

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ヒトゲノム研究に基づく腫瘍免疫細胞療法の開発研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 平井 久丸

平成 14 年 (2002) 3 月

目 次

I. 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

東京大学医学部附属病院無菌治療部 平井 久丸 1

II. 分担研究報告書

1. 慢性骨髄性白血病に対する樹状細胞療法の開発研究

東京大学医学部血液腫瘍内科 千葉 滋 2

2. ヒト V α 24NKT 細胞を用いた免疫療法の開発研究

東京大学医学部附属病院輸血部 高橋 強志 3

3. ゲノム解析と腫瘍免疫細胞療法の研究

株式会社メディネット分子免疫学研究所 賛田 美江 4

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 5

IV. 研究成果の刊行物・別刷 6

I . 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
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：がんに対する免疫細胞療法の開発を目的とし本研究を行った。樹状細胞を用いた慢性骨髄性白血病 (CML) に対する細胞療法では、成熟単球由来樹状細胞を用いた。治療は安全に行うことができた。未熟樹状細胞を用いたのに比べ強い免疫反応が得られた。しかし臨床効果は未だ不十分なものであり今後さらなる開発が必要である。またヒト V α 24NKT 細胞の解析を行い、CD8+V α 24NKT 細胞を新たに見いだした。これらを含め V α 24NKT 細胞の亜集団はそのサイトカイン産生が異なることが明らかとなり、今後臨床への応用が期待できる。また、がん患者に対する α -galactosylceramide(α -GalCer)を用いた樹状細胞療法を行った。副作用はみられず、また末梢血中の V α 24NKT 細胞の増加が確認された。

分担研究者：

千葉 滋（東京大学医学部血液腫瘍内科・助手）
高橋強志（東京大学医学部輸血部・助手）
贄田美江（(株)メディネット・分子免疫学研究所・主任）

効果に関しては、いずれの症例も Ph 染色体および bcr/abl FISH にて病態の改善は確認されなかった。

V α 24NKT 細胞の機能を解析した。その過程で新たに CD8+V α 24NKT 細胞を同定し報告した。V α 24NKT 細胞の亜集団はサイトカイン産生能が異なり CD4+V α 24NKT 細胞は IL-4,IL-10 などを産生、CD8+V α 24NKT 細胞は IFN- γ を産生、CD4 CD8-V α 24NKT 細胞は両者の中間のサイトカイン産生能を示した。また α -GalCer をパルスした樹状細胞のがん患者への投与では、副作用は認められなかった。また8名中7名で末梢血中の V α 24NKT 細胞の増加が確認された。

A. 研究目的

CML に対する樹状細胞療法の開発を行う。前年度は、未熟単球由来樹状細胞を樹状細胞のソースとして用いたが十分な免疫学的反応は得られなかった。そこで今年度は樹状細胞の調製に TNF- α を併用し成熟樹状細胞としてこれを治療に用い、また、抗腫瘍効果を持つヒト V α 24NKT 細胞の解析を行い、併せてその臨床応用を検討した。

B. 研究方法

CML 患者に対する成熟単球由来樹状細胞を用いた細胞療法の臨床応用を行った。方法は、患者末梢血より単球分画を回収し、IL-4、GM-CSF、TNF- α を用いて成熟単球由来樹状細胞とし患者に接種した。これを2週間隔で計4回繰り返した。副作用、免疫学的な評価、臨床評価を行った。

（倫理面での配慮）

本研究計画は、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は十分な説明を行い患者の同意を得て行った。

また、樹状細胞に α -GalCer (V α 24NKT 細胞のリガンド) を加え、自己リンパ球と培養することにより V α 24NKT 細胞を樹立。これを CD4,CD8 の表現型で亜集団に分けその機能を解析した。併せてがん患者に α -GalCer をパルスした樹状細胞を投与しその安全性及び V α 24NKT 細胞誘導能を検討した。

（倫理面での配慮）

α -GalCer をパルスした樹状細胞のがん患者への投与は、オーストラリアの国立プリズベン病院にて、同院倫理委員会の承認を受け患者への十分な説明のもとに同意を得て行った。

C. 研究結果

CML 患者3例に対し今回成熟単球由来樹状細胞療法を行った。3例の患者に明らかな副作用は認められなかった。全例とも KLH に対する免疫学的反応がみられたが、bcr-abl ペプチドに反応する T 細胞の増加は確認できなかった。治療による臨床

D. 考察

今回の結果は、成熟樹状細胞を用いて樹状細胞療法を行うと前回の未熟樹状細胞を用いたときに比べより強力に免疫反応が誘導されうること示した。また、現時点ではこの治療法の安全性も示された。しかし治療効果に関しては不十分であった。今後更に強力な樹状細胞療法の開発を行っていく予定である。また、V α 24NKT 細胞は亜集団でその機能が異なることが判明したため今後はその生理的、病的役割を解明したがんを始めとした臨床応用を検討していきたい。

E. 結論

CML 患者に対し成熟単球由来樹状細胞を用いた免疫療法を行った。副作用は少なく安全であると考えられた。治療効果は不十分であり今後改善させていきたい。また併せて V α 24NKT 細胞を用いたがん免疫療法も開発していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Juji T, Hirai H. Analysis of human V α 24+CD8+ NKT cells activated by α -galactosyl ceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. J. Immunol. 168:3140-3144, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

慢性骨髄性白血病に対する樹状細胞療法の開発研究
分担研究者：千葉 滋（東京大学医学部血液腫瘍内科・講師）

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臨床的検討を行った。昨年度は、未熟単球由来樹状細胞を用いて樹状細胞療法を行い、目標量の樹状細胞を調製、投与することができたがその効果は不十分であった。そこで今年度は樹状細胞の調製に更に TNF- α を用いより成熟した樹状細胞を用い患者への治療を行った。治療は安全に行うことができた。また免疫学的反応は未熟樹状細胞を用いたのに比べ強かった。しかし臨床効果は未だ不十分なものであった。今後はサイトカイン併用等の改善を加え、より強力な樹状細胞療法を開発していく予定である。

A. 研究目的

慢性骨髄性白血病(CML)に対する樹状細胞療法を用いた免疫療法の開発を目的とする。前年度は、未熟単球由来樹状細胞を樹状細胞のソースとして用いることで、大量の樹状細胞を調製することができ、これに bcr-abl ペプチドを添加し患者への投与を行ったが十分な免疫学的反応は得られなかった。そこで今年度は樹状細胞の調製に TNF- α を併用し成熟樹状細胞としてこれを治療に用い、前回行った3症例に対し再度、樹状細胞療法の検討を行った。

B. 研究方法

CML 患者に対する単球由来樹状細胞を用いた細胞療法の臨床応用を行った。方法は、患者末梢血よりアフエーシスを行い、単球分画を回収した。得られた単球を培養液に IL-4 と GM-CSF を加えて5日間培養し bcr/abl ペプチドおよび KLH 蛋白をパルスし12時間後に TNF- α を添加し更に2日間培養しこれを患者皮内に接種した。これを2週間隔で計4回繰り返した。副作用は、理学所見、検査所見等で評価した。免疫学的な評価としては、遅延型過敏反応(DTH)試験および ELISPOT 試験を行った。また臨床評価としては骨髄における Ph 染色体、bcr/abl FISH の陽性率の評価等を行った。

(倫理面での配慮)

本研究計画は、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は十分な説明を行い患者の同意を得て行った。

C. 研究結果

前回、未熟単球由来樹状細胞を用いて治療を行った3症例に対し今回成熟単球由来樹状細胞療法を行った。3症例とも1回のアフエーシスで、4回の樹状細胞療法を行うのに十分な数の樹状細胞が得られた。調製された樹状細胞の解析では、95%の純度で樹状細胞に特徴的な分子の発現が確認された。また電顕でも成熟樹状細胞の形態が確認された。1回あたりの平均樹状細胞投与量は 6.8×10^5 /kg であった。3例の患者の樹状細胞療法では投与時及び投与後現在までに明らかな副作用は認められなかった。全例とも KLH 蛋白に対する DTH が陽性となった。また一例で bcr-abl ペプチドに対する DTH が陽性となった。また ELISPOT 試験では、全例とも KLH 蛋白に反応する Tリン

パ球が患者末梢血中で樹状細胞療法の前後で増加していることが確認された。しかし bcr-abl ペプチドに反応する T 細胞の明らかな増加は確認できなかった。治療による臨床効果に関しては、いずれの症例も Ph 染色体および bcr/abl FISH にて明らかな病態の改善は確認されなかった。

D. 考察

今回の結果は、成熟樹状細胞を用いて樹状細胞療法を行うと前回の未熟樹状細胞を用いたときに比べより強力に免疫反応が誘導されうことを示した。また、現時点ではこの治療法の安全性も示された。しかし治療効果に関しては不十分であった。今後の課題としてはいかにして十分な治療効果が得られるかであり、IL-2 などサイトカインを組み合わせた、in vitro で増やした白血病細胞特異的 CTL を投与するなどの方法を検討していく予定である。

E. 結論

CML 患者に対し成熟単球由来樹状細胞を用いた免疫療法を皮内接種にて行った。副作用は少なく安全であると考えられた。免疫学的反応は、未熟樹状細胞を用いたのに比べより強力に得られた。しかし十分な治療効果は認められなかった。今後、サイトカイン等をお互い組み合わせるなどしてこの樹状細胞療法を改善しより効果のある免疫療法として確立させていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka Y, Takahashi T, Nieda M, Masuda S, Kashiwase K, Takahashi T, Ogawa S, Chiba S, Juji T, Hirai H. Generation of Fas-independent CD4+ cytotoxic T-cell clone specific for p190 minor bcr-abl fusion peptide. *Leukemia Research*. 26:317-321, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ヒト V α 24NKT 細胞を用いた免疫療法の開発研究
分担研究者：高橋強志（東京大学医学部附属病院輸血部・助手）

研究要旨:癌に対する免疫細胞療法の開発を目的として本研究を行った。ヒト V α 24NKT 細胞はマウス V α 14NKT 細胞のホモログであり、抗腫瘍活性や大量のサイトカイン産生能があり癌や自己免疫疾患など多くの病態に関与する事が予想されている細胞集団である。我々は、この細胞集団を CD4/CD8 の表現型で分けて解析した過程で、新規の亜集団 CD8+V α 24NKT を同定した。CD8+V α 24NKT 細胞は、DN, CD4+NKT 細胞と同様に腫瘍細胞株に対し細胞障害活性を持っていた。また、DN, CD4+V α 24NKT 細胞が IFN- γ , IL-4 を大量に産生するのに対し、CD8+V α 24NKT 細胞は IFN- γ のみを産生し IL-4 の産生は認められなかった。今後、これら亜集団の生理的或いは病的意義を研究し、V α 24NKT の亜集団を利用した癌に対する免疫細胞療法の開発研究を実施する予定である。

A. 研究目的

マウス V α 14NKT 細胞は、抗腫瘍活性を持つ事が示されており、また逆に CD4+V α 14NKT 細胞は腫瘍特異的 CTL の増殖を抑えその抗腫瘍活性を抑制するという報告も有る。いずれにしても V α 14NKT 細胞は腫瘍免疫に深くかかわっていると考えられる。また、V α 14NKT 細胞は大量の IFN- γ や IL-4 等のサイトカインを産生することが知られており免疫調節に重要な細胞集団であると思われる。このヒトホモログが V α 24NKT 細胞である。V α 24NKT 細胞に関しては未だ不明な点が多い。今回我々はこの V α 24NKT 細胞を解析し、これを利用した癌をはじめとする疾患に対する免疫細胞療法を検討した。

B. 研究方法

健康人末梢血より単球を IL-4+GM-CSF にて培養し樹状細胞様とする。5日間培養後、 α GalCer を添加し自己リンパ球と混合培養する。その後、V α 24 でソートし同様の刺激を繰り返す。その後 CD4/CD8 で分離し、CD4-CD8- (DN), CD4+, CD8+ V α 24NKT 細胞を樹立する。これら集団の TCR α 鎖、CD1d 拘束性、細胞障害活性、サイトカイン産生能を調べる。また、健康人末梢血中の V α 24NKT 中の各分画を調べ *in vitro* にて樹立した各 NKT の counterpart が *In vivo* でも存在する事を示す。また疾患により NKT 数が変化している事をアトピー性皮膚炎患者で示す。

C. 研究結果

上記の方法により健康人3名より、DN, CD4+, CD8+V α 24NKT をそれぞれ樹立する事ができた。特に、CD8+V α 24NKT は現在までに報告されていない新規の亜集団である。これらはいずれもほぼ同様の性質を持っていた。すなわち Invariant TCR α 鎖(V α 24-J α Q)を持ち、V β 11 を使用していた。また CD161(NKRP1A)の NK レセプターを発現していた。さらに CD1d に拘束され α GalCer (糖脂質)を認識した。また、U937 等の腫瘍細胞株に対し細胞障害活性を持つが、NK 活性 (K562 に対する細胞障害活性)は認められなかった。サイトカイン産生パターンに関してはそれぞれの亜集団が異なったパターンを示した。すなわち、CD4+V α 24NKT は IFN- γ および IL-4 を大量に産生し、また、IL-10 を産生

した。一方、CD8+V α 24NKT は、IFN- γ は産生するが Th2 型のサイトカイン産生はわずかであった。また DN V α 24NKT は両者の中間の性質を示した。また、これらの亜集団が末梢血よりえた fresh なリンパ球にも存在する事が分かった。また、アトピー患者においては末梢血中の V α 24NKT が著減しておりこれは CD4-V α 24NKT が減っているためである事が確認された。

D. 考察

V α 24NKT 細胞には、DN, CD4+, CD8+の亜集団が存在するが *in vitro* での抗腫瘍活性に関しては明らかな差は認められていない。しかし、そのサイトカイン産生パターンがそれぞれの分画で異なるため *In vivo* における抗腫瘍活性は異なる事が予想される。アトピー患者では CD4-V α 24NKT が減少している事が分かった。今後、これら亜集団の生理的或いは病的意義を研究し、V α 24NKT の亜集団を利用した癌に対する免疫細胞療法の開発研究を実施する予定である。

E. 結論

ヒト V α 24NKT 細胞を亜集団で解析しその過程で、CD8+V α 24NKT 細胞を見いだした。今後これらの細胞の生理的或いは病的意義を解明し、癌に対する免疫細胞療法に発展させたいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Juji T, Hirai H. Analysis of human V α 24+CD8+ NKT cells activated by α -galactosyl ceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 168:3140-3144, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

ゲノム解析と腫瘍免疫細胞療法の研究
分担研究者：贄田美江（株式会社メディネット・分子免疫学研究所・主任）

研究要旨： α -Galactosylceramide に特異的に反応する $V\alpha 24NKT$ 細胞の抗腫瘍効果については、*in vitro* の系で証明してきたが、本年度は α -galactosylceramide をパルスした樹状細胞（DC）をがん患者に投与することにより、副作用なく、 $V\alpha 24NKT$ 細胞の活性化と増殖が *in vivo* で観察されるかを確認する Phase 1 study を行った。投与した患者総てに副作用なく、8名中7名で、 $V\alpha 24NKT$ 細胞の増殖がおこるということが明らかとなった。

A. 研究目的

α -galactosylceramide をパルスした樹状細胞（DC）をがん患者に投与して、副作用なく $V\alpha 24NKT$ 細胞の活性化と増殖が起こるかを確認する。併せ、投与前後の免疫学的変化を観察する。

B. 研究方法

α -galactosylceramide をパルスした樹状細胞（DC）を8名のがん患者に、 $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ 個、4回2週間の間隔で、静脈または皮内注射して $V\alpha 24NKT$ 細胞の末梢血液中の細胞数の変化を測定した。また、*in vitro* の系で抗腫瘍効果をもたらす最終的 effector cells はNK細胞と考えられているので、NK細胞数の変化と、K562に対する、細胞傷害活性を測定した。さらに、T細胞とNK細胞の細胞内サイトカインを flow cytometry を用いて、血清中のサイトカインはELISA法で測定した。倫理面の配慮：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えた。Phase 1 study に関しては、オーストラリアの Royal Brisbane Hospital で行ったが、病院内の倫理委員会の承認をえた。

C. 研究結果

- 1) 8名中3名で、軽い発熱が観察されたものの、考慮すべき副作用は観察されなかった。
- 2) 8名中5名で、末梢血中の $V\alpha 24NKT$ 細胞の細胞数の増加が観察された。また、この内2名で、NK細胞の細胞数の増加と、K562に対する細胞傷害活性の増加も確認できた。
- 3) $V\alpha 24NKT$ 細胞とNK細胞の細胞数の増加が見られた患者1名では、細胞内サイトカインと血清中のIFN γ が増加していることが確認できた。

D. 考察とE. 結論

α -galactosylceramide をパルスした樹状細胞（DC）治療は、がん患者に対して、安全な治療方法で、末梢血中の $V\alpha 24NKT$ 細胞の細胞数の増加をもたらすことが確認できた。 $V\alpha 24NKT$ 細胞の活性化と増殖がNK細胞数の増加と機能的変化をもたらしているかについては、更なる検討が必要である。 α -galactosylceramide をパルスした樹状細胞

（DC）の1回の投与細胞数を上げることにより、副作用なく $V\alpha 24NKT$ 細胞の細胞数の更なる増加がもたらされるか、また、臨床的に抗腫瘍効果が観察されるかを確認することが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, et al. TRAIL expression by activated human CD4+ $V\alpha 24NKT$ cells induces *in vitro* and *in vivo* apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 97:2067-2074, 2001
2. Kikuchi A, Nieda M, Nicol A, et al. *In vitro* anti-tumor activity of α -galactosylceramide-stimulated human invariant VaNKT cells against melanoma. *Br J Cancer*. 85:741-746, 2001
3. Lapteva N, Ando Y, Nieda M, et al. Profiling of genes expressed in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells using cDNA expression array. *Br J Hematol*. 114:191-197, 2001
4. Lapteva N, Nieda M, Ando Y, et al. Gene expression analysis in human monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 289:531-538, 2001
5. Lapteva N, Nieda M, Ando Y. Expression of rennin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun*. 285:1059-1065, 2001

2. 学会発表

Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray Lapteva N, Nieda M, Ide K et al. (The 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, 2001, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Imai Y, Kurokawa M, Izutsu K, Hangaishi A, Maki K, Ogawa S, <u>Chiba S</u> , Mitani K, <u>Hirai H</u> .	Mutations of the Smad4 gene in acute myelogenous leukemia and their functional implications in leukemogenesis.	Oncogene	20	88-96	2001
Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, Maki K, Mitani K, <u>Hirai H</u> .	The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor β signaling.	Blood	97	2815-2822	2001
Shimizu K, <u>Chiba S</u> , Saito T, Kumano K, Takahashi T, <u>Hirai H</u> .	Manic fringe and lunatic fringe modify different sites of the Notch2 extracellular region, resulting in different signaling modulation.	J Biol Chem	276	25753-25758	2001
Kumano K, <u>Chiba S</u> , Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, <u>Hirai H</u> .	Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression.	Blood	98	3283-3289	2001
<u>Nieda M</u> , Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Lapteva N, Tanaka Y, Tokunaga K, Suzuki K, Kayagaki N, Yagita H, <u>Hirai H</u> , Juji T.	TRAIL expression by activated human CD4+V α 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells.	Blood	97	2067-2074	2001
Lapteva N, Ando Y, <u>Nieda M</u> , Hohjoh H, Okai M, Kikuchi A, Dymshits G, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K.	Profiling of genes expressed in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells using cDNA expression array.	Br J Haematol	114	191-197	2001
Lapteva N, <u>Nieda M</u> , Ando Y, Nicol A, Ide K, Yamaura A, Hatta-Ohashi Y, Egawa K, Juji T, Tokunaga K.	Gene expression analysis in human monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and α -galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells.	Biochem Biophys Res Commun	289	531-538	2001
Lapteva N, <u>Nieda M</u> , Ando Y, Ide K, Hatta-Ohashi Y, Dymshits G, Ishikawa Y, Juji T, Tokunaga K.	Expression of renin-angiotensin system genes in immature and mature dendritic cells identified using human cDNA microarray.	Biochem Biophys Res Commun	285	1059-1065	2001
<u>Nieda M</u> , Kikuchi A, Nicol A, Koezuka Y, Ando Y, Ishihara S, Lapteva N, Yabe T, Tokunaga K, Tadokoro K, Juji T.	Dendritic cells rapidly undergo apoptosis in vitro following culture with activated CD4+ V α 24 natural killer T cells expressing CD40L.	Immunology	102	137-145	2001

IV. 研究成果の刊行物・別刷

20010459

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。