

20030227

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

免疫系の老化をターゲットにした
細胞療法に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 中山俊憲

平成16(2004)年4月

厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

免疫系の老化をターゲットにした細胞療法に関する研究

(研究課題番号:H13-長寿-005)

平成 15 年度
総括研究報告書

平成 16 年 4 月

.....研究組織.....

(主任研究者) 中山 俊 憲

千葉大学大学院医学研究院 教授

目 次

I. 総括研究報告書	中山俊憲	2
II. 研究成果の刊行に関する一覧表		22
III. 研究成果の刊行物・別刷		25

総括研究報告書

免疫系の老化をターゲットにした細胞療法に関する研究

主任研究者 中山 俊憲 千葉大学大学院医学研究院・教授

免疫系の老化は、T細胞の機能異常が最も顕著にみられ、加齢に伴って病原微生物に対するT細胞依存性の免疫反応が効率よく誘導できなくなる。事実、65歳以上の剖検時での直接の死因の第一位は感染症である(厚生省)。T細胞が効率よく病原微生物に対して免疫反応を起こすためには、異なったリンホカインを産生するTh1またはTh2タイプのメモリーT細胞にバランスよく機能分化する必要がある。本研究で我々は、老化マウスではTh2細胞の分化が障害を受け、Th2依存的なサイトカインの産生や抗体産生が低下していることを明かにした。

また、最近、我々の研究室で発見された新しいリンパ球分画NKT細胞は、元々数が少ないために解析が遅れていたが、Th1/Th2細胞の分化調節に重大な役割を果たしていることが分かった。また、感染免疫、自己免疫疾患の発症抑制、ガン免疫などにも重要であることも明らかになった。このNKT細胞は加齢とともに激減し、60才以上のヒトでは、ほとんど検出できない。また、いくつかの自己免疫疾患の患者やがん患者でもその数は、激減している。1997年にこの細胞のみを特異的に活性化させる糖脂質(α -GalCer)が我々の施設で発見され、これを用いてヒトのNKT細胞を*in vitro*で培養し、これまでに2週間で100倍程度に増殖させることが可能になった。

本研究では、免疫系の老化に伴うT細胞及びNKT細胞依存性の免疫能の低下を防止することを目的とし、老化にともなうT細胞の機能変化を明かにするとともに、老化とともに激減するNKT細胞に焦点をあてた細胞療法に関する基盤研究を行う。これまでに自己のNKT細胞を*in vitro*で増やして細胞移入する、または活性化した樹状細胞に糖脂質(α -GalCer)をパルスして移入し、生体内のNKT細胞を効率よく増殖させる、などの手法を確立してきた。NKT細胞に焦点をあてた細胞療法に関する臨床研究計画は、千葉大学医学部の倫理委員会で承認されている。米国FDAの細胞治療指針に従った細胞調整を行って、Phase Iに相当する研究を平成13年度から開始した。今年度末までに11例のPhase I相当の臨床研究が行われ、レベル1~3の結果がまとまった。

A. 研究目的

T細胞は外来抗原の刺激によって、末梢リンパ組織でそれぞれ異なったリンホカインを産生する Th1 または Th2 タイプのメモリー T細胞に分化する。感染症やアレルギーの病態と Th1 と Th2 のバランスには密接な相関関係がある。そこで、加齢にともなって見られる免疫不全はT細胞の機能不全、特に Th2 細胞の分化の低下がその原因になっていることを、マウスの動物モデルと用いた研究で明らかにした。その後、ヒトの細胞での解析を始めるとともに、細胞治療によって加齢にともなって見られる T細胞の機能不全を改善できないかどうかについて、研究を開始した。最近、我々の研究室で発見された新しいリンパ球分画 NKT 細胞は、元々数が少ないために解析が遅れていたが、Th1/Th2 細胞の分化調節、感染免疫、自己免疫疾患の発症抑制、ガン免疫などに重要な役割を果たしていることが分かってきた。この NKT 細胞は加齢とともに激減し、60 才以上のヒトでは、ほとんど検出できない。また、いくつかの自己免疫疾患の患者やがん患者でもその数は、激減している。1997 年にこの細胞のみを特異的に活性化させる糖脂質 (α -GalCer) が我々の施設で発見され、これを用いてヒトの NKT 細胞も *in vitro* で培養すると増殖や活性化が誘導できる。本申請研究では、免疫系の老化に伴う T細胞及び NKT 細胞依存性の免疫能の低下を改善することを旨として、老化にともなう T細胞の機能変化を明かにするとともに、老化とともに激減する NKT 細胞に焦点をあてた細胞療法に関する基盤研究を行う。

我々の計画している細胞療法は、自己の末

梢血リンパ球中の NKT 細胞を用い、*in vitro* で培養、増殖させた後体内に戻したり、自己の樹状細胞を *in vitro* で糖脂質 (α -GalCer) によって活性化させた後に体内に戻すため、GVH や拒絶反応などの心配はない。 α -GalCer 単独投与の Phase I の臨床試験は海外において行われており、今のところ毒性は非常に低いことが分かっている。我々の施設では、細胞調整は無菌室を用いて日常的に行っており、NKT 細胞療法のプロトコル樹立には、これまで行ってきた LAK 療法での経験が十分参考になる。さらに、今回は米国 FDA の細胞治療指針に従って細胞調整することを目指している。また、LAK 療法を行っているとき患者さんは風邪もひかないことが、経験的に分かっている。自己のリンパ球を用いた細胞療法は、補助療法として上手く使えば、特に高齢者での感染症予防、根治手術のあとの微小転移などをターゲットにしたがんの治療などに効力を発揮し、国民の保健医療のニーズに大いに貢献すると考えられる。

B. 研究方法

1) T細胞の機能解析に関する研究

1-1) マウス

5～6 週齢のマウスを若年マウス (Young) とし、8～12 カ月齢マウスを老齢マウス (Old) として実験に用いた。実験には、C57BL/6 または BALB/c マウスを用いた。すべてのマウスは SPF 条件下で飼育し、動物実験は千葉大学の動物実験指針に従って行い、倫理面に配慮した。

1-2) 脾臓 CD4 T細胞の機能解析

1-2-1)フローサイトメトリー解析

若年および老齢マウスの脾臓細胞を fluorescein isothiocyanate (FITC) または phycoerythrin (PE) で標識された抗体を用いて、氷上で 30 分間静置して細胞を染色し、フローサイトメーターで解析した。

1-2-2) Proliferation assay

脾臓から CD4 T 細胞をパニング法により精製し、固相化した抗 T 細胞抗原レセプター抗体 (H57-597) で 40 時間刺激し、最終 16 時間におけるトリチウム標識チミジンの取り込み量を測定した。

1-2-3) Cell division assay

脾臓から精製した CD4 T 細胞を CFSE で標識し、IL-12 または IL-4 存在下で固相化抗体により T 細胞抗原レセプターを刺激した。3 日後、フローサイトメーターで解析し、細胞分裂回数を測定した。

1-3) 細胞内カルシウム濃度の上昇

C57BL/6 マウスの脾臓から CD4 T 細胞を精製し、遊離カルシウムイオンと結合能をもつ Indo-1 を細胞内に取り込ませた。T 細胞抗原レセプターと CD4 分子に対するビオチン化抗体を結合させた後、アビジンを加えて抗体を架橋することにより CD4 T 細胞を刺激した。細胞刺激後の細胞内カルシウム濃度の上昇をフローサイトメーターを用いて経時的に測定した。

1-4) IL-4 レセプターを介したシグナル伝達分子のリン酸化

C57BL/6 マウスから脾臓を摘出し、赤血球を

除去した後、抗 CD8 抗体および抗 CD44 抗体を用いてパニングを行い、ナイーブ CD4 T 細胞を調製した。抗 T 細胞抗原レセプター抗体、IL-2、IL-4 を培地中に添加して 2 日間培養した。細胞を洗浄し、サイトカインを含まない培地中で 8 時間培養した後、IL-4 を添加して 10 分間刺激した。刺激後、細胞を溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動とリン酸化した Jak1、Jak3、Stat6 に対する抗体を用いてイムノブロットを行い、IL-4 レセプターからのシグナルを伝達する分子のリン酸化レベルを調べた。

1-5) Ras/MAPK カスケードの活性化

C57BL/6 の若年および老齢マウスから脾臓を摘出し、赤血球を除去した後、抗 CD4 モノクローナル抗体を用いた MACS sorting により CD4 陽性 T 細胞を精製した。CD4 T 細胞を抗 T 細胞抗原レセプター抗体 (H57-597) で処理した後、37°C 条件下で抗ハムスター Ig 抗体を用いて抗 T 細胞抗原レセプター抗体を架橋することにより T 細胞抗原レセプターを刺激した。3~30 分間刺激した後、細胞を溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動とイムノブロットを行って、Erk1 および Erk2 のリン酸化レベルを調べた。

1-6) ナイーブ CD4 T 細胞のメモリー細胞への分化

OVA を特異的に認識する T 細胞抗原レセプタートランスジェニックマウスである DO. 11. 10 マウスの脾臓細胞から sorting によりナイーブ CD4 T 細胞を精製した。フローサイトメーターで解析したところ、98% 以上が目的とするナイーブ T 細胞であった。得られ

たナイーブ CD4 T細胞を放射線照射した BALB/c マウスの抗原提示細胞とともに、抗原ペプチドと IL-4 または IL-12 を添加した培地中で5日間培養し、Th1 あるいは Th2 タイプのメモリーT細胞へと分化させた。培養後、細胞を固定し、細胞内の IFN γ と IL-4 を標識した特異的抗体で染色し、フローサイトメーターで解析した。

1-7) Th2 メモリーT細胞への分化条件下における GATA-3/c-Maf の発現誘導

BALB/c マウスの脾臓細胞からナイーブ CD4 T細胞を調製し、抗T細胞抗原レセプター抗体、IL-4 および抗 IL-12 抗体の存在下で5日間培養し、Th2 メモリー細胞へ分化させた。培養後、細胞を溶解し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動とイムノブロットにより GATA-3 と c-Maf の発現量を調べた。

1-8) 抗原刺激による in vitro でのサイトカイン産生能

BALB/c の若年および老齢マウスに対して、day 0 および day 7 に 1 mg 水酸化アルミニウムゲルを含む 100 μ g の OVA を免疫した。Day 14 に各マウスから脾臓を摘出し、赤血球を除いた脾細胞を in vitro において 100 μ g/ml OVA とともに3日間培養して抗原刺激した。3日後、培養上清を回収し、上清中に含まれる IFN γ と IL-5 の濃度を ELISA 法により測定した。

1-9) OVA (chicken egg albumin) の免疫と血清 Ig レベルの測定

BALB/c の若年および老齢マウスに対して、day 0 および day 7 に 1 mg の水酸化アルミ

ニウムゲルを含む 100 μ g の OVA を免疫し、day 14 における血清 Ig レベルを ELISA 法により測定した。

1-10) 喘息モデルにおける肺への炎症細胞浸潤

BALB/c の若年および老齢マウスに対して、day 0 および day 7 に 4 mg の水酸化アルミニウムゲルを含む 250 μ g の OVA を免疫し、day 14 および day 16 に 10 mg/ml の OVA 溶液を 30 分間吸入させて喘息モデルを誘導した。Day 18 に肺洗浄を行い、得られた浸潤炎症細胞を染色して各炎症細胞の数を数えた。

2) NKT 細胞を用いた細胞療法に関する研究

2-1) NKT 細胞療法 Phase I 相当研究のプロトコールの確立

NKT 細胞療法 Phase I プロトコールの確立をめざし検討を行った。これは細胞調整を米国 FDA の細胞調整基準を遵守したもので、かつ GMP 基準を尊重した品質管理、品質保証を行う点が特徴である。 α -GalCer パルス樹状細胞投与の安全性評価を行うための Phase I 試験を 13 年度から 14 年度にかけて行った。

方法の概要を以下に示す。

Primary endpoint は安全性の評価（本治療との因果関係が否定できない有害事象を検討する）であり、Secondary endpoint は特異的免疫応答性の評価（免疫学的検査を実施し、各測定値の変化を検討する）に置いた。

患者群の適応基準としては、生検もしくは手術で非小細胞肺癌と確認された切除不能進行期肺癌もしくは肺癌術後再発症例で、年齢が 20 歳から 80 歳、Performance status が 0 ~2 であること、及び下記の検査値を満たし

ている症例(登録前4週間以内の測定結果)。白血球数 $\geq 3,000/\mu\text{L}$ 、血小板数 $\geq 75,000/\mu\text{L}$ 、血清クレアチン $\leq 1.5\text{mg/dL}$ 、総ビリルビン $\leq 1.5\text{mg/dL}$ 、AST(GOT)、ALT(GPT) $\leq 2.5\text{X}$ 基準値上限。本人及び代諾者からの文書による同意が得られており、末梢血にNKT細胞が存在する症例(10個以上/末梢血1ml)。

除外基準としては、本臨床研究に参加する6週以内に化学療法あるいは放射線療法を施行しているか、予後が6ヶ月に満たないと考えられる症例。活動性の感染症を有するか肝炎及びその既往を有する症例。HBs抗原、HCV抗体、HIV抗体又はHTLV-1抗体が陽性の症例。同時性重複癌の症例もしくは重篤な心疾患のある症例(NYHA Class III以上)。併用薬としてコルチコステロイドを使用している症例。妊娠あるいは妊娠の可能性のある女性および授乳期の女性。以上が除外項目である。

臨床研究期間中の調査・観察・検査項目としては、患者背景として年齢、生年月日、性別、身長、体重、初診年月日、臨床診断名、臨床病期、組織学的分類、前治療の有無、内容、合併症、既往歴、臨床症状、本人及び代諾者の同意の有無を記載することを設定した。一般的臨床所見として、脈拍、血圧、体温、呼吸状態、皮疹をチェックする。臨床検査項目として血液学的検査では白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、末血像、血液生化学検査では総蛋白、アルブミン、尿素窒素、クレアチニン、電解質、総ビリルビン、AST(GOT)、ALT(GPT)、LDH、ALP、 γ -GTP、CRP、尿検査では蛋白、糖、潜血、ウロビリノーゲン、沈査を各細胞投与前後で検査することを設定した。その他心電図、一般肺機能検査を細胞投与前に施行しておく。

免疫学的検査項目として末梢血NKT細胞数を投与前及び各樹状細胞投与後、観察期間中は毎週施行する。NKT細胞のサイトカイン産生能としてIFN- γ 産生能をNKT細胞数の検査とともに検査する。樹状細胞は調製後、投与前に有核細胞数、細胞生存率を算出するとともに、調整した樹状細胞の培養液の汚染がないことを確認するために工程内無菌試験、エンドトキシン定量をそれぞれ施行し無菌性を確保する。

本臨床研究のデザインは、容量漸増法(容量3水準)によるオープン試験であり、その具体的手順として、アフエレーシスを実施して単核球分画採取後、1)樹状細胞(DC)の患者アフエレーシス細胞からの培養、2)培養したDCへの体外での α -GalCer(KRN7000)のパルス、3)パルスされたDCの同患者への輸注(1週間間隔で2回投与)、の3段階よりなる。上記操作およびその後の3週間の観察期間をもって1クールとして実施。原則とし1クール目に重篤な有害事象の発生がなければ再度アフエレーシスを行い、もう1クール施行する(計2クール)。また、 α -GalCerをパルスした細胞の免疫反応に対する効果を見るために、1クール目には α -GalCerパルス細胞の投与に先立ち、 α -GalCerパルス処理なしの細胞をコントロールとして投与し、その免疫反応への影響を測定する。

具体的な細胞調整方法は以下の様である。

肺癌患者から、lymphapheresis(Spectra、COBE社、附属病院輸血部)により単核球を分離、採取する。得られたアフエレーシス液をOptiPrep(Nycomed Amersham)溶液を用いて遠心分離して単核球細胞を回収する(投与

分を除いた単核球細胞は凍結保存)。分離した単核球細胞を 800 U/ml GM-CSF 500 U/ml IL-2 100 U/ml を添加した 2.5%アルブミン添加 AIM-V (GIBCO-BRL) 培地にて培養する。投与前日に、NKT 細胞の特異的リガンドである α -GalCer (KRN7000) 100ng/ml を加えてさらに培養し、 α -GalCer パルス DC とする。

培養終了後、2.5%アルブミン加生理食塩水に懸濁して3回の洗浄処理(細胞の懸濁、遠心分離処理及び遠心上清の除去より成る工程)を行った後、2.5%アルブミン加生理食塩水に懸濁する。最終検査(細胞数、生存率、エンドトキシンの測定)で合格した細胞調製品を同一患者へ輸注する。

凍結保存した単核球細胞は、投与1週間前に解凍し、GM-CSF 及び IL-2 存在下にて培養を開始し、投与前日に α -GalCer を加え培養し、 α -GalCer パルス DC を調整する。

細胞処理で使用する薬剤は安全性の観点からすべて GMP グレードのものを用いる。体外で用いられるものについては、細胞は洗浄後投与されるため、計算上患者へ直接投与される使用薬剤の量は極めて低く臨床的な直接作用は少ないと予想されたが、実際測ったところ、6.25ng/ml 以下であった。以下の GMP グレードのものを使用した。

α -GalactosylCeramide (KRN7000)

KRN7000 は沖縄産の海綿 *Agelas mauritianus* より抗腫瘍活性物質として発見されたアゲラスフィンをリード化合物として開発された化合物で、樹状細胞 (DC) 上に発現している MHC クラス I 様分子、CD1d に提示され NKT 細胞を特異的に活性化する。KRN7000 の投与により癌の転移巣増殖を抑制し、担癌マウスの生

存率を延長させた。製造元：キリンビール (株)

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade。

安全性：各種動物 (マウス、ラット、イヌ、サル) を用いた KRN7000 の I.V. 投与の安全性試験において、試験した最大の用量である 2200mg/kg まで死亡する動物や全身性の反応を示すような毒性は認められなかった。イヌを用いた 220～2200 mg/kg 用量の I.V. 単回投与の毒性試験においてアナフラキシー様症状が観察されたが、これは剤型中の界面活性剤 (ポリソルベート 20) の影響と考えられた (イヌにおいては、この種の界面活性剤に感受性が高いことが報告されている)。また、固形癌患者を対象とした KRN7000 の I.V. 投与による Phase I 試験においては、50～4800 mg/m² の用量において、全 24 症例中 Grade3 の副作用として全身倦怠感 (3 例)、発熱 (1 例)、高血圧 (1 例)、咽頭痛 (1 例) が観察された。

GM-CSF

アミノ酸 127 個からなる糖タンパクで、生体内では主に活性化 T 細胞より産生されるほか、内皮細胞、線維芽細胞からも産生される。骨髓細胞で好中球、マクロファージ、好酸球のコロニーを形成する。また、末梢血単核球に作用して樹状細胞への分化を誘導する作用があり、DC 療法では一般的に用いられている薬剤である。

製造元：GeneTech Co., Ltd, China (華北製薬)

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade

安全性:GM-CSFを5~10 mg/kg/day用量でI. V. 或は S. C. 投与した場合に、20~30%の患者で発熱、筋肉痛、倦怠感、注射部位反応等が見られた。

IL-2 (イムネース Imunace)

アミノ酸 134 個からなるポリペプチドで、T 細胞増殖因子として同定された。主として T 細胞や NK 細胞に結合し、活性化することにより、細胞傷害能の高いキラー細胞を誘導し腫瘍を傷害すると考えられている。更に B 細胞やマクロファージにも結合し、免疫を賦活する。

製造元：塩野義製薬株式会社

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade

安全性:IL-2 は、適応症として血管肉腫の単独承認を受け、第一選択剤として認知されている。1 日 70 万単位を投与した場合の主な副作用として、発熱 (71.9%) 悪寒・戦慄 (35.5%) 倦怠感 (27.1%)、臨床検査値の異常変動として好酸球増多、GOT 上昇、GPT 上昇が見られた。

培地 AIM-V

製造元 GIBCO-BRL

品質：Good Manufacturing Practice (GMP) grade

安全性：無血清合成培地。無菌性試験、エンドトキシントテスト済み。

OptiPrep

製造元：Nycomed Amersham

安全性：エンドトキシントテスト済み、滅菌溶液

生理食塩水

製造元：大塚製薬

品質：指定医薬品。注射用医薬品の希釈・溶解に用いられるもの。

ブミネート 25% (人血清アルブミン)

本剤は、血液を原料として FDA で認可された方法により HBs 抗原陰性、HCV 抗体陰性、HIV-1 /HIV-2 抗体陰性を確認された純度 96%以上のアルブミン濃度 25W/V%のアルブミン製剤である。本剤の製造工程において、HIV をはじめとする各種ウイルスが除去・不活化されることが確認されている。本臨床研究においては、生理食塩水に最終 2.5%となるように添加した 2.5%アルブミン加生理食塩水として、調製細胞の洗浄及び細胞を懸濁して輸注するために使用するほか、2.5%アルブミン加メディウムとして細胞培養に用いる。

製造元：バクスター

品質：指定医薬品

安全性：成人 1 回 20~50 ml 投与した場合の副作用としては、ショック（呼吸困難、血圧低下、チアノーゼ等）、過敏症（発熱、顔面紅潮、蕁麻疹等）、悪寒、腰痛等がみられることがある。但し、使用成績調査等の副作用発現効率が明確となる調査は実施されていない。

セルバンカー 2

本試薬は、アフレーシスと密度勾配遠心分離操作で回収した細胞を長期に渡って凍結保存するために使用する。血清成分等のタンパ

ク成分を含まない無血清タイプ。

製造元：日本全薬工業、販売元：十慈フィールド株式会社

安全性：品質保証として、無菌試験（細菌、真菌、マイコプラズマ混入なし）、迷入ウイルス否定試験、化学試験（pH、エンドトキシン）済み。

投与する細胞は 2.5%アルブミン加生理食塩水に浮遊させた後、生細胞数を計算し、末梢静脈経由にて 15 分以上かけて患者に輸注する。

各 level における投与量はレベル 1 では 5.0×10^7 個/m²、レベル 2 では 2.5×10^8 個/m²、レベル 3 では 1.0×10^9 個/m²、と決定した。次レベルへの移行条件は、研究責任医師が各レベル最後の評価可能症例 2 クール終了時の安全性に関するデータをもとに、次レベルへの移行を以下の条件に基づいて決定し、細胞治療効果安全性評価委員会に研究の継続について諮問する。

細胞治療効果安全性評価委員会は、独自に研究責任医師の判断の妥当性について検討し、検討結果を研究責任医師へ答申する。各レベルの症例数は、評価可能症例として各 3 例ずつとする。少なくとも、最初の患者の 1 クール目投与後 2 週間以内に DLT (dose limiting toxicity) が観察されなかった場合、次の 2 患者のエントリーを可能とする。ただし、DLT が観察された場合は、同一の用量をさらに 3 例追加して評価する。その場合、患者は 2 週間の間隔をおいて段階的にエントリーする。

2/6 例以上に Grade 3 以上の本治療と因果関係の否定できない有害事象を認めた場合は、次投与量へは移行せず、その投与量を MTD

(maximum tolerated dose) とする。

なお、何らかの問題が生じ、研究責任医師が研究の継続について検討を要すると判断した場合は、細胞治療効果安全性評価委員会を開催する。細胞治療効果安全性評価委員会は、諮問内容について検討し、研究の継続に対する答申を回答する。

臨床研究に参加する被験者の安全を守るために、臨床研究期間中に自覚症状、他覚所見、臨床検査等で判明した有害事象の全てについて詳細に内容を調査し（有害事象の名称、発現日時、転帰、細胞投与の継続性、併用療法の有無と内容、治療の有無、内容、入院の有無、入院期間の延長の有無、重症度）症例報告書に記載する。また細胞投与との因果関係につき 5 分類で判定する（明らかに関連あり、多分関連あり、関連の可能性あり、多分関連なし、関連なし）。発現した有害事象のうち、因果関係が否定できないもの（因果関係：明らかに関連あり、多分関連あり、関連の可能性あり）を副作用として取り扱う。なお、副作用の追跡調査は、可能な限り本治療前の状態に回復するまで行う。

倫理面への配慮

動物実験は千葉大学の実験動物委員会の定める規定を遵守して行った。ガン患者での NKT 細胞の細胞移入（千葉大学大学院医学研究院胸部外科学、藤沢武彦教授との共同研究）はすでに千葉大学医学部で倫理委員会の承認を得ている。免疫系の老化をターゲットにした細胞療法に関する研究計画は、具体的なプロトコルが確立した後、千葉大学医学部での倫理委員会に申請する予定である。

C. 研究結果

1) T細胞の機能解析に関する研究

1-1) 脾臓 CD4 T細胞の機能解析

はじめに若年マウスと老齢マウスの脾臓 CD4 T細胞について、基本的な形態的、機能的性質を比較した。抗 CD4、抗 CD8 抗体で染色し、フローサイトメーターで解析したところ、CD4 T細胞の割合にわずかな差がみられたが、全体の染色像として大きな差は認められなかった。また T細胞抗原レセプターや CD3 など、T細胞の機能発現に重要な役割を果たす細胞表面分子についても、発現レベルに大きな差は認められなかった。次に T細胞抗原レセプター刺激による増殖反応を比較したところ、老齢マウスでは若年マウスに比べ増殖反応が低下していた (図 1)。またナイーブ T細胞からメモリー T細胞への分化にともなう細胞分裂能を比較したところ、Th1 分化条件下、Th2 分化条件下のいずれにおいても、若年マウスと老齢マウスとの間で大きな差はみられなかった。

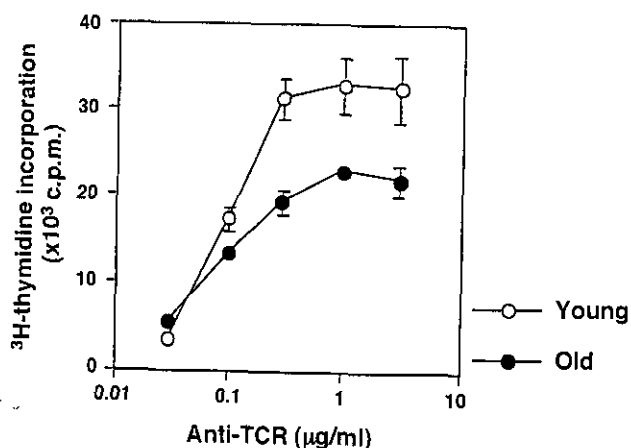


図 1 T細胞抗原レセプター刺激による増殖反応
脾臓から精製した CD4 T細胞を T細胞抗原レセプター刺激して増殖反応を比較したところ、老齢マウスでは若年マウスに比べ増殖反応が低下していた。

1-2) 細胞内カルシウム濃度の上昇

細胞内カルシウムイオンは、細胞外からのシグナルを核へ伝えるためのシグナル伝達分子として最も基本的でよく知られているものである。T細胞などのリンパ球においても、抗原レセプターからの刺激により細胞内カルシウム濃度は上昇し、細胞の活性化に不可欠なシグナル伝達分子である。そこでシグナル伝達系における加齢の影響を調べるために、はじめに抗原レセプターを介した刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇を比較した。その結果、若年マウスと老齢マウスとの間で大きな差は認められず、むしろ老齢マウスの方が若干反応性が高かった。このことから、シグナル伝達系のうち細胞内カルシウム濃度の上昇については、加齢による影響はないと考えられた。

1-3) IL-4 レセプターを介したシグナル伝達分子のリン酸化

T細胞の十分な活性化あるいは特異的な機能発現には、T細胞抗原レセプターからのシグナルに加え、サイトカインシグナルが重要であることが知られている。IL-4 レセプターシグナル伝達系では、これまでに Jak1、Jak3、STAT6 などの分子がリン酸化されてシグナルが伝わるということがわかっている。そこで、IL-4 レセプターを介したシグナル伝達における加齢の影響を検討した。はじめに IL-4 に対する反応性を上昇させるために抗 T細胞抗原レセプター抗体、IL-2、IL-4 の存在下で 2 日間培養を行い、サイトカインを除いてさらに 8 時間培養した後、IL-4 で 10 分間刺激し、シグナル伝達分子のリン酸化レベルを

調べた。その結果、老齢マウスでは Jak1、Jak3、STAT6 のリン酸化レベルが若年マウスに比べて低下しており、加齢にともなう影響が認められた。STAT6 は Jak1 や Jak3 によってリン酸化されることがわかっており、そのリン酸化レベルの低下は Jak1 や Jak3 のリン酸化レベルの低下によるものと考えられた (図 2)。

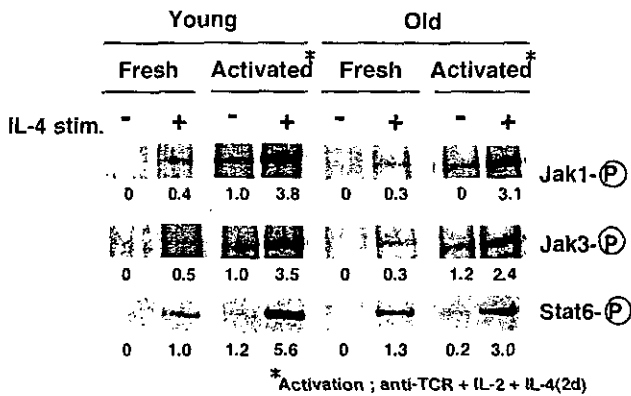


図 2 IL-4 レセプターを介したシグナル伝達分子のリン酸化

Th2 分化条件下で 2 日間培養後 IL-4 刺激し、IL-4 レセプターからのシグナルを伝達する細胞内分子のリン酸化レベルを調べた。老齢マウスでは Jak1、Jak3、STAT6 のリン酸化レベルが若年マウスに比べて低下していた。

1-4) Ras/MAPK カスケードの活性化

T 細胞抗原レセプターからのシグナル伝達系の 1 つとして Ras/MAPK カスケードが知られている。そこで Ras/MAPK カスケードの活性化レベルを比較するために、若年および老齢マウスの脾臓より CD4 T 細胞を精製し、T 細胞抗原レセプターを刺激した場合の Erk1 と Erk2 のチロシンリン酸化レベルを調べた。いずれのマウスも刺激 3 分後に Erk1、Erk2 のチロシンリン酸化レベルがピークに達し、その後ゆっくりと低下した。老齢マウスでは、Erk1、Erk2 ともリン酸化の上昇レベルが明らかに若年マウスより低く、またリン酸化さ

れた Erk 分子の割合も若年マウスに比べて低かった。このことから、加齢による Erk/MAPK カスケードの活性化の低下が認められた (図 3)。

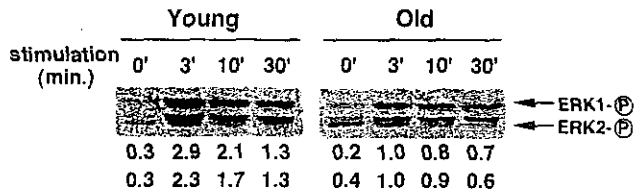


図 3 Ras/MAPK カスケードの活性化

脾臓から精製した CD4 T 細胞を T 細胞抗原レセプター刺激して Ras/MAPK カスケードのシグナル伝達分子のリン酸化レベルを比較したところ、老齢マウスでは若年マウスに比べリン酸化レベルが低下していた。

1-5) ナイーブ CD4 T 細胞のメモリー細胞への分化

ナイーブ CD4 T 細胞は、抗原刺激によりその一部が Th1 あるいは Th2 タイプのメモリー T 細胞へと分化することが知られている。その際には T 細胞抗原レセプターからのシグナルの他に IL-4 や IL-12 などのサイトカインシグナルが必須であることがわかっている。先の研究から老齢マウスではサイトカインシグナル伝達能の低下が認められたことから、サイトカインに依存したメモリー T 細胞への分化に影響があることが予想された。そこで、OVA を特異的に認識する T 細胞抗原レセプターのトランスジェニックマウスである DO. 11. 10 のナイーブ CD4 T 細胞を用いて、サイトカインの存在下で OVA の抗原ペプチドを添加し、メモリー T 細胞への分化能を調べた。抗原ペプチドと IL-4 を添加した Th2 分化条件下で比較したところ、老齢マウスでは Th2 細胞へ分化する細胞の割合が低下していた。

一方、抗原ペプチドと IL-12 を添加した Th1 分化条件下では、若年マウスと老齢マウスとの間で大きな差は認められなかった。抗原ペプチドのみを加えた場合には、抗原ペプチドの濃度依存的に分化が誘導されたが、老齢マウスでは特に Th2 細胞への分化が低下していた。また BALB/c background の DO. 11. 10 は、サイトカインを添加していない条件下では Th2 細胞へ優位に分化が進むことが知られているが、老齢マウスでは Th1 細胞への分化も認められた。これらの結果から、Th1 細胞への分化は加齢による影響を受けにくい、Th2 細胞への分化は加齢にともない低下することが明らかとなった (図 4)。

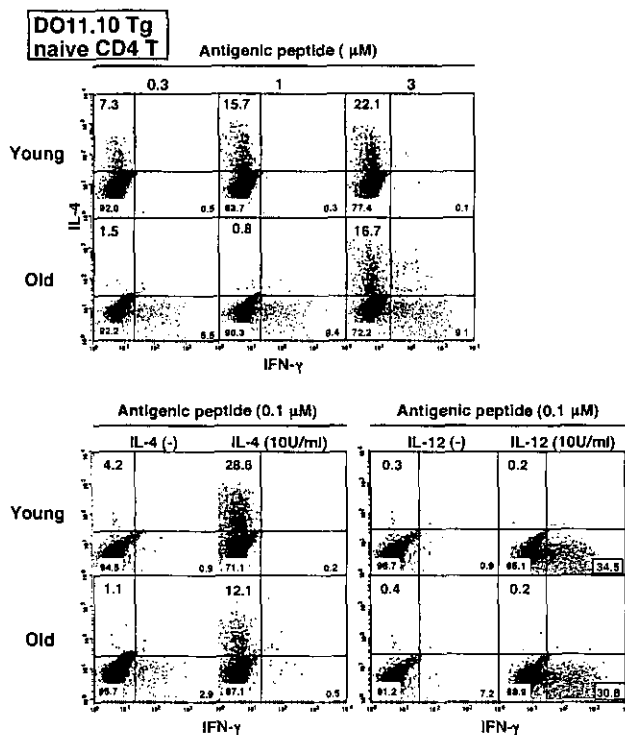


図 4 ナイーブ CD4 T 細胞のメモリー細胞への分化
OVA を特異的に認識する T 細胞抗原レセプタートランスジェニックマウスの脾臓細胞からナイーブ CD4 T 細胞を精製し、抗原ペプチドと IL-4 または IL-12 を添加した培地中で 5 日間培養して Th1 あるいは Th2 タイプのメモリー T 細胞へと分化させた。Th1 細胞への分化は加齢による影響を受けにくい、Th2 細胞への分

化は加齢にともない低下していた。

1-6) Th2 メモリー T 細胞への分化条件下における GATA-3/c-Maf の発現誘導

Th2 メモリー T 細胞が IL-4 や IL-5 などの Th2 細胞特異的サイトカインを産生するためには、それらの発現を誘導する転写因子として GATA-3 や c-Maf が重要な役割を果たすことが知られており、これまでにナイーブ T 細胞の Th2 細胞への分化にともない、これらの転写因子の発現が上昇することがわかっている。老齢マウスでは Th2 細胞への分化能の低下がみられたことから、その原因として Th2 サイトカインの発現を制御する転写因子の発現レベルに差があることが予想された。そこで Th2 細胞への分化条件下における GATA-3 および c-Maf の発現誘導能を比較した。その結果、老齢マウスではこれらの転写因子の発現誘導が低下していることが明らかとなった (図 5)。

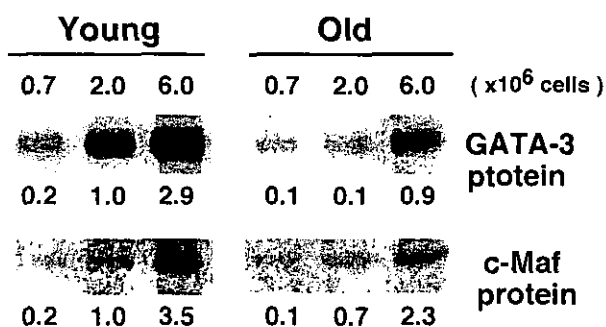


図 5 Th2 メモリー T 細胞への分化条件下における GATA-3/c-Maf の発現誘導

脾臓からナイーブ CD4 T 細胞を調製し、Th2 分化条件下で 5 日間培養した後、GATA-3 および c-Maf のタンパク発現誘導能を比較した。老齢マウスではこれらの転写因子の発現誘導が低下していた。

1-7) 抗原刺激による in vitro でのサイトカ

イン産生能

Th1 あるいは Th2 タイプの細胞に分化したメモリーT細胞は、それぞれ異なるサイトカインを産生することが知られている。老齢マウスでは、特に Th2 細胞への分化能の低下が認められたことから、抗原刺激に対するサイトカインの産生能に差があることが予想された。そこで OVA で2回免疫した若年および老齢の BALB/c マウスの脾細胞を取り出し、in vitro において OVA を添加して抗原刺激を行い、活性化したT細胞により産生されるサイトカインの量を測定した。その結果、主に Th1 細胞により産生される IFN γ の量については、差はみられなかったが、主として Th2 細胞により産生される IL-5 の産生は、老齢マウスで低下していた。このことから、老齢マウスでは Th2 依存的なサイトカインの産生が低下していると考えられた (図6)。

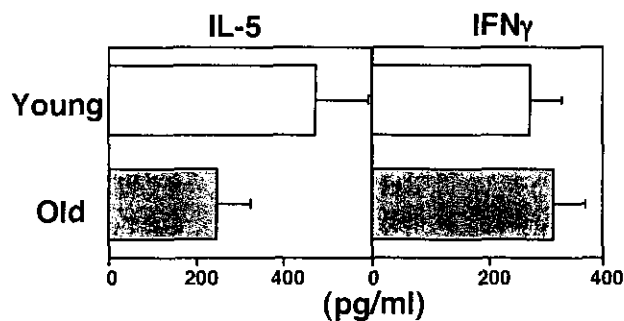


図6 抗原刺激によるサイトカイン産生能

OVA を免疫したマウスの脾細胞を抗原ペプチドで刺激し、活性化T細胞により産生されるサイトカインの量を測定した。老齢マウスでは Th2 依存的なサイトカインの産生が低下していた。

1-8)免疫したマウスでの血清 Ig レベル

次に Th2 細胞への分化能の低下と Th2 依存的な抗体産生能を調べるために、若年および老齢の BALB/c マウスを OVA で免疫し、それ

により誘導される Ig の血中レベルを比較した。若年マウス、老齢マウスとも OVA の免疫により血清中の Ig レベルの上昇がみられたが、老齢マウスでは若年マウスに比べてその誘導能が低く、加齢に伴う Ig 抗体産生能の低下が認められた。また、同じく Th2 に依存的な IgG1 についても、同様の傾向がみられた (図7)。

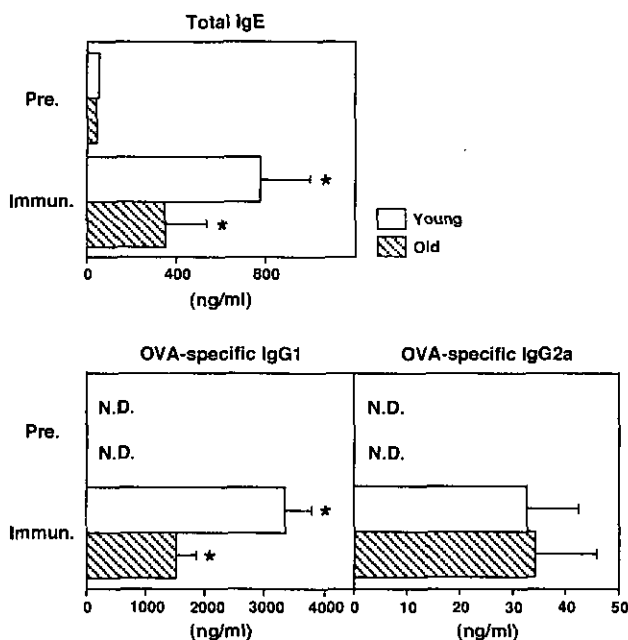


図7 OVA の免疫と血清 Ig レベル

OVA を免疫したマウスの血清 Ig レベルを調べたところ、老齢マウスでは Th2 依存的な IgE や IgG1 の抗体産生能の低下が認められた。

1-9)喘息モデルにおける肺への炎症細胞浸潤

OVA で免疫したマウスに OVA 溶液を吸入させて誘導する喘息モデルを用いて、生体内でのアレルギー反応における加齢の影響を検討した。喘息を引き起こしたマウスの肺洗浄を行い、その中に含まれる浸潤炎症細胞の割合を比較したところ、若年マウスでは好酸球が最も多かったのに対して、老齢マウスではリンパ球の割合が増加していた (図8)。

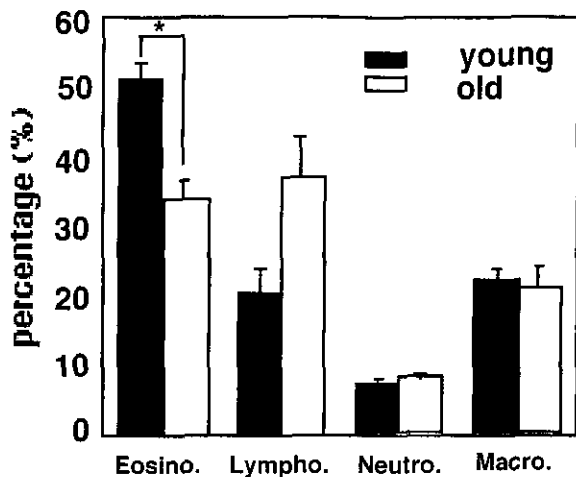


図8 喘息モデルにおける肺への炎症細胞浸潤

OVA で免疫したマウスに OVA 溶液を吸入させて誘導する喘息モデルを用いた。喘息を引き起こしたマウスの肺洗浄を行い、浸潤炎症細胞の割合を比較した。

2) NKT 細胞を用いた細胞療法に関する研究 2-1) NKT 細胞療法 Phase I 相当研究の結果

(I) primary end point としての安全性の評価 (本治療との因果関係が否定できない有害事象を検討する) のまとめ。

これまでに、投与細胞数が最小 ($5 \times 10^7 / m^2$) の Level 1 から開始し、平成 16 年 3 月までに Level 1 の 5 例、Level 2 の 3 例、Level 3 の 3 例を施行した。Level 1 の 2 例は原疾患の悪化のためプロトコール途中にて脱落となった。最終的に評価可能であった 3 例においては細胞投与に関連する重篤な有害事象 (NCI の Common Toxicity Criteria において Grade 2 を越える有害事象) は認められなかった。Grade 2 以下の有害事象としては、1 例で細胞投与直後の頭痛、顔面紅潮、2 例で血清中のカリウム上昇を認め、1 例で血清中のクレアチニン上昇を認めた。抗腫瘍効果の面では、2クール終了後に評価可能であった 3 例において No Change (NC) 1 例、Progressive Disease (PD) 2 例であった。細胞治療効果安全性評価委員会にレベルアップに関して諮問し、承認を受けた後、投与細胞数が $2.5 \times 10^8 / m^2$ の Level 2 を、3 例施行することを予定とし

て開始した。 α -GalCer パルス樹状細胞投与の安全性評価につき、投与細胞数が $2.5 \times 10^8 / m^2$ である Level 2 を施行し、これまでに 3 例を完了した。Level 2 においても細胞投与に関連する Grade 3 以上の重篤な有害事象は認めなかった。Grade 2 以下の有害事象としては、1 例では血清カリウム値の上昇、1 例で血清総ビリルビン値の上昇を認めた。これらの有害事象と細胞投与との間には関連性は認められなかった。投与細胞数が $1 \times 10^9 / m^2$ である Level 3 を施行し、これまでに 3 例を完了した。Level 3 においても細胞投与に関連する Grade 3 以上の重篤な有害事象は認めなかった。一過性の頭痛 1 例 (Grade 1) を認めた。また、1 コース中継続する全身倦怠感 1 例 (Grade 2) を認めた。この症例では、末梢血 NKT 細胞数の増殖が検出された。

(II) Secondary endpoint としての特異的免疫応答性の評価 (免疫学的検査を実施し、各測定値の変化を検討する) のまとめ。

Level 1 での α -GalCer パルス樹状細胞投与と末梢血 NKT 細胞数の変化および NKT 細胞特異的な IFN- γ 産生能の間には有意な相関を認めなかった。

Level 2 での α -GalCer パルス樹状細胞投与と末梢血 NKT 細胞数の変化および NKT 細胞特異的な IFN- γ 産生能の間にも有意な相関を認めなかった。Level 3 の 1 例 (2 例目の患者) に、 α -GalCer パルス樹状細胞投与と関連して、末梢血 NKT 細胞数の劇的な上昇を認めた。この 1 例は元々、肺癌患者の中では NKT 細胞が比較的多い患者 (0.04%) だった。ほかの 2 例は、少ない患者で、数の上での上昇は検出できなかった。末梢血 NKT 細胞数の劇的な上昇を認めた患者でも、3 回目、4 回目の α -GalCer パルス樹状細胞投与による末梢血 NKT 細胞数の上昇は見られなかった。

D. 考察

1) T細胞の機能解析に関する研究

本研究により、老齢マウスのT細胞の反応性の変化について、いくつかの興味深い現象が観察された。まず、アレルギーや細胞外の寄生虫感染などにおける生体防御を担っているとされるTh2細胞の分化が老齢マウスのT細胞では非常に低下していた。それにとまなうTh2サイトカインの産生も低下しており、またTh2に依存的な抗体の産生も低下していることが明らかとなった。

一方、細胞性免疫を担うと考えられている、Th1細胞の分化については変化が見られなかった。さらにTh1サイトカインの産生やTh1に依存的な抗体の産生についても変化は見られなかった。これらの結果は、老化に伴う生体防御機能の変化について、どのような感染に対する機能低下が顕著に現れるかを考える上で、重要である。

また、細胞内シグナル伝達については、特にRas/MAPKのカスケードの活性化に低下が見られ、TCRによる抗原認識後におこる細胞増殖に異常が生じている可能性が示唆されたが、抗TCR抗体によるT細胞の刺激に対する増殖反応は正常に起こっていた。老化マウスのT細胞で見られたカルシウム反応の上昇、Ras/MAPKのカスケードの活性化の低下がどのような意味を持つのか、今後検討が必要である。

2) NKT細胞を用いた細胞療法に関する研究

NKT細胞に関する研究では、NKT細胞の発見・腫瘍免疫分野での重要性など我々のグループは、世界に先駆けてマウス及びヒトでの研究成果を報告してきた。NKT細胞を特異的に活性化させる物質は現在のところ α -GalCerしか見つかっていない。NKT細胞数が加齢とともに激減することが、我々のヒトでの解析から明らかになり、自己のリンパ球をin vitroで増やし体内に戻してやる細胞療法によって高齢者での感染症やがんの補助療法に使うことは出来ないか、といった視

点で、NKT細胞をターゲットにした細胞療法の基礎研究を行ってきた。

2-1)NKT細胞療法 Phase I 相当研究

NKT細胞療法 Phase Iの研究に関しては、一人の患者の治療と経過観察に2ヶ月以上の日時がかかるうえ、レベルの上昇にはそれ以前のレベルでの安全性の確認と、細胞治療効果安全性評価委員会の承認という厳格なプロセスをへた上で臨床研究を行っている。これまでわずかに11例しか施行されていない理由はそこにある。さらに、本臨床研究では、米国FDAの細胞調整基準を遵守したやり方で、かつGMPレベルを尊重した細胞調整を行う点は厳格に遵守している。我々はこの点は非常に重要であると考えている。結果の項で述べたように、幸い、これまでに重篤な有害事象は現れていない。マウスを用いた動物実験では、level 3相当の細胞数での治療によって初めて、十分なNKT細胞の活性化と抗腫瘍効果が期待できるという基礎データがあり、これからデータが集積されるlevel 3での治療によって、どの様にNKT細胞免疫系が反応し、抗腫瘍効果を発揮してくるのか、期待をもって研究を続けている。

E. 結論

本研究によって、Th2細胞の分化が加齢にともなって非常に低下していること、TCRの下流のシグナル伝達系に特徴的な変化が生じていることなどがわかった。このように、老化に伴う生体防御機能の変化を理解する上で、いくつかの新知見が得られた。

これまでの研究で、人の細胞をin vitroで培養し、本人に戻すための手順などの基礎研究が完了した。いつも同じ活性の細胞の調整ができたこと、増殖効率が一定して細胞数の予測が可能になったこと、調整細胞の機能

の評価を適切に行うことなど、一連の細胞調整手法の樹立についての検討が終了した。現在までに行ったPhase I相当の研究において、特記する重大な有害事象は検出されていない。以上の成果をふまえ、NKT 細胞療法の基盤がある程度樹立されつつあると考えている。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Shimizu, T., Abe, R., Nishihara, J., Shibaki, A., Watanabe, H., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Ishibashi, T., and Shimizu, H.: Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor (MIF)-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 33:1478-1487 (2003).
2. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya, K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., and **Nakayama, T.**: Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11:1-8 (2003).
3. Zhang, G., Nichols, R. D., Taniguchi, M., **Nakayama, T.**, and Parmely, M. J.: Gamma interferon production by hepatic NK T cells during Escherichia coli infection is resistant to the inhibitory effects of oxidative stress. *Infect. Immun.* 71:2468-2477 (2003).
4. Murata, K., Inami, M., Hasegawa, A., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S. F., and **Nakayama, T.**: CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-Type II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15:987-992 (2003).
5. Omori, M., Yamashita, M., Inami, M., Ukai-Tadenuma, M., Kimura, M., Nigo, Y., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Taniguchi, M., and **Nakayama, T.**: CD8 T cell-specific downregulation of histone hyperacetylation and gene activation of the IL-4 gene locus by ROG, repressor of GATA. *Immunity* 19:281-294 (2003).
6. Nishikawa, H., Kato, T., Tanida, K., Hiasa, A., Tawara, I., Ikeda, H., Ikarashi, Y., Wakasugi, H., Kronenberg, M., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Kuribayashi, K., Old, L. J., Shiku, H.: CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined sutoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10902-10906 (2003).
7. Ito, H., Ando, K., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Ezaki, T., Saito, K., Takemura, M., Sekikawa, K., Imawari, M., Seishima, M., and Moriwaki, H.: Role of V α 14 NKT cells in the development of impaired liver regeneration *in vivo*. *Hepatology* 38:1116-1124 (2003).
8. Kawakami, K., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Nakasone, C., Uezu, K., Kinjo, T., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., and Saito, A.: Critical role of V α 14⁺ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* 33:3322-3330 (2003).

9. Koike, J., Wakao, H., Ishizuka, Y., Sato, T., Hamaoki, M., Seino, K., Koseki, H., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Bone marrow allograft rejection mediated by a novel murine NK receptor, NKG2I. *J. Exp. Med.* 199:137-143 (2004).
10. Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihara, J., Abe, R., **Nakayama, T.**, Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T., and Shimizu, H.: Ultraviolet A-induced production of matrix metalloproteinase-1 is mediated by macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279:1676-1683 (2004).
11. Kobayashi, S., Kaneko, Y., Seino, K., Yamada, Y., Motohashi, S., Koike, J., Sugaya, K., Kuriyama, T., Asano, S., Tsuda, T., Wakao, H., Harada, M., Kojo, S., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Impaired IFN- γ production of V α 24 NKT cells in non-remitting sarcoidosis. *Int. Immunol.* 16:215-222 (2004).
12. Harada, M., Seino, K., Wakao, H., Sakata, S., Ishizuka, Y., Ito, T., Kojo, S., **Nakayama, T.**, and Taniguchi, M.: Down-regulation of the invariant V α 14 antigen receptor in NKT cells upon activation. *Int. Immunol.* 16:241-247(2004).
2. 学会発表
1. Yamamoto, N., Kawakami, K., Kinjo, Y., Miyagi, K., Nakasone, C., Kinjo, T., Uezu, K., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A.: Contribution of NKT cells to the host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae* in mice. Immunology 2003. May 6-10, Colorado, USA
2. Parmely, M. J., Zhang, G., Nichols, R. D., Taniguchi, M., and Nakayama, T.: Characterization of lymphocyte subsets in the mouse liver that mediate IFN- γ responses to bacterial challenge. Immunology 2003. May 6-10, Colorado, USA
3. 山下政克、谷口克、中山俊憲 Type2 細胞分化とヒストンアセチル化のシグナル制御 第13回 Kyoto T Cell Conference 2003年6月27-28日、京都
4. 長谷川明洋、村田薫、稲見真倫、中山俊憲 CD69 分子による関節炎の発症制御 第13回 Kyoto T Cell Conference 2003年6月27-28日、京都
5. 本橋新一郎、中山俊憲、石川亜紀、石川栄一、藤澤武彦、谷口克 NKT 細胞による肺癌免疫療法—第1相試験 第7回基盤的癌免疫研究会総会 2003年7月17-18日、岡山
6. 俵功、西川博嘉、加藤琢磨、武光哲志、五十嵐義徳、若杉尋、中山俊憲、谷口克、栗林景容、珠玖洋 SEREX 自己抗原により活性化される CD4⁺CD25⁺T 細胞は 3-メチルコラントレンによる発癌を促進する