
 原 著

ヒト末梢血 $\gamma\delta$ T 細胞の増幅培養と その細胞特性について

辻村 貴弘^{1,2}, 中澤 務³, 松尾 良信^{1,3}, 今西 二郎¹

¹京都府立医科大学大学院医学研究科免疫・微生物学*

²グランソール奈良

³(株)グランソール免疫研究所

Characterization and Expansion of Human Peripheral Blood $\gamma\delta$ T Cells

Takahiro Tsujimura^{1,2}, Tsutomu Nakazawa³, Yoshinobu Matsuo^{1,3} and Jiro Imanishi¹

¹Department of Microbiology and Immunology,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

²Clinic Gurandsoul Nara

³Grandsoul Research Institute for Immunology, Inc

抄 録

Zoledronate は骨吸収抑制薬であると同時に $V\gamma 9V\delta 2$ T 細胞受容体 (TcR) 保有細胞の特異的刺激剤として知られている。われわれは健康人 13 名の末梢血リンパ球を対象に $\gamma\delta$ T 細胞の増幅培養を試みた。5 μ M Zoledronate の存在下に 5% 自己血漿および 200 IU/ml インターロイキン-2 含有の AIM-V 培地で増幅培養を行い、細胞の特性分析を行った。培養増幅した細胞は $V\gamma 9V\delta 2$ の TcR を保有した細胞主体の $\gamma\delta$ T 細胞であり陽性率は 82.0 \pm 4.6% であった。また、細胞増幅率は 1782 \pm 463 倍であった。細胞表面抗原の分析を行ったところ培養増幅した $\gamma\delta$ T 細胞は T 細胞としての特性を保ちながら数種のナチュラルキラー (NK) 細胞関連抗原である CD16, CD56, CD94, CD158b, CD161 ならびに CD314 などの受容体を発現していた。また、これらの細胞は K562 に対して 20.2~86.0% および Daudi 細胞に対して 36.8~44.4% の細胞傷害活性を示した。つぎに、多発性骨髄腫由来細胞株 6 株, AM01, MOLP-2, MOLP-5, MOLP-8, RPMI-8226 および U-266 を用いて同様に細胞傷害活性の検討を行ったところ 16.8~83.4% の細胞傷害活性を示した。対象として用いた Epstein-Barr ウイルス感染性“正常”B 細胞株 (BLCL) 5 株, B85, B234, B250, B407 および B422 に対する細胞傷害活性は 0.3~19.0% であった。今回、培養増幅して得られた細胞は $\gamma\delta$ T 細胞主体の細胞であるが同時に複数の NK 受容体を保有しており NK 様 T 細胞の特性を有していた。加えて、これらの細胞は K562, Daudi 細胞のみならず多発性骨髄腫細胞株に対しても旺盛な細胞傷害活性を示したことから、がん免疫細胞療法に臨床応用可能なエフェクター細胞であると考えられた。また、 $\gamma\delta$ T 細胞における更なる細胞特性分析に有用な実験材料となり得るものと考えられる。

キーワード: $\gamma\delta$ T 細胞, ビスフォスフォネート系薬剤, 細胞傷害活性。

Abstract

1-Hydroxy-2-imidazol-1-ylethylidene diphosphonic acid monohydrate (Zoledronate) is known as inhibitor of osteoclastic activity and stimulator of $V\gamma 9V\delta 2$ T cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) from thirteen volunteers were studied. Cells were placed in culture flasks containing AIM-V medium supplemented with 5% autologous blood plasma and 5 μ M Zoledronate in the presence of 200 IU/ml IL-2. Cultures were continued until 13 days, and sufficient culture volumes were obtained for characterization. Expanded cells showed the characteristics of $\gamma\delta$ T cells, carrying mainly $V\gamma 9V\delta 2$ T cell receptors (TcR) at a rate of $82.0\pm 4.6\%$ with a certain expansion rate ($1,782\pm 463$). Phenotypic characterization revealed that the expanded population comprised $\gamma\delta$ T cells, but they carried various natural killer (NK) cell receptors such as CD16, CD56, CD94, CD158b, CD161, and CD314. It was shown that cytotoxic activity rates were 20.2-86.0 and 36.8-44.4% against K562 and Daudi cells, respectively. In addition, in order to investigate the cytotoxic activity against myeloma cells, 6 myeloma cell lines (AM01, MOLP-2, MOLP-5, MOLP-8, RPMI-8226, and U-266) were selected, and cytotoxic activity was detected at a rate of 16.8-83.4%. Five "normal" B-lymphoblastoid cell lines (BLCLs) including B85, B239, B250, B407 and B422 were simultaneously used as target cells, and cytotoxic activity was detected at 0.3-19.0%. In conclusion, expanded $\gamma\delta$ T cells showed NK-like T cell characteristics, carrying various NK receptors, and exhibited strong cytotoxic activity against K562, Daudi, and myeloma cell lines, whilst they did not display any response to BLCLs. Expanded $\gamma\delta$ T cells could be a useful tool as not only effector cells in clinical applications for cancer immunotherapy, but also in research for the cellular characterization of $\gamma\delta$ T cells.

Key Words: $\gamma\delta$ T cells, Bisphosphonate, Cytotoxic activity.

緒 言

近年、 $\gamma\delta$ 型 T細胞受容体 ($\gamma\delta$ TcR) を有するリンパ球は一部のがんを対象とした免疫細胞療法に臨床応用が試みられている¹⁾が、細胞の機能を初めとする細胞学的特性において未だ多くの解析の余地が残されている。その最大の要因は、末梢血 T細胞の中で約5%程度と少数であり²⁾³⁾、細胞解析に必要な細胞数の確保が困難なことが挙げられる。

Tanakaら⁴⁾はリン酸系人工抗原物質が $\gamma\delta$ TcRの特異的リガンドとなることを明らかにした。以後、Bisphosphonate系薬剤が同様に $\gamma\delta$ T細胞を特異的に刺激することが明らかとなった⁵⁾。Bisphosphonate系薬剤は高カルシウム血症を伴う造血器腫瘍とりわけ多発性骨髄腫に対する骨吸収抑制薬として臨床的に投与されるが、その疾病において投与中に腫瘍細胞数の低下ならびにナチュラルキラー (NK) 細胞活性の増強が報告され、骨吸収抑制薬の薬理作用が注目された。その結果、Bisphosphonate系薬剤に $\gamma\delta$ T細胞を特異的に刺激し増幅させる作用が

明らかとなった⁴⁾⁵⁾。

われわれは本薬剤を刺激剤として *in vitro* で用いて、ヒト末梢血リンパ球の培養を行い、 $\gamma\delta$ T細胞が培養増幅できることを確認した。培養増幅した $\gamma\delta$ T細胞の細胞機能ならびに細胞表面抗原発現型の分析および TcR レパトアー解析、またサイトカイン産生能について分析を行った。さらに、培養クローン化された $\gamma\delta$ T細胞株と比較検討を行って末梢血 $\gamma\delta$ T細胞の細胞学的特性を明らかにすることを試みた。

材料と方法

細胞：

1. 健常人末梢血単核球

健常人ボランティア13名(男性3名、女性10名、年齢31~76歳)よりヘパリン加末梢血の提供を受けた。なお、本実験は研究所内倫理委員会によって認可され、ヘルシンキ宣言を遵守して実施された。ヘパリン加末梢血から比重遠心分離法によって単核球を分離し、末梢血単核球(PBMNC)として実験に用いた。健常人ボランティア13名中9名についてはBisphosphonate

系薬剤 1-hydroxy-2-imidazol-1-ylethylidene diphosphonic acid monohydrate (Zoledronate:ゾメタ(ノバルティスファーマ株式会社, 東京)による刺激を行い, 13日間培養の後, 培養増幅比率ならびに $\gamma\delta$ T細胞の含有率についての検討を行った. また, 4名については培養増幅した細胞について蛍光抗体染色法による表面抗原の分析, また, RT-PCRによる $\gamma\delta$ TcRサブタイプならびにサイトカイン産生能についての検討を行った.

2. 細胞株

ヒト $\gamma\delta$ TcR保有細胞として白血病・悪性リンパ腫由来細胞株4株, MOLT-14⁶⁾, PEER⁷⁾, LOUCY⁸⁾ および SNT-8⁹⁾ならびに HTLV-I陽性 IL-2依存性 $\gamma\delta$ T細胞株 HMGN-167¹⁰⁾の1株計5株を比較対照として用いた. また, Zoledronateの多発性骨髄腫細胞に対する作用を解析するため6種類の多発性骨髄腫由来細胞株, AM01¹¹⁾, MOLP-2¹²⁾, MOLP-5¹³⁾, MOLP-8¹⁴⁾, RPMI-8226¹⁵⁾, U-266¹⁶⁾および急性リンパ芽球性白血病細胞株 NALM-6¹⁷⁾ならびに“正常”Bリンパ芽球様細胞(BLCL)5株, B85, B239, B250, B407およびB422を標的細胞として用いた. BLCL5株のうちB85はNALM-6と同一個体由来する非白血病由来細胞株であり, 同様にB407はMOLP-5とそれぞれ同一個体由来する非悪性腫瘍由来細胞株である. これらの細胞株を標的細胞として増幅培養した $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害活性の検討を行った.

3. Zoledronateの至適濃度の検討

健常人1名よりヘパリン加末梢血を採取しPBMNCを分離し, 5%自己血漿ならびに200 IU/ml インターロイキン-2(IL-2:遺伝子組み換え型IL-2, Primmune Inc, 神戸)添加AIM-V培地(インビトロジェンジャパン, 東京)に均等な細胞浮遊液として細胞を浮遊させ, それぞれ3mlを6-well plateの各wellに蒔き込み, それぞれのwellにZoledronateを最終濃度が0, 0.1, 0.5, 1, 5および10 μ Mとなるように添加して培養を開始した. 以後, 細胞増殖に応じてAIM-V培地を加えながら増量し, 13日まで培養を継続した. 培養後 $\gamma\delta$ T細胞の誘導率を蛍

光抗体法により細胞を染色しフローサイトメーター(FACS Calibur, 日本ベクトンディッキンソン, 東京)で測定した.

4. リンパ球増幅培養

PBMNCをFicoll-Hypaque比重遠心分離法によって分離後, 洗浄し, AIM-V培地で培養を開始した. AIM-V培地は5%自己血漿ならびに200 IU/mlのIL-2を含む培養液に終濃度が5 μ MのZoledronateを培養初発時のみ加えて培養を行った. 以後, 細胞の増幅培養に際しては無血清ならびにZoledronate無添加の200 IU/ml IL-2含有AIM-V培地にて増幅培養を行った. また, $\gamma\delta$ T細胞株の培養は10%熱非働化胎児ウシ血清含有RPMI-1640培養液により培養を行った. $\gamma\delta$ T細胞株のうちSNT-8については同培地に100 IU/ml濃度のIL-2を添加して培養を行った.

5. 表面抗原分析

以下それぞれのCD抗原に対するモノクローナル抗体(MoAb)を用いて直接あるいは間接蛍光抗体法によって細胞を標識し, フローサイトメーターで測定し, 陽性率の算定を行った. 検索に用いた抗体を以下に示した: CD2 (NU-TER), CD3 (NU-T3), CD4 (NU-TH/I), CD8 (NU-TS/C), CD28 (KOLT-2), CD122 (MIC β 1), HLA-DR (NU-Ia1) (ニチレイ, 東京), CD16 (3G8), CD25 (2A3), CD161 (DX-12), CD183 (1C6/CXR3), CD194 (1G1), CD314 (1D11), CD183 (1C6/CXR3), CD194 (1G1), TcR $\alpha\beta$ (WT-31), TcR $\gamma\delta$ (11F2) (日本ベクトンディッキンソン, 東京), CD56 (NKH-1), CD94 (HP-3B1), CD158a (HP-3E4), CD158b (CH-L), (ベックマンコールタージャパン, 東京).

6. 細胞傷害活性測定

ヒト白血病由来細胞株K562をCalcein-AM色素で標識し, その細胞を標的として培養増幅した細胞をエフェクター細胞として, エフェクター(E):標的(T)比をそれぞれ1:1, 5:1, 10:1の比率で96穴プレートの各穴に蒔きこみ, プレートを湿潤箱に入れ, 37°Cで3時間静置後, 色素の放出をプレートリーダー(FLUOROSKAN ASCENT, サーモエレクトロン株式会社, 横浜)

を用いて 485/538 nm の 2 波長で測定し、以下の公式より NK 活性を求めた¹⁸⁾。

$$\% \text{Cytotoxicity} = \frac{(F \text{ experiment} - F \text{ spontaneous}) / (F \text{ total lysis} - F \text{ spontaneous}) \times 100}$$

7. 細胞ならびに RNA の調製

健康人ボランティア 4 名を対象とし、それぞれの PBMNC を Zoledronate 刺激、培養 13 日後に細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN: 東京) を用いて型どおり¹⁹⁾ に RNA を分離 cDNA の調製を行った。また、細胞株 5 株については 10% 胎児ウシ血清含有の RPMI-1640 培地で培養、対数増殖期の細胞を回収し、同様に cDNA の調製を行った。

8. RT-PCR

増幅培養によって得られた $\gamma\delta$ T 細胞の受容体型判定を各受容体サブタイプ特異的プライマーを用いて mRNA レベルでの検出を reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) により行った。プライマー配列は Table 1 に示した。また、細胞が産生する各種サイトカインについて mRNA レベルで測定した。それぞれのサイトカインについては特異的プライマーの配列とともに Table 1 に示した。

9. 細胞形態観察

サイトスピン塗抹標本をサイトスピン (Cytospin 4, Shandon, サーモエレクトロン株式会社, 横浜) で作製し、ライトーギムザによる染色を行い、生物顕微鏡 (オリンパス, 東京) 下に観察した。

結 果

1. 薬剤の至適濃度

培養 13 日目に培養増幅した細胞の $\gamma\delta$ TcR お

Table 1. RT-PCR primer sequences used

V δ 1	F	AAGCAACTTCCCAGCAAAGA
V δ 2	F	CATTGAGTTGGTGCTGAAC
V δ 3	F	TCAAGGACGGTTTTCTGTGA
C δ	R	GACAAAAACGGATGTTTGG
V γ 1	F	ATCTTCCAAC TTGGAAGGGAG
V γ 9	F	TCATACAGTTCCTGGTGTCC
V γ 10	F	TCATTCAGTGGTACCGGCAGA
V γ 11	F	GAAGGCATCCATCCAAGGCT
C γ 1/ γ 2	R	GGCACCGTTAACCAGCTAAA
IFN- γ	F	TGGCTGTACTGCCAGGACC
	R	GGACATTCAAGTCAGTTACC
IL-4	F	TGCTAGCATGTGCCGGCAACT
	R	AGGACAGGAATTCAAGC
IL-10	F	AGAACAGCTGCACCCACTTC
	R	CGCCTTGATGTCTGGGTCTT
IL-12 p35	F	AGGGCCGTCAGAACATG
	R	ATGGTAAACAGGCCTCCACTGT
IL-21	F	GGAGAGGATTGTCTATCTGC
	R	CACAGTTTGTCTACATCTTC
IL-23 p19	F	GCAGCAACCCGTAGTCCCTA
	R	CCAAATTTCCCTTCCCATCT
β -actin	F	CCCAGCACAAATGAAGATCAAGATCAT
	R	ATCTGCTGGAAGGTGGACAGCGA

F: forward

R: reverse

よび $\gamma\delta$ TcR 保有細胞の陽性率をフローサイトメーターで分析した。総細胞数では Zoledronate の濃度が 0.5 μ M の時 1.0×10^8 と最も高かったが、 $\gamma\delta$ TcR 陽性細胞の比率は 10 M の時が最も高かった。しかし、この陽性率は 5 μ M の値との間に有意な差は見られなかった。このことから 5 μ M を至適濃度と決定して実験に用いた (Table 2 および Fig. 1)。

2. PBMNC の培養

健康人ボランティア 9 名についての PBMNC における培養前の総細胞数は 11.8 ± 0.7 ($8.6 \sim$

Table 2. Determination of optimal dose of Zoledronate

Zoledronate (μ M)	0	0.1	0.5	1	5	10
$\alpha\beta$ T cells (%)	89	76	70	66	41	36
$\alpha\beta$ T cells count (1×10^6)	98	190	337	220	74	59
$\gamma\delta$ T cells (%)	5	11	21	27	47	54
$\gamma\delta$ T cells count (1×10^6)	5	27	101	89	85	88
Total cell count (1×10^6)	111	250	481	335	182	162

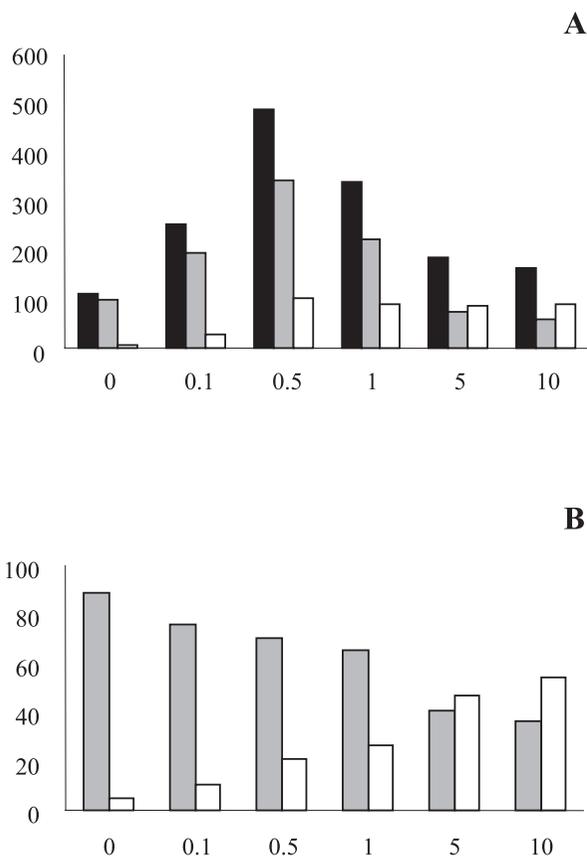


Fig. 1. Determination of optimal dose of Zoledronate.

The horizontal axis for both (A) and (B) shows the dose of Zoledronate, and vertical axis of (A) shows the number of cells (1×10^6) for total cells (■), $\gamma\delta$ (▒) and $\gamma\delta$ T cells (□). (B) shows the percent positivity for $\gamma\delta$ (▒) and $\gamma\delta$ T cells (□).

$14.8) \times 10^6$ [平均±誤差 (最小値～最大値)] であり $\gamma\delta$ T細胞の陽性率は 5.7 ± 1.5 (1.2～16.4) %であった。培養13日後の総細胞数は 16.9 ± 6.5 ($1.8 \sim 60.6$) $\times 10^8$ であり $\gamma\delta$ T細胞の陽性率は 82.0 ± 4.6 (60.0～98.7) %であった。また、培養増殖比率は 1782 ± 463 (352～4698) 倍であった (Table 3)。

3. 培養増幅した細胞の表面抗原分析

培養13日後に細胞を回収して洗浄後、各種細胞表面抗原の発現を蛍光抗体染色法によりフローサイトメーターで分析した。培養増幅した4例における $\gamma\delta$ T細胞の陽性率は 90.9 ± 3.3 (83.0～98.9) %であった。細胞表面抗原発現の

分析では CD2 : 98.6 ± 0.7 (96.5～99.4) % , CD3 : 93.4 ± 3.0 (85.4～99.0) % , CD4 : 7.7 ± 1.8 (2.9～11.0) % , CD8 : 24.3 ± 5.6 (13.0～58.9) % , CD16 : 30.0 ± 4.1 (22.7～39.0) % , CD25 : 27.2 ± 12.0 (4.9～62.4) % , CD28 : 2.8 ± 0.9 (1.7～26.2) % , CD56 : 37.2 ± 4.1 (25.1～54.3) % , CD94 : 34.5 ± 4.6 (23.2～42.7) % , CD122 : 1.9 ± 0.7 (0.6～3.9) % , CD158a : 2.6 ± 0.7 (1.1～4.4) % , CD158b : 12.2 ± 3.9 (5.2～19.6) % , CD161 : 64.5 ± 8.6 (50.1～88.8) % , CD183 : 95.7 ± 1.6 (91.4～99.4) % , CD194 : 7.8 ± 0.8 (6.5～25.5) % , CD314 : 62.3 ± 6.8 (42.1～91.6) % , HLA-DR : 70.3 ± 12.2 (40.2～90.6) % であった (Table 4)。

Table 3. Expansion ratio of $\gamma\delta$ T cells derived from PBMNCs of nine healthy volunteers

Cases	Fresh lymphocytes		Cultured lymphocytes		Expanded ratio of $\gamma\delta$ T cells
	Pre-culture		Cultured 13 days		
	Cell number (10^6)	$\gamma\delta$ T cells (%)	Cell number (10^8)	$\gamma\delta$ T cells (%)	
1	13.6	8.4	39.2	98.7	3371
2	8.6	1.7	1.8	92.9	1146
3	13.1	16.4	8.2	92.5	352
4	9.8	4.0	3.1	92.4	724
5	13.0	7.0	32.0	88.5	3094
6	14.8	1.3	1.9	60.0	573
7	8.7	1.2	2.5	60.7	1478
8	13.4	3.2	3.0	87.9	605
9	10.9	7.7	60.6	64.7	4698
Mean	11.8	5.7	16.9	82.0	1782
SE	0.7	1.5	6.5	4.6	463

Table 4. Cell surface marker analysis of expanded cells from four healthy volunteers

CD antigen	Cases			
	(% positive cells)			
	1	2	3	4
NB*	0.5	0.3	0.2	0.3
CD2	96.5	99.1	99.5	99.4
CD3	96.6	99.1	99.5	99.4
TcR $\alpha\beta$	3.0	12.0	9.2	1.6
TcR $\gamma\delta$	91.4	83.0	90.3	98.9
CD4	7.3	2.9	11.0	9.6
CD8	29.4	37.5	17.2	13.0
CD16	22.7	39.0	23.2	34.9
CD25	21.8	62.4	14.3	10.4
CD28	2.0	1.7	5.6	2.0
CD56	41.0	42.4	25.1	40.3
CD94	23.2	31.0	41.0	42.7
CD122	1.5	1.7	0.6	3.9
CD158a	2.0	4.4	1.1	3.1
CD158b	5.8	19.6	5.2	18.3
CD161	64.0	55.0	50.1	88.8
CD314	70.8	70.1	42.1	66.1
CD183	96.1	91.4	95.9	99.4
CD194	7.7	10.1	6.5	7.0
HLA-DR	60.6	90.6	40.2	89.6

NB: negative background.

4. γδ T細胞受容体レパトアー分析

細胞表面抗原を分析した4例の培養細胞についてRT-PCRによるγδ T細胞受容体サブタイプの分析を行った。δ鎖については4例全てに共通してVδ2の高発現が見られた。Vδ1およびVδ3においても4例の間において強弱の差が見られたが明らかな発現が確認された。γ鎖については4例全てに共通してVγ9の発現が見られた。同時にVδ1ならびにVδ10の発現も見られたがVγ11は全て陰性であった。

また、γδ T細胞株について同様にγδ T細胞受容体サブタイプの分析を行ったところ、Vγ9Vδ2の発現は5例中SNT-8ならびにHMGN-167の2例においてのみ陽性が確認されたがPEER, LOUCYならびにMOLT-14の3例においては陰性であった (Fig. 2)。

5. サイトカイン mRNA の発現

培養増幅細胞は全例においてIFN-γ, IL-4, IL-12p35ならびにIL-23p19のmRNAレベルでの発現が確認された。とりわけIL-4においては4例に共通して高発現していた。IL-21にお

いては低発現ながらも全例が陽性と判断された。IL-10においては1例目と3例目で発現が見られたが1例目では高発現していたものの3例目では低発現であった。また、同時に用いたγδ T細胞株において同様のサイトカイン mRNA の発現を解析したが、Vγ9Vδ2陽性の細胞株であるSNT-8ならびにHMGN-167において4例の培養増幅細胞と同様にIFN-γとIL-10の高発現が見られた。IL-23p19は低発現ながらも全例が陽性であった。また、IL-21についてはHMGN-167のみ低発現していた (Fig. 3)。

6. 細胞傷害活性測定

K562ならびにDaudi細胞をそれぞれ標的細胞として4例の増幅培養細胞の細胞傷害活性解析を行った。それぞれE:T比を1:1, 5:1および10:1として検討を行った。K562細胞に対する細胞傷害活性はE:T比10:1の時52.7±15.3(20.2~86.0)%, 同様にDaudi細胞に対しては41.7±1.7(36.8~44.4)%であった (Fig. 4)。

次に代表的な1例の増幅培養細胞を用いて多発性骨髄腫細胞株に対する細胞傷害活性につい

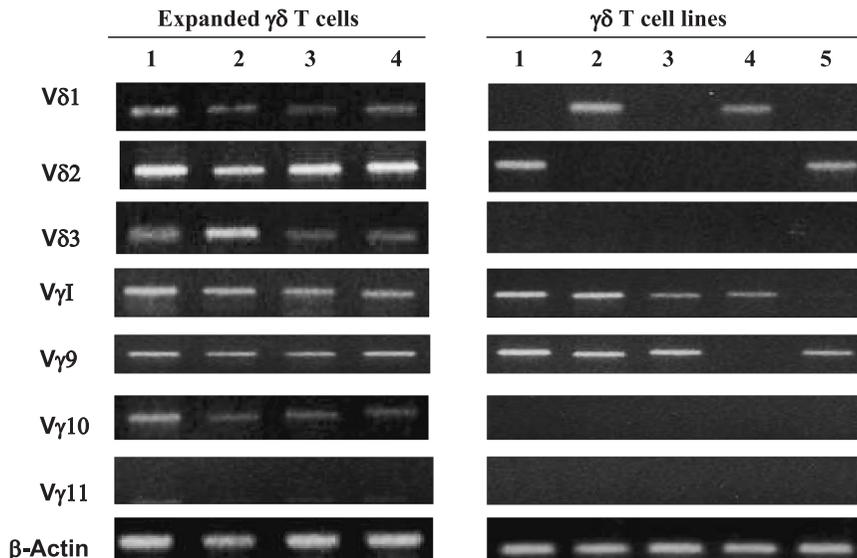


Fig. 2. RT-PCR analysis of γδ TcR repertoire.

Expanded γδ T cells and γδ T cell lines were analyzed for their TcR repertoire by RT-PCR. Four cases of expanded γδ T cells were numbered from 1 to 4, and γδ T cell lines were 1: SNT-8; 2: PEER; 3: LOUCY; 4: MOLT-14; 5: HMGN-167. β-actin is shown as a control.

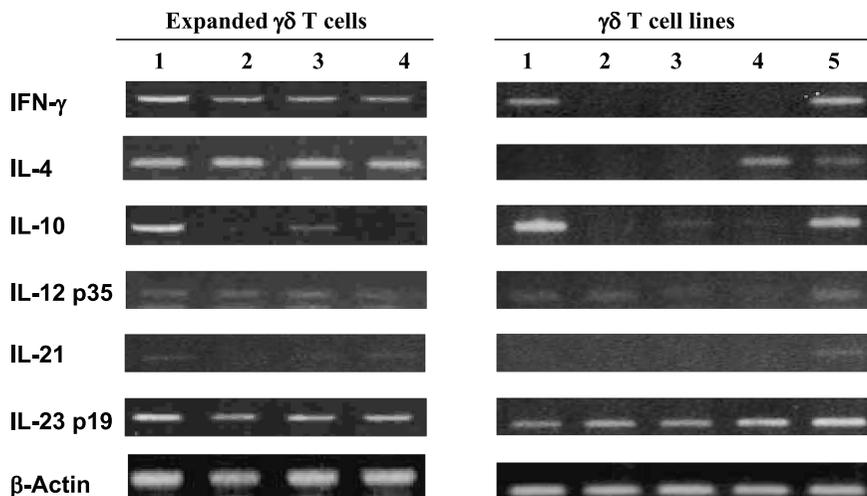


Fig. 3. RT-PCR analysis of cytokine production.

Cytokine production of expanded $\gamma\delta$ T cells and $\gamma\delta$ T cell lines were analysed by RT-PCR. Four cases of expanded $\gamma\delta$ T cells were numbered from 1 to 4, and $\gamma\delta$ T cell lines were 1: SNT-8; 2: PEER; 3: LOUCY; 4: MOLT-14; 5: HMG-167. β -actin is shown as a control.

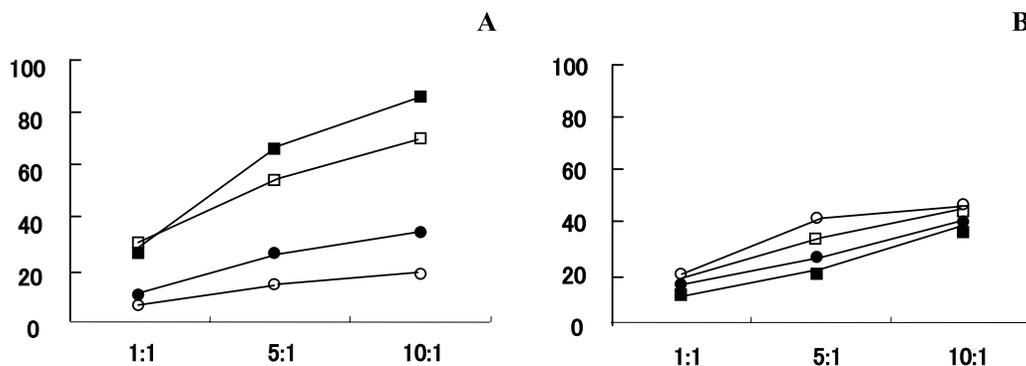


Fig. 4. Determination of cytotoxic activity against K562 and Daudi cells.

Cytotoxic activity in four cases of expanded $\gamma\delta$ T cells was tested against (A) K562 and (B) Daudi cells. Lines show case 1 (■), case 2 (□), case 3 (●), and case 4 (○). The horizontal axis represents the E:T ratio, and the vertical axis the percent cytotoxic activity.

て検討を行った。E:T比を10:1とした時、MOLP-2細胞に対しては63.9%、MOLP-5細胞に対しては54.7%、RPMI-8226に対しては83.4%、U-266細胞に対しては81.2%、およびAM01細胞に対しては16.8%の細胞傷害活性が見られた。急性リンパ性白血病由来NALM-6細胞に対しても45.5%の細胞傷害活性が見られ

た。対照としてBLCL5株に対する細胞傷害活性を測定したが、その活性は0.3~19.0%であった。B85細胞はNALM-6と同一個体由来するBLCLであり、B407はMOLP-5のそれぞれ同一個体由来するBLCLであるが、増幅培養細胞は同一個体であっても腫瘍細胞由来の細胞株に対しては細胞傷害活性を示したが、腫瘍に由来

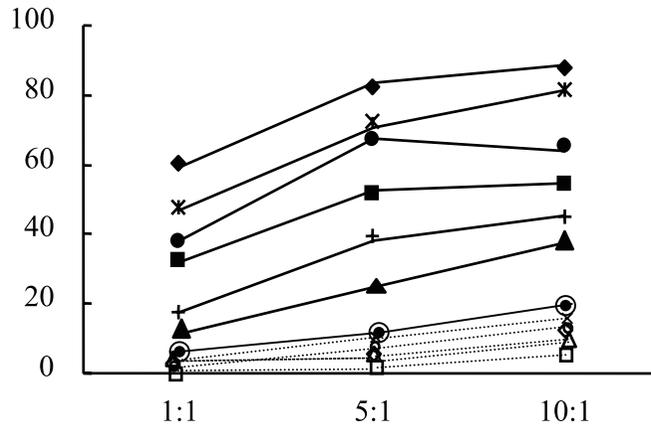


Fig. 5. Determination of cytotoxic activity against myeloma cell lines and BLCLs.

Cytotoxic activity of expanded $\gamma\delta$ T cells was tested against six myeloma cell lines: AM01 (●), MOLP-2 (●), MOLP-5 (■), MOLP-8 (▲), RPMI-8226 (◆), and U-266 (✱), one acute lymphoblastic leukemia cell line: NALM-6 (+) and five BLCLs: B85 (○), B239 (□), B250 (△), B407 (◇), and B422 (✕). The horizontal axis shows the E: T ratio, and the vertical axis the percent cytotoxic activity.

しない BLCL には細胞傷害活性は見られなかった (Fig. 5).

考 察

末梢血の $\gamma\delta$ T 細胞はその機能をはじめとする細胞特性分析において実験に必要な細胞数を確保することが困難であることから未だ明らかでない部分が多い。われわれは $\gamma\delta$ T 細胞の機能ならびに細胞表面抗原の発現様式を明らかにすべく、健常人末梢血より得た単核球を用いて Bisphosphonate 系薬剤で細胞の刺激を行い、増幅培養を行った。本薬剤による $\gamma\delta$ T 細胞の増幅培養法は既に報告¹⁾⁴⁾⁵⁾ されているが増幅培養された細胞のとりわけ表面抗原発現様式の解析は不明な部分が多い。従って本研究では増幅培養した $\gamma\delta$ T 細胞を用いて細胞機能および細胞表面抗原発現様式の解析を行った。

Bisphosphonate 系薬剤である Zoledronate での刺激による $\gamma\delta$ T 細胞の培養増幅の普遍性と培養増幅率の検討を行ったところ培養増幅率は 724~4698 倍と個体による増幅率の差が見られたが、培養増幅後の $\gamma\delta$ T 細胞の含有率は 82.6

±4.6 % と高率であった。

Bisphosphonate 系薬剤によって増幅が誘導される細胞は $V\gamma 9V\delta 2$ TcR を保有した $\gamma\delta$ T 細胞であると報告²⁾ されているが、今回のわれわれの検討では $V\gamma 9V\delta 2$ TcR mRNA の高発現が見られたものの、同時に低発現ながらも $V\gamma 1$, $V\gamma 10$, $V\delta 1$, $V\delta 3$ のそれぞれの mRNA 発現が確認された。蛋白レベルでの検索は今後の検討課題ではあるが、このことは、培養増幅された細胞集団は依然として多クローン性増殖であり、クローンレベルでの解析には細胞のクローニングが必要であると考えられる。RT-PCR による TcR 解析において培養増幅した $\gamma\delta$ T 細胞は全例において $V\gamma 9V\delta 2$ の発現が見られたが、 $\gamma\delta$ T 細胞株では HMGN-167 と SNT-8 の 2 株において同一の TcR mRNA の発現が見られたものの他の PEER, LOUCY ならびに MOLT-14 の 3 株では $V\gamma 9V\delta 2$ の発現は見られなかった。 $V\gamma 9V\delta 2$ 陽性の HMGN-167 細胞株は Zoledronate 刺激により IL-2 依存的に培養樹立された HTLV-I 陽性の成熟 $\gamma\delta$ T 細胞株であり、SNT-8 は副鼻腔原発の成熟 $\gamma\delta$ T 細胞性悪性リンパ腫由来細胞株

で、Zoledronate 非存在下に IL-2 依存的に培養樹立された細胞株で、両者共に成熟 T 細胞である。一方、PEER, LOUCY ならびに MOLT-14 はいずれも白血病由来の未熟 $\gamma\delta$ T 細胞株で、それぞれ IL-2 非依存的に培養樹立されたものである。Zoledronate 刺激に $V\gamma 9V\delta 2$ 発現型 T 細胞が反応して培養増幅されることにより、HMGN-167 は樹立されたものと考えられるが、SNT-8 の培養には Zoledronate は使用されていない。両細胞株は健康人末梢血より培養増幅された $\gamma\delta$ T 細胞と共通の $V\gamma 9V\delta 2$ TcR を発現し、また、後述の NK 関連抗原をも発現していることから細胞株として実験に有用な材料となり得るものと考えられる。

13 名中 4 名の PBMNC について培養増幅した $\gamma\delta$ T 細胞の細胞表面抗原の検索を行ったところ、 $\gamma\delta$ TcR の陽性率は 83.0~98.9%、 $\gamma\delta$ TcR の陽性率は 1.6~12.0% であった。これらの細胞は CD2, CD3, CD4, CD8, CD183 などの T 細胞関連抗原に加えて CD16, CD56, CD94, CD158b, CD161, CD314 などの NK 細胞関連抗原を著明に発現しており、血液学的な NKT 細胞の表面抗原発現型であった。

Matsuo ら¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾ は白血病・悪性リンパ腫由来の NK ならびに NKT 細胞株を用いて細胞表面抗原発現様式の解析を報告しているが、NKT 細胞株の TcR は主として $\gamma\delta$ 型であり、多様な NK 関連抗原を発現している。しかし、白血病由来の $\gamma\delta$ T 細胞株には NK 関連抗原は発現されていない。同様に上述の SNT-8 および HMGN-167 の両者の成熟型 $\gamma\delta$ T 細胞株においては、NK 細胞関連抗原の発現が見られた。これらの結果から成熟型 $\gamma\delta$ T 細胞において NK 関連抗原は普遍的に発現しているものと考えられる。未熟 $\gamma\delta$ T 細胞株に細胞傷害活性を誘導する目的で Ariyasu ら²²⁾ は 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate で細胞を刺激して活性を誘導できたことを報告しているが、このことは $\gamma\delta$ T 細胞は TcR の発現型によらず分化成熟することによって細胞傷害活性を発揮することができるようになる可能性を示唆している。

今回培養増幅した細胞は多様な NK 細胞関連

抗原を発現していることから細胞傷害活性について解析を行った。NK 細胞活性の測定に標的細胞として使用される慢性骨髄性白血病細胞株 K562 および HLA-class I 抗原欠損悪性リンパ腫細胞株 Daudi を用いて細胞傷害活性²³⁾ を解析した。培養増幅した細胞は K562 細胞ならびに Daudi 細胞に対して著明な細胞傷害活性を示した。つぎに、 $\gamma\delta$ T 細胞が多発性骨髄腫細胞に対して細胞傷害活性を持つとする報告⁵⁾ があることから、同様に多発性骨髄腫細胞に対する細胞傷害活性の解析を行った。AM01, MOLP-2, MOLP-5, MOLP-8, RPMI-8226 および U-266 の 6 種類の多発性骨髄腫細胞株ならびに急性リンパ性白血病細胞株 NALM-6 を標的とした。加えて NALM-6 と同一個体に由来の B85, MOLP-5 と同一個体に由来する B407 を含む計 5 種類のそれぞれ“正常”B 細胞株、(いずれも Epstein-Barr ウイルス感染 B リンパ芽球様細胞) を標的細胞とした。培養増幅した細胞の多発性骨髄腫細胞に対する細胞傷害活性は MOLP-2, MOLP-5, MOLP-8, RPMI-8226, U-266 に対して 37.5~83.4% の細胞傷害活性を示した。AM01 に対しては 16.8% であった。NALM-6 細胞に対しても 48.5% の細胞傷害活性がみられた。しかし、5 種類の“正常”B 細胞株については 6.4~19.0% とその細胞傷害活性は低い値であった。5 種類の多発性骨髄腫細胞のうち、AM01 細胞に対して活性が低かったのは AM01 における CD54 抗原の発現が低いために細胞接着が阻害されるのが要因であるとする Uchida ら²⁴⁾ の報告がある。従って $\gamma\delta$ T 細胞の細胞傷害活性機構には細胞接着が関わっていると考えられる。

また、MOLP-5 および NALM-6 のいずれも腫瘍細胞に対して培養増幅 $\gamma\delta$ T 細胞は旺盛な細胞傷害活性を示したが、これら腫瘍細胞と同一個体に由来する“正常”B 細胞株、それぞれ B85 および B407 に対しては細胞傷害活性は見られなかった。同様にその他の BLCL についても細胞傷害活性はみられなかった。このことは BLCL がいずれも EB ウイルスに感染しており、EB ウイルス関連の LMP-1 タンパクによる阻害が関与していることが考えられる²⁵⁾²⁶⁾。

しかしながら、今回培養増幅した $\gamma\delta$ T細胞はNK細胞と同様に関連の複数のNK受容体を発現し、旺盛な細胞傷害活性を示した。このことは本細胞を用いたがん免疫細胞療法におけるエフェクター細胞としての臨床応用への可能性を示唆するものである。また、本法は、 $\gamma\delta$ T細胞の細胞特性分析を行う上でも有用な細胞増殖法であると考えられる。

結 語

Bisphosphonate系薬剤であるZoledronateを用いることによりヒト末梢血中の $\gamma\delta$ T細胞を効率よく培養増幅できた。増幅率は 1782 ± 463 倍であった。培養増幅した $\gamma\delta$ T細胞はV γ 9V δ 2

主体のTcRを発現していたが同時にNK細胞関連抗原をも発現しておりNK様T細胞の特徴を有していた。また、これらの細胞は機能的にも旺盛な細胞傷害活性を有しており、NK細胞との類似性が見られた。特に、多発性骨髄腫由来細胞株を用いた細胞傷害試験では腫瘍細胞に特異的傷害活性を示したが、同一個体由来する“正常”B細胞株には傷害活性は見られなかった。これらのことから本薬剤を用いて培養増幅した $\gamma\delta$ T細胞はがん免疫細胞療法に有用なエフェクター細胞として臨床応用の可能性が考えられた。また、 $\gamma\delta$ T細胞は細胞数が少数であることから、細胞の解析が困難であったが本法はその細胞解析にも有用であると考えられた。

文 献

- 1) 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.
- 2) Carding SR, Egan PJ. Gammadelta Tcells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 336.
- 3) Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989; 169: 1277-1294.
- 4) Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature* 1995; 375: 155-158.
- 5) 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.
- 6) Drexler HG, editor. The leukemia-lymphoma cell line factsbook. San Diego: Academic Press; 2000.
- 7) Ravid Z, Goldblum N, Zaizov R, Schlesinger M, Kertes T, Minowada J, Verbi W, Greaves M. Establishment and characterization of a new leukaemic T-cell line (Peer) with an unusual phenotype. *Int J Cancer* 1980; 25: 705-710.
- 8) Ben-Bassat H, Shlomai Z, Kohn G, Prokocimer M. Establishment of a human T-acute lymphoblastic leukemia cell line with a (16;20) chromosome translocation. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 49: 241-248.
- 9) Nagata H, Konno A, Kimura N, Zhang Y, Kimura M, Demachi A, Sekine T, Yamamoto K, Shimizu N. Characterization of novel natural killer (NK)-cell and $\gamma\delta$ T-cell lines established from primary lesions of nasal T/NK-cell lymphomas associated with the Epstein-Barr virus. *Blood* 2001; 97: 708-713.
- 10) Nakazawa T, Tsujimura T, Imanishi J, Matsuo Y. Establishment and characterization of regulatory T cell-like gd T cell line from a patient with HTLV-I infection. Abstract In: 66th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2007 p154.
- 11) Shimizu S, Takiguchi T, Fukutoku M, Yoshioka R, Hirose Y, Fukuhara S, Ohno H, Isobe Y and Konda S. Establishment of a CD4-positive plasmacytoma cell line (AM01). *Leukemia* 1993; 7: 274-280.
- 12) Matsuo Y, Nakamura S, Adachi T, Tsubota T. Establishment and characterization of new IgD1 type myeloma cell lines, MOLP-2 and MOLP-3, expressing CD28 and CD33 antigens and the IL-6 receptor. *Hum Cell* 1993; 6: 310-313.
- 13) Matsuo Y, Drexler HG, Nishizaki C, Harashima A, Fukuda S, Kozuka T, Sezaki T, Orita K. Human bone

- marrow stroma-dependent myeloma cell line, MOLP-5, derived from a multiple myeloma patient with hyperammonemia and hypercalcemia. *Br J Haematol* 2000; 109: 54-63.
- 14) Matsuo Y, Drexler HG, Harashima A, Okochi A, Hasegawa A, Kojima K, Orita K. Induction of CD28 on the new myeloma cell line MOLP-8 with t(11;14) (q13;q32) expressing δ/λ type immunoglobulin. *Leukemia Research* 2004; 28: 869-877.
 - 15) Matsuoka Y, Moore GE, Yagi Y, Pressman D. Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma (32327). *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 125: 1246-1250.
 - 16) Nilsson K, Bennichi H, Johansson SGO, Ponten J. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clin Exp Immunol* 1970; 7: 477-489.
 - 17) Hurwitz R, Hozier J, LeBien T, Minowada J, Gajl-Peczalska K, Kubonishi I, Kersey J. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 1979; 23: 174-180.
 - 18) Lichtenfels R, Biddison WE, Schulz H, Vogt AB, Martin R. CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods* 1994; 172: 227-239.
 - 19) Matsuo Y, Drexler HG, Harashima A, Okochi A, Shimizu N, Orita K. Transcription factor expression in cell lines derived from natural killer-cell and natural killer like T-cell leukemia lymphoma. *Hum cell* 2004; 17: 85-92.
 - 20) Matsuo Y, Drexler HG. Immunophenotyping of cell lines derived from natural killer-cell and natural killer-like T-cell leukemia-lymphoma. *Leukemia Res* 2003; 27: 935-945.
 - 21) Matsuo Y, Drexler HG, Okochi A, Sugimoto A, Harashima A, Orita K. Expression and distribution of NK-associated antigens: Investigation using Leukaemia/ lymphoma-derived cell lines. In Mason D, André A, Buckley C, Civin C, Clark E, De Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Ho?ej $\gamma\delta$ V, Jones Y, Meuer S, Morrissey J, Schwarz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Turni L, Uguccioni M, van der Schoot E, Vivier E, Zola H, editors. *Leucocyte Typing VII*. Oxford University Press, Oxford, UK. 2002; pp431-434.
 - 22) Ariyasu T, Kimura N, Kikuchi M, Kohno K, Sugamura K, Watanabe T, Minowada J. Induced natural killer-like cytotoxic function in the TCR delta-1 positive human leukemic T-cell lines. *Leukemia* 1991; 5: 807-812.
 - 23) Fisch P, Meuer E, Pende D, Rothenfusser S, Viale O, Kock S, Ferrone S, Fradelizi D, Klei G, Moretta L, Rammensee HG, Boon T, Coulie P, van der Bruggen P. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3368-3379.
 - 24) 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.
 - 25) Matsuo Y, Sugimoto A, Harashima A, Nishizaki C, Ishimaru F, Kondo E, Katayama Y, Harada M, Orita K. Establishment and characterization of a novel ALL-L3 cell line (BALM-18): Induction of apoptosis by anti-IgM and inhibition of apoptosis by bone marrow stroma cells. *Leukemia Res* 1999; 23: 559-568.
 - 26) Kenney JL, Guinness ME, Curiel T, Lacy J. Antisense to the Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded Latent Membrane Protein 1 (LMP-1) Suppresses LMP-1 and Bcl-2 Expression and Promotes Apoptosis in EBV-Immortalized B Cells. *Blood* 1998; 92: 1721-1727.