

ゾレドロン酸で前処置した白血病性形質 細胞様樹状細胞株PMDC11を用いた $\gamma\delta$ T細胞の効果的な誘導

西澤 幹則・成田美和子・岩谷 俊平・大岩 恵理・内山 孝由・高橋 益廣

Key words : $\gamma\delta$ T細胞, ゾレドロン酸, 樹状細胞, 細胞傷害活性

要旨 $\gamma\delta$ T細胞は様々な腫瘍細胞に対する抗腫瘍活性を有しており, *in vitro*においてゾレドロン酸を用いる事で末梢血単核球(PBMNC)から選択的に誘導することが可能であることから, $\gamma\delta$ T細胞の腫瘍に対する養子免疫療法への応用が期待されている。また, ゾレドロン酸で前処置した単球由来樹状細胞(moDC)でPBMNCを刺激することで, 従来の培養法に比べ効果的に $\gamma\delta$ T細胞を誘導すること可能であるという報告がある。そこで本検討では, 当研究室で樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株PMDC11を用いた場合でも, moDCと同様に $\gamma\delta$ T細胞をより効果的に誘導出来るか否かを検討した。ゾレドロン酸で24時間前処置したPMDC11でPBMNCを刺激することで従来の培養法に比べより効果的に $\gamma\delta$ T細胞を誘導することが可能であった。また, 誘導された $\gamma\delta$ T細胞の腫瘍細胞株に対する細胞傷害活性も確認された。以上のことから, $\gamma\delta$ T細胞を用いた養子免疫療法へのPMDC11の応用の可能性が示唆された。

緒言

$\gamma\delta$ T細胞は末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocyte: PBL)の1~5%を占める少ない細胞群である。 $\gamma\delta$ T細胞は $\gamma\delta$ T細胞受容体(T cell receptor: TCR)を介して, メバロン酸代謝経路の中間代謝物であるイソペンテニルピロリン酸(isopentenyl pyrophosphate: IPP)などのリン酸化抗原をMHC非拘束性に認識し活性化する。腫瘍細胞においては, メバロン酸代謝経路のヒドロキシメチルグルタリル(3-hydroxy-3-methylglutaryl: HMG) CoA還元酵素の発現が増強しているためメバロン酸代謝経路が亢進しており^(1,2), その結果として過剰に増加・蓄積したリン酸化抗原を $\gamma\delta$ T細胞が認識することで抗腫瘍活性を示すことが報告されている⁽³⁾。

アミノビスホスホネート製剤の一種であるゾレドロン酸(zoledronic acid: ZA)は, 破骨細胞の機能障害及び細胞死を誘導する薬剤であり⁽⁴⁾, 多発性骨髄腫の治療及び前立腺癌や肺癌などの骨転移による骨病変への治療に用いられている⁽⁵⁾。また, ゾレドロン酸は腫瘍細胞の他, 単球や樹状細胞に対してメバロン酸代謝のファルネシルニリン酸合成酵素を阻害する作用があ

り, 結果としてIPPの蓄積を誘導する⁽⁵⁾。この作用により, *in vitro*及び*in vivo*において $\gamma\delta$ T細胞が活性化・増殖されることが報告されている⁽⁷⁻⁹⁾(図1)。 $\gamma\delta$ T細胞を用いた腫瘍に対する養子免疫療法として, *in vitro*において患者の末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMNC)からゾレドロン酸や人工的に合成したIPPを用いて $\gamma\delta$ T細胞を誘導・増殖させ, これを患者

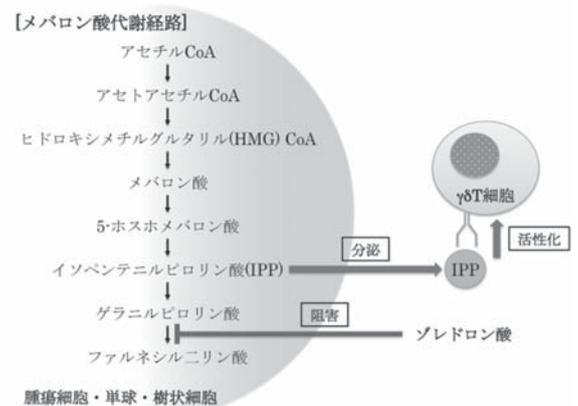


図1 メバロン酸代謝経路におけるゾレドロン酸の作用及び $\gamma\delta$ T細胞の活性化

に注入するという治療法があり、実際に複数の臨床研究が行われている^(10, 11)。また、従来のPBMNCに直接ゾレドロン酸を加える $\gamma\delta$ T細胞の誘導法と比較して、ゾレドロン酸で前処置した単球由来樹状細胞(monocyte-derived dendritic cell: moDC)でPBLを刺激することで、従来の培養法に比べより効果的に $\gamma\delta$ T細胞を誘導することが可能であるという報告がある^(12, 13)。

当研究室で樹立したPMDC05は、細胞株であるがため安定して増殖させることが可能であり常に必要量の細胞数を確保出来る他、TNF- α やIL-12のサイトカイン産生能及び抗原提示能を有することが確認されている⁽¹⁴⁾。また、近年の当研究室での研究において、PMDC05にレンチウイルスベクターを用いて共刺激分子CD80遺伝子を導入することで抗原提示能をより増強させた細胞株を樹立し、これをPMDC11と命名した⁽¹⁵⁾。

そこで本検討においては、moDCの代わりにゾレドロン酸で前処置したPMDC11を用いることで、従来の $\gamma\delta$ T細胞の培養方法と比してより効果的に $\gamma\delta$ T細胞を誘導できる否かを検討した。

材料と方法

細胞株及び細胞培養

本検討では、CD80遺伝子導入白血病性形質細胞様樹状細胞株(PMDC11)及びgreen fluorescent protein遺伝子導入ヒト骨髄腫細胞株(GFP-RPMI8226)を用いた。PMDC11は10% fetal bovine serum (FBS) 添加 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Life Technologies Corporation, CA)で培養を行い、GFP-RPMI8226は10% FBS添加Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640; Life Technologies Corporation, CA)で培養を行った。

サイトカイン及び薬剤

Interleukin (IL) -2 (シオノギ製薬, 大阪), ゾレドロン酸(Nozartis pharma AG, Basel, Switzerland)を用いた。

フローサイトメトリーによる解析

培養細胞にFc γ レセプターブロッカ試薬を加え4℃, 10分間反応させ、各染色抗体で4℃, 20分間染色した。抗体は、fluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗体: IgG1, CD3, $\gamma\delta$ TCR (BD Biosciences, San Jose, CA), phycoerythrin (PE) 標識抗体: IgG1, CD3 CD80 (BD Biosciences), IgG2b, CD40, CD83, CD86, HLA-DR (Biolegend, San Diego, CA), CD1a (Immunotech, Marseille, France), PerCP 標識抗体: IgG1, CD3 (BD Biosciences)を使用した。染

色後、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)で1回洗浄し、FACSCalibur (BD Biosciences)で測定し、CellQuest Pro (BD Biosciences)で解析した。

ゾレドロン酸によるPMDC11細胞の前処置

PMDC11を 1.0×10^6 cells/mlに調整後、ゾレドロン酸(終濃度0, 1, 5, 10 μ M)添加し、24時間培養を行った。以降、ゾレドロン酸で前処置後のPMDC11をPMDC11*ZAと表記する。

PMDC11細胞の細胞表面分子の発現解析

PMDC11*ZAを回収し、PMDC11の細胞表面分子CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86及びHLA-DRの発現をフローサイトメトリーで解析した。

PBMNCの分離

健康人に対して十分な説明を行い、同意を得た後、末梢血を採取した。採取した末梢血を、Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway)の上に静かに重層し、 $800 \times g$ で30分間遠心した。その後、中間層よりPBMNCを新しい試験管に移し、RPMI1640培地を加えて混和し、 $300 \times g$ で10分間遠心を行った。上清を除き、さらにRPMI1640培地を加え混和し、 $200 \times g$ で10分間遠心した。この沈殿したPBMNCを10% FBS添加RPMI1640培地に浮遊し、トリパンブルー色素除去試験法により生細胞数を求めた。

$\gamma\delta$ T細胞の誘導

健康人由来PBMNCを10% FBS添加RPMI1640培地に浮遊し、 2×10^6 cells/mlに調節した。その後、細胞浮遊液を1 ml/wellずつ12-well plateに播種した。

PBMNCに直接ゾレドロン酸を加える培養系では、10% FBS添加RPMI1640培地を1 ml/wellずつ各wellに加え、総量を2 mlとした後、ゾレドロン酸(終濃度0, 1, 5, 10 μ M)及びIL-2 (終濃度10 U/ml)を添加し、37℃, 5%CO₂, 湿潤状態で7日間培養を行った。

PMDC11*ZAを用いた培養系では、PMDC11*ZAをRPMI1640培地で3回洗浄し、 4.0×10^5 cells/wellに調節した後、30Gyの γ 線照射を行った。ラジエーション後、PMDC11*ZAを1 ml/wellずつ各wellに加え総量を2 mlとした後、IL-2 (終濃度10 U/ml)を添加し、37℃, 5%CO₂, 湿潤状態で7日間共培養を行った。

培養7日間後、各wellの培養細胞中の $\gamma\delta$ T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。また、各wellの生細胞数をトリパンブルー色素除去試験法により求

めた。

細胞傷害活性試験

効果細胞に培養後の各wellの細胞, 標的細胞にGFP-RPMI8226を用いて細胞傷害活性試験を行った。効果細胞はフェノールレッド非添加RPMI1640培地で1回洗浄後, 1.0×10^4 , 5.0×10^4 または 1.0×10^5 cells/100 mlに調節した。標的細胞はフェノールレッド非添加RPMI1640培地で2回洗浄した後 1.0×10^4 cells/100 mlに調節した。調節後, 5 mlポリエチレンチューブ (BD Biosciences)に効果細胞と標的細胞をそれぞれ100 mlずつ加え, 37°C, 5%CO₂, 湿潤状態で4時間共培養を行った。その後, 各チューブに7-amino-actinomycin.D (7AAD ;SIGMA-ALDRICH) を1 μ l加えて暗所で15分室温に置き, 死細胞を染色した後, FACS解析を行った。GFP⁺かつ7AAD⁻の細胞を生細胞とした。解析は1本につき120秒ずつ行い, 実験は全てtriplicateで行った。細胞傷害活性は以下のように算出した。

細胞傷害活性(% cytotoxicity)=[(標的細胞のみのチューブ中の標的生細胞数)-(効果細胞と標的細胞の共培養チューブ中の標的生細胞数)]/(標的細胞のみのチューブ中の標的生細胞数)×100

統計解析

統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad Prism Inc, San Diego, CA) を用いて行った。統計学的差は一元配置分散分析と Tukeyの検定、及び二元配置分散分析とBonferroni法により検定し, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

PMDC11細胞の細胞表面分子発現に対するゾレドロン酸の影響

まずPMDC11の細胞表面分子発現におけるゾレドロン酸の影響を検討した。フローサイトメトリーの結果については, 同様な検討を行ったうちの代表的なデータを示した。発現が見られる分子について統計解析した結果では, 細胞表面分子の発現に対するゾレドロン酸の影響は認められなかった(図2)。

PMDC11*ZAを用いた $\gamma\delta$ T細胞の誘導

次に実際にPMDC11*ZAでPBMNCを刺激すること

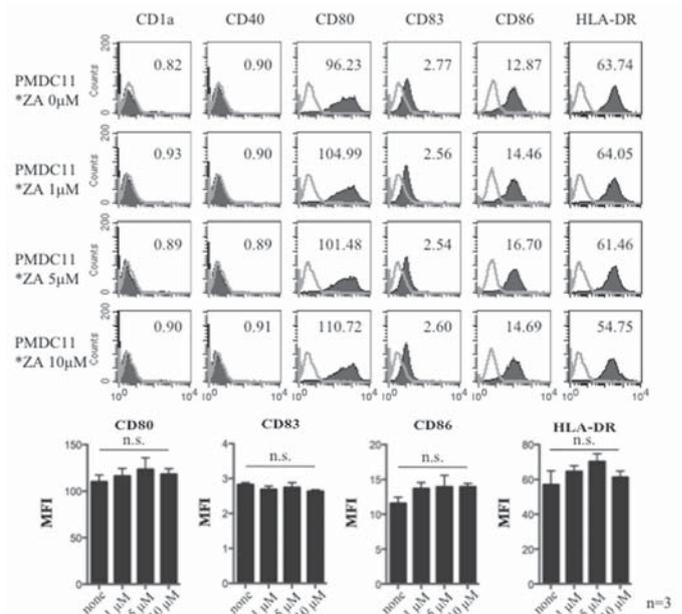


図2 PMDC11細胞の細胞表面分子発現に対するゾレドロン酸の影響の検討

各濃度のゾレドロン酸(0, 1, 5, 10 μ M)で前処置したPMDC11の細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。ヒストグラム内の数字は各分子の平均蛍光強度(mean fluorescence intensity: MFI)をアイソタイプコントロールであるIgG1またはIgG2bのMFIで割ったものを示している。下のグラフは, 発現が見られる分子について統計解析を行ったものである。

で, 従来の培養法と比べより効果的に $\gamma\delta$ T細胞を誘導できるか否かを検討した。PBMNCに各濃度のゾレドロン酸(0, 1, 5, 10 μ M)を直接加える従来の培養系と, 各濃度のゾレドロン酸(0, 1, 5, 10 μ M)で前処置したPMDC11*ZAでPBMNCを刺激する培養法で誘導を行った。

PBMNCに直接ゾレドロン酸を加える培養系では, ゾレドロン酸1 μ Mを用いた培養系において最も多くの $\gamma\delta$ T細胞が誘導された。一方, PMDC11*ZAでPBMNCを刺激する培養系ではPMDC11*ZA 10 μ Mを用いた培養系において最も多くの $\gamma\delta$ T細胞が誘導された。また, PMDC11*ZA 10 μ Mを用いた培養系はゾレドロン酸1 μ Mを用いた培養系に比べ, より多くの $\gamma\delta$ T細胞を誘導することが可能であった(図3)。

同様の検討をグラフにまとめ統計解析を行った結果では, PMDC11*ZA 10 μ Mを用いた培養系において, 培養細胞中の $\gamma\delta$ T細胞の割合が高い傾向にあったが有意差は確認されなかった。一方で誘導された $\gamma\delta$ T細胞

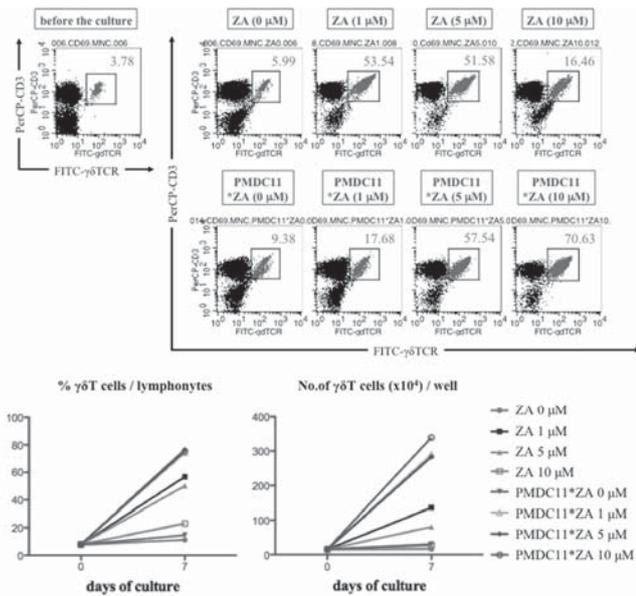


図3 ギレドロン酸もしくはPMDC11*ZAを用いた $\gamma\delta$ T細胞の誘導

健康人からPBMCを分離し、ギレドロン酸を直接加える培養法またはギレドロン酸で前処置したPMDC11で刺激する培養系により $\gamma\delta$ T細胞の誘導を行った。上の図はフローサイトメトリーによる $\gamma\delta$ T細胞の解析結果を示している。左下のグラフは培養細胞中の $\gamma\delta$ T細胞の割合、その右のグラフは絶対数を表している。

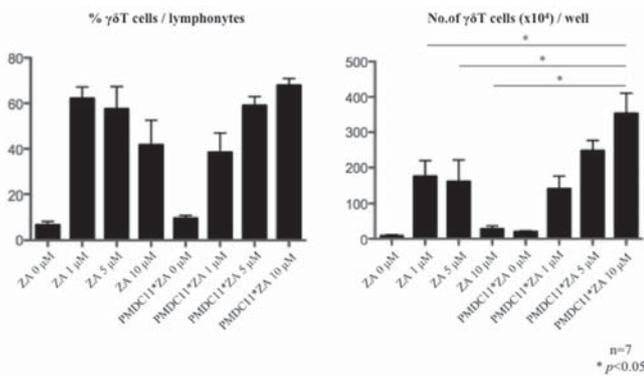


図4 ギレドロン酸もしくはPMDC11*ZAを用いた $\gamma\delta$ T細胞の誘導のグラフ

$\gamma\delta$ T細胞の誘導の結果をまとめ、統計解析を行ったグラフである。左のグラフは培養細胞中の $\gamma\delta$ T細胞の割合、右のグラフはその絶対数を表している。

細胞の実数に関しては、従来の培養法と比較して有意に増加していた(図4)。

ゾレドロン酸もしくはPMDC11*ZAを用いて誘導した $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害活性

各培養系において $\gamma\delta$ T細胞の誘導効率の良かった、PBMCにゾレドロン酸 $1\mu\text{M}$ を加える培養系とPBMCをPMDC11*ZA $10\mu\text{M}$ で刺激する培養系により誘導された細胞が腫瘍細胞株に対して細胞傷害活性を有するか否かを検討した。各対照としてゾレドロン酸を加えない培養系とPMDC11*ZA $0\mu\text{M}$ で刺激した培養系を用いた。効果細胞には培養により誘導された細胞を用い、標的細胞にはGFP-RPMI8226を用いた。そして、効果細胞と標的細胞をそれぞれ1:1, 5:1, 10:1の割合で混合し、細胞傷害性試験を行った。GFP-RPMI8226に対する細胞傷害活性を比較すると、PBMCにゾレドロン酸 $1\mu\text{M}$ を加える培養系ではゾレドロン酸を加えない培養系よりも5:1, 10:1において有意に高かった。一方、PBMCとPMDC11*ZA $10\mu\text{M}$ と共培養する培養系では、PMDC11*ZA $0\mu\text{M}$ と共培養した培養系よりも全ての割合で有意に差が見られた。また、PBMCにZA $1\mu\text{M}$ を加える培養系と比較した場合でもPMDC11*ZA $10\mu\text{M}$ と共培養する培養系の方が全ての割合において有意に高かった(図5)。

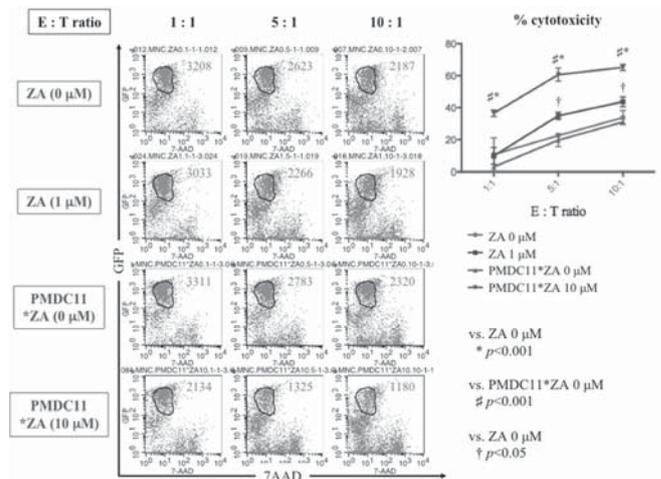


図5 ギレドロン酸もしくはPMDC11*ZAを用いて誘導した $\gamma\delta$ T細胞の細胞傷害活性試験

各培養系により誘導された細胞を効果細胞として細胞傷害活性を測定した。標的細胞にはGFP-RPMI8226を用いた。効果細胞と標的細胞は1:1, 5:1, 10:1の割合で共培養して行った。左の図はフローサイトメトリーの結果である。ドットプロット内の数字はゲートした生細胞の数を表している。右のグラフはフローサイトメトリーの結果をグラフに直したものである。

考察

$\gamma\delta$ T細胞は、多発性骨髄腫や小細胞癌などの様々な腫瘍に対して抗腫瘍活性を有することが確認されている^(16,17)。実際に癌患者を対象とした臨床試験においても、 $\gamma\delta$ T細胞の抗腫瘍効果が報告されており^(10,11)、 $\gamma\delta$ T細胞を用いた養子免疫療法は今後の発展が期待される治療法であると考えられる。しかしながら、癌患者の中にはPBMNCにゾレドロン酸を直接加える従来の $\gamma\delta$ T細胞の培養法では十分量の $\gamma\delta$ T細胞が誘導されない者もあり⁽¹⁸⁾、このことから $\gamma\delta$ T細胞のより効果的な誘導方法の開発がこの治療法の今後の発展に必要である。一方、従来の培養法とは異なり、ゾレドロン酸で前処置したmoDCでPBLを刺激することで、従来の培養法では十分量の $\gamma\delta$ T細胞が誘導されなかった癌患者においても $\gamma\delta$ T細胞を効果的に誘導することが可能であったと報告されている^(13,14)。この報告を受け、本検討ではPMDC11細胞を用いることでも、moDCと同様に $\gamma\delta$ T細胞を効果的に誘導出来るか否かを検討した。

PBMNCからのmoDCの誘導において、moDCを成熟させる際にゾレドロン酸を加える事で、細胞の生存能を損なうことなく細胞表面のCD80及びHLA-DRの発現が増強したという報告がある⁽¹⁹⁾。そこで、まずPMDC11細胞の細胞表面分子発現に対するゾレドロン酸の影響を検討した。PMDC11細胞をゾレドロン酸で前処置し細胞表面分子発現を解析した結果では、PMDC11細胞の表面分子発現の有意な変化は認められなかった。このことから、ゾレドロン酸は細胞表面分子の発現には影響を与えないことが確認された。

PMDC11でPBMNCを刺激する $\gamma\delta$ T細胞の誘導では、前処置に使用するゾレドロン酸の濃度依存性に、培養細胞中の $\gamma\delta$ T細胞の割合及び細胞数が増加する傾向が認められた。これは、高濃度のゾレドロン酸を加えることで、PMDC11のメバロン酸代謝経路が強く阻害され、より多くのIPPが分泌されていることが要因と予想される。また、従来のPBMNCにゾレドロン酸を加える $\gamma\delta$ T細胞の培養法と比べ、 $10\mu\text{M}$ のゾレドロン酸で前処置したPMDC11を用いた場合で多量の $\gamma\delta$ T細胞を有意に誘導することが可能であった。しかし、培養細胞中の $\gamma\delta$ T細胞の割合に関しては、従来の培養法に比べ高い傾向にあったが有意差は認められなかった。この理由として、PMDC11はアロの細胞株であるためにPMDC11が提示するアロ抗原と反応して $\alpha\beta$ T細胞などの他種の細胞も同時に誘導・増殖されていることが考えられた。

養子免疫療法において、誘導された細胞が実際に腫瘍細胞を傷害するか否かを確認することは必要不可欠である。本検討における各培養細胞を用いた細胞傷害活性試験の結果では、どちらの培養法においても、培養細胞が腫瘍細胞に対して細胞傷害活性を有することが確認された。また、従来のPBMNCにゾレドロン酸を加える培養法で誘導された細胞と比較して、PMDC11を用いた培養法で誘導された細胞を用いた場合でより高い抗腫瘍効果を示した。

PBMNCから誘導するmoDCと異なり、当研究室で樹立したPMDC11は細胞株として安定して培養することができ、常に必要量の細胞数を確保することが可能である。また今回の検討において、ゾレドロン酸で前処置したPMDC11を用いた $\gamma\delta$ T細胞の培養法により、高い抗腫瘍効果を有する $\gamma\delta$ T細胞を多量に誘導することが可能であった。以上のことから、 $\gamma\delta$ T細胞を用いた各種腫瘍に対する養子免疫療法へのPMDC11の応用の可能性が示された。今後は $\gamma\delta$ T細胞のみを選択的に誘導するような培養条件のさらなる検討が必要であると思われた。

引用文献

1. Harwood HJ Jr, Alvarez IM, Noyes WD, et al. In vivo regulation of human leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: increased enzyme protein concentration and catalytic efficiency in human leukemia and lymphoma. *J Lipid Res.* 1991;32(8):1237-52.
2. Assian R, Pradines A, Pratz C, et al. Epidermal growth factor stimulates 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase expression via the ErbB-2 pathway in human breast adenocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;260(3):699-706.
3. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, et al. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.* 2003;197(2):163-8.
4. Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, et al. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone.* 2001;28(5):465-73.
5. Berenson JR. Recommendations for zoledronic acid treatment of patients with bone metastases. *Oncologist.* 2005;10(1):52-62.
6. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, et al. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med.* 2003;197(2):163-8.
7. Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, et al. Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood.* 2000;96(2):384-92.
8. Mariani S, Muraro M, Pantaleoni F, et al. Effector gammadelta T cells and tumor cells as immune targets of zoledronic acid in multiple myeloma. *Leukemia.* 2005;19(4):664-70.

9. Dieli F, Gebbia N, Poccia F, et al. Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood*. 2003;102(6):2310-1.
10. Chiplunkar S, Dhar S, Wesch D, et al. gammadelta T cells in cancer immunotherapy: current status and future prospects. *Immunotherapy*. 2009;1(4):663-78.
11. Yoshida Y, Nakajima J, Wada H, et al. $\gamma\delta$ T-cell immunotherapy for lung cancer. *Surg Today*. 2011;41(5):606-11.
12. Castella B, Riganti C, Fiore F, et al. Immune modulation by zoledronic acid in human myeloma: an advantageous cross-talk between V γ 9V δ 2 T cells, $\alpha\beta$ CD8+ T cells, regulatory T cells, and dendritic cells. *J Immunol*. 2011;187(4):1578-90.
13. Cabillic F, Toutirais O, Lavoué V, et al. Aminobisphosphonate-pretreated dendritic cells trigger successful Vgamma9Vdelta2 T cell amplification for immunotherapy in advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(11):1611-9.
14. Yamahira A, Narita M, Nakamura T, et al. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leuk Res*. 2011;35(6):793-9.
15. Yamahira A, Narita M, Ishii K, et al. Enhancement of antigen presenting ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) by lentiviral vector-mediated transduction of CD80 gene. *Leuk Res*. 2012;36(12):1541-6.
16. Burjanadzé M, Condomines M, Reme T, et al. In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007;139(2):206-16.
17. Sato K, Kimura S, Segawa H, et al. Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer*. 2005;116(1):94-9.
18. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(11):1599-609.
19. Fiore F, Castella B, Nuschak B, et al. Enhanced ability of dendritic cells to stimulate innate and adaptive immunity on short-term incubation with zoledronic acid. *Blood*. 2007;110(3):921-7.

Efficient amplification of $\gamma\delta$ T cell by PMDC11 cells treated with zoledronic acid

Yoshinori NISHIZAWA, Miwako NARITA, Takayoshi UCHIYAMA
Shunpei IWAYA, Eri OIWA, Masuhiro TAKAHASHI

Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, Niigata University, Niigata, Japan

Key words : $\gamma\delta$ T cell, zoledronic acid, dendritic cell, cytotoxicity

Abstract $\gamma\delta$ T cells possess a cytotoxic activity against various human tumor cells and can be easily expanded by phosphoantigen stimulation in vitro. Thus, adoptive immunotherapy with $\gamma\delta$ T cells is an attractive strategy for tumor. It has been reported that dendritic cells (DCs) treated with aminobisphosphonates, such as zoledronic acid (ZA), could more efficiently expand $\gamma\delta$ T cells than conventional culture protocol without DCs in tumor patients. On the other hand, we have reported that a leukemic plasmacytoid dendritic cell line transduced with CD80 gene, PMDC11, which was previously established in our laboratory, possess the function equivalent to conventional DCs. Here, in order to establish the method of generating potent $\gamma\delta$ T cells, we investigated whether ZA-treated PMDC11 cells could also expand $\gamma\delta$ T cells efficiently. $\gamma\delta$ T cell expansions were performed by co-culturing PB mononuclear cells (MNCs) with PMDC11 cells incubated with ZA for 24 hours. Co-culturing of PBMNCs with ZA-treated PMDC11 cells induced efficient expansion of $\gamma\delta$ T cells compared with the conventional culture protocol without PMDC11 cells. In the cytotoxicity assay, expanded $\gamma\delta$ T cells were used as effector cells and myeloma cell line (RPMI8226) was used as target cells. This assay demonstrated that expanded $\gamma\delta$ T cells possessed cytotoxicity against RPMI8226 in an effector-to-target ratio-dependent manner. These finding showed that ZA-treated PMDC11 cells efficiently expanded $\gamma\delta$ T cells with cytotoxic activity. The present date suggested that the method of generating $\gamma\delta$ T cells by co-culturing PBMNCs with ZA-treated PMDC11 cells could be applicable to an efficient $\gamma\delta$ T cell adoptive immunotherapy for tumors.

Accepted : 2015.7.30