

氏名 (生年月日) ともがね まこ
友金 眞光 (1994年1月25日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第216号

学位授与の日付 2022年3月19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 $\gamma\delta$ T細胞療法の開発に向けた増幅効率予測因子の探索および抗腫瘍効果における PD-1/PD-L1 経路の影響

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 田中 智之

(副査) 教授 中山 祐治

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

がん免疫療法は第4の治療法として注目され、抗 programmed cell death 1 (PD-1) 抗体が様々ながん種で承認され、目覚ましい発展を遂げてきた。しかし、抗 PD-1 抗体単剤での奏効率は 20~40%程度であり、十分に高いとはいえず、さらなるがん免疫療法の開発が望まれている。

$\gamma\delta$ T細胞はメバロン酸経路の中間代謝物イソペンテルニリン酸 (IPP) を抗原として認識する。また、ビスホスホネート製剤 (BPs) であるゾレドロン酸 (ZOL) による IPP の細胞質内蓄積作用により、 $\gamma\delta$ T細胞は主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) が欠失した腫瘍に対しても、抗腫瘍活性を示すエフェクター細胞として機能する。 $\gamma\delta$ T細胞療法を臨床応用するためには、明らかにすべき問題点が2つ存在し、1点目は $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率の個人差で、2点目は PD-1/PD-1-ligand 1 (PD-L1) 経路による抗腫瘍活性の減弱化の可能性である。これらの問題点を解決すべく、本研究では $\gamma\delta$ T細胞療法の臨床応用に向けて最適なドナー選択するための体外増幅培養における増幅効率を予測できるバイオマーカーを探索し、次に $\gamma\delta$ T細胞の殺腫瘍細胞作用に対する PD-1/PD-L1 経路の影響について検討した。

第1章 $\gamma\delta$ T細胞の体外増幅培養における予測可能なバイオマーカーの探索

インフォームド・コンセントが得られた20名の健常人における $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率を算出した結果、105.9~2236.2倍 (中央値 932.6倍) であった。体外増幅培養では、ZOLにより末梢血単核球 (PBMCs: peripheral blood mononuclear cells) 中の単球に蓄積した IPP に $\gamma\delta$ T細胞が反応し、IL-2 によって増幅する。初めに、免疫細胞を活性化するために処置している IL-2 に着目し、 $\gamma\delta$ T細胞における IL-2 受容体 α 鎖 (CD25) について検討した。CD25 の発現強度は培養6日目にかけて発現上昇し、培養11日目では CD25 の発現が低下した。この結果より、培養6日目の CD25 の発現強度と、 $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率の相関を解析したところ、有意な正の相関 ($*p < 0.05$) を示した。培養6日目よりも早期の予測因子を見つけるために、PBMCs 中に存在する単球に着目した。PBMCs から単球を除いて増幅培養を行うと、通常培養と比べて $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率が減少した。また、培養3日目での CD25 の発現強度も通常培養と比べ低下したことから、単球が $\gamma\delta$ T細胞における CD25 の発現に寄与することが示唆された。

次に、 $\gamma\delta$ T 細胞は抗原提示細胞の細胞膜上に発現する糖タンパク質 Butyrophilin 3A1 (BTN3A1) を認識して活性化することから、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と培養前の単球における BTN3A1 の発現強度の相関の有無を検討した。その結果、培養前の単球細胞膜上に発現する BTN3A1 の発現強度と培養 6 日目 (** $p < 0.01$) および 11 日目 (* $p < 0.05$) の $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率は、有意に正に相関した。また、増幅効率の悪いドナーの末梢血単核球に対してキメラタンパク質 BTN3A1-Fc を添加すると、通常培養に比べて $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が増加した。以上のことから、単球細胞膜上の BTN3A1 の発現強度が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できる有用なバイオマーカーとなることが示された。

第 2 章 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果における PD-1/PD-L1 経路の影響

次に本章では、 $\gamma\delta$ T 細胞療法開発に向けたもう 1 つの問題点として掲げる PD-1/PD-L1 経路の $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果に及ぼす影響について解析した。前章で増幅した $\gamma\delta$ T 細胞において PD-1 の発現強度を比較すると、PD-1 の発現強度が高いドナーが観察された。そこで、増幅した $\gamma\delta$ T 細胞とがん細胞を共培養し、 $\gamma\delta$ T 細胞の殺腫瘍細胞作用における PD-1/PD-L1 経路の影響について解析した。15 株のヒトがん細胞株のうち、UMUC3、T24 および T24cis 細胞株 (膀胱がん細胞株)、H2052 および H2452 細胞株 (中皮腫細胞株)、ならびに乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞株では、PD-L1 が高く発現していた。これらの PD-L1 高発現細胞株に対して ZOL を前処置し、抗 PD-1 抗体を用いて阻害した $\gamma\delta$ T 細胞を共培養すると、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性は有意に上昇しなかった。一方、ZOL を前処置したがん細胞株に発現する PD-L1 に対して阻害抗体を処置し、 $\gamma\delta$ T 細胞と共培養すると、一部のがん細胞株 (UMUC3、T24、T24cis、H2052、H2452、MDA-MB-231) において、抗腫瘍活性が有意に上昇した。次に、PD-L1 低発現細胞株 (A549、MKN28) および PD-L1 高発現株 (MDA-MB-231、T24) に対して PD-L1 を small interfering RNA (siRNA) によりノックダウンし、抗腫瘍活性を検討した。その結果、PD-L1 ノックダウン株に対する抗腫瘍活性は変化せず、抗 PD-1 抗体阻害時および PD-L1 siRNA 処置時の $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性は、PD-1/PD-L1 経路による抑制を受けないことを示した。そこで、Fc γ 受容体である CD16 を発現する $\gamma\delta$ T 細胞は抗体依存性細胞傷害活性を有することが報告されていることから、抗 PD-L1 抗体による抗腫瘍効果の増強は抗体依存性細胞傷害によるものと推察し、CD16 の発現をフローサイトメトリーにて検証した。その結果、一部の $\gamma\delta$ T 細胞は CD16 を発現し、抗 PD-L1 抗体により有意に抗腫瘍活性が上昇した細胞株と上昇しなかった細胞株との間で PD-L1 の発現強度を比較すると、前者の細胞株の方が PD-L1 の発現強度が有意に高いことが示された。さらに、がん細胞株における PD-L1 の発現強度と抗 PD-L1 抗体併用時の抗腫瘍効果の変化量との間において相関解析を行うと、これらの間には有意に正の相関を示した (** $p < 0.001$)。したがって、抗 PD-L1 抗体併用時の抗腫瘍活性の上昇に $\gamma\delta$ T 細胞による抗体依存性細胞傷害が関与していると考えた。

総括

本研究により、単球の細胞表面上における BTN3A1 の発現強度が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できる有用なバイオマーカーとなることが明らかとなった。さらに、増幅培養して得られた $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性は PD-1/PD-L1 経路による抑制を受けないことが明らかとなった。これらのことは、増幅前の患者末梢血中の単球に発現する BTN3A1 発現強度により増幅可能な患者を層別化でき、増幅された $\gamma\delta$ T 細胞は PD-1 および PD-L1 の発現に影響されず抗腫瘍効果が期待できることを示唆している。以上のことから、本研究の成果は、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫療法の臨床応用に貢献できるものと考えられる。

審査の結果の要旨

《緒言》

がん免疫療法は第4の治療法として注目され、抗 programmed cell death 1 (PD-1) 抗体が様々ながん種で承認され、目覚ましい発展を遂げてきた。しかし、抗 PD-1 抗体単剤での奏効率は十分に高いとはいえず、さらなるがん免疫療法の開発が望まれている。がんの進展を妨げる免疫担当細胞の一つである $\gamma\delta$ T 細胞は、末梢血 T 細胞中の3~5%程度を占め、メバロン酸経路の中間代謝物イソペンテルニリン酸 (IPP) を抗原として認識する。また、ビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸 (ZOL) による IPP の細胞質内蓄積作用により、 $\gamma\delta$ T 細胞は抗腫瘍活性を示すエフェクター細胞として機能する。

本研究は、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できるバイオマーカーを探索し、次に $\gamma\delta$ T 細胞の殺腫瘍細胞作用に対する PD-1/PD-1-ligand 1 (PD-L1) 経路の影響について検討している。

《審査結果の要旨》

第1章では、インフォームド・コンセントが得られた20名の健常人における $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率には個人差があった。末梢血単核球から CD14⁺細胞を除くと $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が減少し、 $\gamma\delta$ T 細胞上に発現する CD25 の発現強度が低下したことから、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅には CD14⁺細胞が必要であり、 $\gamma\delta$ T 細胞における CD25 の発現に寄与することが示された。続いて、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化には Butyrophilin (BTN) 3A1 が関与することから単球の細胞表面上に発現する BTN3A1 の発現強度と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を相関解析すると、有意に正に相関した。さらに、BTN3A1-Fc キメラタンパク質存在下において $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が有意に上昇した。本研究の進展により、単球細胞表面上における BTN3A1 の発現強度が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できる有用なバイオマーカーとなることが示唆された。

第2章では、 $\gamma\delta$ T 細胞の殺腫瘍細胞作用に対する PD-1/PD-L1 経路の影響について検討した。第1章で増幅した $\gamma\delta$ T 細胞において PD-1 の発現強度が高いドナーが観察された。15株のヒトがん細胞株における PD-L1 の発現強度を比較し、PD-L1 高発現がん細胞株に対して ZOL を前処置し、抗 PD-1 抗体を併用するも $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果は変化しなかった。一方、抗 PD-L1 抗体との併用では一部のがん細胞株に対して、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が増大した。しかし、がん細胞株に対して PD-L1 をノックダウンするも $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果は変化しなかった。さらに、増幅した一部の $\gamma\delta$ T 細胞は CD16 を発現し、がん細胞株における PD-L1 の発現強度と抗 PD-L1 抗体併用時の抗腫瘍効果の変化量との間において有意に正の相関を示したことから、抗 PD-L1 抗体併用時の抗腫瘍活性の上昇に $\gamma\delta$ T 細胞による抗体依存性細胞傷害が関与することが示唆された。以上より、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性は PD-1/PD-L1 経路による抑制を受けないことを示した。

《審査の結論》

本論文では、単球の細胞表面上における BTN3A1 の発現強度が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できる有用なバイオマーカーとなることが明らかとなった。さらに、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性は PD-1/PD-L1 経路による抑制を受けないことが明らかとなった。したがって、増幅前の患者末梢血中の単球に発現する BTN3A1 発現強度により増幅可能な患者を層別化でき、 $\gamma\delta$ T 細胞は PD-1 および PD-L1 の発現に影響されず抗腫瘍効果が期待できることを示唆している。以上より、本研究の成果は、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫療法の臨床応用に貢献できると考える。

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。