

$\gamma\delta$ 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

2021 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

友金 眞光

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) : 友金眞光 (Mako Tomogane)

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

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。

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) Mako Tomogane, Maho Omura, Yusuke Sano, Daiki Shimizu, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Shinya Kimura, Eishi Ashihara. 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 [第 1 章]. Copyright Elsevier
- 2) Mako Tomogane, Yusuke Sano, Daiki Shimizu, Teruki Shimizu, Masatsugu Miyashita, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Yoshimasa Tanaka, Shinya Kimura, Eishi Ashihara. V γ 9V δ 2 T cells exert anti-tumor activity independently of PD-L1 expression in tumor cells: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 573, 132-139. [第 2 章]. Copyright Elsevier

目次

略語一覧

序論 (はじめに)	1
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	6
第1節 緒言	6
第2節 実験方法	9
1. 試薬	9
2. 末梢血単核球の分離	9
3. $\gamma\delta$ T細胞培養	11
4. フローサイトメトリー	11
4-1. $\gamma\delta$ T細胞における表面抗原解析	11
4-2. PBMCs中の単球における表面抗原解析	11
4-3. $\gamma\delta$ T細胞に結合したBTN3A1-Fc解析	11
5. 単球の細胞におけるBTN3A1の発現解析	12
6. 統計解析	13
第3節 実験結果	14
1. $\gamma\delta$ T細胞の体外増幅培養と増幅効率	14
2. $\gamma\delta$ T細胞におけるCD25の発現と増幅効率の比較	15
3. $\gamma\delta$ T細胞の増幅における単球の機能解析	16
4. 末梢血単核球中の単球の割合と $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率との相関性	19
5. 単球におけるBTN3A1の発現強度と $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率の解析	20
6. BTN3A1-Fcキメラタンパク質の添加による $\gamma\delta$ T細胞の増幅効率の検討	24
第4節 考察	26
第5節 小括	28
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	29
第1節 緒言	29
第2節 実験方法	31
1. 細胞培養	31
2. $\gamma\delta$ T細胞培養	31
3. フローサイトメトリー	31
4. 細胞傷害性試験	32
5. PD-L1 small interfering RNA (siRNA)によるノックダウンの検証	33
6. 統計解析	33
第3節 実験結果	34

1. 増幅した $\gamma\delta$ T 細胞における PD-1 の発現解析.....	34
2. がん細胞株における PD-L1 の発現解析.....	37
3. 抗 PD-1 抗体との併用による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討.....	38
4. 抗 PD-L1 抗体との併用による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討.....	40
5. PD-L1 ノックダウンがん細胞株に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討.....	42
6. $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果における抗体依存性細胞傷害活性の関与の可能性.....	44
第 4 節 考察.....	46
第 5 節 小括.....	47
総括.....	48
謝辞.....	50
引用文献.....	51
Supplementary information.....	62

略語一覽

Ab	antibody
ABCA1	ATP-binding cassette protein A1
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein 1
APC	allophycocyanin
ATCC	american type culture collection
BTN	Butyrophilin
CD	cluster of differentiation
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
Conc	concentration
CR	complete response
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOXP	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate
E:T	Effector cell:Target cell
F	female
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
FITC	fluorescein isothiocyanate
FPP	farnesyl pyrophosphate
h	hour (s)
HD	healthy donor
HLA	human leukocyte antigen
HMBPP	(E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate
HRP	Horseradish peroxidase
IFN- γ	interferon- γ
IL-2	interleukin-2
IMDM	Iscove's modified Dullbecco's medium
IPP	isopentenyl pyrophosphate
IU	international unit
iv	intravenous injection
M	male
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MFI	median fluorescent intensity
MHC	major histocompatibility complex
MM	multiple myeloma
MR	minor response
NA	not available
NE	not evaluable for response
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NFDM	non-fat dry milk
NSCLC	non-small cell lung cancer
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ
ORR	over all response
pAg	phosphoantigen
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PD	progressive disease
PD-1	programmed cell death-1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PFA	paraformaldehyde
PE	phycoerythrin
PI	propidium iodide
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PR	partial response
PVDF	poly vinylidene di fluoride
RCC	renal cell carcinoma
rh	recombinant human
RIPA	radioimmuno precipitation assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCC	squamous cell carcinoma
SD	stable disease
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
TBS	tris-buffer saline
TCR	T cell receptor
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TNF- α	tumor necrosis factor- α
ZOL	zoledronic acid

序論 (はじめに)

がん免疫療法の歴史は、1800年代後半に William Coley らが「悪性腫瘍患者で、細菌感染によりがんが退縮する」ことの発見に端を発し、このことを契機に炎症・免疫をがん治療に応用する試みが始まった (1)。がん細胞は宿主から非自己と認識されるがん抗原を有するため、自己の免疫機構により排除されるがん免疫応答として「がん免疫監視機構」が1950年代に提唱された (2)。免疫細胞による監視機構の提唱により、これまで様々な免疫細胞を用いた細胞免疫療法が実施されたが、免疫チェックポイント阻害薬が上市されるまでのがん治療における細胞免疫療法は治療効果が乏しい治療法であった (Table 1)。

Table 1. Clinical studies of adoptive cell therapy

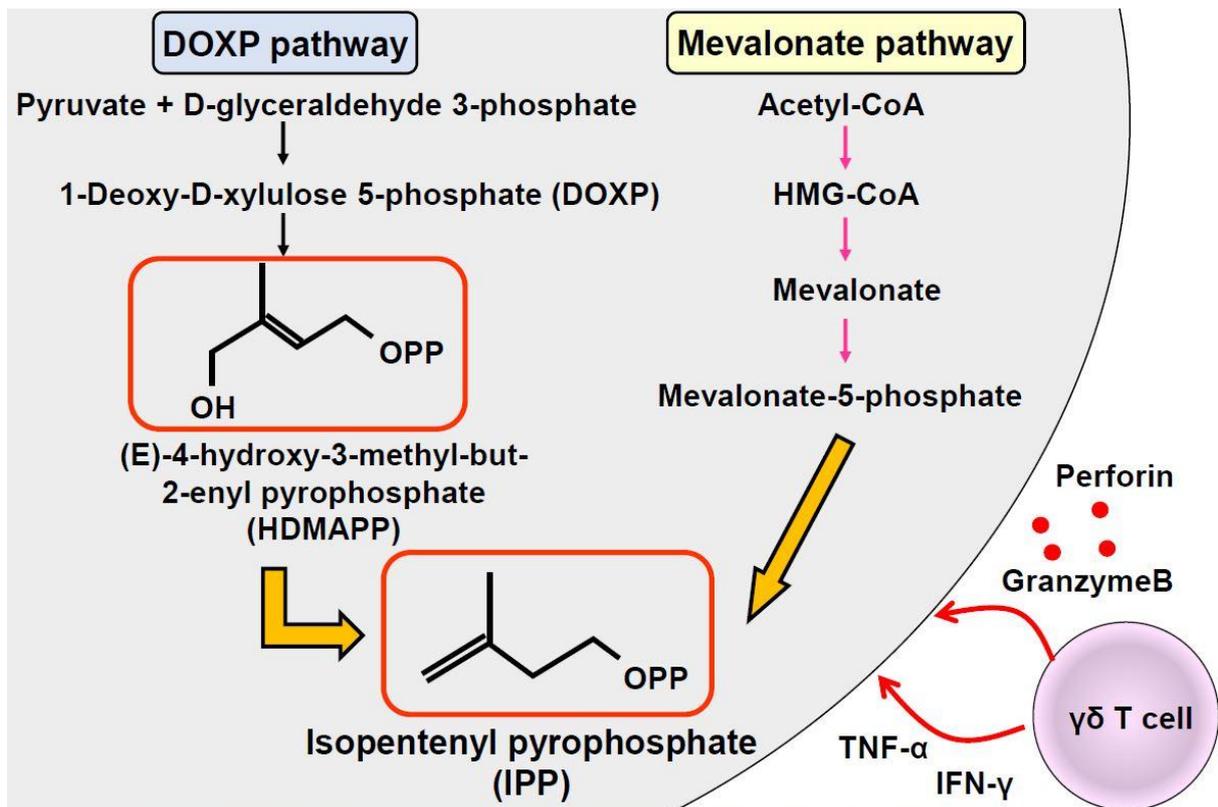
Cell source	Tumor (Number of case)	Clinical response	Reference
CTL	Melanoma (n=10)	MR : 3、SD : 6、PD : 2	(3)
TIL	Melanoma (n=10)	CR : 1、PR : 1、SD : 3、PD : 5	(4)
NK cell	Ovarian cancer (n=14)	PR : 4、SD : 8、PD : 1、NE : 1	(5)
	Breast cancer (n=6)	SD : 4、PD : 2	
NKT cell	Head and neck SCC (n=10)	PR : 5、SD : 5	(6)

CTL, cytotoxic T lymphocyte; TIL, tumor infiltrating lymphocyte; SCC, squamous cell carcinoma; CR, complete response; PR, partial response; MR, minor response; SD, stable disease; PD, progressive disease; NE, not evaluable for response

免疫細胞による監視機構が存在するにもかかわらず、がんは顕在化するため、発がんに至る過程での免疫系の役割を3つに分類し、免疫系が、がんに与える影響をまとめた「がん免疫編集」が提唱された (7)。免疫系が発がんからがんの進展に関わる過程は、排除相、平衡相ならびに逃避相の3つに分けられている。紫外線や放射線等の外界からの刺激により生体内に出現したがん細胞は、腫瘍抗原を標的とした免疫系からの攻撃を受けて排除され、生体の恒常性が維持される (排除相)。排除されなかったがん細胞は、免疫系からの攻撃とがん細胞自身の増殖とが均衡した平衡状態に移行する (平衡相)。さらに、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る (逃避相)。即ち、免疫系による選択圧のもと免疫監視の回避能力をもつがん細胞が選択される。このがん免疫編集という仮説を支持する知見が蓄積した結果、がんの治療法として外科的切除、化学療法ならびに放射線療法の従来標準的治療に加えて、がん免疫療法が第4の治療法として注目

され、免疫チェックポイント阻害薬として、抗 programmed cell death 1 (PD-1) 抗体ならびに抗 cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) 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 (8)。PD-1/PD-ligand 1 (PD-L1) 経路は免疫機能抑制システムに重要な経路であり、当経路を阻害することによって抗腫瘍免疫を再賦活化することで抗 PD-1 抗体が幅広いがん種に対して用いられてきた。抗 PD-1 抗体はこれまでに悪性黒色腫や非小細胞肺癌において承認されてきたが、その奏効率は 10~30%前後である (9-11)。したがって、PD-1 経路阻害薬の奏効率をさらに上乘せするような最適な併用療法の開発や他の免疫療法の開発が盛んに行われている (12)。

がんの発生から進展に関わる過程で、がんの進展を妨げる免疫担当細胞として、非自己抗原を貪食する単球・マクロファージ、細胞性免疫に関わる T 細胞、液性免疫に関わる B 細胞、免疫担当細胞への抗原提示を主たる機能とする樹状細胞等が存在し、これら免疫担当細胞を用いたがんに対する治療法をがん細胞免疫療法という。T 細胞は α 鎖と β 鎖からなる T cell receptor (TCR) を有する $\alpha\beta$ T 細胞と γ 鎖と δ 鎖からなる $\gamma\delta$ T 細胞に分けられる。末梢に存在する T 細胞のほとんどは $\alpha\beta$ T 細胞であり、樹状細胞上の major histocompatibility complex (MHC) 分子上に提示された抗原ペプチドを $\alpha\beta$ T 細胞受容体にて認識し、その抗原を有する非自己を攻撃する。一方、 $\gamma\delta$ T 細胞は皮膚や粘膜に多く存在する V δ 1 T 細胞と末梢血液に存在する V δ 2 T 細胞に大別され、そのうち V δ 2 T 細胞は寄生虫などの外来微生物のイソプレノイド合成経路で産生される非ペプチド性の phosphoantigen (pAg) を $\gamma\delta$ T 細胞受容体にて認識し、pAg を有する非自己を攻撃する (13)。また、V δ 2 T 細胞は末梢血 T 細胞中の 3~5%程度を占め、TCR 可変領域として V γ 9 鎖と V δ 2 鎖からなる二量体で構成されている (14)。V γ 9V δ 2 T 細胞 (以下、 $\gamma\delta$ T 細胞は V γ 9V δ 2 T 細胞を指す) は、MHC 非拘束的に病原性細菌や原生生物由来での非メバロン酸経路 (1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) 経路) の (E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニルニリン酸 (HMBPP : (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate) や、真核生物でのメバロン酸経路の Isopentenyl pyrophosphate (IPP) を認識し、増殖ならびに活性化し IFN- γ や TNF- α を産生する (Schema 1) (15-17)。



Schema 1. Antigen recognition mechanisms of $\gamma\delta$ T cells

$\gamma\delta$ T cells recognize non-peptidic compounds termed phosphoantigens (pAg), which are derived from a dysfunctional mevalonate pathway (e.g., isopentenyl pyrophosphate (IPP)) or from a 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) pathway in microorganisms (e.g., (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMBPP)). Activated $\gamma\delta$ T cells can then kill cancer cells by releasing interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and cytolytic granules such as perforin and granzyme B.

さらに興味深いことに、 $\gamma\delta$ T 細胞はビスホスホネート製剤 (BPs) と IL-2 の併用により著明に体外増幅でき、BPs で前処置したがん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかにされてきた (18-23)。これは、BPs により細胞内のイソプレノイド経路が阻害され、上流に蓄積した IPP を $\gamma\delta$ T 細胞が認識するためである (24)。また、未だ抗原認識様式は完全に解明されていないが、近年 pAg の認識には Butyrophilin3A1 (BTN3A1) が必須であることが報告されている (25-27)。Butyrophilin (BTN) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、ジスルフィド結合で安定化された 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。ヒトでは、BTN ファミリーは 7 つの BTN1A1、BYN2A1、BTN2A2、BTN2A3、BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3 に分かれ、BTN3A2 を除き、ほとんどの BTN は細胞内にアミノ酸約 180 個の配列の B30.2 ドメインを有する (28)。BPs であるゾレドロン酸によって細胞内に蓄積した IPP は BTN3A1 の B30.2 ドメインに結合し、BTN3A1 を介して $\gamma\delta$ T 細胞は活性化し、IFN- γ や TNF- α を産生する (29-31)。

これらの知見をふまえ、これまで様々ながん種に対し *ex vivo* で培養した $\gamma\delta$ T 細胞を用いた養子免疫療法の臨床試験が行われており (32-44)、その忍容性は示されてきたが、 $\gamma\delta$ T 細胞の

全身投与では有効性が限定的である (Table 2)。治療効果が乏しい要因として、がん細胞数に対して全身投与した $\gamma\delta$ T 細胞数が確保できていないことが考えられている。しかし、膀胱腔内への $\gamma\delta$ T 細胞の投与によりがんの増大を抑制する前臨床研究 (21,22) や胃がんに伴う悪性腹水を認める患者への $\gamma\delta$ T 細胞の腹腔内投与により治療効果を示した症例が報告されており (36)、局所空間を利用した $\gamma\delta$ T 細胞療法は実用性が実証されている。これらの知見は、より高い $\gamma\delta$ T 細胞/がん細胞比を維持することが本治療法を有効な治療法として確立させるには重要であることを示唆している。そこで著者は $\gamma\delta$ 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つ存在すると考えた。1点目は $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率の予測である。 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率には個人差があることが報告されている (19,45) が、培養前に増幅効率を予測することができ、大量の $\gamma\delta$ T 細胞の増幅可能な患者を層別化できれば、より高い治療効果が望める。2点目は「がん免疫編集」における PD-1/PD-L1 経路による抗腫瘍活性の減弱化の可能性である。現在、がん細胞免疫療法に用いられている CTL や CAR-T 細胞はいずれも PD-1/PD-L1 経路により、その抗腫瘍効果が減弱する。その打破のためニボルマブやアテゾリズマブ等の免疫チェックポイント阻害薬が投与されているが、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果も PD-1/PD-L1 経路に影響を受けるのかは明らかにすべきと考えた。 $\gamma\delta$ T 細胞療法の臨床応用におけるこれらの問題点を解決すべく、本研究では、最適なドナーを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。

Table 2. Clinical studies of adoptive transfer by $\gamma\delta$ T cells

Tumor (Number of case)	Administration			Clinical response	Reference
	Dose interval	Dose frequency	Rote		
RCC (n=7)	Every week	6~12	iv	-	(32)
RCC (n=10)	Every 3 weeks	3		SD : 6 PD : 4	(33)
		16			
		8			
MM (n=6)	Every 2 weeks	4~8 (Median 7)		M-protein level decreased : 4/6	(37)
NSCLC (n=10)	Every 2 weeks	3~12 (Median 6)		SD : 3 PD : 5 NE : 2	(38)
RCC (n=11)	Every 3 weeks	Average 4.2		CR : 1 SD : 5 PD : 5	(39)
NSCLC (n=15)	Every 2 weeks	3~12		SD : 6 PD : 6 NE : 3	(40)
NSCLC (n=25)	Every 2 weeks	6	PR : 1 SD : 16 PD : 8	(42)	

RCC, renal cell carcinoma; MM, multiple myeloma; NSCLC, non-small cell lung cancer; iv, intravenous injection; CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; NE, not evaluable for response

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

第1節 緒言

1968年に Fleisch および Russell らが高カルシウム血症モデルラットにおいて BPs の骨吸収抑制作用を初めて示した (46)。彼らはそれに先立つ 1966 年に、無機ピロリン酸が *in vitro* において、リン酸カルシウムの沈着ならびに溶解を阻害することを見出していたが、*in vivo* においてはホスファターゼによって分解されるため、石灰化や骨吸収に対しては全く効果を示さないことが明らかとなった (47)。この知見から、酵素的に分解されにくいピロリン酸誘導体として BPs が合成された (48)。骨粗鬆症、高カルシウム血症、がん性骨破壊に対する治療薬として用いられている BPs は、P-C-P 結合を基本骨格とする骨吸収抑制薬であり、P-C-P の炭素原子に付着する側鎖に様々な化学修飾を加えることにより現在までに数多くの BPs が開発されている (49)。BPs は側鎖の構造中の窒素原子の有無により窒素含有 BPs (パミドロン酸、アレンドロン酸、イバンドロン酸、リセドロン酸、ゾレドロン酸) と窒素非含有 BPs (エチドロン酸、クロドロン酸) に大別される (Table 1-1)。BPs は側鎖の構造中に窒素原子を含むことで強力な骨吸収抑制活性を示し、パミドロン酸やゾレドロン酸は窒素含有 BPs に該当する。窒素含有 BPs の標的分子は、マクロファージ細胞株を用いた検討によりメバロン酸経路の中のファルネシルピロリン酸 (FPP : farnesyl pyrophosphate) 合成酵素であることが明らかにされた (50)。BPs の主要な標的細胞は破骨細胞であるが、一方でパミドロン酸をはじめとする BPs の経静脈投与により、約半数で発熱やリンパ球増加などの急性期反応が認められる (51)。この末梢血中で増加するリンパ球は $\gamma\delta$ T 細胞であることが報告されている (52,53)。BPs は FPP 合成酵素阻害作用により、抗原となる IPP を蓄積させ、 $\gamma\delta$ T 細胞の増殖を誘導する (54)。これらの報告から窒素含有 BPs を用いて活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞を用いるがん免疫療法が考案された。そして、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いた養子免疫療法では、ゾレドロン酸による IPP 蓄積作用および IL-2 によるリンパ球増殖作用によって末梢血単核球から $\gamma\delta$ T 細胞を増幅培養する手法が多く用いられてきた (Table 1-2)。しかし、これまでの報告では $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が低い症例が存在することが示されている (19,45)。 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できるバイオマーカーがないため、臨床試験を実施する前に小スケールでテスト培養を実施し、最適な症例選択を行う臨床試験も存在する (42)。培養前に増幅効率を予測することができ、大量の $\gamma\delta$ T 細胞の増幅可能な患者が選択できれば、局所空間を利用した $\gamma\delta$ T 細胞療法においてより高い治療効果が望める。そこで第1章では、健常人ドナー20名より末梢血を採取し、 $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養を行った。 $\gamma\delta$ T 細胞療法の臨床応用に向け、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を算出し、増幅効率を予測できるバイオマーカーを探索した。

Table 1-1. Chemical structure of bisphosphonates

<p>Non-nitrogen containing</p>	$ \begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{CH}_3\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Ethidronic acid</p>	$ \begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{Cl} \quad \text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{Cl} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Clodronic acid</p>	
<p>nitrogen containing</p>	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Pamidronic acid</p>	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Alendronic acid</p>	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Ibandronic acid</p>
	$ \begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Risedronic acid</p>	$ \begin{array}{c} \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{O}=\text{P}-\text{C}-\text{P}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} $ <p>Zoledronic acid</p>	

Table 1-2. Conditions for *ex vivo*-expanded culture in adoptive $\gamma\delta$ T cell immunotherapy

Number of $\gamma\delta$ T cells /cycle	Culture conditions				Refer ence
	IL-2	Agents (Conc)	Serum	Culture days	
0.04~2.8 × 10 ⁹	350 IU/mL (day 0)	ZOL (1 μM)	10% AB serum	7~14 days	(43)
0.3~2.2 × 10 ⁹	700 IU/mL (2 to 3 day interval)				
0.3~1.9 × 10 ⁹					
NA	1000 IU/mL	ZOL (5 μM)	10% autologous serum	14 days	(38)
0.07~5.2 × 10 ⁹	1000 IU/mL	ZOL (5 μM)	autologous serum		(37)
NA	1000 IU/mL	ZOL (5 μM)	10% autologous serum		(40)
1.7~13.8 × 10 ⁹	1000 IU/mL	ZOL (5 μM)	10% autologous serum		(41)
0.06~6.49 × 10 ⁹	1000 IU/mL	ZOL (5 μM)	autologous serum		(36)
>1 × 10 ⁹	1000 IU/mL	ZOL (5 μM)	10% autologous serum		(42)

IU, international unit; Conc, concentration; NA, not available

第2節 実験方法

1. 試薬

ゾレドロン酸は Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) より購入した。recombinant human (rh) IL-2 は FUJIFILM 和光純薬 (大阪、日本) より購入した。

2. 末梢血単核球の分離

20名の健常人ドナー (Table 1-3) 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 40 mL を等量の phosphate-buffered saline (PBS) (-) で希釈した。その後、3 mL の希釈血液を 4 mL の Lymphoprep™ (Abbot Diagnostics Technologies AS, Oslo, Norway) の上層に乗せ、600 ×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。回収した末梢血単核球懸濁液を 900 ×g、4°C、10 分間の遠心分離を行って末梢血単核球を回収した。さらに、末梢血単核球を 4°C であらかじめ冷却した cold PBS (-) で懸濁し、600 ×g、4°C、10 分間の遠心分離を二度行った。得られた末梢血単核球は 10% AB 型血清を加えた Yssel's 培地 (55) に懸濁して培養した。なお、Yssel's 培地の組成は Table 1-4 に示した。本研究で使用した検体 (20-19-17) および AB 型血清 (京都薬科大学: 20-30、佐賀大学医学部附属病院: 2019-12-02) は所属機関 (本学、佐賀大学医学部附属病院) 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。

Table 1-3. Characteristics of healthy donors

ID	age	sex	Taking HMG-CoA reductase inhibitors
HD01	36	M	No
HD02	45	M	No
HD03	57	M	No
HD04	60	M	Yes
HD05	51	F	No
HD06	35	M	No
HD07	37	M	No
HD08	47	F	No
HD09	51	F	No
HD10	43	M	Yes
HD11	60	M	No
HD12	50	M	Yes
HD13	27	M	No
HD14	36	M	No
HD15	48	F	No
HD16	48	M	No
HD17	53	F	Yes
HD18	54	M	No
HD19	52	M	No
HD20	40	M	No

HD, healthy donor; M, male; F, female

Table 1-4. Composition of Yssel's medium

IMDM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	500 mL
2-aminoethanol	Nacalai Tesque, Kyoto	3.3×10^{-5} M
human recombinant insulin	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	5 mg/L
Transferrin apo	Millipore, Billerica, MA	40 mg/L
linoleic acid	Sigma-Aldrich	2 mg/L
oleic acid	Sigma-Aldrich	2 mg/L
palmitic acid	Sigma-Aldrich	2 mg/L
penicillin-streptomycin	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	1%
L-glutamine	Nacalai Tesque	2 mM

IMDM, Iscove's modified Dullbecco's medium

3. $\gamma\delta$ T 細胞培養

24 well プレート (Thermo Fisher Scientific) に末梢血単核球を 2.5×10^6 /well (1.5 mL Yssel's 培地 /well) の条件で播種後、5 μ M のゾレドロン酸を処置し、37°C、5% CO₂ の環境下にて 24 h 培養した。その後、培養上清 1.3 mL を Yssel's 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 5 日目まで rhIL-2 (100 IU/mL) を添加した。培養 6 日目では、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS : Thermo Fisher Scientific)、抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン : FUJIFILM 和光純薬) を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 を 1.5 mL/well 添加し、1.5 mL ずつ新しい well に移し、各 well に rhIL-2 (100 IU/mL) を添加した。培養 7 日目以降では、24 well プレートから T-75 フラスコ (Thermo Fisher Scientific) に移し、rhIL-2 (100 IU/mL) を添加し、10% FBS 含有 RPMI1640 を用いて増幅培養した。

単球非存在下での $\gamma\delta$ T 細胞の培養では、“2. 末梢血単核球の分離”によって得られた peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) サンプルから FACS JAZZ (BD Bioscience, Billerica, MA) により CD14⁺分画の単球を除き、培養 11 日目まで上記の $\gamma\delta$ T 細胞培養と同様の方法で増幅培養を行った。

BTN3A1-Fc (R&D Systems, MN, USA) を処置して $\gamma\delta$ T 細胞を増幅培養する場合は、培養 1 日目に BTN3A1-Fc (5 μ g/mL) を処置し、培養 11 日目まで上記の $\gamma\delta$ T 細胞培養と同様の方法で増幅培養を行った。なお、BTN3A1-Fc が $\gamma\delta$ T 細胞の細胞表面に結合していることを検出するために、培養 2 日目にフローサイトメトリー法により解析した。

4. フローサイトメトリー

4-1. $\gamma\delta$ T 細胞における表面抗原解析

PBMCs 中の $\gamma\delta$ T 細胞の割合および $\gamma\delta$ T 細胞における CD25 の発現強度をフローサイトメトリーにより解析した。100 μ L の PBS (-) に細胞を 1.0×10^7 cells/mL になるように調製し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、以下の抗体と反応させた。抗 CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC) 抗体 (1 : 20 ; BD Bioscience, #555332)、抗 TCR $\gamma\delta$ -allophycocyanin (APC) 抗体 (1 : 20 ; BD Bioscience, #555718)、抗 V δ 2- phycoerythrin (PE) 抗体 (1 : 500 ; BD Bioscience, #555739)、抗 CD25-APC 抗体 (1 : 5 ; BD Bioscience, #555434) 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って細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。

4-2. PBMCs 中の単球における表面抗原解析

PBMCs 中の単球における BTN3A1 の発現強度をフローサイトメトリーにより解析した。100 μ L の PBS (-) に細胞を 1.0×10^7 cells/mL になるように調製し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、以下の抗体と反応させた。抗 CD14-FITC 抗体 (1 : 20 ; BD Bioscience, #555397)、抗 BTN3A1/2/3-PE 抗体 (1 : 10 ; R&D Systems, #FAB7136P) 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って細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。

4-3. $\gamma\delta$ T 細胞に結合した BTN3A1-Fc 解析

PBMCs 中の $\gamma\delta$ T 細胞に結合した BTN3A1-Fc をフローサイトメトリーにより解析した。100 μ L の PBS (-) に細胞を 1.0×10^7 cells/mL になるように調製し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、以下の抗体と反応させた。抗 V δ 2-APC 抗体 (1 : 500 ; BioLegend、San Diego、CA、#331417)、抗 IgG-Fc-PE 抗体 (1 : 50 ; eBioscience、San Diego、CA、#2236816) 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って細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。

“4-1. $\gamma\delta$ T 細胞における表面抗原解析” “4-2. PBMCs 中の単球における表面抗原解析” “4-3. $\gamma\delta$ T 細胞に結合した BTN3A1-Fc 解析” における細胞懸濁液を 70 μ m 径のナイロンメッシュ (共進理工、東京) に通した後、LSR Fortessa X-20 (BD Bioscience) を用いて解析した。発現強度の指標として未染色サンプルの蛍光強度の median fluorescence intensity (MFI) と蛍光標識抗体で染色したサンプルの MFI の比をとった MFI ratio を使い、下記の式より算出した (Fig. 1-1)。解析は FlowJo (BD Bioscience) により実施した。

MFI ratio = (MFI obtained with the fluorescent-dye conjugated antibody) / (MFI obtained without immunofluorescence staining)

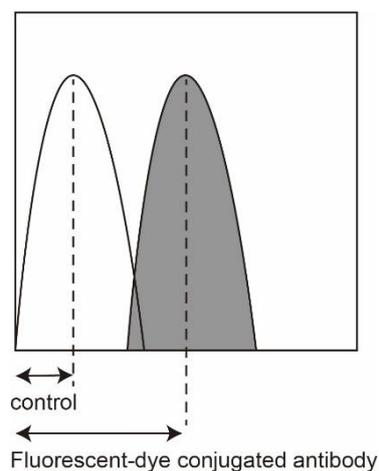


Fig. 1-1. Calculation of median fluorescence intensity (MFI) ratio

The fluorescence intensity ratio was calculated as follows: (Median fluorescence intensity obtained with the fluorescent-dye conjugated antibody) / (Median fluorescence intensity obtained without immunofluorescence staining).

5. 単球の細胞における BTN3A1 の発現解析

末梢血単核球を分離後、ゾレドロン酸を 24 時間処理した培養上清を除き、接着細胞を回収した。その後、回収した細胞のうち CD14⁺細胞を分取し、全タンパク質を回収した。分取した CD14⁺細胞を RIPA (radioimmuno precipitation assay) buffer (FUJIFILM 和光純薬) で $4.0 \times 10^6/100 \mu$ L となるように懸濁した。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 \times 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 Micro BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) およ

びマイクロプレートリーダーGlomax[®] (Promega, Madison, WI, U. S. A) を用いて定量を行い、0.5 µg/µL になるように Sample Buffer Solution (FUJIFILM 和光純薬工業)、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、タンパク質の発現を SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を行い、解析した。12.5% ポリアクリルアミドゲル、200 V の条件下で電気泳動し、PVDF (poly vinylidene di fluoride) 膜 Immobilon[®]-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 1% NFDM (non-fat dry milk) 中で 1 時間反応させた。ブロッキング剤は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 BTN3A1 (Proteintech、Chicago、IL、#25221-1-AP) および抗 β-actin (Sigma-Aldrich、#A5441) を使用した。HRP (Horseradish peroxidase) 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、U. S. A) を用いて X 線フィルム (ケアストリーム株式会社、東京、日本) に感光させることにより検出した。使用した抗体とブロッキング剤は Table 1-5 に示す。

Table 1-5. Antibodies and blocking agents by Western Blotting

Primary Ab	Primary Ab concentrations	Secondary Ab	Secondary Ab concentrations	Blocking agents
BTN3A1	1 : 1000	anti-rabbit IgG	1 : 1000	1% NFDM
β-actin	1 : 10000	anti-mouse IgG	1 : 1000	1% NFDM

6. 統計解析

3 群以上の比較での統計学的解析は、分散分析法 (analysis of variance ; 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 (エムデーエフ、東京) を使用した。2 群間の比較では Welch の t 検定を用いて解析した。得られた実験結果は、平均値±標準偏差 (standard deviation ; SD) で表示した。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。危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

第3節 実験結果

1. $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養と増幅効率

20名の健常人末梢血単核球よりゾレドロン酸と rhIL-2 を用いて $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養を行い、増幅効率を解析した。培養開始前の末梢血単核球中の $\gamma\delta$ T 細胞の割合は 0.71-13% (中央値 : 1.79%) であり、培養 11 日目の $\gamma\delta$ T 細胞の割合は 50.3-96.6% (中央値 : 90.0%) であった (Table 1-6)。また、20名の末梢血単核球中の $\gamma\delta$ T 細胞を 11 日間体外増幅培養した結果、増幅効率は 105.9~2236.2 倍 (中央値 : 932.6 倍) であり、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率には個人差があった。一方、培養 11 日目における $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の割合にも相違があり、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の割合との間に相関性はないものの (Supplementary Figure 1A)、 $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の割合の中央値 90% で 2 群に分けると、 $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の純度が 90% を下回る症例では $\gamma\delta$ T 細胞とは異なる細胞集団の増殖した (Supplementary Figure 1B)。

Table 1-6. Profiles in *ex vivo* culture.

ID	CD3 ⁺ /TCR $\gamma\delta$ ⁺ (%)			fold expansion
	Day 0	Day 6	Day 11	
HD01	1.49	57.8	95.2	2236.2
HD02	1.02	41.8	54.8	2020.1
HD03	0.87	25.1	50.3	222.9
HD04	2.40	40.5	58.3	307.7
HD05	3.12	72.7	62.0	492.8
HD06	13.0	65.7	94.7	105.9
HD07	7.17	76.6	96.2	235.2
HD08	1.79	58.1	90.0	987.7
HD09	1.88	48.5	96.6	1864.6
HD10	2.31	67.1	92.7	749.7
HD11	0.71	38.9	91.8	1152.5
HD12	2.04	62.9	92.4	1595.3
HD13	0.71	29.4	67.6	1211.1
HD14	3.95	48.1	55.2	355.3
HD15	2.84	62.7	90.0	231.4
HD16	1.57	55.7	86.9	1018.4
HD17	1.78	69.6	92.1	965.9
HD18	1.35	57.6	87.4	925.8
HD19	4.30	48.2	91.8	939.3
HD20	1.52	40.6	76.0	477.9

2. $\gamma\delta$ T 細胞における CD25 の発現と増幅効率の比較

$\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養では、末梢血単核球を分離し、ゾレドロン酸と rhIL-2 を用いて培養するため、 $\gamma\delta$ T 細胞における IL-2 受容体 α 鎖である CD25 の発現と増幅効率について解析を行った。末梢血単核球を分離後、培養 6 日目、培養 11 日目のそれぞれにおいて $\gamma\delta$ T 細胞上に発現する CD25 をフローサイトメトリーにより解析すると、培養 6 日目に CD25 が発現し、培養 11 日目になると CD25 の発現が低下した (Fig. 1-2A)。次に、健常人 20 名の $\gamma\delta$ T 細胞培養 6 日目の CD25 の発現強度をフローサイトメトリーにより解析し、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と相関解析を行った。発現強度の指標として未染色サンプルの蛍光強度の中央値である、陰性 MFI と蛍光標識抗体で染色したサンプルの中央値である陽性 MFI の比をとった MFI 比を用いて比較した。その結果、健常人 20 名の増幅効率と培養 6 日目の $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が正に有意に相関した (Fig. 1-2B ; $p=0.042$; $R^2=0.21$)。

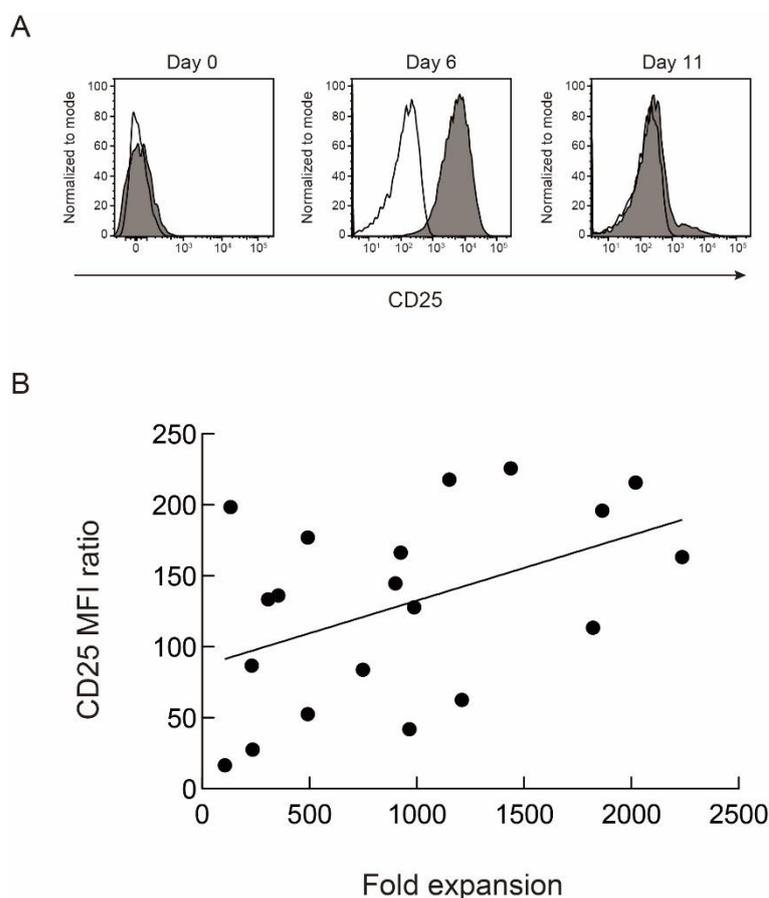


Fig. 1-2. Expression of CD25 on *ex vivo*-expanded $\gamma\delta$ T cells.

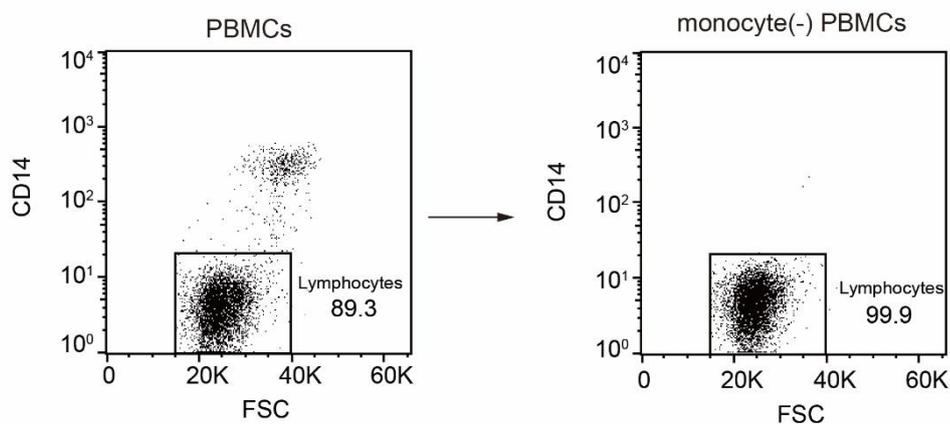
(A) Flow cytometry analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from HD01 to detect expression of CD25 by the $CD3^+/V\delta 2^+$ T cell population on Days 0, 6, and 11. (B) Correlation between the fold expansion of $\gamma\delta$ T cells and surface expression of CD25 by $\gamma\delta$ T cells. Pearson's correlation analysis of data from 20 healthy donors: $r=0.46$, $R^2=0.21$, $p=0.042$.

Modified from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

3. $\gamma\delta$ T 細胞の増幅における単球の機能解析

$\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養では培養開始時に添加するゾレドロン酸が単球に取り込まれ、 $\gamma\delta$ T 細胞が活性化することが明らかになっている。そこで次に、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅における単球の重要性を評価するために、セルソーターFACS JAZZ を用いて末梢血単核球から $CD14^+$ の単球を除去し (Fig. 1-3A)、11 日間の体外増幅培養を行った。通常の末梢血単核球から $\gamma\delta$ T 細胞を増幅培養する際、培養 6 日目で増殖した $\gamma\delta$ T 細胞が凝集塊 (クラスター) を形成するが、 $CD14^+$ の単球を除いた増幅培養では凝集塊が十分に形成されなかった (Fig. 1-3B)。

A



B

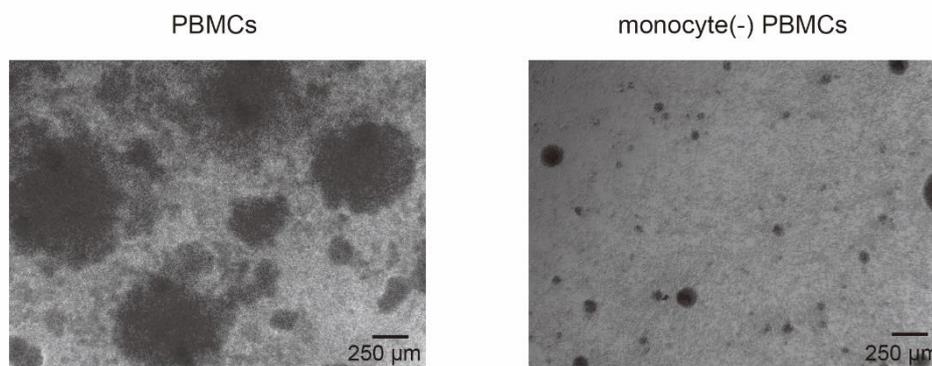


Fig. 1-3. Comparison of *ex vivo* culture between PBMCs and monocyte-depleted PBMCs

(A) Purification of monocyte-depleted PBMCs derived from HD01. After sorting, the cell population comprised >95% lymphocytes. (B) Clustering of $\gamma\delta$ T cells in response to ZOL is dependent on monocytes.

Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

また、HD01、HD02、HD03 の 3 検体を用いて単核球分離後、培養 6 日目、培養 11 日目における $\gamma\delta$ T 細胞の割合を通常増幅培養と単球を除いた増幅培養とで比較すると、単球を除いた増幅培養における $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の割合は通常増幅培養に比べて減少し (Fig. 1-4A)、通常増幅培養と単球を除いた増幅培養とで $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を比較すると、すべての検体で有意に減少した (Fig. 1-4B: PBMCs vs. monocyte(-) PBMCs; 2024 ± 271.2 vs. 299.4 ± 5.87 倍 (HD01)、 1679.7 ± 116.3 vs. 60 ± 2.94 倍 (HD02)、 114.3 ± 16.6 vs. 3.63 ± 0.22 倍 (HD03))。

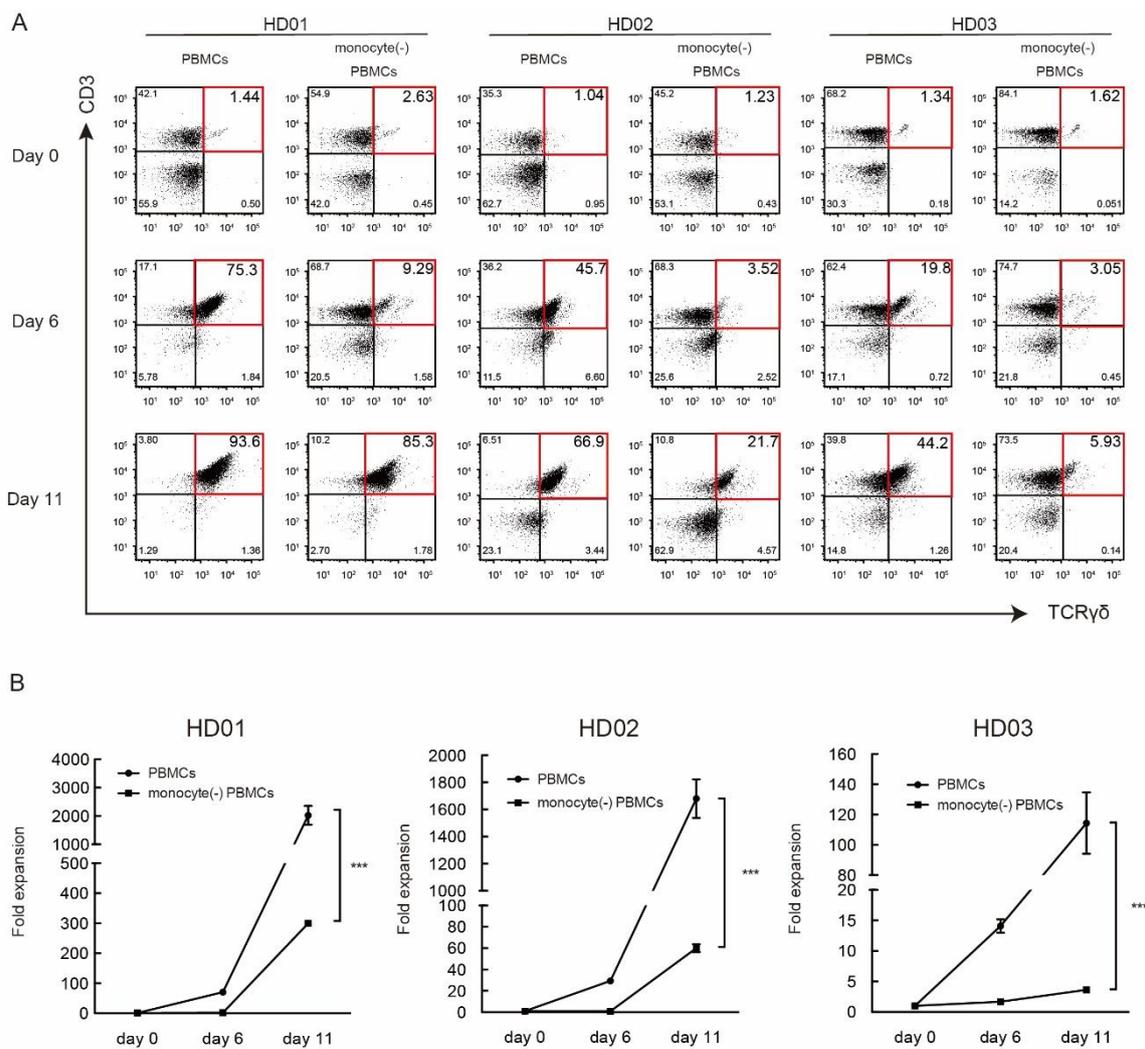


Fig. 1-4. Monocytes are required for ZOL-mediated expansion of $\gamma\delta$ T cells.

(A) Flow cytometry analysis of PBMCs or monocyte-depleted PBMCs stimulated with ZOL. PBMCs isolated from HD01, HD02, and HD03 were examined on Days 0, 6, and 11 to detect expression of CD3 and TCR $\gamma\delta$ (red frames). (B) Fold expansion in the absence or presence of monocytes on Days 0, 6, and 11 was calculated as the number of $\gamma\delta$ T cells derived from HD01, HD02, and HD03 divided by the number at the start of culture. The mean \pm SD of three validation runs is shown. The statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test (***) $p < 0.001$ vs. monocyte(-) cultures).

Modified from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

さらに、単球を除いた増幅培養では、 $\gamma\delta$ T 細胞上に発現する CD25 の発現強度が通常増幅培養時に比べて有意に低下した (Fig. 1-5)。これらの結果から、 $\gamma\delta$ T 細胞が増幅するためには末梢血単核球中の CD14⁺単球が必要であり、 $\gamma\delta$ T 細胞における CD25 の発現に寄与することが示唆された。

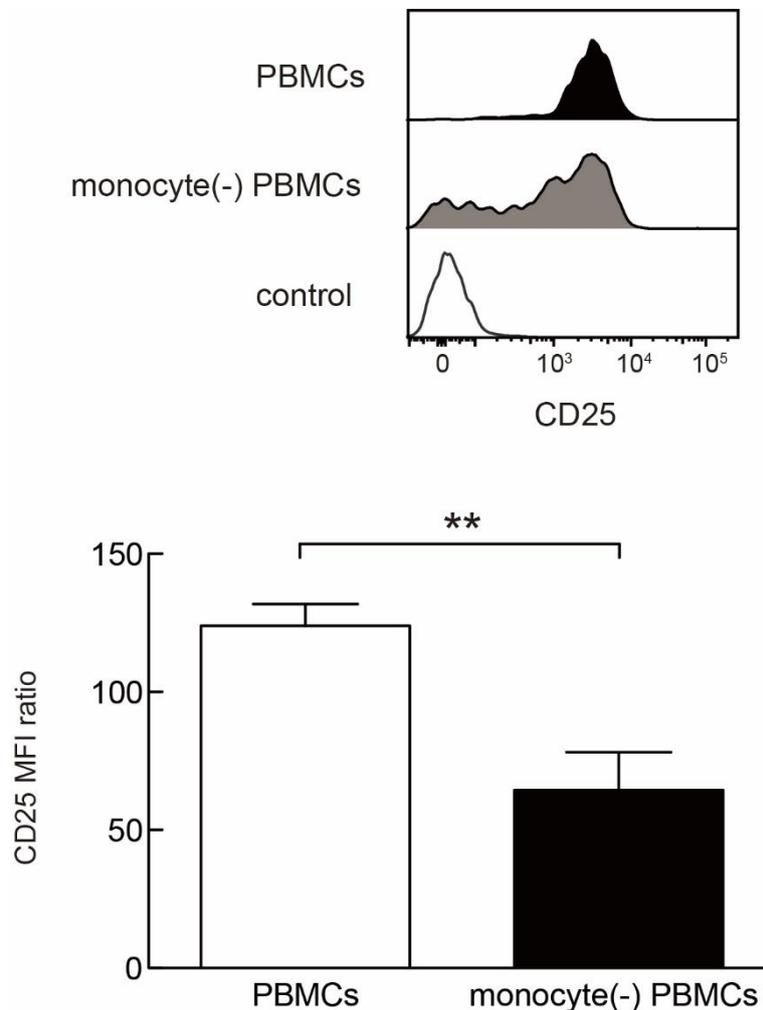


Fig. 1-5. Comparison of the expression levels of CD25 on $\gamma\delta$ T cells in PBMCs and monocyte-depleted PBMCs

Surface expression of CD25 by $\gamma\delta$ T cells in PBMCs and monocyte(-) PBMCs, expressed as the MFI ratio (FlowJo software). The mean \pm SD of three validation runs is shown. The statistical significance of differences was determined by an unpaired t-test with Welch's correction.

Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

4. 末梢血単核球中の単球の割合と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率との相関性

“3. $\gamma\delta$ T 細胞の増幅における単球の機能解析”において、単球非存在下では $\gamma\delta$ T 細胞が増幅できず、単球の存在が $\gamma\delta$ T 細胞における IL-2 α 鎖 (CD25) の発現に寄与していることが示唆された。次に、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅が PBMCs 中の単球の割合に影響されるのかをフローサイトメトリーにより解析した。初めに、HD01、HD02 および HD03 における単球の割合を解析すると、HD01 や HD02 と比べて増幅効率の悪い HD03 の単球の割合が多かった (Fig. 1-6A)。また、20 名の $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と末梢血中の単球の割合との相関性を解析すると、有意な相関性は得られなかった (Fig. 1-6B)。これらの結果より、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率は抗原提示細胞として機能する単球の割合のみには依存しないことが示唆された。

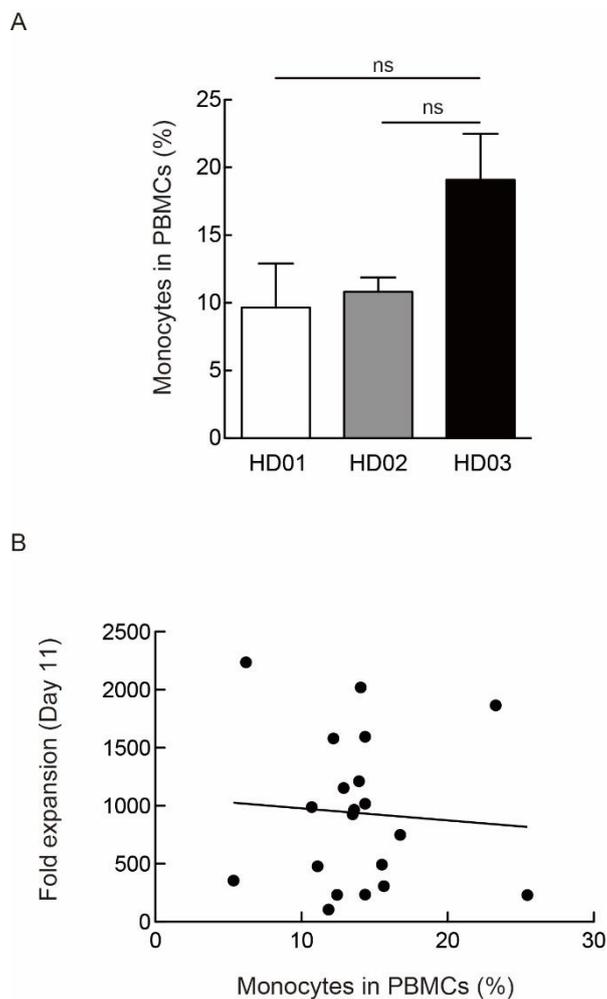


Fig. 1-6. $\gamma\delta$ T cell expansion was independent of the percentage of monocytes.

(A) Comparison of the percentage of monocytes within the PBMCs population isolated from HD01, HD02, and HD03 on Day 0. The mean \pm SD of three validation runs is shown. The statistical significance of the differences was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test (not significant vs. HD03). (B) Correlation between fold expansion of $\gamma\delta$ T cells and the percentage of monocytes within the PBMCs population from 20 healthy donors: $r=-0.073$, $R^2=0.0053$.

Modified from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

5. 単球における BTN3A1 の発現強度と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率の解析

$\gamma\delta$ T 細胞の活性化には BTN3A1 が関与する (25-27) ことから、次に $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と CD14⁺単球上に発現する BTN3A1 との相関を解析した。初めに、HD01、HD02、HD03 における CD14⁺の単球の細胞表面上に発現する BTN3A1 の発現強度をフローサイトメトリーにより比較した。発現強度の指標として未染色サンプルの蛍光強度の中央値である、陰性 MFI 値と蛍光標識抗体で染色したサンプルの中央値である陽性 MFI 値の比をとり、比較した。その結果、増幅効率の悪い HD03 の PBMCs 中に含まれる CD14⁺単球では、BTN3A1 の発現強度が低いことがわかった (Fig. 1-7A)。しかし、培養 1 日目の単球を回収し、抽出した全タンパク質における BTN3A1 の発現をウェスタンブロッティング法にて解析すると、HD01、HD02、HD03 間における BTN3A1 の発現は同程度であった (Fig. 1-7B)。この結果は、HD03 由来 CD14⁺単球における BTN3A1 の発現レベルが低いことを支持し、“1. $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養と増幅効率”の結果を併せて考えると、細胞あたりの BTN3A1 の発現レベルが増幅効率に影響する可能性が示唆された。

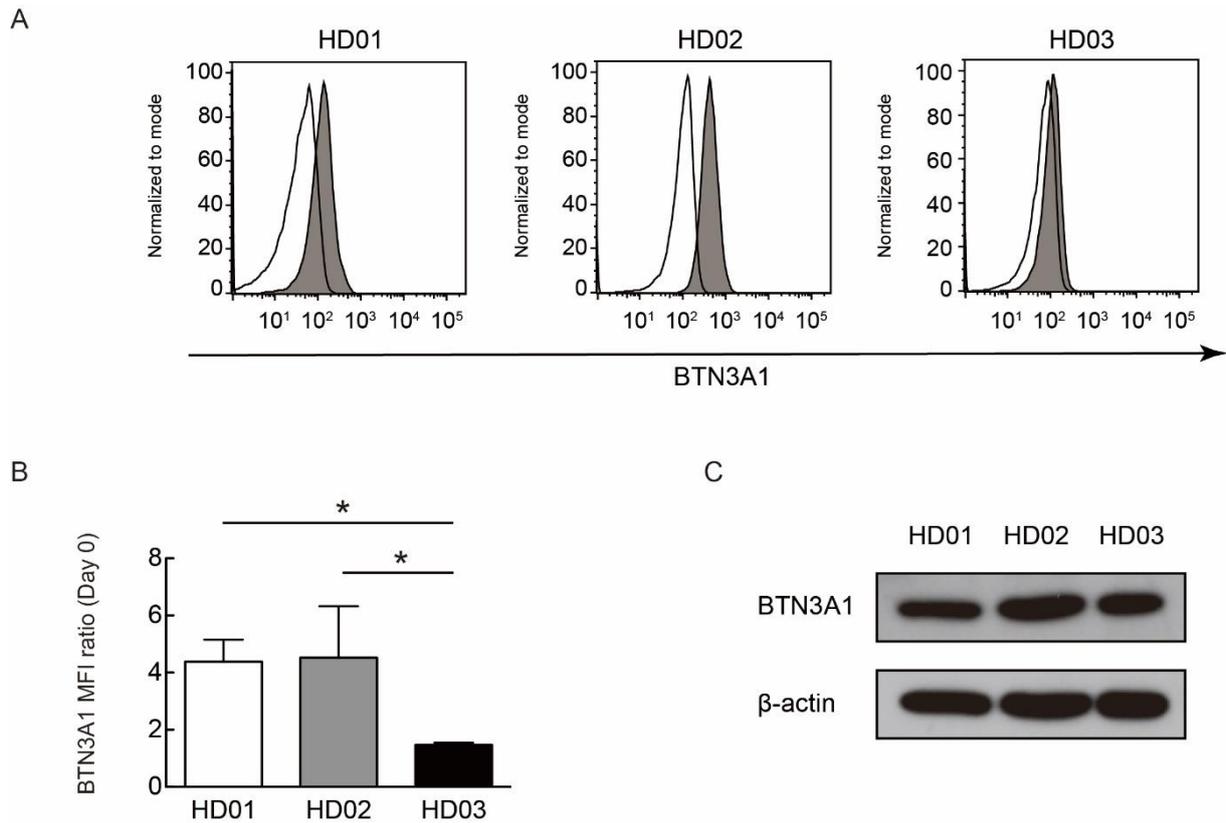


Fig. 1-7. Expression levels of BTN3A1 by monocytes

(A) Flow cytometry analysis of BTN3A1 levels on CD14⁺ cells in PBMCs derived from HD01, HD02, and HD03. Cells were examined to detect expression of BTN3A1 on CD14⁺ cells without stimulation. White histograms represent the negative control. Gray histograms indicate the expression levels of BTN3A1 from PBMCs on day 0 (gated on CD14⁺ cells). (B) Comparison of surface expression levels was made by calculating the median fluorescence intensity (MFI) ratio (FlowJo software). The statistical significance of differences was determined by one-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test ($*p < 0.05$ vs. HD03). (C) Western blot analysis of BTN3A1 expression in ZOL-treated monocytes. β -actin was used to control for equal protein loading.

Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

これらの結果を踏まえ、単球の細胞表面上に発現する BTN3A1 の発現強度と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率とを相関解析した。その結果、培養 6 日目 (Fig. 1-8A ; $p=0.0053$; $R^2=0.36$) および培養 11 日目 (Fig. 1-8B ; $p=0.037$; $R^2=0.22$) における増幅効率と単球細胞膜上に発現する BTN3A1 の発現強度が有意に正に相関した。

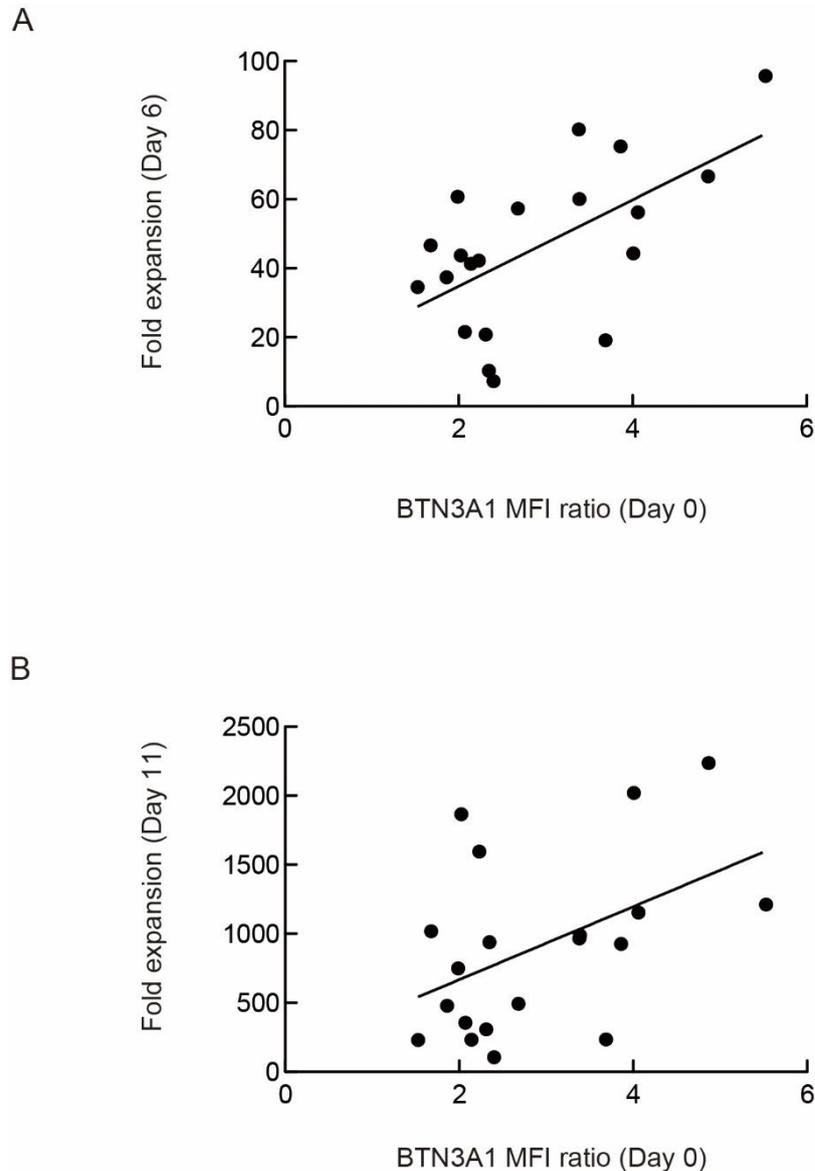


Fig. 1-8. Expansion of $\gamma\delta$ T cells is dependent on the level of BTN3A1 expressed on the monocyte surface.

(A) and (B) Correlation between the fold expansion of $\gamma\delta$ T cells and surface expression of BTN3A1 on monocytes. Pearson's correlation analysis of 20 healthy donors: $r=0.60$, $R^2=0.36$, $**p<0.01$ (Fold expansion on Day 6); and $r=0.47$, $R^2=0.22$, $*p<0.05$ (Fold expansion on Day 11).

Modified from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

さらに、“4. 末梢血単核球中の単球の割合と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率との相関性”の結果も踏まえ、PBMCs 中に存在する細胞表面上に BTN3A1 が強く発現している BTN3A1^{high} 単球の割合と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率との相関の有無を解析した。その結果、培養 6 日目における増幅効率と PBMCs 中に存在する BTN3A1^{high} 単球の割合とでは有意に正に相関し (Fig. 1-9A ; $p=0.0055$; $R^2=0.36$)、培養 11 日目における増幅効率と PBMCs 中に存在する BTN3A1^{high} 単球の割合とでは正に相関する傾向があった (Fig. 1-9B ; $p=0.35$; $R^2=0.049$)。以上より、単球の細胞表面上に発現する BTN3A1 の発現強度および PBMCs 中に存在する BTN3A1^{high} 単球の割合が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率に影響を与えることが示唆された。

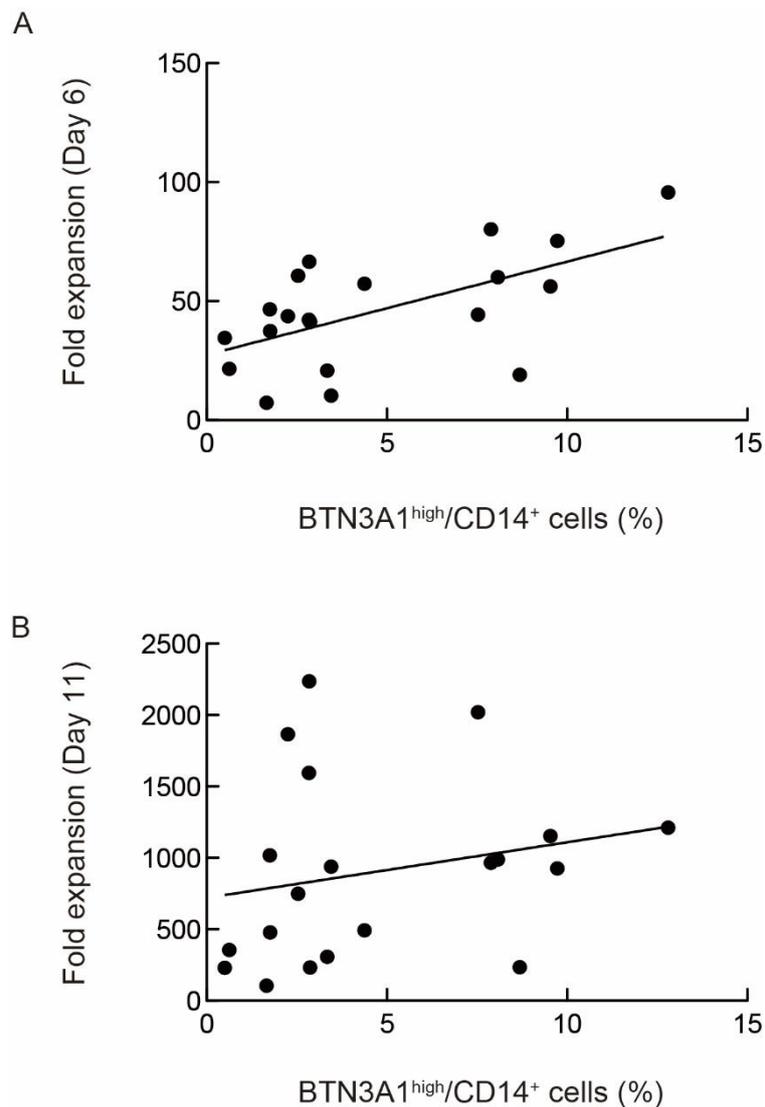


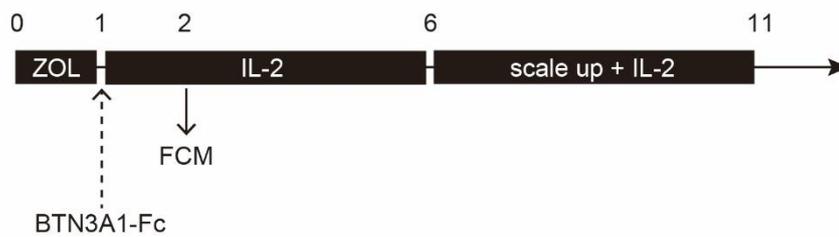
Fig. 1-9. Correlation between expansion of $\gamma\delta$ T cells and percentage of CD14⁺ cells highly expressing BTN3A1 in PBMCs.

(A) and (B) Correlation between the fold expansion of $\gamma\delta$ T cells and the percentage of BTN3A1^{high} and CD14⁺ in PBMCs. Pearson’s correlation analysis of 20 healthy donors: $r=0.60$, $R^2=0.36$, $**p<0.01$ (Fold expansion on Day 6); and $r=0.22$, $R^2=0.049$, $p=0.35$ (Fold expansion on Day 11).

6. BTN3A1-Fc キメラタンパク質の添加による $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率の検討

$\gamma\delta$ T 細胞の増幅に BTN3A1 からの刺激が必要であることを検証するために、BTN3A1-Fc キメラタンパク質を培養 1 日目に添加し、体外増幅培養を行った (Fig. 1-10A)。初めに、添加した BTN3A1-Fc キメラタンパク質を $\gamma\delta$ T 細胞が認識していることを確認するために、抗 IgG-Fc 抗体にて蛍光標識後、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、BTN3A1-Fc キメラタンパク質は $\gamma\delta$ T 細胞に結合していた (Fig. 1-10B)。

A



B

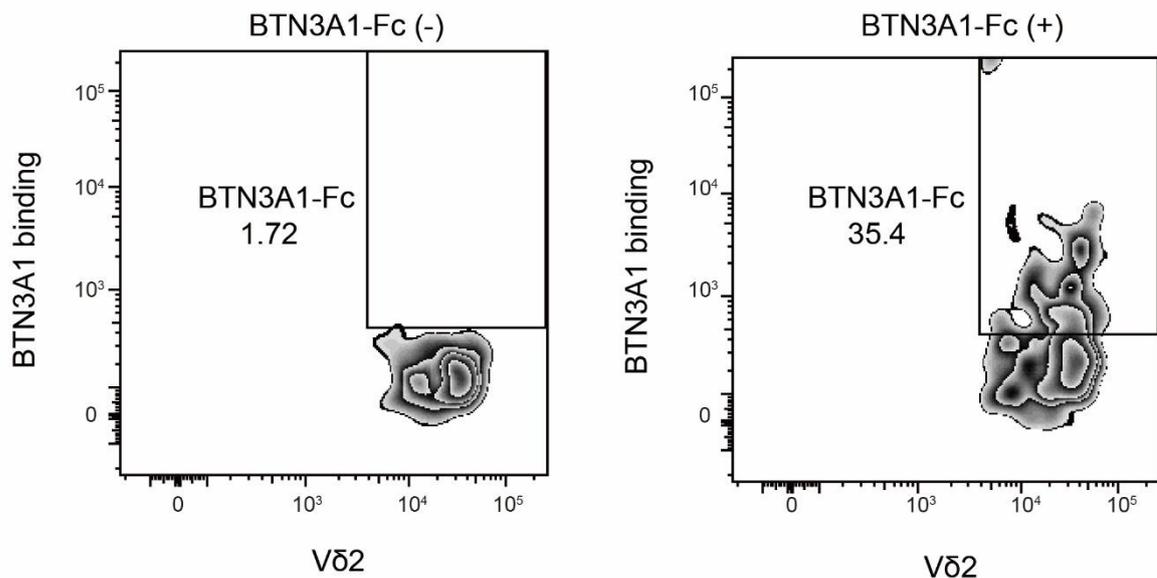


Fig. 1-10. Ex vivo-expanded culture of $\gamma\delta$ T cells treated with BTN3A1-Fc

(A) Schematic showing BTN3A1-Fc treatment and flow cytometry analysis of *ex vivo*-cultured cells. (B) Binding of BTN3A1-Fc to the surface of CD3⁺/V δ 2⁺ T cells on Day 2. PBMCs isolated from HD03 and stimulated with BTN3A1-Fc were analyzed with flow cytometry by using PE-labelled anti IgG-Fc antibody.

Modified from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

また、BTN3A1-Fc キメラタンパク質存在下において $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を算出すると、非存在下と比較して有意に $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が上昇していた (Fig. 1-11 : BTN3A1-Fc 非存在下 vs. BTN3A1-Fc 存在下 ; 88.8 ± 9.64 vs. 144.7 ± 8.65 倍 (HD03) ; 557.1 ± 35.5 vs. 855.4 ± 7.97 倍 (HD15))。以上より、BTN3A1 が $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養において予測できるバイオマーカーの一つになりうるということが明らかとなった。

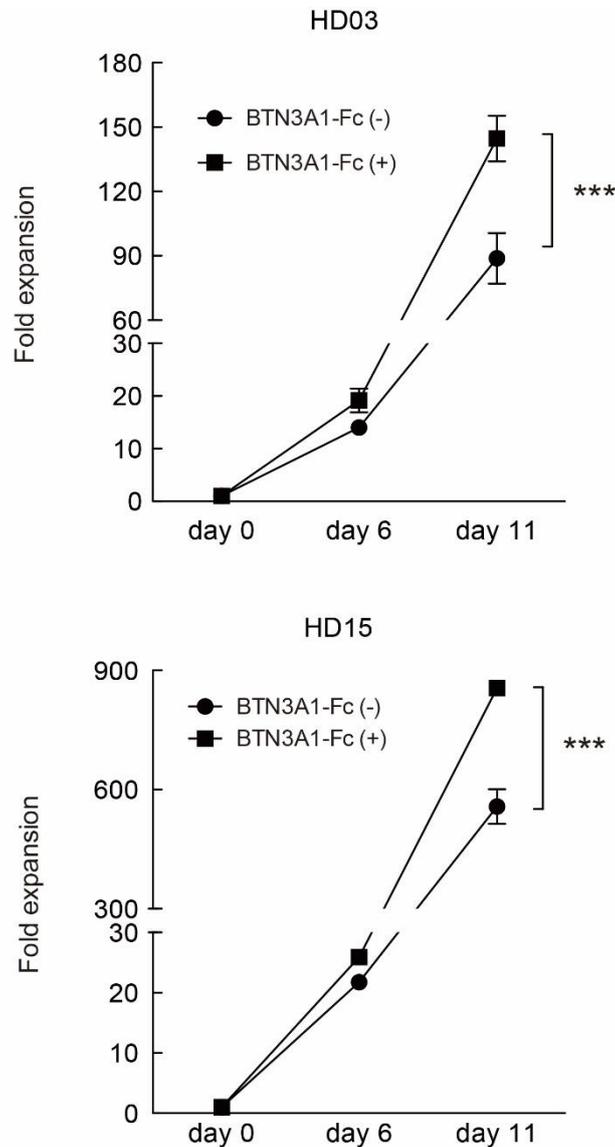


Fig. 1-11. BTN3A1-Fc increases the fold expansion of $\gamma\delta$ T cells.

Fold expansion on Days 0, 6, and 11 was calculated as the number of $\gamma\delta$ T cells obtained from HD03 and HD15 divided by the number before stimulation with ZOL. The mean \pm SD of three validation runs is shown. The statistical significance of differences was determined by two-way ANOVA with a post-hoc Bonferroni test (***) $p < 0.001$ vs. BTN3A1-Fc(-) culture).

Modified from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **588**, 47-54 (2022)

第4節 考察

本章では、PBMCs 中の $\gamma\delta$ T 細胞を増幅培養し、経時的なフローサイトメトリーによる解析を行った。その結果、既報 (19,45) と同様に $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率に個人差があり、検討した症例の中には $\gamma\delta$ T 細胞が選択的に増幅せず、他の細胞が増殖した症例が見受けられた。 $\alpha\beta$ T 細胞や CD3 細胞での培養 6 日目の CD25 の発現をフローサイトメトリーにて解析すると、一部の細胞が CD25 を発現しており (Supplementary Figure 2)、これらの細胞が IL-2 に反応して増殖していることが考えられる。増幅効率を予測できるバイオマーカーを探索するため、 $\gamma\delta$ T 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) について解析すると、培養 6 日目の $\gamma\delta$ T 細胞における CD25 の発現強度が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と有意に正に相関することを見出した。IL-2 が $\gamma\delta$ T 細胞に発現する CD25 に結合すると、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達経路 (ERK、p38、JNK) が活性化され (56)、 $\gamma\delta$ T 細胞は IL-2 のオートクラインやパラクラインによって増幅する (57)。しかし、PBMCs に対して IL-2 処置だけでは $\gamma\delta$ T 細胞の活性化が誘導されず、 $\gamma\delta$ T 細胞のリン酸抗原の認識が必要である (58)。ゾレドロン酸による IPP の蓄積が、磁気ビーズにより分離した単球細胞内において検出され、それ以外の細胞からは検出されない (59)。また、本検討では PBMCs から単球を除くと $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が減少し、 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅および CD25 の発現制御には抗原提示細胞として単球が必要であることを示した。よって、 $\gamma\delta$ T 細胞は単球内でゾレドロン酸によって蓄積した IPP を認識して活性化することが示唆される。また、 $\gamma\delta$ T 細胞におけるトランスクリプトーム解析では、IL-2 単独群と比較してリン酸抗原 IPP + IL-2 処置群の方が AP1 ファミリー転写因子 Fos および Jun の発現上昇を見出している (60)。T 細胞では nuclear factor of activated T cells (NFAT) と activator protein 1 (AP-1) が協調的に CD25 の遺伝子発現制御をする (61) ことから、 $\gamma\delta$ T 細胞における CD25 の発現制御機構として単球内に蓄積した IPP を認識し、NFAT と AP-1 による転写制御により CD25 の発現が上昇したと考えられる。今回の CD14⁺細胞を除いた場合での増幅効率の検討は末梢血液より分離した PBMCs を対照として比較検討したが、CD14⁺細胞を除いた細胞に対してセルソーターで分取した CD14⁺細胞を加えて培養することが本検討のあるべき対照として置くべきであった。正しい対照群を用いて検討した過去の報告でも、 $\gamma\delta$ T 細胞のみ分取しても増幅できず、単球と $\gamma\delta$ T 細胞をそれぞれ分取し、共培養することで $\gamma\delta$ T 細胞数が上昇していた (62)。一方、PBMCs から単球を除いた場合の $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率は、単球を含む通常培養と比較すると大きく増幅効率が減少したが、僅かに $\gamma\delta$ T 細胞が増殖した。これは、 $\gamma\delta$ T 細胞自身が ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1) を介して細胞外へ放出した外因性 IPP (63,64) により活性化されたことで、単球非存在下においてわずかに増幅したと考えられる。

今回のフローサイトメトリーによる検証から単球細胞表面上の BTN3A1 の発現強度と $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率が正に相関することを見出した。単球には相同性の高い BTN3A2 および BTN3A3 も発現している (65)。BTN3A1 および BTN3A3 は細胞内にアミノ酸約 180 個の配列の B30.2 ドメインを有する (28,29)。一方、BTN3A1/2/3 は二つの細胞外免疫グロブリンドメインで構成されており、95%以上の相同性がある (26)。BTN3A1、BTN3A2、BTN3A3 のすべてを shRNA によってノックダウンした HEK293 細胞に対してサブファミリーである BTN3A1、

BTN3A2、BTN3A3 のそれぞれを発現させ、BPs であるパミドロン酸を処置すると、BTN3A1 発現細胞に対してのみ $\gamma\delta$ T 細胞が活性化することが実証された (25)。本研究に使用した抗 BTN3A1/2/3 抗体は BTN3A2 および BTN3A3 に交叉性を持つが、単球内における BTN3A1 遺伝子発現量は BTN3A2 や BTN3A3 の発現量と比べて極めて高い (65)。また、 $\gamma\delta$ T 細胞は BPs 前処置 BTN3A1 発現細胞にのみ反応する (25) ことより、単球の細胞表面上の BTN3A1 の発現強度に依存して $\gamma\delta$ T 細胞が増幅し、BTN3A1 を高発現する単球の割合が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅に重要な役割を果たすと考えている。

現在まで $\gamma\delta$ T 細胞の抗原認識様式は完全に解明されていないが、BTN3A1 に関する数々の報告がなされている。一つは、リン酸抗原が BTN3A1 の細胞外 IgV 様ドメインに直接結合し、そのリン酸抗原を $\gamma\delta$ T 細胞が認識する抗原認識様式 (27) で、もう一つは、細胞内に蓄積したリン酸抗原が BTN3A1 の細胞内ドメイン B30.2 に結合し、構造変化した BTN3A1 を $\gamma\delta$ T 細胞が認識する抗原認識様式 (29,31) である。さらに、近年では BTN2A1 が $\gamma\delta$ T 細胞受容体における V γ 9 鎖と結合し、BTN2A1-BTN3A1 の複合体を $\gamma\delta$ T 細胞受容体を介して認識する抗原認識様式も報告されている。BTN2A1-V γ 9 鎖と対をなす形として V δ 2 鎖のリガンドとして BTN3A1 であると推測されている (65,69)。したがって、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗原認識には BTN3A1 が重要であることが示唆されている (67)。 $\gamma\delta$ T 細胞が BTN3A1 を介して活性化することは、二つの抗 BTN3A 抗体 (20.1 抗体および 103.2 抗体) による $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析により発見された。20.1 抗体はリン酸抗原刺激時と同様に $\gamma\delta$ T 細胞を活性化させ、103.2 抗体はリン酸抗原刺激による TNF- α の産生を阻害する抗体として同定された (25,26)。PBMCs を用いた検討では、ゾレドロン酸を前処置した単球に対して 103.2 抗体を処置すると、V γ 9T 細胞の増幅を抑制することが示されている (62)。

以上より、本研究では $\gamma\delta$ T 細胞の増幅に PBMCs 中の単球が必要であり、単球細胞表面上に発現する BTN3A1 の発現強度が $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率と正に相関することを明らかにした。本研究の進展により、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り、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の層別化が期待される。また、患者を層別化する中で増幅効率の低いドナーには他のピロリン酸モノエステル化合物 (69) を投与し、大量増幅を試みることができ、今回の研究結果を用いて患者の層別化ができることは極めて意義深いと考える。

第 5 節 小括

本章では $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できる有用なバイオマーカーを探索し、以下の知見を得た。

1. $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率を予測できるバイオマーカーとして単球の細胞表面上に発現する **BTN3A1** の発現強度が有用である
2. $\gamma\delta$ T 細胞の増幅には **CD14⁺**細胞が必要である。
3. $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率は単球細胞表面上に発現する **BTN3A1** の発現強度と正に相関する。
4. 培養 6 日目の $\gamma\delta$ T 細胞における **CD25** の発現強度と増幅効率が正に相関する。

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

第1節 緒言

がん細胞は、がん抗原および human leukocyte antigen (HLA) の消失、免疫抑制物質の発現や分泌、免疫抑制性細胞の誘導などを介して、免疫の監視から逃れる機能を獲得した「がん免疫逃避」状態となる。その中でも PD-1/PD-L1 経路は、免疫逃避において中心的な役割を担っている。PD-1 分子は CD28 ファミリーに属する免疫抑制性補助シグナル受容体であり、1992 年に T 細胞の細胞死刺激により発現が誘導される I 型膜タンパク質をコードする遺伝子として単離、同定された (70)。これまでの基礎実験では、PD-1 ノックアウトマウスにおけるマウスメラノーマ細胞の増殖抑制や、マウス肥満細胞腫株を用いた PD-L1 発現の有無による増殖効果および PD-1/PD-L1 経路阻害抗体による増殖抑制効果が示され (71,72)、抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体が新たながん治療薬として開発されてきた (73,74)。しかし、現時点における PD-1/PD-L1 阻害抗体単剤での奏効率は 10~30%程度であり、十分に高いものとは言えない (Table 2-1) (11)。有効性が認められない原因として、primary resistance (自然耐性) と acquired resistance (獲得耐性) の二つの機序が考えられている。前者は、発がんの過程で免疫系による排除から免れるためにネオ抗原を脱落させたがん (cold tumor) では、はじめから奏効が認められないタイプであり (75)、一方、後者は長期にわたる PD-1/PD-L1 阻害抗体の使用に伴い耐性を獲得するタイプである (76,77)。これらの問題を克服するための新たながん免疫療法が望まれている。

Table 2-1. Response rates to anti PD-1 antibody monotherapy

Study/Agent	Tumor	Experimental arm	Primary endpoint	Reference
KEYNOTE-001 /pembrolizumab	Melanoma	2 mg/kg or 10 mg/kg every 3 weeks	ORR 26%	(78)
KEYNOTE-001 /pembrolizumab	NSCLC	2 mg/kg every 3 weeks or 10 mg/kg every 2 or 3 weeks	ORR 28%	(79)
KEYNOTE-052 /pembrolizumab	Uroepithelial carcinoma	200 mg every 3 weeks	ORR 24%	(80)
CheckMate 275 /nivolumab	Uroepithelial carcinoma	3 mg/kg every 2 weeks	ORR 28.4%	(81)
KEYNOTE-059 /pembrolizumab	Gastric cancer	200 mg every 3 weeks	ORR 11.2%	(82)
CheckMate 142 /nivolumab	Colon cancer	3 mg/kg every 2 weeks	ORR 31.1%	(83)

ORR, over all response

細胞免疫療法には、能動免疫を強化する樹状細胞ワクチンによる治療法 (84,85) と、受動免疫療法として体外で増幅した NK 細胞 (5) や T 細胞 (3,4) を用いる養子免疫療法がある。さらに後者には、既知の抗原特異性をもつ受容体を人工的に導入した遺伝子改変 T 細胞療法がある。遺伝子改変 T 細胞療法には、CAR-T 細胞療法や TCR-T 細胞療法がある。CAR-T 細胞療法は、細胞外ドメインとして抗体の部分構造に抗原受容体を、細胞内ドメインとして T 細胞の副刺激分子である CD28 もしくは CD137 と T 細胞受容体構成分子である CD3 ζ のシグナルドメインを組み合わせたキメラタンパク質を発現させる。TCR-T 細胞療法では、抗原反応性 T 細胞受容体遺伝子を導入する。近年、抗 CD19 CAR-T 細胞療法が B 細胞性血液悪性腫瘍に対して高い治療効果を発揮している (86,87) もの、再発が認められるといった臨床的課題も存在する (88)。さらに、固形がんに対する CAR-T 細胞療法の有効性は非常に低い状況である (89)。また、TCR-T 細胞療法では 20~50%の奏効率が認められた報告はあるものの、有効性を発揮できる固形がんの種類は限られている (90)。遺伝子改変 T 細胞療法が固形がんに対して十分な効果を発揮できない原因の一つとして、固形がん組織内に強力な免疫抑制環境が形成されているため、投与した CAR-T 細胞や TCR-T 細胞が PD-1/PD-L1 経路により疲弊し、その抗腫瘍活性が無力化、減弱化してしまうことが報告されている (91)。その打破のためニボルマブやアテゾリズマブ等の免疫チェックポイント阻害薬が投与されているが、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果も PD-1/PD-L1 経路に影響を受けるのかは明らかにすべきと考える。

本章では、 $\gamma\delta$ T 細胞療法を確立するにあたり、体外での培養によって増幅した $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性における PD-1/PD-L1 経路の影響について検証した。

第2節 実験方法

1. 細胞培養

ヒト膀胱がん細胞株 (UMUC3、T24、T24cis、TCCSUP)、ヒト胃がん細胞株 (MKN28、MKN45)、ヒト肺がん細胞株 (A549、SBC-3、SBC-5)、ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB-231)、ヒト大腸がん細胞株 (SW480、HT29)、ヒト中皮腫細胞株 (211H、H2052、H2452) は American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。膀胱がん、胃がん、肺がん、中皮腫細胞株は 10% FBS (Sigma-Aldrich)、抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン : FUJIFILM 和光純薬) を含む RPMI1640 (FUJIFILM 和光純薬)、大腸がん細胞株および乳がん細胞株は 10% FBS (Sigma-Aldrich)、抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン : FUJIFILM 和光純薬) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (ナカライテスク) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

2. $\gamma\delta$ T 細胞培養

末梢血単核球は Ficoll-Paque (GE Healthcare、Little Chalfont、Bucks、UK) を用いて分離し、分離した末梢血単核球を 10% ヒト AB 型血清、5 μ M ゴレドロン酸 (Novartis Pharma AG) 含有 ALyS505N-0 培地 (フナコシ、東京、日本) に懸濁し、37°C、5% CO₂ 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 5 日目まで rhIL-2 (100 IU/mL) を添加した。培養 6 日目では、10% FBS (Sigma-Aldrich)、抗生物質 (100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン : FUJIFILM 和光純薬) を含む RPMI1640 を 1.5 mL/well 添加し、1.5 mL ずつ新しい well に移し、各 well に rhIL-2 (100 IU/mL) を添加した。培養 7 日目以降では、24 well プレートから T-75 フラスコ (Thermo Fisher Scientific) に移し、rhIL-2 (100 IU/mL) を添加し、10% FBS 含有 RPMI1640 を用いて増幅培養した。本研究で使用した検体は所属機関の倫理委員会において承認 (20-16-09) され、インフォームド・コンセントを得た上で採血を行った。

3. フローサイトメトリー

末梢血単核球中の $\gamma\delta$ T 細胞の割合、 $\gamma\delta$ T 細胞内における脱顆粒分子および interferon- γ (IFN- γ) の発現、がん細胞における PD-L1 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。表面抗原の染色では、100 μ L の PBS (-) に細胞を 1.0×10^7 cells/mL になるように調製し、1.5 mL チューブ (Thermo Fisher Scientific) に回収した。調製後、以下の抗体と反応させた。抗 CD3- FITC 抗体 (1 : 20 ; BD Bioscience、#555332)、抗 TCR $\alpha\beta$ -PE 抗体 (1 : 50 ; BD Bioscience、#564728) 抗 TCR $\gamma\delta$ -APC 抗体 (1 : 20 ; BD Bioscience、#555718)、抗 V δ 2TCR 抗体 (1 : 500 ; BD Bioscience、#555739)、抗 V γ 9TCR-PE (1 : 100 ; Biolegend、#331307)、抗 PD-1-PE 抗体 (1 : 5 ; BD Bioscience、#560908)、抗 PD-L1-APC 抗体 (1 : 20 ; BD Bioscience、#563741)、抗 IgG κ -APC 抗体 (1 : 40 ; BD Bioscience、#554681) を処置し、20 分間、4°C、遮光で反応させた。その後、300 \times g、4°C、5 分間の遠心分離を行って細胞を PBS (-) により 2 回洗浄した。細胞内抗原の染色では、 $\gamma\delta$ T 細胞を 1.0×10^6 cells/well で 24 well プレートに播種後、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

/ionomycin (eBioscience™ Cell Stimulation Cocktail 500×) を1×で加えたのち GolgiStop Protein Transport Inhibiter (BD Bioscience) を 1 μL/mL で処置し、各インキュベータ内で 2 時間培養した。その後、1.5 mL チューブに回収した。回収した細胞を 100 μL の PBS (-) に懸濁し、抗 human TCRγδ-APC 抗体を処置し、20 分、4°C で反応させた。300 ×g、4°C、5 分間の遠心分離を行い、細胞を PBS (-) により洗浄した。次に、500 μL の 4% paraformaldehyde (PFA) 溶液を加え、ボルテックスにて混和し、室温、暗所で 15 分間反応させた。PBS (-) で 2 回洗浄し、0.2% 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 PBS (-) 溶液 150 μL 加え、室温で 10 分間反応させた。抗 Perforin-Alexa Fluor 488 抗体 (1:20; BD Bioscience)、抗 Granzyme B-PE 抗体 (1:20; BD Bioscience)、抗 IFN-γ-PE 抗体 (1:20; BioLegend) を処置し、20 分、4°C で反応させた。0.2% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートで 2 回洗浄した後、PBS (-) で 1 回洗浄した。

細胞懸濁液を 70 μm 径のナイロンメッシュ (共進理工、東京) に通した後、FACS Calibur (BD Bioscience) を用いて解析した。発現強度の指標として未染色サンプルの蛍光強度の MFI と蛍光標識抗体で染色したサンプルの MFI の比をとった MFI ratio を用いた。解析は FlowJo (BD Bioscience) により実施した。

4. 細胞傷害性試験

がん細胞に対する γδ 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。各がん細胞を 1 mL の PBS (-) に懸濁し、0.5 μM の Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE: 同仁堂、熊本) で 30 分間、37°C、遮光で染色を行った。その後、200 ×g、5 分間の遠心分離を行い、各培養液に交換し、6 well プレート (Thermo Fisher Scientific) に 1 × 10⁶ cells/well ずつ播種した。その後、ゾレドロン酸を 5 μM ずつ処置し、37°C、5% CO₂ の環境下で 18 時間培養した。その後、24 well プレートにがん細胞を 1 × 10⁵ cells/well ずつ播種し、未処置群、Effector cell:Target cell (E:T) 比 1:1、E:T 比 10:1 になるように γδ T 細胞を処置し、4 時間共培養した。

抗 PD-1 抗体併用下および抗 PD-L1 抗体併用下における γδ T 細胞の抗腫瘍効果の検討では、抗 PD-L1 抗体 (eBioscience、#16-5983、clone MIH1) および抗 PD-1 抗体 (R&D Systems、#AF1086) をそれぞれ 10 μg/mL および 3 μg/mL の濃度で処置し、20 分間、4°C で反応させた後、がん細胞と γδ T 細胞を共培養した。各 well の共培養後のサンプルをすべて回収し、200 ×g、5 分間の遠心分離を行い、500 μL の PBS (-) に懸濁した。

γδ T 細胞による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) 20 μg/mL (FUJIFILM 和光純薬) を処置後、FACS Calibur (BD Bioscience) を用いて解析した。なお、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。

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

5. PD-L1 small interfering RNA (siRNA) によるノックダウンの検証

PD-L1 に対する siRNA は、siDirect バージョン 2.0 (<http://sidirect2.rnai.jp/>) を用いて設計した。設計した PD-L1 siRNA を GeneDesign Inc. (大阪、日本) から購入し、control siRNA を Thermo Fisher Scientific から購入した (Table 2-2)。がん細胞株 (A549、MKN28、T24、MDA-MB-231) を 6 well プレート (Thermo Fisher Scientific) に 2.5×10^5 cells/well で播種し、lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて siRNA (1 nM) をトランスフェクションした。72 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーにより、PD-L1 の発現強度や $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を検証した。

Tabale 2-2. Sequence of siRNA

siRNA		sequence
PD-L1 siRNA	sense	5'-UAUAAAGACAGCAAUAUCCU-3'
	antisense	5'-GAUAUUUGCUGUCUUUAUAUU-3'

6. 統計解析

3 群以上の比較での統計学的解析は、分散分析法 (analysis of variance ; 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 (エムデーエフ、東京) を使用した。2 群間の比較では unpaired-t 検定を用いて解析した。得られた実験結果は、平均値±標準偏差 (standard deviation ; SD) で表示した。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。危険率 5%以下を統計学的に有意差があると判定した。

第3節 実験結果

1. 増幅した $\gamma\delta$ T 細胞における PD-1 の発現解析

前章と同様に、健常人末梢血液より得られた PBMCs 中の $\gamma\delta$ T 細胞をフローサイトメトリーにより解析すると $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の割合の平均 ($n=3$) は 1.02% であり、11 日間増幅培養すると $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の割合の平均 ($n=3$) は 75.0% であった (Fig. 2-1A)。このドナーにおける $\gamma\delta$ T 細胞の増幅効率の平均は 1600 倍であった (Fig. 2-1B)。また、培養 11 日目での $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ の $\gamma\delta$ T 細胞において V δ 2 および V γ 9 が発現していた (Fig. 2-1C)。さらに、11 日間の増幅培養で得られた $\gamma\delta$ T 細胞における IFN- γ や細胞傷害性顆粒に含まれる granzymeB、perforin の細胞内における発現量をフローサイトメトリーにて評価した。granzymeB および perforin は PMA/ionomycin (Cell Stimulation Cocktail) によって活性化した場合と同程度に発現しており、IFN- γ は PMA/ionomycin 処置程ではないが、増幅前の PBMCs と比較すると $\gamma\delta$ T 細胞内での発現強度が増大した (Fig. 2-1D)。

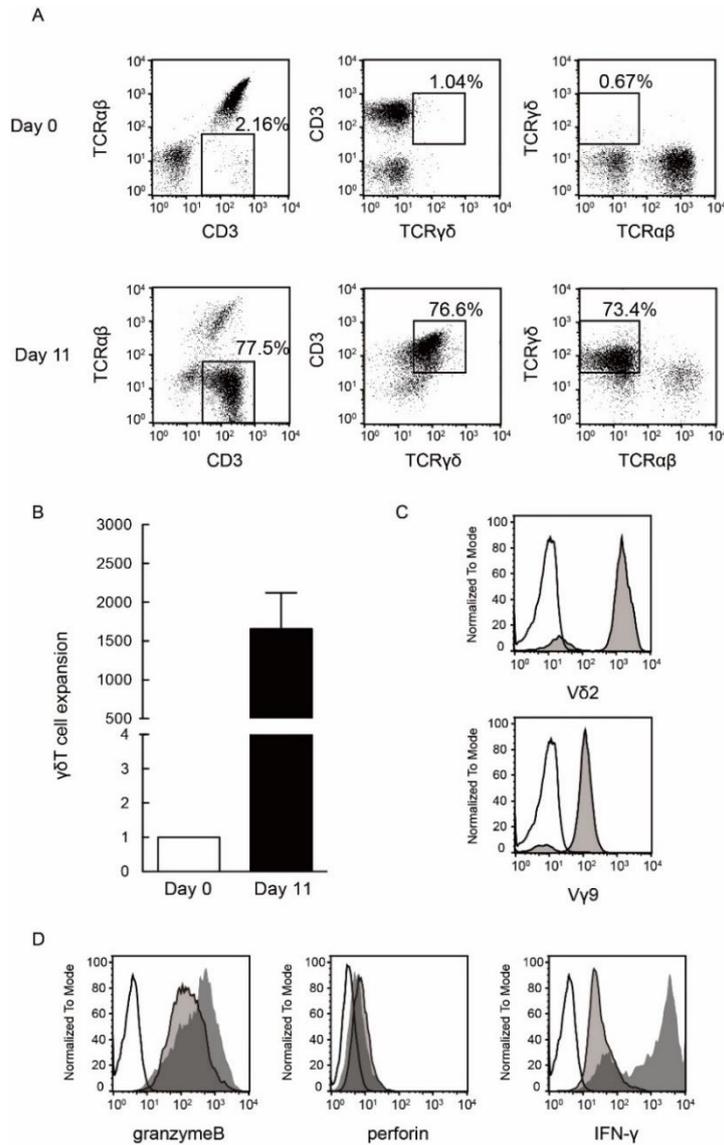


Fig. 2-1. $\gamma\delta$ T cells were expanded *ex vivo* from a healthy donor's PBMCs upon stimulation with ZOL (5 μ M) and rhIL-2 (100 IU/mL).

(A) Flow cytometric analysis of cell surface antigen designated shows the percentage of $\gamma\delta$ T cells on day 0 (upper panels) and 11 (lower panels). Phenotypic analysis of CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells. Representative data of three independent experiments are shown. (B) Fold expansion of $\gamma\delta$ T cells for 11 days (black bar). $\gamma\delta$ T cell expansion on day 0 (white bar) was used as the control. (C) Representative data of the expression of V δ 2 and V γ 9 on CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells are shown. White histograms represent the negative control. Gray histograms indicate the levels of V δ 2 and V γ 9 from *ex vivo* culture cells on day 11 (gated on CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells). (D) Intracellular staining for perforin, granzyme B, and IFN- γ in CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells on day 11 were evaluated by flow cytometry. White histograms represent the negative control. Gray histograms indicate levels of perforin, granzyme B, and IFN- γ in CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells on day 11. $\gamma\delta$ T cells stimulated with Cell Stimulation Cocktail that contains PMA/ionomycin (500 \times) were used as the positive control (dark gray).

$\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果における PD-1/PD-L1 経路の影響を検討すべく、体外増幅培養によって得られた $\gamma\delta$ T 細胞での PD-1 の発現をフローサイトメトリーにて検討した。その結果、PBMCs 回収直後、 $\gamma\delta$ T 細胞において PD-1 は検出されなかったが、培養 11 日目では PD-1 の発現が観察された (Fig. 2-2A)。また、前章の健康人ドナーから体外増幅培養して得られた $\gamma\delta$ T 細胞において PD-1 の発現強度が高いドナーが存在した (Fig. 2-2B)。

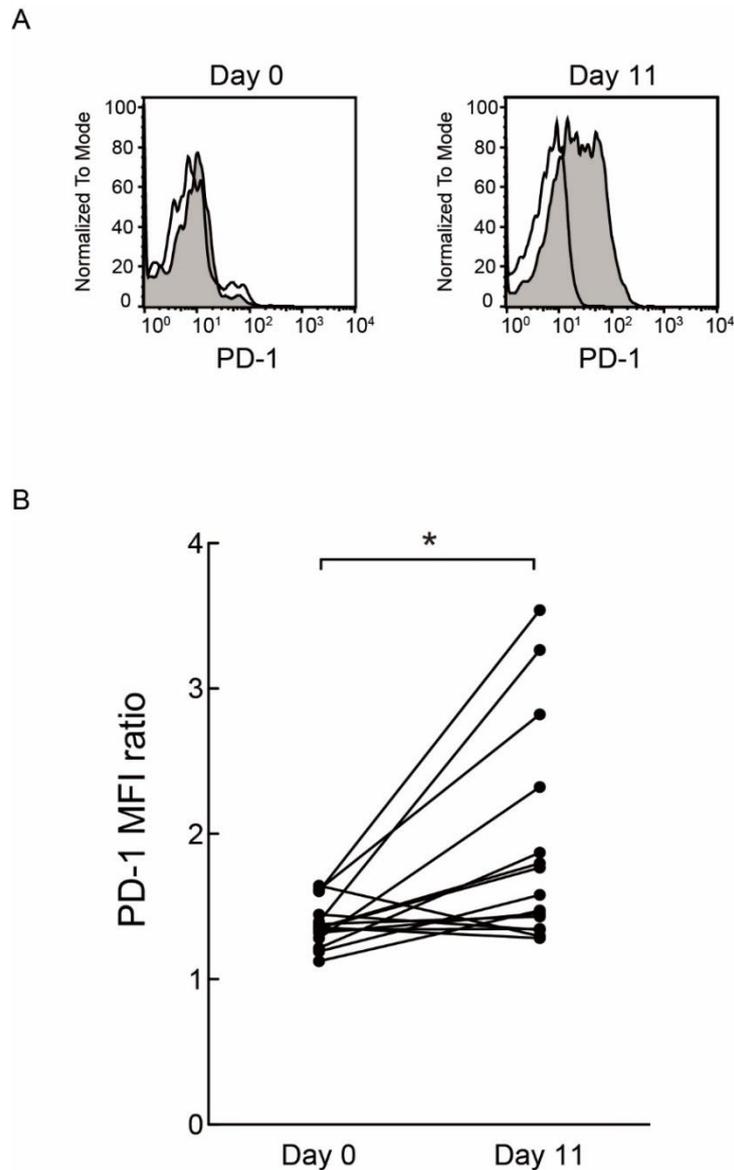


Fig. 2-2. PD-1 expression on *ex vivo*-expanded $\gamma\delta$ T cells

(A) Expression levels of PD-1 on CD3⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells on day 0 and day 11 are shown as representative data. (B) Comparison of surface expression of PD-1 on $\gamma\delta$ T cells between day 0 and day 11. Statistical significance of differences was determined using unpaired t test with Welch's correction (n=15, **p* < 0.05 vs. Day 0).

Fig. 2-2. (A) from Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **573**, 132-139 (2021)

2. がん細胞株における PD-L1 の発現解析

次に、15 株の細胞株（膀胱がん、乳がん、中皮腫、胃がん、大腸がん、肺がん）における PD-L1 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。各細胞株において PD-L1 の発現強度は様々であり、特に膀胱がん細胞株（UMUC3、T24、T24cis）、乳がん細胞株（MDA-MB-231）、中皮腫細胞株（H2052、H2452）の PD-L1 が高発現であった（Fig. 2-3）。

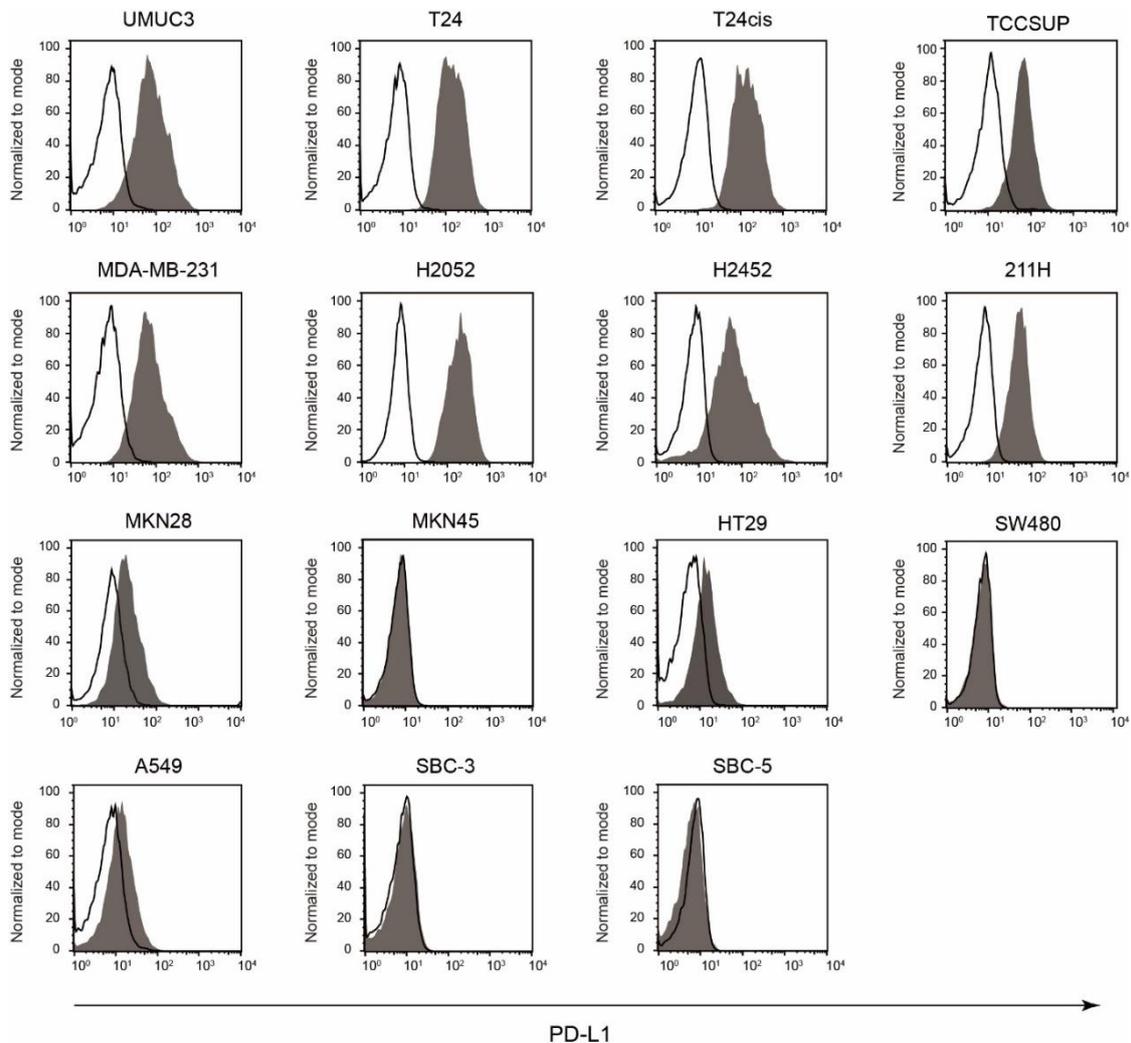


Fig. 2-3. Expression levels of PD-L1 on cancer cells.

Expression of PD-L1 in urinary bladder cancer (UMUC3, T24, T24cis, and TCCSUP), stomach cancer (MKN28 and MKN45), lung cancer (A549, SBC-3, and SBC-5), breast cancer (MDA-MB-231), colon cancer (SW480 and HT29), and mesothelioma (211H, H2052, and H2452) were investigated using flow cytometer. White histograms represent the negative control. Gray histograms indicate the levels of PD-L1.

Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **573**, 132-139 (2021)

3. 抗 PD-1 抗体との併用による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討

$\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果をフローサイトメトリーにより検証した。フローサイトメトリーにおいて $\gamma\delta$ T 細胞から識別するためにがん細胞を蛍光色素 CFSE で染色し、細胞膜非透過性の蛍光色素 PI により死細胞の核酸を染色して $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を PI positive cancer cells (%) = (CFSE⁺PI⁺ cancer cells/CFSE⁺ cancer cells) × 100 を用いて算出した。 $\gamma\delta$ T 細胞とがん細胞とを 4 時間共培養し、CFSE⁺分画における PI⁺細胞の割合を $\gamma\delta$ T 細胞による抗腫瘍効果とみなした。その結果、ゾレドロン酸前処置によりがん細胞に対する抗腫瘍効果が上昇した (Fig. 2-4)。

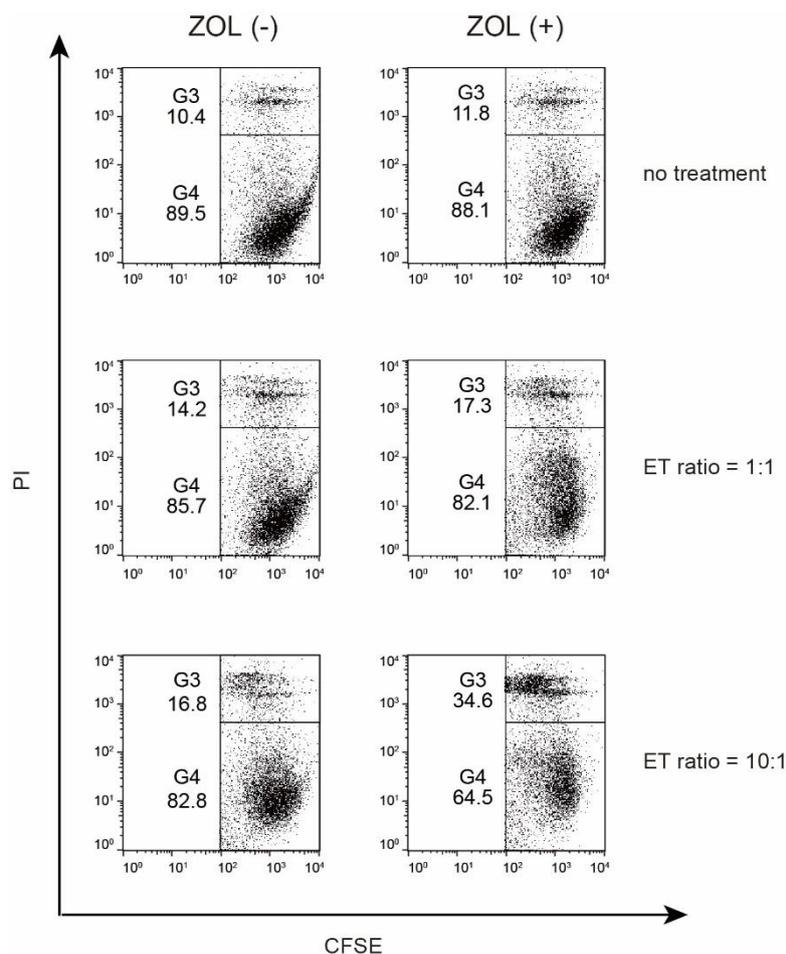


Fig. 2-4. ZOL pre-treatment enhanced $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity.

Cancer cells were stained with 0.5 μ M CFSE and pretreated with or without 5 μ M ZOL. Results of typical flow cytometric analysis of $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity in the UMUC3 cell line are shown. G3 and G4 include nonviable (CFSE⁺PI⁺) and viable (CFSE⁺PI⁻) target cells, respectively.

Tomogane M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **573**, 132-139 (2021)

次に、ゾレドロン酸を前処置した PD-L1 高発現細胞株を用いて抗 PD-1 抗体および $\gamma\delta$ T 細胞併用時の抗腫瘍効果を検討した。その結果、抗 PD-1 抗体による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の有意な上昇は観察されなかった (Fig. 2-5)。

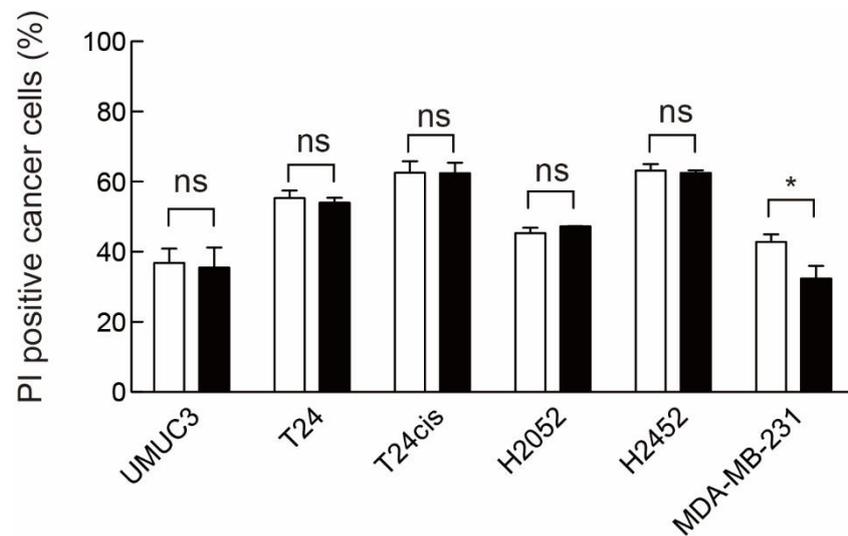


Fig. 2-5. Anti PD-1 monoclonal antibody (mAb) did not increase $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity against PD-L1^{high} tumor cells.

Comparison of the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells with (white bars) and without anti-PD-1 mAb (black bars) against ZOL-pretreated cancer cells at an E:T ratio of 10:1. The mean \pm SD of three validation runs is presented. Statistical significance of differences was determined using the Student's t-test (* $p < 0.05$ vs. E:T ratio = 10:1)

Tomogane M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **573**, 132-139 (2021)

4. 抗 PD-L1 抗体との併用による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討

次に、PD-L1 の発現強度が様々ながん細胞株に対して抗 PD-L1 抗体を処置し、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果における PD-L1 の発現強度による影響について検討した。MKN45 および HT29 を除き、ゾレドロン酸前処置がん細胞に対する抗腫瘍効果の方が高く、一部のがん細胞株 (UMUC3、T24、T24cis、H2052、H2452、MDA-MB-231) において抗 PD-L1 抗体によって $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が有意に増大した (Fig. 2-6)。

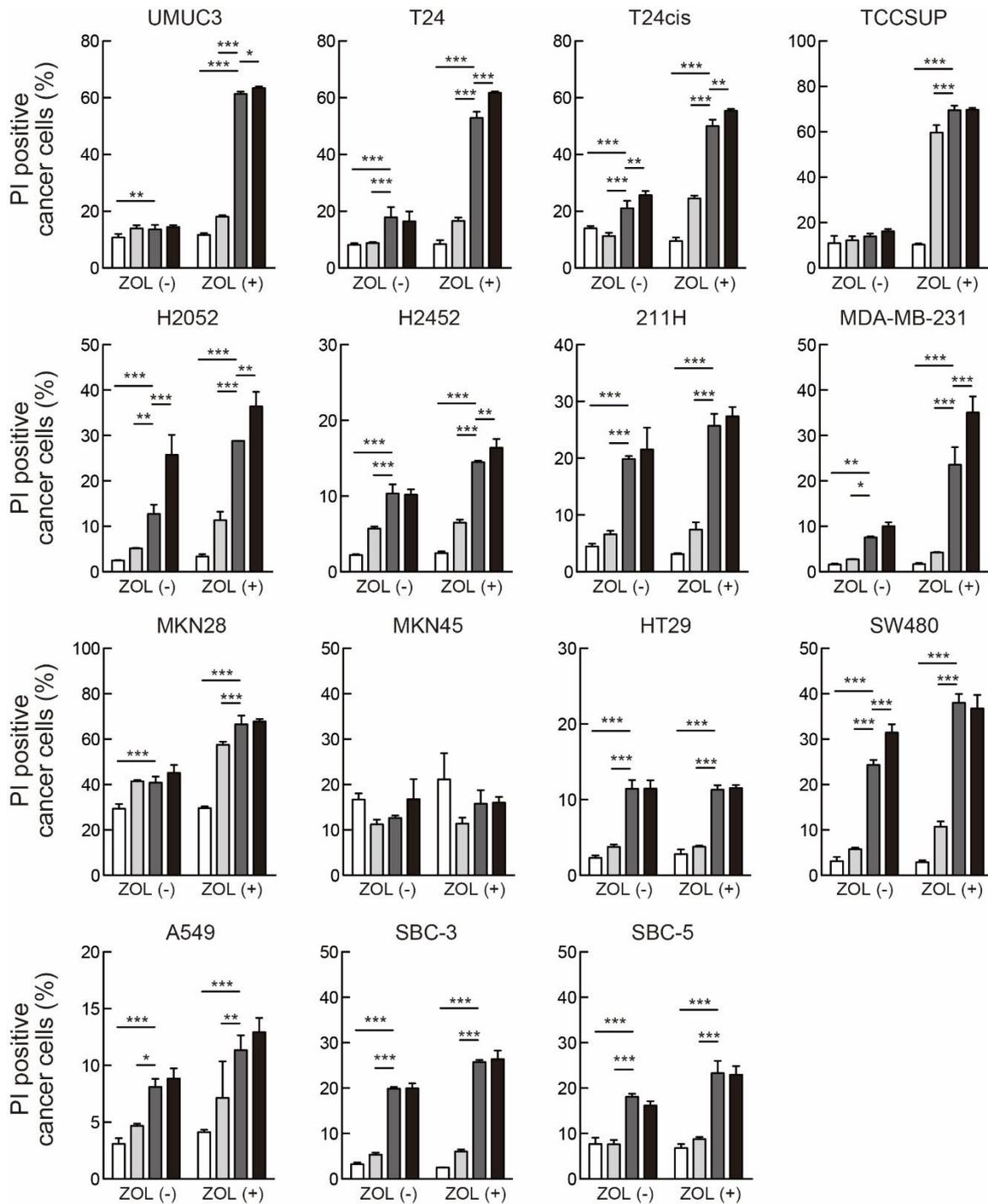


Fig. 2-6. Treatment with the anti-PD-L1 mAb increased the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells against certain ZOL-pretreated cancer cells (UMUC3, T24, T24cis, H2052, H2452, and MDA-MB-231 cells) at an E:T ratio of 10:1.

Comparison of the ratio of dead cancer cells between the control (white bars), E:T ratio = 1:1 (light gray bars), E:T ratio = 10:1 (dark gray bars), and E:T ratio = 10:1 with anti-PD-L1 mAb (black bars). The mean \pm SD of three validation runs is shown. The statistical significance of differences was determined by two way ANOVA (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. E/T ratio = 10:1 with a post hoc Bonferroni's test).

5. PD-L1 ノックダウンがん細胞株に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討

さらに、PD-L1 低発現株 (A549、MKN28) および PD-L1 高発現株 (MDA-MB-231、T24) の PD-L1 をノックダウンし、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を検討した。PD-L1 siRNA を処置してから 72 時間後、各がん細胞株における PD-L1 の発現強度をフローサイトメトリーにより検討した。その結果、すべての細胞株において PD-L1 siRNA によって PD-L1 が発現低下した (Fig. 2-7A)。次に、PD-L1 ノックダウン細胞株を用いて $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を検討したところ、すべての細胞株において抗腫瘍効果の増大は見受けられなかった (Fig. 2-7B)。これらの結果より、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果は PD-1/PD-L1 経路による影響を受けることなく発揮することが示唆された。

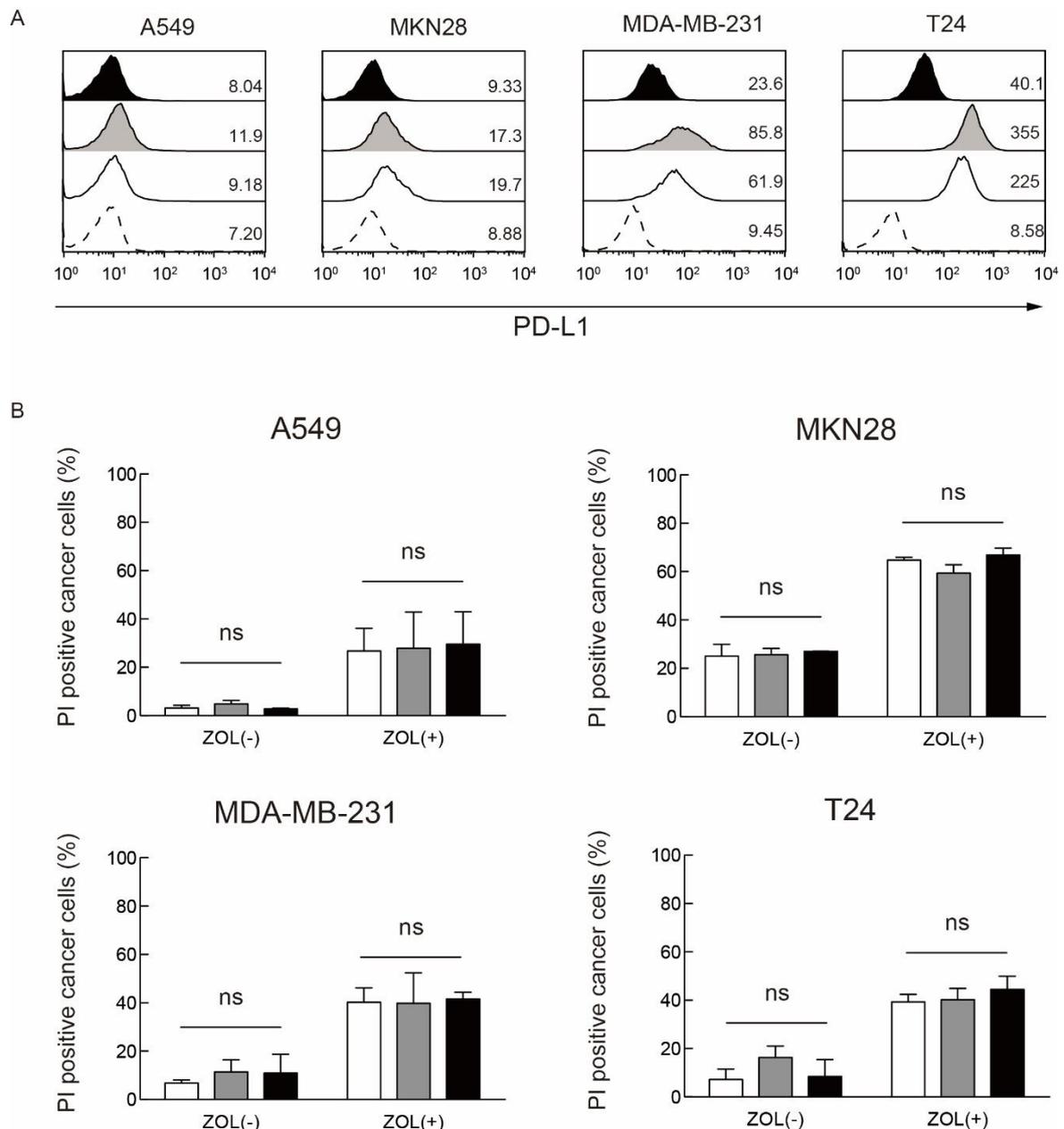


Fig. 2-7. PD-L1 knockdown did not increase the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells regardless of the expression level of PD-L1.

(A) Flow cytometric analysis of PD-L1 expression after siRNA transfection. Broken line: isotype control; solid line: anti-PD-L1-APC; solid line filled with gray: anti-PD-L1-APC (control siRNA); solid line filled with black: anti-PD-L1-APC (PD-L1 siRNA). The median fluorescence intensity (MFI) of PD-L1 expression was determined for each agent-treated sample. (B) Comparison of the ratio of dead cancer cells between control, E/T ratio = 10:1 (white bars), E/T ratio = 10:1 with control siRNA (gray bars), and E/T ratio = 10:1 with PD-L1 siRNA groups (black bars). The mean \pm SD of three validation runs is presented. Statistical significance of differences was determined by two way ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. all samples).

Tomogane M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **573**, 132-139 (2021)

6. $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果における抗体依存性細胞傷害活性の関与の可能性

“4. 抗 PD-L1 抗体との併用による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討” および “5. PD-L1 ノックダウンがん細胞株に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の検討” により、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の結果に違いが生じた。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 を発現していた (Fig. 2-8A)。また抗 PD-L1 抗体により抗腫瘍活性が有意に上昇した細胞株と有意に上昇しなかった細胞株との間で PD-L1 の発現強度を比較したところ、前者の細胞株の方が PD-L1 の発現強度が有意に高いことを見出した (Fig. 2-8B)。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は、有意な正の相関を示した (Fig. 2-8C)。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。

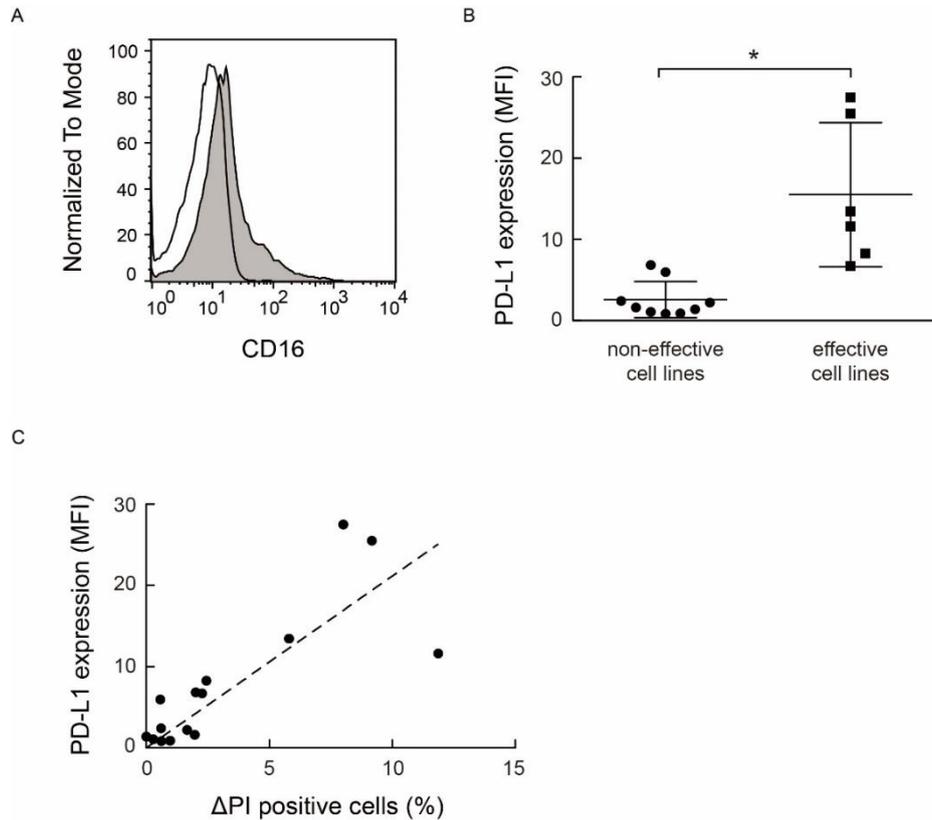


Fig. 2-8. PD-L1 expression was positively correlated with changes in $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity induced by anti-PD-L1 mAb.

(A) Flow cytometric analysis of the expression of CD16 in $\gamma\delta$ T cells on day 11. White histograms represent the negative control. Gray histograms indicate the levels of CD16 (gated on $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ T cells). (B) Comparison of the expression levels of PD-L1 between non-effective and effective cancer cell lines. Effective cell lines (UMUC3, T24, T24cis, H2052, H2452, MDA-MB-231) show that treatment with the anti-PD-L1 antibody increased the cytotoxicity of $\gamma\delta$ T cells against certain ZOL-pretreated cancer cells at an E/T ratio of 10:1. Statistical significance of differences was determined using unpaired t-test with Welch's correction ($*p < 0.05$ vs. non-effective cell lines). (C) Correlation between the expression level of PD-L1 and the changes in $\gamma\delta$ T cell cytotoxicity induced by anti-PD-L1 mAb. Pearson's correlation analysis in 15 cell lines with $r = 0.81$, $***p < 0.001$.

Tomogane M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **573**, 132-139 (2021)

第4節 考察

本章では、体外増幅培養で得られた $\gamma\delta$ T 細胞は PD-1 を発現し、 $\gamma\delta$ T 細胞を用いて抗腫瘍効果に対する PD-1/PD-L1 経路の影響について検討し、がん細胞株に発現する PD-L1 の発現強度に関係することなく抗腫瘍効果を発揮することを明らかとした。 $\gamma\delta$ T 細胞の体外増幅培養において PD-1 の発現は培養 3 日目に最も高く、培養 6 日目以降となると PD-1 の発現は低下していく (92-95)。しかし、中には培養 10 日目以降で PD-1 高発現 $\gamma\delta$ T 細胞が増幅する場合もある (92,96)。がん細胞は「がん免疫編集」の過程において、がん細胞上に抑制性受容体 PD-L1 を発現し、PD-1/PD-L1 経路によって T 細胞の活性を抑制する (71,97,98)。本検討に用いた抗 PD-1 抗体および抗 PD-L1 抗体により PD-1/PD-L1 経路を阻害すると、NK 細胞および CD8 遺伝子導入 Jurkat 細胞の抗腫瘍効果が増大する (99,100)。 $\gamma\delta$ T 細胞での検討では、PD-L1 高発現細胞株に対して抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果は増大せず、一部のがん細胞株に対して抗 PD-L1 抗体によって抗腫瘍効果が増大したが、PD-L1 ノックダウン細胞株に対して有意な抗腫瘍効果の変化を認めなかった。このことは、 $\gamma\delta$ T 細胞による抗腫瘍活性には PD-1/PD-L1 経路による影響を受けないことを示している。

$\gamma\delta$ T 細胞は CD16 を介して抗体依存性細胞傷害 (ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity) 活性を発揮し (101-103)、抗 PD-L1 抗体に対しても NK 細胞による ADCC 活性を示す (104,105)。増幅して得られた一部の $\gamma\delta$ T 細胞において CD16 が発現し、抗 PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍効果の変化量とがん細胞株における PD-L1 の発現強度が正に相関したことから、抗 PD-L1 抗体を用いた検討では、一部のがん細胞株では $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性に加えて ADCC 活性が発揮されたと考えられる。また、CD16⁺ $\gamma\delta$ T 細胞はリツキシマブを介して ADCC 活性を発揮するが、Fc フラグメントを除去した Fab フラグメントの処置により $\gamma\delta$ T 細胞の ADCC 活性が抑制される (106)。本検討では、抗 PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍効果の増大に ADCC 活性が関与していることは実証できておらず、(106) と同様に Fab フラグメントを用いて追加検討をすべきであった。また、ADCC に対する感受性はがん細胞によっても異なるため、既報 (101-103,106) のような他の表面分子に対する抗体でも同様の傾向を示すのかを検討すべきだと考える。

以上より、本研究では $\gamma\delta$ T 細胞が PD-L1 の発現強度に関係なく抗腫瘍効果を発揮するエフェクター細胞として機能することが示唆された。

第 5 節 小括

本章では、体外増幅培養で得られた $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果における PD-1/PD-L1 経路の影響について検討し、以下の知見を得た。

1. がん細胞株の PD-L1 の発現強度に関係なく $\gamma\delta$ T 細胞は抗腫瘍効果を示す。
2. 抗 PD-1 抗体の併用では $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が増大しない。
3. 抗 PD-L1 抗体の併用では、一部のがん細胞株に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が増大する。
4. PD-L1 ノックダウンはがん細胞株に対する $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果を変化させない。
5. 抗 PD-L1 抗体処置による $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果の増大は、抗体依存性細胞傷害活性による可能性がある。

総括

1950年代にがん免疫監視機構が提唱され、様々な免疫細胞を用いた細胞免疫療法が実施されるも、細胞免疫療法は治療効果が不十分な治療法であった。その後、発がんに至る過程での免疫系の役割を3つに分類した「がん免疫編集」が提唱され、がん免疫療法は第4の治療法として注目され、抗PD-1抗体やCAR-T細胞療法の承認により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がん種によって異なるものの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。γδT細胞は1980年代に存在が確認された細胞集団(107-109)であり、リン酸抗原の同定(110)やBPsによるIPP蓄積作用(17,111)により様々ながん種に対してγδT細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験が行われてきた。γδT細胞の全身投与は安全で忍容性があるが、有効性が限定的である。これまでの臨床試験において治療効果が乏しい要因として、がん細胞数に対して全身投与したγδT細胞数が確保できていないことが考えられている。しかし、膀胱腔内へのγδT細胞の投与によりがんの増大を抑制する前臨床研究(21,22)や胃がんに伴う悪性腹水を認める患者へのγδT細胞の腹腔内投与により治療効果を示した症例が報告されており(36)、局所空間を利用したγδT細胞療法の実用性が実証されており、これらの知見は、より高いγδT細胞/がん細胞比を維持することが本治療法を有効な治療法として確立させるには重要であることを示唆している。

著者はγδT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つ存在すると考えた。1点目はγδT細胞の増幅効率の予測である。γδT細胞の増幅効率には個人差があることが報告されている(19,45)が、培養前に増幅効率を予測することができ、大量のγδT細胞の増幅可能な患者が選択できれば、より高い治療効果が望める。2点目は「がん免疫編集」におけるPD-1/PD-L1経路による抗腫瘍活性の減弱化の可能性である。現在、がん細胞免疫療法に用いられているCTLやCAR-T細胞はいずれもPD-1/PD-L1経路により、その抗腫瘍効果は減弱される。その打破のため免疫チェックポイント阻害薬が投与されているが、γδT細胞の抗腫瘍効果もPD-1/PD-L1経路に影響を受けるのかは明らかにすべきである。これらの問題点を解決すべく、本研究ではγδT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γδT細胞の抗腫瘍効果に対するPD-1/PD-L1経路の影響について検討した。

第1章では、健常人20名のPBMCsからγδT細胞の増幅効率を算出し、抗原提示細胞としてγδT細胞の増幅に関与する単球に着目し、γδT細胞の増幅効率と相関するバイオマーカーを探索した。その結果、単球細胞表面上に発現するBTN3A1の発現強度がγδT細胞の増幅効率と相関し、γδT細胞の増幅効率を予測できるバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。第2章では、増幅培養して得られたγδT細胞を用いてがん細胞に対する抗腫瘍効果におけるPD-1/PD-L1経路の影響について検証した。その結果、γδT細胞はPD-L1の発現強度に関係なく抗腫瘍効果を発揮するエフェクター細胞として有用であることが示唆された。

以上より、著者は増幅前の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の層別化に期待でき、この研究成果を受けて、現在患者検体の末梢血中のγδT細胞の増幅効率および単球に発現するBTN3A1について解析を進めている。また、増幅したγδT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。今回の検討における *in vitro* での 4 時間の共培養では、内在的に発現する PD-L1 の発現強度の影響を受けることなく抗腫瘍効果を発揮した。しかし、 $\gamma\delta$ T 細胞を投与し、長時間経過した後も同様に PD-1/PD-L1 の影響を受けることなく、 $\gamma\delta$ T 細胞が抗腫瘍効果を発揮するかは明らかにする必要はある。IFN- γ は II 型 IFN 受容体に結合し、JAK1/JAK2-STAT1/STAT2/STAT3-IRF1 経路を介して PD-L1 遺伝子の発現を制御する (112-114) ため、PD-L1 は T 細胞から産生された IFN- γ によって発現が上昇する。このことから、 $\gamma\delta$ T 細胞から分泌される IFN- γ によりがん細胞上の PD-L1 の発現強度が増大し、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍効果が PD-1/PD-L1 経路によって減弱する可能性は残る。しかし、既報 (22) の局所空間を利用した $\gamma\delta$ T 細胞療法を基に考察すると、膀胱内に $\gamma\delta$ T 細胞を輸注し、4 時間排尿を止めることで *in vitro* 系と同様の環境を再現でき、PD-L1 の発現強度に関係なく抗腫瘍効果を発揮することができると思う。本研究は、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、さらに増幅された $\gamma\delta$ 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。本基礎的研究の成果は、新たな免疫療法として $\gamma\delta$ T 細胞を用いたがん免疫療法の臨床応用に貢献できる知見であると思う。

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 薬理学分野 田中智之 教授、同生化学分野 中山祐治 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。

京都府立医科大学 泌尿器科学

清水輝記 先生 (現 京都府立医科大学 泌尿器科学教室 助教)

宮下雅重 先生 (現 京都第二赤十字病院 泌尿器科医長)

佐賀大学医学部附属病院 血液・呼吸器・腫瘍内科

木村晋也 教授

長崎大学 先端創薬イノベーションセンター

田中義正 教授

京都薬科大学 病態生理学分野

河西翔平 博士 (現 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)

黒田絵莉子 博士 (現 金沢医科大学総合医学研究所 細胞医学研究分野 助教)

甘利圭悟 学士

今吉菜月 学士

佐野友亮 学士

杉山雄輝 学士

清水大器 学士

松井透磨 学士

吉澤正人 学士

大村真穂

深見友希

松田凌太郎

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. Nauts, H. C.; Swift, W. E.; Coley, B. L. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Res.* **1946**, 6, 205-216.
2. Burnet, M.; Walter, F. R. S.; Hall, E. Cancer—A Biological Approach: I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *Br. Med. J.* **1957**, 1, 779-786.
3. Yee, C.; Thompson, J. A.; Byrd, D.; Riddell, S. R.; Roche, P.; Celis, E.; Greenberg, P. D. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T Cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: *in vivo* persistence, migration, and antitumor effect of transferred T Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 16168–16173.
4. Verdegaal, E. M. E.; Visser, M.; Ramwadhoebé, T. H.; Van Der Minne, C. E.; Van Steijn, J. A. Q. M. J.; Kapiteijn, E.; Haanen, J. B. A. G.; Van Der Burg, S. H.; Nortier, J. W. R.; Osanto, S. Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T Cells in combination with low-dose interferon-Alpha. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, 60, 953–963.
5. Geller, M. A.; Cooley, S.; Judson, P. L.; Ghebre, R.; Carson, L. F.; Argenta, P. A.; Jonson, A. L.; Panoskaltsis-Mortari, A.; Curtsinger, J.; McKenna, D.; Dusenbery, K.; Bliss, R.; Downs, L. S.; Miller, J. S. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy.* **2011**, 13, 98–107.
6. Yamasaki, K.; Horiguchi, S.; Kurosaki, M.; Kunii, N.; Nagato, K.; Hanaoka, H.; Shimizu, N.; Ueno, N.; Yamamoto, S.; Taniguchi, M.; Motohashi, S.; Nakayama, T.; Okamoto, Y. Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin. Immunol.* **2011**, 138, 255–265.
7. Schreiber, R. D.; Old, L. J.; Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* **2011**, 331, 1565–1570.
8. Iwai, Y.; Hamanishi, J.; Chamoto, K.; Honjo, T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* **2017**, 24, 1–11.
9. Robert, C.; Schachter, J.; Long, G. V.; Arance, A.; Grob, J. J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M. S.; McNeil, C.; Lotem, M.; Larkin, J.; Lorigan, P.; Neyns, B.; Blank, C. U.; Hamid, O.; Mateus, C.; Shapira-Frommer, R.; Kosh, M.; Zhou, H.; Ibrahim, N.; Ebbinghaus, S.; Ribas, A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 372, 2521–2532.
10. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D. R.; Steins, M.; Ready, N. E.; Chow, L. Q.; Vokes, E. E.; Felip, E.; Holgado, E.; Barlesi, F.; Kohlhäufel, M.; Arrieta, O.; Burgio, M. A.; Fayette, J.; Lena, H.; Poddubskaya, E.; Gerber, D. E.; Gettinger, S. N.; Rudin, C. M.; Rizvi, N.; Crinò, L.; Blumenschein, G. R.; Antonia, S. J.; Dorange, C.; Harbison, C. T.; Graf Finckenstein, F.; Brahmer, J. R. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 373, 1627–1639.

11. Gong, J.; Chehrazi-Raffle, A.; Reddi, S.; Salgia, R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J. Immunother. Cancer.* **2018**, *6*, 8.
12. Kruger, S.; Ilmer, M.; Kobold, S.; Cadilha, B. L.; Endres, S.; Ormanns, S.; Schuebbe, G.; Renz, B. W.; D'Haese, J. G.; Schloesser, H.; Heinemann, V.; Subklewe, M.; Boeck, S.; Werner, J.; Von Bergwelt-Baildon, M. Advances in cancer immunotherapy 2019 - latest trends. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 1–11.
13. Morita, C. T.; Jin, C.; Sarikonda, G.; Wang, H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol. Rev.* **2007**, *215*, 59–76.
14. De Libero, G.; Lau, S. Y.; Mori, L. Phosphoantigen presentation to TCR $\gamma\delta$ cells, a conundrum getting less gray zones. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 679.
15. Constant, P.; Davodeau, F.; Peyrat, M. A.; Poquet, Y.; Puzo, G.; Bonneville, M.; Fournié, J. J. Stimulation of Human $\gamma\delta$ T Cells by Nonpeptidic Mycobacterial Ligands. *Science.* **1994**, *264*, 267–270.
16. Tanaka, Y.; Morita, C. T.; Tanaka, Y.; Nieves, E.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature.* **1995**, *375*, 155-158.
17. 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*, 163–168.
18. Kato, Y.; Tanaka, Y.; Tanaka, H.; Yamashita, S.; Minato, N. Requirement of Species-Specific Interactions for the Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells by Pamidronate. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3608–3613.
19. Sato, K.; Kimura, S.; Segawa, H.; Yokota, A.; Matsumoto, S.; Kuroda, J.; Nogawa, M.; Yuasa, T.; Kiyono, Y.; Wada, H.; Maekawa, T. Cytotoxic effects of $\gamma\delta$ T cells expanded *ex vivo* by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int. J. Cancer.* **2005**, *116*, 94–99.
20. 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*, 613-618.
21. Yuasa, T.; Sato, K.; Ashihara, E.; Takeuchi, M.; Maita, S.; Tsuchiya, N.; Habuchi, T.; Maekawa, T.; Kimura, S. Intravesical administration of $\gamma\delta$ T cells successfully prevents the growth of bladder cancer in the murine model. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 493–502.
22. Shimizu, T.; Tomogane, M.; Miyashita, M.; Ukimura, O.; Ashihara, E. Low dose gemcitabine increases the cytotoxicity of human V γ 9V δ 2 T cells in bladder cancer cells *in vitro* and in an orthotopic xenograft model. *Oncimmunology.* **2018**, e1424671.
23. 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, 5481-5487.

24. Kavanagh, K. L.; Guo, K.; Dunford, J. E.; Wu, X.; Knapp, S.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J.; Russell, R. G. G.; Oppermann, U. T The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103, 7829-7834.
25. 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, 2269–2279.
26. Palakodeti, A.; Sandstrom, A.; Sundaresan, L.; Harly, C.; Nedellec, S.; Olive, D.; Scotet, E.; Bonneville, M.; Adams, E. J. The Molecular Basis for Modulation of Human $V\gamma 9V\delta 2$ T Cell Responses by CD277/Butyrophilin-3 (BTN3A)-specific Antibodies. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 32780–32790.
27. Vavassori, S.; Kumar, A.; Wan, G. S.; Ramanjaneyulu, G. S.; Cavallari, M.; El Daker, S.; Beddoe, T.; Theodossis, A.; Williams, N. K.; Gostick, E.; Price, D. A.; Soudamini, D. U.; Voon, K. K.; Olivo, M.; Rossjohn, J.; Mori, L.; De Libero, G. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. *Nat. Immunol.* **2013**, 14, 908-916.
28. Redwan, E. M.; Al-Hejin, A. M.; Almehdar, H. A.; Elsayay, A. M.; Uversky, V. N. Prediction of Disordered Regions and Their Roles in the Anti-Pathogenic and Immunomodulatory Functions of Butyrophilins. *Molecules.* **2018**, 23, 328.
29. 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, 490-500.
30. Wang, H.; Henry, O.; Distefano, M. D.; Wang, Y.-C.; Rääkkönen, 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, 1029-1042.
31. 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, 4583-4594.
32. Kobayashi, H.; Tanaka, Y.; Yagi, J.; Osaka, Y.; Nakazawa, H.; Uchiyama, T.; Minato, N.; Toma, H. Safety profile and anti-tumor effects of adoptive immunotherapy using gamma-delta T cells against advanced renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, 56, 469-476.
33. Bennouna, J.; Bompas, E.; Neidhardt, E. M.; Rolland, F.; Philip, I.; Galéa, C.; Salot, S.; Saiagh, S.; Audrain, M.; Rimbart, M.; Lafaye-de Micheaux, S.; Tiollier, J.; Négrier, S. Phase-I study of Innacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$, an autologous cell-therapy product highly enriched in $\gamma 9\delta 2$ T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, 57, 1599-1609.
34. 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, 473-485.

35. Sato, Y.; Mori, K.; Hirano, K.; Yagi, K.; Kobayashi, Y.; Nagaoka, K.; Hosoi, A.; Matsushita, H.; Kakimi, K.; Seto, Y. Adoptive $\gamma\delta$ T-cell transfer alone or combined with chemotherapy for the treatment of advanced esophageal cancer. *Cytotherapy*. **2021**, *23*, 423-432.
36. Wada, I.; Matsushita, H.; Noji, S.; Mori, K.; Yamashita, H.; Nomura, S.; Shimizu, N.; Seto, Y.; Kakimi, K. Intraperitoneal injection of in vitro expanded V γ 9V δ 2 T cells together with zoledronate for the treatment of malignant ascites due to gastric cancer. *Cancer Med*. **2014**, *3*, 362-375.
37. Abe, Y.; Muto, M.; Nieda, M.; Nakagawa, Y.; Nicol, A.; Kaneko, T.; Goto, S.; Yokokawa, K.; Suzuki, K. Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V γ 9 $\gamma\delta$ T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp. Hematol*. **2009**, *37*, 956-968.
38. Nakajima, J.; Murakawa, T.; Fukami, T.; Goto, S.; Kaneko, T.; Yoshida, Y.; Takamoto, S.; Kakimi, K. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. **2010**, *37*, 1191-1197.
39. Kobayashi, H.; Tanaka, Y.; Yagi, J.; Minato, N.; Tanabe, K. Phase I/II study of adoptive transfer of $\gamma\delta$ T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother*. **2011**, *60*, 1075-1084.
40. Sakamoto, M.; Nakajima, J.; Murakawa, T.; Fukami, T.; Yoshida, Y.; Murayama, T.; Takamoto, S.; Matsushita, H.; Kakimi, K. Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded $\gamma\delta$ Tcells: a phase I clinical study. *J. Immunother*. **2011**, *34*, 202-211.
41. Izumi, T.; Kondo, M.; Takahashi, T.; Fujieda, N.; Kondo, A.; Tamura, N.; Murakawa, T.; Nakajima, J.; Matsushita, H.; Kakimi, K. *Ex vivo* characterization of $\gamma\delta$ T-cell repertoire in patients after adoptive transfer of V γ 9V δ 2 T cells expressing the interleukin-2 receptor β -chain and the common γ -chain. *Cytotherapy*. **2013**, *15*, 481-491.
42. 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 γ 9V δ 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*, e001185.
43. Nicol, A. J.; Tokuyama, H.; Mattarollo, S. R.; Hagi, T.; Suzuki, K.; Yokokawa, K.; Nieda, M. Clinical evaluation of autologous *gamma delta* T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br. J. Cancer*. **2011**, *105*, 778-786.
44. Yamaguchi, Y.; Katata, Y.; Okawaki, M.; Sawaki, A.; Yamamura, M. A Prospective Observational Study of Adoptive Immunotherapy for Cancer Using Zoledronate-Activated Killer (ZAK) Cells – An Analysis for Patients with Incurable Pancreatic Cancer. *Anticancer Res*. **2016**, *36*, 2307-2313.
45. Odaira, K.; Kimura, S. N.; Fujieda, N.; Kobayashi, Y.; Kambara, K.; Takahashi, T.; Izumi, T.; Matsushita, H.; Kakimi, K. CD27⁻CD45⁺ $\gamma\delta$ T cells can be divided into two populations, CD27⁻CD45^{int} and CD27⁻CD45^{hi} with little proliferation potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2016**, *478*, 1298-1303.

46. Fleisch, H.; Russell, R. G. G.; Bisaz, S.; Casey, P. A.; Mühlbauer, R. C. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo. *Calcif. Tissue Res.* **1968**, 2, 10-10a.
47. Fleisch, H.; Russell, R. G. G.; Straumann, F. Effect of Pyrophosphate on Hydroxyapatite and Its Implications in Calcium Homeostasis. *Nature.* **1966**, 212, 901-903.
48. Fleisch, H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res.* **2002**, 4, 30-34.
49. Giger, E. V.; Castagner, B.; Leroux, J. C. Biomedical applications of bisphosphonates *J. Control. Release.* **2013**, 167, 175-188.
50. Dunford, J. E.; Thompson, K.; Coxon, F. P.; Luckman, S. P.; Hahn, F. M.; Poulter, C. D.; Ebetino, F. H.; Rogers, M. J. Structure-Activity Relationships for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase in Vitro and Inhibition of Bone Resorption in Vivo by Nitrogen-Containing Bisphosphonates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, 296, 235-242.
51. Thiébaud, D.; Sauty, A.; Burckhardt, P.; Leuenberger, P.; Sitzler, L.; Green, J. R.; Kandra, A.; Zieschang, J.; Ibarra De Palacios, P. An *In Vitro* and *In Vivo* Study of Cytokines in the Acute-Phase Response Associated with Bisphosphonates. *Calcif. Tissue Int.* **1997**, 61, 386-392.
52. Bukowski, J. F.; Dascher, C. C.; Das, H. Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 328, 746-750.
53. Kunzmann, V.; Bauer, E.; Wilhelm, M. γ/δ T-Cell Stimulation by Pamidronate. *N. Engl. J. Med.* **1999**, 340, 737-738.
54. Kunzmann, V.; Bauer, E.; Feurle, J.; Weißinger, F.; Tony, H.-P.; Wilhelm, M. Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood.* **2000**, 96, 384-392.
55. Yssel, H.; De Vries, J. E.; Koken, M.; Van Blitterswijk, W.; Spits, H. Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J. Immunol. Methods.* **1984**, 72, 219-227.
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, e5657.
57. 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, 1202-1208.
58. Li, H.; Pauza, C. D. Interplay of T-cell receptor and interleukin-2 signalling in V γ 2V δ 2 T-cell cytotoxicity. *Immunology.* **2011**, 132, 96-103.
59. Roelofs, A. J.; Jauhiainen, M.; Mönkkönen, H.; Rogers, M. J.; Mönkkönen, J.; Thompson, K. Peripheral blood monocytes are responsible for $\gamma\delta$ T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br. J. Haematol.* **2009**, 144, 245-250.
60. Madhok, A.; Bhat, S. A.; Philip, C. S.; Sureshbabu, S. K.; Chiplunkar, S.; Galande, S.

- Transcriptome Signature of V γ 9V δ 2 T Cells Treated With Phosphoantigens and Notch Inhibitor Reveals Interplay Between TCR and Notch Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **2021**, 12, 660361.
61. Macián, F.; López-Rodríguez, C.; Rao, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* **2001**, 20, 2476-2489.
 62. 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, 3059-3068.
 63. Castella, B.; Kopecka, J.; Sciancalepore, P.; Mandili, G.; Foglietta, M.; Mitro, N.; Caruso, D.; Novelli, F.; Riganti, C.; Massaia, M. The ATP-binding cassette transporter A1 regulates phosphoantigen release and V γ 9V δ 2 T cell activation by dendritic cells. *Nat. Commun.* **2017**, 8, 1-14.
 64. Laplagne, C.; Ligat, L.; Foote, J.; Lopez, F.; Fournié, J.-J.; Laurent, C.; Valitutti, S.; Poupot, M. Self-activation of V γ 9V δ 2 T cells by exogenous phosphoantigens involves TCR and butyrophilins. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, 18, 1861-1870.
 65. 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, eaay5516.
 66. Karunakaran, M. M.; Willcox, C. R.; Salim, M.; Paletta, D.; Fichtner, A. S.; Noll, A.; Starick, L.; Nöhren, A.; Begley, C. R.; Berwick, K. A.; Chaleil, R. A. G.; Pitard, V.; Déchanet-Merville, J.; Bates, P. A.; Kimmel, B.; Knowles, T. J.; Kunzmann, V.; Walter, L.; Jeeves, M.; Mohammed, F.; Willcox, B. E.; Herrmann, T. Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity.* **2020**, 52, 487-498.e6.
 67. Starick, L.; Riano, F.; Karunakaran, M. M.; Kunzmann, V.; Li, J.; Kreiss, M.; Amslinger, S.; Scotet, E.; Olive, D.; Libero, G. De; Herrmann, T. Butyrophilin 3A (BTN3A, CD277)-specific antibody 20.1 differentially activates V γ 9V δ 2 TCR clonotypes and interferes with phosphoantigen activation. *Eur. J. Immunol.* **2017**, 47, 982-992.
 68. Dang, A. T.; Strietz, J.; Zenobi, A.; Khameneh, H. J.; Brandl, S. M.; Lozza, L.; Conradt, G.; Kaufmann, S. H. E.; Reith, W.; Kwee, I.; Minguet, S.; Chelbi, S. T.; Guarda, G. NLRC5 promotes transcription of BTN3A1-3 genes and V γ 9V δ 2 T cell-mediated killing. *iScience.* **2021**, 24, 101900.
 69. Tanaka, Y.; Murata-Hirai, K.; Iwasaki, M.; Matsumoto, K.; Hayashi, K.; Kumagai, A.; Nada, M. H.; Wang, H.; Kobayashi, H.; Kamitakahara, H.; Okamura, H.; Sugie, T.; Minato, N.; Toi, M.; Morita, C. T. Expansion of human $\gamma\delta$ T cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate prodrug. *Cancer Sci.* **2018**, 109, 587-599.
 70. Ishida, Y.; Agata, Y.; Shibahara, K.; Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **1992**, 11, 3887-3895.

71. Iwai, Y.; Ishida, M.; Tanaka, Y.; Okazaki, T.; Honjo, T.; Minato, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2002**, *99*, 12293-12297.
72. Okazaki, T.; Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* **2007**, *19*, 813-824.
73. Ribas, A.; Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* **2018**, *359*, 1350-1355.
74. Sun, C.; Mezzadra, R.; Schumacher, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* **2018**, *48*, 434-452.
75. Rosenthal, R.; Cadieux, E. L.; Salgado, R.; Al-Bakir, M.; Moore, D. A.; Hiley, C. T.; Lund, T.; Tanić, M.; Reading, J. L.; Joshi, K.; Henry, J. Y.; Ghorani, E.; Wilson, G. A.; Birkbak, N. J.; Jamal-Hanjani, M.; Veeriah, S.; Szallasi, Z.; Loi, S.; Hellmann, M. D.; Feber, A.; Chain, B.; Herrero, J.; Quezada, S. A.; Demeulemeester, J.; Van Loo, P.; Beck, S.; McGranahan, N.; Swanton, C.; Swanton, C.; Jamal-Hanjani, M.; Veeriah, S.; Czyzewska-Khan, J.; Johnson, D.; Laycock, J.; Rosenthal, R.; Gorman, P.; Hynds, R. E.; Wilson, G.; Birkbak, N. J.; Watkins, T. B. K.; McGranahan, N.; Escudero, M.; Stewart, A.; Rowan, A.; Hiley, C.; Abbosh, C.; Goldman, J.; Stone, R. K.; Denner, T.; Ward, S.; Nye, E.; Joshi, K.; Ben Aissa, A.; Wong, Y. N. S.; Georgiou, A.; Quezada, S.; Hartley, J. A.; Lowe, H. L.; Lawrence, D.; Hayward, M.; Panagiotopoulos, N.; Falzon, M.; Borg, E.; Marafioti, T.; Janes, S. M.; Forster, M.; Ahmad, T.; Lee, S. M.; Papadatos-Pastos, D.; Carnell, D.; Mendes, R.; George, J.; Ahmed, A.; Taylor, M.; Choudhary, J.; Summers, Y.; Califano, R.; Taylor, P.; Shah, R.; Krysiak, P.; Rammohan, K.; Fontaine, E.; Booton, R.; Evison, M.; Crosbie, P.; Moss, S.; Joseph, L.; Bishop, P.; Quinn, A. M.; Doran, H.; Leek, A.; Harrison, P.; Moore, K.; Waddington, R.; Novasio, J.; Blackhall, F.; Rogan, J.; Smith, E.; Dive, C.; Tugwood, J.; Brady, G.; Rothwell, D. G.; Pierce, J.; Gulati, S.; Naidu, B.; Langman, G.; Trotter, S.; Bancroft, H.; Kerr, A.; Kadiri, S.; Middleton, G.; Djearaman, M.; Fennell, D.; Shaw, J. A.; Le Quesne, J.; Moore, D. A.; Nakas, A.; Rathinam, S.; Monteiro, W.; Marshall, H.; Nelson, L.; Riley, J.; Primrose, L.; Martinson, L.; Anand, G.; Khan, S.; Nicolson, M.; Kerr, K.; Palmer, S.; Remmen, H.; Miller, J.; Buchan, K.; Chetty, M.; Gomersall, L.; Lester, J.; Morgan, F.; Adams, H.; Davies, H.; Kornaszewska, M.; Attanoos, R.; Lock, S.; MacKenzie, M.; Wilcox, M.; Bell, H.; Hackshaw, A.; Ngai, Y.; Smith, S.; Gower, N.; Ottensmeier, C.; Chee, S.; Johnson, B.; Alzetani, A.; Shaw, E.; Lim, E.; De Sousa, P.; Barbosa, M. T.; Bowman, A.; Jordan, S.; Rice, A.; Raubenheimer, H.; Bhayani, H.; Hamilton, M.; Mensah, N.; Ambrose, L.; Devaraj, A.; Chavan, H.; Nicholson, A. G.; Lau, K.; Sheaff, M.; Schmid, P.; Conibear, J.; Ezhil, V.; Prakash, V.; Russell, P.; Light, T.; Horey, T.; Danson, S.; Bury, J.; Edwards, J.; Hill, J.; Matthews, S.; Kitsanta, Y.; Suvarna, K.; Fisher, P.; Shackcloth, M.; Gosney, J.; Feeney, S.; Asante-Siaw, J.; Ryanna, K.; Dawson, A.; Tuffail, M.; Bajaj, A.; Brozik, J.; Walter, H.; Carey, N.; Price, G.; Gilbert, K.; Webb, J.; Patel, A.; Chaturvedi, A.; Granato, F.; Baker, K.; Carter, M.; Priest, L.; Krebs, M. G.; Lindsay, C.; Gomes, F.; Chemie, F.; George, R.; Patrini, D.; Khirroya, R.; Shaw, P.; Skrzypski, M.; Sunderland, M. W.; Reading, J. L. L.; Beastall, C.; Mangal, N.; Peggs, K.; Lim, E.; Navani, N.;

- Scarci, M.; Ensell, L.; Biswas, D.; Salgado, R.; Razaq, M.; Nicod, J.; Beck, S.; Lopez, S.; Huebner, A.; Dietzen, M.; Mourikis, T.; Adefila-Ideozu, T.; Begum, S.; Klein, H.; Mani, A.; Carvalho, S.; Kaniu, D.; Realingo, C.; Malima, M.; Booth, S.; Lim, L.; Rao, J.; Tenconi, S.; Socci, L.; Kibutu, F.; Agyemang, M.; Young, R.; Blyth, K. G.; Dick, C.; Kirk, A.; Kidd, A. Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature*. **2019**, 567, 479-485.
76. Sharma, P.; Hu-Lieskovan, S.; Wargo, J. A.; Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. **2017**, 168, 707-723.
77. Wang, Q.; Wu, X. Primary and acquired resistance to PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, 46, 210-219.
78. Robert, C.; Ribas, A.; Wolchok, J. D.; Hodi, F. S.; Hamid, O.; Kefford, R.; Weber, J. S.; Joshua, A. M.; Hwu, W. J.; Gangadhar, T. C.; Patnaik, A.; Dronca, R.; Zarour, H.; Joseph, R. W.; Boasberg, P.; Chmielowski, B.; Mateus, C.; Postow, M. A.; Gergich, K.; Ellassaiss-Schaap, J.; Li, X. N.; Iannone, R.; Ebbinghaus, S. W.; Kang, S. P.; Daud, A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. **2014**, 384, 1109-1117.
79. Hui, R.; Gandhi, L.; Costa, E. C.; Felip, E.; Ahn, M.-J.; Eder, J. P.; Balmanoukian, A. S.; Leighl, N. B.; Aggarwal, C.; Horn, L.; Patnaik, A.; Middleton, G. W.; Gubens, M. A.; Hellmann, M. D.; Soria, J.-C.; Ramalingam, S. S.; Lubiniecki, G. M.; Zhang, J.; Piperdi, B.; Garon, E. B. Long-term OS for patients with advanced NSCLC enrolled in the KEYNOTE-001 study of pembrolizumab (pembro). *J. Clin. Oncol.* **2016**, 34, 9026.
80. Balar, A. V.; Castellano, D.; O'Donnell, P. H.; Grivas, P.; Vuky, J.; Powles, T.; Plimack, E. R.; Hahn, N. M.; de Wit, R.; Pang, L.; Savage, M. J.; Perini, R. F.; Keefe, S. M.; Bajorin, D.; Bellmunt, J. First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **2017**, 18, 1483-1492.
81. Sharma, P.; Retz, M.; Siefker-Radtke, A.; Baron, A.; Necchi, A.; Bedke, J.; Plimack, E. R.; Vaena, D.; Grimm, M. O.; Bracarda, S.; Arranz, J. Á.; Pal, S.; Ohyama, C.; Saci, A.; Qu, X.; Lambert, A.; Krishnan, S.; Azrilevich, A.; Galsky, M. D. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, 18, 312-322.
82. Fuchs, C. S.; Doi, T.; Jang, R. W.-J.; Muro, K.; Satoh, T.; Machado, M.; Sun, W.; Jalal, S. I.; Shah, M. A.; Metges, J.-P.; Garrido, M.; Golan, T.; Mandala, M.; Wainberg, Z. A.; Catenacci, D. V. T.; Bang, Y.-J.; Wang, J.; Koshiji, M.; Dalal, R. P.; Yoon, H. H. KEYNOTE-059 cohort 1: Efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *J. Clin. Oncol.* **2017**, 35, 4003.
83. Overman, M. J.; McDermott, R.; Leach, J. L.; Lonardi, S.; Lenz, H. J.; Morse, M. A.; Desai, J.; Hill, A.; Axelson, M.; Moss, R. A.; Goldberg, M. V.; Cao, Z. A.; Ledezne, J. M.; Maglinte, G. A.; Kopetz, S.; André, T. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite

- instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **2017**, 18, 1182-1191.
84. Iwahashi, M.; Katsuda, M.; Nakamori, M.; Nakamura, M.; Naka, T.; Ojima, T.; Iida, T.; Yamaue, H. Vaccination with peptides derived from cancer-testis antigens in combination with CpG-7909 elicits strong specific CD8⁺ T cell response in patients with metastatic esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **2010**, 101, 2510-2517.
 85. Katsuda, M.; Iwahashi, M.; Matsuda, K.; Miyazawa, M.; Nakamori, M.; Nakamura, M.; Ojima, T.; Iida, T.; Hayata, K.; Yamaue, H. Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs. *Int. J. Oncol.* **2011**, 39, 1295-1302.
 86. Maude, S. L.; Laetsch, T. W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M. R.; Stefanski, H. E.; Myers, G. D.; Qayed, M.; De Moerloose, B.; Hiramatsu, H.; Schlis, K.; Davis, K. L.; Martin, P. L.; Nemecek, E. R.; Yanik, G. A.; Peters, C.; Baruchel, A.; Boissel, N.; Mechinaud, F.; Balduzzi, A.; Krueger, J.; June, C. H.; Levine, B. L.; Wood, P.; Taran, T.; Leung, M.; Mueller, K. T.; Zhang, Y.; Sen, K.; Lebwohl, D.; Pulsipher, M. A.; Grupp, S. A. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378, 439-448.
 87. Schuster, S. J.; Bishop, M. R.; Tam, C. S.; Waller, E. K.; Borchmann, P.; McGuirk, J. P.; Jäger, U.; Jaglowski, S.; Andreadis, C.; Westin, J. R.; Fleury, I.; Bachanova, V.; Foley, S. R.; Ho, P. J.; Mielke, S.; Magenau, J. M.; Holte, H.; Pantano, S.; Pacaud, L. B.; Awasthi, R.; Chu, J.; Anak, Ö.; Salles, G.; Maziarz, R. T. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, 380, 45-56.
 88. Shah, N. N.; Fry, T. J. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, 16, 372-385.
 89. Newick, K.; O'Brien, S.; Moon, E.; Albelda, S. M. CAR T Cell Therapy for Solid Tumors. *Annu. Rev. Med.* **2017**, 68, 139-152.
 90. Ikeda, H. T-cell adoptive immunotherapy using tumor-infiltrating T cells and genetically engineered TCR-T cells. *Int. Immunol.* **2016**, 28, 349-353.
 91. Rupp, L. J.; Schumann, K.; Roybal, K. T.; Gate, R. E.; Ye, C. J.; Lim, W. A.; Marson, A. CRISPR/Cas9-Mediated PD-1 Disruption Enhances Anti-Tumor Efficacy of Human Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Sci. Reports.* **2017**, 7, 1-10.
 92. Iwasaki, M.; Tanaka, Y.; Kobayashi, H.; Murata-Hirai, K.; Miyabe, H.; Sugie, T.; Toi, M.; Minato, N. Expression and function of PD-1 in human $\gamma\delta$ T cells that recognize phosphoantigens. *Eur. J. Immunol.* **2011**, 41, 345-355.
 93. Zumwalde, N. A.; Sharma, A.; Xu, X.; Ma, S.; Schneider, C. L.; Romero-Masters, J. C.; Hudson, A. W.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Kenney, S. C.; Gumperz, J. E. Adoptively transferred V γ 9V δ 2 T cells show potent antitumor effects in a preclinical B cell lymphomagenesis model. *JCI. insight.* **2017**, 2, e93179.
 94. Nada, M. H.; Wang, H.; Hussein, A. J.; Tanaka, Y.; Morita, C. T. PD-1 checkpoint blockade enhances

- adoptive immunotherapy by human V γ 2V δ 2 T cells against human prostate cancer. *Oncoimmunology*. **2021**, 10, 1989789.
95. Hsu, H.; Boudova, S.; Mvula, G.; Divala, T. H.; Mungwira, R. G.; Harman, C.; Laufer, M. K.; Pauza, C. D.; Cairo, C. Prolonged PD1 Expression on Neonatal V δ 2 Lymphocytes Dampens Proinflammatory Responses: Role of Epigenetic Regulation. *J. Immunol.* **2016**, 197, 1884-1892.
 96. Hsu, H.; Boudova, S.; Mvula, G.; Divala, T. H.; Rach, D.; Mungwira, R. G.; Boldrin, F.; Degiacomi, G.; Manganelli, R.; Laufer, M. K.; Cairo, C. Age-related changes in PD-1 expression coincide with increased cytotoxic potential in V δ 2 T cells during infancy. *Cell Immunol.* **2021**, 359, 104244.
 97. Blank, C.; Gajewski, T. F.; Mackensen, A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunotherapy*. **2005**, 307-314.
 98. Blank, C.; Mackensen, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, 56, 739-745.
 99. Versteven, M.; Bergh, J. M. J. Van den; Broos, K.; Fujiki, F.; Campillo-Davo, D.; Reu, H. De; Morimoto, S.; Lecocq, Q.; Keyaerts, M.; Berneman, Z.; Sugiyama, H.; Tendeloo, V. F. I. Van; Breckpot, K.; Lion, E.; Versteven, M.; Van den Bergh, J. M. J.; Broos, K.; Fujiki, F.; Campillo-Davo, D.; De Reu, H.; Morimoto, S.; Lecocq, Q.; Keyaerts, M.; Berneman, Z.; Sugiyama, H.; Van Tendeloo, V. F. I.; Breckpot, K.; Lion, E. A Versatile T Cell-Based Assay to Assess Therapeutic Antigen-Specific PD-1-Targeted Approaches. *Oncotarget*. **2018**, 9, 27797-27808.
 100. Liu, Y.; Cheng, Y.; Xu, Y.; Wang, Z.; Du, X.; Li, C.; Peng, J.; Gao, L.; Liang, X.; Ma, C. Increased Expression of Programmed Cell Death Protein 1 on NK Cells Inhibits NK-Cell-Mediated Anti-Tumor Function and Indicates Poor Prognosis in Digestive Cancers. *Oncogene*. **2017**, 36, 6143-6153.
 101. Tokuyama, H.; Hagi, T.; Mattarollo, S. R.; Morley, J.; Wang, Q.; So, H.-F.; Fai-So, H.; Moriyasu, F.; Nieda, M.; Nicol, A. J. V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs—Rituximab and trastuzumab. *Int. J. Cancer*. **2008**, 122, 2526-2534.
 102. Gertner-Dardenne, J.; Bonnafous, C.; Bezombes, C.; Capietto, A.-H.; Scaglione, V.; Ingoure, S.; Cendron, D.; Gross, E.; Lepage, J.-F.; Quillet-Mary, A.; Ysebaert, L.; Laurent, G.; Sicard, H.; Fournié, J.-J. Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. *Blood*. **2009**, 113, 4875-4884.
 103. Seidel, U. J. E.; Vogt, F.; Grosse-Hovest, L.; Jung, G.; Handgretinger, R.; Lang, P. $\gamma\delta$ T cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity with CD19 antibodies assessed by an impedance-based label-free real-time cytotoxicity assay. *Front. Immunol.* **2014**, 5, 618.
 104. Grenga, I.; Donahue, R. N.; Lepone, L. M.; Richards, J.; Schlom, J. A fully human IgG1 anti-PD-L1 MAb in an in vitro assay enhances antigen-specific T-cell responses. *Clin. Transl. Immunol.* **2016**, 5, e83.
 105. Juliá, E. P.; Amante, A.; Pampeña, M. B.; Mordoh, J.; Levy, E. M. Avelumab, an IgG1 anti-PD-L1

- Immune Checkpoint Inhibitor, Triggers NK Cell-Mediated Cytotoxicity and Cytokine Production Against Triple Negative Breast Cancer Cells. *Front. Immunol.* **2018**, 9, 2140.
106. Chen, Z.; Freedman, M. S. CD16⁺ $\gamma\delta$ T cells mediate antibody dependent cellular cytotoxicity: Potential mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **2008**, 128, 219-227.
107. Saito, H.; Kranz, D. M.; Takagaki, Y.; Hayday, A. C.; Eisen, H. N.; Tonegawa, S. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature.* **1984**, 309, 757-762.
108. Brenner, M. B.; McLean, J.; Dialynas, D. P.; Strominger, J. L.; Smith, J. A.; Owen, F. L.; Seidman, J. G.; Ip, S.; Rosen, F.; Krangel, M. S. Identification of a Putative Second T-Cell Receptor. *Nature.* **1986**, 322, 145-149.
109. Chien, Y. H.; Iwashima, M.; Kaplan, K. B.; Elliott, J. F.; Davis, M. M. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature.* **1987**, 327, 677-682.
110. Tanaka, Y.; Sano, S.; Nieves, E.; De Libero, G.; Rosa, D.; Modlin, R. L.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R.; Morita, C. T. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1994**, 91, 8175-8179.
111. E. Dunford, J. Molecular Targets of the Nitrogen Containing Bisphosphonates: The Molecular Pharmacology of Prenyl Synthase Inhibition. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 2961-2969.
112. Garcia-Diaz, A.; Shin, D. S.; Moreno, B. H.; Saco, J.; Escuin-Ordinas, H.; Rodriguez, G. A.; Zaretsky, J. M.; Sun, L.; Hugo, W.; Wang, X.; Parisi, G.; Saus, C. P.; Torrejon, D. Y.; Graeber, T. G.; Comin-Anduix, B.; Hu-Lieskovan, S.; Damoiseaux, R.; Lo, R. S.; Ribas, A. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* **2017**, 19, 1189-1201.
113. Abiko, K.; Matsumura, N.; Hamanishi, J.; Horikawa, N.; Murakami, R.; Yamaguchi, K.; Yoshioka, Y.; Baba, T.; Konishi, I.; Mandai, M. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br. J. Cancer.* **2015**, 112, 1501-1509.
114. Chen, S.; Crabill, G. A.; Pritchard, T. S.; McMiller, T. L.; Wei, P.; Pardoll, D. M.; Pan, F.; Topalian, S. L. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J. Immunother. Cancer.* **2019**, 7, 1-12.

Supplementary information

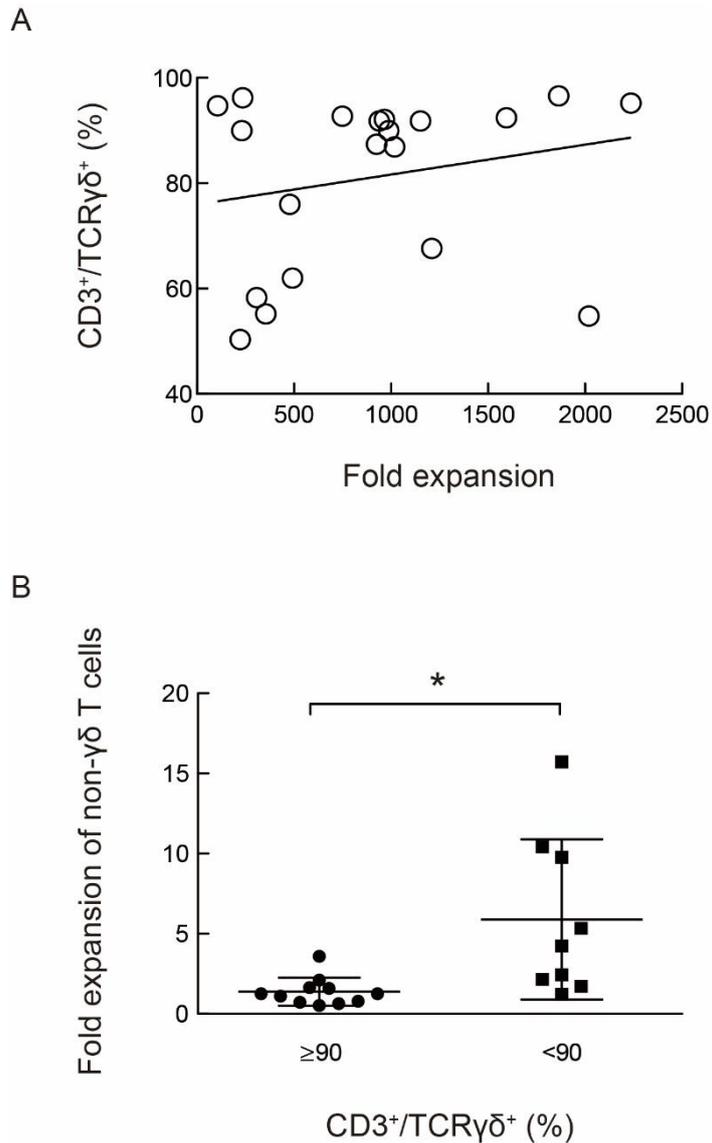
$\gamma\delta$ T 細胞療法の開発に向けた増幅効率予測因子の探索および
抗腫瘍効果における PD-1/PD-L1 経路の影響

2021 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

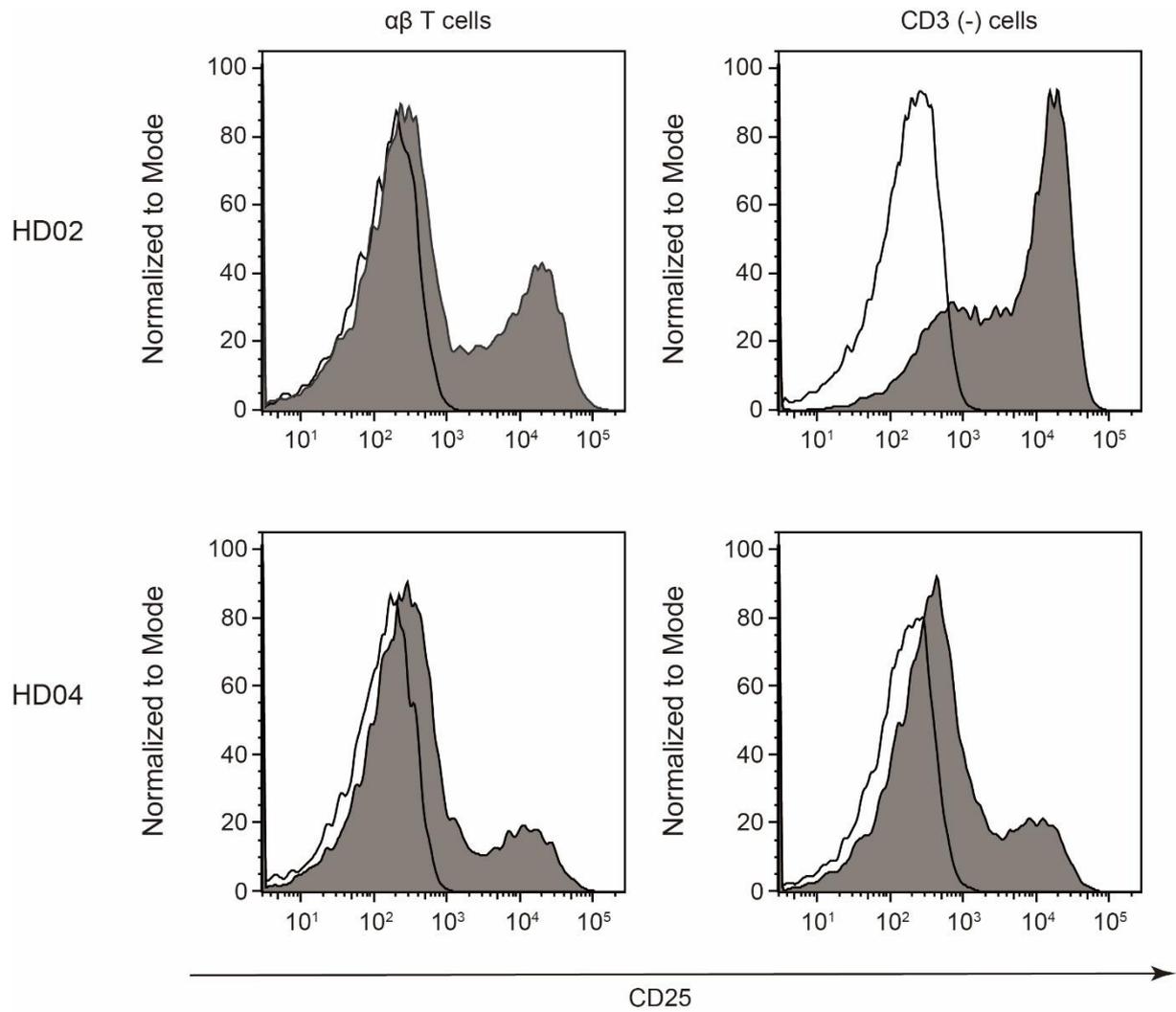
【薬学】病態生理学分野

友金 眞光



Supplementary Figure 1. $\gamma\delta$ T cell expansion was independent of the percentage of $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ on Day 11.

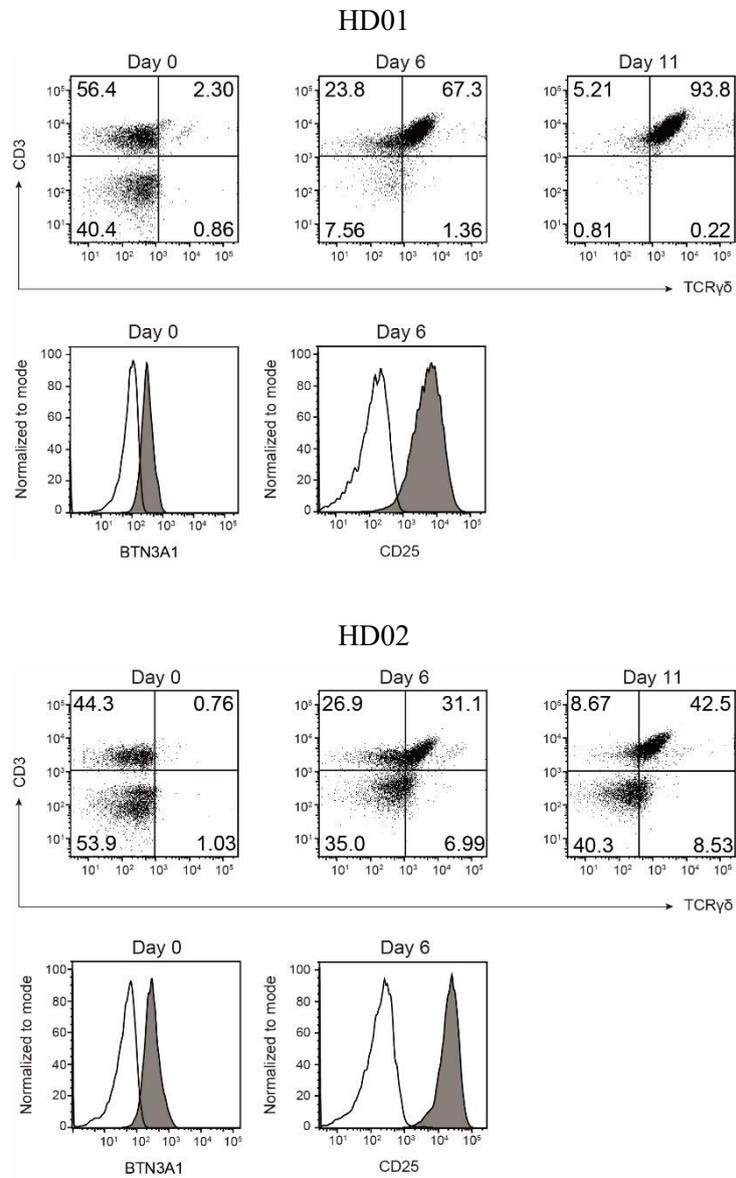
(A) Correlation between fold expansion of $\gamma\delta$ T cells and the percentage of $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ cells on Day 11 from 20 healthy donors: $r=0.22$, $R^2=0.048$, $p=0.35$. (B) Comparison of non- $\gamma\delta$ T cell expansion when the percentage of $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ cells is above 90% and below 90%. Statistical significance of differences was determined using unpaired t test with Welch's correction ($*p < 0.05$ vs. ≥ 90 of $CD3^+/TCR\gamma\delta^+$ (%)).



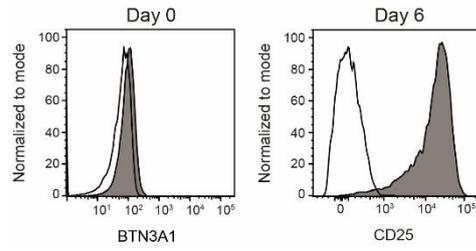
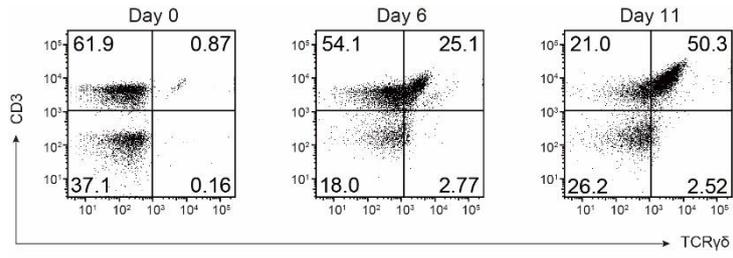
Supplementary Figure 2. Expression of CD25 on $\alpha\beta$ T cells and CD3⁻ cells.

Flow cytometry analysis of PBMCs derived from HD02 and HD04 to detect expression of CD25 by $\alpha\beta$ T cell and CD3⁻ cell population on Day 6.

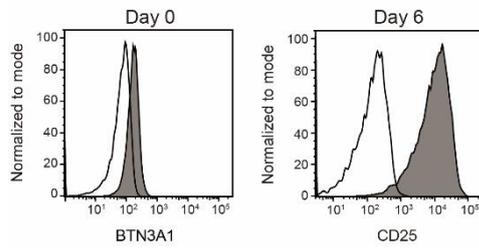
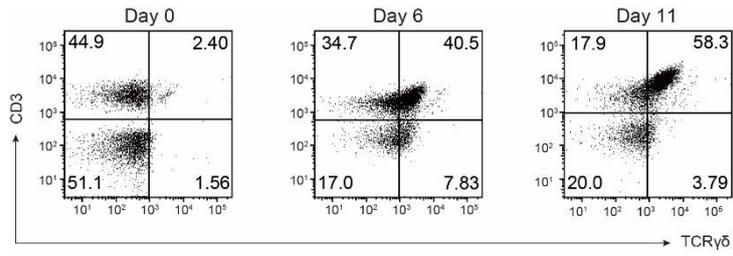
各健常人末梢血液より得られた $\gamma\delta$ T 細胞におけるフローサイトメトリーのデータ（培養 0、6、11 日目での CD3/TCR $\gamma\delta$ dotplot、培養 0 日目の単球に発現する BTN3A1、培養 6 日目の $\gamma\delta$ T 細胞に発現する CD25）は以下の通りである。



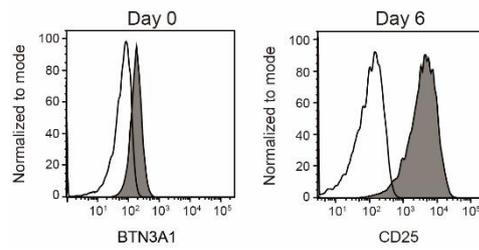
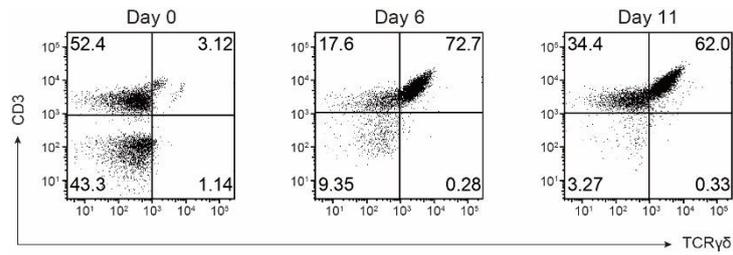
HD03



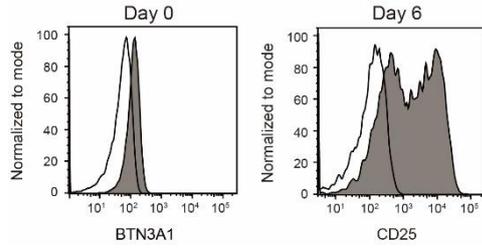
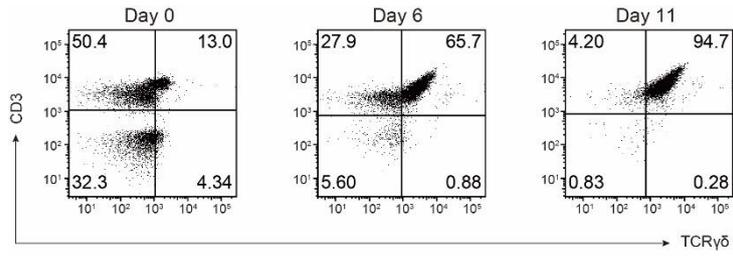
HD04



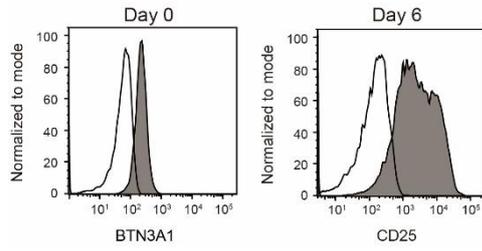
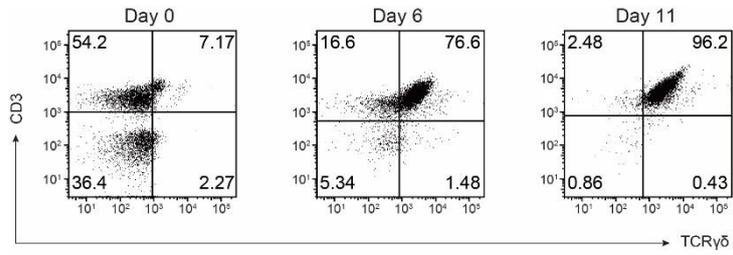
HD05



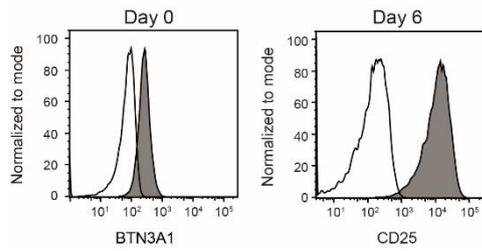
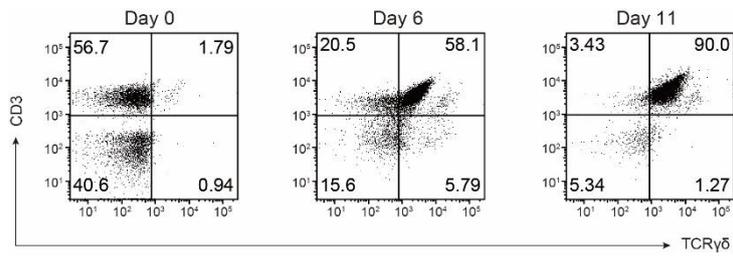
HD06



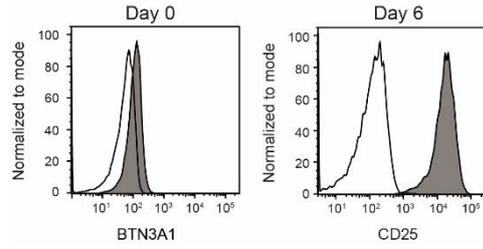
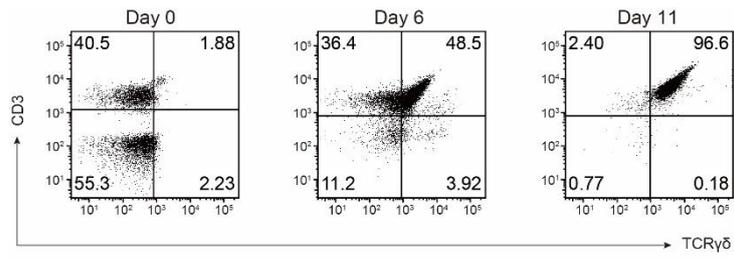
HD07



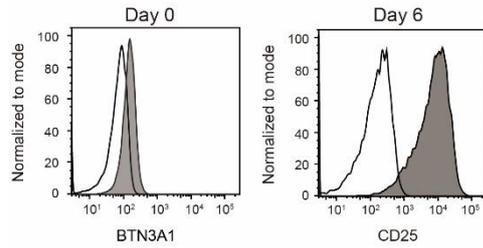
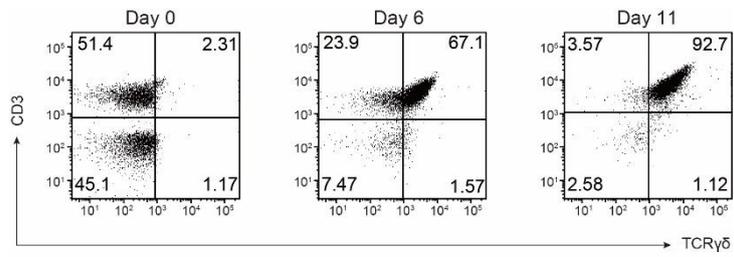
HD08



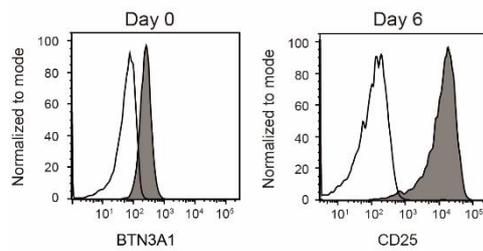
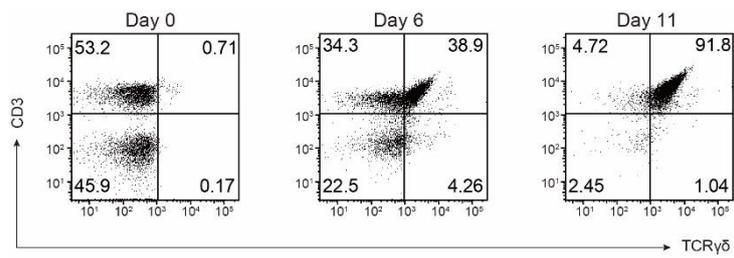
HD09



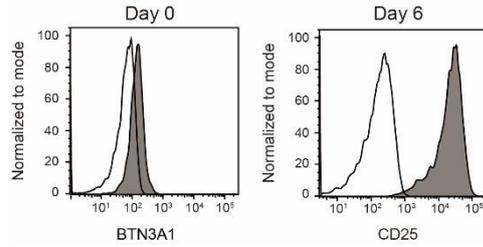
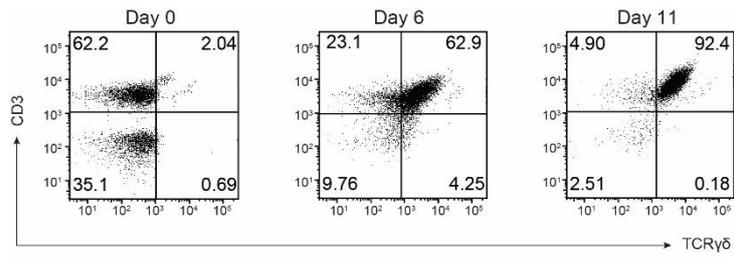
HD10



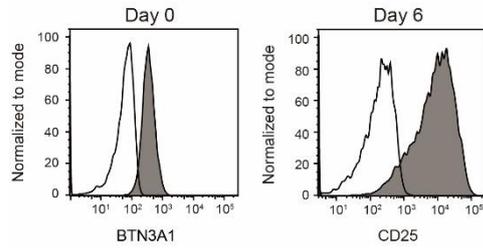
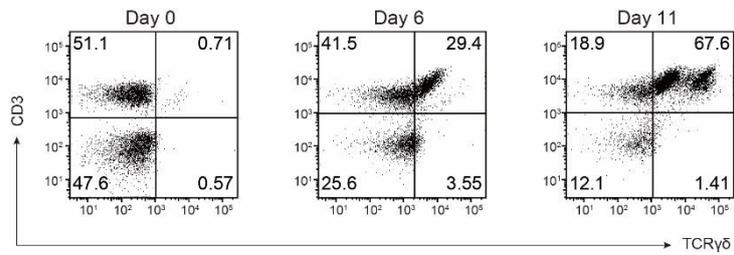
HD11



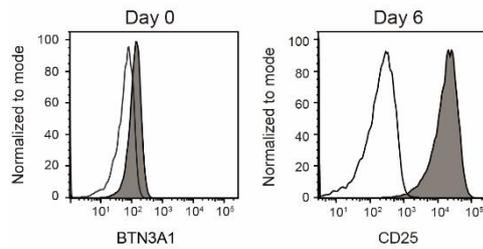
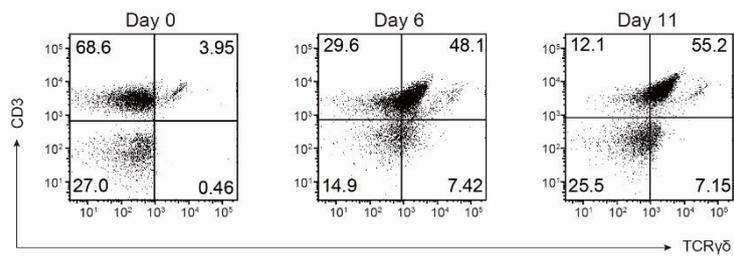
HD12



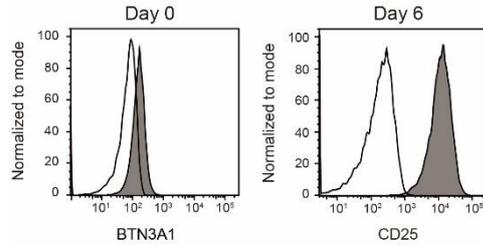
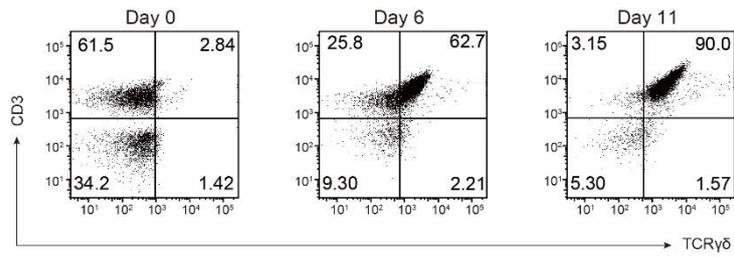
HD13



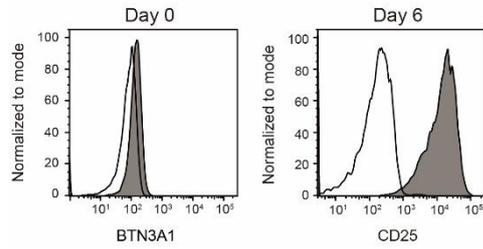
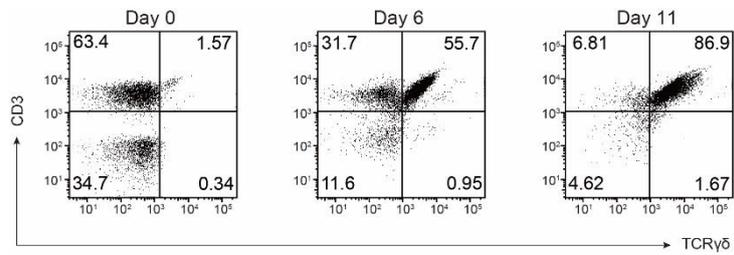
HD14



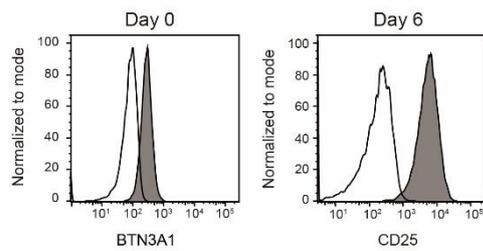
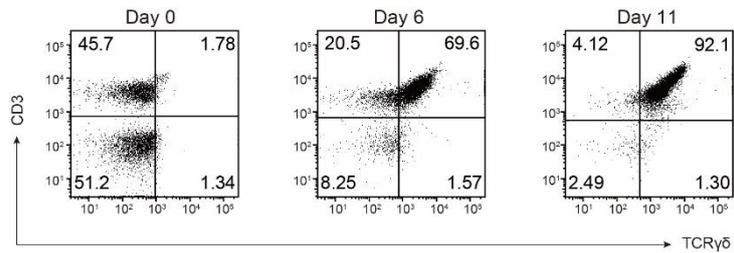
HD15



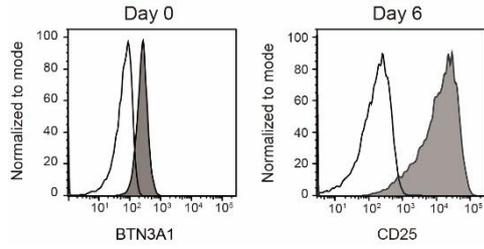
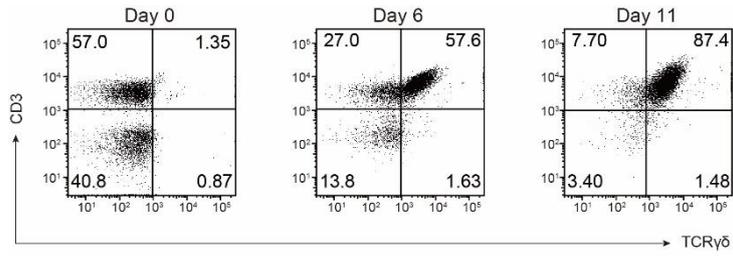
HD16



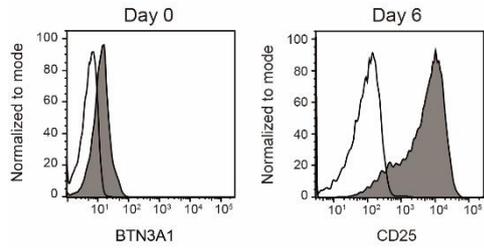
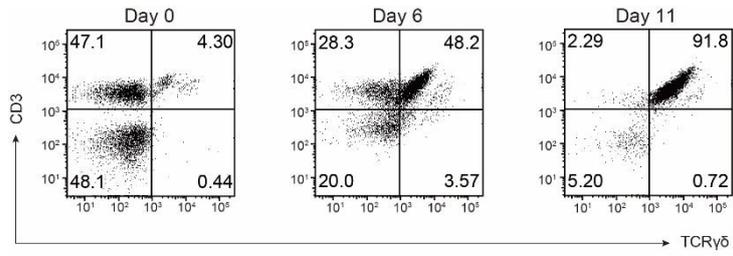
HD17



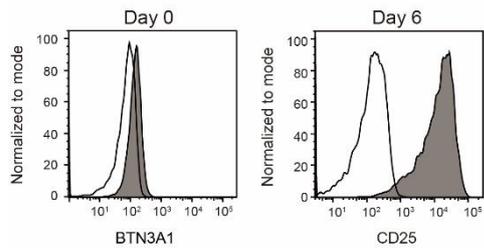
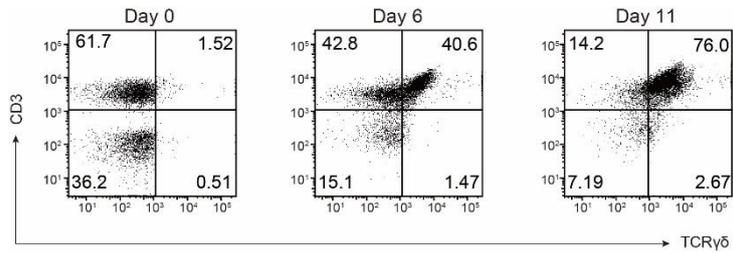
HD18



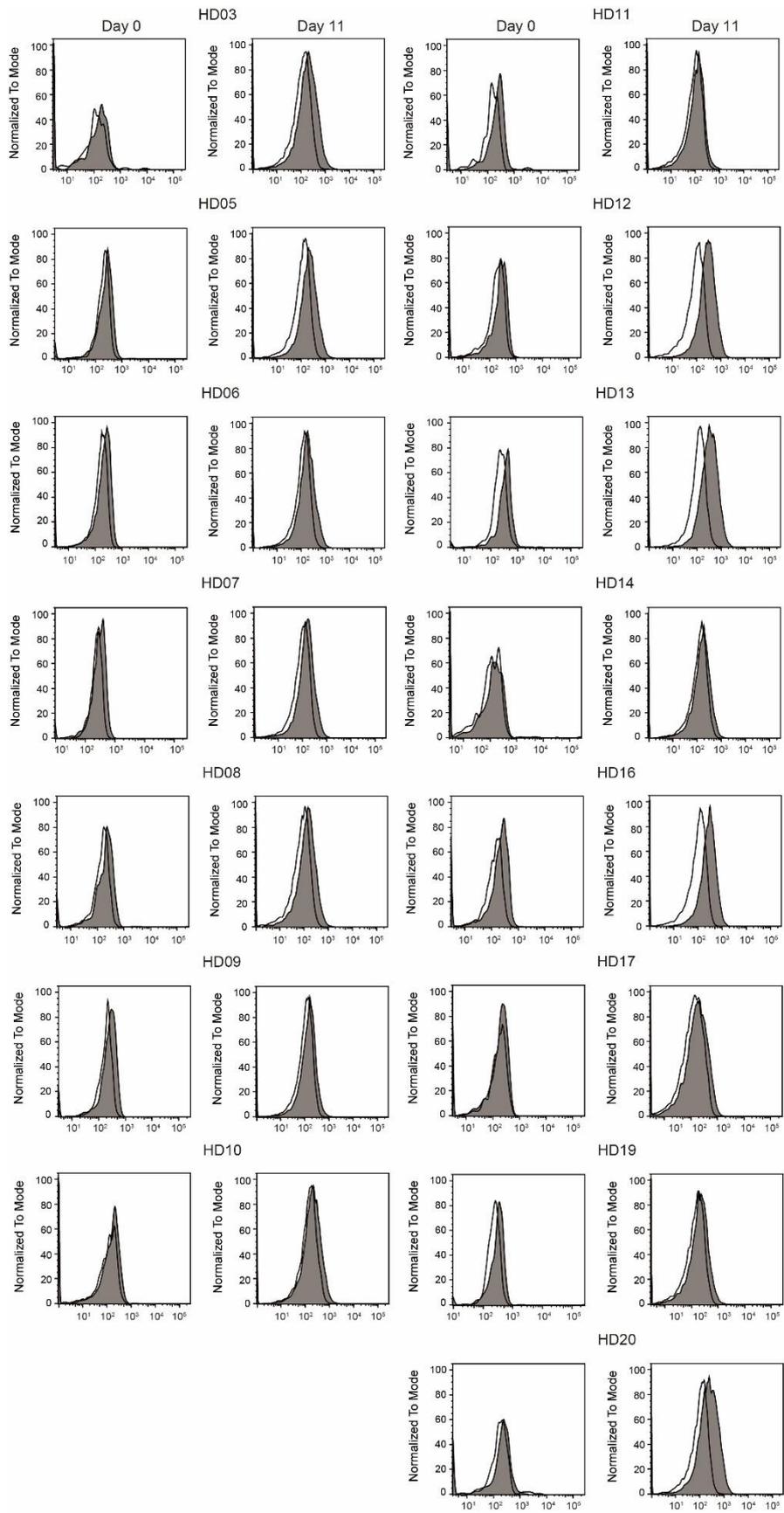
HD19



HD20



各健常人末梢血液より得られた $\gamma\delta$ T 細胞における PD-1 の発現に関するフローサイトメトリーのデータは以下の通りである。



→ PD-1