特集：疾患の制御—臨床から免疫へ—
総 説

慢性骨髄性白血病の免疫機構と免疫療法の展望

藤井眞一郎

Immunological evaluation for CML and its possibility for an immunotherapy

Shin-ichiro FUJII

Research Unit for Cellular Immunotherapy, Research Center for Allergy and Immunology (RCAI), RIKEN

(Received June 1, 2009)

summary

Chronic myelogenous leukemia (CML) is associated with the Ph1 chromosome translocation, which produces a chimeric tyrosine-specific kinase gene, the product of the fusion of the BCR gene and the ABL gene. The immune system has long been implicated in the control of CML. We found oligoclonal T cell responses in treated patients with IFN- α or leukemic dendritic cells. Also other groups treated chronic phase CML (CP-CML) patients with various leukemic antigen peptides, resulted in apparent immune response and clinical response. Imatinib mesylate is currently used as the first line therapy for CP-CML patients. Although it selectively targets the ABL portion of BCR-ABL protein as a reversible tyrosine kinase inhibitor, it cannot kill the leukemic stem cells of CML. To find a possibility to enhance the immunity in imatinib-treated CML patients by combining it with immunotherapy, we summarized the immune response of innate and adaptive immunity in CML. Development of such immunotherapeutic strategies would be a promising approach to treat the imatinib-treated CML-CP patients.

Key words——CML; immunotherapy; NKT cells; Dendritic cells

抄 録

造血器腫瘍疾患は、多くの場合免疫担当細胞の腫瘍性疾患であり、免疫の機能異常を随伴する場合がある。しかしながら疾患のタイプや治療反応性により病態は異なり、必ずしも常に免疫抑制状態にあるわけではない。慢性骨髄性白血病 (CML) は Ph1 染色体を有し、BCR-ABL 融合遺伝子の遺伝子産物である BCR-ABL チロシンキナーゼが白血化をもたらす疾患であり、通常数年の慢性期を経て移行期、急性転化を来す予後不良の疾患である。近年このチロシンキナーゼに対する分子標的治療薬である imatinib mesylate (イマチニブ) により予後が目覚しく改善されている。しかし白血病幹細胞への効果がないため、治療中における耐性、不応性が臨床的に問題となる。一方、CML 患者の免疫能に関して様々な報告がある。BCR-ABL, Proteinase 3 (PR-1) 等が CML の腫瘍抗原として同定されており、これらのエピトープに対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が検出され、免疫療法も施行されている。我々は、CML 患者の末梢血中の TCR レパトアの解析により、オリゴクローナルな T 細胞の集積があること、更に樹状細胞療法により新規 CTL が誘導されることを明らかにした。更に自然免疫の評価として、イマチニブを使用している血液学的完全寛解の CML 慢性期の患者を対象として細胞学的効果と V α 24 iNKT 細胞の機能的解析の関連性を検討した。その結果、イマチニブ療法を受けている CML 患者の多くは NKT 細胞数の減少が認められることと、この中の細胞学的部分寛解症例は、V α 24 iNKT 細胞数が比較的保たれていても、IFN- γ 産生が認められないことが判明した。この機構は V α 24 iNKT 細胞自体ではなく、末梢血に含まれる単球の抗原提示異常があることがわかり、実際に樹状細胞で再刺激することにより V α 24 iNKT 細胞機能が回復した。以上のことは、疾患の進行と免疫の関与を意味すると共に、分子標的治療薬であるイマチニブ治療群での残存白血病細胞に対して免疫療法併用の可能性を示唆している。

はじめに

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogeneous leuke-

理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター、免疫細胞移植戦略研究ユニット

mia : 以下 CML) は、1845 年 Edinburgh の病理学者である John Hughes Benett とほぼ同時期に Berlin の Rudolf Virchow の報告に始まる^{1~3)}。その後 1872 年 Ernst Neumann が初めて骨髄に白血病細胞が存在することを示し、その後慢性骨髄性白血病と

しての概念の下での解析が開始された。本疾患において、典型的な染色体異常を示すフィラデルフィア (Ph) 染色体は、1960 年に 9 番染色体と 22 番染色体の相互転座 $t(9; 22)(q34; 21)$ によって生ずることが明らかにされた¹⁻³⁾。実際には、この染色体として観察される特異的再構成遺伝子 BCR-ABL から転写、翻訳されるキメラ蛋白の持つチロシンキナーゼの異常活性化がその発症原因の本質であり、これは BCR-ABL の遺伝子を造血幹細胞に導入すると CML モデルマウスの作成が可能であることからわかる⁴⁾。

CML は、無治療の場合、数年の慢性期とその後の移行期を経て急性転化期になると極めて予後不良となる。この CML の治療薬に関しては、1959 年にブスルファン、更に 10 年後にハイドロキシウレアが使われるようになったが、これらの薬剤は白血球細胞の数を減少させるものの生存率の延長は見られなかった^{1-3,5,6)}。その後、IFN- α 療法で細胞遺伝学的寛解が得られる症例や完全寛解期と予後が伸びる症例が現れたが、この IFN- α 療法で Ph1 染色体が消失する症例は 5-30% 程度と効果は不十分であった。画期的なブレイクスルーは、同種骨髄移植にあり、1970 年の半ばにシアトルのグループが、CML の Ph1 が消失することを示したことによる¹⁻³⁾。ただし、慢性期に HLA 一致同胞のドナーが存在することが移植の条件であった。1990 年代の始め、Nichlas Lydon が、BCR-ABL 蛋白を標的とする阻害剤を同定し、Brian Drucker と共に ABL 特異的メシル酸イマチニブ (imatinib mesylate; 以下イマチニブ) が、最もその効果が高いことを示した(図 1)^{1-3,7)}。すでにこの分子標的治療薬により、

95% の 5 年生存率が認められることが報告された。

本稿では、CML における免疫について、自然免疫と獲得免疫の立場から概説し、特に分子標的治療薬と免疫との関連を考察することにより、今後の免疫療法の分子標的治療薬との併用の可能性について言及したい。

1. CML の分子標的薬療法

前述したように CML は、可逆性のチロシンキナーゼの阻害剤であるイマチニブが開発され第一選択薬として用いられるようになり、従来の化学療法や IFN- α 療法と比較して劇的な効果をあげている。実際早期慢性期 CML におけるイマチニブ 400 mg と高用量 800 mg を比較した研究では、細胞学的完全寛解が 24 ヶ月時点で各々 74% 対 90% であり、より高用量投与が奏効することがわかってきた⁸⁾。

しかしながら、この分子標的治療薬は、白血病幹細胞レベルでは抵抗性であり、投薬を休止することも出来ず、また単独療法では、完全な治癒に至るのは難しいことも判明してきた⁹⁻¹¹⁾。特に腫瘍クロンの幹細胞には、効果がないばかりではなく、長期治療中に BCR-ABL に変異が出来ることで耐性となることも知られてきている。実際、イマチニブ使用例において急性期への進展、効果の喪失が年平均 4% に認められている。その為、治療中の腫瘍クロンが減少している間に骨髄移植を積極的に行う臨床試験も試みられてきている¹²⁾。

最近、BCR-ABL 陽性の白血病幹細胞維持にヘッジホッグシグナルが重要な役割を果たしている、このシグナルが CML 細胞の動員増殖とイマチニブ抵抗性 CML の病態に関与していることが報告されている¹³⁾。特にこのシグナルの中で膜貫通型蛋白である smoothened (Smo) に着目すると、Smo 欠損マウスは、正常な造血系のみならず、BCR-ABL による白血病細胞も増殖しなくなることが判明した^{13,14)}。今後、白血病幹細胞への治療として、白血病幹細胞の Smo 選択的阻害剤のような開発が、可能になるかもしれない。

現段階では、薬剤耐性 CML に対して、イマチニブの増量、新規薬剤であるダサチニブ (Src/ABL キナーゼ拮抗薬) やニロチニブ (イマチニブの改良型の ABL キナーゼ拮抗薬) による治療が開始されている⁷⁾。両者は、イマチニブ耐性の BCR-ABL 変異にはほぼ対応するといわれ、イマチニブ不応性、不

図1 イマチニブの CML 細胞への抗腫瘍効果作用機序。

BCR-ABL は、ATP が結合することで、基質において Tyr393 のリン酸化および脱リン酸化が起こり細胞増殖を起こす。イマチニブのチロシンキナーゼ活性阻害作用の機序としては、チロシンキナーゼの ATP 結合部位における ATP との競合拮抗することで、BCR/ABL 活性を阻害することにある。

耐応性の慢性期の患者を対象にした臨床試験でも一定の効果を挙げている。しかしながら、白血病幹細胞に関してはイマチニブと同様に有効ではなく、悪性腫瘍クローンは減少させることが出来ても、治療を目指すためには、残存クローンの除去が必要となり、抗腫瘍免疫応答の樹立が必要であると考えられる。

II. CML の腫瘍抗原と免疫応答

CML と免疫の関連を考えると、CML は免疫原性が比較的高い疾患であり、これまで種々の免疫療法が試みられてきた疾患である。同種移植後のドナー T リンパ球輸注による再寛解が得られることは、このことの裏づけである。また上記 BCR-ABL キメラ蛋白由来のエピトープは、腫瘍抗原として T 細胞に認識され、特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導しうる。実際、BCR-ABL 抗原ペプチドが同定され、HLA-A2 や-A3, -A11 の CML 患者を対象に BCR-ABL ペプチド療法が行われてきた。また、BCR-ABL 抗原以外にも hTERT や proteinase3 (PR3), WT-1 など様々の腫瘍エピトープも CML の腫瘍抗原として同定されている¹⁵⁾。Gannage らは 90% 以上の CML 患者において少なくとも 1 つのエピトープの T 細胞、64% の患者から 4 つ以上の異なるエピトープに反応する CD8 T 細胞が同定されると報告している¹⁵⁾。CML の 6 種類の BCR-ABL ペプチドを用いた免疫療法により CD4 T 細胞、CD8 T 細胞の両方の免疫応答が見ら

れているが、むしろ proteinase3 (PR3) の方が効率よく誘導できると言う報告もある¹⁶⁾。Molldrem らの報告は PR3 抗原由来の PR-1 ペプチド特異的 T 細胞を同種骨髄移植、IFN- α 、化学療法の各治療群で検討している。それによると PR-1 特異的 T 細胞は IFN- α 、同種骨髄移植治療群において検出され、臨床結果と非常に相関していた¹⁷⁾。CML は、上記の通り腫瘍抗原が同定されているため、免疫療法の良い標的になりうる疾患である。

III. 慢性骨髄性白血病における免疫応答の評価

我々は CML の患者の免疫応答として、IFN- α 療法が、免疫賦活に大きく関わる可能性を示してきた。これは CML 患者を健常人と比べると、T 細胞のオリゴクローナルな増殖が見られること (図 2) や、IFN- α 療法施行例でも効果群、非効果群の間で異なる T 細胞クローンの偏りが見られると言う特徴がある¹⁸⁾。このことは CML の病態と T 細胞免疫応答の関与を示唆するとともに IFN- α の効果が宿主免疫に働き抗腫瘍免疫 T 細胞を誘導している可能性を意味している。

しかしながら、CML 患者は、生体内に CTL が同定されない場合でも、能動的な免疫療法で in vivo において CTL クローンの誘導が可能である。我々は、CML 幹細胞から Ph1 + CML 細胞由来の DC (leukemic DC) が誘導できることに着目し、leukemic DC を治療に用いることで、CML 患者においても in vitro と同様に抗原特異的なヘルパー

図 2 健常人と CML 患者に対する T 細胞レパトワの解析

健常人と CML 患者末梢血を単離して、RT-PCR-SSCP 法で、T 細胞受容体の V β 鎖において V β 1 から V β 20 遺伝子発現を解析した。T 細胞受容体 V β 1 から V β 20 遺伝子発現のバンドの集積を数値化し、列挙したものである (図の左方から V β 1 から V β 20 のバンドが列挙してある)。殆どの CML の患者で、V β 10, V β 12 と V β 14 の T 細胞クローンの増殖が同定されることが判明した。

図3 CML慢性期の患者に対する白血病樹状細胞療法による免疫応答の解析

- (A) G-CSFで動員させた造血幹細胞を含む末梢血単核球をGM-CSF, IL-4 and TNF- α で7日間培養し leukemic DCsを誘導した。(i) 単離した leukemic DCを位相差顕微鏡で示す。(ii) leukemic DCがBCR-ABLの融合遺伝子を発現していることをFISH法で明らかにした。Leukemic DCの遺伝子シグナルは、黄色 (bcr 遺伝子)、緑 (abl 遺伝子)、黄色/緑 (融合遺伝子 BCR-ABL 遺伝子)を示す。
- (B) 抗 CML-CTL 細胞株の細胞傷害活性を示す。CTLの標的細胞として、CML腫瘍細胞由来のLCL (□), CML腫瘍細胞由来の骨髄単核球細胞 (BMMNCs) (○), HLA一致ドナー由来のLCL (■), 更にCML細胞株のK562 (●)である。
- (C) DC療法中の、末梢血T細胞の特異的T細胞受容体のV β 遺伝子パターンを評価した。leukemic DCの投与によりV β 3, 4, 8, 13.1, 14, 16+T細胞が経時的に同定された。V β 3, 8, 13.1を発現しているT細胞クローンは、in vitroで樹立した抗腫瘍CTL細胞株と共通であった (lane 6th)。他は、Lane 1がDC投与前; lane 2, 第一回; lane 5th, DC四回DC投与直後; lane 6th, 患者由来のCTL細胞株 (leukemic DCと共培養し樹立したCTL)。
- (D) 免疫経過中のCD8⁺T細胞 (CTL)の細胞内サイトカイン染色解析。DC治療中と治療後の末梢血においてIFN- γ 産生T細胞の増殖が増幅した。図中の (1, 2, 4, 5)は、3-Cの治療時期と同時期である。

CD4T細胞, CTLを誘導でき, 抗腫瘍効果が発揮できることを示した。図3は, 骨髄移植非適応でIFN- α 抵抗性となった患者を対象にPh1⁺leukemic DCを投与したパイロットスタディで臨床的に一年半に渡り無治療で経過できた症例の免疫解析を示す¹⁹⁾。免疫学的解析では, 細胞療法後にCD4T及びCD8T細胞でIFN- γ 産生が認められることと, CTLのT細胞受容体 (TCR) レパトワの解析を行うとIFN- α 療法効果群の場合とは異なるクローンが同定できることが判明した (図3)。この新たに出現したバンドは, in vitroで誘導したCTLクローンとも一致していた。本症例は, DC療法により機能的に有効なCTLが誘導され, in vivoで増幅でき, 尚且つ白血病幹細胞レベルで殺傷効果を示した最初の報告である (表1)。

しかしながら, 本症例のCTLクローンは, 一年半後には消失し, 長期には維持できなかった。この免疫療法を省みると, leukemic DCに提示されてい

Table 1. Proportion of Ph1⁺ colonies in bone marrow cells

1. Prior to the DC treatment	75%
2. Five days after 2 nd DC treatment	70%
3. Five days after 4 th DC treatment	30%

DC: dendritic cells

Ph1⁺ colonies were measured as number of colony-forming unit-granulocyte-macrophage (CFU-GM)

る種々の腫瘍抗原の抗原量やin vivoでの機能の問題を始め, CTL誘導から記憶免疫を確立する為には, 更なる工夫が必要といわざるを得ない。そこで, CMLへの免疫療法発展の可能性を目指して, 分子標的治療薬と免疫との関連を十分に良く考慮し, CMLに対しこれまで進めてきた細胞療法に自然免疫の賦活化による抗腫瘍免疫を付加する可能性を検討した。

IV. 分子標的治療薬療法を受けている CML 患者の NKT 細胞の機能評価と免疫療法への発展

1. イマチニブによる免疫応答への影響

イマチニブと免疫系について最近、その増強効果と免疫抑制の2方向から報告されている。Imatinib は、3種類のキナーゼである、BCR/ABL tyrosine kinase²⁰⁾、platelet-derived growth factor receptor (PDGF)²¹⁾、KIT²²⁾の活性化を抑制することが知られていて、このようなチロシンキナーゼを発現している腫瘍を対象として臨床的に利用されると考えられる。

一方、上記腫瘍に発現しているチロシンキナーゼと関係なく、免疫賦活にも影響を与えることもマウスモデルで報告されてきた²³⁾。DCをイマチニブで処理するとNK細胞を活性化しうようになる。特にイマチニブとIL-2の併用療法で、IFN- γ -産生 killer DC (B220+NK1.1+CD49B+DC) と呼ばれる IKDC を活性化することのみならず、IFN- γ 産生性のNK細胞活性化を促し抗腫瘍効果を示す (B220-NK1.1+CD49B+NK)^{24,25)}。このIKDCによる細胞傷害性機構には、TRAILが関与している。

分子標的治療薬であるイマチニブは抗癌剤に比べて、通常の投与方法では正常細胞への影響がないと考えられてきたが、治療を受けているCML群のT細胞、DCなど免疫担当細胞への非特異的な抑制効果が報告されている^{26,27)}。このことは、前述した薬剤耐性のことを考えると、イマチニブを投与されている際の病態と治療期間に免疫応答が依存している可能性がある。ただWT-1, hTertなどの腫瘍抗原特異的CD8 T細胞が、イマチニブ使用群と非使用群(同種骨髄移植群, IFN- α 療法群)において有意な差なく80%以上の患者において検出できることは¹⁵⁾、少なくとも分子標的治療薬の奏効している期間には免疫療法を併用できる可能性を示唆している。

2. iNKT細胞の生物学的特徴

NKT細胞はNK, $\gamma\delta$ T細胞と共に自然免疫の代表的なリンパ球細胞である²⁸⁾。ヒトiNKT細胞はV α 24, マウスはV α 14陽性のインバリアント鎖のT細胞レセプター(TCR)を有し、T細胞とNK細胞の両方のマーカーを発現していて、ヒト末梢血リンパ球中の0.05%程度と非常に低率にしか存在しない。しかしながらこの細胞数は一般にペプチド療

法で得られているCTL前駆細胞頻度と比較するとそれほど少ないとはいえない²⁹⁾。細胞学的特徴としてはCD44, CD69, CD122などの活性化T細胞、或はメモリーT細胞などのユニークな表現型を発現しており、活性化するとTh1, Th2両方のタイプのサイトカインを産生する³⁰⁾³¹⁾。iNKT細胞は、これまで免疫促進作用も免疫抑制作用もある免疫調節細胞として、種々の疾患の病因、病態の制御に深く関与しているとされてきた。例えばI型糖尿病³²⁾など自己免疫疾患³³⁾におけるiNKT細胞の数的減少、喘息患者でのIL-4産生性iNKT細胞偏向³⁴⁾³⁵⁻³⁷⁾や、宿主側のTh2タイプのiNKT細胞の存在が急性GVHDを制御できること³⁶⁻³⁹⁾や担癌状態においてIL-13産生性のiNKTが存在する⁴⁰⁾などの免疫制御の報告がある。反対に、CD1d分子又はiNKT細胞の欠損マウスモデルで感染や腫瘍が増悪する報告も多く存在し、自然免疫による生体防御に複雑に関わっている⁴¹⁻⁴⁴⁾。

生体内でのiNKT細胞の活性化はCD1dに提示されたリガンドにより活性化する場合と、DCやマクロファージなどの抗原提示細胞から産生されるIL-12, IL-18などによる二次的なサイトカインによる場合とがある。抗腫瘍免疫応答は、活性化iNKT細胞がパーフォリンやグランザイムを発現し主要組織適合抗原(MHC)非拘束性に直接的抗腫瘍効果を示すものと、一方ではiNKT細胞から産生されたIFN- γ やCD40Lの刺激により2次的に成熟したDCを介した獲得免疫により成り立っている(図4)⁴⁵⁾。またNKT細胞は特異な生体内分布を呈しており、肝臓、肺、脾臓、骨髄に豊富なためこれらの発生部位の腫瘍には効果が期待できる。

3. 分子標的療法とiNKT細胞療法併用の可能性

CMLの分子標的治療薬と免疫療法の併用の有効性を検討するため、イマチニブを使用している血液学的完全寛解(CR)のCML慢性期の患者を細胞学的効果で分類し、細胞学的完全寛解(CCR)14症例および細胞学的部分寛解(PR)6症例に対してV α 24+iNKT細胞の機能を解析した(表2)⁴⁶⁾。

末梢血単核球中のV α 24+iNKT細胞頻度をFACSで定量化すると健康人が約0.05%程度であるのに対し⁴⁷⁾、CMLでは0.02%とやや低下していた(表2)。CML患者末梢血中のIFN- γ 産生V α 24+iNKT細胞数をELISPOT法で解析すると、健康人ではV α 24+iNKTの細胞頻度とIFN- γ 産生

図4 樹状細胞による自然免疫と獲得免疫の増強効果

Toll 様受容体のリガンド (TLR-L) と同様に自然リンパ球の活性化により DC は成熟し、獲得免疫を誘導する。特に, small phosphoantigen や aminoantigen による $\gamma\delta$ T 細胞の活性化, ウイルス抗原による NK 細胞の活性化, または α -GalCer などにリガンドによる iNKT 細胞の活性化は, DC の完全成熟化を促進する。外来抗原を取り込み成熟化することで, 抗原特異的な T 細胞誘導が可能になる。

Table 2. Imatinib-treated CML-CP patients

		Hematology			%CD3 ⁺ invariant NKT ⁺	PB			Therapy
		WBC ($\times 10^{-9}/L$)	Hb (g/dL)	Plt ($\times 10^{-9}/L$)		%CD4	%CD8	%CD3 ⁻ CD56 ⁺	Imatinib
CML CP	UPN1	3.1	10.1	115.0	0.000	49.6	11.8	28.4	— ^a
	UPN2	3.0	10.6	117.0	0.026	19.1	18.1	18.0	+
	UPN3	4.9	13.6	209.0	0.036	21.6	5.9	20.5	+
	UPN4	8.6	14.1	181.0	0.032	34.7	18.2	10.2	+
	UPN5	5.6	9.7	237.0	0.009	20.2	12.0	5.0	+
	UPN6	2.8	12.6	95.0	0.002	30.2	14.2	19.9	+
	[CR] UPN7	4.7	13.5	169.0	0.040	15.2	23.8	21.8	+
	UPN8	3.1	9.8	98.0	0.030	32.7	10.6	29.3	+
	UPN9	2.8	10.8	195.0	0.010	27.2	27.2	9.4	+
	UPN10	2.9	10.0	65.0	0.000	27.3	27.3	9.1	+
	UPN11	3.0	12.1	113.0	0.110	46.8	30.9	4.7	+ ^b
	UPN12	6.0	12.5	204.0	0.020	24.3	19.0	12.2	+
	UPN13	5.5	14.7	150.0	0.006	23.5	32.4	33.2	+
	UPN14	3.9	9.8	63.0	0.011	28.0	21.2	7.0	+
[PR]	UPN15	2.5	10.3	38.0	0.012	48.3	15.7	8.2	+
	UPN16	4.2	9.7	107.0	0.002	12.0	15.3	6.7	+
	UPN17	8.3	9.0	298.0	0.003	32.5	2.2	5.6	+
	UPN18	2.3	10.4	200.0	0.015	42.9	30.8	18.5	+
	UPN19	8.4	11.5	1791.0	0.002	13.6	10.0	6.5	+
	UPN20	7.7	13.7	124.0	0.010	35.1	15.4	38.5	+

a ; pre BMT b ; combination with IFN- α

V α 24+iNKT 細胞が相関するのに対し, CML 患者では V α 24+iNKT 細胞頻度の高い症例でも IFN- γ 産生が認められなかった. この理由として, V α 24+iNKT 細胞自体の IFN- γ 産生能が傷害されている場合と, 腫瘍そのもの, 或はイマチニブ治療関連により抗原提示細胞のリガンドの提示能が傷害されている可能性が考えられる. また腫瘍細胞から免疫抑制物質 (IL-10, TGF- β , VEGF など) が産生され生体の抗原提示細胞 (DC やマクロファージ) の機能の傷害の可能性もある^{48,49}. また CML は造血幹細胞疾患であるため, 幹細胞からの分化異常による DC などの抗原提示細胞の異常も報告されている⁵⁰. その為, 自己の抗原提示細胞に非依存性に V α 24+iNKT 細胞機能を検出する必要があり, マウスの DC を用いて CML の患者の V α 24+iNKT 細胞の機能を評価する方法を確立した. V α 24+iNKT 細胞のリガンドは, ペプチドと異なり CD1d 分子に提示されることが知られている. CD1d 分子がヒトとマウスにおいて高い相同性 (約 60%) を有することに着目し⁵¹, ヒト自己 DC を用いずにマウス

DC を利用することにより PBMC 中の V α 24+iNKT を活性化させることが出来る (図 5)⁴⁶.

この方法は, PBMC より CD14, CD11c 陽性細胞などの自己の抗原提示細胞を除き, α -GalCer を添加したマウス骨髄由来 DC (BM-DC/Gal) と IL-2 存在下で 10 日間培養し V α 24+iNKT 細胞の増殖能と IFN- γ 産生能を検討するものである. 抗原提示細胞と V α 24+iNKT 細胞が異種の系であるため, マウス DC 由来のサイトカインや共刺激分子による刺激はヒト V α 24+iNKT 細胞の活性化には影響せず, リガンド依存性の刺激のみを考えればよいことになる (図 5-C).

本解析系を用いた結果, CCR の症例においては V α 24+iNKT 細胞の増殖能および IFN- γ 産生能が維持されていたのに対し, PR 例では増殖能もサイトカイン産生能も低下していることが判明した (図 6).

上記の結果は, 前述の末梢血を用いた ELISPOT 法では CCR 患者の V α 24+iNKT 細胞の機能も検出不能であることと矛盾する. この理由を解明する為

図 5 ヒト V α 24+iNKT 細胞に対するマウス DC の NKT 細胞リガンド提示能

iNKT 細胞のリガンドである α -GalCer の CD1d は, ヒト, ラットとマウスなど哺乳類で極めて類似性があるため, 共通リガンドで活性化できる. (A) DC と T 細胞の反応性において, ヒト末梢血由来 T 細胞は, 自己 DC (auto) と異種であるマウス DC (xeno) に対しては, 全く反応しないが, 他者由来の DC (allo) に対してアロ反応は強い. 一方, 各々の DC の NKT 細胞への抗原提示能については, (B) ヒト α -GalCer パルス DC に対して自己 V α 24+iNKT 細胞は, 強く反応する. 一方, α -GalCer 非パルス群では IFN- γ の産生は見られない. α -GalCer パルスしたマウス (xeno) DC 群は, 自己の樹状細胞群に比べ反応性は 1/3 程度の明らかなリガンド特異的な反応が見られる. (C) この交差反応の免疫応答に違いは, 自己の系による抗原提示は, 活性化した V α 24+iNKT 細胞が DC を 2 次的に完全成熟させ, IL-12, IL-18 などの炎症性サイトカインを産生させることと共刺激分子からの刺激と相まって NKT 細胞への二次的の反応が起こることに起因する. 一方, 異種 DC (xeno) の系では, マウスのサイトカインや共刺激分子はヒト V α 24+iNKT 細胞への二次的免疫応答を惹起せず, DC が成熟化することなく, リガンド特異的な反応のみを誘導するからである.

図6 イマチニブ療法を受けたCML慢性期患者のVα24+iNKT細胞に関する免疫学的解析

(A) 種々のCML群の患者に対し xeno-DC/Gal (murineDC/Gal) を用いて、培養後10日目に細胞の増幅と細胞内染色によるIFN-γ産生能を解析した。(CR: 完全寛解, m-CR: 分子レベルでの完全寛解, PR: 部分寛解)。(B) イマチニブ療法を受けている慢性期CML患者(CCR及びPR患者)におけるVα24+iNKT細胞の増殖(上段)とIFN-γ産生能(下段)を評価し列挙した。CCR群はVα24+iNKT細胞の増幅とIFN-γ産生能が認められるが、PR群は認められなかった。

図7 イマチニブ療法を受けたCML慢性期患者の抗原提示細胞の免疫学的解析

APCに着目して、自己の単球と単球由来のDCにα-GalCerを提示させて、健康人由来のVα24+iNKT細胞株(アロ)と共培養した。その結果、健康人の単球は健康人由来のVα24+iNKT細胞と共培養するとサイトカインの産生が認められるが、患者由来の単球は認められなかった。しかし同一患者からDCを誘導すると、NKT細胞からIFN-γの産生が見られた。このことは、イマチニブが単球の抗原提示能を抑制していて、DCに分化させると解除される為と考えられる。

に、次に健康人とCML-CP患者の末梢血由来のCD14陽性単球および単球由来DCのリガンド提示能を解析した。各々の患者由来の抗原提示細胞にα-GalCerをパルスし、健康人由来のVα24+iNKT細胞株と共培養後にIFN-γ産生を測定することによりα-GalCerの抗原提示細胞能を比較検討した。その結果、健康人群では、単球によるVα24+iNKT細胞活性は十分認められたが、CML群CCR, PR患者由来の単球はVα24+iNKT細胞の刺激能が低下していることがわかった(図7)。これらの患者

末梢血の単球由来DCを誘導しVα24+iNKT細胞刺激能を検討すると、健康人とほぼ同程度にVα24+iNKT細胞活性化能が回復することを明らかにした。

上記をまとめると、①CML慢性期患者では健康人に比較してVα24+iNKT細胞数の低下が認められる、②イマチニブ療法CCRの患者ではVα24+iNKT細胞の増殖能、サイトカイン産生能が保たれているが、PR患者では低下している、③CML患者の末梢血単球のリガンドの提示能は低下している

が、単球由来 DC の α -GalCer 提示能は健常人と同程度であることが判明した。このことは、CML のイマチニブ効果群で V α 24 + iNKT 細胞機能が正常に温存されている場合は免疫療法との併用の有効性が期待できることを示唆している。

V. おわりに

分子標的治療薬や抗体療法などの新規治療法の目覚しく進歩している。一方、若年者に対しては治療が期待できる治療法として同種造血幹細胞移植が積極的に施行されており、CML を対象とした本邦における治療成績は HLA 適合同胞間移植では 5 年生存率 93.3% で HLA 血清学的適合非血縁者間移植では 5 年生存率 21.9% で、イマチニブに対して低率であるものの、完全治癒が期待できる⁵²⁾。一方、イマチニブ療法に関しては、今後薬剤耐性の出現や医療費増大等の問題をも伴っていくことが予想され、従来の抗がん剤の考え方とは異なり、どこまで継続すべきであるかを決定することが重要な課題である。実際、医療費を比較すると、イマチニブでは月約 40 万円、移植では約 1000–1500 万円の費用がかかると言われているが、イマチニブをどの時点で投薬中止にしてよいかという判断基準は明らかになっていないのが現状である。

抗癌剤が腫瘍特異的であるとは言えないのに対して、このような分子標的治療薬の利点は、腫瘍への特異性であると考えられてきた。しかしながら、白血病幹細胞が抵抗性であることや、治療後に耐性となる場合があることは、今後残存した腫瘍細胞 (minimal residual disease: MRD) に対して免疫応答増強の考えが必要であることを意味している。癌特異的な免疫監視システムを確立することを目的とする免疫療法は、抗癌剤や放射線照射のように腫瘍細胞を短期間で直接殺傷するよりも、この様な MRD を腫瘍特異的に抑え、除去することに大きな利点があると考えられる。

現在進められている免疫療法は、多くの場合、進行癌の症例に対して進行を妨げることを目的に進められており、腫瘍量が多い場合には stable disease (SD) の期間を延ばす為の治療効果を得ること (TTP の延長) が一つの指標となっている。しかしながら、本稿において我々の提示した知見を考え合わせると、造血器腫瘍に対しての免疫療法は、分子標的治療薬や抗体療法との併用や比較的経過の長い病態、或は従来の治療後の微少残存白血病細胞の状

態に対して積極的に併用することにより、治癒に向けて有効性が期待できると考えられる。

文 献

- 1) Deininger MW.: Chronic myeloid leukemia: an historical perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2008**: 418, 2008.
- 2) Deininger MW.: Milestones and Monitoring in Patients with CML Treated with Imatinib. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2008**: 419–426, 2008.
- 3) Druker BJ.: Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* **112**: 4808–4817, 2008.
- 4) Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D.: Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/ab1 gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**: 824–830, 1990.
- 5) Ohnishi K, Ohno R, Tomonaga M et al.: A randomized trial comparing interferon-alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* **86**: 906–916, 1995.
- 6) 木村晋也: CML に対する分子標的療法. 臨床血液 **48**: 46–55, 2007.
- 7) Melo JV, Chuah C.: Novel Agents in CML Therapy: Tyrosine Kinase Inhibitors and Beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2008**: 427–435, 2008.
- 8) O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA et al.: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **348**: 994–1004, 2003.
- 9) Graham SM, Jorgensen HG, Allan E et al.: Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**: 319–325, 2002.
- 10) Michor F, Hughes TP, Iwasa Y et al.: Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature* **435**: 1267–1270, 2005.
- 11) Elrick LJ, Jorgensen HG, Mountford JC et al.: Punish the parent not the progeny. *Blood* **105**: 1862–1866, 2005.
- 12) Bornhauser M, Kroger N, Schwerdtfeger R et al.: Allogeneic haematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukaemia in the era of imatinib: a retrospective multicentre study. *Eur J Haematol* **76**: 9–17, 2006.

- 13) Zhao C, Chen A, Jamieson CH et al.: Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**: 776–779, 2009.
- 14) Dierks C, Beigi R, Guo GR et al.: Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* **14**: 238–249, 2008.
- 15) Gannage M, Abel M, Michallet AS et al.: Ex vivo characterization of multiepitopic tumor-specific CD8 T cells in patients with chronic myeloid leukemia: implications for vaccine development and adoptive cellular immunotherapy. *J. Immunol.* **174**: 8210–8218, 2005.
- 16) Grunebach F, Mirakaj V, Muller MR et al.: BCR-ABL is not an immunodominant antigen in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **66**: 5892–5900, 2006.
- 17) Molldrem JJ, Lee PP, Wang C et al.: Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* **6**: 1018–1023, 2000.
- 18) Shimomura T, Fujii S, Ezaki I et al.: Characterization of T-cell receptor β chain mRNA expression in IFN- α -responsive chronic myelogenous leukaemia patients. *Br J Haematol* **105**: 173–180, 1999.
- 19) Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K et al.: Analysis of a chronic myelogenous leukemia patient vaccinated with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**: 1117–1129, 1999.
- 20) Apperley JF, Gardembas M, Melo JV et al.: Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* **347**: 481–487, 2002.
- 21) Buchdunger E, O'Reilly T, Wood J. Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur J Cancer* **38** Suppl 5: S28–36, 2002.
- 22) Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ et al.: Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* **20**: 1692–1703, 2002.
- 23) Borg C, Terme M, Taieb J et al.: Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* **114**: 379–388, 2004.
- 24) Ullrich E, Bonmort M, Mignot G et al.: Therapy-induced tumor immunosurveillance involves IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res* **67**: 851–853, 2007.
- 25) Mignot G, Ullrich E, Bonmort M et al.: The critical role of IL-15 in the antitumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2. *J Immunol* **180**: 6477–6483, 2008.
- 26) Dietz AB, Souan L, Knutson GJ et al.: Imatinib mesylate inhibits T-cell proliferation in vitro and delayed-type hypersensitivity in vivo. *Blood* **104**: 1094–1099, 2004.
- 27) Appel S, Boehmler AM, Grunebach F et al.: Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34 + peripheral blood progenitor cells. *Blood* **103**: 538–544, 2004.
- 28) Munz C, Steinman RM, Fujii S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* **202**: 203–207, 2005.
- 29) Germeau C, Ma W, Schiavetti F et al.: High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *J. Exp. Med.* **201**: 241–248, 2005.
- 30) Taniguchi M, Harada M, Kojo S et al.: The regulatory role of Va14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 483–513, 2003.
- 31) Fujii S. Application of natural killer T-cells to posttransplantation immunotherapy. *Int J Hematol* **81**: 1–5, 2005.
- 32) Hong S, Wilson MT, Serizawa I et al.: The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* **7**: 1052–1056, 2001.
- 33) Hammond KJ, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol* **15**: 683–689, 2003.
- 34) Akbari O, Faul JL, Hoyte EG et al.: CD4 + invariant T-cell-receptor + natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* **354**: 1117–1129, 2006.
- 35) Akbari O, Umetsu DT. Reply to Natural killer T cells and CD8(+) T cells are dispensable for T cell-dependent allergic airway inflammation. *Nat Med* **12**: 1347, 2006.
- 36) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S et al.:

- Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J Immunol* **174**: 551–556, 2005.
- 37) Haraguchi K, Takahashi T, Matsumoto A et al.: Host-residual invariant NK T cells attenuate graft-versus-host immunity. *J Immunol* **175**: 1320–1328, 2005.
 - 38) Lan F, Zeng D, Higuchi M et al.: Predominance of NK1.1+TCR $\alpha\beta$ + or DX5+TCR $\alpha\beta$ +T cells in mice conditioned with fractionated lymphoid irradiation protects against graft-versus-host disease: “natural suppressor” cells. *J Immunol* **167**: 2087–2096, 2001.
 - 39) Lowsky R, Takahashi T, Liu YP et al.: Protective conditioning for acute graft-versus-host disease. *N Engl J Med* **353**: 1321–1331, 2005.
 - 40) Terabe M, Swann J, Ambrosino E et al.: A nonclassical non-V α 14Ja18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J. Exp. Med.* **202**: 1627–1633, 2005.
 - 41) Ranson T, Bregenholt S, Lehuen A et al.: Invariant V α 14+ NKT Cells Participate in the Early Response to Enteric *Listeria monocytogenes* Infection. *J Immunol* **175**: 1137–1144, 2005.
 - 42) Smiley ST, Lanthier PA, Couper KN et al.: Exacerbated susceptibility to infection-stimulated immunopathology in CD1d-deficient mice. *J Immunol* **174**: 7904–7911, 2005.
 - 43) Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI.: A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Exp. Med.* **196**: 119–127, 2002.
 - 44) Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP et al.: Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* **202**: 1279–1288, 2005.
 - 45) Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M et al.: Prolonged interferon- γ producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded dendritic cells. *Nat. Immunol.* **3**: 867–874, 2002.
 - 46) Shimizu K, Hidaka M, Kadowaki N et al.: Evaluation of the function of human invariant NKT cells from cancer patients using α -galactosylceramide-loaded murine dendritic cells. *J. Immunol.* **177**: 3484–3492, 2006.
 - 47) Fujii S, Shimizu K, Steinman RM et al.: Detection and activation of human V α 24+ natural killer T cells using α -galactosyl ceramide-pulsed dendritic cells. *J. Immunol. Meth.* **272**: 147–159, 2003.
 - 48) Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **4**: 71–78, 2004.
 - 49) Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res* **92**: 13–27, 2004.
 - 50) Mohty M, Jarrossay D, Lafage-Pochitaloff M et al.: Circulating blood dendritic cells from myeloid leukemia patients display quantitative and cytogenetic abnormalities as well as functional impairment. *Blood* **98**: 3750–3756, 2001.
 - 51) Brossay L, Chioda M, Burdin N et al.: CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T Cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* **188**: 1521–1528, 1998.
 - 52) Ohnishi K, Minami S, Ueda T et al.: Multicenter prospective study of interferon-alpha and conventional chemotherapy versus bone marrow transplantation for newly diagnosed patients with chronic myelogenous leukemia. Kouseisho Leukemia Study Group. *Int J Hematol* **72**: 229–236, 2000.