

学位論文

Doctoral Thesis

AIDS 関連 primary effusion lymphoma に対する免疫療法の有効性

(Efficacy of immunotherapy against AIDS-related primary effusion  
lymphoma)

後藤 裕樹

Hiroki Goto

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻

エイズ先端研究者育成コース

指導教員

岡田 誠治 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻エイズ学Ⅲ

2014年3月

目次	
1. 要旨	1
2. 学位論文の骨格となる参考論文	2
3. 謝辞	4
4. 略語一覧	5
5. 研究の背景と目的	7
5-1. HIV/AIDS 関連悪性腫瘍	7
5-2. AIDS 関連リンパ腫(ARL)	7
5-3. KSHV/HHV-8	8
5-4. KSHV/HHV-8 の感染様式と発がん	10
5-5. Primary effusion lymphoma(PEL)	11
5-6. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞	12
5-7. 本研究の目的	14
6. 実験方法	15
6-1. 細胞株	15
6-2. 試薬	15
6-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅	15
6-4. フローサイトメトリー	15
6-5. Tetrazolium dye methylthiotetrazoletrazol(MTT)法	16
6-6. 細胞傷害活性の評価	16
6-7. マウスモデル	16
6-8. 免疫組織化学染色	17
6-9. 統計学的解析	17
7. 実験結果	18
7-1. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅	18
7-2. ゴレドロン酸による直接的な抗腫瘍効果の有無	19
7-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の抗腫瘍効果	19
7-3-1. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の PEL 細胞、Burkitt リンパ腫細胞、PBMCs に対する細胞傷害活性	19
7-3-2. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞表面上の death receptor(DR)及び MICA/B の発現	20
7-3-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞傷害のメカニズム	21
7-3-4. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の脱顆粒	22
7-4. マウスモデルを用いた V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の治療効果	23
7-4-1. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による細胞増殖抑制効果	23
7-4-2. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による臓器浸潤抑制効果	24
7-4-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の生着	27

8. 考察 .....	28
9. 結語 .....	31
10. 参考文献 .....	32

## 1. 要旨

[ 目的 ] Primary Effusion Lymphoma(PEL)は、リンパ節や節外臓器に明らかな腫瘤を形成せず、体腔内(胸腔・腹腔・心膜腔)に腫瘍細胞が浮遊した状態で発症する非ホジキン悪性リンパ腫である。HIV/AIDS 患者に特異的に発症し、KSHV/HHV-8 によるウイルス発がんが原因とされる。従来の化学療法に抵抗性で、生存期間中央値は 6 ヶ月未満と予後は極めて不良であり、新たな治療法の開発が望まれている。我々は AIDS 関連 PEL に対する V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法の有効性について検討した。

[ 方法 ] 末梢血単核球(PBMCs)をゾレドロン酸、IL-2 存在下で 14 日間培養し、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の特異的な増幅を *in vitro* で行った。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の PEL 細胞に対する細胞傷害活性をフローサイトメトリーにより評価した。阻害剤や阻害抗体を用いた実験により、PEL 細胞の認識メカニズムを検討した。NOD/Rag-2/Jak3 二重欠損マウス(NRJ マウス)の腹腔内に PEL 細胞株を移植した PEL モデルマウスを用いて、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の抗腫瘍効果の検討を行った。

[ 結果 ] V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は PEL 細胞に対して、MICA/B やメバロン酸代謝産物を認識し、perforin 経路・TRAIL 経路を介した細胞傷害活性を認めた。PEL モデルマウスにおいて、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞投与群では、コントロール群と比べ、体重増加量・腹水量の減少、遠隔臓器への浸潤抑制を認めた。

[ 考察 ] PEL は V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞が減少した AIDS 患者に発症するリンパ腫であるため、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法が有効であることが考えられた。

[ 結論 ] V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は、PEL 細胞に対して、*in vitro*、*in vivo* で高い抗腫瘍効果を認め、新たな治療法となりうることが明らかとなった。

## 2. 学位論文の骨格となる参考論文

### ① 関連論文

1. Hiroki Goto, Kouki Matsuda, Pattaravadee Srikoon, Ryusho Kariya, Shinichiro Hattori, Manabu Taura, Harutaka Katano, Seiji Okada.  
Potent antitumor activity of zoledronic acid-induced V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells against primary effusion lymphoma.  
*Cancer Lett.* 331:174-182, 2013.
2. Hiroki Goto, Ryusho Kariya, Masako Shimamoto, Eriko Kudo, Manabu Taura, Harutaka Katano, Seiji Okada.  
Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway.  
*Cancer Sci.* 103:775-781, 2012.
3. Hiroki Goto, Yuki Kojima, Hirokazu Nagai, Seiji Okada.  
Establishment of CD4-positive cell line from AIDS-related primary effusion lymphoma.  
*Int. J. Hematol.* 97:624-633, 2013.
4. Hiroki Goto, Seiji Okada.  
New approaches to treating primary effusion lymphoma.  
*Expert Opinion on Orphan Drugs* 1:1019-1029, 2013.

### ② その他の論文

1. Taura M, Kariya R, Kudo E, Goto H, Iwawaki T, Amano M, Suico MA, Kai H, Mitsuya H, Okada S.  
Comparative analysis of ER stress response into HIV protease inhibitors: Lopinavir but not darunavir induces potent ER stress response via ROS/JNK pathway.  
*Free Radic. Biol. Med.* 65:778-788, 2013.
2. Suzu I, Goto H, Hiwatashia N, Hattori S, Rotjanapanb K, Leeanansaksirib W, Okada S.  
Antioxidant and Antityrosinase Activity of *Cissus quadrangularis* Extract.  
*Natural Product Communications* 8:629-630, 2013.
3. Kudo E, Taura M, Matsuda K, Shimamoto M, Kariya R, Goto H, Hattori S, Kimura S, Okada S.  
Inhibition of HIV-1 replication by a tricyclic coumarin GUT-70 in acutely and chronically infected cells.

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23:606-609, 2013.

4. Michai M, Goto H, Hattori S, Vaeteewoottacharn K, Wongkham C, Wongkham S, Okada S.

Soluble CD30: a possible serum tumor marker for primary effusion lymphoma.

*Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13:4939-4941, 2012.

5. Taura M, Suico MA, Koyama K, Komatsu K, Miyakita R, Matsumoto C, Kudo E, Kariya R, Goto H, Kitajima S, Takahashi C, Shuto T, Nakao M, Okada S, Kai H. Rb/E2F1 regulates the innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells.

*Mol. Cell. Biol.* 32:1581-1590, 2012.

### 3. 謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学教育部エイズ学Ⅲ分野 岡田 誠治 教授に深甚なる謝意を表します。

実験に御協力いただきました国立感染症研究所 片野 晴隆 先生に厚く感謝の意を表します。

研究を御支援・御助言いただきました熊本大学エイズ学研究センターの皆様に深く感謝いたします。

最後に、これまで支えてくれた、両親、妻・章子、博士課程在籍中に誕生した倫太郎、亜紗奈には、ここに改めて感謝の念を表したいと思います。

#### 4. 略語一覽

ADM: AIDS-defining malignancies  
AIDS: acquired immunodeficiency syndrome  
ARL: AIDS-related lymphoma  
BSA: bovine serum albumin  
cART: combination antiretroviral therapy  
CMA: concanamycin A  
DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma  
DR: death receptor  
EBV: Epstein-Barr virus  
E/T: effector/target  
FADD: Fas-associated protein with Death Domain  
FBS: fetal bovine serum  
FITC: fluorescein isothiocyanate  
FPP: farnesyl pyrophosphate  
HE: hematoxylin-eosin  
HHV-8: human herpes virus-8  
HIV: human immunodeficiency virus  
IL-2: interleukin-2  
IPP: isopentenylpyrophosphate  
KS: Kaposi's sarcoma  
KSHV: Kaposi's sarcoma-associated herpes virus  
LANA: latency-associated nuclear antigen  
LTNP: Long term non-progressors  
LUR: long unique region  
MCD: multicentric Castleman's disease  
Mev: mevastatin  
MFI: mean fluorescence intensity  
MHC: major histocompatibility complex  
NADM: non-AIDS-defining malignancies  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor-kappa B  
NHL: non-Hodgkin lymphoma  
ORF: open reading frame  
PBMCs: peripheral blood mononuclear cells  
PBS: phosphate buffered saline



PE: phycoerythrin

PEL: primary effusion lymphoma

PI: propidium iodide

TCR: T-cell receptor

TR: terminal repeat

TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

v-FLIP: viral FLICE inhibitory protein

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1. HIV/AIDS 関連悪性腫瘍

HIV-1 感染者は健常人と比べ高頻度に悪性腫瘍を合併する(1)(表 1)。HIV-1 感染者の高齢化、腫瘍ウイルスの共感染、慢性的な免疫不全・炎症、生活習慣等により、HIV-1 感染者の約 3 人に 1 人は悪性腫瘍が原因で亡くなるようになった(2)。HIV/AIDS 関連悪性腫瘍は HIV-1 感染者の長期予後を規定し、悪性腫瘍の予防推進及び治療法の確立が急務となっている。HIV-1 感染者に発症する悪性腫瘍は、エイズ指標悪性腫瘍(AIDS-defining malignancies: ADM)と非エイズ指標悪性腫瘍(non-AIDS-defining malignancies: NADM)の二つに分類される。ADM は、エイズ発症の指標となる悪性腫瘍を指しており、カポジ肉腫(Kaposi's sarcoma: KS)、原発性脳リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(non-Hodgkin lymphoma: NHL)、浸潤性子宮頸癌の 4 つが挙げられる。エイズ指標疾患には含まれない NADM は一般に CD4 値と関係なく発症しており(3)、多剤併用抗ウイルス療法(combination antiretroviral therapy : cART)による HIV-1 感染のコントロールが良好な例でも発症する。

		発症数	発症率 (/10万人/年)	標準化罹患比 (Standardized incidence ratio; SIR)
すべての癌		871	468	2.1
エイズ指標 悪性腫瘍	カポジ肉腫	173	93	1.3
	非ホジキンリンパ腫	203	109	7.3
	原発性脳リンパ腫	28	15	250
	浸潤性子宮頸癌	28	44	2.9
非エイズ指 標悪性腫瘍	ホジキンリンパ腫	36	19	5.6
	肛門癌	18	10	9.2
	口腔/喉頭癌	26	14	1.7
	肺癌	109	59	2.6
	肝癌	14	8	2.7

表 1 HIV/AIDS 関連悪性腫瘍における標準化罹患比(米国)：文献(1)より引用・改変  
(HIV-1 感染者: 57,350 人, 1991-2002 年に登録)

### 5-2. AIDS 関連リンパ腫(ARL)

AIDS 関連リンパ腫(AIDS-related lymphoma: ARL)は、ADM で最も多く、cART 導入後、AIDS 患者の死因の主なものの一つとなっている。WHO 分類において、ARL は大きく 3 つのカテゴリーに分類される(表 2)。ほとんどが B 細胞性リンパ腫であり、Diffuse large

B-cell lymphoma(DLBCL)が最も多く(約 60%)、次いで、Burkitt リンパ腫が多い(約 30%)。また、頻度は少ないが primary effusion lymphoma(PEL)や plasmablastic lymphoma 等の AIDS に特異的なリンパ腫が存在する。ARL では、非 AIDS 例の悪性リンパ腫に比べて、発熱、夜間盗汗、体重減少等の B 症状を認めることが多く(75-85%)、中枢神経、消化管、骨髄、肝臓、肺等の節外臓器に高頻度に発生する(4)(表 3)。特に EBV 感染例では、中枢神経浸潤の確率が高い。予後不良因子としては、CD4 陽性リンパ球数低値(<100/ $\mu$ l)、病期: III or IV、年齢: 35 歳以上、Performance status(PS)不良、AIDS 発症、静脈麻薬常用者、LDH 高値、cART への反応不良、などがある(5)。cART 導入以前は、ARL に対しての標準的 chemotherapy は合併症の頻度が高かったため、抗腫瘍薬の投与量を減らした治療が行われてきた。そのため、従来の標準治療と比べて、完全寛解率も低く、満足いく治療成績は得られていなかった。cART 普及後、ARL の中でも、特に DLBCL の治療成績は劇的に改善し、多剤併用 chemotherapy である CHOP 療法による完全寛解率は、45-65%となっている(5)。

Lymphomas also occurring in immunocompetent patients	Lymphomas occurring more specifically in HIV-positive patients	Lymphomas occurring in other immunodeficient states
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Burkitt lymphoma</li> <li>• Diffuse large B-cell lymphoma</li> <li>• Others</li> <li>  Malt lymphoma</li> <li>  Peripheral T/NK cell lymphoma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Primary effusion lymphoma</li> <li>• Plasmablastic lymphoma</li> <li>• Lymphomas arising in HHV8- associated Castleman disease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymorphic B-cell lymphoma (PTLD-like)</li> </ul>

表 2 ARL の WHO 分類

<ul style="list-style-type: none"> <li>• HIV-1感染者の5-20%に合併する</li> <li>• Aggressive lymphomaが大部分を占める</li> <li>• 発熱、夜間盗汗、体重減少等のB症状(全身症状)を呈することが多い</li> <li>• 診断時に病変が進行していることが多い(75%以上がStage III/IV)</li> <li>• 中枢神経、消化管、骨髄、肝臓、肺等の節外病変が多い</li> <li>• 組織の炎症を伴い、病理診断が困難となることがある</li> <li>• HIV-1感染と日和見感染症のコントロールが重要となる</li> <li>• cARTを行わずにリンパ腫を治療すると、HIV-1感染が悪化することがある</li> </ul>
---

表 3 ARL の特徴

### 5-3. KSHV/HHV-8

KSHV(Kaposi's sarcoma-associated herpes virus)/HHV-8(human herpes virus-8)は、1994 年、AIDS 患者に合併した KS より発見された(6)。KSHV/HHV-8 遺伝子は約 140kbp の固有の遺伝子配列(long unique region: LUR)の両端に 801bp の繰り返し配列(terminal repeat: TR)が位置する。LUR には約 90 の ORF(open reading frame)が含まれている(図

1)(7)。ORFは herpesvirus saimir のホモログ遺伝子を示し、KSHV/HHV-8に特徴的な ORF は K1-K15 と名付けられた。これらの ORF の中には、DNA 合成・複製や構造遺伝子等のウイルス複製のための遺伝子の他に、細胞増殖、アポトーシス阻害、サイトカイン産生等の発がんに関与するものも含まれる。KSHV/HHV-8 は、ヒトに KS、multicentric Castleman's disease(MCD)、PEL を引き起こし、ヒトヘルペスウイルスの中では、Epstein-Barr virus(EBV)同様に、がんウイルスであると考えられている(表 4)。KSHV/HHV-8 を感染したヒトが必ずこれらの悪性腫瘍を発症するわけではなく、AIDS 等の免疫不全患者に発症し、日和見腫瘍であると考えられる。健常人における KSHV/HHV-8 感染率は、アフリカ諸国で 40-50%、イタリア等の地中海沿岸及び北米では 10%、日本を含む他の地域では 5%以下と地域によって大きく異なる(8)。感染経路としては、唾液、粘膜分泌液、性行為等の経路が考えられている。特に、AIDS 合併の KS は、MSM(men who have sex with men)で大部分が発症するため、男性同性愛の性行動に関係している可能性がある。

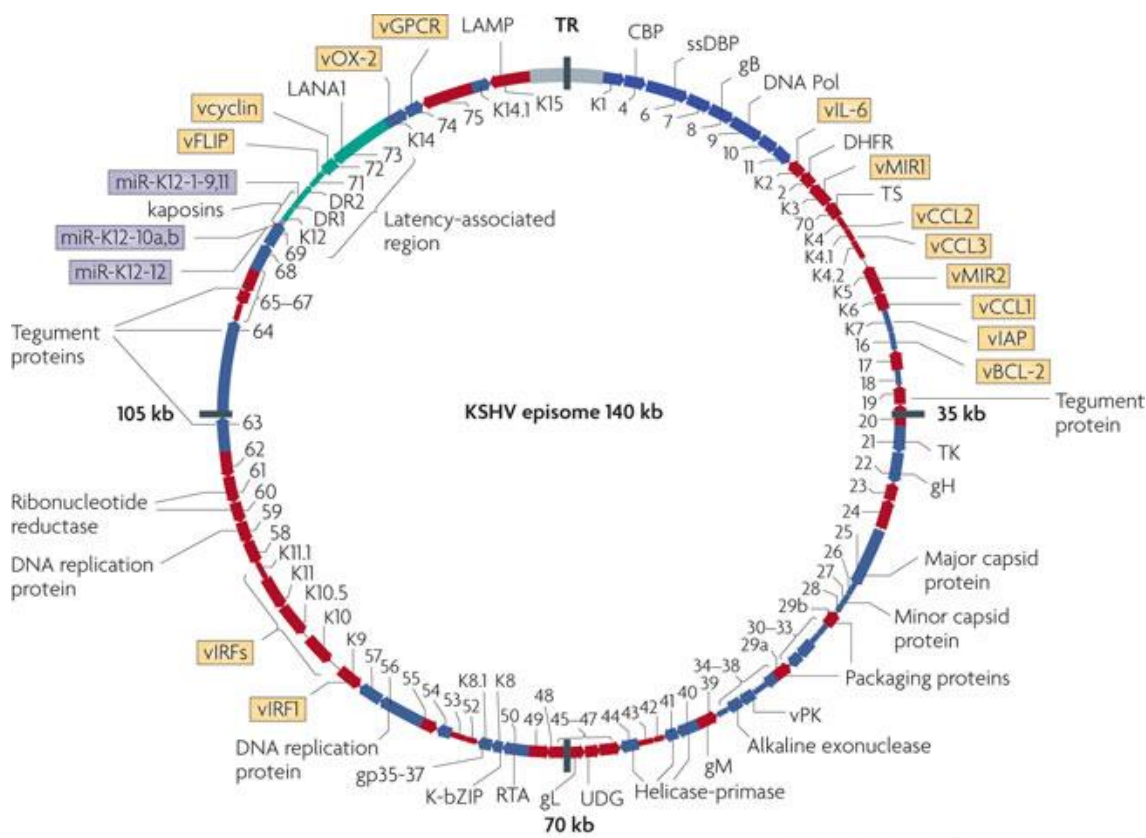


図 1 KSHV/HHV-8 遺伝子配列: 文献(7)より引用

	PEL	MCD	KS
腫瘍	リンパ腫	リンパ増殖性疾患	肉腫
細胞起源	post-germinal center B 細胞	naïve B 細胞	血管内皮細胞
臓器	体腔内	リンパ節	皮膚, 内臓
EBV	+ (50-80%)	—	—

表 4 KSHV 関連腫瘍

#### 5-4. KSHV/HHV-8 の感染様式と発がん

感染により細胞内に入った KSHV/HHV-8 には、溶解感染と潜伏感染の二つの感染状態があり、それぞれの状態で機能するウイルス蛋白も異なる。溶解感染ではウイルスが盛んに複製され、それに伴い感染細胞が「溶解」してしまう。一方、潜伏感染では、ウイルスは複製されず、細胞死は誘導されない状態となる。KS や PEL では、潜伏感染状態にある。しかしながら、これらの腫瘍のごく一部の細胞では、溶解感染が起こっており、溶解感染に関連するウイルス蛋白の発現を介して、ウイルスの放出及び微小環境の保持に寄与していると考えられる。潜伏感染遺伝子は、latency-associated nuclear antigen(LANA)-1、v-cyclin(ORF72)、viral FLICE inhibitory protein(v-FLIP, K13)、Kaposin(K12)、LANA-2(K10.5)の 5 つに限られ、これらの遺伝子の発がんへの関与が示唆されている(図 2)。特に、LANA-1 は潜伏感染蛋白の中でも発現量が高く、KS や PEL において必ず検出され、診断においても重要である。LANA-1 は、がん抑制遺伝子 p53 と結合し、p53 依存的なアポトーシスを阻害する(9)。また、LANA-1 は、がん抑制遺伝子 Rb に対しても結合し、Rb-E2F の経路を阻害し、細胞増殖を促す(10)。v-cyclin は Cdk-6 と p27<sup>KIP1</sup> と結合しリン酸化することで宿主細胞の増殖を促進する(11)。LANA-2 は Caspase を抑制するが、その病的意義は不明な部分が多い。v-FLIP は、Fas-associated protein with Death Domain(FADD)や Caspase-8 に結合し Fas 経路によるアポトーシスを阻害するとともに(12)、NF-κB(nuclear factor-kappa B)経路の IKKγ と結合し NF-κB の恒常的な活性化を引き起こす(13)。Kaposin A は線維芽細胞の形質転換を誘導し、Kaposin B は MAP kinase-associated protein 2(MK2) のアダプタータンパクとして働き、サイトカインの発現誘導に関与するが、リンパ球への影響は明らかではない(14)。

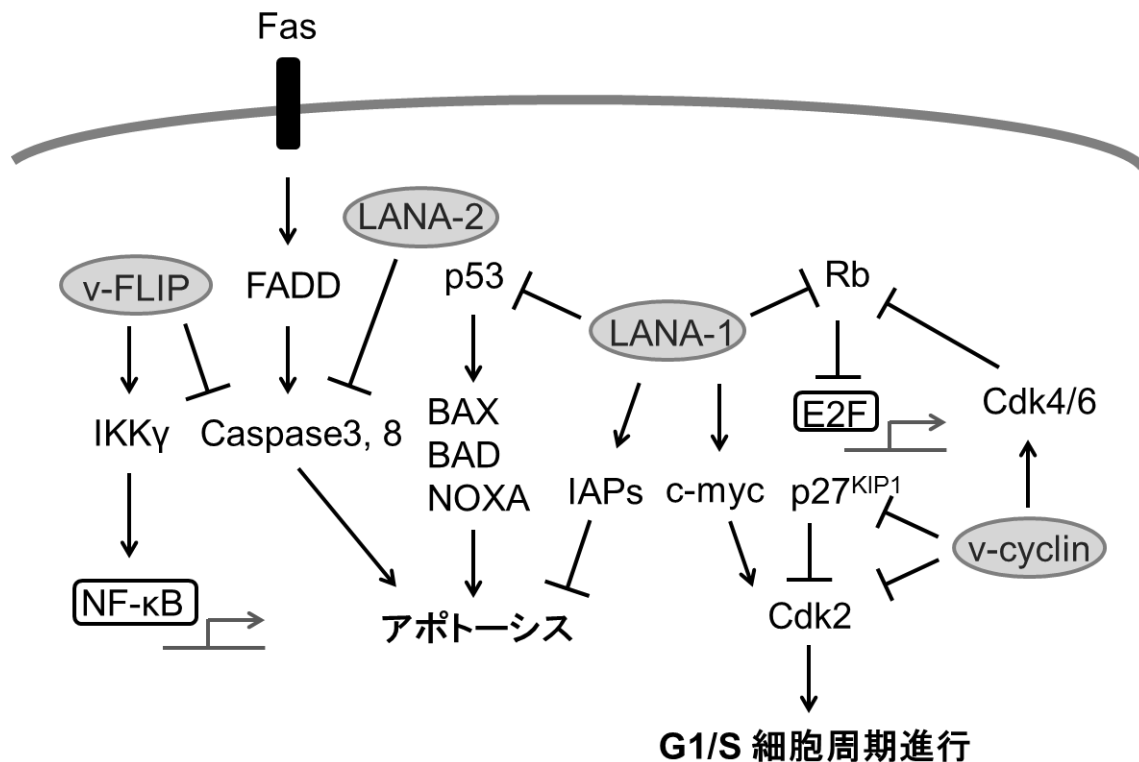


図 2 KSHV/HHV-8 蛋白によるアポトーシスの抑制及び細胞周期の進行

### 5-5. Primary effusion lymphoma(PEL)

PEL は、リンパ節や節外臓器に明らかな腫瘍を形成せず、体腔内(胸腔・腹腔・心膜腔)に腫瘍細胞が浮遊した状態で発症する B 細胞性リンパ腫である(15, 16)。細胞の形態としては、核が大型で異型性が強く明瞭な核小体を有する(図 3)。1995 年に Cesarman らが体腔内に限局した ARL において KSHV/HHV-8 DNA を同定し(15)、1996 年に Nador らが体液貯留形成を認め KSHV/HHV-8 感染を伴うリンパ腫を一つの疾患概念として提唱した(16)。KSHV/HHV-8 の B 細胞への感染が原因であり、その 50-80%に EBV 感染が合併する。ARL の 1-5%を占めるが、AIDS に特異的に発症するリンパ腫とされる(17)。免疫学的表現型として、CD45 が陽性であるが、CD19、CD20、CD79a 等の B 細胞マーカーや免疫グロブリン(細胞表面・細胞質内)は陰性である。通常、T/NK 細胞マーカーは陰性であり、細胞系統の決定は困難だが、免疫グロブリン遺伝子の再構成が認められることから、B 細胞性リンパ腫に分類される。CD30、CD71、EMA(epithelial membrane antigen)等の活性化マーカー及び CD38、CD138 等の形質細胞関連マーカーは陽性で、B 細胞の中でも post-germinal center B 細胞が細胞起源であると考えられる。特定の染色体異常は認められない。診断には、LANA-1 の免疫染色が決め手となり、表面マーカーや PCR による KSHV/HHV-8 の同定も補助診断として有用である。化学療法に対して抵抗性で、通常の NHL において行われ

る CHOP 療法の完全寛解率は 40-50%にとどまり、生存期間中央値は 6 ヶ月以内と予後は極めて不良である(18)。

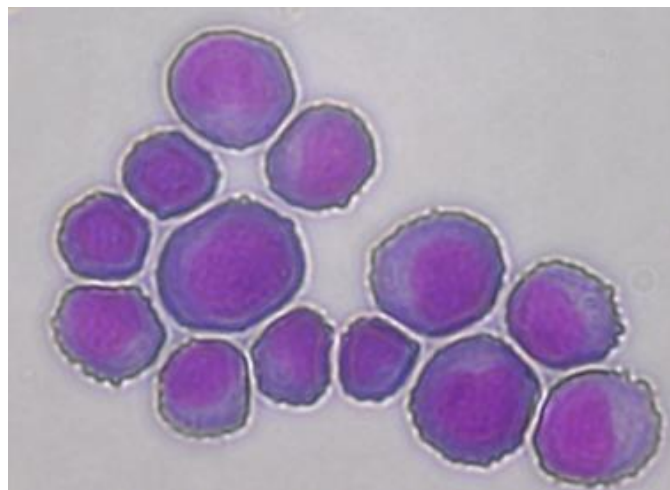


図 3 PEL 細胞の形態

#### 5-6. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は、主に末梢血に存在する  $\gamma\delta$ T 細胞で、末梢血リンパ球の 1-10%を占める(19)。細胞は小型～中型で細胞質に少数のアズール顆粒を有する(図 4)。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は、 $\gamma\delta$ TCR(T-cell receptor)、NKG2D 等を介して腫瘍細胞を認識し、perforin/granzyme や TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) 経路を介して MHC(major histocompatibility complex)非拘束性の細胞傷害活性を示す(図 5)。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の TCR はリン酸化抗原を認識することが知られており、コレステロール代謝におけるメバロン酸経路のイソペンテニルピロリン酸(isopentenyl pyrophosphate: IPP)を認識する。

AIDS 患者では V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞が減少し機能が低下しているとともに(20)、cART を開始することで V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の数及び機能を改善するという報告がある(21, 22)。また、一部の Long term non-progressors(LTNP)において、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の減少は認められないとされる(23)。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞が減少する機序として、HIV エンベロープが CCR5 及び integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 を介して  $\gamma\delta$ T 細胞の細胞死を誘導するという *in vitro* の報告がある(24)。以上の報告から、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は、HIV/AIDS の病態進行抑制や日和見感染症、日和見悪性腫瘍の抑制に関わっている可能性が示唆されている。

また、第三世代ビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸(zoledronic acid: Zol)が抗原提示細胞におけるメバロン酸経路のファルネシルピロリン酸合成酵素(farnesyl pyrophosphate: FPP)を阻害することで IPP を蓄積させ、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を誘導することが報告されている(25)(図 6)。

近年、この V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を利用した免疫療法が、がん治療において注目されている。



図 4 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の形態

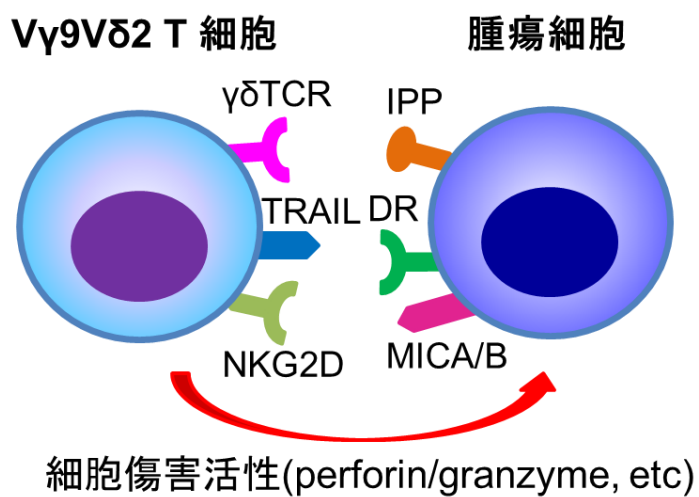


図 5 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の腫瘍細胞の認識及び細胞傷害活性



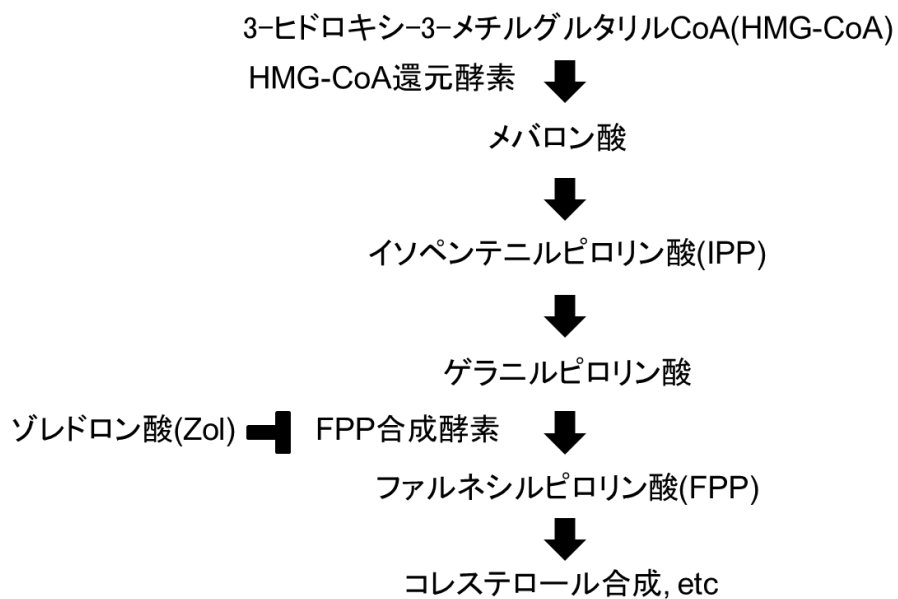


図 6 Zol による V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅

#### 5-7. 本研究の目的

ARL の中でも PEL は従来の治療法に対して極めて抵抗性の悪性リンパ腫であり、新たな治療法の開発が望まれている。また、前述のように、HIV/AIDS 患者においては免疫不全状態が ARL の発症に関わっており、効率的な免疫細胞の誘導は新たな治療戦略の可能性を秘めている。

本研究では、AIDS 関連 PEL に対する V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法の有効性を検証するために、*in vitro* 及び *in vivo* の前臨床試験段階に相当するマウスモデルを用いて治療評価することを目的とする。

## 6. 実験方法

### 6-1. 細胞株

PEL 細胞株は BCBL-1、BC-1、BC-3 の 3 種類、Burkitt リンパ腫の細胞株は Daudi を用いて、実験を行った。BCBL-1 は NIH より入手し、BC-1、BC-3 は ATCC より購入し、Daudi は理研細胞バンクより購入した。BCBL-1、BC-1、BC-3、Daudi は 10%ウシ胎児血清(FBS: fetal bovine serum)含有 RPMI1640 を用いて、CO<sub>2</sub> インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>)内で培養を行った。

### 6-2. 試薬

ゾレドロン酸(Zol: zoledronic acid)はノバルティス社より提供を受けた。

### 6-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅

健常人ドナーより書面を含むインフォームドコンセントを得た後に、末梢血を採取した。健常人の末梢血に対して、Pancoll(PAN Biotech GmbH)を用いた密度勾配遠心法により、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells: PBMCs)を分離した。PBMCs に終濃度 1 $\mu$ M の Zol を添加し、10%非働化 FBS を加えた RPMI1640 を用いて 14 日間 CO<sub>2</sub> インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>)内で培養を行った。培養後 1、5、9、13 日に終濃度 100 U/ml の interleukin-2(IL-2)を加えた。培養後 14 日目に、 $\gamma$  $\delta$ T 細胞分離キット(Miltenyi Biotec)を用いた磁気細胞分離を行い、95.0%以上まで純化した。

### 6-4. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーにおいて、以下の抗体を用いて解析を行った。抗ヒトモノクローナル抗体: TCR V $\gamma$ 9-phycoerythrin(PE)、TCR V $\delta$ 2-fluorescein isothiocyanate(FITC)、DR4(TRAIL-R1)-PE、DR5(TRAIL-R2)-PE、CD107a-PE、CD45-pacific blue(PB)、MICA/B-Alexafluor(AF) 647、CD138-FITC、Fas(CD95)-PE; 抗マウスモノクローナル抗体: CD45-AF 700。

細胞を緩衝液(3%FBS と 0.05%アジ化ナトリウムを含有した PBS)で洗浄した後、抗体で氷上 30 分間染色を行い、再度、洗浄を行った後、500  $\mu$ l の緩衝液に懸濁し、LSRII(BD Bioscience)を用いて解析した。データ解析は、Flow Jo software(Tree Star)を用いて行った。

CD107a の発現検出において、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞と PEL 細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>)内において E/T(effector/target)比 1 で 1 時間培養した後、終濃度 10  $\mu$ g/ml の

brefeldin A(Sigma-Aldrich)を添加し、さらに4時間培養した。その後、細胞を洗浄し TCR V $\beta$ 2-FITC と CD107a-PE で染色し、解析を行った。

#### 6-5. Tetrazolium dye methylthiotetrazole(MTT)法

96 ウェル培養プレートに  $2 \times 10^5$ /ml の細胞数で1 ウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ3箇所に入れた。薬剤投与後の測定値を平均値 $\pm$ 標準偏差で評価した。測定時には MTT(最終濃度: 0.5 mg/ml)をそれぞれ 10  $\mu$ l ずつ加えた後、3時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で反応させ、0.01 N の HCl を加えたイソプロピルアルコールを 100  $\mu$ l ずつ入れ、結晶を溶解させ、ELISA プレートリーダー(Multiskan; Thermo Electron Vantaa)を用いて、595 nm で測定を行った。

#### 6-6. 細胞傷害活性の評価

細胞傷害活性は、CFSE(Invitrogen)と propidium iodide(PI)を用いて、フローサイトメトリーで解析した。CFSE の染色において、50  $\mu$ l の CFSE と標的細胞を含んだ 1 ml の PBS( $5 \times 10^5$ /ml)を混合し、CFSE の終濃度を 2.5  $\mu$ M とし培養した。培養5分後に穏やかに攪拌し、10分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター(37°C、5%CO<sub>2</sub>)で培養した。培養10分後に1 ml の FBS を添加して、染色反応を停止させた。その後、室温で 400g 5分間遠心し、冷 PBS で2回洗浄し、10%FBS 含有 RPMI1640 中に懸濁した。 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ /ml の細胞濃度の V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞 100  $\mu$ l を CFSE で染色した標的細胞 100 $\mu$ l とともにポリスチレンラウンドチューブに添加し、E/T 比 1、5、10 で、4時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養4時間後、300  $\mu$ l の 10%FBS 含有 RPMI1640 と 1 $\mu$ l の 10 mg/ml PI を添加し、15分間反応させ、LSRII サイトメーターで解析した。CFSE 陽性細胞中の PI 陽性細胞の割合(CFSE+PI+ /CFSE+)を用いて、細胞傷害活性を定量化した。

PEL に対する V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞傷害のメカニズムを検討するため、阻害剤及び阻害抗体を用いた阻害実験を行った。パーフォリンの阻害剤である concanamycin A(CMA)(A.G. Scientific, Inc.)は、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞と終濃度 300 nM で 30分間培養し、その後、洗浄せず、PEL 細胞と共培養した。メバロン酸経路の阻害剤である mevastatin(Mev)(Sigma-Aldrich) は PEL 細胞と終濃度 25  $\mu$ M で 60分間培養し、その後、洗浄せず、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞と共培養した。また、阻害抗体として抗 Fas ligand(FasL)抗体(clone NOK-1)、抗 MICA/B 抗体(clone 6D4)、抗 TRAIL 抗体(clone RIK-2)、mouse IgG1 isotype control (clone MG1-45)、mouse IgG2a isotype control を終濃度 10 $\mu$ g/ml として添加した。CMA と Mev による前処理において細胞毒性は認められなかった。

#### 6-7. マウスモデル

NOD 系統と Rag-2 欠損(Rag2<sup>-/-</sup>)マウスまたは Jak3 欠損(Jak3<sup>-/-</sup>)マウスを 10 世代以上かけ合わせて、NOD/Rag-2 欠損マウスと NOD/Jak3 欠損マウスを樹立した。さらに、NOD/Rag-2 欠損マウスと NOD/Jak3 欠損マウスをかけ合わせて、NOD/Rag-2/Jak3 二重欠損マウス(NRJ マウス)を樹立した。動物の飼育は熊本大学動物資源開発研究施設で行い、熊本大学動物実験における倫理基準に基づき実験を行った。

PEL 細胞株移植モデルの作製にあたって、8 から 12 週齢の NRJ マウスに  $7 \times 10^6$  の BCBL-1 または BC-3 を 200 $\mu$ l の PBS に懸濁し、腹腔内投与した。移植後 3 日目より、200 $\mu$ l の PBS または *ex vivo* で増幅し 200 $\mu$ l の PBS に懸濁した  $3 \times 10^7$  の V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を週 1 回腹腔内投与した。また、移植後 3 日目に 2  $\mu$ g の Zol を腹腔内投与し、3000U の IL-2 を週 2 回腹腔内投与した。移植後 31 日目に、体重増加量、腹水量、肺・肝臓の組織染色、脾臓中のヒト CD45+CD138+細胞をフローサイトメトリーで定量化することで、腫瘍量を評価した。

#### 6-8. 免疫組織化学染色

KSHV/HHV-8 ORF73(LANA)蛋白を検出するために、組織標本を 10%ホルマリン含有中性緩衝液で固定した後、パラフィン包埋を行い、4  $\mu$ m に切断した。キシレン、エタノールに浸して、脱パラフィン化し、distilled water で再水和させた。15 分間、マイクロウェーブ照射で抗原賦活化した。0.6% $H_2O_2$  含有メタノールで室温 30 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。PA1-73N 抗体を 5%BSA(bovine serum albumin)含有 PBS に 1:3000 で希釈し、組織切片を 4°C で一晩反応させた。PBS で 2 回洗浄した後、高感度検出キットである catalyzed signal amplification kit(Dako)を用いて処理した。0.2 mg/ml ジアミノベンジン及び 0.015% $H_2O_2$  含有 Tris-HCl(pH7.6)で発色した。

#### 6-9. 統計学的解析

統計学的有意差は、Student's *t*-test において、 $P < 0.05$  とした。

## 7. 実験結果

### 7-1. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅

PBMCs を Zol、IL-2 存在下で培養し、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の特異的な増幅を *in vitro* で行い、培養 14 日目には、80%以上の割合まで増幅できた(図 7A)。3 人の健常人ドナーにおいて検討したところ、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の絶対数は 88.0 倍から 134.1 倍まで増幅可能であった(図 7B)。

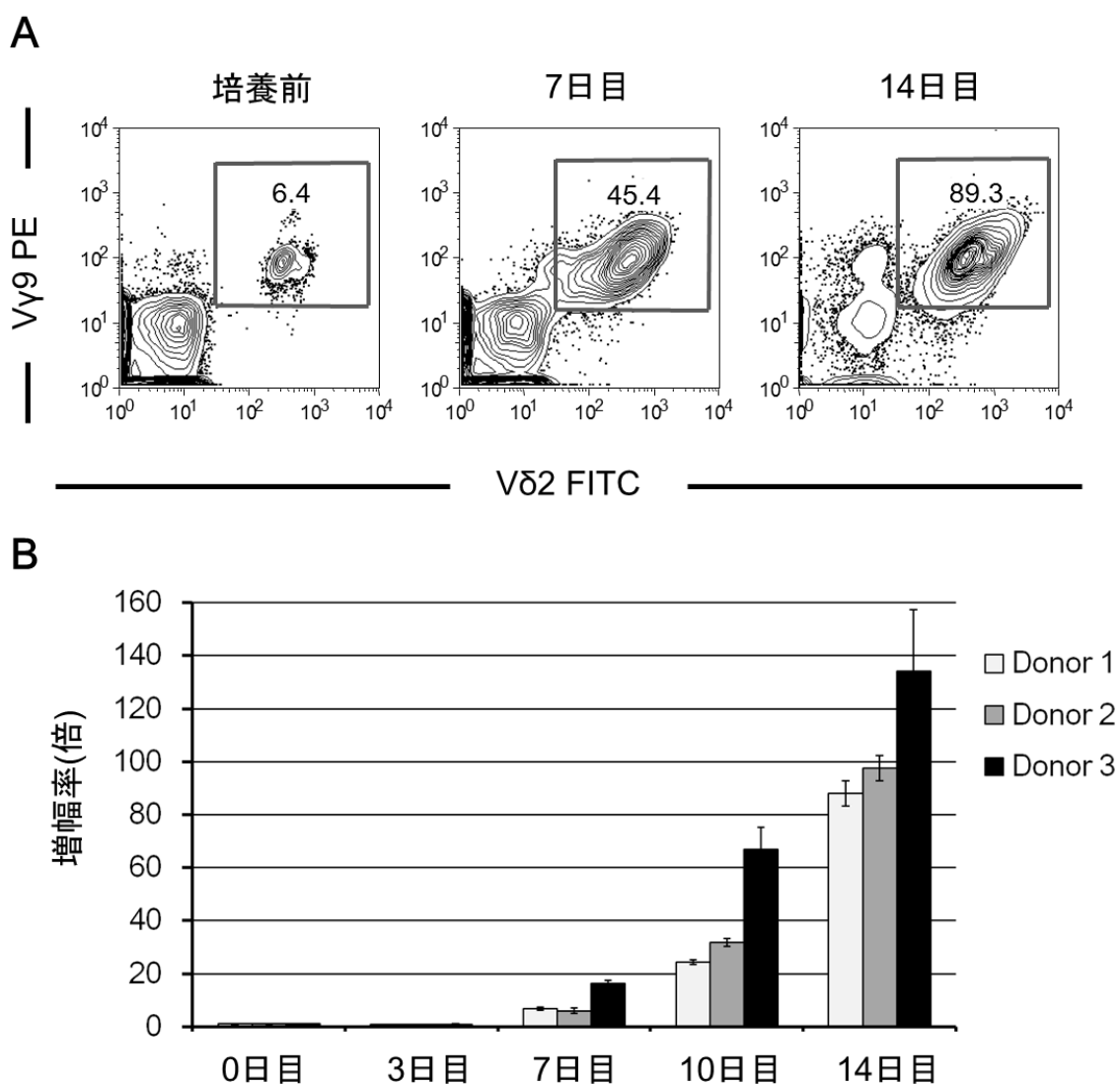


図 7 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅

A, 培養前及び培養後 7、14 日目における V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の割合。B, 培養前及び培養後 3、7、10、14 日目における V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の増幅。3 回の実験を行い、結果は平均±標準偏差で算出した。

## 7-2. ゴレドロン酸による直接的な抗腫瘍効果の有無

ゴレドロン酸(Zol)による PEL 細胞に対する抗腫瘍効果の有無について MTT 法によって評価した。Zol は PEL 細胞に対して明らかな増殖抑制効果は認めなかった(図 8)。

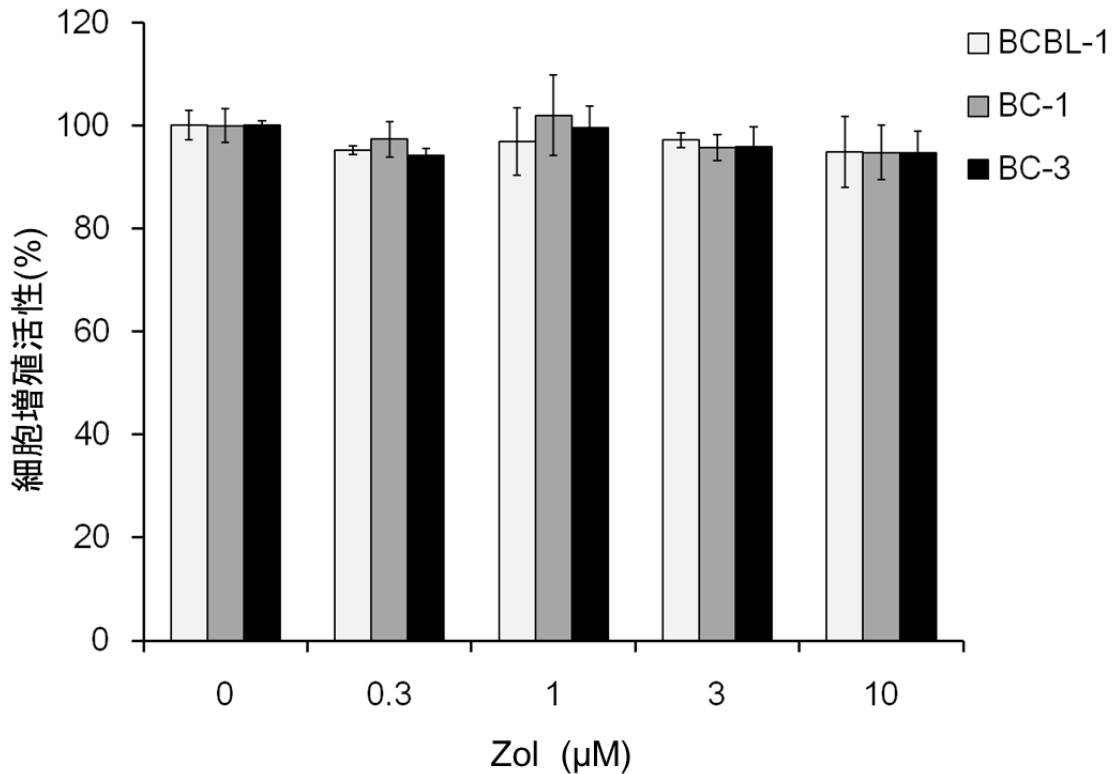


図 8 Zol による細胞増殖抑制効果

PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)に対して Zol(0-10μM)を添加後 24 時間培養し、MTT 法により細胞増殖抑制効果の有無を解析した。3 回の実験を行い、結果は平均±標準偏差で算出した。

## 7-3. Vγ9Vδ2T 細胞の抗腫瘍効果

### 7-3-1. Vγ9Vδ2T 細胞の PEL 細胞、Burkitt リンパ腫細胞、PBMCs に対する細胞傷害活性

Vγ9Vδ2T 細胞は、フローサイトメトリーを用いた評価実験において、3 種類の PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)に対して、Burkitt リンパ腫の細胞株である Daudi に比しても同等または高い細胞傷害活性を E/T 比依存的に認めた(図 9)。また、健常人ドナー由来の PBMCs に対しては、明らかな細胞傷害活性は示さなかった。以上の結果から、Vγ9Vδ2T

細胞は、PEL 細胞に対して高い細胞傷害活性を示すことが明らかとなった。

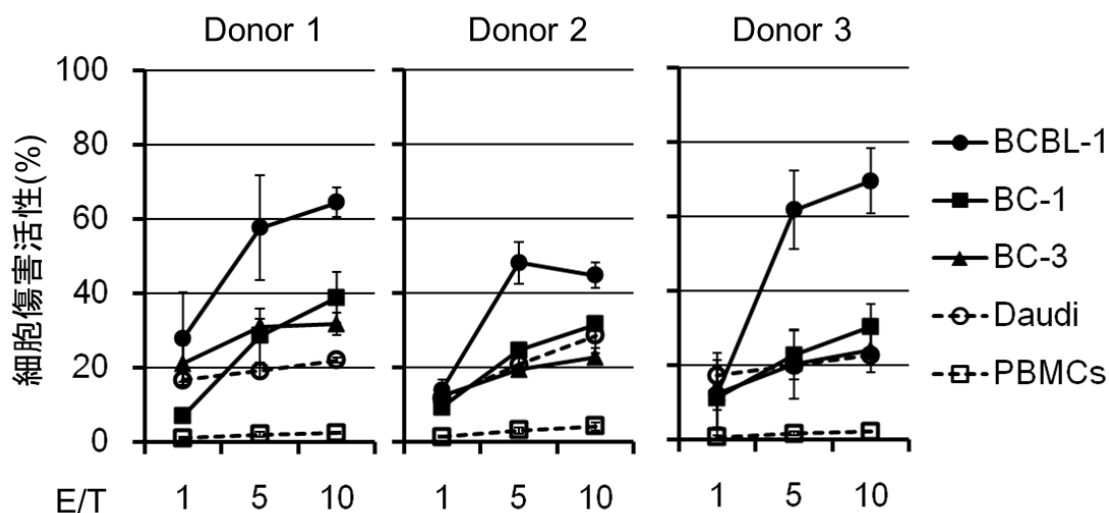


図 9 Vγ9Vδ2T 細胞の細胞傷害活性

CFSE で染色した PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)、Burkitt リンパ腫の細胞株である Daudi、健常人ドナー由来の PBMCs を Vγ9Vδ2T 細胞とともに E/T 比を 3 段階(1、5、10)に分けて 4 時間培養し、フローサイトメトリーで解析した。3 回の実験を行い、結果は平均 ± 標準偏差で算出した。

### 7-3-2. Vγ9Vδ2T 細胞の細胞表面上の death receptor(DR)及び MICA/B の発現

PEL 細胞表面上の Fas(CD95)、DR4(TRAIL-R1)、DR5(TRAIL-R2)、MICA/B の発現について、フローサイトメトリーを用いて検討した。3 つの PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)において、これらの分子の発現を認めた(図 10)。

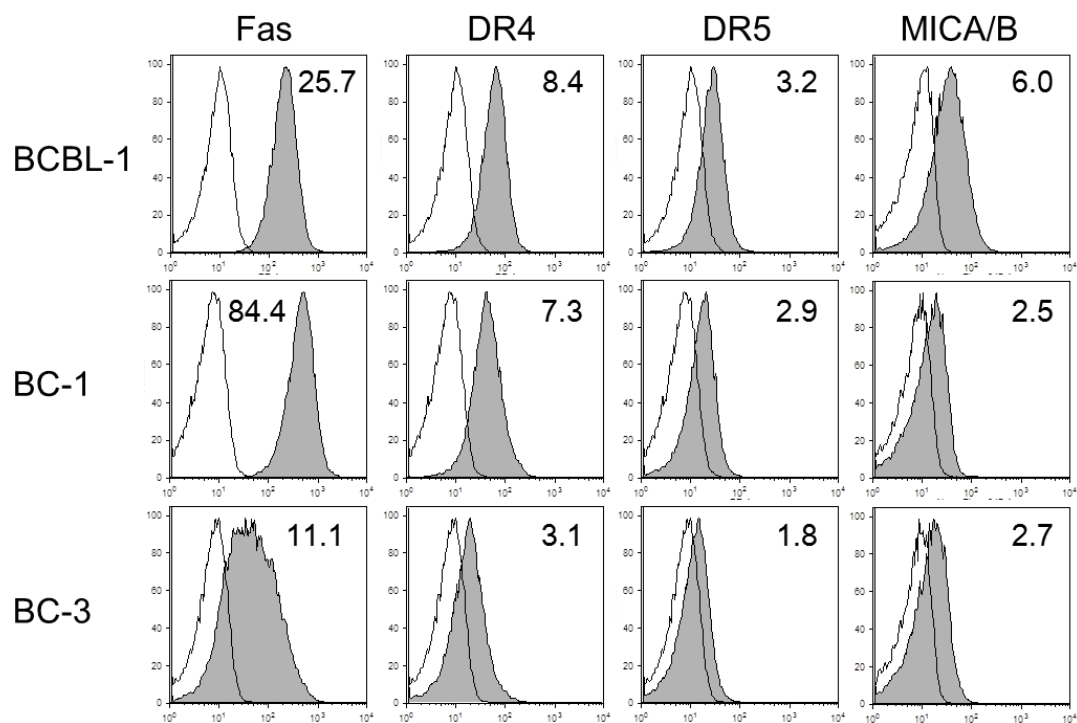


図 10 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞表面上の death receptor(DR)及び MICA/B の発現  
3つの PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)の細胞表面における Fas、DR4、DR5、MICA/B  
の発現をフローサイトメトリーで解析した。ヒストグラム中の値は、相対的 mean  
fluorescence intensity(MFI)を示す。

### 7-3-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞傷害のメカニズム

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は細胞のメバロン酸代謝産物や NKG2D リガンドを認識し細胞傷害活性を示すことが報告されている。PEL に対する V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞傷害のメカニズムを検討するため阻害実験を行った。パーフォリンの阻害剤である concanamycin A(CMA)、メバロン酸経路の阻害剤である mevastatin(Mev)、MICA/B・TRAIL に対する阻害抗体を使用した。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞はパーフォリン (平均 28.2-43.7%阻害)、メバロン酸代謝産物(平均 34.0-65.8%阻害)、MICA/B(平均 25.5-39.7%阻害)を介して細胞傷害活性を示すことが明らかとなった(図 11)。TRAIL の阻害抗体に関しては、BC-1(平均 28.1%阻害)、BC-3(平均 18.4%阻害)のみ有意に阻害していたが、BCBL-1 に関しては平均 6.2%の阻害と統計学的に有意なものではなかった。TRAIL 経路による細胞傷害活性は部分的なものと考えられる。



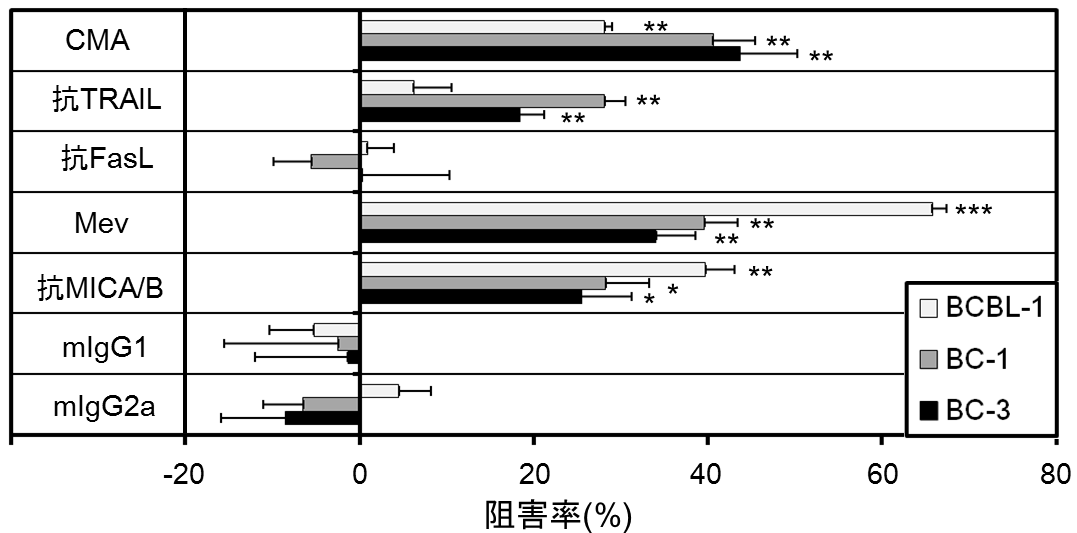


図 11 阻害剤・阻害抗体による細胞傷害活性の阻害

阻害剤・阻害抗体を添加し、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を PEL 細胞と E/T 比 10 で、4 時間培養した。3 回の実験を行い、結果は平均±標準偏差で算出した。 $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ 。

#### 7-3-4. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の脱顆粒

CD107a が CD8 陽性細胞や NK 細胞の脱顆粒の際に細胞表面に発現することが報告されている(26, 27)。PEL 細胞に対する脱顆粒の誘導、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞における CD107a の脱顆粒マーカーとしての可能性について、フローサイトメトリーを用いて検討を行った。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞と 3 種類の PEL 細胞株(BCBL-1、BC-1、BC-3)の共培養を行い、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞表面上の CD107a について解析したところ、2.1 から 2.8 倍の発現レベルの上昇を認めた(図 12)。Perforin の阻害実験の結果を合わせて考えると、PEL 細胞に反応して V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の脱顆粒が行われるとともに、CD107a は V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞においても脱顆粒マーカーとなりうることが示唆された。

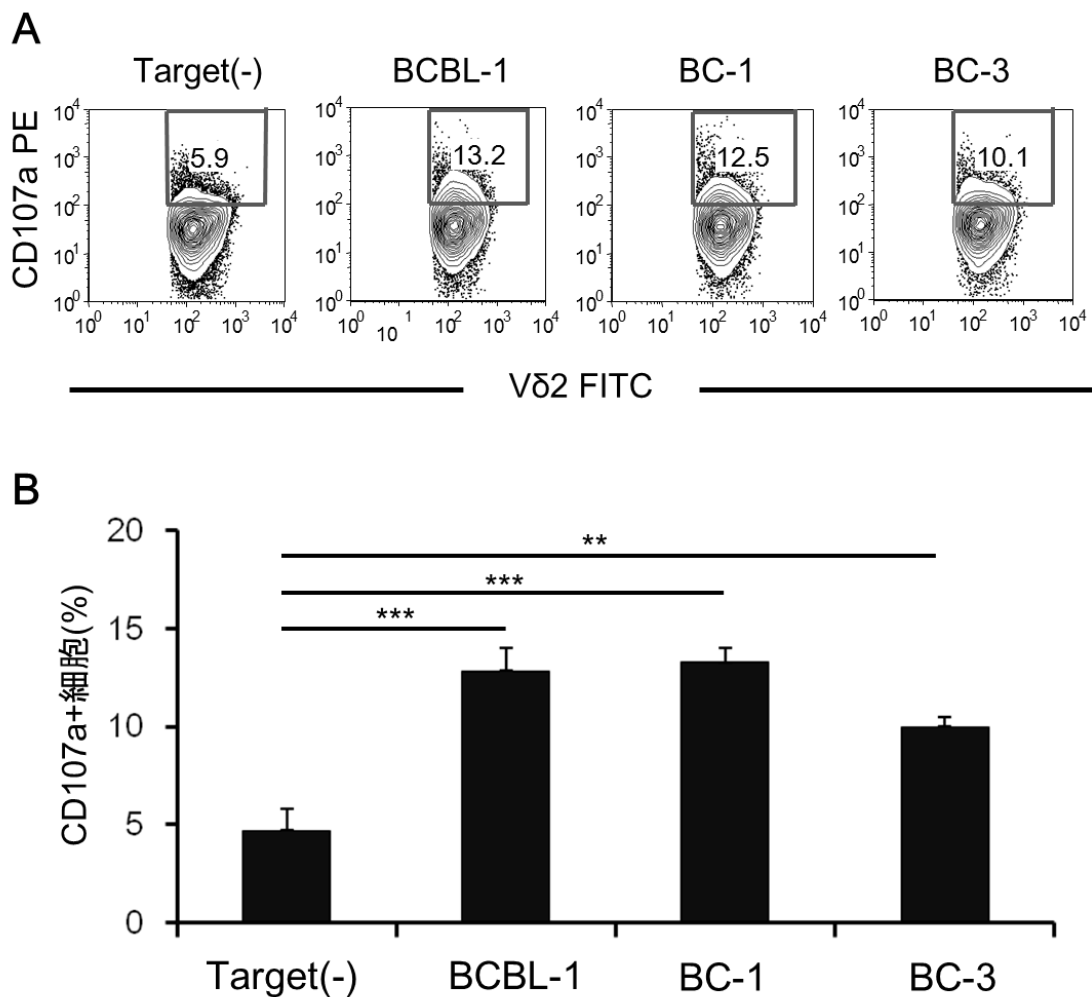


図 12 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の CD107a の発現上昇

A, V $\delta$ 2 FITC/CD107a PE 二重陽性細胞。B, V $\delta$ 2 陽性細胞中の CD107a 陽性細胞の割合の変化。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を PEL 細胞と E/T 比 1 で培養した。3 回の実験を行い、結果は平均 ± 標準偏差で算出した。\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ 。

#### 7-4. マウスモデルを用いた V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の治療効果

##### 7-4-1. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による細胞増殖抑制効果

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の PEL モデルマウスにおける抗腫瘍効果の検討を行った。当研究室で樹立した高度免疫不全マウス(NOD/Rag-2/Jak3 二重欠損マウス: NRJ マウス)の腹腔内に BCBL-1 または BC-3 を移植し、PBS 投与群、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞投与群にわけて 31 日間観察した。移植 31 日目に、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞投与群では、PBS 投与群と比べ、体重増加量(BCBL-1:  $7.5 \pm 2.7$  g vs  $4.1 \pm 3.1$  g, BC-3:  $6.5 \pm 2.6$  g vs  $2.8 \pm 2.0$  g)及び腹水量(BCBL-1:  $2.8 \pm$

1.0 ml vs  $0.9 \pm 1.0$  ml, BC-3:  $3.3 \pm 1.5$  ml vs  $0.6 \pm 0.8$  ml)の減少を有意に認めた(図13)。

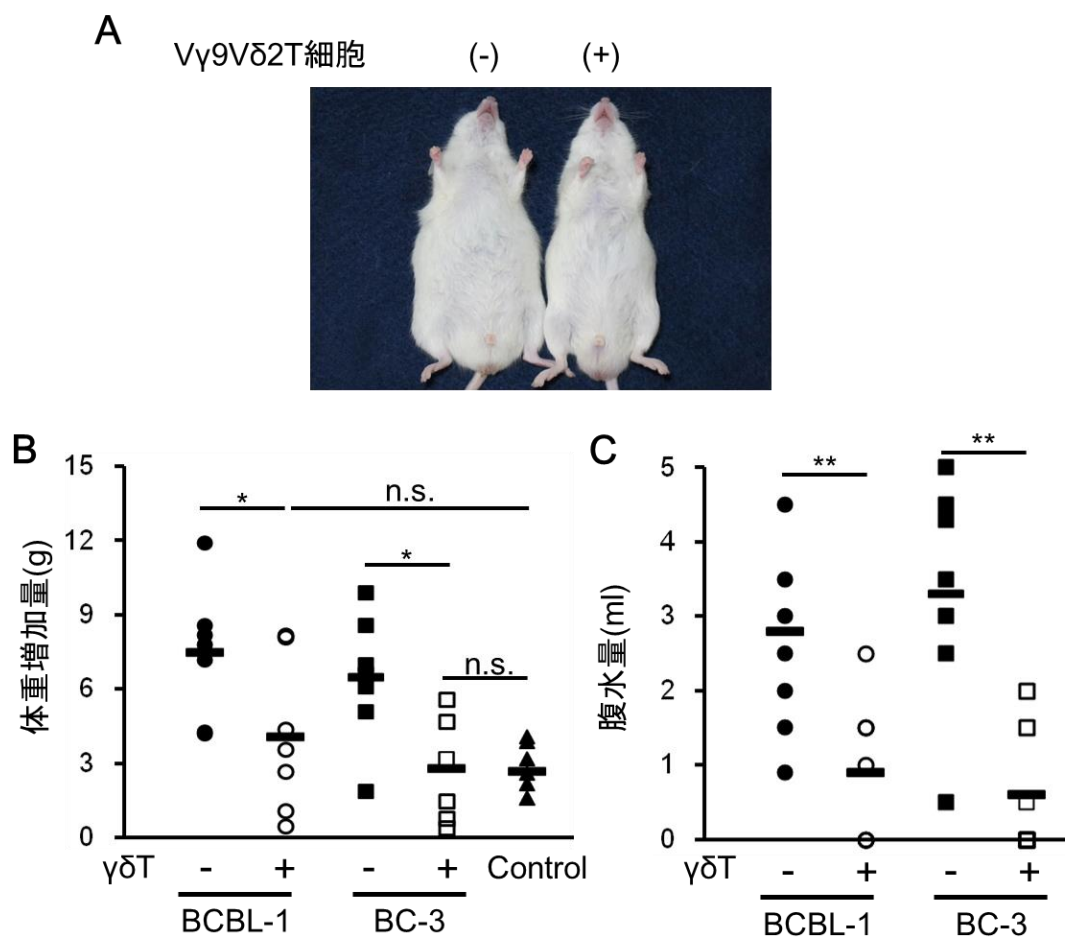


図 13 PEL モデルマウスにおける体重及び腹水量の変化

A, PEL 細胞を移植後 31 日目における PBS 投与マウス、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞投与マウス。B, 体重増加量。C, 腹水量。7 匹のマウスを解析し、平均を算出した。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

#### 7-4-2. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による臓器浸潤抑制効果

BCBL-1 の遠隔臓器への浸潤について、肺・肝臓に対する hematoxylin-eosin(HE)染色、LANA 染色及び脾臓に対するフローサイトメトリーによる解析を行った。無治療群では、肺及び肝臓において LANA 陽性細胞を認めていたが、治療群においては有意な LANA 陽性細胞数の減少を認めた(50-100 細胞/視野 vs 0-1 細胞/視野,  $\times 40$ )(図 14)。また、脾臓細胞のフローサイトメトリーを用いた解析では、無治療群と比べ、治療群では有意な PEL 細胞の減少を認めた( $2.6 \pm 1.8\%$  vs  $0.1 \pm 0.1\%$ )(図 15)。

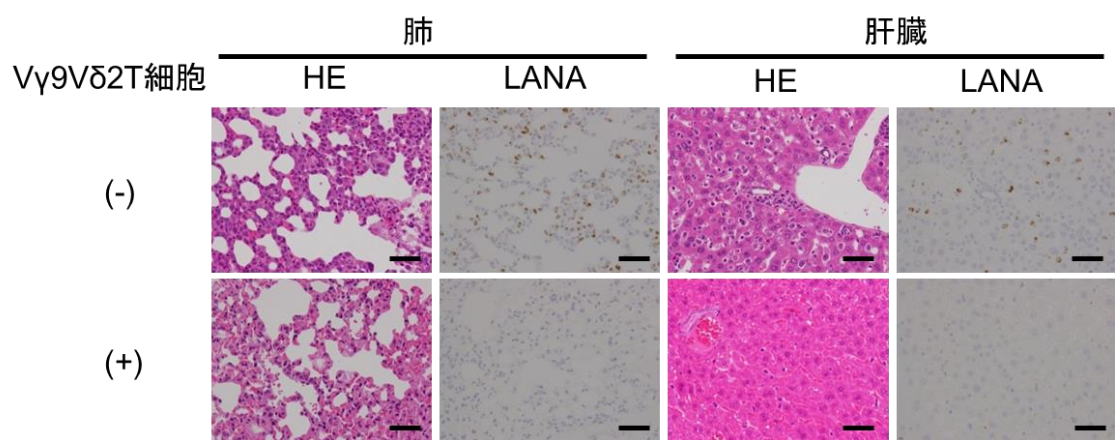
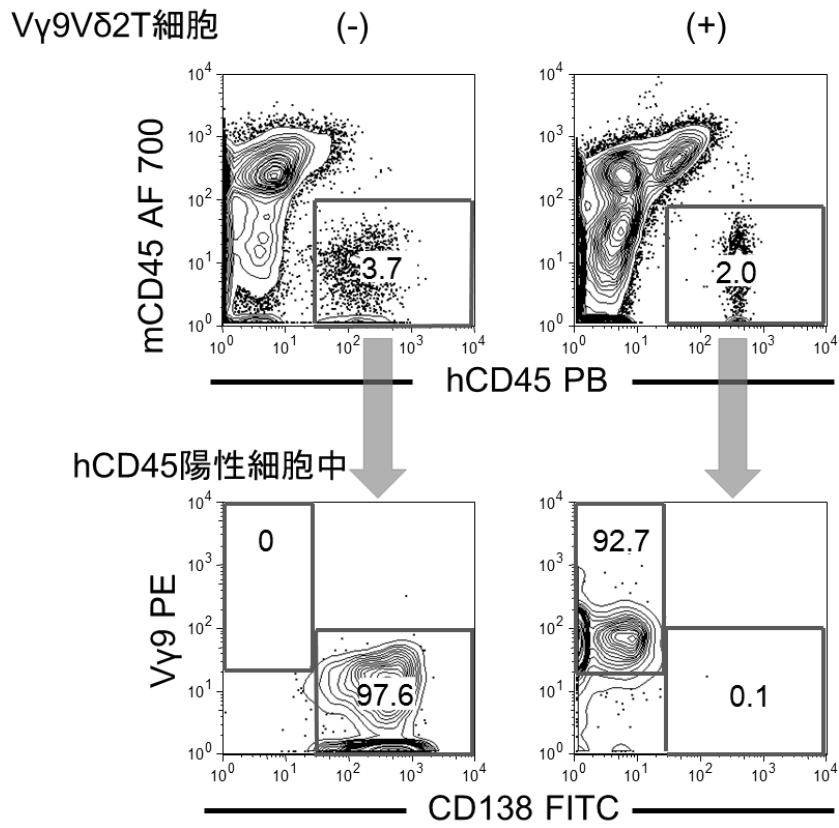


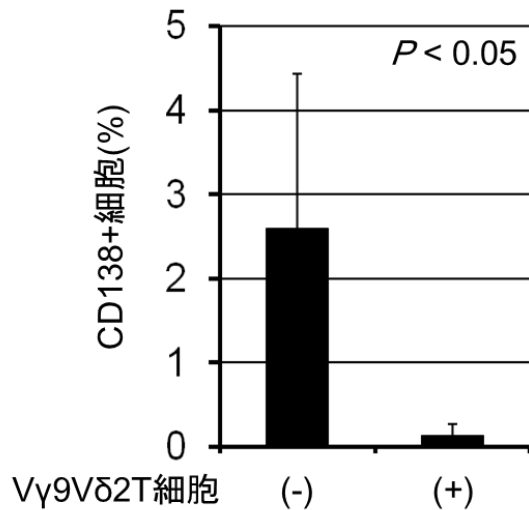
図 14 PEL モデルマウスにおける肺・肝臓の浸潤

BCBL-1 を移植後 31 日目のマウスにおいて、肺・肝臓に対して HE 染色及び LANA 染色を行った。スケールバーは 100μm を示す。

A



B



C

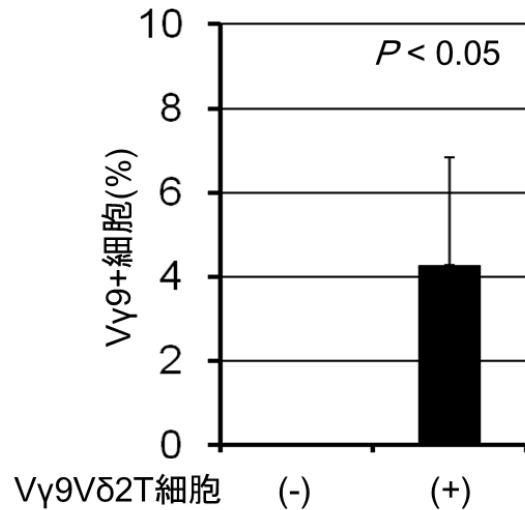


図 15 脾臓における PEL 細胞の浸潤及び V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の生着

A, マウス CD45 陰性ヒト CD45 陽性細胞中における CD138 陽性または V $\gamma$ 9 陽性細胞。B, CD138 陽性細胞割合の比較。C, V $\gamma$ 9 陽性細胞割合の比較。5 匹のマウスを解析し、結果は平均±標準偏差で算出した。

### 7-4-3. V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の生着

BCBL-1 を移植後 31 日目の NRJ マウスにおいて、脾臓・末梢血中に V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を認めていた(脾臓:  $4.3 \pm 2.6\%$ , 末梢血:  $2.2 \pm 2.0\%$ )。腹腔内投与後少なくとも 7 日以上にわたって、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞がマウス内で存在したと考えられ、NRJ マウスは V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の解析モデルとしても有用であることが示唆された。

## 8. 考察

PEL は急激な経過を辿るとともに、従来の治療法に抵抗性であるという臨床的な特徴を有する。PEL に対する新たな治療法が望まれるところであり、近年、様々な治療法が検討されている。NF- $\kappa$ B 経路の阻害(28)、interferon- $\alpha$  と azidothymidine による TRAIL を介したアポトーシスの誘導(29, 30)、KSHV/HHV-8 の溶解感染を介したアポトーシスの誘導(31)等、様々な報告が *in vitro* 及び *in vivo* でなされてはいるが、未だに標準治療の確立には至っていない。

本研究では、免疫細胞の中でも V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法の有効性について、*in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞はヒト末梢血リンパ球の 1-10%を占め、MHC 非拘束性の細胞傷害活性を示し、ヒト腫瘍免疫の一端を担うとされる。HIV-1 感染により、その絶対数及び機能が減少しているとされるが、cART を開始することで V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の数及び機能を改善するという報告がある(21, 22)。HIV-1 感染に伴う V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の減少は HIV/AIDS 関連悪性腫瘍の発症に関与することが考えられ(32)、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法は PEL を含めた HIV/AIDS 関連悪性腫瘍に対する新たな治療法としての可能性を秘めている。第三世代ビスホスホネート製剤であるゾレドロン酸(Zol)は、骨粗鬆症、高 Ca 血症、骨転移に対して、安全かつ幅広く使われている(33)。Zol は抗原提示細胞におけるメバロン酸経路の FPP 合成酵素を阻害することで IPP を蓄積させ、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を誘導することが報告されている(34)。我々は、PEL に対する Zol によって誘導された V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の有効性について、*in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

これまで V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞傷害活性の研究において、Burkitt リンパ腫の細胞株である Daudi が高感受性の細胞株として用いられており(35)、本研究においても Daudi を陽性コントロールとして使用した。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は、Daudi と比べても PEL 細胞に同程度か、あるいは、より強力な細胞傷害活性を示した。3 種類の PEL 細胞株の中では BCBL-1 の感受性が最も高かった。阻害実験の結果から、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は PEL 細胞のメバロン酸代謝産物及び MICA/B を認識し細胞傷害活性を示していたが、3 種類の PEL 細胞株の中でも BCBL-1 に対して強く阻害効果を示していた。この結果から、メバロン酸代謝産物及び MICA/B の発現の違いが V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による認識・細胞傷害活性の違いに影響していることが示唆された。また、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞と同じドナー由来の PBMCs に対しては有意な細胞傷害活性を示さなかったことから、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法は副作用の少ない安全かつ有効な治療法であると考えられる。

PEL 細胞は Fas を発現しているにも関わらず、Fas 経路については、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の細胞傷害活性への関与は有意なものではなかった。PEL の感染潜伏タンパクの一つである v-FLIP は FADD や caspase-8 に結合し、Fas 経路によるアポトーシスを阻害することが報告されている(12)。v-FLIP が Fas 経路を介したアポトーシスの回避に影響している可能性

がある。また、TRAIL 経路に関しては、細胞傷害活性に部分的に関与していたが、特に、BCBL-1 に対して TRAIL 経路の関与は有意でなかった。腫瘍細胞においてしばしば TRAIL に対するデコイレセプターを発現しアポトーシスを回避するなどの TRAIL 耐性機序が報告されているが(36)、BCBL-1 においてもデコイレセプターが発現している可能性等が示唆された。

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞と同じく腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を有する細胞として、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞が挙げられる。これらの細胞において、細胞傷害活性が誘導される際には、perforin、granzyme 等の細胞傷害因子が脱顆粒により放出される。細胞内顆粒内膜に存在する CD107a が脱顆粒に際して細胞表面に発現上昇することが CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞において報告されているが(26, 27)、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞における意義は不明な部分もあった。本研究では、PEL 細胞に対して V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞が細胞傷害活性を示す際に、CD107a の発現上昇が細胞表面において認められるかについて検討したところ、2.1 から 2.8 倍の発現レベルの上昇を認めた。CD107a は V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞においても脱顆粒マーカーになりうると考えられる。

本研究の *in vivo* 実験系では、NRJ マウスを用いて、PEL に対する V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の抗腫瘍効果について検討を行った。NRJ マウスは、T/B 細胞、補体及び NK 細胞の欠損を認め、これまで報告された高度免疫不全マウスの NOD/Scid/common  $\gamma$  欠損(NOG)マウス(37)や NOD/Scid/Jak3(NOJ)欠損マウス(38)と同様の表現型を示していると考えられる。NRJ マウスをレシピエントとして用いることで PEL 細胞及び V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の速やかな生着を認めていた。これまで皮下腫瘍や腫瘍の静脈投与によるマウスモデルを用いた V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の有効性に関する報告は認められていたが(39-44)、我々は腹腔内投与による同所移植の系における V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の有効性について初めて明らかにした。また、 $\gamma\delta$ T 細胞の SCID マウスにおける生着は一時的なもので、静脈投与において 48 時間後には細胞が除去してしまうという報告があった(45)。NRJ マウスを用いた解析では、腹腔内投与後少なくとも 7 日以上はマウス体内に存在し、その抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。SCID マウスと比べ、NRJ マウスでは NK 細胞の活性を認めないこと等が関与していると考えられる。また、NRJ マウスは、Scid 変異の代わりに Rag-2 がノックアウトされており、NOG マウス等と比べて放射線等による DNA 障害における修復活性が優れていると考えられる。放射線を使用して長期にわたってヒト細胞の生着を確認し解析する際にも、NRJ マウスは非常に有用であると考えられる。以上より、NRJ マウスはヒトの腫瘍及び免疫細胞を解析する上でも優れたレシピエントになりうることを示唆された。

これまで、cART は AIDS 関連リンパ腫の予後を改善すると報告されている(46, 47)。PEL においても、cART は治療効果があるとする報告もあり(48, 49)、PEL における cART を介した免疫能の改善が重要であると考えられた。HIV-1 感染者において発症した PEL は、免疫不全状態であることを考慮すると、免疫細胞の誘導は非常に理にかなった有望な治療選択肢であると考えられた。一方で、がん患者における V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞の誘導は、健常人と比



べ困難であるとする報告もある(50)。実際に HIV-1 感染者に Zol 及び IL-2 で加療した報告では免疫能の改善を認めているものの(51)、より効率的に V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を誘導する方法の開発も望まれると考える。

## 9. 結語

ゾレドロン酸により誘導された V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞は、PEL 細胞表面の MICA/B・メバロン酸代謝産物を認識し、perforin 経路・TRAIL 経路を介して、*in vitro*、*in vivo* で抗腫瘍効果を認めることが明らかとなった。

HIV/AIDS 患者では V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞が減少していることを考慮すると、PEL に対してゾレドロン酸を使い V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞を誘導すること、または *ex vivo* で増幅した V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法は、新たな治療戦略の一つとして考えられる。

以上より、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫療法は、未だ標準的治療法の確立されていない PEL の新たな治療法となりうると思える。

## 10. 参考文献

1. Engels EA, Biggar RJ, Hall HI, Cross H, Crutchfield A, Finch JL, et al. Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *Int J Cancer*. 2008;123:187-94.
2. Bonnet F, Burty C, Lewden C, Costagliola D, May T, Bouteloup V, et al. Changes in cancer mortality among HIV-infected patients: the Mortalite 2005 Survey. *Clin Infect Dis*. 2009;48:633-9.
3. Clifford G, Franceschi S. Immunity, infection, and cancer. *Lancet*. 2007;370:6-7.
4. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood*. 1992;80:8-20.
5. Mounier N, Spina M, Gisselbrecht C. Modern management of non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients. *Br J Haematol*. 2007;136:685-98.
6. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;266:1865-9.
7. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:707-19.
8. Fujii T, Taguchi H, Katano H, Mori S, Nakamura T, Nojiri N, et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 in human immunodeficiency virus 1-positive and human immunodeficiency virus 1-negative populations in Japan. *J Med Virol*. 1999;57:159-62.
9. Friborg J, Jr., Kong W, Hottiger MO, Nabel GJ. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*. 1999;402:889-94.
10. Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med*. 2000;6:1121-7.
11. Chang Y, Moore PS, Talbot SJ, Boshoff CH, Zarkowska T, Godden K, et al. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature*. 1996;382:410.
12. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*. 1997;386:517-21.
13. Liu L, Eby MT, Rathore N, Sinha SK, Kumar A, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem*. 2002;277:13745-51.
14. McCormick C, Ganem D. The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science*. 2005;307:739-41.

15. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med.* 1995;332:1186-91.
16. Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, Dawson DB, Ansari MQ, Sald J, et al. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *Blood.* 1996;88:645-56.
17. Simonelli C, Spina M, Cinelli R, Talamini R, Tedeschi R, Gloghini A, et al. Clinical features and outcome of primary effusion lymphoma in HIV-infected patients: a single-institution study. *J Clin Oncol.* 2003;21:3948-54.
18. Boulanger E, Gerard L, Gabarre J, Molina JM, Rapp C, Abino JF, et al. Prognostic factors and outcome of human herpesvirus 8-associated primary effusion lymphoma in patients with AIDS. *J Clin Oncol.* 2005;23:4372-80.
19. Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, et al. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med.* 1990;171:1597-612.
20. Poccia F, Boullier S, Lecoeur H, Cochet M, Poquet Y, Colizzi V, et al. Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. *J Immunol.* 1996;157:449-61.
21. De Maria A, Ferrazin A, Ferrini S, Ciccone E, Terragna A, Moretta L. Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis.* 1992;165:917-9.
22. Martini F, Urso R, Gioia C, De Felici A, Narciso P, Amendola A, et al. gammadelta T-cell anergy in human immunodeficiency virus-infected persons with opportunistic infections and recovery after highly active antiretroviral therapy. *Immunology.* 2000;100:481-6.
23. Bodman-Smith MD, Williams I, Johnstone R, Boylston A, Lydyard PM, Zumla A. T cell receptor usage in patients with non-progressing HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 2002;130:115-20.
24. Li H, Pauza CD. HIV envelope-mediated, CCR5/alpha4beta7-dependent killing of CD4-negative gammadelta T cells which are lost during progression to AIDS. *Blood.* 2011;118:5824-31.
25. Roelofs AJ, Jauhiainen M, Monkkonen H, Rogers MJ, Monkkonen J, Thompson K. Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol.* 2009;144:245-50.
26. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric

- assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003;281:65-78.
27. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22.
  28. Keller SA, Schattner EJ, Cesarman E. Inhibition of NF-kappaB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood*. 2000;96:2537-42.
  29. Toomey NL, Deyev VV, Wood C, Boise LH, Scott D, Liu LH, et al. Induction of a TRAIL-mediated suicide program by interferon alpha in primary effusion lymphoma. *Oncogene*. 2001;20:7029-40.
  30. Wu W, Rochford R, Toomey L, Harrington W, Jr., Feuer G. Inhibition of HHV-8/KSHV infected primary effusion lymphomas in NOD/SCID mice by azidothymidine and interferon-alpha. *Leuk Res*. 2005;29:545-55.
  31. Klass CM, Krug LT, Pozharskaya VP, Offermann MK. The targeting of primary effusion lymphoma cells for apoptosis by inducing lytic replication of human herpesvirus 8 while blocking virus production. *Blood*. 2005;105:4028-34.
  32. Cummings JS, Cairo C, Armstrong C, Davis CE, Pauza CD. Impacts of HIV infection on Vgamma2Vdelta2 T cell phenotype and function: a mechanism for reduced tumor immunity in AIDS. *J Leukoc Biol*. 2008;84:371-9.
  33. Ibrahim A, Scher N, Williams G, Sridhara R, Li N, Chen G, et al. Approval summary for zoledronic acid for treatment of multiple myeloma and cancer bone metastases. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2394-9.
  34. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. 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;296:235-42.
  35. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Gaschet J, Houde I, Vivien R, et al. Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *J Immunol*. 1993;151:1214-23.
  36. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther*. 2005;12:228-37.
  37. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100:3175-82.
  38. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T, Suzu S. Early development of human hematopoietic and acquired immune systems in new born NOD/Scid/Jak3null mice intrahepatic engrafted with cord blood-derived CD34 + cells. *Int J Hematol*. 2008;88:476-82.

39. Sato K, Kimura S, Segawa H, Yokota A, Matsumoto S, Kuroda J, et al. Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 2005;116:94-9.
40. Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, Meraviglia S, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J Immunol*. 2009;182:7287-96.
41. D'Asaro M, La Mendola C, Di Liberto D, Orlando V, Todaro M, Spina M, et al. V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *J Immunol*. 2010;184:3260-8.
42. Li H, Wang Y, Zhou F. Effect of ex vivo-expanded gammadelta-T cells combined with galectin-1 antibody on the growth of human cervical cancer xenografts in SCID mice. *Clin Invest Med*. 2010;33:E280-9.
43. Benzaid I, Monkkonen H, Stresing V, Bonnelye E, Green J, Monkkonen J, et al. High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer Res*. 2011;71:4562-72.
44. Gertner-Dardenne J, Castellano R, Mamessier E, Garbit S, Kochbati E, Etienne A, et al. Human Vgamma9Vdelta2 T cells specifically recognize and kill acute myeloid leukemic blasts. *J Immunol*. 2012;188:4701-8.
45. Lozupone F, Pende D, Burgio VL, Castelli C, Spada M, Venditti M, et al. Effect of human natural killer and gammadelta T cells on the growth of human autologous melanoma xenografts in SCID mice. *Cancer Res*. 2004;64:378-85.
46. Thiessard F, Morlat P, Marimoutou C, Labouyrie E, Ragnaud JM, Pellegrin JL, et al. Prognostic factors after non-Hodgkin lymphoma in patients infected with the human immunodeficiency virus: Aquitaine Cohort, France, 1986-1997. *Groupe d'Epidemiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GECSA)*. *Cancer*. 2000;88:1696-702.
47. Tam HK, Zhang ZF, Jacobson LP, Margolick JB, Chmiel JS, Rinaldo C, et al. Effect of highly active antiretroviral therapy on survival among HIV-infected men with Kaposi sarcoma or non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 2002;98:916-22.
48. Oksenhendler E, Clauvel JP, Jouveshomme S, Davi F, Mansour G. Complete remission of a primary effusion lymphoma with antiretroviral therapy. *Am J Hematol*. 1998;57:266.
49. Hocqueloux L, Agbalika F, Oksenhendler E, Molina JM. Long-term remission of an AIDS-related primary effusion lymphoma with antiviral therapy. *Aids*. 2001;15:280-2.
50. Thedrez A, Sabourin C, Gertner J, Devilder MC, Allain-Maillet S, Fournie JJ, et al. Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex

issue? *Immunol Rev.* 2007;215:123-35.

51. Poccia F, Gioia C, Martini F, Sacchi A, Piacentini P, Tempestilli M, et al. Zoledronic acid and interleukin-2 treatment improves immunocompetence in HIV-infected persons by activating Vgamma9Vdelta2 T cells. *Aids.* 2009;23:555-65.