

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
総括研究報告書

ヒトゲノム研究に基づく腫瘍免疫細胞療法の開発研究
主任研究者 平井久丸 東京大学医学部附属病院 無菌治療部助教授

研究要旨：がんに対する樹状細胞を用いた免疫療法の開発を目的とし、慢性骨髄性白血病(CML)を標的として樹状細胞を用いた抗白血病効果の基礎的ならびに臨床的検討を行った。患者末梢血より取り出した樹状細胞にbcr/ablペプチドをパルスリンパ球と混合培養することにより、b3a2型bcr/ablペプチドに特異的に、HLA型ではA*0201及びA*2402依存性にCD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)を樹立することができた。この結果を用いてCML患者に対する樹状細胞療法の臨床試験を実施した。当院倫理委員会の承認のもとに3人のCML患者に対し樹状細胞療法を行った。現在までに問題となる副作用は確認されておらず、安全な治療であると考えられる。治療に対する免疫反応及び臨床効果が一部認められたが一過性であった。今後、樹状細胞の質的ならびに量的な改善を加え、より強力な抗白血病効果の誘導を試みる予定である。

分担研究者

十字猛夫・日本赤十字社中央血液センター・所長

A. 研究目的

慢性骨髄性白血病（CML）に対する樹状細胞を用いた免疫療法を開発することを目的として、CML患者末梢血においてbcr/ablペプチド特異的T細胞の誘導能とbcr/ablの切断点の型及びHLAの型に依存性について基礎的検討を行い、CML患者に対しbcr/ablペプチドをパルスした自己樹状細胞を投与する臨床試験の安全性と有効性について検討を行った。

B. 研究方法

約30名のCML患者のbcr/ablの切断点の型、及びHLA型を調べ、患者末梢血より単球を採取して樹状細胞化させ、17merのbcr/ablペプチドを加えてリンパ球と混合培養を行った。樹立したT細胞のペプチドに対する反応性を3H-thymidineの取り込みや51Cr遊離試験で評価し、得られたT細胞の解析を行った。この基礎検討に基づき、当院倫理委員会の承認のもとにCMLに対する細胞療法の臨床試験を行った。患者末梢血よりアフエーシスにて樹状細胞分画を回収し、bcr/ablペプチドをパルスして患者に戻した。副作用は理学所見、検査所見等で、有効性は染色体、FISHなどを用いて評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、すでに東京大学医学部倫理委員会で承認を受けており、実際の臨床試験において十分な説明を行い患者の同意を得た。

C. 研究結果

b3a2型bcr/ablペプチド特異的かつHLA型A*0201及びA*2402依存性に反応するCD8陽性T細胞を樹立した。樹立されたCD8陽性T細胞はBCR/ABLペプチド添加自己樹状細胞に対し細胞障害活性を示した。3例のCML患者に対する樹状細胞療法ではアフエーシスを行うにあたり問題はみられなかった。1例の患者においては、細胞輸注時に悪寒、発熱がみられたがそれ以外には副作用は認められなかった。治療による免疫学的な反応では、治療開始8週後頃

よりKLHあるいはbcr/ablペプチドに対するDTH反応が一部認められたが何れも一過性であった。治療による臨床的效果に関しては、一部症例においてはFISHにおいて一過性にbcr/abl陽性細胞の割合の減少を認めたが、染色体レベルでは明らかな腫瘍クロソンの減少効果は認められなかった。

D. 考察

CML患者末梢血よりbcr/abl特異的CD4陽性及びCD8陽性T細胞の誘導が可能であることが示された。この誘導はbcr/ablの切断点の型、及びHLAの型に大きく依存していることが示唆された。臨床試験においては問題となる副作用は認められず、樹状細胞療法は安全な治療であると考えられた。治療効果に関しては免疫学的、臨床的にも一部効果はみられたが、効果は限局的であった。今後は樹状細胞の質的量的検討を行うとともに、IL-2等のサイトカインを組み合わせる、in vitroで増やした抗原特異的CTLを投与するなどの方法を検討し、治療効果をより増強させる方法論の開発を目指す予定である。

E. 結論

CML患者の末梢血より樹状細胞を用いてbcr/abl特異的T細胞を樹立することに成功した。樹状細胞を用いた免疫療法をCML患者に対して実施した。副作用は少なく安全であったが、治療効果は限局的であった。今後、治療法の改善などについて、さらに検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka Y, Takahashi T, Nieda M, Masuda S, Kashiwase K, Ogawa S, Chiba S, Juji T, Hirai H. Generation of HLA-DRB1*1501-restricted p190 minor bcr-abl (e1a2)-specific CD4+ T-lymphocytes. Br. J. Haematol. (In press)

Takahashi T, Hirano N, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H. Immunogenetic therapy against mouse leukemia using B7 molecules. Cancer Gene Therapy 7:144-150, 2000.

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

ヒトゲノム研究に基づく腫瘍免疫細胞療法の開発研究
分担研究者 十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター所長

研究要旨：“遺伝子変異による発癌機構に関する研究”から得られた新しい知見を基に同定された腫瘍抗原を用いた樹状細胞免疫療法(DC therapy)は悪性腫瘍に対する癌治療として将来が期待されるものである。しかしながら従来の樹状細胞治療ではその効果が限定されているので、より多くの人に適応できる樹状細胞治療の開発を目的にその可能性を検討する。

分担研究者
十字猛夫・日本赤十字社中央血液センター・所長

A. 研究目的

従来の悪性腫瘍に対するDC therapyでは、患者の主要組織適合性抗原(MHC)と腫瘍抗原ペプチドの適切な組み合わせ(MHC拘束性)がみられない場合は、DC therapyが適応できない場合が生ずる。最近DC上に強く発現していて、多形性に乏しいCD1d上に提示された糖脂質(α -GalCer)によって活性化されるV α 24NKT細胞がある種の腫瘍細胞株を傷害することが判明した。本研究ではDC上の α -GalCer-CD1d系を介したMHCのバリアーを越えて多くの患者に適応できるDC therapyおよびV α 24NKT細胞のワクチン療法についてその可能性を検討する。

B. 研究方法

健常人および患者より得られたDCを用いた自己混合リンパ球反応の系でV α 24NKT細胞を樹立し、その性状(表面抗原の同定と各種サイトカインの測定)と機能(主に腫瘍細胞株に対する傷害活性)について検討する。

(倫理面への配慮)

健常人および患者に十分な説明を行い採血と血液の使用に関する同意を得た。

C. 研究結果

健常人由来のV α 24NKT細胞はある種の腫瘍細胞株を傷害するが、その中でも単球系白血病細胞由来の腫瘍細胞株U937に対し最も強い傷害活性を示し、NK細胞の標的細胞であるK562に対する傷害活性がないことが確かめられた。この結果はV α 24NKT細胞とNK細胞では傷害のメカニズムが異なることを示唆するものである。また、メラノーマ患者由来のV α 24NKT細胞は健常人由来の同細胞と性状は同じであったが、自己のメラノーマ腫瘍細胞株に対する傷害活性は認められなかったが、その増殖を抑制し、この抑制はV α 24NKT細胞が誘出するIFN α によるものであることが判明した。

D. 考察

V α 24NKT細胞と細胞の傷害のメカニズムについては明確には解明されていないが、V α 24NKT細胞はある種の腫瘍細胞株を傷害もしくはその増殖を抑制

することが判ったので、V α 24NKT細胞のT細胞ワクチン療法が患者を選べば癌治療に用いることができると考えられる。

E. 結論

V α 24NKT細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性にどのような分子が関与しているかを解明することを目的としてさらに研究を進める。このことにより、どのような腫瘍細胞にはV α 24NKT細胞のワクチン療法が適応できるかが判明し、患者の選択が可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sato K, Juji T, et al. Autocrine Activation-Induced Cell Death of T Cells By Human Peripheral Blood Monocyte-Derived CD4(+) Dendritic Cells. *Cell Immunol.* 199;115-125, 2000.

Nicol A, Juji T, et al. Human invariant α 24 natural killer T cells activated by α -galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 99:229-234, 2000.

Sato K, Juji T, et al. TGF-beta1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J Immunol.* 164:2285-95, 2000.

Kodera Y, Juji T, et al. Analysis of 500 bone marrow transplants from unrelated donors (UR-BMT) facilitated by the Japan Marrow Donor Program: confirmation of UR-BMT as a standard therapy for patients with leukemia and aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* 24:995-1003, 1999.

Maenaka K, Juji T, et al. Killer cell immunoglobulin receptors and T cell receptors bind peptide-major histocompatibility complex class I with distinct thermodynamic and kinetic properties. *J Biol Chem.* 274:28329-34, 1999.

Ishihara S, Juji T, et al. CD8(+)NKR-P1A(+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur J Immunol.* 29:2406-13, 1999.

Juji T, et al. Human platelet alloantigen(HPA)-5a/b mismatch decreases disease-free survival in unrelated bone marrow transplantation. *Tissue Antigens.* 54:229-34, 1999.