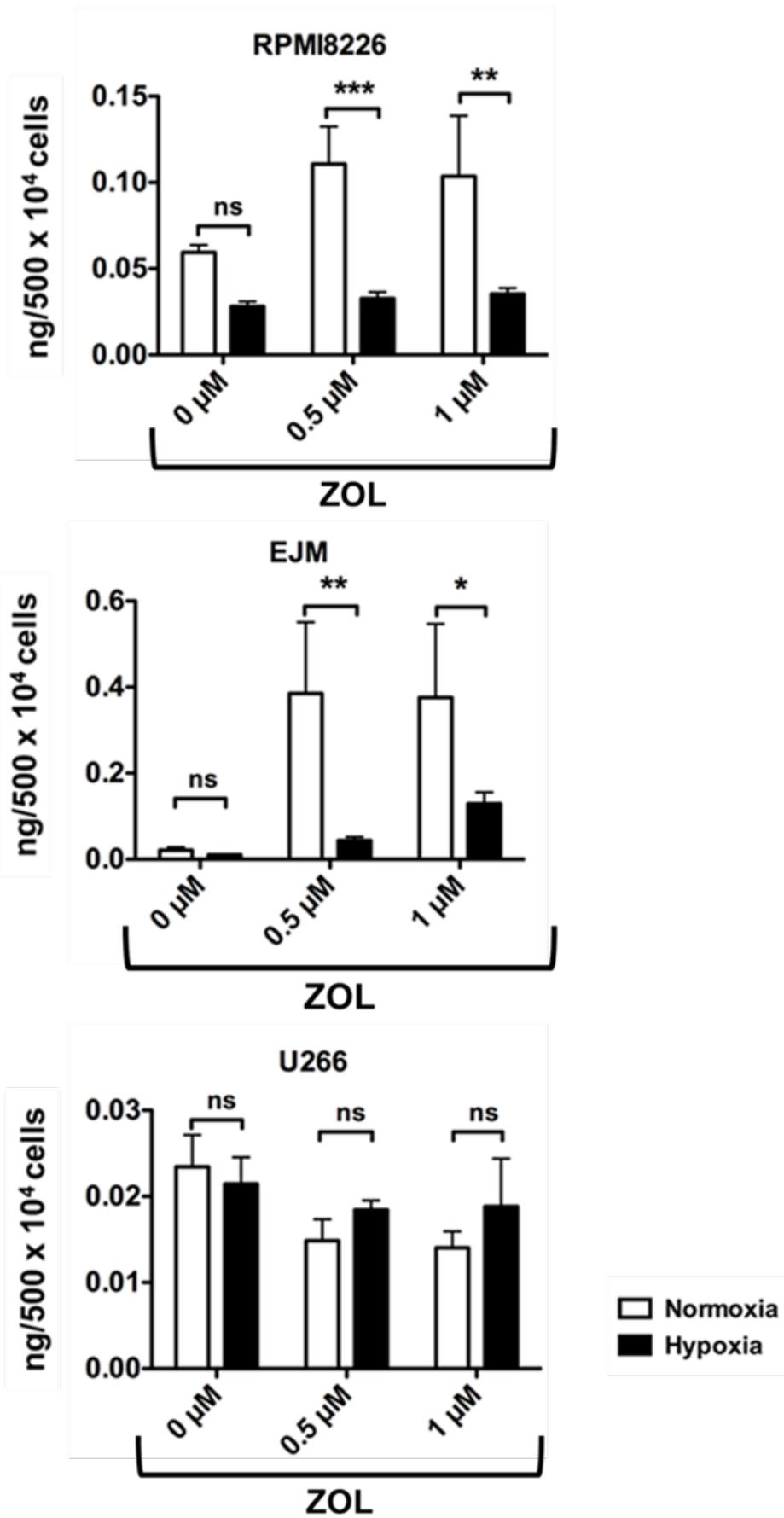
Control (without zoledronic acid) (a) and zoledronic acid (1  $\mu$ M) (b).



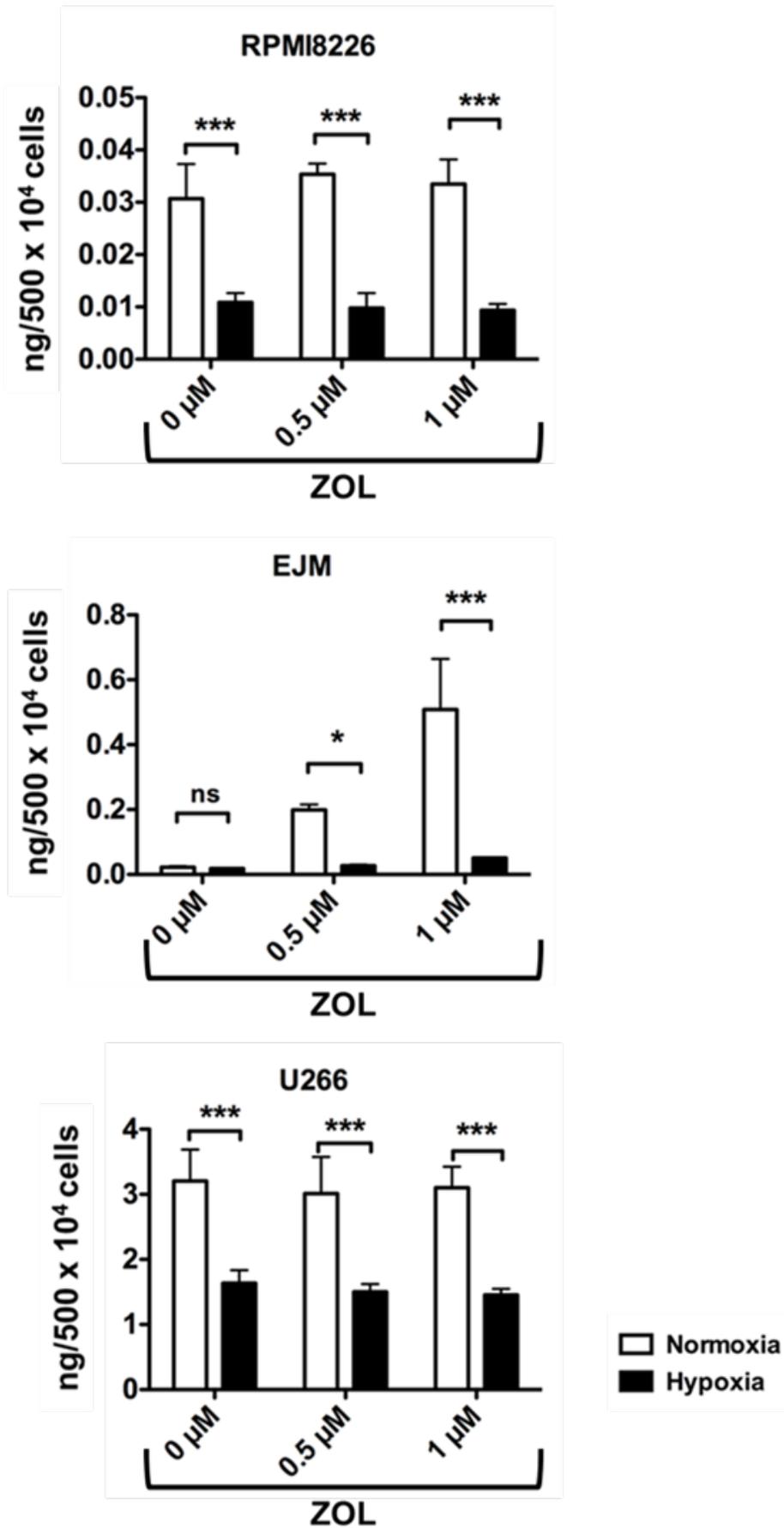
Supplementary Figure 2. Correlation between the amount of IPP in MM cells and their culture supernatants.

Pearson's correlation analysis:  $R^2 = 0.6654$ ,  $**p < 0.01$ .

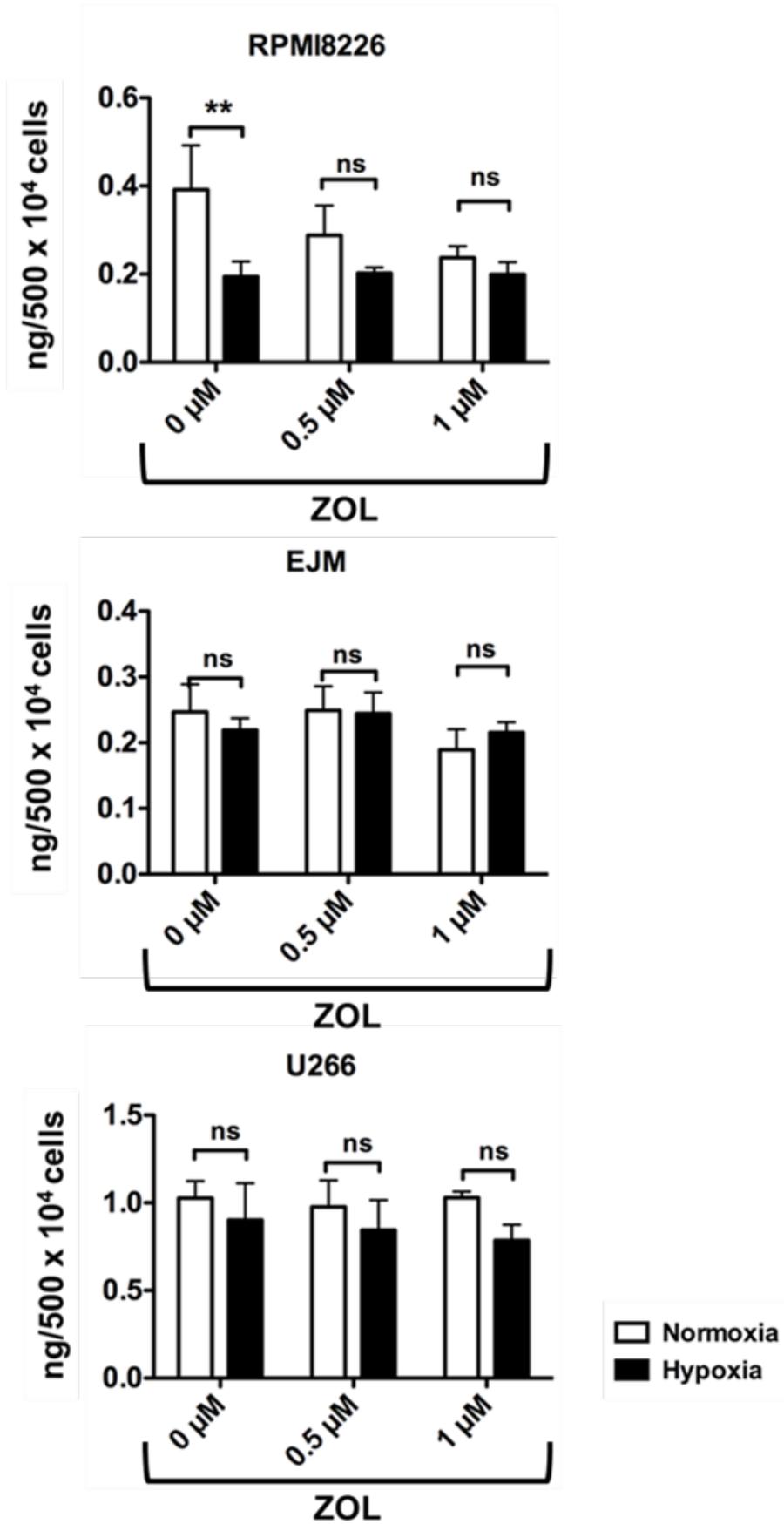
A



**B**



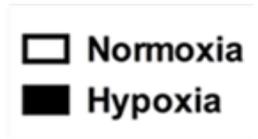
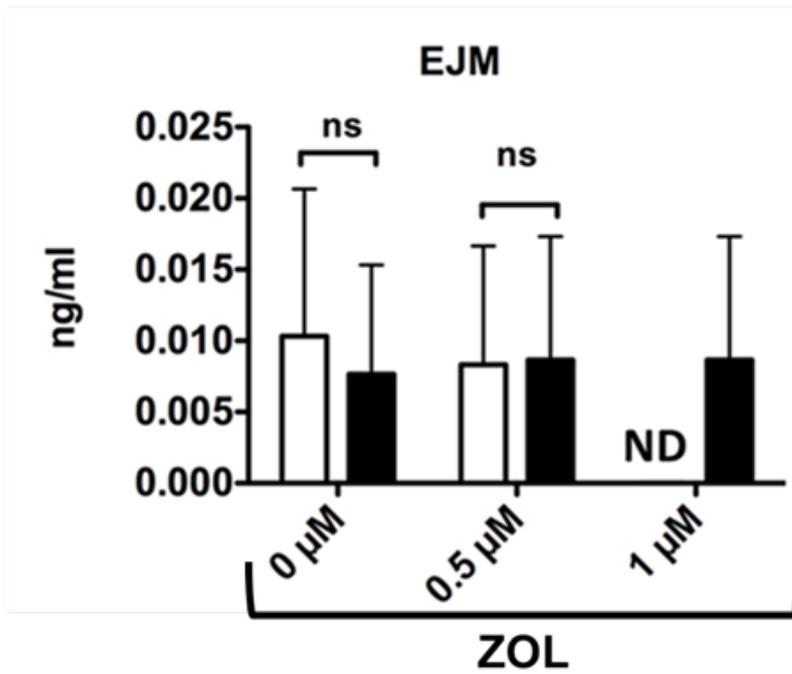
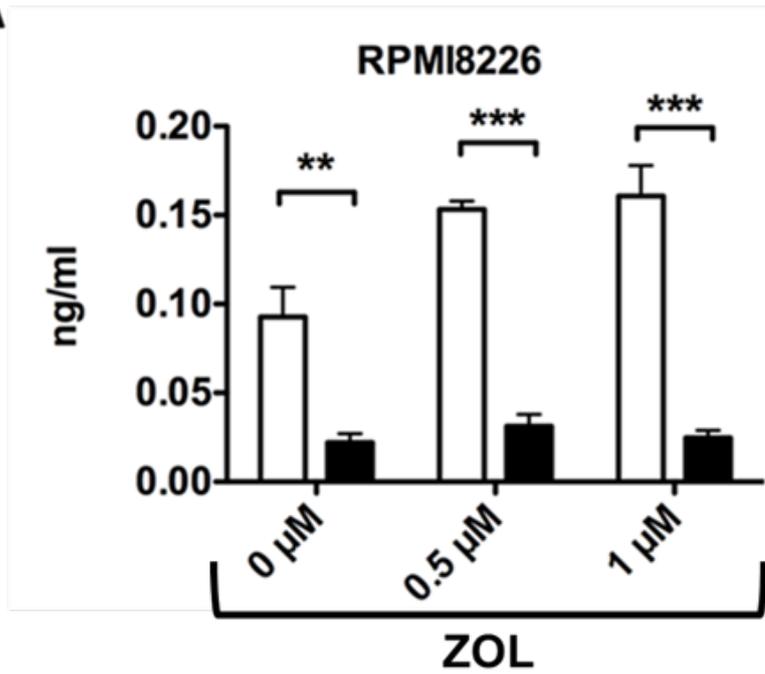
C



### **Supplementary Figure 3. GPP, FPP and GGPP contents of multiple myeloma (MM) cells**

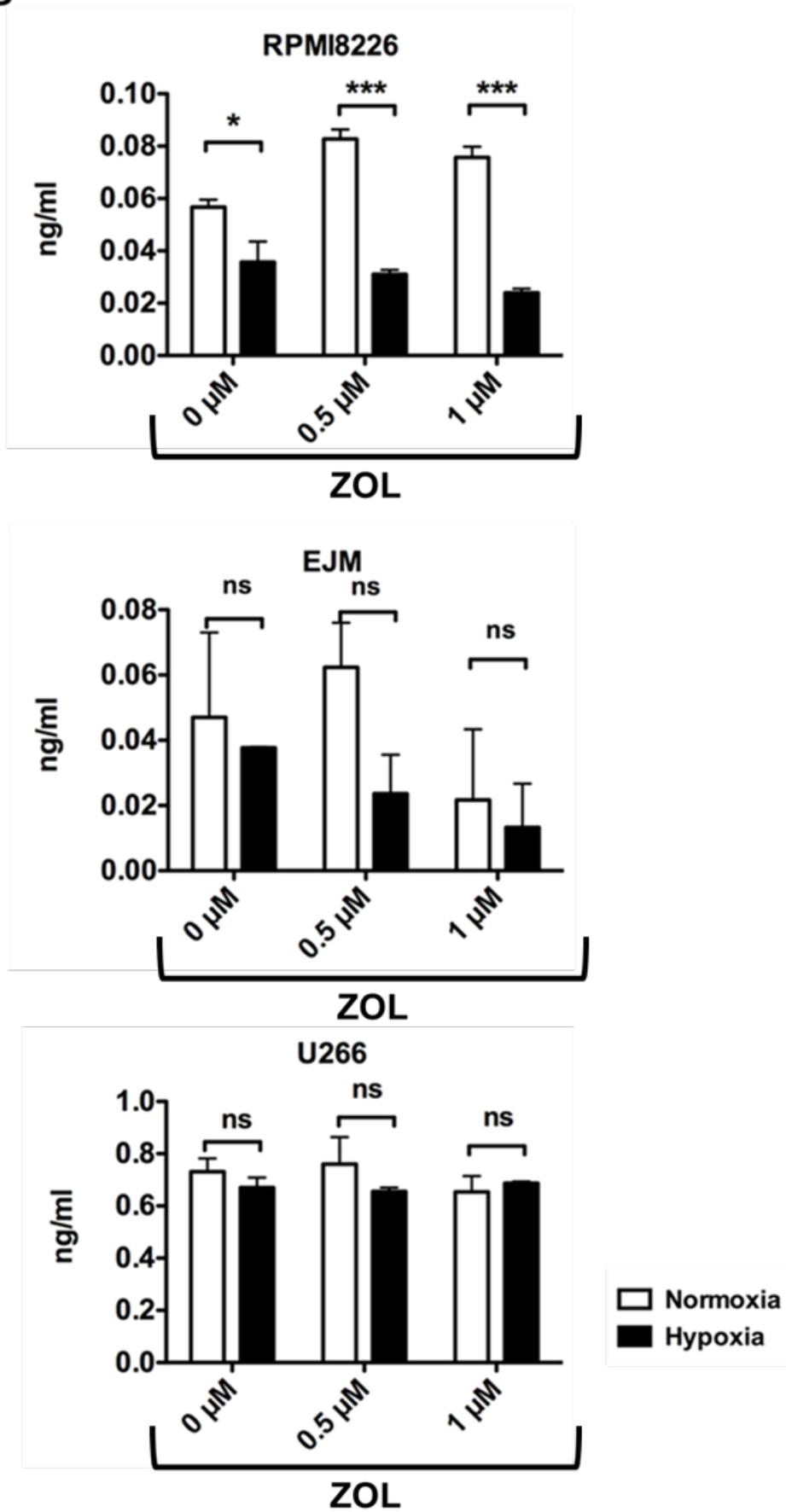
ZOL was applied to  $5 \times 10^6$  MM cells at the indicated concentrations (0.5 or 1  $\mu\text{M}$ ) in 5 ml of medium. The MM-Normo and MM-HA cells were then cultured for 24 h. Concentrations of GPP (A), FPP (B) and GGPP (C) in MM cells were measured using LC-MS/MS. White histograms represent MM-Normo cells, and black histograms represent MM-HA cells. Statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , MM-Normo vs. MM-HA). ns, not significant.

A

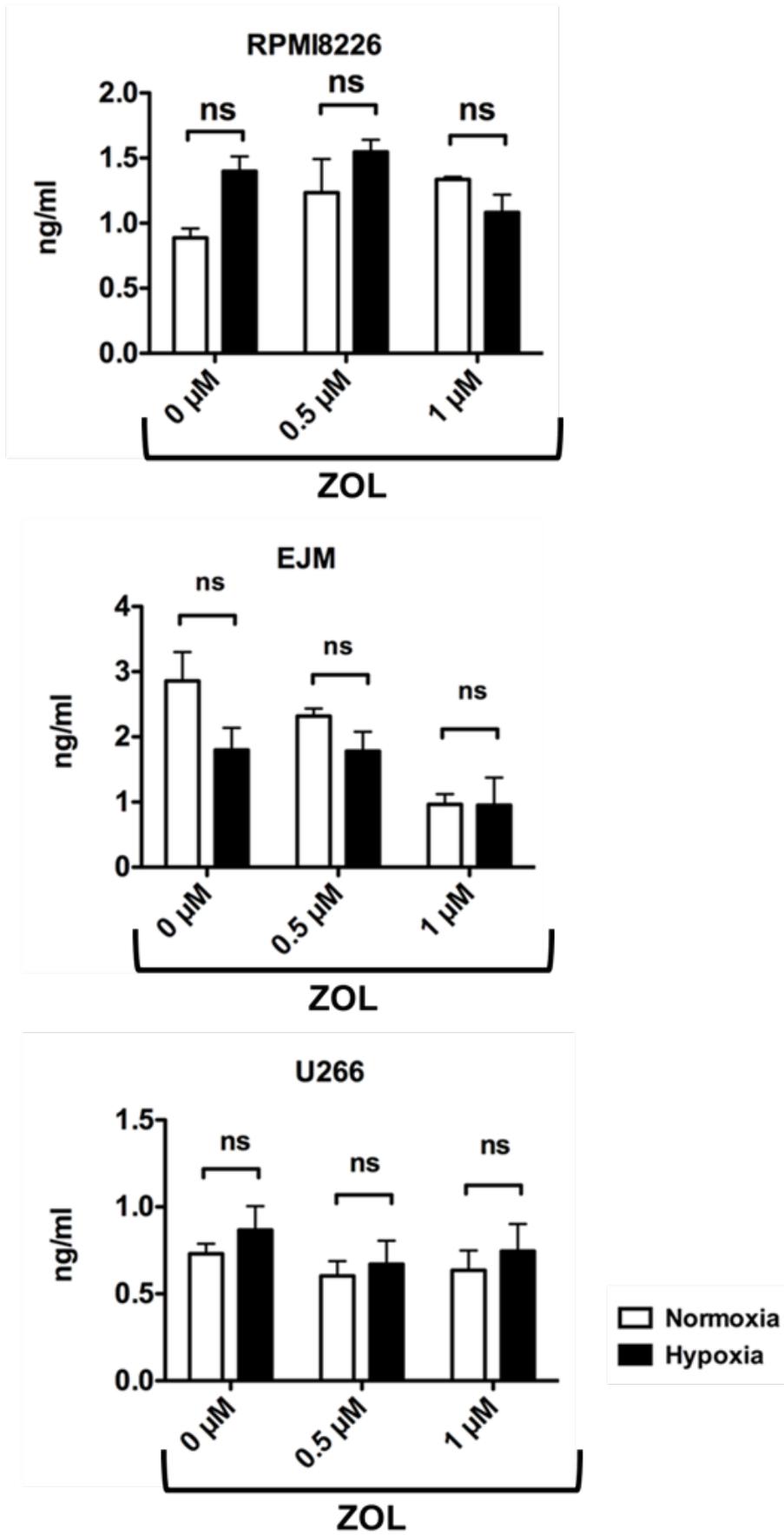


U266

Not detected

**B**

C



**Supplementary Figure 4. GPP, FPP and GGPP contents of multiple myeloma (MM) cells culture supernatants.**

ZOL was applied to  $5 \times 10^6$  MM cells at the indicated concentrations (0.5 or 1  $\mu$ M) in 5 ml of medium. The MM-Normo and MM-HA cells were then cultured for 24 h. Concentrations of GPP (A), FPP (B) and GGPP (C) in MM cells were measured using LC-MS/MS. White histograms represent MM-Normo cells, and black histograms represent MM-HA cells. Statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , MM-Normo vs. MM-HA). ND, not detected; ns, not significant.