

がん抗原特異的 NKT 細胞サブセットを用いた 低侵襲・新規がん免疫療法の開発

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部
主任研究員 植村 靖史

(共同研究者)
部長 葛島 清隆

背景と目的

最近、がん特異抗原由来の T 細胞エピトープを患者に投与するペプチドワクチンの臨床試験が国内外の多くの施設で行われている。ところが、①がんを特異的に傷害する T 細胞を生体内で増殖させることが困難であること、②がん組織における免疫抑制性の微小環境を改善できないこと等に起因して、期待された効果が認められていないのが現状である。したがって、がんに対する抗原特異的免疫療法を有効な医療技術として確立するためには、免疫賦活効果（アジュバント効果）を有するとともに、がん細胞を強力に排除しうる T 細胞を体外で増殖させて、これを生体内に投与する新たな養子免疫療法を開発することが必要不可欠である。

インバリアントナチュラルキラー T (invariant natural killer T: iNKT) 細胞は、T 細胞とナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞の両方の特徴を有する特殊な T 細胞サブセットである。この T 細胞は、均一な T 細胞抗原受容体 (T cell receptor: TCR) を発現して、CD1d 分子に提示された海面由来の糖脂質抗原 (α -galactosylceramide: α -GalCer) を認識して増殖応答を示す。

最近、私達はヒト iNKT 細胞の代表的な 2 つのサブセット (CD4+CD8 β - および CD4-CD8 β -) を精製分離して株化する方法を構築し、それぞれの iNKT 細胞サブセットが異なる細胞アジュバントとして樹状細胞 (dendritic cell: DC) に作用し、DC の異なる活性化を誘導すること⁽¹⁾、さらに iNKT 細胞と DC の相互作用により、DC における IL-12/IL-23 産生バランスが制御され、免疫抑制性のがん微小環境が改善されるメカニズムを報告した^(2, 3)。iNKT 細胞は、DC を賦活化する細胞アジュバントとしての機能に優れているが、HLA クラス I 分子拘束性にごん抗原を認識して直接がん細胞を傷害することはできない。したがって、HLA クラス I 分子拘束性にごん抗原を認識する TCR を iNKT 細胞に発現させ、この強力な細胞傷害活性をごん細胞に向けることができれば、免疫抑制性のがん微小環境を改善するとともに、がん細胞の選択的排除を誘導する新たな治療法の開発に資することができる。

本研究課題は、ヒト iNKT 細胞サブセットにごん抗原を認識する TCR を人為的に発現させることでがん細胞を特異的に認識する抗腫瘍エフェクター細胞を作製し、これの有用性を検討することを目的とした。

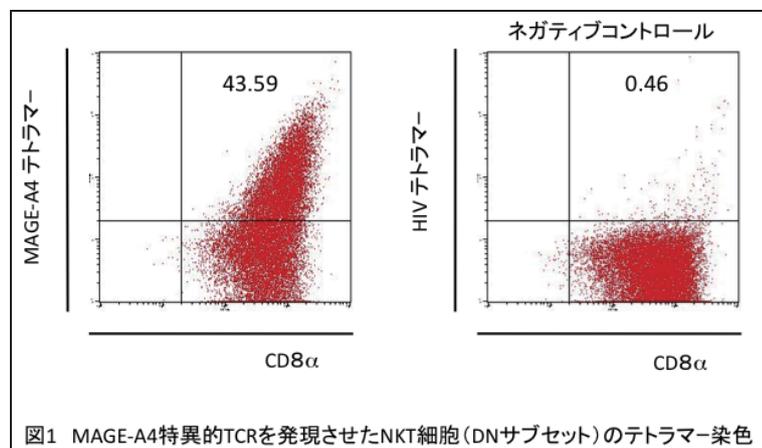
方法

健康人末梢血単核球を α -GalCerにて刺激することによって α -GalCer特異的ヒトV α 24 iNKT細胞の増殖を誘導した。これからV α 24+V β 11+6B11+ヒトiNKT細胞を、高速自動セルソーターにより精製分離して7-9日おきに複数回刺激することで株化した。さらにCD4+CD8 β - (CD4+ iNKTサブセット), CD4-CD8 β - (double negative (DN) iNKTサブセット)の各iNKTサブセットを精製分離して株化した。これらのiNKT細胞株を抗CD3抗体刺激した際に産生されるサイトカインは、フローサイトメトリーベースのサイトカインアレイ法により同定した。

2つのiNKT細胞サブセットにCD8 α / β 鎖遺伝子、およびがん抗原(MAGE-A4)特異的TCR α / β 鎖遺伝子をレトロウイルスを用いて導入した。CD8 α / β 鎖、TCR α / β 鎖の発現はCD8 α 鎖、CD8 β 鎖に対する抗体、およびHLAテトラマーを用いたフローサイトメトリーにより確認した。細胞傷害活性は、抗原ペプチドを負荷したT2細胞をターゲット細胞とする⁵¹Cr放出試験により評価した。

結果

抗CD3抗体刺激において、CD4 iNKT細胞サブセットは大量のTNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSFを産生した。一方、DN iNKT細胞サブセットは、TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSFを産生した。特にDN iNKT細胞サブセットは、IFN- γ /IL-4比の高いTh1偏向のサイトカイン産生パターンを示した。がんの転移や進行を促進する炎症性サイトカイン(IL-1 β , IL-6)の産生は、どちらにも認められなかった。また、がん・自己免疫疾患・炎症性疾患の病因・病態に関与することで近年注目視されているTh17サイトカイン(IL-17, IL-22)の産生は認められなかった。



これら精製分離した2つのiNKT細胞サブセットに対して、HLA-A24拘束性のがん特異抗原ペプチドを認識するTCRを発現させた(図1)。これらは、がん抗原特異的TCRの他に、 α -GalCerを特異的に認識する内因性のインバリエントTCRを保持していた。これらががん抗原特異的TCR発現iNKT細胞は、HIVペプチド

を負荷したHLA-A24陽性細胞株に細胞傷害性を示さなかったが、がん特異抗原ペプチド(MAGE-A4ペプチド)を負荷したものに対して細胞傷害活性を示した(図2)。

考察

本研究により、がん抗原特異的TCRを導入したDNおよびCD4+iNKTサブセットは、ともにごん特異抗原を認識してがん細胞を傷害する可能性が示唆された。また、このエフェクター細胞は、がん抗

原ペプチドを認識する TCR と α -GalCer を特異的に認識するインバリアント TCR をともに発現するため、がん抗原ペプチドあるいは α -GalCer を用いて生体内で増殖をコントロールできると考えられる。

近年、レトロウィルスを用いてがん抗原特異的 TCR を人為的に発現させた多様な T 細胞を、がん患者に投与し

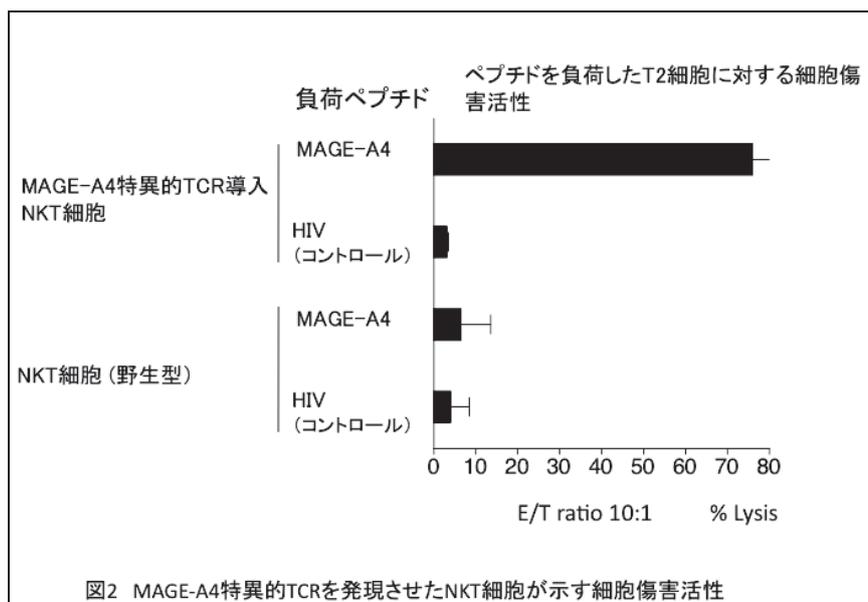
てがんの排除を誘導する方法が開発されている⁽⁴⁾。しかし、抗原特異性が未知の TCR を内因性に発現する T 細胞集団に、がん抗原特異的 TCR を導入して体外で増殖させ、これを患者体内に輸注する方法は、GVHD を惹起させるなどのリスクを有している⁽⁵⁾。ヒト iNKT 細胞は、内因性 TCR の抗原特異性が明らかであり、GVHD を惹起するリスクがなく低侵襲であること、また DC との相互作用により強力なアジュバント効果を発揮して免疫抑制性のがん微小環境を改善できるなどの点において他の細胞をベースとしたシステムより優れていると考えられる。

要約

iNKT 細胞と呼ばれる特殊な T 細胞サブセットに、がん抗原を特異的に認識する TCR を発現させた。このエフェクター細胞は、がん抗原ペプチドを負荷した細胞株に対して細胞傷害活性を示した。iNKT 細胞は抗原刺激により多様なサイトカインを産生するとともに、DC との相互作用によって、がんの進行を促進する炎症性反応を抑制する。また、iNKT 細胞は内因性 TCR の抗原特異性が明らかであり、これを活性化して生体内に投与しても GVHD を惹起するリスクが小さく低侵襲である。したがって、iNKT 細胞ベースの抗腫瘍エフェクター細胞を用いた免疫療法は、副作用が少なく患者の QOL を高めるとともに、効果の高いがん治療法へと発展する可能性がある。

文献

1. Liu, T-Y., Uemura, Y., Suzuki, M., Narita, Y., Hirata, S., Ohyama, H., Ishihara, O. and Matsushita, S. Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. Eur. J. Immunol.38: 1012-1023, 2008.
2. Uemura, Y., Liu, T-Y. Narita, Y., Suzuki, M., Nakatsuka, R., Araki, T., Matsumoto, M., Iwai L.K., Hirose, N., Matsuoka, Y., Murakami, M., Kimura, T., Hase, M., Kohno, H., Sasaki, Y., Ichikawa, Y., Ishihara, O.,



Kikuchi, H., Sakamoto, Y., Jiao, S-C., Senju, S., and Sonoda, Y.

Cytokine-dependent modification of IL-12p70 and IL-23 balance in dendritic cells by ligand activation of V α 24 invariant natural killer T cells.

J. Immunol. 183: 201-208, 2009.

3. 成田弥生, 鈴木元晴, 劉天懿, 村上真理, 松岡由和, 中塚隆介, 長谷真, 河野比良夫, 佐々木豊, 廣澤成美, 坂本安, 植村靖史, 藺田精昭

NKT 細胞のアジュバント効果と抗腫瘍免疫応答への応用

Cytometry Research, 20 (1) : 19-25, 2010.

4. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA.

Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes.

Science 314: 126-129, 2006

5. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, Kaiser AD, Pouw N, Debets R, Kieback E, Uckert W, Song JY, Haanen JB, Schumacher TN.

Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy.

Nat. Med. 16: 565-576, 2010