



Title	ゾレドロン酸により活性化させた γ δ T細胞の抗原提示能に関する検討
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6980
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62743
Type	doctoral thesis
File Information	Masato_Muto.pdf



学位論文

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)

2016 年 3 月

北海道大学

武藤 真人

学位論文

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)

2016 年 3 月

北海道大学

武藤 真人

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	12 頁
考察	24 頁
総括および結論	26 頁
謝辞	27 頁
引用文献	28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Masato Muto, Muhammad Baghdadi, Ryuji Maekawa, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino
Myeloid molecular characteristics of human $\gamma\delta$ T cells support their acquisition of tumor antigen-presenting capacity
Cancer Immunology, Immunotherapy. 64(8), 941-949. (2015)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 武藤真人, 富山舞, 贅田美江, 前川隆司, 香城諭, 和田はるか, 清野研一郎
Zoledronate 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
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 2 日-4 日・大阪
2. Muto Masato, Maekawa Ryuji, Kamijuku Hajime, Kojo Satoshi, Wada Haruka, Seino Ken-ichiro
Antigen-presenting capacity of human $\gamma\delta$ T cells activated by Zoledronate
第 14 回国際免疫学会議 2010 年 8 月 22-27 日・神戸
3. Muto Masato, Maekawa Ryuji, Kojo Satoshi, Wada Haruka, Seino Ken-ichiro
Differential acquisition of antigen-presenting capacity in human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells
第 11 回日本免疫治療学研究会 2014 年 2 月 22 日・東京

緒言

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。末梢に存在するほとんどのT細胞は $\alpha\beta$ T細胞であり、 $\alpha\beta$ TCRによりMajor histocompatibility complex (MHC) 分子に結合したペプチドを認識し、様々な免疫応答を引き起こす。一方、ヒトの $\gamma\delta$ T細胞では、皮膚や粘膜に多く存在するV δ 1型と末梢血に存在するV δ 2型 $\gamma\delta$ T細胞に大別される。特に末梢血単核球の1-10%を占めるV δ 2型は主にV γ 9と構成されており、高度に多様性が制限されている¹。V γ 9V δ 2型 $\gamma\delta$ T細胞による抗原認識はMHC非拘束性であり、Phosphoantigenと呼ばれる非ペプチド性パターン抗原を認識するという特徴がある。興味深いことに、この抗原の選択性はヒトおよび霊長類に特有であり、マウスの $\gamma\delta$ T細胞では反応を示さない。Phosphoantigenとしては病原性細菌や原生生物由来のピロリン酸モノエステル類やアルキルアミン類が知られている。これらの化合物は共通して細菌由来の非メバロン酸経路や真核細胞でのメバロン酸経路によるIsopentenyl pyrophosphate (IPP) またはその中間代謝物に関連している²。また、V γ 9V δ 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で活性化し、増殖することが可能である³⁻⁵。IPPが直接 $\gamma\delta$ TCRを活性化するのに対して、ビスフォスフォネート製剤ではAntigen-presenting cell (APC) の存在が重要であることが知られている (Fig.1)⁶⁻⁷。

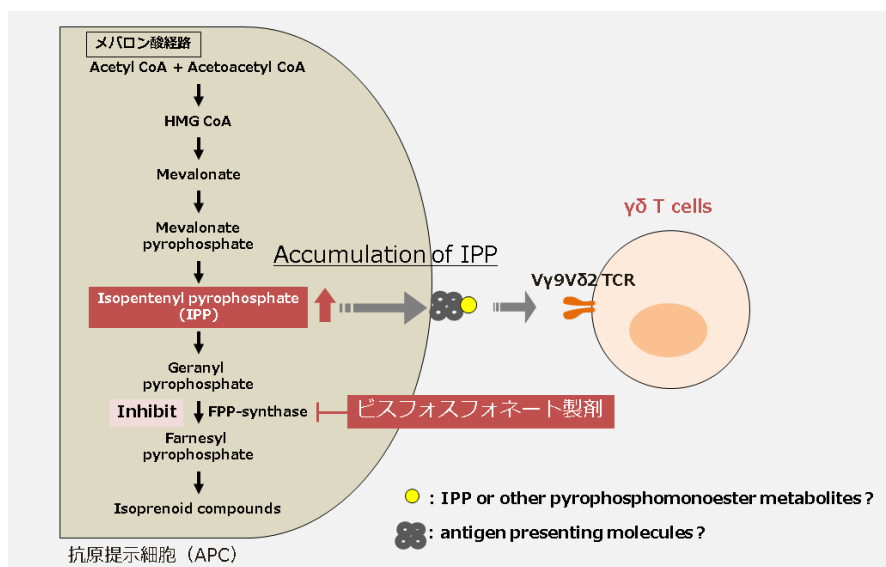


Figure.1 ビスフォスフォネート製剤による $\gamma\delta$ T細胞の活性化メカニズム

ビスフォスフォネート製剤が APC に取り込まれ、メバロン酸代謝経路の Farnesyl pyrophosphate (FPP) synthase を阻害し、IPP のようなメバロン酸経路の中間代謝物を蓄積させることで、間接的に $\gamma\delta$ T 細胞を活性化させることが知られている。

活性化した $\gamma\delta$ T 細胞によるがん細胞の認識機構を示した (Fig.2)。変異型 p53 を持つがん細胞では、メバロン酸経路が活性化していることが知られており⁸、その中間代謝物である IPP 等の Phosphoantigen が蓄積している。 $\gamma\delta$ T 細胞は、その Phosphoantigen を $\gamma\delta$ TCR で認識することでがん細胞を認識する。 $\gamma\delta$ TCR を介した認識以外にも様々な分子によりがん細胞を認識し、細胞傷害活性を示すことが報告されている⁹⁻¹⁶。この $\gamma\delta$ T 細胞によるがんに対する細胞傷害活性を期待し、数多くの臨床研究が行われてきた¹⁷⁻¹⁹。既に筆者等はビスフォスフォネート製剤のひとつであるゾレドロン酸を使用した $\gamma\delta$ T 細胞の特異的培養法を確立し、多発性骨髄腫に対する $\gamma\delta$ T 細胞療法を用いた臨床研究の報告を行った²²。

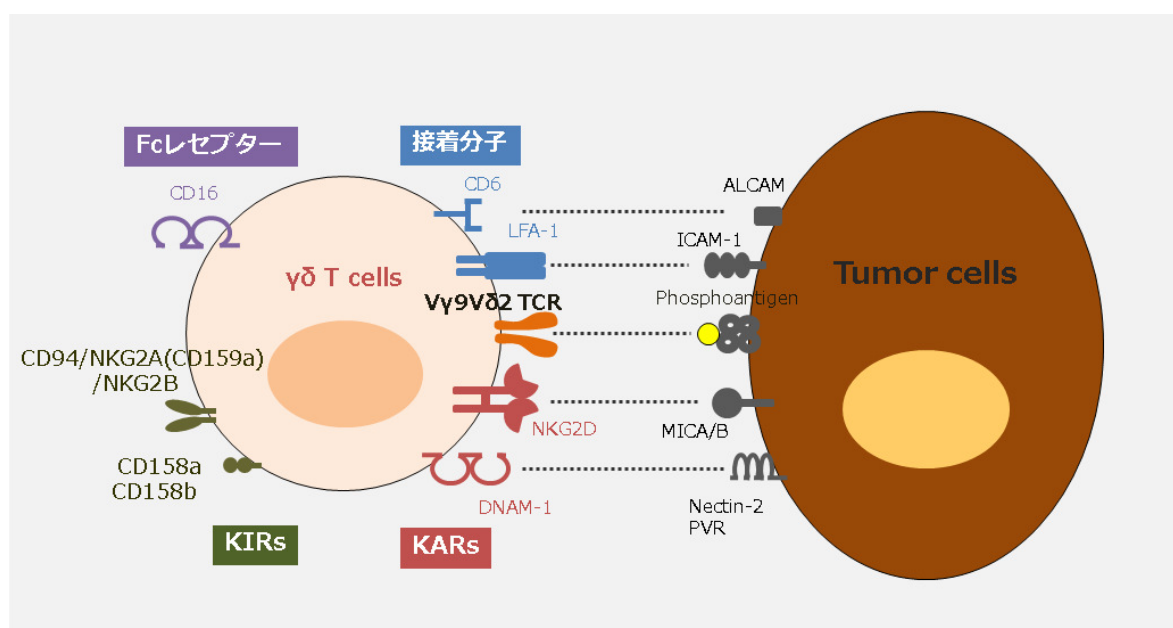


Figure.2 $\gamma\delta$ T 細胞によるがん細胞の認識機構

$\gamma\delta$ T 細胞は、活性型 Natural killer (NK) レセプターである Killer-activating receptors (KARs) に分類される Natural-killer group 2, member D (NKG2D)⁹⁻¹¹ や DNAM-1¹² を発現している。それぞれストレスを受けた細胞に発現する MHC class I chain-related gene A and B (MICA/B) や Nectin-2/ Poliovirus receptor (PVR) を認識する。一方で、抑制型 NK レセプターである Killer-inhibitory receptors (KIRs) も発現していることが知られており、NK 細胞と同様にそのバランスが重要であ

ると考えられている¹³。また、Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)¹⁴やCD6¹⁵などの接着分子もそれぞれ Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) と結合することで、がん細胞の認識や細胞傷害活性に強く関与している。さらに、 $\gamma\delta$ T 細胞は Fc レセプターである CD16 を発現していることが知られ¹⁶, 抗体医薬品との併用による Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) 活性を有することが報告されている。

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²³。既に IPP やゾレドロン酸で活性化することで $\gamma\delta$ T 細胞が貪食能を獲得し²⁴⁻²⁶, 抗原を Cluster of differentiation (CD) 8⁺T 細胞へクロスプレゼンテーションすることが報告されている^{27,28}。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 APC 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^{29,30}。一方で、これら T 細胞の APC 関連マーカーの獲得や機能における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。

始めに $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の APC 関連マーカーの比較を行った。その結果、両細胞ともに活性化することで MHC Class II 分子や共刺激分子である CD80 や CD86 などの抗原提示能に関わる分子を発現することが確認された。特に活性化した $\gamma\delta$ T 細胞のみでスカベンジャーレセプターのひとつである CD36 を発現することが確認された。CD36 は Immature dendritic cells (imDC) 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^{31,32}。また、この発現は Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路や Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 経路により制御されている可能性が示された。さらに活性化した $\gamma\delta$ T 細胞では、抗原タンパクを細胞内に取り込む能力があることを共焦点顕微鏡により確認した。活性化した $\gamma\delta$ T 細胞はアポトーシスを誘導、または未処理の生きているがん細胞株を抗原リソースとした場合においても、がん抗原特異的 CD8⁺T 細胞の誘導が可能であった。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⁺T 細胞を誘導している可能性が考えられた。加えてミエロイド系細胞への分化に重要な転写因子である CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) の発現が、 $\alpha\beta$ T 細胞よりも $\gamma\delta$ T 細胞で高く発現していることを見出した。C/EBP α のリン酸化は、MAPK 経路である p38 や Extracellular signal-regulated kinase (Erk) 1/2 によって制御されているという報告がある³³。

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 α 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³⁴。

これらの結果や報告から $\gamma\delta$ T 細胞の抗原提示能には、静止期な状況下において C/EBP α が高発現していることが重要であると考えられた。初めに、V γ 9V δ 2 TCR からの刺激で C/EBP α 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 α 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⁺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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
APC	Antigen-presenting cells
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein α
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GalCer	Galactosylceramide
GATA3	GATA binding protein 3
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HES1	Hairy and enhancer of split 1
HLA	Human leukocyte antigen
HPRT	Hypoxanthineguanine phosphoribosyltransferase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IKK	I κ B kinase
IL-2	Interleukin-2
imDC	Immature dendritic cells
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
KARs	Killer-activating receptors
KIRs	Killer-inhibitory receptors
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
mAb	Monoclonal antibodies
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MART-1	Melanoma-associated antigen recognized by T cells 1
mDC	Mature dendritic cells
MFG-E8	Milk fat globule-EGF-factor 8
MFI	Mean fluorescent intensity
MHC	Major histocompatibility complex
MICA/B	MHC class I chain-related gene A and B
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B

NKG2D	Natural-killer group 2, member D
NK	Natural killer
NKT	Natural killer T
OVA	Ovalbumin
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PC5	Phycoerythrin-cyanin 5
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PI	Propidium iodide
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PVR	Poliovirus receptor
R/S	Responder/stimulator
TCR	T cell receptor
Tim-4	T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

実験方法

試薬

ゾレドロン酸は Novartis Pharmaceuticals より購入した。Human leukocyte antigen (HLA) -A*0201 拘束性 Melanoma-associated antigen recognized by T cells 1 (MART-1) 改変 (A27L) ペプチド (ELAGIGILTV) および A27L テトラマー試薬は、それぞれ Operon および MBL より購入した。MART-1 タンパクは、Abnova Corporation より購入した。MART-1 陽性細胞株 (JCOCB) は Queensland Institute of Medical Research の Dr. Chris Schmidt より提供いただいた。この細胞株は新鮮な手術標本より樹立された細胞株である。IPP およびベツリン酸は Sigma-Aldrich より購入した。

各 APC 細胞の培養法

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常人より採取したものである。MART-1 を使用した検討においては HLA-A*0201 陽性の健常人ボランティアに提供いただいた。Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) の分離のため全血を Lymphocyte Separation Medium (MP Biomedicals) に重層し、400g で 30 分間遠心を行った。単核球層を回収し、Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の培養は、10%AB 血清または非働化自己血漿を添加した ALyS203 培地 (Cell Science & Technology Institute) を用いた。また、imDC または mature dendritic cells (mDC) の誘導には AIM-V 培地 (invitrogen) を用いた。 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化には、5 μ M のゾレドロン酸と 1000IU/mL の Interleukin-2 (IL-2) (Chiron Benelux B.V) を添加した。 $\alpha\beta$ T 細胞の活性化には、10 μ g/mL の抗 CD3 抗体 (BD Biosciences) を固相化したプレートを用いて 175IU/mL の IL-2 を添加した。 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の増殖に合わせて細胞密度が $0.5-2 \times 10^6$ cells/mL を維持できるように IL-2 添加培地を加えた。DC の培養には、PBMCs より CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いてポジティブセクションした CD14⁺細胞を使用した。CD14⁺細胞を 500IU/mL の IL-4 (CellGenix) と 500IU/mL の Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc.) を添加し、5-7 日間培養したものを imDC とした。また、mDC は imDC に炎症性のサイトカインである Tumor necrosis factor- α (TNF- α) を 10ng/mL, Prostaglandin E2 (PGE2) を 1 μ g/mL, IL-1 β (Millipore) を 10ng/mL および IL-6 を 10ng/mL (R&D

Systems) 添加し、さらに 48 時間培養した。

シグナル経路の探索では、 $\gamma\delta$ T 細胞を 50 μ M の IPP と 50IU/mL の IL-2 存在下で活性化を行い、ERK 1/2 の阻害剤である PD98059 を 100 μ M, p38 MAP kinase 阻害剤である SB203580 を 20 μ M または NF- κ B 阻害剤である PS-1145 を 20 μ M で培養に添加した。また、C/EBP α の阻害検討では、その阻害剤であるベツリン酸³⁵ を 50 μ M で培養に添加した。72 時間刺激後の APC 関連マーカーを測定し、Control (IPP 単独刺激) と比較した。

フローサイトメトリー

細胞表面の染色に使用した Monoclonal antibodies (mAb) は、Beckman Coulter および BD Biosciences または、BioLegend より購入した。抗 TCRV γ 9- Fluorescein isothiocyanate (FITC), 抗 CD3- Phycoerythrin-cyanin 5 (PC5), 抗 CD8-FITC, 抗 CD11a- Phycoerythrin (PE), 抗 CD11b-PE, 抗 CD11c-PE, 抗 CD80-PE, 抗 CD86-PE, 抗 HLA-DR-PE, 抗 CD54-PE, 抗 CD206-PE, 抗 CD36-PE を使用した。 $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の表面抗原は、FC500 (Beckman Coulter) を用いたフローサイトメトリーにて測定した。また、データは CXP software (Beckman Coulter) を用いて解析した。

抗原の取り込み

活性化した $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞 (5-8 日間培養) に 2 時間もしくは一晩, 50 μ g/mL の Alexa Fluor555-labeled ovalbumin (OVA) (Molecular Probes) と共培養を行った。その後、それぞれの細胞を抗 TCRV γ 9 または抗 HLA ABC mAbs で染色を行い、Alexa Fluor 488 でラベルされた 2 次抗体 (Invitrogen) により検出した。フローサイトメトリーによって細胞の蛍光強度をまた共焦点顕微鏡によってラベルされた抗原の取り込みを観察した。

抗原提示能の評価

MART-1 タンパクまたは MART-1 陽性がん細胞株をパルスした $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞を APC として使用した。がん細胞株にアポトーシスを誘導するために 50Gy で放射線処理した。活性化した $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞 (14 日間培養) をアポトーシスさせたがん細胞株もしくは未処理の生きたがん細胞株とそれぞれ 48 時間および 96 時間共培養した。その後、それぞれの細胞を $\gamma\delta$ T 細胞および Pan-T 細胞にネガティブセレクションを行った。これらを APC として用いる際には、

レスポンダー細胞である CD3⁺T 細胞との共培養前に 20Gy で放射線処理した。共培養後は 50IU/mL の IL-2 を 2-3 日おきに加え、細胞の増殖に合わせスプリットさせた。1 週間または 2 週間の共培養後に、A27L テトラマーを使用して抗原特異的 CD8⁺T 細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。

細胞傷害試験

活性化した $\gamma\delta$ T 細胞, $\alpha\beta$ T 細胞および誘導された Mart-1 抗原特異的 CD8⁺T 細胞による MART-1 陽性がん細胞株に対する細胞傷害活性を Annexin V/ Propidium iodide (PI) (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーで解析した。ターゲット細胞であるがん細胞株を PKH26 Fluorescent Cell Linker Kits (Sigma-Aldrich) により染色することで、フローサイトメーター上で区別することができる。エフェクター細胞とターゲット細胞を様々な比率で 4 時間, 37°C で共培養する。全ての細胞を回収し、Annexin V/PI で染色を行った。PKH26 陽性のターゲット細胞の中で生きた細胞 (Annexin V⁻/PI⁻) からアポトーシス初期細胞 (Annexin V⁺/PI⁻), アポトーシス後期細胞 (Annexin V⁺/PI⁺), ネクローシス細胞 (Annexin V⁻/PI⁺) を分けることができる。細胞傷害活性は、ターゲット細胞のみのコントロール条件を基準として算出した。

リアルタイム PCR による解析

$\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞から得られた Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) サンプル中の C/EBP α , Pu.1, Hairy and enhancer of split 1 (HES1), Milk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8), T-Cell Immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4 (Tim-4), GATA binding protein 3 (GATA3) の発現レベルをリアルタイム PCR により測定した。リアルタイム PCR のためのプライマーペアは Qiagen より購入した。データは Hypoxanthineguanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) をハウスキーピング遺伝子として標準化した。また、相対的な発現レベルは Comparative Ct 法を用いて算出した。

免疫ブロット解析

Phospho-Erk1/2, Erk1/2, Phospho-p38, p38 に対する抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。活性化した $\gamma\delta$ T 細胞 (8 日間培養) を洗浄後に 1 時間氷上で静置させた。その後, 50 μ M の IPP または Phorbol

12-myristate 13-acetate (PMA) /Ionomycin それぞれ 50ng/mL, 500nM を加え, 37°C で活性化させた。活性化 0, 1, 3, 10 および 20 分後の細胞を 1×Nonidet P-40 Buffer (1 % Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 10 µg/mL PMSF および Leupeptin) により溶解させた。サンプルは, 10%の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し, PVDF メンブレン (Millipore) へ転写した。メンブレンを任意の 1 次抗体で処理し, HRP 標識 2 次抗体と反応させた。メンブレンを洗浄後, Enhanced chemiluminescence detection system (Amersham) により可視化させ, LAS-3000 imaging system により解析した。必要に応じてメンブレンを Stripping buffer (Thermo Scientific)で 15 分間軽く振盪させながらインキュベートすることで抗体を除去後に洗浄し, 他の抗体により再検出を行った。

統計解析

P 値はスチューデントの t 検定により算出し, P 値<0.05 で有意であると判定した。

実験結果

ゾレドロン酸による $\gamma\delta$ T 細胞の増殖方法

健康人末梢血単核球よりゾレドロン酸と IL-2 を用いて $\gamma\delta$ T 細胞特異的培養法を行った。培養開始前と培養中の $\gamma\delta$ T 細胞率の代表例を 2 パラメータヒストグラムで示した (Fig.3-A)。培養開始前の $\gamma\delta$ T 細胞率は 1.4%であったが、培養 14 日後には 90.9%となった。

$\gamma\delta$ T 細胞率の平均を示した (Fig.3-B 上段)。培養開始時には平均で 3.3%であったが、培養 7 日後には 80%以上となり、その割合は培養 14 日後にも維持されていた。

$\gamma\delta$ T 細胞数を示した (Fig.3-B 下段)。 $\gamma\delta$ T 細胞数は、培養 day7 で 237 ± 68 倍、培養 day14 で 4317 ± 2565 倍となった。

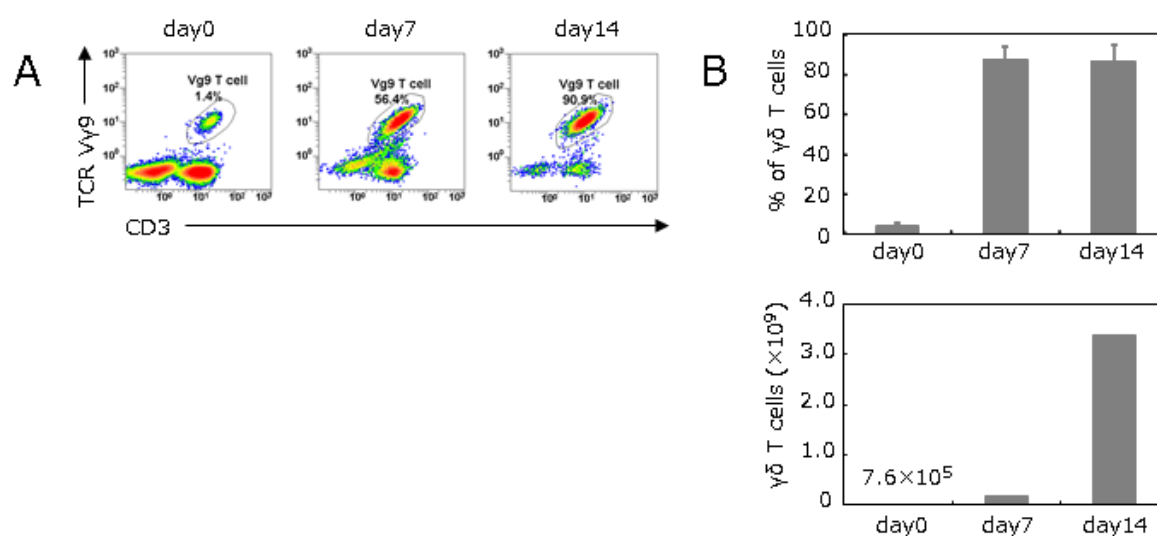


Figure.3 $\gamma\delta$ T 細胞特異的培養法による $\gamma\delta$ T 細胞率と細胞数の推移

PBMCs をゾレドロン酸と IL-2 により 14 日間の培養を行った。培養細胞は抗 TCRVγ9 抗体と抗 CD3 抗体により染色した。(A) 培養前、培養 7 日目および 14 日目の代表的な 2 パラメータヒストグラムを示した。(B) $\gamma\delta$ T 細胞の率 (上側) と細胞数 (下側) のそれぞれの時点での平均値を示した(mean; n = 9)。

活性化による $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の APC 関連マーカーの発現

活性化前後の $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の MHC Class II および共刺激分子である CD80, CD86 の発現率および発現強度の推移を示した (Fig.4-A)。 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞ともに活性化前ではいずれの分子も発現が確認されないが、活性化後に発現が確認された。

MHC Class II の発現レベルは、 $\gamma\delta$ T 細胞の方が $\alpha\beta$ T 細胞よりも高い傾向があった。一方、CD80 の発現レベルは、同程度であった。CD86 の発現レベルは培養 7 日目で同程度であったが、 $\gamma\delta$ T 細胞では、培養 14 日目まで発現レベルが維持される傾向が確認された。

$\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の接着分子 (CD54, CD11a, CD11b, CD11c) の発現率の推移を示した (Fig.4-B)。活性化前では CD54 においてのみ $\gamma\delta$ T 細胞の方が高い発現率が確認された。その他の分子においては活性化前の発現レベルは、同程度であった。また、それぞれの分子において活性化後の発現レベルは、 $\gamma\delta$ 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 $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞は、活性化することで APC 関連マーカーを発現してくることが明らかとなった。

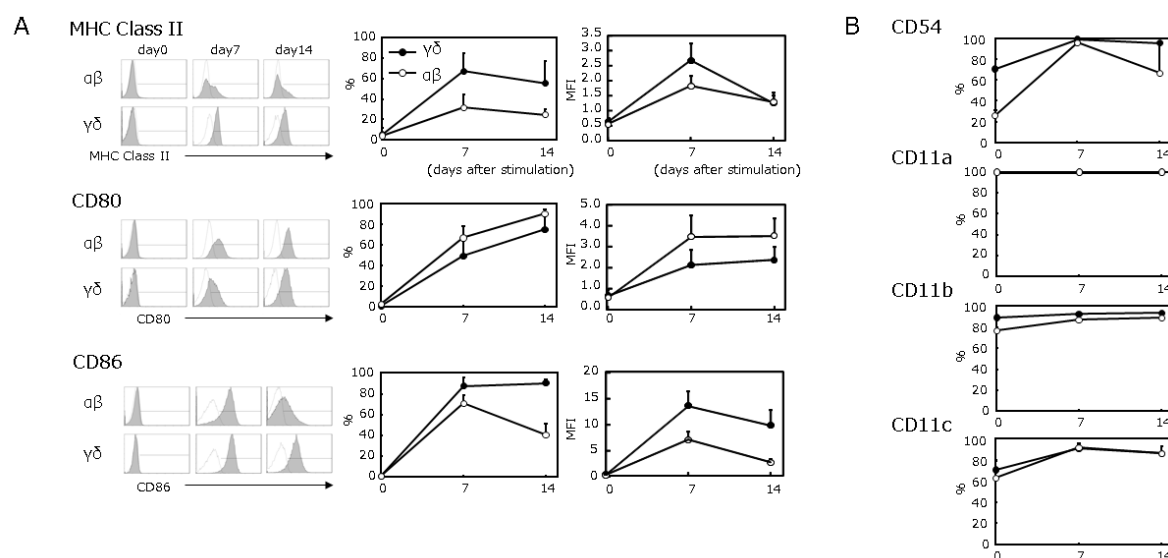


Figure.4 活性化前後の APC 関連マーカーの発現推移

PBMCs にゾレドロン酸を用いて $\gamma\delta$ T 細胞を活性化し、固相化した抗 CD3 抗体を用いて $\alpha\beta$ T 細胞を活性化した。(A) MHC Class II, CD80 および CD86 の培養前、培養 7 日目および 14 日目の代表的な発現パターンを示した (左側)。 $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の MHC Class II, CD80 および CD86 の発現率 (中央), 平均蛍光強度

mean fluorescent intensity (MFI) (右側) の推移を示した。(B) $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の接着分子 (CD54, CD11a, CD11b, CD11c) の発現率の推移を示した(mean $\pm$ SD; n = 5-9)。

活性化による $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の抗原取り込み能の比較

活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の抗原取り込み能の評価を行った。モデル抗原タンパクとして蛍光標識された OVA を使用した。活性化した $\gamma\delta$ T 細胞または $\alpha\beta$ T 細胞と OVA-Alexa555 を 4°C または 37°C で 2 時間, 共培養させた。比較検討のために imDC を使用し, 共培養時間は 1 時間で行った。37°C で共培養した場合の蛍光強度の増加をフローサイトメーターにより測定した (Fig.5-A)。両細胞ともに 37°C で共培養した条件では, 4°C と比較して蛍光強度が増加していた。しかしながら, imDC と比較するとその増加は軽度であった。

この蛍光強度の増加が細胞表面への結合ではなく, 細胞内への抗原の取り込みであることを確認するため共焦点顕微鏡により観察した (Fig.5-B)。活性化した $\alpha\beta$ T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞を 37°C で一晩, 共培養した場合の共焦点顕微鏡画像を示した。imDC の場合は 1 時間の共培養で行った。活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞では, imDC と同様に細胞内に抗原たんぱくを貪食しているのに対して, 活性化させた $\alpha\beta$ T 細胞では, ほとんど確認されなかった。

これらの結果から $\alpha\beta$ T 細胞にはなく, $\gamma\delta$ T 細胞ではタンパク抗原の取り込み能を有していると考えられた。

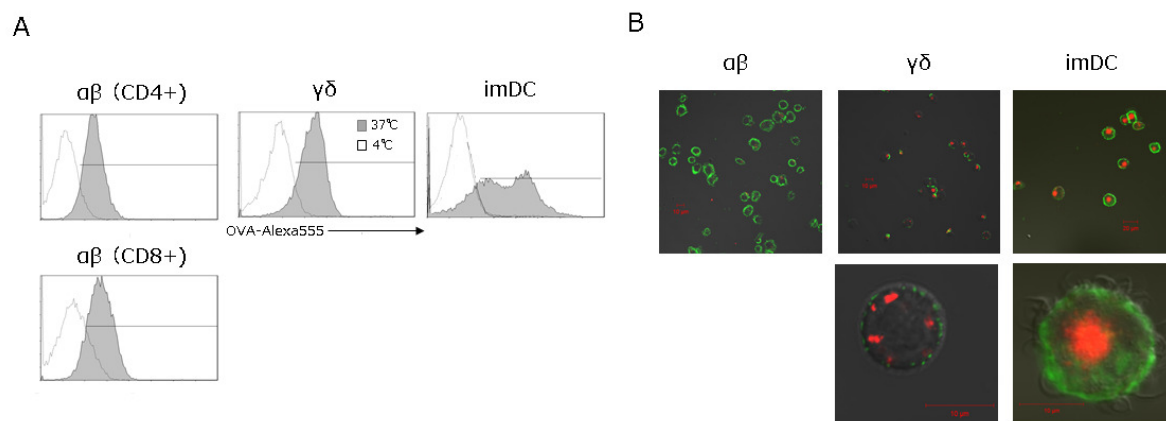


Figure.5 抗原取り込み能の比較

(A) 活性化させた $\alpha\beta$ T 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞および imDC を OVA-Alexa555 と 4°C (白抜き) または 37°C (灰色) で 2 時間 (imDC においては 1 時間) 共培養を行っ

た。共培養後の細胞を回収し、フローサイトメーターにより測定した。(B) 活性化した $\alpha\beta$ T 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞および imDC を OVA-Alexa555 (赤) と一晚 (imDC においては 1 時間) 共培養を行った。共培養後の $\gamma\delta$ T 細胞は TCRV γ 9 抗体で, $\alpha\beta$ T 細胞および imDC は抗 HLA ABC 抗体を使用し, 2 次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗体 (緑) を使用した。

MART-1 改変 (A27L) ペプチドを使用した場合の抗原提示能の比較

A27L ペプチドを抗原として用いた場合の活性化した $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の抗原提示能を評価した。 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞は, 培養 7 日目または 14 日目の 2 種類を準備した。比較対象として mDC を使用した。活性化 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞を Stimulator として用いる場合は Responder/stimulator (R/S) 比が 1 で, mDC の場合は 10 で共培養した。また, 全ての Stimulator は共培養前に放射線処理を行った。Responder 細胞である CD3⁺T 細胞をそれぞれの Stimulator と A27L ペプチド存在下で共培養し, 抗原特異的 CD8⁺T 細胞の誘導効率を A27L テトラマーにより測定した (Fig.6)。

その結果, A27L ペプチド非存在下では A27L テトラマー陽性細胞は検出されないものの, 存在下においてはいずれの APC においても A27L テトラマー陽性細胞が検出された。Stimulator として $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞を用いた場合は同程度の誘導効率であり, 培養 7 日目の方が培養 14 日目よりも高い傾向があった。比較対象である mDC を用いた場合の方が効率よく A27L テトラマー陽性細胞を誘導している傾向が確認された。

これらの結果から A27L ペプチドを用いた場合, 活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞は A27L 抗原特異的 CD8⁺T 細胞を誘導し, その誘導効率は同程度であることが明らかとなった。

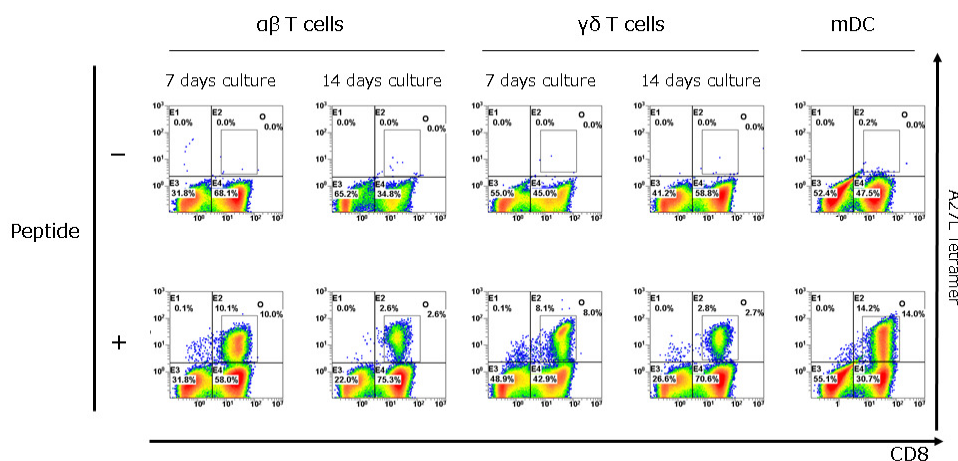


Figure.6 A27L ペプチドを抗原とした場合の抗原提示能の比較

APC として活性化させた $\alpha\beta$ T 細胞, $\gamma\delta$ T 細胞および mDC を使用した。APC は, $CD3^+$ T 細胞 (Responder 細胞) との共培養前に放射線処理を行った。共培養時にペプチド添加なし条件 (上段) および添加あり条件 (下段) で 2 週間の共培養の後, A27L テトラマーにより測定した。

抗原提示能の比較と誘導された抗原特異的 $CD8^+$ T 細胞の機能評価

A27L ペプチドを抗原として用いた場合の活性化した $\gamma\delta$ T 細胞および mDC の抗原提示能の比較および誘導された抗原特異的 $CD8^+$ T 細胞の細胞傷害活性の確認を行った。Responder 細胞である $CD3^+$ T 細胞を A27L ペプチドパルスあり, またはなしの APC と共培養を行った。健常人ボランティア 3 名分の各条件で誘導された A27L テトラマー陽性細胞率を示した (Fig.7-A)。

活性化 $\gamma\delta$ T 細胞では R/S 比が 1 で mDC の場合は 10 ではあるものの, 同程度の A27L テトラマー陽性細胞率が得られるボランティアも存在することが明らかとなった (Fig.7-A 上段および下段)。また, 各条件で誘導された共培養 7 日目の A27L テトラマー陽性細胞数を示した (Fig.7-B)。その結果, A27L テトラマー陽性細胞率では同程度であったが, 細胞数で比較すると mDC の方が $\gamma\delta$ T 細胞よりも 2.8 倍から 7.6 倍程度に A27L テトラマー陽性細胞数が増加することが確認された。

これら誘導された A27L テトラマー陽性細胞を含む細胞集団をエフェクター細胞として Mart-1 陽性がん細胞株への細胞傷害活性を測定した (Fig.7-C)。その結果, A27L テトラマー陽性細胞率が高いほど Mart-1 陽性がん細胞株への細胞傷害活性が高い傾向が認められた。

これらの結果から, 活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞により誘導された A27L 抗原特異的 $CD8^+$ T 細胞は, エフェクター細胞としての機能を有していることが明らかとなった。

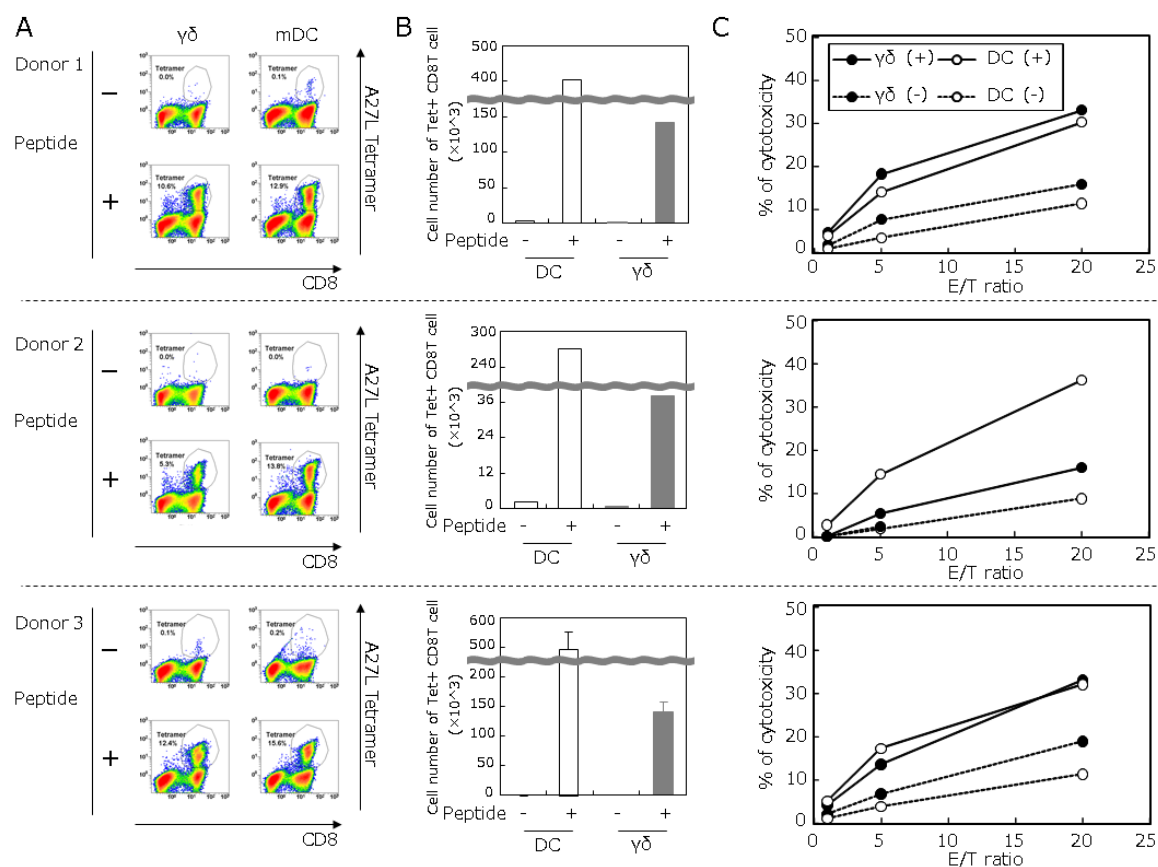


Figure.7 誘導されたがん抗原特異的 CD8⁺T 細胞の機能評価

APC として活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞および mDC を使用した。APC は、CD3⁺T 細胞 (Responder 細胞) との共培養前に放射線処理を行った。健常人ボランティア 3 名分の結果を示した。Responder 細胞である CD3⁺T 細胞を A27L ペプチドパルスあり、またはなしの APC と共培養を行った。共培養 2 週間後の (A) A27L テトラマー陽性細胞率および (B) 1 週間後の A27L テトラマー陽性細胞数を示した。(C) エフェクター細胞として共培養 2 週間後の細胞を使用して Mart-1 陽性細胞株に対する細胞傷害活性を測定した。

各種抗原を使用した場合の抗原提示能の比較

Mart-1 タンパク、Mart-1 陽性がん細胞株および α -galactosylceramide (GalCer) を抗原として用いた場合の活性化した $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の抗原提示能を評価した。抗原リソースとして使用したがん細胞株は、放射線照射よりアポトーシスを誘導した場合と無処理の生きたがん細胞株を準備した。

その結果、両細胞ともに Mart-1 タンパクを抗原とした場合には、抗原特異的

CD8⁺T 細胞の増殖が誘導されなかった (Fig.8-A)。

両細胞ともにアポトーシスした Mart-1 陽性がん細胞株を抗原とした場合には、抗原特異的 CD8⁺T 細胞の増殖を誘導した (Fig.8-B)。生きたがん細胞株を抗原とした場合には、活性化された $\gamma\delta$ T 細胞でのみ抗原特異的 CD8⁺T 細胞の増殖が確認された (Fig.8-B)。

$\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞による Mart-1 陽性がん細胞株に対する細胞傷害活性を示した (Fig.8-C)。 $\gamma\delta$ T 細胞の方が $\alpha\beta$ T 細胞よりもこのがん細胞株に対して強い細胞傷害活性を有することが確認された。

$\gamma\delta$ T 細胞に α -GalCer を 100ng/mL で処理後洗浄し, Responder 細胞と共培養を行った (Fig.8-D)。その結果, V α 24V β 11⁺ natural killer T (NKT) 細胞が誘導可能であることが確認された。

これらの結果から活性化した $\gamma\delta$ T 細胞においては、生きたがん細胞株由来の抗原を提示する能力があることが示唆された。

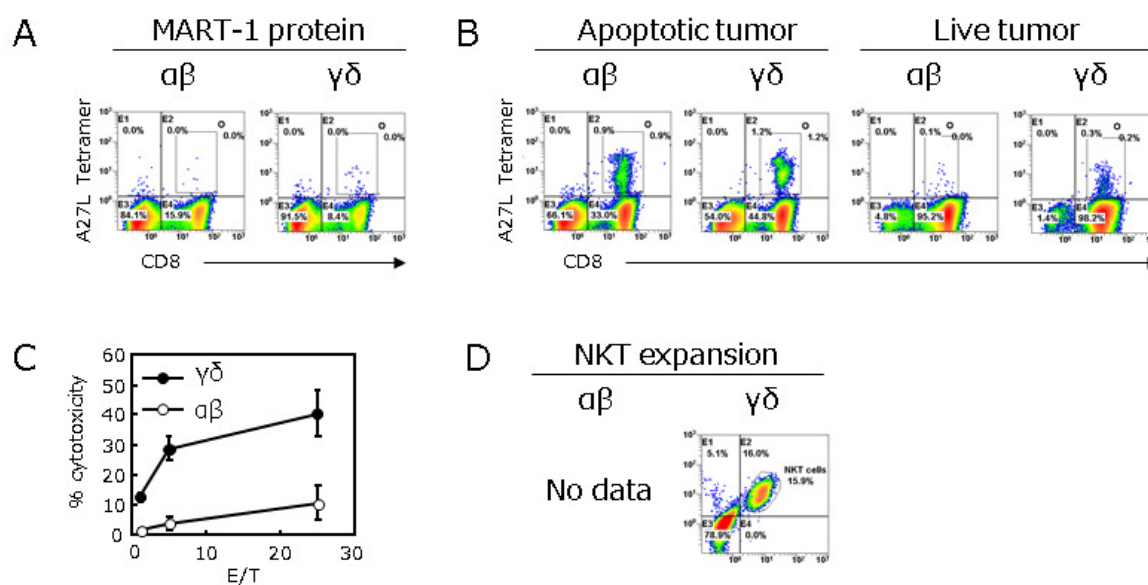


Figure.8 各種抗原を用いた場合の抗原提示能の比較

APC として活性化した $\alpha\beta$ T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞を使用した。APC は、CD3⁺T 細胞 (Responder 細胞) との共培養前に放射線処理を行った。(A) Mart-1 タンパク、(B) アポトーシスまたは生きた Mart-1 陽性細胞株を抗原として使用した。アポトーシスは放射線照射により誘導した。2 週間の共培養の後、A27L テトラマーにより測定した。(C) 活性化した $\alpha\beta$ T 細胞および $\gamma\delta$ T 細胞による Mart-1 陽性細胞株に対する細胞傷害活性を示した。データは平均値を示している。(mean $\pm$ SD; n = 3) (D) α -GalCer を $\gamma\delta$ T 細胞にパルスし、CD3⁺T 細胞と 10 日間の共培養

を行った。CD3⁺T 細胞からの Invariant NKT 細胞の増殖を抗 TCRV α 24 および抗 V β 11 mAbs を用いて測定した。

スカベンジャー/ファゴサイトーシス関連分子の発現比較

活性化前後の $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞のスカベンジャー/ファゴサイトーシス関連分子の発現率を測定した。

$\gamma\delta$ T 細胞は、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 (Fig.9-A)。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。

マンノースレセプター (CD226) やアポトーシス細胞の取り込みに関与している MFG-E8 や Tim-4 の発現は $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞で大きな違いは確認されなかった (Fig.9-B)。

CD36 は imDC 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。これらの結果から $\gamma\delta$ T 細胞が CD36 を介してアポトーシス細胞を取り込んでいる可能性が示唆された。

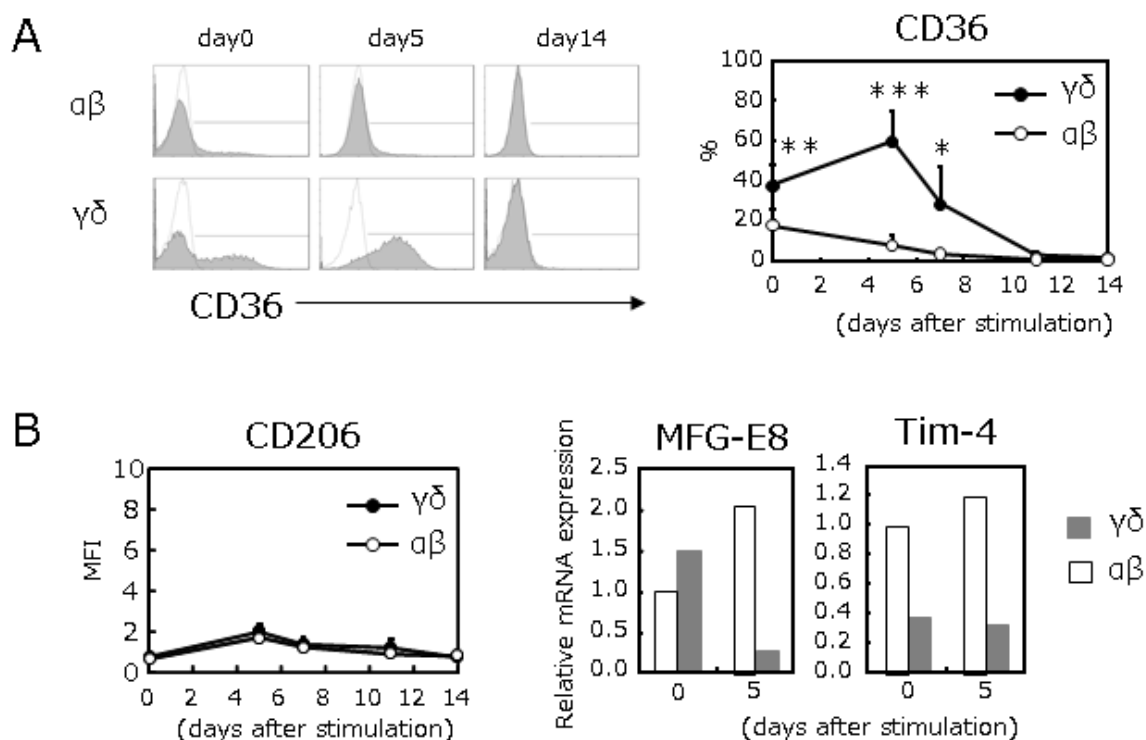


Figure.9 スカベンジャー/ファゴサイトーシス関連分子の発現比較

(A) 活性化前, 活性化 5 日目および 14 日目の $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞の CD36 の代表的な発現パターンを示した (左側)。 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の CD36 の発現率の平均値の推移を示した (mean $\pm$ SD; n = 5-9) (右側)。 (B) $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞の CD206 の発現率の平均値の推移を示した (mean $\pm$ SD; n = 5-9) (左側) 単離した $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞からの cDNA サンプルにおける MFG-E8 や Tim-4 の発現レベルをリアルタイム PCR にて測定した。 データは, HPRT をハウスキーピング遺伝子として標準化した。

APC 関連マーカーの発現を制御するシグナル経路の探索

活性化による $\gamma\delta$ T 細胞の APC 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した。

これまでに樹状細胞において MHC Class II や共刺激分子の発現に MAPK 経路や NF- κ B 経路が関与していることが報告されている^{36,37}。そこで, MAPK 経路 (ERK1/2, p38 MAP kinase) と NF- κ B 経路 (I κ B kinase:IKK) の阻害剤を使用し, IPP 刺激による APC 関連マーカーの発現阻害効果を検討した。ゾレドロン酸による活性化には APC が必要であり, 本実験では阻害剤が APC に作用してしまう可能性があった。そのため, 直接的に $\gamma\delta$ TCR を刺激することが報告されている IPP を使用した。

IPP による活性化 72 時間後の APC 関連マーカーの発現変化に対する発現阻害効果で代表的なヒストグラムを示した (Fig.10-A)。MHC Class I, MHC Class II, CD54, CD80 では, 阻害剤の添加により大きな違いは確認されなかった。CD86, CD36 は MAPK 経路と NF- κ B 経路阻害剤の添加により, 明らかに発現の上昇が阻害される傾向が確認された。

IPP による活性化前および活性化後の APC 関連マーカーの発現率および発現強度を示した (Fig.10-B および C)。MHC Class I では, 活性化前後において阻害剤の添加により発現率には低下が確認されなかった。MHC Class II, CD54, CD80 では活性化により発現の上昇が認められ, 阻害剤を添加しても発現率には大きな変化は確認されなかった。CD86, CD36 では活性化により発現の上昇が認められ, 阻害剤の添加により発現率および発現強度の上昇が阻害される傾向が確認された。

次に IPP による $\gamma\delta$ TCR の活性化により Erk1/2, p38 のリン酸化が起こるかをウエスタンブロットにより確認した (Fig.10-D)。PMA/Ionomycin 刺激と同様に IPP の刺激により, phospho-Erk1/2, phospho-p38 が検出された。

これらの結果から活性化 $\gamma\delta$ T 細胞の APC 関連マーカー, 特に CD36 の発現上昇は, MAPK 経路と NF- κ B 経路によって制御されていることが示唆された。

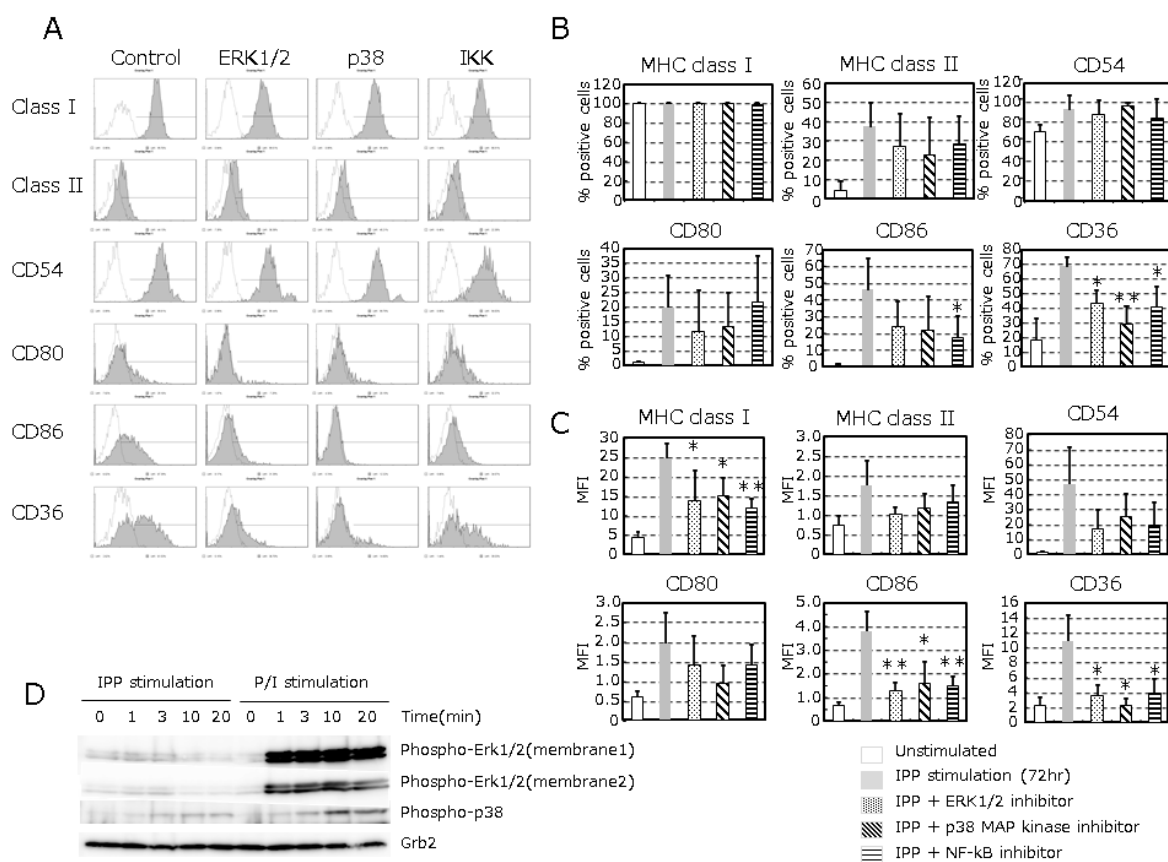


Figure.10 APC 関連マーカーの発現上昇を制御するシグナル経路の探索

(A) Control (IPP 単独刺激) または IPP にそれぞれの阻害剤である ERK 1/2 (PD98059), p38 MAP kinase (SB203580), NF- κ B (PS-1145) を加え, 72 時間刺激後の各分子での代表的な発現パターンを示した。IPP 刺激または各阻害剤添加前および 72 時間後の (B) APC 関連マーカーの発現率および (C) 発現強度を示した (mean $\pm$ SD; n = 3-4)。 (D) $\gamma\delta$ T 細胞を IPP または PMA/Ionomycin で刺激後の ERK1/2 と p38 のリン酸化の推移をウエスタンブロットにより測定した。Grb2 はタンパクローディングコントロールとして使用した。

ミエロイド系細胞の転写因子の測定

APC 機能の誘導メカニズムを解明するために活性化前後の $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞のミエロイド系転写因子の発現比較を行った。

その結果、刺激前の $\gamma\delta$ T 細胞で C/EBP α の発現レベルが高いことが確認された (Fig.11-A)。活性化後の C/EBP α の発現は、 $\alpha\beta$ T 細胞と同等レベルにまで低下した。一方で、PU.1 や HES1 の発現レベルは $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞で大きな違いは確認されなかった。

$\gamma\delta$ T 細胞の APC 機能の誘導において C/EBP α の発現の影響を確認するために、C/EBP α の阻害剤を使用し、活性化における APC 関連マーカーの発現に対する抑制効果を検討した (Fig.11-B)。

その結果、実験 1 において C/EBP α の阻害により $\gamma\delta$ T 細胞の方が、 $\alpha\beta$ T 細胞よりも CD36 や MHC Class II の発現上昇が抑制される傾向が確認された。実験 2 においては CD86 でも同様の傾向が確認された。一方で、 $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞ともに CD54 や MHC Class I の発現にはほとんど影響がなかった。

これらの結果から $\gamma\delta$ T 細胞に高発現する C/EBP α が、抗原提示機能の獲得、特に CD36 や MHC Class II の発現上昇を支持していると考えられた。

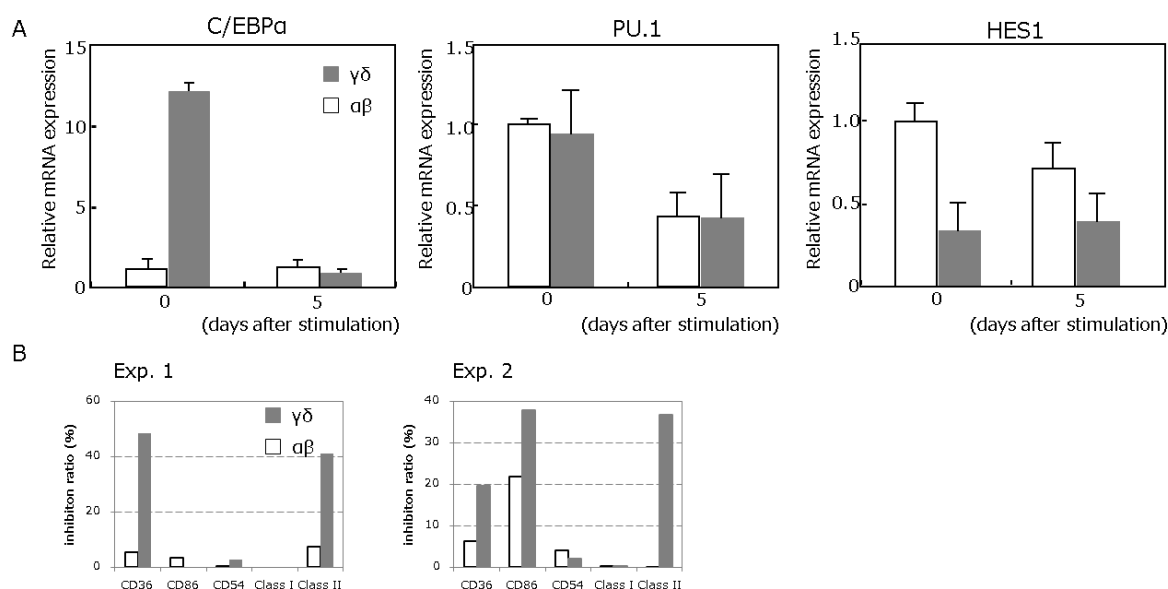


Figure.11 ミエロイド系転写因子の発現比較

活性化前後で単離した $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞から得られた cDNA サンプルを使用して、C/EBP α , Pu.1, HES1, GATA3 発現レベルをリアルタイム PCR により測定した。データは HPRT をハウスキーピング遺伝子として標準化した。(mean

± SD; n = 3)。 (B) C/EBPα の阻害剤であるベツリン酸存在下において γδT 細胞および αβT 細胞を活性化させた。72 時間後の APC 関連マーカーの発現をフローサイトメーターにより測定した。発現抑制率 (%) を次の計算式 { (% 阻害剤なし陽性率 - % 阻害剤あり陽性率) / % 阻害剤なし陽性率 } ×100 にて算出した。

考察

これまでに $\gamma\delta$ T 細胞および $\alpha\beta$ T 細胞を含む T 細胞が、抗原提示能を示すことが報告されている²³⁻³⁰。しかしながら、 $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の抗原提示能や関連する分子メカニズムの特徴的な違いについて明らかとなっていない。

そこで本研究では、活性化させた $\gamma\delta$ T 細胞と $\alpha\beta$ T 細胞の APC 関連マーカーの発現レベル、抗原取り込み、抗原提示能の比較に加え、 $\gamma\delta$ T 細胞が抗原提示能を獲得するための分子メカニズムについて検証した。

まず、APC 関連マーカーの発現では、 $\gamma\delta$ T 細胞の方が $\alpha\beta$ T 細胞よりも MHC Class II 分子の発現が高い傾向にあった (Fig.4)。さらに、ヒトの $\gamma\delta$ T 細胞においてスカベンジャーレセプターである CD36 を発現していることを確認した (Fig.9)。これまでに牛の $\gamma\delta$ T 細胞が CD36 を発現していることが報告されている³⁸。また、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ことが知られている^{31,32}。活性化された $\gamma\delta$ T 細胞は、生きたがん細胞株との共培養によってがん細胞株に対して細胞傷害活性を示し、抗原特異的 CD8⁺T 細胞を誘導することが可能であった (Fig.8)。そのため、 $\gamma\delta$ T 細胞は生きたがん細胞を殺傷し、CD36 を介して細胞片を取り込み、がん細胞由来の抗原に処理することで APC 機能を示し、がん抗原特異的 CD8⁺T 細胞を誘導していると考えられた。

次に、 $\gamma\delta$ T 細胞の活性化による CD36 の発現上昇において、どのシグナル経路が関与しているのかを検討した。その結果、CD36 の発現上昇が MAPK (ERK1/2, p38 MAP kinase) 経路や NF- κ B (IKK) 経路によって制御されていることが明らかとなった (Fig.10)。これまでに C/EBP α のリン酸化が p38 や ERK1/2 シグナル経路により制御されていることが報告されている³³。さらに、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 α 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³⁴。これらの結果や報告から活性化した $\gamma\delta$ T 細胞の抗原提示能の獲得には、C/EBP α が高発現していることが重要であると考えられた。

本研究では、 $\gamma\delta$ T 細胞が抗原タンパクを細胞内に取り込む能力を有していることが確認された (Fig.5)。これまで報告されているように $\gamma\delta$ T 細胞は強い細胞傷害活性を有し、それら細胞片を直接取り込むことで抗原提示を行っている可能性が示唆された³⁹。そのため $\gamma\delta$ T 細胞は様々な抗原を処理し、抗原提示することが可能であると考えられた。一方、 $\alpha\beta$ T 細胞では、トロゴサイトーシスと呼ばれる APC から MHC 分子や共刺激分子が $\alpha\beta$ T 細胞に移行する機序や樹状細胞から分泌されるエキソソームを T 細胞が取り込む機序によって抗原提示を行って

いることが報告されている^{29,30}。 $\gamma\delta$ T 細胞が同様のメカニズムにより抗原提示を行うかどうかは、さらなる研究が必要である。

本研究での一連の結果から $\gamma\delta$ T 細胞の抗原提示能には、静止期な状況下において C/EBP α が高発現していることが重要である (Fig.12)。①初めに、 $\gamma\delta$ T 細胞に対して V γ 9V δ 2 TCR から刺激が入る。②p38 や Erk1/2 などの MAPK カスケードが活性化することで C/EBP α のリン酸化が起こる。③それにより CD36 の発現が上昇し、抗原の取り込みが起こる。④取り込んだ抗原をプロセッシングし、CD8⁺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。

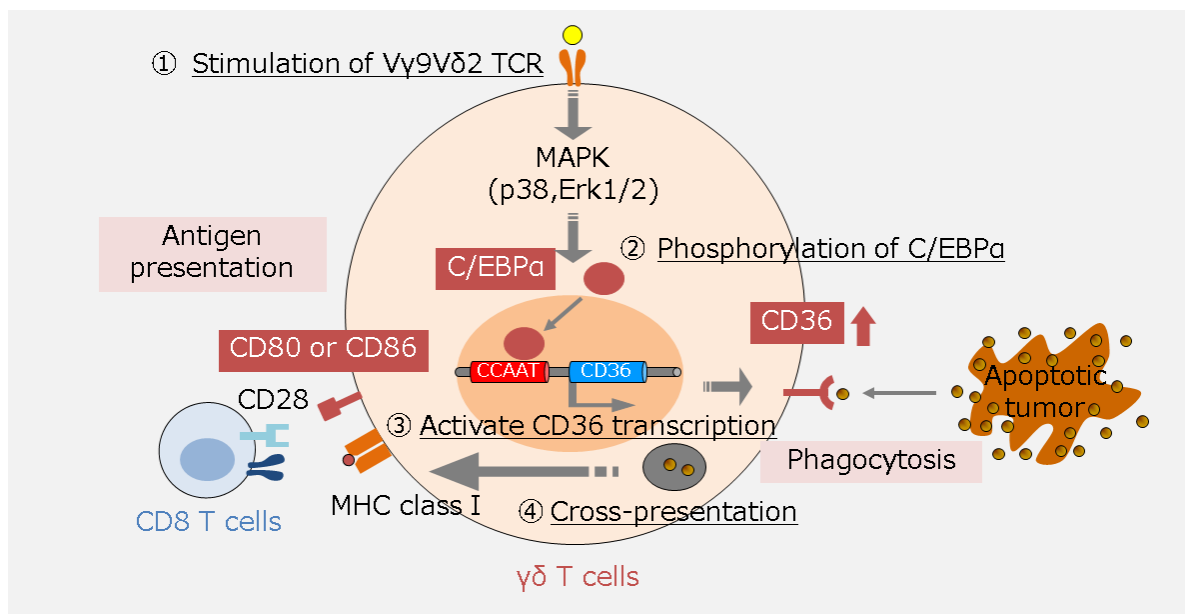


Figure.12 本研究から想定される APC 機能獲得におけるメカニズム

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

1. ゼレドロン酸で活性化された $\gamma\delta$ T 細胞はがん細胞を傷害するとともにがん抗原を提示することが示された。
2. $\gamma\delta$ T 細胞はミエロイド系細胞の分子的特徴である C/EBP α を発現しており抗原提示能の獲得に重要である。
3. $\gamma\delta$ T 細胞が抗原提示能を獲得する際には MAPK 経路や NF- κ B 経路が重要である。

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、がん免疫反応を理解する際に基盤となるような知見である。今後、 $\gamma\delta$ T 細胞の APC 機能を利用した新しい治療法の開発につなげていきたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，多大なる御指導・御助言をいただきました
北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野，清野研一郎教授
ならびに和田はるか講師に深く感謝いたします。

研究を始める際に，右も左もわからなかった筆者に的確なご助言を下さり
送り出してくださった元株式会社メディネット，前川隆司様ならびに
贅田美江様に深く感謝いたします。

そして研究を完遂するまで寛大に見守ってくださった
株式会社メディネット先端医科学研究所，神宮司英雅様に深く感謝いたします。

また，研究手法やデータの考え方，進め方等懇切丁寧にご指導くださった
元聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 生体機能制御研究部門，
香城諭講師ならびに神宿元研究員にはご助力をいただきました。
厚く御礼申し上げます。

研究生生活のあらゆる面で筆者にお力添えいただいた，
北海道大学遺伝子病制御研究所病態研究部門免疫生物分野の皆様ならびに
株式会社メディネット先端医科学研究所の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，研究生生活を支えてくれた家族に感謝します。

2015 年 12 月

引用文献

1. Kabelitz, D., Wesch, D., Pitters, E. & Zöller, M. Potential of human $\gamma\delta$ T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *Int. J. Cancer* **112**, 727-732 (2004).
2. Tanaka, Y., Morita, CT. & Tanaka, Y. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* **375**, 155-158 (1995).
3. Kunzmann, V., Bauer, E. & Wilhelm, M. $\gamma\delta$ T-cell stimulation by pamidronate. *N. Engl. J. Med.* **340**, 737-738 (1999).
4. Kunzmann, V. *et al.* Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* **96**, 384-392 (2000).
5. Wilhelm, M. *et al.* $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* **102**, 200-206 (2003).
6. Kato, Y. *et al.* Requirement of species-specific interactions for the activation of human $\gamma\delta$ T cells by pamidronate. *J. Immunol.* **170**, 3608-3613 (2003).
7. Conti, L. *et al.* Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated $\gamma\delta$ T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J. Immunol.* **174**, 252-260 (2005).
8. William, A. *et al.* Mutant p53 Disrupts Mammary Tissue Architecture via the Mevalonate Pathway. *Cell* **148**, 244-258 (2012)
9. Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-729 (1999).
10. Das, H. *et al.* MICA engagement by human V γ 2V δ 2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* **15**, 83-93 (2001).
11. Groh, V. *et al.* Broad tumor-associated expression and recognition by tumor derived T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 6879-6884 (1999).
12. Toutirais, O. *et al.* DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by V γ 9V δ 2 T cells. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1361-1368 (2009)
13. Correia, DV., Lopes, A. & Silva-Santos, B. Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology* **2**, e22892 (2013)
14. Corvaisier, M. *et al.* V γ 9V δ 2 T cell response to colon carcinoma cells. *J. Immunol.* **175**, 5481-5488 (2005)
15. Kato, Y. *et al.* Involvement of CD166 in the activation of human $\gamma\delta$ T cells by tumor

- cells sensitized with nonpeptide antigens. *J. Immunol.* **177**, 877-884 (2006)
16. Tokuyama, H. *et al.* V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs—rituximab and trastuzumab. *Int. J. Cancer* **122**, 2526-2534 (2008)
 17. Bennouna, J. *et al.* Phase-I study of Innacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$, an autologous cell-therapy product highly enriched in γ 9 δ 2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1599-1609 (2008).
 18. Kobayashi, H. *et al.* 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.* **60**, 1075-1084 (2011).
 19. Nicol, A.J. *et al.* Clinical evaluation of autologous gamma delta T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br. J. Cancer* **105**, 778-786 (2011).
 20. Nakajima, J. *et al.* A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-lung cancer patients with autologous $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **37**, 1191-1197 (2010).
 21. Wada, I. *et al.* 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.* **3**, 362-375 (2014).
 22. Abe, Y. *et al.* Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V γ 9 $\gamma\delta$ T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp. Hematol.* **37**, 956-968 (2009).
 23. Brandes, M. *et al.* Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ T cells. *Science* **309**, 264-268 (2005).
 24. Wu, Y. *et al.* Human $\gamma\delta$ T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J. Immunol.* **183**, 5622-5629 (2009).
 25. Landmeier, S. *et al.* Activated human $\gamma\delta$ T cells as stimulators of specific CD8⁺ T-cell responses to subdominant Epstein Barr virus epitopes: potential for immunotherapy of cancer. *J. Immunother.* **32**, 310-321 (2009).
 26. Altwater, B. *et al.* Activated human $\gamma\delta$ T cells induce peptide-specific CD8⁺ T-cell responses to tumor-associated selfantigens. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 385-396 (2012)
 27. Brandes, M. *et al.* Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 2307-2312 (2009).
 28. Himoudi, N. *et al.* Human $\gamma\delta$ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J. Immunol.* **188**, 1708-1716

- (2012).
29. Umeshappa, CS. *et al.* CD4⁺ Th-APC with acquired peptide/MHC class I and II complexes stimulate type 1 helper CD4⁺ and central memory CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol.* **182**, 193-206 (2009).
 30. Hao, S., Yuan, J. & Xiang, J. Nonspecific CD4⁺ T cells with uptake of antigen-specific dendritic cell-released exosomes stimulate antigen-specific CD8⁺ CTL responses and long-term T cell memory. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 829-838 (2007).
 31. Albert, ML. *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**, 1359-1368 (1998).
 32. Greenberg, ME. *et al.* Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **203**, 2613-2625 (2006).
 33. Ross, SE. *et al.* Phosphorylation of C/EBP α inhibits granulopoiesis. *Mol. Cell Biol.* **24**, 675-686 (2004).
 34. Qiao, L. *et al.* Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein α . *J. Biol. Chem.* **283**, 8788-8795 (2008).
 35. Hollis, A., Speri, B., Graber, M. & Berg, T. The natural product betulinic acid inhibits C/EBP family transcription factors. *ChemBioChem* **13**, 302-307 (2012).
 36. Ardeshtna, KM., Pizzey, AR., Devereux, S. & Khwaja, A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF- κ B signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **96**, 1039-1046 (2000).
 37. Yoshimura, S. *et al.* Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* **13**, 675-683 (2001).
 38. Lubick, K. & Jutila, MA. LTA recognition by bovine $\gamma\delta$ T cells involves CD36. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1268-1270 (2006).
 39. Meuter, S., Eberl, M. & Moser, B. Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 8730-8735 (2010).