NKT 細胞免疫療法のトランスレーショナルリサーチ

本橋新一郎^{1), 2)}, 中山 俊憲¹⁾

要約：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細胞はがん転移モデルにおいて強力な抗腫瘍効果を示すことから、ヒトがん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およびin vitroでNKT細胞を活性化し投与する活性化NKT細胞療法、さらには両者を組み合わせた複合免疫療法を臨床研究として施行している。原発性肺癌および頭頸部癌に対して現在までに報告してきた、NKT細胞を標的とした免疫細胞療法の安全性、NKT細胞特異的免疫学的解析結果さらには臨床効果につき概説する。

はじめに

自然免疫系に属するインバリアントNKT (iNKT) 細胞は、NK受容体とともに唯1種類のT細胞抗原受容体 (TCR) を発現することを特徴としている。沖縄産の海綿から抽出された糖脂質の1つである α -ガラクトシルセラミド (α GalCer) がNKT細胞のインバリアントTCR (ヒトでは α 鎖にV α 24, β 鎖にV β 11) によって特異的に認識されるリガンドであることが発見され、iNKT細胞の機能解析は飛躍的に進み⁽¹⁾、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⁾。獲得免疫系に属する通常のT細胞の場合、非常に多様な抗原を認識するTCRは、多型に富む主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 拘束性に様々なペプチド抗原を認識するのに対して、iNKT細胞のTCRは、種属に1種類しか存

在しない単一な抗原提示分子であるCD1dに提示された α GalCerを特異的に認識し、活性化する。つまり誰のiNKT細胞であっても α GalCer-CD1d系によって活性化が可能なのである。 α GalCerによって活性化されたiNKT細胞が示す抗腫瘍効果には直接作用と間接作用があり、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。間接作用には、iNKT細胞が活性化後、短時間で大量に産生するインターフェロンガンマ (IFN- γ) やインターロイキン4 (IL-4) といったサイトカインや、CD40L/CD40を介した樹状細胞 (DC) の成熟化と、それにより起こるDCからのIL-12産生などにより、NK細胞やCD8⁺T細胞の細胞傷害活性を増強することで抗腫瘍効果を示すアジュバント効果がある (図1)⁽³⁾。

健康人と比較したがん患者の末梢血iNKT細胞数はその機能とともに低下していることが報告されている。iNKT細胞数の低下ががん治療後の予後不良と関連することや、腫瘍局所へのiNKT細胞集積亢進と良好な予後との相関の報告からは、がん状態でのiNKT細胞の機能維持の重要性が示唆される。従ってがん患者で機能低下したiNKT細胞の再生を図り、本来もつ強力な抗腫瘍アジュバント効果を発揮させることが、がん治療として有効に働くのではないかと考えられる。このようなことから、千葉大学では悪性腫瘍に対するiNKT細胞を標的とした免疫細胞療法の開発を行っている。本稿では、すでに臨床研究として千葉大学で施行されている肺癌および頭頸部癌に対する、ヒトiNKT細胞免疫療法の結果について概説する。

キーワード：NKT細胞、免疫細胞療法、樹状細胞

千葉大学 大学院 医学研究院 ¹⁾免疫発生学、²⁾免疫細胞医学
(〒260-8677 千葉市中央区亥鼻 1-8-1 千葉大学医学部附属病院 未来開拓センター)

E-mail: motohashi@faculty.chiba-u.jp 原稿受領日：2010年9月13日、依頼原稿

Title: Translational research of NKT cell-based immunotherapy. Author: Shinichiro Motohashi, Toshinori Nakayama

図1 NKT 細胞による抗腫瘍効果発揮メカニズム

未熟 DC 上の CD1d に提示された α GalCer を iNKT 細胞が認識すると活性化し、直接の抗腫瘍効果を発揮する。さらに活性化した iNKT 細胞が産生する IFN- γ や、成熟 DC からの IL-12 などにより、NK 細胞や CD8 $^{+}$ T 細胞へのアジュバント効果を発揮する。

1. 肺癌に対する樹状細胞療法の臨床研究

2001 年より千葉大学において、iNKT 細胞を標的とした免疫細胞療法の第 I 相臨床試験として、標準治療終了後の手術不能進行期肺癌もしくは肺癌術後再発症例 11 例を対象として、 α GalCer パルス DC の容量漸増試験を施行した(4)。樹状細胞の分化誘導方法として、成分採血にて分離した末梢血単核球を GM-CSF および IL-2 で培養した樹状細胞を含むすべての培養細胞に α GalCer をパルス提示させた後、静脈内に投与した。GM-CSF および IL-2 にて培養された細胞による iNKT 細胞の活性化能は、培養中の T 細胞が産生する TNF- α により樹状細胞の成熟化が進み、NKT 細胞活性化能が増強するのである(5)。本臨床試験は重篤な有害事象を認めることなく施行され、最大細胞数投与群（ 1×10^9 個/ m^2 ）において α GalCer パルス DC 投与に伴い、末梢血 V α 24 $^{+}$ V β 11 $^{+}$ NKT 細胞数の増加が確認され、1 例で NKT 細胞からの IFN- γ mRNA の増加を認めた。最大細胞数投与群の 3 症例は、臨床研究登録後の生存期間が 31, 59, 14 カ月と比較的長期の予後が認められた。

α GalCer パルス DC 療法は安全に施行可能であったことから、2005 年から手術不能進行期肺癌もしくは肺癌術後再発症例 17 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(6)。その結果、末梢血単核球の α GalCer 刺激特異的 IFN- γ 産生細胞数が DC 投与後に明らかに増加した症例を 10 例に認めた。この α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞は NKT 細胞であると報告されているが、 α GalCer パルス DC 投与後には NKT 細胞に加えて NK 細胞が IFN- γ 産生細胞に加わっており、本治

療により活性化した NKT 細胞の NK 細胞へのアジュバント効果と考えている。全 17 例の生存期間中央値は 18.6 カ月であり、 α GalCer パルス DC 投与による IFN- γ 産生増加症例 10 例は、不応例 7 例と比較して有意に全生存期間の延長を認めた（ $P=0.0011$, Logrank test, 図 2）。この結果より、IFN- γ 産生が α GalCer パルス DC 投与後の生存期間に関する有効なバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

2. 肺癌に対する活性化 NKT 細胞療法の臨床研究

担がん患者における in vivo での iNKT 細胞活性化を目指す樹状細胞療法に対して、in vitro で iNKT 細胞数を増殖させ、機能回復を図ることを目的に、活性化 NKT 細胞投与の臨床研究を行った。2003 年より 2004 年にかけて、標準治療終了後の手術不能進行期肺癌および術後再発症例 6 例に対して、活性化 iNKT 細胞の静脈内投与を施行した(7)。全末梢血単核球を α GalCer および IL-2 を添加して 2~3 週間培養すると、活性化 iNKT 細胞は培養前値から平均 1200 倍（50~5250 倍）の増加を認め、活性化 iNKT 細胞として $1 \times 10^7/m^2$ および $5 \times 10^7/m^2$ を計 2 回投与した。培養細胞のサイトカイン産生能は IFN- γ 産生が優位であり、肺癌 cell line に対する in vitro での高い細胞傷害活性が確認された。全例において観察期間中に重篤な有害事象は認められず安全に施行可能であった。活性化 iNKT 細胞高投与群の 3 例中 2 例で治療前値と比較し末梢血 iNKT 細胞数の有意な増加を認め、3 例中 3 例で末梢血単核球中の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の明らかな増加を認めた。活性化 iNKT 細胞高投与群の 3 例中 2 例で、臨床研究登録後、33.3 カ月および 76.6 カ月生存した。

図2 原発性肺癌に対する α GalCer パルス DC 投与全 17 例の登録時からの生存曲線 (実線)

生存期間中央値 (MST) は 18.6 カ月であった。NKT 細胞免疫療法施行後に IFN- γ 産生増強を認めた反応良好群 ($n=10$ 例, 太実線) と不応群 ($n=7$ 例, 点線) の生存曲線において, 免疫療法反応良好群は不応群と比較し, 有意に良好であった ($P=0.0011$, Logrank test)。

3. 頭頸部癌に対する樹状細胞療法の臨床研究

頭頸部癌の所属リンパ節は頸部リンパ節であり, 鼻粘膜下に投与された樹状細胞は早期に同側の頸部リンパ節へと移動し, リンパ節内に長期にわたって存在することが判明している(8)。このことから, α GalCer パルス DC を頸部リンパ節へ移行が見込める腫瘍近傍の粘膜下投与とし, 再発頭頸部扁平上皮癌 9 例に対して, α GalCer パルス DC の腫瘍同側鼻粘膜下投与を施行した(9)。前述の肺癌プロトコルと同様に, GM-CSF および IL-2 にて 1 週間培養された DC を用い, 1 回当たりの投与細胞数は, より少ない 1×10^8 個とした。その結果, 全身投与と比較し 10 分の 1 の投与細胞数であるにもかかわらず, 9 例中 8 例において末梢血単核球の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の増加が認められた。全例において重篤な有害事象を認めず, α GalCer パルス DC の鼻粘膜下投与は安全に施行することが可能であった。1 例に明らかな抗腫瘍効果を認め, 部分奏功と判定された。

4. 頭頸部癌に対する樹状細胞および活性化 NKT 細胞を用いた複合免疫療法の臨床研究

頭頸部癌の栄養血管は終末枝であることが多く, 血管造影にて同定することが可能であることから, *in vitro* で増殖・活性化させた iNKT 細胞を経カテーテル的に選択動注する養子免疫療法と前述の α GalCer パルス DC の鼻粘膜下投与を組み合わせた複合免疫療法を施行した。標準治療終了後の再発頭頸部扁平上皮癌 8 例に対して, α GalCer パルス DC (1×10^8 個) の患

側下鼻甲介粘膜下への 2 回投与および活性化 NKT 細胞投与 (5×10^7 個) の腫瘍栄養動脈への 1 回投与を施行した(10)。1 例に活性化 NKT 細胞投与後 2 週間で咽頭皮膚瘻を認め, Grade 3 と判定された。この症例は皮膚直下に及ぶ咽頭腫瘍が存在しており, 細胞投与により腫瘍が急速に縮小したことが原因と考えられた。その他の症例においては重篤な有害事象を認めず安全に施行可能であった。末梢血単核球中の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数は, 8 例中 5 例において顕著な増加を認めた。抗腫瘍効果として, 3 例において画像上, 明らかな腫瘍縮小効果を認め, 部分奏功と判定された。対象が進行再発症例であったにも関わらず腫瘍縮小が認められたことから, 本免疫療法の強力な抗腫瘍効果が示唆された。

5. まとめ

現在のところ, 手術不能進行期の肺癌もしくは頭頸部癌, 特に転移を有する症例に対する標準治療としては, 抗がん薬治療が推奨されており, 延命効果が確認されている。しかし治癒が得られないためになるべく治療を継続する必要があるが, 抗がん薬治療には様々な副作用が必発であり, そのために治療を中止せざるを得ないことも多い。NKT 細胞を標的とした免疫細胞療法においては, 腫瘍縮小に伴う Grade 3 の咽頭皮膚瘻の発生を 1 例に認めたものの, それ以外には細胞投与に関連する重篤な副作用を認めていない。限界のある抗がん薬治療の選択枝に加えて, 副作用が軽微で生活の質を保つことが可能な新しい治療法の選択枝を確立していくことは臨床的に重要なことであると考え

られる。

iNKT細胞免疫系を標的とした樹状細胞療法に関しては、様々な悪性腫瘍を対象として、未熟DCおよび成熟DCを用いた臨床研究の結果が報告されている(11, 12)。千葉大学においても肺癌および頭頸部癌に加えて、頭頸部領域粘膜発生悪性黒色腫に対しても臨床研究を開始している。今後抗腫瘍効果を高めていくためには、iNKT細胞の特徴であるアジュバント効果をより有効に発揮させるために、獲得免疫系を標的とした免疫療法との組み合わせや、標準治療との併用の検討が必要と考えられる。そのためにもiNKT細胞の抗腫瘍アジュバント効果の作用機序を詳細に解明していくことが必要と考えられ、現在ベッドサイドからベンチサイドに戻って、免疫系ヒト化マウスモデルを利用したアジュバント効果の解析を行っている。さらに

iNKT細胞免疫療法の有効性が期待できる症例の選択が可能となれば、本免疫療法の治療効果は飛躍的に上昇する。今までに得られた末梢血サンプルなどを用いて、iNKT細胞免疫療法に反応が期待される症例の選択に有用なバイオマーカーの網羅的探索を進めている。

文 献

- 1) Kawano T, et al. Science. 1997;278:1626-1629.
- 2) Taniguchi M, et al. Annu Rev Immunol. 2003;21:483-513.
- 3) Fujii S, et al. Semin Immunol. 2010;22:97-102.
- 4) Ishikawa A, et al. Clin Cancer Res. 2005;11:1910-1917.
- 5) Ishikawa E, et al. Int J Cancer. 2005;117:265-273.
- 6) Motohashi S, et al. J Immunol. 2009;182:2492-2501.
- 7) Motohashi S, et al. Clin Cancer Res. 2006;12:6079-6086.
- 8) Horiguchi S, et al. J Clin Immunol. 2007;27:598-604.
- 9) Uchida T, et al. Cancer Immunol Immunother. 2008;57:337-345.
- 10) Kunii N, et al. Cancer Sci. 2009;100:1092-1098.
- 11) Nieda M, et al. Blood. 2004;103:383-389.
- 12) Chang DH, et al. J Exp Med. 2005;201:1503-1517.

ケルトの模様