

γδ 型 T 細胞を用いた癌免疫療法

小林 博人 菅野 仁

γδ 型 T 細胞は 1980 年代に存在が確認された細胞集団であり、感染防御に重要な役割を果たしていると考えられていた。近年様々な腫瘍に対して強い細胞傷害活性を有し、癌免疫療法のエフェクター細胞として注目されている。γδ 型 T 細胞は、細菌由来や合成リン酸化合物に対して、*in vivo* や *in vitro* で強く反応して増殖し、MHC 非拘束性に細胞傷害活性を呈する。また含窒素ビスホスホン酸も、*in vivo* や *in vitro* で γδ 型 T 細胞を増殖させる。これは、含窒素ビスホスホン酸により細胞内のイソプレノイド経路が阻害され、上流に蓄積したリン酸化合物を γδ 型 T 細胞が認識するためである。これらの知見から、*in vivo* に直接、含窒素ビスホスホン酸や合成リン酸化合物を投与して、γδ 型 T 細胞を刺激し、さらに活性維持のためインターロイキン 2 (IL-2) を投与する免疫療法を考案した。一方、*in vitro* で大量に γδ 型 T 細胞を培養する方法も考案し、細胞療法としての養子免疫療法も確立した。様々な腫瘍に対し臨床研究が行われ、本治療法の有用性や克服すべき問題点が明らかとなった。

本総説では、これまでの γδ 型 T 細胞を用いたがん免疫療法の臨床試験を俯瞰し、問題点および展望について論じる。

キーワード：ガンマデルタ型 T 細胞, がん免疫療法, 臨床試験

緒 言

T 細胞は、T 細胞レセプター (TCR) により αβ 型 T 細胞と、γδ 型 T 細胞に分類される。αβ 型 T 細胞は、抗原提示細胞上の主要組織適合性抗原 (MHC) クラス I または II に結合したペプチド抗原を認識する。γδ 型 T 細胞は 1980 年代に存在が確認された細胞集団^{1)~3)}であり、感染防御の第一線と考えられたが、抗原の種類や抗原認識様式が不明であった⁴⁾。γδ 型 T 細胞は、末梢血 T 細胞中の 3~5% 程度を占め、その 50~75% が、TCR 可変領域として Vγ9 (別名 Vγ2 と表記されるが、同じものである) 鎖と Vδ2 鎖からなる二量体で構成されている⁴⁾。Vγ9Vδ2 型 T 細胞は TCR を介して、メバロン酸経路のイソペンテニル二リン酸 (IPP) や非メバロン酸経路の (E)-4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブテニル二リン酸などリン酸化合物を認識することが報告された (以下 γδ 型 T 細胞は、Vγ9Vδ2 型 T 細胞をさす)^{5)~7)} (図 1)。また、γδ 型 T 細胞はイソブチラミンなどのアルキルアミン類も認識する⁸⁾。未だ抗原認識様式は完全に解明されていないが、近年リン酸化合物の認識にはブチロフィリン 3A1 が必須であることが報告されている^{9)~11)}。

γδ 型 T 細胞は、細菌由来や合成リン酸化合物に対して、*in vivo* や *in vitro* で強く反応して増殖し⁶⁾、MHC 非拘束性に様々な腫瘍細胞株に対して強い抗腫瘍活性

を示す⁴⁾¹²⁾。また、高 Ca 血症治療薬のパミドロネート (Pam) などの含窒素ビスホスホン酸 (N-bis) も、*in vivo* や *in vitro* で γδ 型 T 細胞を刺激する¹³⁾¹⁴⁾。N-bis は、単球系細胞内のイソプレノイド経路の律速酵素であるファルネシルピロリン酸合成酵素 (FPP 合成酵素) を特異的に阻害するため、上流の中間代謝体である IPP 等が細胞内に蓄積し、γδ 型 T 細胞が活性化される (図 2)。活性化には、抗原提示細胞として単球系の細胞が必要である¹⁵⁾。これらの結果から、リン酸化合物や N-bis を用いて活性化させた γδ 型 T 細胞を用いる癌免疫療法が考案され、近年様々な癌種に対し臨床試験が行われている。この免疫療法には二つのアプローチがあり、Pam やゾレドロン酸 (Zol) などの N-bis や合成リン酸化合物を *in vivo* に投与して γδ 型 T 細胞を刺激する方法 (図 3) と、リン酸化合物や N-bis を用いて、*ex vivo* で γδ 型 T 細胞を培養して投与する方法である (図 4)。本総説では、これまでの γδ 型 T 細胞を用いた癌免疫療法の臨床試験を俯瞰し、問題点および展望について論じたい。

in vivo 刺激による γδ 型 T 細胞を用いた免疫療法 (表 1)

末梢血 γδ 型 T 細胞が Pam 投与によって刺激される

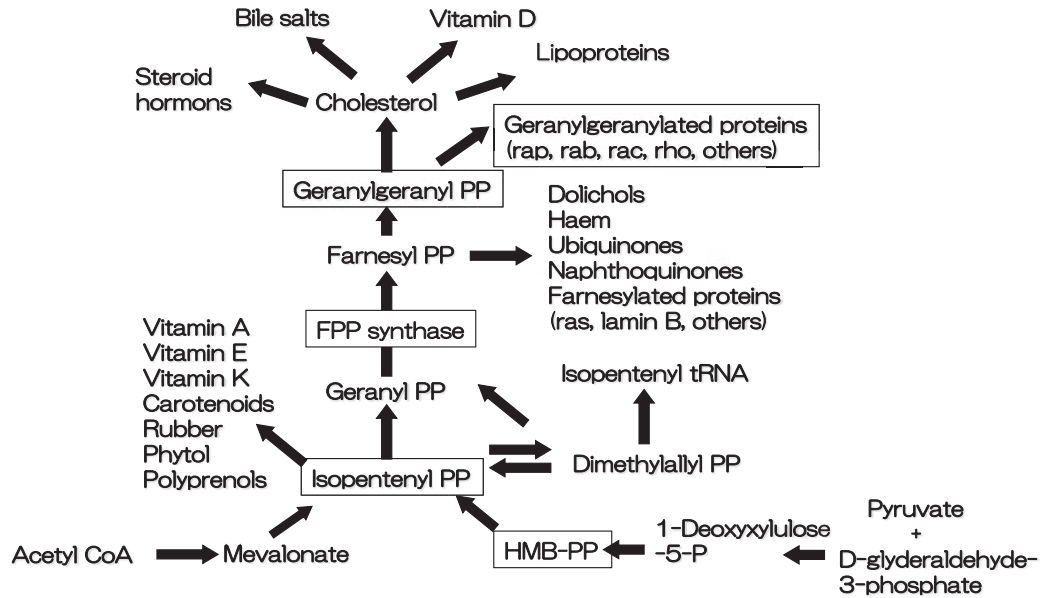


図1 イソプレノイド経路- $\gamma\delta$ 型 T 細胞の認識する自然抗原

イソプレノイド経路は真核生物や古細菌が持つ「メバロン酸経路」と、大腸菌、結核菌などの真正細菌やマラリアなどの原虫も持つ「非メバロン酸経路」がある。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は、自然抗原として HMB-PP や isopentenyl PP を TCR で認識し、活性化される (文献 7, 図 1 を改変)。

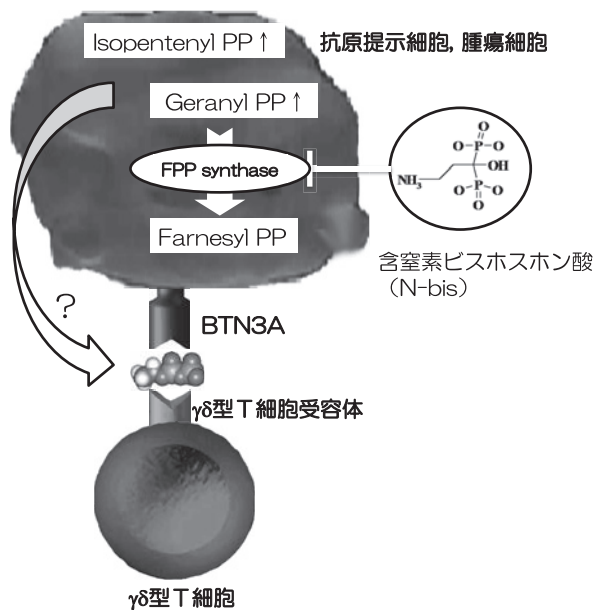


図2 含窒素ビスホスホン酸は FPP 合成酵素を阻害する。FPP 合成酵素が Geranyl-PP に炭素 5 個のイソプレンを付加し、Farnesyl-PP を合成する。含窒素ビスホスホン酸は FPP 合成酵素を特異的に阻害するため、上流にある Geranyl-PP や IPP が細胞内に蓄積し、なんらかの機序で BTN3A を介して $\gamma\delta$ 型 T 細胞を活性化する。

ことが Kunzmann らによって報告された¹³⁾。Pam を投与後、発熱等を示した症例では末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増殖し、急性期反応は $\gamma\delta$ 型 T 細胞の産生するインターフェロンガンマ (IFN- γ) や腫瘍壊死因子アルファなど

の生理活性物質によるものと推測された。そこで Wilhelm らは、Pam とインターロイキン 2 (IL-2) を投与する臨床試験を造血器腫瘍症例に実施し、安全性と腫瘍縮小効果を認めた¹⁴⁾。腫瘍縮小効果が得られた症例では、*in vitro* でも Pam + IL-2 に反応して $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増殖した。また有効症例は、IL-2 を Pam 投与 1 日目から投与した群であり、3 日目から投与した群では認められなかった。

Dilei らは、去勢抵抗性前立腺癌に対し、Zol 単独群 (A 群: 9 症例) と Zol + IL-2 併用群 (B 群: 9 症例) の比較試験を実施した¹⁶⁾。B 群では 6 症例に末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増えていたが、A 群では 2 症例のみであった。また 3 カ月後評価では、A 群では 4 症例が癌死し、末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞が著明に減少していた。B 群では、良好な臨床経過と血清中の TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 値が相関し、PSA 値と末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞数が、逆相関していた。また同グループは、先行して前立腺癌 6 症例、乳癌 3 症例に対して、免疫モニタリングを主目的とした臨床試験を行っている¹⁷⁾。

IL-2 療法は転移性腎癌の標準治療であり、Lang らは腎癌 12 症例に対し、Zol + IL-2 の至適投与量を検討する臨床試験を実施した¹⁸⁾。Zol 4mg 投与後、6 症例に 7×10^6 IU/m²、3 症例に 1×10^6 IU/m² の IL-2 を 5 日間投与した。予想に反して、 7×10^6 IU/m² 投与群では、1 症例も末梢血 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増加を認めず、 1×10^6 IU/m² 投与群では 1 症例に増加を認めた。次の 6 症例に 1×10^6 IU/m²

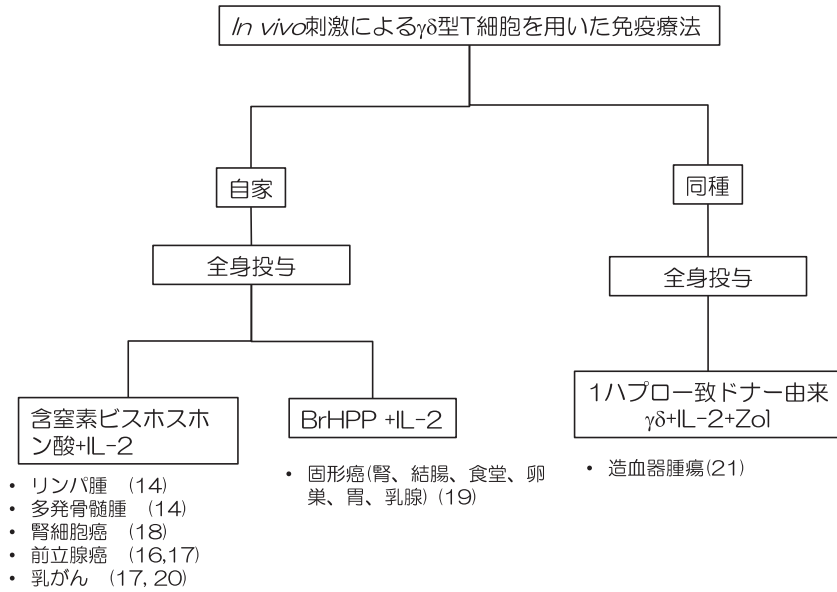


図3 *in vivo* 刺激による γδ 型 T 細胞を用いた免疫療法の分類
in vivo で γδ 型 T 細胞を活性化させる目的で含窒素ビスホスホン酸あるいはリン酸抗原を直接投与し、活性化を維持目的で IL-2 を併用投与する。

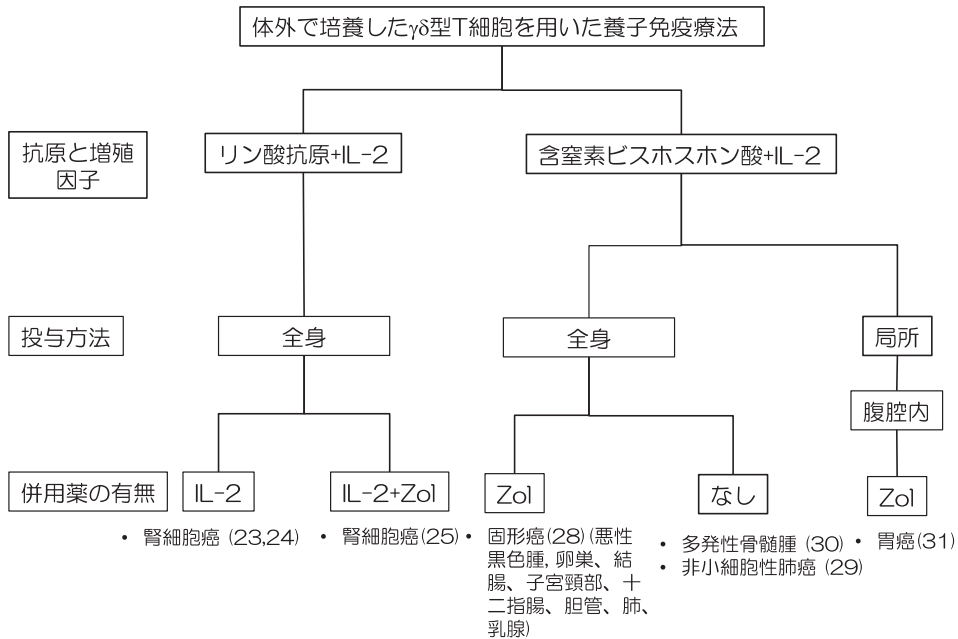


図4 体外で培養した γδ 型 T 細胞を用いた養子免疫療法の分類
 γδ 型 T 細胞を刺激する目的でリン酸抗原あるいは含窒素ビスホスホン酸が用いられる。増殖因子として IL-2 を添加し、培養する。投与方法は経静脈的に全身投与、あるいはカテーテルから局所投与される。活性化維持目的で IL-2 の投与や免疫賦活剤として Zol が併用投与されることがある。

の IL-2 を投与し、至適 Zol 投与量検討のため、0.4mg から 3.0mg に段階増量投与した。全 6 症例で末梢血 γδ 型 T 細胞が増加し、評価可能 5 症例では病勢安定(SD) が得られた。

Bennouna らは固形癌 28 症例に対して、合成リン酸化合物のプロモヒドリンニリン酸 (BrHPP) と 1×10^6

IU/m² の IL-2 を投与し、BrHPP の最大耐性量と安全性を検討する第 1 相臨床試験を施行した¹⁹⁾。3 週間毎に BrHPP を投与後、IL-2 を 7 日間連続投与し、至適投与量を 1,500mg/m² とした。Zol 単独投与と同様に、単独投与では末梢血 γδ 型 T 細胞は増加せず、IL-2 併用時は、BrHPP 用量依存的に増加した。しかし、サイクルを重

表1 *in vivo* 刺激による $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた免疫療法

文献番号	症例数	疾患	抗原		IL-2 全身投与		サイクル	サイクル数	臨床効果	
			量	投与日	量 (IU), 経路, 症例数	期間				
Wilhelm et al., 2003 Blood ¹⁴⁾	10	MM : 4	Pam (90 mg)	d1	0.25 ~ 3×10 ⁶ , iv	d3 ~ 8	3 週間	1 ~ 6	PD : 8 SD : 1 NE : 1	
		CLL : 4								
		IC : 1								
		MZL : 1								
	9	MM : 4			0.25×10 ⁶ , iv, n=3, 0.5 ~ 2×10 ⁶ , iv, n=3, 1 ~ 2×10 ⁶ , iv, n=3	d1 ~ 6		1 ~ 2	PD : 3	
		FCL : 4								
	MZL : 1			4 ~ 8	SD : 1 PR : 2					
Dieli et al., 2007 Cancer Res. ¹⁶⁾	9	HRPC	Zol (4 mg)	d1	No	21 日間	2 ~ 17 (12 カ月)	SD : 1, PR : 1, PD : 1, death : 6		
	9				0.6×10 ⁶ , sc				d1	7 ~ 17 (12 カ月)
Lang et al., 2011 Cancer Immunol. Immunother. ¹⁸⁾	6	腎細胞癌	Zol (4 mg)	d1, d8, d15	7×10 ⁶ IU/m ² /day, sc	d1 ~ 5, d8 ~ 12, d15 ~ 19	28 日間	<1 : n=2,	SD : 3, PD : 1, NA : 3	
								2 ~ 10 : n=4,		
								NA : n=1		
	3							1 ~ 2×10 ⁶ IU/m ² /day, sc	3	NA : 1, SD : 2
	3				Zol (0.4 ~ 3.0 mg)			1 ~ 2×10 ⁶ IU/m ² /day, sc	4	SD : 3
			7							
			16							
Meraviglia et al., 2010 Clin. Exp. Immunol. ²⁰⁾	10	乳癌	Zol (4 mg)	d1	1×10 ⁶ IU/m ² /day, sc	d1	21 日間	<4 : n=2	PD : 2, SD : 2, PR : 1 (9 カ月)	
								5 ~ 13 : n=3		
								14 ~ 18 : n=1		
								18<, n=4		PD : 1, SD : 2, PR : 1 (12 カ月)
Bennouna et al., 2010 Cancer Immunol. Immunother. ¹⁹⁾	28	腎細胞癌 : 18	BrHPP (200 mg/m ²)	d1	1×10 ⁶ IU/m ² /day, sc, 2 サイクル目から	d1 ~ 7	21 日	18	SD : 12, PD : 16 (3 サイクル目)	
		結腸癌 : 3	(600 mg/m ²)							
		食道癌 : 3	(1,200 mg/m ²)							
		胃癌 : 1	(1,500 mg/m ²)							
		卵巣癌 : 1	(1,500 mg/m ²)							
		乳癌 : 2	(1,800 mg/m ²)							
		1×10 ⁶ IU/m ² /day, sc, 1 サイクル目から	10							
		1×10 ⁶ IU/m ² /day, sc, 2 サイクル目から	26							
			39							
			16							

略語 : MM : 多発性骨髄腫, CLL : 慢性リンパ球性白血病, IC : Immunocytoma (免疫細胞腫), MZL : マントル細胞リンパ腫, FCL : 濾胞細胞リンパ腫, HRPC : ホルモン療法抵抗性 (去勢抵抗性) 前立腺癌, Pam : パミドロン酸, Zol : ゼレドロン酸, iv : 経静脈的, sc : 皮下.

ねる毎に末梢血 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の抗原反応性が低下し, 5 サイクル目では反応が認められなかった. 3 サイクル目に行った 28 症例の病勢評価は, SD : 12, 病勢進行 (PD) : 16 であった.

Meraviglia らは 10 症例の進行乳癌に対して, Zol4 mg と 1×10⁶IU/m² の IL-2 を 3 週毎に投与し, 12 カ月の時点で PD : 1, SD : 2, PR : 1 と報告している²⁰⁾.

同種 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた *in vivo* 刺激による免疫療法

Wilhelm らによって *in vivo* で $\gamma\delta$ 型 T 細胞を刺激する新しいアプローチが報告された²¹⁾. 進行造血器悪性腫瘍 4 症例に, 化学療法後, 1 ハプロ一致ドナーのアフェレシス産物から CD4 および CD8 を除去した末梢血単核球を投与し, 同時に Zol4mg を投与後, 1×10⁶IU/m² の IL-2 を 6 日間連続で投与した. 全例とも前治療無効例であったが, 3 症例で GVHD を起こすことなく, 完全奏功 (CR) が得られた.

表2 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた養子免疫療法 (1)

文献番号	症例数	疾患	細胞ソース	培養条件				培養日数
				IL-2	抗原 (濃度)	血清		
Kobayashi et al., 2007 Cancer Immunol. Immunother. ²³⁾	7	腎細胞癌	末梢血	100 IU/ml	2M3B1-PP	100 μ M	2% 自己血清	14 日間
Bennouna et al., 2008 Cancer Immunol. Immunother. ²⁴⁾	10	腎細胞癌	アフエレス	328 IU/ml : d1, 984 IU/ml : d4-14	BrHPP	3 μ M	9% FCS	14 日間
Kobayashi et al., 2011 Cancer Immunol. Immunother. ²⁵⁾	11	腎細胞癌	アフエレス (1アフエレス/ 細胞培養2回分)	100 IU/ml	2M3B1-PP	100 μ M	2% 自己血清	11 日間
Nicol et al., 2011 Br. J. Cancer ²⁸⁾	18	悪性黒色腫:4, 卵巣癌:1, 結腸癌:1 悪性黒色腫:3 腺癌:1 胆管癌:1 卵巣癌:1 結腸癌:2 十二指腸癌:1 乳がん:2, 子宮頸部癌:1	アフエレス (1アフエレス/ 細胞培養8回分)	700 IU/ml, d0: 350 IU/ml, 2~3日間隔	Zol	1 μ M	10% AB 血清	7~14 日間
Nakajima et al., 2010 Eur. J. Cardiothorac. Surg. ²⁹⁾	10	非小細胞性肺癌	末梢血: 70 ml	1,000 IU/ml	Zol	5 μ M	10% 自己血清	14 日間
Abe et al., 2009 Exp. Hematol. ³⁰⁾	6	多発骨髄腫	末梢血	1,000 IU/ml	Zol	5 μ M	自己血清	14 日間
Wada et al., 2014 Cancer Med. ³¹⁾	7	胃癌	アフエレス	1,000 IU/ml	Zol	5 μ M	自己血清	14 日間

$\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた養子免疫療法

体外で培養した $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた臨床試験が報告されている (表 2, 3)。

$\gamma\delta$ 型 T 細胞を刺激する抗原としては Zol または合成リン酸化化合物が用いられる。著者らは、天然リン酸化化合物 IPP の約 100 倍の活性を持つ合成リン酸化化合物の 2-メチル, 3-ブテニル, 1-ピロリン酸 (2M3B1PP) を抗原として用いている²²⁾。著者らは、2005 年に 2M3B1PP で刺激した自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞と IL-2 を投与する臨床試験を行った²³⁾。7 症例の転移性腎細胞癌に対し、自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞と IL-2 を毎週投与し、計 6~12 サイクル行った。全例で IL-2 に起因する有害事象を認めなかった。7 症例中 5 症例で末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞が増加し、CT で腫瘍倍加時間の計算ができた 5 症例のうち、3 症例で延長が認められた。7 症例中 6 症例が癌死しているが、2015 年 8 月現在、1 症例が生きている。

Bennouna らは、転移性腎細胞癌患者に対し、抗原として BrHPP を用い、IL-2 で増殖させた自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞 (Innacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$) を投与する第 I 相試験を行った²⁴⁾。本試験では、3 週毎に 1×10^9 から 8×10^9 個の Innacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$ を投与後、IL-2 を 7 日間連続投与した。 8×10^9 の In-

nacell $\gamma\delta^{\text{TM}}$ を投与した 1 症例で血液生化学的検査上、播種性血管内凝固症候群を認めたが、他には IL-2 投与に起因する有害事象以外の重篤なものは認めなかった。

著者らは、進行腎癌の患者 11 人に 2M3B1PP + IL-2 で培養した自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を、Zol 4mg 投与後に投与して、140 万単位の IL-2 を 5 日間連続投与する臨床試験を施行した²⁵⁾。 *in vitro* では、腫瘍細胞株に Zol を感作させると、腫瘍細胞内に IPP 等のリン酸類が蓄積され、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の細胞傷害活性が上昇することが報告されている¹²⁾。著者らは自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞投与前に、Zol を投与することで、*in vivo* でも強い細胞傷害活性の誘導が期待できると考えた。ヒトで腫瘍内の IPP 蓄積を証明することは困難であるが、Benzad らは、ヒト乳癌細胞株を移植したマウス異種モデルで、Zol を投与すると癌組織内の IPP 濃度が上昇し、細胞外基質へ放出された IPP は $\gamma\delta$ 型 T 細胞の遊走を誘導することを報告している²⁶⁾。3 週毎に最大で計 6 サイクル行い、RECIST 評価にて、PD : 5, SD : 5, CR : 1 であった。2 症例が試験期間中に癌死し、4 症例が試験終了後に癌死しているが、他の 5 症例は生存期間中央値 105.8 カ月 (99.2~108.6 カ月) 生存している (2015 年 8 月現在)。5 症例のうち 4 症例は、分子標的薬治療中であるが、CR を得た症例は 105.8 カ月間特に治療はなく CR を維持している²⁷⁾。

表3 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた養子免疫療法 (2)

文献番号	投与 $\gamma\delta$ T 細胞数		サイクル		投与経路	併用投与薬			臨床効果
	各サイクル	総数 (個)	間隔	投与数		Zol	IL-2 : 量 (IU)/期間		
Kobayashi et al., 2007 Cancer Immunol. Immunother. ²³⁾	$5 \times 10^6 \sim 3.57 \times 10^9$	$0.1 \sim 40.8 \times 10^9$	毎週	6 ~ 12	iv	なし	7×10^5 IU, iv	d1	
Bennouna et al., 2008 Cancer Immunol. Immunother. ²⁴⁾	1×10^9 , n = 1	$1.45 \sim 18.3 \times 10^9$	3 週毎	3	iv	なし	1 サイクル目:なし, 2 サイクル以降: 2×10^6 IU/m ² , sc	d1 ~ d7	SD : 6, PD : 4
	4×10^9 , n = 6			16					
	8×10^9 , n = 3			8					
Kobayashi et al., 2011 Cancer Immunol. Immunother. ²⁵⁾	$9.4 \times 10^6 \sim 24.0 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9 \sim 46.7 \times 10^9$	3 週毎	平均 4.2	iv	4 mg, iv, d1	1.4×10^6 IU, iv	d1 ~ 5	SD : 5, PD : 5, CR : 1
	中央値 : 1.4×10^9	中央値 : 22.0×10^9							
Nicol et al., 2011 Br. J. Cancer ²⁸⁾	$0.04 \sim 2.8 \times 10^9$	$0.1 \sim 5.5 \times 10^9$		最大 8	iv	1 mg, iv, 細胞投与 24 時間前; 1 mg, iv, 細胞投与直後	なし	なし	SD : 2, PD : 4
	$0.3 \sim 2.2 \times 10^9$	$1.0 \sim 7.2 \times 10^9$							SD : 1, PD : 7, NE : 1
	$0.3 \sim 1.9 \times 10^9$	$0.9 \sim 4.0 \times 10^9$							PR : 2, CR : 1
Nakajima et al., 2010 Eur. J. Cardiothorac. Surg. ²⁹⁾		$2.6 \sim 31.4 \times 10^9$	2 週毎	3 ~ 12 (中央値 6)	iv	なし	なし	なし	SD : 3, PD : 5 NE : 2
Abe et al., 2009 Exp. Hematol. ³⁰⁾	$0.07 \sim 5.2 \times 10^9$	$3.0 \sim 20.0 \times 10^9$	2 週毎	4 ~ 8 (中央値 7)	iv	なし	なし	なし	Mタンパク減少: 4
Wada et al., 2014 Cancer Med ³¹⁾	$0.06 \sim 6.49 \times 10^9$	$0.06 \sim 25.0 \times 10^9$	毎週	1 ~ 4 (中央値 3)	ip	1 mg, iv 1 サイクル目, 1 mg 腹腔内投与, 2 サイクル目以降	なし	なし	腹水量, 消失 : 1, 減少 : 1, 不変 : 5

本試験のレジメンは忍容性良好であったが、サイクルを重ねると、他の臨床試験と同様に、*in vitro* 培養での $\gamma\delta$ 型 T 細胞の抗原に対する反応が低下し、増殖が低下することが明らかになった。

Nicol らは、固形癌 18 症例に対し、Zol+IL-2 で培養した自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を投与する臨床試験を行った²⁸⁾。細胞投与の 24 時間前と直前に Zol1mg を投与した。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞数を段階増量し、最大で 2.8×10^9 個を投与したが、投与細胞による有害事象は認めなかった。15 症例の臨床効果は、SD : 3 で PD : 12 であった。また、著者らは、¹¹¹indium でラベルした $\gamma\delta$ 型 T 細胞を 3 症例に投与し、体内への分布を検討している。投与細胞は 4~7 時間肺に集積し、その後肺の集積は減弱し、肝臓と脾臓へ集積した。副腎に 84mm 大の転移を有する症例では、細胞投与 1 時間後から転移部に集積を始め、48 時間にわたり集積していた²⁸⁾。

Nakajima らは、10 症例の非小細胞性肺癌 (NSCLC) に対する臨床試験を行い、SD : 3, PD : 5 であった²⁹⁾。SD の得られた症例では投与細胞総数が 10.0×10^9 個以上であり、また血中の IFN- γ 濃度が上昇していた。

Abe らは、6 症例の多発性骨髄腫に対する臨床試験を行い、4 症例で M タンパク量が減少し、2 症例では増加していた³⁰⁾。

Wada らは、癌性腹膜炎の胃癌患者 4 人に対し、Zol+IL-2 で増殖させた自家 $\gamma\delta$ 型 T 細胞と Zollmg を腹腔内

へ投与する臨床試験を行った³¹⁾。7 症例が登録されたが、3 症例が 4 サイクルを完遂し、そのうち 2 症例で CT 上腹水の著明な減量をみとめ、腹水中の癌細胞数も減少していた。

考 察

臨床試験の結果から、*in vivo* に N-bis やリン酸化化合物と低用量の IL-2 を投与し、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を刺激増殖させる試みや、*ex vivo* で培養した $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた養子免疫療法は、安全で忍容性があり、様々な癌種に対して有効性が期待できるといえる。しかし、単独での臨床効果については、第 1 相あるいは早期第 2 相試験であり、現状では評価困難であるが、限定的な有効性を認めると考えられる。Fisher らは系統的レビューの中で、前立腺癌、腎癌、肺癌について $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いた免疫療法と二次治療との比較をしている³²⁾。前立腺癌では、*in vivo* 刺激群とプレドニゾン+ドセタキセル群を比較して、PR が 33.3% 対 25.2% と *in vivo* 刺激群が良好で、腎癌では養子免疫療法群とエベロリムス群と比較して PR 以上得られた割合で 4.8% 対 1.8% と、養子免疫療法群が良好であった。また腎癌で *in vivo* 刺激群とエベロリムス群との比較では SD 以上で 66.7% 対 68.3% であったと報告しており、有用性が示されている。しかし、より有効性を高めるためには、様々な解決すべき問題がある。

in vivo 刺激法では、投与する N-bis やリン酸化合物の濃度、IL-2 投与量とタイミング及び $\gamma\delta$ 型 T 細胞疲弊の回避が検討課題である。*in vivo* 刺激後の $\gamma\delta$ 型 T 細胞の維持に IL-2 は必須であり、投与量は 1×10^6 IU/体から 1×10^8 IU/m² の7日間投与で十分で、投与時期は、抗原投与直後から翌日までが妥当と思われる。Zol の至適投与量は未だ明らかではないが、サイクルを重ねることにより $\gamma\delta$ 型 T 細胞数が減り、抗原反応性が低下するという $\gamma\delta$ 型 T 細胞疲弊の原因となる可能性があり、通常臨床での 4mg/体では過量と考えられる。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞疲弊のメカニズムは完全に明らかとなっていないが、副刺激分子を発現していない不完全抗原提示細胞によるアナジ-誘導や活性化誘導細胞死 (AICD) が考えられる。

近年、メバロン酸経路阻害により代謝中間体であるゲラニルゲラニル二リン酸の減少が caspase 1 を活性化し、その結果 IL-18 が活性化され、IL-18 はヘルパー NK 細胞を誘導し、ヘルパー NK 細胞は $\gamma\delta$ 型 T 細胞を著明に増殖させることが報告されている^{33)~35)}。また IL-21 は $\gamma\delta$ 型 T 細胞の細胞傷害活性を増強することが報告されている³⁶⁾。現在 IL-18 と IL-21 は、非ホジキンリンパ腫や転移性悪性黒色腫に対し臨床試験が行われており、それらとの併用で $\gamma\delta$ 型 T 細胞疲弊等を克服できるかもしれない。また、抗 CD3 抗体による $\gamma\delta$ 型 T 細胞レセプター複合体の構造変化が、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞による細胞傷害活性を格段に増強し、構造変化に続き PI3K/Akt や Ras/Ark 経路の活性化をもたらすという報告がある³⁷⁾。新しいアプローチにより、AICD や抗原不応性を回避できる可能性もある。

養子免疫療法の有効性を高めるためには、症例選択基準、至適培養方法、IL-2 や Zol 等の併用投与薬、腫瘍組織微小環境での免疫抑制解除の検討が必要である。まず末梢血単核球に占める $\gamma\delta$ 型 T 細胞の割合や数、抗原反応性の良好な症例を選択することが重要である。癌患者では、早期癌であっても、末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞数は減少しており³⁵⁾、細胞数が少ないと、*in vitro* で増加させるのは困難である。レビューした養子免疫療法の臨床試験でも、末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞数と投与総数が多い方が、良好な臨床効果が得られている。

ex vivo で $\gamma\delta$ 型 T 細胞を培養する場合、刺激する抗原としては、N-bis か合成リン酸化合物が用いられる。どちらの抗原も十分な $\gamma\delta$ 型 T 細胞を得ることができるが、N-bis では、抗原提示細胞が必要であり¹⁵⁾、非プロフェッショナル抗原提示細胞によるアナジ-誘導の可能性もある。また、一般に進行癌患者の末梢血では、単球系細胞の増加が認められ、腫瘍組織に浸潤している単球系細胞は、免疫抑制性の微小環境の一部を担っていると考えられている。これらの細胞が Zol を取り込

み、リン酸抗原を $\gamma\delta$ 型 T 細胞に抗原提示した場合に、 $\gamma\delta$ 型細胞の機能に影響を与える可能性がある。

抗原刺激を受けた $\gamma\delta$ 型細胞の増殖には IL-2 が必須であり、濃度依存性に増殖する。諸家の培養条件で、IL-2 濃度は 100IU/ml から 1,000IU/ml と様々である。しかし、十分な数の $\gamma\delta$ 型細胞を得るために、高濃度 IL-2 存在下で過度に分裂させると、テロメアの短縮から *in vivo* に投与された後、apoptosis する割合が増加し、また、十分な IL-2 濃度のない環境で活性を維持することは困難である。

また、より効果を高めるための併用投与薬の検討も重要である。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞投与後に *in vivo* に IL-2 を投与する必要性についても、議論がある。抗原刺激後に IL-2 レセプターの発現をみると、刺激後 10 から 11 日頃が最も発現が高く、その後減少し、14 日目過ぎにはほとんど認められなくなる。このことから、*in vitro* で 14 日以上培養した場合、IL-2 全身投与は不要かもしれない。

$\gamma\delta$ 型 T 細胞は、N-bis に感作された腫瘍細胞株を強力に傷害する¹²⁾。そこで *in vivo* に Zol を投与して腫瘍細胞を感作させ、*ex vivo* で培養した $\gamma\delta$ 型 T 細胞を投与する方法は良い戦略と考えられる。しかし、Zol を *in vivo* に投与すると、末梢血中の $\gamma\delta$ 型 T 細胞数は減少し、抗原に低反応性になってしまうために培養が困難になるというジレンマがある。しかも Zol 投与後の $\gamma\delta$ 型 T 細胞数の減少は、1 年以上にわたり持続されることが報告されている³⁸⁾。Zol 投与前に必要な量の末梢血単核球を採取保存するか、投与する Zol 量の検討や、Zol のように長期間体内に蓄積しない新規 N-bis や FPP 阻害剤の開発が必要である。また、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は MHC 非拘束性のため、前述のように同種 $\gamma\delta$ 型 T 細胞を用いることが可能であり²¹⁾、ドナーに対する Zol の影響は無視できる。

局所治療として $\gamma\delta$ 型 T 細胞を、体腔内や腫瘍摘除部位へ直接投与することも可能である³¹⁾³⁹⁾⁴⁰⁾。局所投与では、Zol を投与しても、全身的な反応は起きず、末梢血中 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の消耗や不応答を回避することが可能である。

免疫チェックポイント分子阻害剤との併用は、最も期待できると思われる。固形癌に対する抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体の臨床試験の結果から、進行癌の治療にパラダイムシフトが起きている^{41)~43)}。合成リン酸化合物で刺激した $\gamma\delta$ 型 T 細胞も、PD-1 を発現しており⁴⁴⁾、PD-1 と腫瘍細胞が発現する PD-L1 や腫瘍組織に浸潤する末梢樹状細胞が発現する PD-L1/2 の結合阻害により、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の抗腫瘍活性が保持できる⁴⁵⁾。免疫チェックポイント分子は、他にも LAG-3 や TIM-3 などもあり、阻害抗体の組み合わせにより、さらに抗腫瘍効果を増

強できるかもしれない。抗 PD-1 抗体と抗 CD137 抗体と自家腫瘍浸潤リンパ球を用いた養子免疫療法の臨床試験が進行悪性黒色腫に対して行われており、また進行悪性黒色腫に対し、癌ペプチドに、ニボルマブあるいはニボルマブ+イピリムマブの試験も行われている⁴⁶⁾。

腫瘍浸潤リンパ球には、CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺の制御性 T 細胞 (Treg) が高頻度に存在し⁴⁷⁾、リン酸化合物で刺激した $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖を著しく阻害するという報告もある⁴⁸⁾。Treg の除去に抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) が有用との報告があり⁴⁹⁾、現在臨床試験が行われており、効果が期待できる薬剤である。また、間葉系幹細胞も $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖を抑制するという報告もある⁵⁰⁾。骨髄由来抑制性細胞が $\gamma\delta$ 型 T 細胞の機能を阻害するという報告は無いが、細胞障害性 T 細胞の CD3 ζ 鎖の発現低下による機能不全を引き起こすという報告もあり⁵¹⁾、同様に $\gamma\delta$ 型 T 細胞の機能不全の原因になり得る。

$\gamma\delta$ 型 T 細胞の機能を十分に発現させるためには、さらなる基礎研究と臨床試験が必要である。そして、たとえ進行癌であっても治癒に至る免疫療法が確立することが可能になると思われる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- Saito H, Kranz DM, Takagaki Y, et al: Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*, 309: 757—762, 1984.
- Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, et al: Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*, 322: 145—149, 1986.
- Chien YH, Iwashima M, Kaplan KB, et al: A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature*, 327: 677—682, 1987.
- Porcelli S, Brenner MB, Band H: Biology of human $\gamma\delta$ T cell receptor. *Immunol Rev*, 120: 137—183, 1991.
- Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, et al: Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science*, 264: 267—270, 1994.
- Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, et al: Natural and synthetic nonpeptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. *Nature*, 375: 155—158, 1995.
- Gober HJ, Kistowska M, Angman L, et al: Human T Cell Receptor $\gamma\delta$ Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *J Exp Med*, 197: 163—168, 2003.
- Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB: Human $\gamma\delta$ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: Implications for innate immunity. *Immunity*, 11: 57—65, 1999.
- Harly C, Guillaume Y, Nedellec S, et al: Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. *Blood*, 120: 2269—2279, 2012.
- Sandstrom A, Peigne CM, Leger A, et al: The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells. *Immunity*, 40: 490—500, 2014.
- Wang H, Henry O, Distefano MD, et al: Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells. *J Immunol*, 191: 1029—1042, 2013.
- Kato Y, Tanaka Y, Miyagawa F, et al: Targeting of tumor cells for human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptide antigens. *J Immunol*, 167: 5092—5098, 2001.
- Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M: Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med*, 340: 737—738, 1999.
- Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al: $\gamma\delta$ T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood*, 102: 200—206, 2003.
- Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, et al: Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonate antigen. *J Immunol*, 166: 5508—5514, 2001.
- Dieli F, Vermijlen D, Fulfarò F, et al: Targeting human $\gamma\delta$ T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 67: 7450—7457, 2007.
- Dieli F, Gebbia N, Poccia F, et al: Induction of $\gamma\delta$ T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients *in vivo*. *Blood*, 102: 2310—2311, 2003.
- Lang JM, Kaikobad MR, Wallace M, et al: Pilot trial of interleukin-2 and zoledronic acid to augment $\gamma\delta$ T cells as treatment for patients with refractory renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1447—1460, 2011.
- Bennouna J, Levy V, Sicard H, et al: Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a V γ 9V δ 2 T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. *Cancer Immunol Immunother*, 59: 1521—1530, 2010.

- 20) Meraviglia S, Eberl M, Vermijlen D, et al: *In vivo* manipulation of V γ 9V δ 2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. *Clin Exp Immunol*, 161: 290–297, 2010.
- 21) Wilhelm M, Smetak M, Schaefer-Eckart K, et al: Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of haploidentical $\gamma\delta$ T cells. *J Transl Med*, 12: 45, 2014.
- 22) Tanaka Y, Kobayashi H, Terasaki T, et al: Synthesis of pyrophosphate-containing compounds that stimulate V γ 2V δ 2 T cells: Application to cancer immunotherapy. *Med Chem*, 3: 85–89, 2007.
- 23) Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al: 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*, 56: 469–476, 2007.
- 24) Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al: Phase-I study of Innacell $\gamma\delta$, an autologous cell-therapy product highly enriched in V γ 9V δ 2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother*, 57: 1599–1609, 2008.
- 25) Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, 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.
- 26) Benzaid I, Mönkkönen H, Stresing V, et al: High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote V γ 9V δ 2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity *in vivo*. *Cancer Res*, 71: 4562–4572, 2011.
- 27) Kobayashi H, Tanaka Y, Shimmura H, et al: Complete remission of lung metastasis following adoptive immunotherapy using activated autologous $\gamma\delta$ T-cells in a patient with renal cell carcinoma. *Anticancer Res*, 30: 575–579, 2010.
- 28) Nicol AJ, Tokuyama H, Mattarollo SR, et al: Clinical evaluation of autologous $\gamma\delta$ T cell-based immunotherapy for metastatic solid tumours. *Br J Cancer*, 105: 778–786, 2011.
- 29) Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, et al: A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small-cell lung cancer patients with autologous $\gamma\delta$ T cells. *Eur. J. Cardiothorac Surg*, 37: 1191–1197, 2010.
- 30) Abe Y, Muto M, Nieda M, 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.
- 31) Wada I, Matsushita H, Noji S, 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.
- 32) Fisher JP, Heuveljans J, Yan M, et al: $\gamma\delta$ T cells for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 3: e27572, 2014.
- 33) Tsuda J, Li W, Yamanishi H, et al: Involvement of CD56^{bright}CD11c⁺ cells in IL-18-mediated expansion of human $\gamma\delta$ T cells. *J Immunol*, 186: 2003–2012, 2011.
- 34) Nussbaumer O, Gruenbacher G, Gander H, et al: Essential requirements of zoledronate-induced cytokine and $\gamma\delta$ T cell proliferative responses. *J Immunol*, 191: 1346–1355, 2013.
- 35) Sugie T, Murata-Hirai K, Iwasaki M, et al: Zoledronic acid-induced expansion of $\gamma\delta$ T cells from early-stage breast cancer patients: Effect of IL-18 on helper NK cells. *Cancer Immunol. Immunother*, 62: 677–687, 2013.
- 36) Thedrez A, Harly C, Morice A, et al: IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V γ 9V δ 2 T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunol*, 182: 3423–3431, 2009.
- 37) Dopfer EP, Hartl FA, Oberg H-H, et al: The CD3 conformational change in the $\gamma\delta$ T cell receptor is not triggered by antigens but can be reforced to enhance tumor killing. *Cell Rep*, 7: 1704–1705, 2014.
- 38) Rossini M, Adami S, Viapiana O, et al: Long-term effects of amino-bisphosphonates on circulating $\gamma\delta$ T cells. *Calcif. Tissue Int*, 91: 395–399, 2012.
- 39) Lamb LS Jr, Bowersock J, Dasgupta A, et al: Engineered drug resistant $\gamma\delta$ T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: A strategy for combining chemo- and immunotherapy. *PLoS One*, 8: e51805, 2013.
- 40) Bryant NL, Gillespie GY, Lopez RD, et al: Preclinical evaluation of *ex vivo* expanded/activated $\gamma\delta$ T cells for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, 101: 179–188, 2011.
- 41) Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, et al: Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 369: 122–133, 2013.
- 42) Hamid O, Robert C, Daud A, et al: Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 369: 134–144, 2013.
- 43) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366: 2443–2454, 2012.

- 44) Iwasaki M, Tanaka Y, Kobayashi H, et al: Expression and function of PD-1 in human $\gamma\delta$ T cells that recognize phosphoantigens. *Eur J Immunol*, 41: 345—355, 2011.
- 45) Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, et al: Blockade of programmed death-1 ligand on dendritic cells enhanced T cell activation and cytokine production. *J Immunol*, 170: 1257—1266, 2003.
- 46) Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, et al: Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol*, 31: 4311—4318, 2013.
- 47) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10: 942—949, 2004.
- 48) Kunzmann V, Kimmel B, Herrmann T, et al: Inhibition of phosphoantigen-mediated $\gamma\delta$ T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology*, 126: 256—267, 2009.
- 49) Ni X, Langridge T, Duvic M: Depletion of regulatory T cells by targeting CC chemokine receptor type 4 with mogamulizumab. *Oncoimmunology*, 4: e1011524, 2015.
- 50) Petrini I, Pacini S, Petrini M, et al: Mesenchymal cells inhibit expansion but not cytotoxicity exerted by gamma-delta T cells. *Eur J Clin Invest*, 39: 813—818, 2009.
- 51) Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, et al: Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13: 721s—726s, 2007.

THE APPLICATION FOR CANCER IMMUNOTHERAPY USING *in vivo* OR *in vitro* ACTIVATED $\gamma\delta$ T CELL

Hirohito Kobayashi and Hitoshi Kanno

Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University

Keywords:

$\gamma\delta$ T cell, cancer immunotherapy, phosphorylated antigen, amino-bisphosphonate, clinical trial

©2016 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://yuketsu.jstmct.or.jp/>