



|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | ゾレドロン酸により活性化させた $\gamma\delta$ T細胞の抗原提示能に関する検討 [論文内容及び審査の要旨]                                                              |
| Author(s)           | 武藤, 真人                                                                                                                    |
| Description         | 配架番号 : 1689                                                                                                               |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                                    |
| Dissertation Number | 乙第6980号                                                                                                                   |
| Issue Date          | 2016-03-24                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/61735">https://hdl.handle.net/2115/61735</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Masato_Muto_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                         |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 武 藤 真 人

### 学 位 論 文 題 名

ゾレドロン酸により活性化させた  $\gamma\delta$  T 細胞の抗原提示能に関する検討  
(Studies on antigen-presenting capacity of human  $\gamma\delta$  T cells activated by zoledronate)

#### 【背景と目的】

ヒトの  $\gamma\delta$  T 細胞は、皮膚や粘膜に多く存在する V $\delta$ 1 型と末梢血単核球中の 1-10% を占める V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 型  $\gamma\delta$  T 細胞に大別される。 $\alpha\beta$  T 細胞が抗原提示分子である MHC 分子に結合したペプチドを認識するのに対して、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 型  $\gamma\delta$  T 細胞は MHC 非拘束性に Phosphoantigen と呼ばれる非ペプチド抗原を認識する。Phosphoantigen としてはマイコプラズマなどの細菌由来のピロリン酸モノエステル (IPP 等)、アルキルアミンなどが知られている。また、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 型  $\gamma\delta$  T 細胞は骨粗しょう症の治療薬のひとつであるビスフォスフォネート製剤（ゾレドロン酸等）で活性化し、増殖することが可能である。さらに増殖した  $\gamma\delta$  T 細胞は様々な種類のがん細胞株に対して細胞傷害活性を示すことが報告されている。そのため  $\gamma\delta$  T 細胞は、がんに対する免疫細胞療法におけるエフェクター細胞として有用であると考えられており、数多くの臨床研究が行われてきた。

近年、活性化した  $\gamma\delta$  T 細胞が抗原提示能を有することが報告された。しかしながら、 $\gamma\delta$  T 細胞が抗原提示能を獲得するための分子メカニズムは不明である。また、 $\alpha\beta$  T 細胞も活性化により抗原提示細胞関連マーカーを発現し、抗原提示能を示すことが報告されている。一方で、これら T 細胞の抗原提示能に関わる部分の違いは知られていない。そこで本研究ではこれらの違いを検討し、 $\gamma\delta$  T 細胞が抗原提示能を獲得するための分子的特徴を見出すことを目的として検討を行った。

#### 【材料と方法】

本研究で使用したヒト検体は、所属機関の倫理委員会において承認された内容に従い同意を得た健康人より採取したものである。抗原提示細胞としての  $\gamma\delta$  T 細胞と  $\alpha\beta$  T 細胞は、末梢血単核球よりそれぞれゾレドロン酸または固相化した抗 CD3 抗体により刺激し、IL-2 存在下で活性化させたものを使用した。活性化による抗原提示細胞関連マーカーの発現をフローサイトメトリー、RT-PCR にて解析した。また、モデル抗原タンパクとして ovalbumin を使用して、その取り込みをフローサイトメトリー、共焦点顕微鏡により観察した。抗原提示能を評価するための腫瘍抗原としてメラノーマ関連抗原である Mart-1 peptide (A27L)、および Mart-1 を発現しているがん細胞株等を使用した。抗原提示細胞は、Responder となる CD3<sup>+</sup>T 細胞との共培養前に放射線照射を行った。共培養後の A27L 抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合を Tetramer assay により検討した。抗原提示細胞関連マーカーの発現が、どのシグナル経路に制御されているかを検討するために MAPK 経路 (ERK1/2, p38 MAP kinase) と NF- $\kappa$ B 経路 (IKK) の阻害剤を使用し、IPP 刺激による抗原提示細胞関連マーカーの発現阻害効果をフローサイトメトリー、ウエスタンブロットにより解析した。また、活性化前後の  $\gamma\delta$  T 細胞と  $\alpha\beta$  T 細胞におけるミエロイド系転写因子の発現を RT-PCR にて比較した。

#### 【結果と考察】

本研究では活性化させた  $\gamma\delta$  T 細胞と  $\alpha\beta$  T 細胞の抗原提示能の比較および  $\gamma\delta$  T 細胞の抗原提示能の獲得のための分子メカニズムについて検証した。まず、抗原提示能に関わる分子として MHC Class II と CD80/CD86 を測定した。両細胞ともに活性化前ではこれら分子の発現は確認できなかったが、活性化後に発現が確認された。特に MHC Class II の発現レベルにおいて、 $\gamma\delta$  T 細胞の方が  $\alpha\beta$  T 細胞よりも高い傾向があった。また、接着分子 (CD54,

CD11a, CD11b, CD11c) では、活性化前の CD54 発現率のみで  $\gamma\delta$  T 細胞の方が高い傾向が確認された。一方で、いずれの分子も活性化により発現レベルが上昇する傾向があるものの、 $\gamma\delta$  T 細胞と  $\alpha\beta$  T 細胞で大きな違いは確認されなかった。これらの結果から両細胞ともに活性化することにより抗原提示能に関わる分子を発現することが明らかとなった。

次に抗原の取り込みに関与する分子において、 $\gamma\delta$  T 細胞では、活性化前よりスカベンジャーレセプターのひとつである CD36 の発現を認め、活性化により発現が上昇することが確認された。一方、 $\alpha\beta$  T 細胞では CD36 の発現は僅かに確認される程度であり、活性化による発現の上昇は確認されなかった。CD36 は未成熟 DC やマクロファージにおいてアポトーシス細胞の取り込みに関与していると報告されている。抗原タンパクの取り込み能を評価した結果、活性化させた  $\gamma\delta$  T 細胞では細胞内に抗原タンパクを貪食しているのに対して、 $\alpha\beta$  T 細胞ではほとんど確認されなかった。

実際の抗原提示能を評価した結果、A27L ペプチドを使用した場合は両細胞ともに抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞の誘導が可能であった。一方で、 $\gamma\delta$  T 細胞でのみ生きた Mart-1 陽性がん細胞株との共培養により、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導させることが可能であった。使用したがん細胞株への細胞傷害活性を比較したところ、 $\gamma\delta$  T 細胞の方が強い細胞傷害活性を有していることが確認された。そのため  $\gamma\delta$  T 細胞はがん細胞を傷害し、その細胞片を CD36 を介して取り込むことで、抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞を誘導している可能性が考えられた。

最後に  $\gamma\delta$  T 細胞の活性化による抗原提示能に関わる分子の発現が、どのシグナル経路に制御されているかを検討したところ、MAPK 経路や NF- $\kappa$ B 経路により制御されている可能性が示唆された。特に CD36 の発現上昇において優位な傾向が認められた。また、ミエロイド系の転写因子の発現比較を行った。その結果、活性化前の  $\gamma\delta$  T 細胞で CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ) の発現レベルが高いことが確認された。C/EBP  $\alpha$  のリン酸化は、MAPK 経路である p38 や Erk1/2 によって制御されているという報告がある。また、CD36 の調節領域にはエンハンサーである CCAAT-box が存在することから、C/EBP  $\alpha$  によって CD36 の発現が制御されていることが知られている。これらの結果および報告から、 $\gamma\delta$  T 細胞の抗原提示能の誘導には C/EBP  $\alpha$  が高いレベルで発現していることが重要であると示唆された。

## 【結論】

$\gamma\delta$  T 細胞の抗原提示能には、静止期な状況下において C/EBP  $\alpha$  が高発現していることが重要である。初めに、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR からの刺激で C/EBP  $\alpha$  のリン酸化に重要な p38 や Erk1/2 などの MAPK カスケードが活性化する。それにより C/EBP  $\alpha$  のリン酸化が起こることで CD36 の発現が上昇し、抗原の取り込みが起こる。 $\gamma\delta$  T 細胞は、取り込んだ抗原をプロセッシングし、CD8<sup>+</sup>T 細胞に対し共刺激分子とともにクロスプレゼンテーションを行う。

本研究により得られた  $\gamma\delta$  T 細胞の抗原提示能に関するメカニズムの知見は、がんに対する免疫応答への理解を深め、今後新しい治療法の開発につながることを期待される。