

[第三回千葉医学会賞 : 基礎医学部門]

NKT細胞を標的としたがん免疫細胞治療の開発研究

本 橋 新一郎

要 旨

NKT細胞は抗原提示細胞上のCD1d分子に提示された外来性抗原である糖脂質、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) を認識し活性化する。活性化したNKT細胞は癌転移モデルにおいて強力な抗腫瘍効果を示すことから、ヒト担癌状態においても内在性NKT細胞の活性化により強力な抗腫瘍効果を発揮することが期待される。これらのことからNKT細胞を標的とした免疫細胞治療の臨床応用を目指した臨床試験を施行している。現在までに原発性非小細胞肺癌に対して施行した内在性のNKT細胞活性化を目指す α -GalCerパルス樹状細胞療法安全性、NKT細胞特異的免疫反応および臨床効果につき概説する。

Key words: NKT cell, immunotherapy, translational research, lung cancer

I. はじめに

Invariant Natural Killer T cell (NKT細胞) は自然免疫系に属するリンパ球で、NK受容体とともに単一のT細胞抗原受容体 (TCR) を発現する。糖脂質 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) がNKT細胞の特異的リガンドであることが千葉大学免疫発生学教室で発見されたことなどから[1], NKT細胞の機能解析は飛躍的に進み、現在までに抗腫瘍免疫反応を始めとする様々な免疫反応に関与していることが報告されている[2,3]。 α -GalCerによって活性化されたNKT細胞は、パーフォリンなど様々な殺細胞誘導因子を発現することで、標的細胞に対して直接細胞傷害活性を示す[4,5]。また活性化したNKT細胞が急速にかつ大量に産生するインターフェロン- γ などのTh1タイプのサイトカインや、樹状細胞 (DC) の成熟化などを介して、NK細胞やCD8⁺T細胞の細胞傷害活性の増強効果を発揮する点で非常にユニークな細胞である[6](図1)。さらにマウス

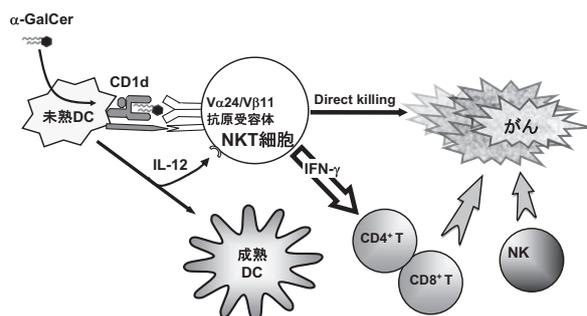


図1 NKT細胞による抗腫瘍メカニズム

未熟DC上の抗原提示分子CD1dに提示された α -GalCerをNKT細胞の抗原受容体V α 24/V β 11が認識すると活性化し、がんに対する直接の抗腫瘍効果を発揮する。活性化したNKT細胞との相互作用にてDCは成熟化が誘導され、T細胞活性化能が高まるとともに、活性化したNKT細胞が産生するIFN- γ やDCから産生されるIL-12などにより、NK細胞やCD4⁺、CD8⁺T細胞の抗腫瘍効果が増強される。

癌転移モデルにおいて、 α -GalCerを単独で投与するよりもDCに提示させて投与する細胞治療の方が、より強力な抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった[7]。これらのことから千葉大学で

は、NKT細胞の示す強力な抗腫瘍効果を利用した癌治療の臨床応用を目指して、NKT細胞を標的とした免疫細胞治療の開発研究を行っている。本稿では、すでに千葉大学で臨床研究として施行されている非小細胞肺癌に対するNKT細胞を標的とした免疫治療の開発研究について概括する。

II. 原発性非小細胞肺癌症例におけるNKT細胞の機能解析

ヒトNKT細胞が末梢血単核球に占める割合は個人差が非常に大きいものの、およそ0.1~0.01%を占めるに過ぎない非常にマイナーな細胞集団である。末梢血NKT細胞の原発性肺癌及び健常者での絶対数及びIFN- γ 産生能の解析を行った[8]。NKT細胞は抗V α 24抗体および抗V β 11抗体を用いてフローサイトメーターにより検出することにより、非常に鋭敏に同定することが可能である。臨床病期I期症例から進行期症例までの計60例における末梢血NKT細胞数を同年齢層の健常人と比較すると有意な減少を認めたが、癌の進行度との有意な相関は認められなかった。さらに患者末梢血NKT細胞数は減少しているものの、残存している個々のNKT細胞自体のIFN- γ 産生能は健常者と比較しほぼ同程度に保たれていた。つまり体内全体とすると機能的NKT細胞数は減少していることが判明した。同時にまた患者末梢血よりGM-CSFとIL-4で誘導したDCのNKT細胞への α -GalCer提示能も健常者とほぼ同程度に保たれていたことが明らかとなった。

患者末梢血中のNKT細胞分画の低下と予後との負の相関（頭頸部癌）や、腫瘍局所へのNKT細胞集積亢進と良好な予後との相関（大腸癌）の報告なども併せて考えると[9,10]、癌患者で相対的に機能低下したNKT細胞の再生・維持を図り、本来もつ強力な直接および間接的な抗腫瘍効果を発揮させるNKT細胞免疫治療の可能性が示唆された。

III. 樹状細胞療法の臨床研究に用いる抗原提示細胞の調製法

NKT細胞を体内で活性化することを目指すDC療法に向けて、臨床研究で利用可能な大量の抗原提示細胞の誘導方法を検討した。その結果、DCを含む抗原提示細胞の誘導には、成分採血にて採取した患者末梢血単核球すべてをGM-CSFおよびIL-2で培養する方法が優れていることが明らかとなった[11]（図2）。この培養系の特徴として、培養細胞に含まれるT細胞が産生するTNF- α により単球由来DCの成熟化が進み、 α -GalCer提示能が増強するのである。またDC以外の細胞も α -GalCerを提示し、DCと比較して弱いながらもNKT細胞を活性化できることも判明した。また、この全ての末梢血単核球を用いて培養する方法は単球分画の分離を必要としないなど、細胞調製工程が簡便であり、GMP（good manufacturing practice）を遵守した細胞加工による臨床研究には適切であると考えられた。

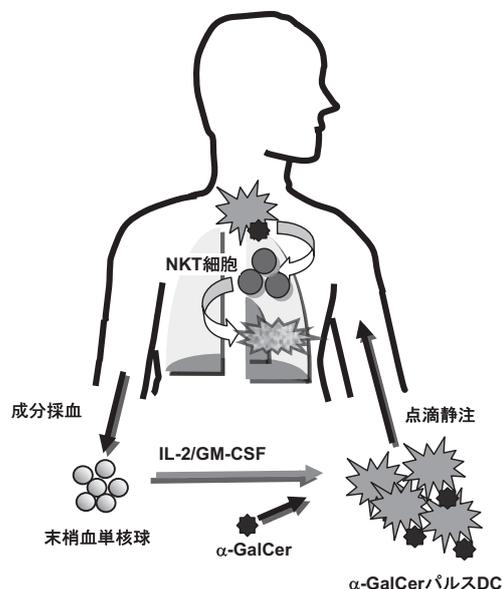


図2 肺癌に対する α -GalCerパルス樹状細胞の静脈内投与法

非小細胞肺癌に対するNKT細胞を標的とした免疫細胞治療に用いる α -GalCerパルスDCの誘導には、成分採血にて採取された全末梢血単核球をGM-CSFおよびIL-2で1~2週間培養する。投与前日に α -GalCerをパルスして α -GalCerパルスDCとし、翌日静脈内に点滴投与する。肺に到達した α -GalCerパルスDCが肺内NKT細胞を活性化し、抗腫瘍効果を発揮する。

IV. 肺癌に対するNKT細胞免疫系を用いた免疫細胞治療

千葉大学において初めて行われたNKT細胞免疫治療の臨床試験は、2001年より2003年にかけて施行した11例の標準治療終了後の切除不能進行期もしくは再発非小細胞肺癌に対する α -GalCerパルスDC療法である[12]。 5×10^7 個/ m^2 から最大 1×10^9 個/ m^2 の培養細胞を計4回投与する容量漸増試験として行い、重篤な有害事象を認めることなく施行可能であることが確認された。NKT細胞特異的免疫学的解析として、最大細胞数投与群においてのみ、 α -GalCerパルスDC投与に伴う末梢血NKT細胞数の変化が確認可能であった。NKT細胞数の顕著な増加を認めた一例では、NKT細胞からのIFN- γ 産生量のmRNAレベルでの増加を認めた。抗腫瘍効果の検討では、NKT細胞数の顕著な増加反応を示した症例では肺内腫瘍影の増大抑制が30ヶ月間継続し、臨床研究登録後59ヶ月の生存期間が得られた。

この結果を受けて、2005年から進行・再発非小細胞肺癌症例に対して、 1×10^9 個/ m^2 の α -GalCerパルスDCを静脈内に計4回投与する臨床試験を施行した[13]。17例でプロトコルが完遂し、解析が可能であった。観察期間中に成分採血や細胞投与に関連する重篤な副作用は認められず安全に施行可能であることが判明した。NKT細胞特異的免疫反応の解析では、ELISPOT法を用いて測定した末梢血単核球の α -GalCer反応性IFN- γ 産生細胞数が治療後明らかに増加した症例を10例に認めた。 α -GalCer反応性IFN- γ 産生細胞は通常NKT細胞であるが、 α -GalCerパルスDC投与後にはNK細胞が加わってくることが我々の解析から判明しており[14,15]、本治療により活性化したNKT細胞の他の免疫細胞へのadjuvant効果の一つと考えている。全症例の生存期間中央値は18.6ヶ月であり、また α -GalCerパルスDC投与により末梢血単核球中のIFN- γ 産生細胞の増加を認めた症例群は、非増加症例群と比較し有意に全生存期間の延長を認めた(図3)。このことよりIFN- γ 産生が α -GalCerパルスDC投与後の生存期間に関するバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

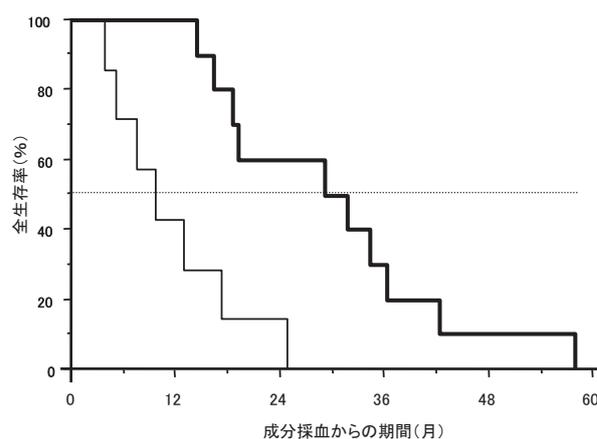


図3 非小細胞肺癌に対する α -GalCerパルスDC投与17例を、細胞投与後にIFN- γ 産生増強を認めた免疫療法反応群(n=10例、太線)と非反応群(n=7例、細線)に群分けしたときの細胞治療後の各群の生存曲線。起算日は成分採血施行日。免疫療法反応群の生存期間は非反応群と比較し、有意に良好であった($P=0.0011$, logrank test)。

V. おわりに

NKT細胞免疫系を標的とした免疫細胞治療に関しては、我々の施設以外からもその結果が報告されている[16,17]。千葉大学においては本稿で述べた肺癌に加えて、頭頸部癌に対する臨床研究を行っており、現在までに様々な形での抗腫瘍効果を明らかにしている[18-20]。肺癌に対するNKT細胞免疫治療の標準治療化への取り組みとして、これまでの成績を基に高度医療評価制度第3項に申請を行っており、現在審査中である。また新規の探索的臨床研究として、腫瘍局所への標的細胞のターゲティングを試みるために、新たな治療細胞デリバリー法である気管支鏡を利用した免疫細胞治療の臨床研究を開始している。

今後の治療成績の向上のためには、NKT細胞免疫治療の有効性が期待できる症例が治療前に選択可能となるバイオマーカーの開発が必須である。これまでに得られた末梢血サンプルを用いて、治療効果判定に有効と思われるバイオマーカーの網羅的解析から2候補遺伝子の同定に成功しており[21]、現在治療前にNKT細胞免疫治療に反応が期待される症例の予測に有用なバイオマーカーの探索をそのメカニズム解析とともに進めている。これらの研究の進捗により個別化医療の実現

を目指し、非小細胞肺癌の治療成績向上に貢献していきたいと考えている。

謝 辞

第三回千葉医学会賞（基礎医学部門）を受賞することが出来ましたのも、偏にこれまでご指導下さった多くの先生方を始めとして、共に研究生生活を送った同僚や後輩の皆様のご指導ご協力のお陰と思います。さらに臨床研究を行うに際しては、呼吸器外科外来・病棟のスタッフを始め、附属病院の様々な部署の多くの方々のご協力のお陰で、これまで遂行して行くことができました。この場をお借りいたしまして、お世話になりました皆様にご心より御礼申し上げますとともに、千葉医学会賞受賞に恥じぬようこれからも精一杯励んでいく所存ですので、今後ともご指導のほど宜しくお願い申し上げます。

SUMMARY

Invariant Natural killer T (iNKT) cells, a unique subgroup of lymphocytes with features of both T and natural killer (NK) cells are activated by a specific ligand, α -Galactosylceramide (α -GalCer), in a CD1d-dependent manner. iNKT cells modulate the function of a wide variety of other immune cells including anti-tumor effector cells in both a direct and indirect manner. α -GalCer-pulsed dendritic cells (DCs) exerted a strong anti-tumor activity in the mouse tumor metastatic models. Decreased numbers and a reduced function of iNKT cells have been observed in patients with various malignant diseases, thus correlating with a poor clinical outcome. Therefore, therapeutic intervention strategies aimed at the recovery of functional iNKT cells would be an appropriate rationale for the treatment of cancer. Early clinical trials of iNKT cell-based immunotherapy demonstrated that the administration of ligand-pulsed antigen presenting cells was safe and well tolerated. This review summarizes the results of a series of clinical trials in patients with non-small cell lung cancer and discusses iNKT cell-induced immune responses particularly those in the tumor microenvironment.

文 献

- 1) Kawano T, Cui J, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of $V\alpha 14$ NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278:1626-9.
- 2) Taniguchi M, Harada M, et al. The regulatory role of $V\alpha 14$ NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 483-513.
- 3) Fujii S, Motohashi S, et al. Adjuvant activity mediated by iNKT cells. *Semin Immunol* 2010; 22: 97-102.
- 4) Kawano T, Cui J, et al. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated $V\alpha 14$ NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5690-3.
- 5) Kawano T, Nakayama T, et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human $V\alpha 24$ NKT cells. *Cancer Res* 1999; 59: 5102-5.
- 6) Taniguchi M, Seino K, et al. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2003; 4: 1164-5.
- 7) Toura I, Kawano T, et al. Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J Immunol* 1999; 163: 2387-91.
- 8) Motohashi S, Kobayashi S, et al. Preserved IFN- γ production of circulating $V\alpha 24$ NKT cells in primary lung cancer patients. *Int J Cancer* 2002; 102: 159-65.
- 9) Molling JW, Langius JA, et al. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 862-8.
- 10) Tachibana T, Onodera H, et al. Increased intratumor $V\alpha 24$ -positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7322-7.
- 11) Ishikawa E, Motohashi S, et al. Dendritic cell maturation by CD11c⁻ T cells and $V\alpha 24^+$ natural killer T-cell activation by α -galactosylceramide. *Int J Cancer* 2005; 117: 265-73.
- 12) Ishikawa A, Motohashi S, et al. A phase I study of α -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1910-7.
- 13) Motohashi S, Nagato K, et al. A phase I-II study of α -galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol* 2009; 182: 2492-501.
- 14) Motohashi S, Ishikawa A, et al. A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6079-86.
- 15) Motohashi S, Nakayama T. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci* 2008; 99: 638-45.
- 16) Motohashi S, Nakayama T. Invariant natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Immunotherapy* 2009; 1: 73-82.

- 17) Motohashi S, Okamoto Y, et al. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. *Clin Immunol* 2011; 140: 167-76.
 - 18) Uchida T, Horiguchi S, et al. Phase I study of α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 337-45.
 - 19) Kunii N, Horiguchi S, et al. Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and α -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 1092-8.
 - 20) Yamasaki K, Horiguchi S, et al. Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clin Immunol* 2011; 138: 255-65.
 - 21) Okita K, Motohashi S, et al. A set of genes associated with the interferon- γ response of lung cancer patients undergoing α -galactosylceramide-pulsed dendritic cell therapy. *Cancer Sci* 2010; 101: 2333-40.
-