

総説

肺癌治療に向けた樹状細胞ならびに NKT 細胞の誘導とアフェレシス

本橋 新一郎^{*1,*2}・清水 直美^{*3}

^{*1} 千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学, ^{*2} 同胸部外科学, ^{*3} 同医学部附属病院輸血部

Induction of Dendritic Cells and NKT Cells from Apheresis Products for Immunotherapy in Patients with Lung Cancer

Shinichiro Motohashi^{*1,*2} and Naomi Shimizu^{*3}

Departments of ^{*1} Medical Immunology and ^{*2} Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba University, ^{*3} Division of Blood Transfusion, Chiba University Hospital

Summary Human *Vα24* natural killer T (NKT) cells bearing an invariant *Vα24 Jα18* antigen receptor recognize a specific ligand, α -Galactosylceramide (α GalCer; KRN 7000) in a CD1d-dependent manner. Previous findings showed that α GalCer-pulsed dendritic cells (DCs) exerted a strong anti-tumor activity in the mouse tumor metastatic models and intravenous administration of α GalCer-pulsed DCs led to *Vα14* NKT cell expansion in the lung. With these results, we performed the NKT cell-based immunotherapy for lung cancer. In this clinical research, an apheresis product was used to induce the dendritic cells or activated NKT cells. A phase I and a phase I-II clinical study of α GalCer-pulsed DC treatment in patients with lung cancer was performed. No severe adverse event related to the apheresis or treatment was observed. After the injection of α GalCer-pulsed DCs, increased numbers of IFN- γ -producing cells in the peripheral blood were detected in 10 patients. The administration of α GalCer-pulsed DCs was accompanied by the successful induction of NKT cell-dependent immune responses and the increased IFN- γ -producing cells in PBMCs might be associated with prolonged survival. These results are encouraging and warrant further evaluation of the survival benefit of this immunotherapy.

Key words: apheresis, *Vα24* NKT cell, α -Galactosylceramide, dendritic cells, immunotherapy

1. はじめに

ナチュラルキラー T (NKT) 細胞は多様性のない均一な T 細胞抗原受容体とナチュラルキラー (NK) 受容体を共発現しているリンパ球として新しく同定された細胞である^{1,2)}。ヒト NKT 細胞は *Vα24 Jα18* 鎖と *Vβ11* 鎖で構成されている抗原受容体を発現し、糖脂質の α -ガラクトシルセラミド (α GalCer) によって活性化することが判明している³⁾。

NKT 細胞は様々な免疫応答に関連していることが報告されており、特に強力な抗腫瘍効果を持つことが知られている^{4,5)}。活性化した NKT 細胞はパーフォリン/グランザイムなどの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。さらに CD40/CD40L 経路を通じて樹状細胞 (DC) の成熟化を引き起こし、DC から IL-12 の産生を促す。また活性化 NKT 細胞はインターフェロン (IFN)- γ

やインターロイキン (IL)-4 などのサイトカインを短時間に大量に産生し、IFN- γ は DC からの IL-12 の作用とともに NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞の有する細胞傷害活性を増強するアジュバント効果を発揮する。以上のように、NKT 細胞は自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする機能を有する (図 1)⁶⁾。

我々は *ex vivo* で調製した α GalCer をパルスした DC (α GalCer パルス DC) をマウス腫瘍転移モデルに投与し、 α GalCer を単独でマウスに投与した群と比較して抗腫瘍効果の増強を認めたことを報告した⁷⁾。さらに、投与した α GalCer パルス DC が肺実質中に存在するマウス NKT 細胞の活性化を誘導することも報告した^{8,9)}。 α GalCer は哺乳類の生体内には存在しない外来性抗原であるが、外来性抗原の投与によって人為的に NKT 細胞の活性化をコントロールすることは非常に重要なことであり、NKT 細胞免疫系による悪性腫瘍のコントロールへの応用が期待された。

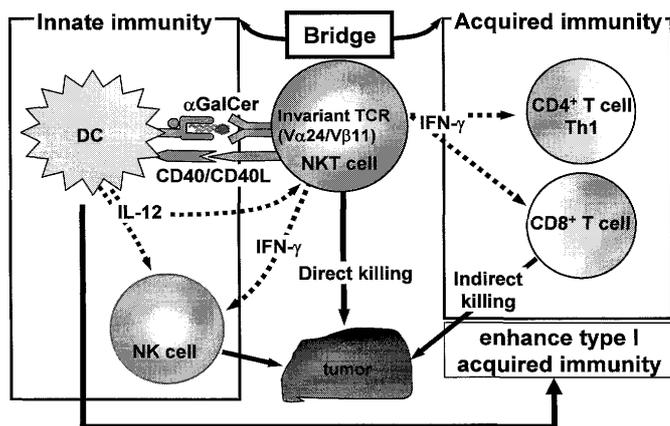


図1 ヒト NKT 細胞の活性化機構

抗原提示細胞上の CD1d 分子に提示された α GalCer/CD1d 複合体は、 $V\alpha 24+V\beta 11+$ 抗原受容体によって認識される。活性化された NKT 細胞は、パーフォリン/グランザイム系、Fas/FasL 系にて直接標的細胞を傷害するほか、CD 40/40 L を介して DC の成熟化を促す。すると DC からは IL-12 が産生され、NKT 細胞から産生される IFN- γ とともに NK 細胞、CTL の活性化を誘導する。

2. NKT 細胞免疫系を用いた臨床研究

これまでの NKT 細胞の持つ抗腫瘍効果発揮に関する基礎的研究の成果から、肺癌の治療へ臨床応用することを目指すトランスレーショナルリサーチを施行することとなった。

2.1 NKT 細胞免疫療法におけるアフエレシス

臨床研究に関わるアフエレシスは千葉大学医学部附属病院輸血部の専任医師が行い、採血装置として GAMBRO 社製 Spectra を使用している。回路のプライミングは生理食塩水にて、抗凝固剤としては ACD-A 液を使用し、採取は manual mode MNC に行っている。通常脱血ラインを正肘静脈より 19 G のクランプキャスを使用して血管確保後、十分な逆流があることを確認し回路に接続、正肘静脈よりの確保が難しい症例では、橈骨動脈より 20 G の静脈留置カテーテルにて血管確保とする。返血は対側前腕静脈より 20 G の静脈留置カテーテルにて確保している。採取条件として、流速 40 ml/min で 1 回の体外循環処理量上限 10 L とし採取を行い、アフエレシス中、Ht 2~3% となるよう採取ポートを監視し微調整を行う。好中球の混入を減少する目的で回転速度 817 rpm から 1,001 rpm とした採取を行っている¹⁰⁾。

2.2 α GalCer パルス DC による Phase I 試験

2001 年より GCP・GMP を遵守する形で、千葉大学免疫発生学と胸部外科学共同で、原発性肺癌に対し

て内在性の NKT 細胞を活性化することを目的とした α GalCer パルス DC 療法の第 I 相試験を施行した¹¹⁾。

投与に用いている抗原提示細胞は、全末梢血単核球から GM-CSF および IL-2 にて培養したものであり、単球由来の樹状細胞と比較し NKT 細胞の活性化能は劣らないことを我々は報告してきた¹²⁾。培養細胞中に含まれる CD 3⁺ T 細胞が TNF- α の産生を介して単球由来樹状細胞の成熟化を進めることで、 α GalCer の提示能が増強するという特徴を持っている。この培養方法では複雑な細胞の分離精製のプロセスを必要としないため、アフエレシスで得られた末梢血単核球を用いてすぐに培養開始することが可能である。

標準治療終了後の手術不能進行期肺癌症例もしくは肺癌術後再発症例を対象として、 α GalCer パルス DC の dose escalation study を計 11 例に施行した。その結果、アフエレシスや細胞投与に伴う重篤な副作用なく施行可能であることを確認した。さらに DC 最大数投与群の α GalCer パルス DC 投与に伴う末梢血中の NKT 細胞数の変化が全例で確認可能であり、特に末梢血 NKT 細胞の顕著な増加と IFN- γ 産生量が mRNA レベルにおいて増強した 1 例を認めた。臨床効果として NKT 細胞数の顕著な増加が認められた症例では、肺内腫瘤影の増大抑制が 2 年 6 ヶ月間継続し、約 5 年の生存期間が得られた。

2.3 α GalCer パルス DC の Phase I-II 試験

この結果を受けて、2005 年から標準治療終了後の原発性肺癌進行期症例および術後再発症例の計 17 例に対して、 1×10^9 個の 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⁾。観察期間中にアフエレシス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った。NKT 細胞特異的免疫反応の解析では、末梢血単核球の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の明らかな増加を 10 例に認めた。 α GalCer 反応性の IFN- γ 産生細胞は NKT 細胞であると報告されているが¹⁴⁾、 α GalCer パルス DC 投与後には NK 細胞が加わってくるのが判明しており^{15,16)}、本治療により活性化した NKT 細胞の adjuvant 効果の一つと考えている。また本治療後に IFN- γ 産生細胞が増加した症例群は、増加を認めなかった症例群と比較し有意に生存期間の延長を認め、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。

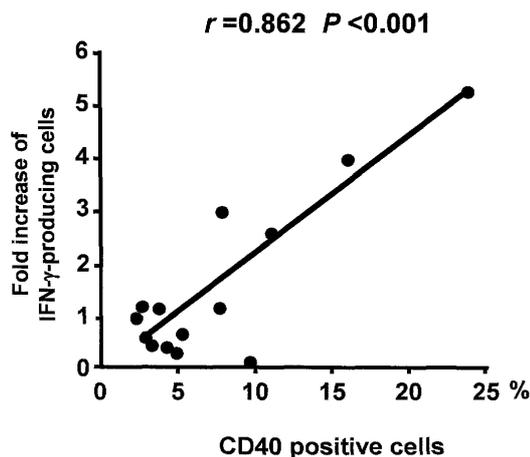


図2 細胞治療後のIFN- γ 産生増強は、培養細胞表面のCD40発現レベルと相関する

全症例の全4回投与すべてにおいて培養細胞の表面抗原発現をFACSにて解析した。解析を行った表面抗原であるHLA-DR, CD11c, CD86, CD40, CD83, CD1dのうち、CD40の発現レベルのみが α GalCerパルスDC投与による末梢血単核球のIFN- γ 産生細胞数の増加率(fold increase)と有意な正の相関関係にあった($r=0.862$, $p<0.001$, Pearson's correlation coefficient)。図は1回目の投与細胞のCD40発現レベルと細胞投与後7日でのIFN- γ 産生細胞数の前値からの増加率との有意な相関を示す。

投与した培養細胞の細胞表面抗原発現(HLA-DR, CD11c, CD86, CD40, CD83, CD1d)と末梢血単核球の α GalCer反応性IFN- γ 産生能との関連性について精査してみると、培養細胞のCD40分子の発現上昇が有意にIFN- γ 産生増強と関連していることが認められ(図2)、マウスで示されているNKT細胞と抗原提示細胞間のCD40L/CD40の相互作用の重要性が示唆された¹⁷⁾。

2.4 NKT細胞を用いた養子免疫療法の臨床研究

NKT細胞免疫系を用いた養子免疫療法として、手術不能進行期肺癌手術もしくは肺癌術後再発症例に対する活性化NKT細胞療法を施行した¹⁵⁾。計6例に対して投与するNKT細胞数を $1 \times 10^7/m^2$ および $5 \times 10^7/m^2$ と設定し、アフエリシスにて採取した末梢血単核球を α GalCerおよびIL-2で培養し、活性化したNKT細胞を含む全培養細胞を静注にて投与した。結果として、観察期間中に重篤な有害事象は認められず、NKT細胞特異的免疫学的反応の検討では、活性化NKT細胞投与前後での末梢血NKT細胞が3例において有意な上昇を認めた。また活性化NKT細胞投与とともに末梢血中の α GalCer反応性のIFN- γ 産生細胞数の上昇を認めた。

3. おわりに

NKT細胞免疫系を標的とした免疫細胞療法ではNKT細胞特異的な免疫反応が測定可能となり、他施設からも内在性NKT細胞の活性化を目的とする α GalCerパルスDC療法が様々な悪性腫瘍に対してなされている^{18~20)}。千葉大学では原発性肺癌に加えて頭頸部癌に対してもNKT細胞を標的とした免疫細胞療法の臨床研究を開始しており、さらなる発展が見込まれている²¹⁾。今後、NKT細胞の特徴であるadjuvant効果がさらに発揮できるよう、獲得免疫系を標的とした免疫療法との組み合わせなど、他の治療法との併用療法を現在検討している。さらには現状のような標準治療終了後の高度進行期担癌状態では、NKT細胞免疫療法に対する適切な症例選択も検討が必要であると思われる。施行前の適切な症例選択が可能なバイオマーカーが解明できれば高い治療効果を上げることが可能となると考えられ、今までの症例で得られたデータを元に研究を進めていく予定である。

文 献

- 1) Taniguchi M, Harada M, Kojo S, et al: The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* **21**: 483-513, 2003
- 2) Bendelac A, Savage PB, Teyton L: The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**: 297-336, 2007
- 3) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V α 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**: 1626-1629, 1997
- 4) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al: Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5690-5693, 1998
- 5) Kawano T, Nakayama T, Kamada N, et al: Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V α 24 NKT cells. *Cancer Res* **59**: 5102-5105, 1999
- 6) Taniguchi M, Seino K, Nakayama T: The NKT cell system: Bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **4**: 1164-1165, 2003
- 7) Taura I, Kawano T, Akutsu Y, et al: Cutting edge: Inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with α -galactosylceramide. *J Immunol* **163**: 2387-2391, 1999
- 8) Akutsu Y, Nakayama T, Harada M, et al: Expansion of lung V α 14 NKT cells by administration of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells. *Jpn J Cancer Res* **93**: 397-403, 2002
- 9) Motohashi S, Kobayashi S, Ito T, et al: Preserved IFN- γ production of circulating V α 24 NKT cells in primary lung cancer patients. *Int J Cancer* **102**: 159-165, 2002
- 10) Shimizu N, Asai T: Analysis for the optimal blood draw speed to collect sufficient peripheral blood mononuclear cells by COBE Spectra. *Ther Apher Dial* **8**:

190-193, 2004

- 11) Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, et al: A phase I study of α -galactosylceramide (KRN 7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 1910-1917, 2005
- 12) Ishikawa E, Motohashi S, Ishikawa A, et al: Dendritic cell maturation by CD 11c(-) T cells and V α 24(+) natural killer T-cell activation by α -Galactosylceramide. *Int J Cancer* **117**: 265-273, 2005
- 13) Motohashi S, Nagato K, Kunii N, et al: A phase I-II study of α -galactosylceramide (KRN 7000)-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol* **182**: 2492-2501, (2009)
- 14) Fujii S, Shimizu K, Steinman RM, Dhodapkar MV: Detection and activation of human V α 24+ natural killer T cells using α -galactosyl ceramide-pulsed dendritic cells. *J Immunol Methods* **272**: 147-159, 2003
- 15) Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, 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* **12**: 6079-6086, 2006
- 16) Motohashi S, Nakayama T: Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci* **99**: 638-645, 2008
- 17) Fujii S, Liu K, Smith C, et al: The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells *in vivo* requires CD 40 ligation in addition to antigen presentation and CD 80/86 costimulation. *J Exp Med* **199**: 1607-1618, 2004
- 18) Okai M, Nieda M, Tazbirkova A, et al: Human peripheral blood V α 24+V β 11+NKT cells expand following administration of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells. *Vox Sang* **83**: 250-253, 2002
- 19) Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, et al: Therapeutic activation of V α 24+V β 11+NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* **103**: 383-389, 2004
- 20) Chang DH, Osman K, Connolly J, et al: Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of α -galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med* **201**: 1503-1517, 2005
- 21) Uchida T, Horiguchi S, Tanaka Y, 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* **57**: 337-345, 2008