

compensatory phenomena be recognized in clinical cases? *Surg Today*. in press

2. 学会発表

1. 吉野一郎. 肺癌外科の現状と展望 第113回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2013年4月12日
2. 吉野一郎. 日本人肺癌の術後補助化学療法にプラチナは必要か? 第30回日本呼吸器外科学会, 名古屋, 2013年5月9-10日
3. 吉野一郎. 非小細胞肺癌術後アジュバント治療における TS1 vs.CDDP+TS1の無作為化第II相臨床試験 WJOG4107 第30回日本呼吸器外科学会, 名古屋, 2013年5月9-10日
4. 田中朝志, 牧野茂義, 高橋孝喜, 勝俣範之, 吉野一郎, 桑野博行, 前原喜彦, 西山正彦. がん化学療法に伴う貧血(CIA)に関する全国調査結果 第61回日本輸血・細胞治療学会, 横浜, 2013年5月17日
5. 吉野一郎. がん化学療法にともなう貧血(CIA)に対する対策:本邦における現状と問題点 第61回日本輸血・細胞治療学会, 横浜, 2013年5月17日
6. 吉野一郎. Lung cancer surgery Patient selection & spectrum of surgical procedures 3rd World Congress of Thoracic Imaging, ソウル, 2013年6月10-11日
7. 吉野一郎. 長微量検体による肺癌術前遺伝子プロファイル検索システムの構築 第36回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 大宮, 2013年6月20日
8. 吉野一郎, 間質性肺炎合併肺癌の外科治療 第5回福島県肺癌研究会, 郡山, 2013年7月6日
9. 吉野一郎. 肺癌治療における Evidence-Based Surgery と Rationale-based Surgery:ーリンパ節郭清を中心に 岡山呼吸器外科カンファレンス, 岡山, 2013年8月31日
10. 吉野一郎. 肺癌根治術としての Sublobar resection と論点 (講義V) Learning Expertise in Thoracic Surgery 2013, 東京, 2013年9月21日
11. Inoue M, Yoshino I (Co Author). Clinicopathological characteristics and surgical results of lung cancer patients aged up to 50 years; The Japanese lung cancer registry study 2004 International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
12. Okumura M, Yoshino I (Co Author). Outcome of surgical treatment for thymic epithelial tumors based on the nationwide retrospective database of 3033 patients in Japan International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
13. Nakagawa Y, Yoshino I (Co Author). Analysis of lymphatic metastases of thymic epithelial tumor on Japanese database International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
14. Sekine Y, Yoshino I (Co Author). The impact of combined pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease on long term survival after lung cancer surgery. International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
15. Kometani T, Yoshino I (Co Author). A pilot study on the effects of perioperative administration of the neutrophil elastases inhibitor, sivelestat, to Non Small Lung Cancer patients with Preoperative risk factors of acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
16. Sawabata N, Yoshino I (Co Author). Japanese nation wide lung cancer registries conducted by the Japanese joint

committee of lung cancer registry
(JJCLCR) International Association for
the Study of Lung Cancer, シドニー,
2013年10月27-30日

17. Tada H, Yoshino I (Co Author). Update
data of biomarker analysis of
WJOG4107(A randomized phase II trial of
adjuvant chemotherapy with S-1 versus
CDDP+S-1 for resected stage II-III
Non-small cell lung cancer (NSCLC)
International Association for the Study of
Lung Cancer, シドニー, 2013年10月
27-30日
18. 尹貴正、岩田剛和、佐田諭己、椎名裕
樹、山本高義、鎌田稔子、森本淳一、
中島崇裕、鈴木秀海、田川哲三、溝渕
輝明、吉田成利、吉野一郎. 長期生存
を得た膵癌肺転移の一例 第163回日
本胸部外科学会関東甲信越地方会, 東
京, 2013年11月2日
19. 吉野一郎、坂入祐一、中島崇裕、鈴木
秀海、岩田剛和、田川哲三、溝渕輝明、
吉田成利. 肺癌進展形式に Segmental
Compartment concept は成立するか?
第54回日本肺癌学会総会, 東京, 2013
年11月21-22日
20. 中島崇裕、坂入祐一、稲毛輝長、山本
高義、森本淳一、鎌田稔子、尹貴正、
鈴木秀海、田川敬三、岩田剛和、溝渕
輝明、吉田成利、吉野一郎. 分子標的
治療時代における EBUS-TBNA 検体
を用いたバイオマーカー診断 第54回
日本肺癌学会総会, 東京, 2013年11月
21-22日
21. 溝渕輝明、山本直敬、中嶋美緒、馬場
雅行、鎌田正、藤澤武彦、吉田成利、
吉野一郎. 炭素線治療後局所再発に
対するサルベージ手術例の検討 第54
回日本肺癌学会総会, 東京, 2013年11
月21-22日
22. 岩田剛和、吉田成利、星野英久、椎名
裕樹、稲毛輝長、山本高義、尹貴正、
鎌田稔子、森本淳一、坂入祐一、鈴木

秀海、中島崇裕、田川哲三、溝渕輝明、
中谷行雄、吉野一郎. NBI 併用拡大観
察用胸腔鏡を用いた肺癌胸膜浸潤の術
中診断 第54回日本肺癌学会総会, 東
京, 2013年11月21-22日

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 臨床結果

症例	効果判定	観察・追跡期間	転帰
1	SD	11.6ヶ月	原病死
2	PD	9.0ヶ月	原病死
3	PR	21.4ヶ月	生存
4	SD	11.5ヶ月	原病死
5	SD	14.7ヶ月	生存
6	SD	10.4ヶ月	原病死
7	PD	14.0ヶ月	生存
8	PD	9.5ヶ月	原病死
9	PD	9.2ヶ月	生存
10	PD	9.0ヶ月	生存
11	PD	9.3ヶ月	生存
12	SD	2.8ヶ月	生存
13	SD	3.9ヶ月	生存
14	PD	2.6ヶ月	生存
15	PD	5.2ヶ月	生存
16	PD	2.6ヶ月	生存

NKT 細胞を用いた免疫細胞治療における免疫モニタリングに関する研究

研究分担者：中山 俊憲	千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学	教授
研究協力者：加藤 美紀	千葉大学未来医療教育研究センター	特任研究員
三瀬 直子	千葉大学大学院医学薬学府	大学院生
中野 友理	千葉大学大学院医学薬学府	大学院生

研究要旨

α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与に関する第 II 相臨床研究を施行するために調製された、患者自己末梢血単核球由来 α Galactosylceramide (α GalCer) パルス樹状細胞の表面上に発現する抗原分子の検討を行った。従来の樹状細胞マーカーとされる HLA-DR、CD11c、CD86 に加え、樹状細胞誘導により発現が低下する CD14 の発現率を検討したところ、各表面マーカーは症例間で発現率に差は認められたものの、各症例ともに各投与細胞間で比較的安定した発現を示すとともに、CD14 分子の発現低下を認めた。また、治療前後の患者末梢血 NKT 細胞、NK 細胞の増加率を算出したところ、それぞれ 16 例中 5 例および 10 例で有意な増加を認めた。さらに α GalCer 特異的インターフェロ γ 産生細胞能の検討を 14 例で行い、7 例で治療後の産生細胞数の増加を検出した。これらの免疫パラメーターが主要評価項目である生存期間とどのように関連するか、今後の追跡調査の結果と合わせて引き続き検討を加える必要がある。

A. 研究目的

アフエレーシスによって採取された末梢血より誘導し、NKT 細胞特異的リガンドである α Galactosylceramide(α GalCer) をパルスし提示させた樹状細胞は *in vivo* で NKT 細胞を認識し、活性化することが期待される。患者末梢血より誘導した樹状細胞について、表面抗原マーカーを中心とした質的評価を行い、免疫細胞療法における臨床効果との関係を検討する。また、この治療用免疫細胞である α GalCer パルス

樹状細胞の作用機序として、体内で NKT 細胞を活性化することによって抗腫瘍効果に役割を果たす他の免疫細胞も活性化することが考えられていることから、細胞投与と臨床効果との因果関係を証明するには、*in vivo* における免疫反応を客観的に評価する必要がある。そこで治療期間中に採取した患者末梢血単核球を用いて *in vivo* での NKT 細胞特異的な免疫反応を解析した。

B. 研究方法

1) 投与細胞の免疫モニタリング

患者末梢血単核球より誘導した樹状細胞分画を含んだ培養細胞集団を用いることで、効率良く NKT 細胞を活性化できることはすでに示されており、樹状細胞の特徴となる基本的な表面抗原に関しても発現検討がなされてきている。しかし培養細胞の発現する抗原分子の中で効果予測可能となりうるマーカーが存在しないことから、表面抗原発現として、樹状細胞の代表的なマーカーである HLA-DR、CD11c、CD86 の発現をフローサイトメトリー法にて検討した。さらに末梢血単核球での強い発現を認め、樹状細胞への誘導にて発現が著しく低下することが知られている CD14 分子の細胞表面発現割合の検討を行い、末梢血における免疫反応や臨床効果との関係を検討した。

2) 治療前後の末梢血単核球モニタリング

α GalCer パルス樹状細胞投与による生体内での反応を確認するため、末梢血単核球中における NKT 細胞および NKT 細胞活性化にて2次的な活性化が期待される NK 細胞について、フローサイトメトリー法にて検討した。NKT 細胞は CD3 陽性、V α 24 抗原受容体陽性、V β 11 抗原受容体陽性細胞と定義し、NK 細胞は CD3 陰性かつ CD56 陽性と定義した。末梢血リンパ球中の NKT 細胞、NK 細胞の割合を測定し、血液学的検査で得られた全白血

球数とリンパ球分画の割合を元に、各治療ポイントでの末梢血 1 mL あたりの NKT 細胞数、NK 細胞数を算出した。治療開始時の NKT 細胞数、NK 細胞数を基準として、治療介入後の NKT 細胞数、NK 細胞数の増加割合とその中で最大の増加割合を求め、臨床効果との比較を行った。さらに凍結保存した末梢血単核球を用いて、*in vitro* で α GalCer によって再刺激した際の α GalCer 特異的インターフェロ γ (IFN- γ) 産生細胞数を、ELISPOT 法を用いて各症例ごとに同時に測定した。この assay 系における IFN- γ 産生細胞は、活性化した NKT 細胞のみならず、NKT 細胞の発揮する免疫増強効果によって活性化した NK 細胞の一部も寄与することが判明している。

(倫理面への配慮)

本研究は免疫モニタリングとして臨床研究に含まれる研究であり、臨床研究全体として千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会による承認を受けている。全ての被験者に対して文書による説明と同意を得ている。用いた検体は全て匿名化されており、個人情報の管理にも十分配慮をして研究を実施している。

C. 研究結果

1) 投与細胞の免疫モニタリング

成分採血にて得られた末梢血単核球より誘導し、治療に用いた培養細胞投与群における、HLA-DR、CD11c、

CD86 および CD14 分子の細胞表面発現割合を検討すると、症例間で発現率に差は認められたものの、各症例ともに 4 回の投与細胞で比較的安定した発現を示した (表 1)。特に NKT 細胞と樹状細胞の相互作用に重要な CD86 分子の発現は各症例とも高い割合で発現を認めている。これまでに投与された培養細胞全体の各マーカーの平均発現率は、HLA-DR が 64.5%、CD11c が 23.2%、CD86 が 78.8%、CD14 は 1.3%であった。

2) 治療前後の末梢血単核球モニタリング

治療開始時と比較し、全コースを通じて NKT 細胞数が 1.5 倍以上の増加を認めたのは 16 例中 5 例であり、NK 細胞が 1.5 倍以上増加を認めたのは 10 例であった (表 2)。さらに各コース開始時点を基準として、NKT 細胞数の増減を解析してみると、1 コースまたは 2 コース開始時から増加を認めた症例は、16 例中 9 例であった。

NKT 細胞の機能解析のための末梢血単核球中の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の検討を 14 例で行い、治療開始時と比較し 7 例で治療経過中に 2 倍以上の明らかな増加を認めた (表 2)。IFN- γ 産生細胞数が増加を認めた 7 例における腫瘍縮小効果は、partial response (PR) 1 名、stable disease (SD) 3 名、progressive disease (PD) 4 名である一方、増加を認めなかった症例における腫瘍縮小効果は SD 3 名、

PD 5 名であった。今後、 α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数と全生存期間との関連について、追跡調査によって全生存期間を確定させた後に検討を行う。

3) 樹状細胞上の表面抗原発現率と NKT 細胞特異的免疫反応の関連性の検討

樹状細胞の表面抗原発現と末梢血 NKT 細胞の増加の関係を検討するために、末梢血 NKT 細胞が開始時より増加した症例群 (症例 6, 8, 9, 12, 13) とそれ以外の症例群における、樹状細胞上の表面抗原発現率を比較してみると、HLA-DR (増加群 73.4%、非増加群 60.9%)、CD11c (増加群 20.1%、非増加群 24.3%)、CD86 (増加群 79.9%、非増加群 78.4%)、CD14 (増加群 1.5%、非増加群 1.1%) と HLA-DR 発現が NKT 細胞上昇群で高い傾向にあったが、他の表面マーカーには差を認めなかった。

一方、樹状細胞の表面抗原発現が α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数に及ぼす影響を検討すると、IFN- γ 産生細胞増加群と非増加群における表面マーカーの発現割合を検討すると、HLA-DR 発現は増加群 65.6%、非増加群 61.5%、CD11c 発現割合は増加群 25.4%、非増加群 20.6%、CD86 発現割合は増加群 78.3%、非増加群 80.4%、CD14 発現割合は増加群 1.1%、非増加群 1.2%であり、2 群間に差は認められなかった。今後症例を重ねて検討するとともに、主要評価項目である全生存期間のデー

タ確定を得てさらに検討を行う予定である。

D. 考察

樹状細胞のモニタリングとして、樹状細胞の代表的な表面マーカーである HLA-DR と CD11c、CD86 分子および樹状細胞の誘導により発現が著しく低下もしくは消失する CD14 分子による評価を行い、特に樹状細胞と NKT 細胞の相互作用に必要で、樹状細胞の成熟化や NKT 細胞の活性化とサイトカイン産生に重要な働きをする CD86 分子が安定して高発現していることが明らかとなった。また単球で高発現する表面マーカーである CD14 分子は低下もしくはほぼ消失しており、単球から樹状細胞への誘導が問題無くなされていることが確認された。NKT 細胞の活性化の指標から樹状細胞の機能を検討すると、NKT 細胞の増加が認められた症例群で投与された樹状細胞の HLA-DR 発現が高い傾向にあることが示唆されていることから、樹状細胞誘導に重要なマーカー候補になる可能性が考えられる。しかしこれまでの 16 例の検討では発現率の差 (12.5%) が大きくないことから、今後も症例を追加しデータを蓄積していくことで、HLA-DR 分子の発現の意義を明らかとしていく。

治療前後での末梢血単核球を用いた免疫モニタリングは、全身的な NKT 細胞特異的免疫反応の誘導を示し、これらの免疫モニタリングが細胞投与と臨床効果の関

係を証明する手段となることが期待されている。今回の免疫モニタリングとして、NKT 細胞、NK 細胞数といった単純な数の変化に加えて、NKT 細胞の機能変化として、 α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の検討を行った。 α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の検討が終了した 14 例中、7 例で 2 倍以上の IFN- γ 産生細胞数の増加を認め、臨床効果 PR の 1 例および SD の 2 例で、 α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の増加を認めている。現時点では臨床効果との関連は明らかでは無いが、今後全生存期間との関連が最も重要となることから、今後の予後追跡調査から得られる全生存期間の確定を行って、免疫反応データとの関連を検討していく。またこれらの治療経過に沿って得られる免疫バイオマーカーに加えて、治療前に得られている免疫モニタリングのデータが、治療効果の予測を可能とするバイオマーカーとなりうるか、検討を進めていく予定である。

E. 結論

樹状細胞の表面抗原は、細胞調製にて比較的安定した発現を示し、HLA-DR の発現が重要な可能性が示唆された。また α GalCer 特異的インターフェロン γ 産生細胞能の増強症例では、良好な臨床効果が得られる可能性があり、今後主要評価項目である生存期間とどのように関連するか検討を加えていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Onodera, A., Tumes, D. J., and Nakayama, T.: Too much of a good thing. *Nat. Immunol.* 2013; 14(2): 112-114
2. Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., Reis, B. S., Huang, Y., Lambolez, F., Docherty, M., Attinger, A., Shui, J. -W., Kim, G., Lena, J. C., Sakaguchi, S., Miyamoto, C., Wang, P., Atarashi, K., Park, Y., Nakayama, T., Honda, K., Ellmeier, W., Kronenberg, M., Taniuchi, I., and Cheroutre, H.: Transcriptional reprogramming of mature CD4⁺ helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2013; 14(3): 281-289
3. Hosokawa, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Endo, Y., Onodera, A., Tumes, D. J., Kanai, A., Sugano, S., and Nakayama, T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2013; 110(12): 4691-4696
4. Suzuki, J., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Imamura, M., Kato, F., Nakayama, T., Ohara, O., and Yamashita, M.: A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the *IL5* gene locus. *PLOS ONE.* 2013; 8(4): e61785.
5. Jabara, H. H., Ohsumi, T., Chou, J., Massaad, M. J., Benson, H., Megarbane, A., Chouery, E., Mikhael, R., Gorka, O., Gewies, A., Portales, P., Nakayama, T., Hosokawa, H., Revy, P., Herrod, H., Le Deist, F., Lefranc, G., Ruland, J., and Geha, R. S.: A homozygous mucosa-associated lymphoid tissue 1 (*MALTI*) mutation in a family with combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132(1): 151-158
6. Hasegawa, A., Iwamura, C., Kitajima, M., Hashimoto, K., Otsuyama, K., Ogino, H., Nakayama, T., and Shirai, M.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of dextran sulphate sodium-induced colitis. *PLOS ONE.* 2013; 8(6): e65494.
7. Yamashita, J., Iwamura, C., Ito, T., Narita, M., Hara, Y., Sasaki, T., Masuda, D., Takahashi, M., Tsuchiya, M., Hada, K., Ishikawa, M., Matsuo, T., Ohno, Y., Tanaka, H., Maruyama, H., Ogawa, Y., and Nakayama, T.: Paraoxonase-1 suppresses experimental colitis via the inhibition of IFN- γ production from CD4 T cells. *J. Immunol.* 2013; 191(2): 949-960
8. Sasaki, T., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Horiuchi, S., Yamashita, J., Tanaka, H., Ogawa, Y., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genomic-wide gene expression profiling revealed a critical role for GATA3 in the maintenance of the Th2 cell identity. *PLOS ONE.* 2013; 8(6): e66468.
9. Homma, T., Kinugawa, S., Takahashi, M., Sobirin, M. A., Saito, A., Fukushima, A., Suga, T., Takada, S., Kadoguchi, T., Masaki, Y., Furihata, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Ishimori, N., Iwabuchi, K., and Tsutsui, H.: Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 62:179-188
10. Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Shinoda, K., Yagita, H., Okumura, K., Löhning, M., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Eckes, B., Radbruch, A., Tokoyoda, K., and Nakayama, T.: CD49b-dependent establishment of T helper cell memory.

- Immunol. Cell Biol.* 2013; 91:524-531
11. Nagao, T., Kusunoki, R., Iwamura, C., Kobayashi, S., Yumura, W., Kameoka, Y., Nakayama, T., and Suzuki, K.: Correlation of Interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 concentrations with crescent formation and myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody titer in SCG/Kj mice by treatment with anti-interleukin-6 receptor antibody or mizoribine. *Microbiol. Immunol.* 2013; 57(9): 640-650
 12. Suzuki, K., Suzuki, K., Nagao, T., and Nakayama, T.: Proposal of anti-moesin as a novel biomarker for ANCA-associated vasculitis. *Clin. Exp. Nephrol.* 2013; 17(5): 638-641
 13. Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato, M., Shinoda, K., Tohyama, H., Hanazawa, A., Tamaki, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Sakikawa, I., Morita, A., Nagira, M., Poyurovsky, V. M., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.: Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(46): 18626-18631
 14. Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁺ T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 2013; 39(5): 819-832
 15. Nakamura, T., Fukiage, M., Higuchi, M., Nakaya, A., Yano, I., Miyazaki, J., Nishiyama, H., Akaza, H., Ito, T., Hosokawa, H., Nakayama, T., and Harashima, H.: Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *J. Control. Release.* 2013; 176:44-53
 16. Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., and Taniguchi, M.: NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front. Immunol.* 2013; 4:409
2. 学会発表
 1. Nakayama, T. Generation and maintenance of pathogenic memory CD4 T cells. AAI Annual Meeting, Honolulu Hawaii, 5/3-7/2013
 2. 中山俊憲 Th2 細胞の分化維持機構におけるエピジェネティクスの役割 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜 2013 年 5 月 11-12 日
 3. 米倉修二、櫻井大樹、稲嶺絢子、中山俊憲、岡本美孝 スギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜 2013 年 5 月 11-12 日
 4. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. Department of Immunology Special Seminar, Toronto Canada, 6/12/2013
 5. Nakayama, T. iNKT Cell-Based Immunotherapy for Cancer. Keck School of Medicine of USC Research Seminar Series, Los Angeles USA, 6/14/2013
 6. 中山俊憲 NKT 細胞免疫系をターゲットにしたがんの免疫細胞治療-10 年間の臨床研究の成果と今後の展望- 肺がんセミナー, 福岡, 2013 年 6 月 21 日
 7. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. RCAI International Summer Program 2013, Yokohama, 6/21-26/2013
 8. 中山俊憲 NKT 細胞免疫系をターゲットにした肺癌と頭頸部癌の免疫細胞治療-10 年間の臨床研究の成果と今後の展望- 第 11 回京阪神耳鼻咽喉科臨床懇話会, 大阪, 2013 年 6 月 29 日
 9. 中山俊憲、本橋新一郎、國井直樹、岡本美孝 NKT 細胞免疫系をターゲット

- にしたがんの免疫細胞治療-10年間の臨床研究の成果と今後の展望- 第17回日本がん免疫学会総会, 山口, 2013年7月3-5日
10. 中山俊憲 NKT細胞免疫系を標的にしたがん免疫治療の開発研究 第7回長崎呼吸器がんセミナー, 長崎, 2013年7月19日
 11. Nakayama, T. Generation and maintenance of memory CD4 T cells. 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference, Greece, 9/8-13/2013
 12. Shinoda, K., and Nakayama, T. CD69 regulates the formation of resting T helper memory. 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference, Greece, 9/8-13/2013
 13. Motohashi, S., Kunii, N., Taniguchi, M., Yoshino, I., Okamoto, Y., and Nakayama, T. NKT cell-targeting therapy for lung cancer and head and neck cancer. 7th International symposium on CD1 and NKT cells, France, 9/13-17/2013
 14. 中山俊憲、本橋新一郎、國井直樹、岡本美孝 抗腫瘍免疫機構の最先端 第66回日本胸部外科学会定期学術集会, 仙台, 2013年10月16-19日
 15. 中山俊憲 T細胞免疫記憶とアレルギー性気道炎症制御 第25回多摩アレルギー懇話会, 新宿, 2013年10月18日
 16. 中山俊憲 免疫記憶CD4T細胞による慢性気道炎症制御 平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会 感染・免疫・炎症・発癌, 札幌, 2013年10月25日
 17. 中山俊憲 免疫記憶とアレルギー性気道炎症制御 第2回えひめ骨と免疫学セミナー, 愛媛, 2013年11月21日
 18. Nakayama, T., Iwamura, C., Shinoda, K., and Endo, Y. Pathogenic memory Th2 cells in the airway and regulation by activated NKT cells in vivo. 第36回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013年11月28-30日
 19. Nakayama, T., Endo, Y., Onodera, A., and Tumes, D. J. Generation and maintenance of pathogenic memory CD4 T cells. The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Korea, 12/1-3/2013
 20. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3-6日
 21. Nakayama, T. Generation and maintenance of CD4 T cell memory. Germany-Japan Immunology Seminar 2013 in Shizuoka - Challenge in Immunology for Opening the Door to the Understanding of Human System and Disease -, Shizuoka, 12/5-9/2013
 22. Nakayama, T. Effector and Memory CD4 T cells. Overview Talk 第42回日本免疫学会総会学術集会, 幕張, 2013年12月11-13日
- G. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

表 1 投与細胞中の樹状細胞関連表面抗原発現割合

症例	HLA-DR	CD11c	CD86	CD14
1	50.4±13.2	33.2±15.9	70.0±6.4	2.2±2.0
2	49.1±7.7	29.2±9.4	81.7±12.1	0.7±0.4
3	21.9±12.7	44.1±13.9	65.6±19.3	0.6±0.6
4	46.8±10.7	32.4±9.1	72.7±15.5	2.4±1.0
5	42.5±19.3	7.7±2.1	90.2±5.7	1.0±0.2
6	64.7±17.6	28.6±9.3	88.2±11.0	1.6±0.9
7	69.7±1.7	12.5±3.8	77.1±9.8	0.6±0.1
8	66.8±13.3	36.3±13.9	69.2±19.9	0.8±0.1
9	59.4±9.7	15.0±8.2	66.6±3.2	0.6±0.2
10	81.9±7.0	13.6±3.3	82.3±5.9	0.3±0.9
11	80.4±9.5	22.8±4.0	79.0±17.3	0.7±0.3
12	84.9±4.9	15.2±4.6	86.0±7.4	1.0±0.9
13	84.7±4.6	12.4±2.3	80.7±10.2	1.1±0.2
14	91.9±3.9	28.9±8.2	90.8±7.2	1.0±0.5
15	51.1±10.8	27.9±7.1	66.3±15.7	3.3±2.5
16	85.9±5.7	15.3±4.2	87.0±6.4	1.3±0.4

表 2 臨床効果および NKT 細胞特異的免疫反応

症例	臨床効果	NKT細胞数 増加	NK細胞数 増加	IFN- γ 産生細胞数 増加
1	SD	1.0	1.1	2.3
2	PD	0.3	3.7	1.9
3	PR	1.4	3.0	5.9
4	SD	0.9	1.1	0.8
5	SD	0.3	1.2	1.5
6	SD	3.5	1.1	4.4
7	PD	1.0	2.2	6.5
8	PD	1.6	1.4	1.2
9	PD	3.5	1.5	4.6
10	PD	1.4	1.6	2.1
11	PD	0.4	1.2	1.7
12	SD	5.1	2.0	1.4
13	SD	4.0	2.1	1.8
14	PD	0.4	1.7	2.1
15	PD	0.4	1.8	n.d.
16	PD	0.5	1.5	n.d.

SD: stable disease, PD: progressive disease, PR: partial response, n.d.: not done

NKT 細胞を用いた免疫細胞治療の臨床試験の管理・推進に関する研究

研究分担者：花岡 英紀 千葉大学医学部附属病院 臨床試験部 教授

研究協力者：藤川 陽 千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学 特任研究員

研究要旨

千葉大学医学部附属病院未来開拓センターで実施される細胞治療の試験の管理・推進を ICH-GCP 基準として実施する必要がある。このため、本試験の実施において、未来開拓センター内の推進部を中心に、専門の CRC を配置するとともにモニタリングおよび監査、データマネージメント業務を平行して実施する体制を整備し、これを実施した。

A. 研究目的

本研究では、試験の適切な遂行を目的として、ICH-GCP 基準の臨床試験実施体制の整備を行い、さらに、これに基づく試験を展開することを目的とする

責任医師の出席のもと毎月行い、症例の組み入れ進捗管理や、有害事象の発生状況の確認、発生時の対応などを実施した(今年度は計 12 回開催)。また、本試験に関与する多くのスタッフの連携を図ることも調整会議およびプロジェクトを管理するスタッフの重要な役目である(資料 1)。

B. 研究方法

本研究においては、昨年に続き、以下の検討を行った。

- (1) 試験の実施体制の整備と実施
- (2) モニタリング体制の整備と実施
- (3) 監査体制の整備と実施
- (4) データマネージメントの整備と実施

- (2) 試験の実施体制のモニタリングに加え、参加登録した被験者の組み入れ基準や試験の参加状況に関するモニタリング業務を行った。
- (3) 試験の実施状況は、当院倫理審査委員会において確認を行っている(実施状況報告書の提出)。

C. 研究結果

検討結果は以下の通り

- (1) 臨床試験の実施においてはプロジェクトを管理する専任のスタッフを配置するとともに、定期的な調整会議を

- (4) データマネージメント業務において、本試験を実施するための臨床データマネージメントシステム(CDMS)構築の上、試験の稼働に合

わせてデータマネジメント業務を実施している。

システムは、DATATRAK 社の DATATRAK ONE を採用した。システム構築に際して、CDISC による CDASH 及び SDTM 標準の概念を採用し、ベンダーによる構築トレーニングを受けた構築専門スタッフにより、SOP（標準業務手順書）に沿って構築及びコンピュータ・システム・バリデーション（CSV）を行った。

また、それらの業務に加えて、症例登録業務を実施している。症例登録業務においては、被験者の適格性を第三者の立場から確認する作業を SOP に沿って実施している。

データマネジメント業務においては、SOP 及び DM 計画書に定める業務手順に沿って、症例報告書管理、データ入力（ダブルデータエントリー）、データクリーニングを中心に現在、業務を遂行している。CRF 作成からデータ固定までに発生する一連の作業手順を確立させ、臨床試験の品質確保とデータの信頼性の向上を図っている。

D. 考察

本研究において以下の考察を行った。

- (1) 試験の実施体制においては研究チームの構築と内部の連携を図ることは試験全体の推進に不可欠なことである。専門性をもつスタッフと責任医師分担医師によって構成された研究チ

ームが試験においてスムーズに連携が可能となり、試験全体の進捗が図られる。

- (2) モニタリングによる試験の質の確保とデータの信頼性の向上が本取り組みにおいて実施が可能となった。
- (3) 監査業務は、本来されるべき業務を第三者的立場から検証することが目的であり、試験の信頼性において不可欠であるが一方で多大な労力を伴うことでもある。内部・外部委託含め、本研究において今後効果的な方法を確認していく必要があると考えられる。
- (4) データマネジメント業務はデータの質の確保に不可欠であると同時にモニターとの連携が重要である。本研究においてその連携体制をさらに発展させることが可能となった。

E. 結論

本研究では千葉大学医学部附属病院未来開拓センターで実施される NKT 細胞を用いた免疫細胞治療（Chiba-NKT）の試験を ICH-GCP 基準として実施するための体制整備を行い、これを実行した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

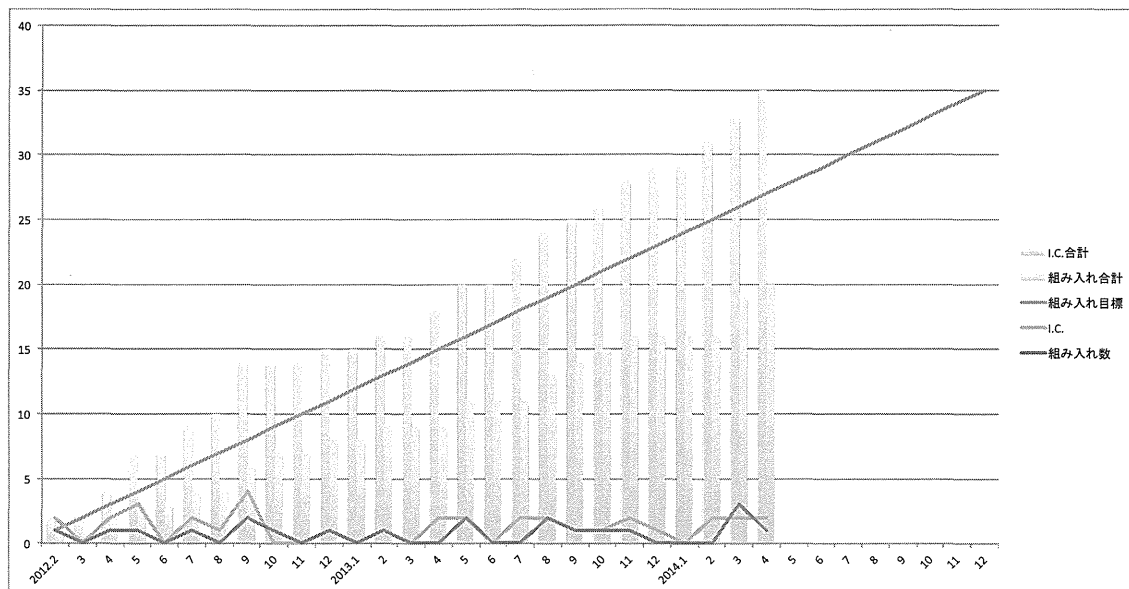
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資料 1



Ⅲ. 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	巻号	ページ	出版年
Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., and Taniguchi, M.	NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic	Front. Immunol.	4	409	2013
Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato, M., Shinoda, K., Tohyama, H., Hanazawa, A., Tamaki, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Sakikawa, I., Morita, A., Nagira, M., Poyurovsky, V. M., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.	Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	110	18626-18631	2013
Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T.	The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4 ⁺ T helper type-1 and type-2 cells	Immunity	39	819-832	2013
Homma, T., Kinugawa, S., Takahashi, M., Sobirin, M. A., Saito, A., Fukushima, A., Suga, T., Takada, S., Kadoguchi, T., Masaki, Y., Furihata, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Ishimori, N., Iwabuchi, K., and Tsutsui, H.	Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice	J. Mol. Cell. Cardiol.	62	179-188	2013



NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic

Shin-ichiro Fujii¹, Kanako Shimizu¹, Yoshitaka Okamoto², Naoki Kunii², Toshinori Nakayama³, Shinichiro Motohashi⁴ and Masaru Taniguchi⁵*

¹ Laboratory for Immunotherapy, RCAI, RIKEN, Center for Integrative Medical Sciences (IMS-RCAI), Yokohama, Japan

² Department of Otorhinolaryngology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

³ Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

⁴ Department of Medical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan

⁵ Laboratory of Immune Regulation, RCAI, RIKEN, Center for Integrative Medical Sciences (IMS-RCAI), Yokohama, Japan

Edited by:

Kendall A. Smith, Cornell University, USA

Reviewed by:

Kendall A. Smith, Cornell University, USA

Wolf Hervé Fridman, University Paris Descartes, France

*Correspondence:

Masaru Taniguchi, Laboratory of Immune Regulation, RCAI, RIKEN, Center for Integrative Medical Sciences (IMS-RCAI), 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan
e-mail: taniguti@rcai.riken.jp

Human natural killer T (NKT) cells are characterized by their expression of an invariant T cell antigen receptor α chain variable region encoded by a $V\alpha 24J\alpha 18$ rearrangement. These NKT cells recognize α -galactosylceramide (α -GalCer) in conjunction with the MHC class I-like CD1d molecule and bridge the innate and acquired immune systems to mediate efficient and augmented immune responses. A prime example of one such function is adjuvant activity: NKT cells augment anti-tumor responses because they can rapidly produce large amounts of IFN- γ , which acts on NK cells to eliminate MHC negative tumors and also on CD8 cytotoxic T cells to kill MHC positive tumors. Thus, upon administration of α -GalCer-pulsed DCs, both MHC negative and positive tumor cells can be effectively eliminated, resulting in complete tumor eradication without tumor recurrence. Clinical trials have been completed in a cohort of 17 patients with advanced non-small cell lung cancers and 10 cases of head and neck tumors. Sixty percent of advanced lung cancer patients with high IFN- γ production had significantly prolonged median survival times of 29.3 months with only the primary treatment. In the case of head and neck tumors, 10 patients who completed the trial all had stable disease or partial responses 5 weeks after the combination therapy of α -GalCer-DCs and activated NKT cells. We now focus on two potential powerful treatment options for the future. One is to establish artificial adjuvant vector cells containing tumor mRNA and α -GalCer/CD1d. This stimulates host NKT cells followed by DC maturation and NK cell activation but also induces tumor-specific long-term memory CD8 killer T cell responses, suppressing tumor metastasis even 1 year after the initial single injection. The other approach is to establish induced pluripotent stem (iPS) cells that can generate unlimited numbers of NKT cells with adjuvant activity. Such iPS-derived NKT cells produce IFN- γ *in vitro* and *in vivo* upon stimulation with α -GalCer/DCs, and mediated adjuvant effects, suppressing tumor growth *in vivo*.

Keywords: NKT cells, adjuvant effects, clinical trial, induced pluripotent stem cells, artificial adjuvant vector cells

DISCOVERY OF NKT CELLS EXPRESSING AN INVARIANT $V\alpha 14J\alpha 18$ ANTIGEN RECEPTOR

Natural killer T (NKT) cells are characterized by the expression of an invariant antigen receptor encoded by $V\alpha 14J\alpha 18$ in mice and $V\alpha 24J\alpha 18$ in humans (1–3). The murine invariant $V\alpha 14J\alpha 18$ NKT cell antigen receptor was identified by cloning of cDNAs encoding T cell antigen receptor (TCR) from 13 independently established hybridomas with regulatory functions (4, 5). Surprisingly at that time, Southern blot analysis of TCR usage by these 13 hybridomas had the same DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns, even when three different enzymes, *EcoRI*, *BamHI*, and *HindIII* were used. Because of this unusual homogeneous DNA restriction pattern, the TCR cDNAs were cloned and could be classified into four types at the nucleotide level, all of which were composed of $V\alpha 14$ and $J\alpha 18$ with a 1-nt N region. The N region was different in each clone, a C, A, T, or G nucleotide. However, any nucleotide addition in the N region at this position becomes invariant at the amino

acid level, because this N region is the third base of a glycine codon (5).

By RNase protection assays using antisense $V\alpha 14J\alpha 18$ of C57BL/6 (B6) origin as a probe, we detected a single 630 bp band in B6, a single 400 bp band in BALB/c, and 630/400 double bands in DBA/2 mice. Quite remarkably, this band(s) represented 2–4% in the total TCR α expression in these mice (6). The theoretical expression frequency of any one particular TCR α is calculated to be $1/10^6$, because the total TCR α chain repertoire is around 10^8 and there are 100 $V\alpha$ segments in the TCR α loci. Therefore, the $V\alpha 14J\alpha 18$ expression frequency detected in unprimed mice was more than 10^4 times higher than expected, suggesting that $V\alpha 14^+$ NKT cells are clonally expanded under physiological conditions, likely do to their intrinsic autoreactivity. Another interesting finding was that the invariant $V\alpha 14J\alpha 18$ receptor is used only by NKT cells and not by conventional $\alpha\beta$ T cells. This was shown conclusively when the invariant $V\alpha 14J\alpha 18$ together with TCRV $\beta 8.2$ was introduced into RAG-knockout (KO) mice; only NKT cells and

not conventional $\alpha\beta$ T cells or NK cells developed (7). These and other studies confirmed that expression of $V\alpha 14J\alpha 18$ in mice and $V\alpha 24J\alpha 18$ in human is a unique NKT cell signature.

DISCOVERY OF THE NKT CELL LIGAND

The ligand for NKT cells was identified as α -galactosylceramide (α -GalCer), which is presented by the MHC class I-like CD1d molecule. However, unlike MHC class I molecule with polymorphic in nature, CD1d is monomorphic among species, indicating that α -GalCer can be used in any potential NKT cell therapy for all humans. The glycolipid nature of the NKT cell ligand was suggested by experiments using mice lacking the transporter associated with antigen processing (TAP), which is essential for translocation of cytoplasmic peptides generated by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway into the endoplasmic reticulum (ER) to make a stable complex with MHC class I molecules. The MHC peptide complex is required to select CD8 T cells, therefore, in TAP-KO mice, CD8 T cells are not generated. However, by RNase protection assays using the invariant $V\alpha 14J\alpha 18$ as a probe, we could detect significant levels of protected bands in TAP-KO mice but not in $\beta 2M$ -KO mice, suggesting that the ligand is not a peptide, but likely to be a glycolipid in conjunction with a $\beta 2M$ -associated MHC-like molecule (8). The MHC-like molecule turned out to be CD1d, which has two large hydrophobic pockets, A' and F', that can bind the two long fatty acid chains of the ceramide portion of α -GalCer (9). Therefore, we screened various synthetic glycolipids and found the essential structure-function relationships critical for the NKT cell recognition, such as: (1) α -linkage between the sugar moiety and the ceramide portion of α -GalCer but not β -GalCer, (2) a 2'-OH configuration on the sugar moiety different from α -ManCer, and (3) a 3'-OH on the sphingosine of α -GalCer (10).

Furthermore, by using alanine substitution to mutagenize CD1d, we also identified important amino acids on CD1d, such as Ser76, Arg79, Asp80, Glu83, and Gln153, for activation of NKT cells in mice (11). In 2007, Borg et al. succeeded in crystallizing the triple complex of α -GalCer/human $V\alpha 24J\alpha 18$ /TCRV $\beta 11$ /human CD1d (12). Interestingly, the $V\alpha 24J\alpha 18$ chain docks in parallel with the CD1d cleft without any direct contribution of the TCR β chain to ligand binding. This configuration is quite different from the mode of ligand recognition by the TCR β chain of conventional $\alpha\beta$ T cells, in which only the TCR β but not the TCR α chain recognizes the MHC bound peptide in a diagonal position.

Analysis of the structure also revealed that the first four amino acids (Asp94, Arg95, Gly96, and Ser97) of $J\alpha 18$, which are conserved in mouse and human, are essential for binding with both CD1d and α -GalCer. The $J\alpha 18$ Asp94 binds with CD1dArg79, $J\alpha 18$ Arg95 with CD1dArg79/Ser76/Asp80 and the 3'-OH on the sphingosine, $J\alpha 18$ Gly96 with the 2'-OH on galactose, and $J\alpha 18$ Ser97 with CD1dGln150. Interestingly, the CD1d amino acid, Glu83, defined as important in functional assays with CD1d mutants, is important for binding with the TCR β chain to make a stable complex with CD1d but has no direct contribution to the ligand binding itself. Moreover, the CD1d amino acids (Ser76, Arg79, and Asp80) important for binding with either α -GalCer or $J\alpha 18$ are also well conserved among species such as mouse, rat, sheep, and human (10, 13–15). Thus, α -GalCer, identified as

an NKT cell ligand in mice can also be used to activate human NKT cells.

NKT CELL-MEDIATED ADJUVANT EFFECTS ON INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY AGAINST CANCER

In general, tumor cells do not contain any adjuvant materials, so that it is difficult to induce proliferation of specific T cell clones to mount anti-tumor responses in patients. On this particular point, α -GalCer overcomes these problems by its intrinsic adjuvant activity, inducing clonal expansion of tumor-specific T cell cells as well as activating various innate cell types (16). In the initial anti-tumor response after stimulation with α -GalCer/DCs, NKT cells immediately produce large amounts of IFN- γ , which acts on DCs, NK cells, and neutrophils in the innate immune system to eliminate MHC negative tumor target cells and, at the same, also on CD8 cytotoxic T cells and CD4 Th1 cells to kill MHC positive tumor cells, resulting in tumor eradication (Figure 1) (1, 17, 18). Therefore, NKT cell-targeted therapy is expected to overcome the major problem of current anti-cancer immunotherapies – recurrent tumors – due to their targeting of only one type of effector cell (10, 19, 20). For example, in the immunotherapy using tumor peptide CTL or antibodies against PD-1 or CTLA4, the target is the CD8 killer T cell, which kills MHC positive but not negative tumor cells, resulting in tumor recurrence (21). Similarly, in the artificial cells recently developed by the forced expression of Rae1/H60 (NKG2D-L), Mult-1 (NKG2D-L), or CD70 (TNF-L), the target cells are NK cells, which will eliminate MHC negative, but not MHC positive tumor cells (22).

Tumors in general contain both MHC positive and negative cells. Therefore, for an optimal therapy, both MHC types of tumor cells should be eliminated simultaneously by activating both innate and adaptive immune responses (Figure 1A). Since only NKT cells, but not other immune cells, activate NK and CD8 killer T cells at the same time, thus eliminating both MHC positive and negative tumor cells, the NKT cell-targeted therapy is a promising strategy for cancer treatment (Figures 1B,C).

NKT CELL-MEDIATED ADJUVANT EFFECTS ON DC MATURATION

Another important NKT cell function is their ability to interact with immature DCs in the presence of α -GalCer to induce DC maturation (17). Therefore, NKT cell-targeted therapy is also useful for advanced cancer patients, who often suffer from severe immunodeficiency. DCs in these advanced cancer patients are usually immature because of the presence of immune suppressive cytokines, such as IL-10 or TGF β , produced by tumor cells (Figure 1A) (23). The immature DCs are able to capture tumor antigens, but unable to activate specific T cells. However, immature DCs presenting α -GalCer are activated by NKT cells through CD40-CD40L interactions to produce IFN- γ , which induce full DC maturation (24). This leads to a robust interleukin (IL)-12 response to further activate NKT cells, followed by activation of CD8T cells and NK cells (17, 24).

The DC maturation by activated NKT cells is a prominent strategy for the enhancement of protective innate and acquired immune responses. To investigate the mechanisms of bystander potential of α -GalCer-activated NKT cells, an experimental system

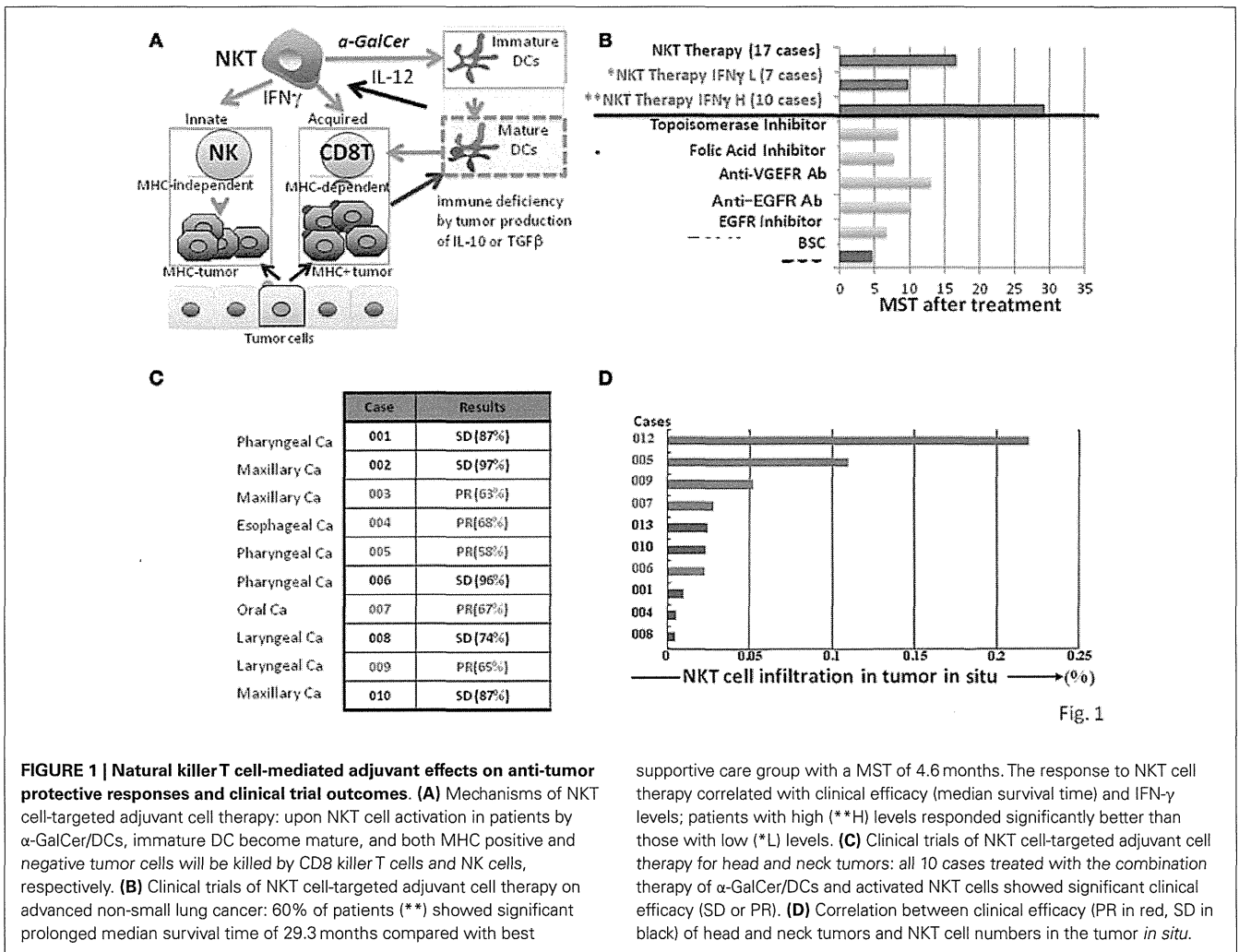


Fig. 1

FIGURE 1 | Natural killer T cell-mediated adjuvant effects on anti-tumor protective responses and clinical trial outcomes. (A) Mechanisms of NKT cell-targeted adjuvant cell therapy: upon NKT cell activation in patients by α -GalCer/DCs, immature DC become mature, and both MHC positive and negative tumor cells will be killed by CD8 killer T cells and NK cells, respectively. **(B)** Clinical trials of NKT cell-targeted adjuvant cell therapy on advanced non-small lung cancer: 60% of patients (***) showed significant prolonged median survival time of 29.3 months compared with best

supportive care group with a MST of 4.6 months. The response to NKT cell therapy correlated with clinical efficacy (median survival time) and IFN- γ levels; patients with high (**H) levels responded significantly better than those with low (*L) levels. **(C)** Clinical trials of NKT cell-targeted adjuvant cell therapy for head and neck tumors: all 10 cases treated with the combination therapy of α -GalCer/DCs and activated NKT cells showed significant clinical efficacy (SD or PR). **(D)** Correlation between clinical efficacy (PR in red, SD in black) of head and neck tumors and NKT cell numbers in the tumor *in situ*.

using immunization with OVA-loaded TAP-deficient spleen cells loaded with OVA after permeabilization by osmotic shock was developed. In this system, OVA was used as an artificial tumor antigen to induce OVA-specific CD8 T cells to kill OVA-bearing tumor cells. Only after α -GalCer administration, IFN- γ production by NK and CD8T cells was observed (see Figure 2A). Under these conditions, the clonal expansion of OVA-specific CD8 T cells and strong anti-tumor responses develop in the mice, and the response requires co-administration of α -GalCer (17).

CLINICAL TRIAL OF NKT CELL-TARGETED THERAPY FOR ADVANCED LUNG CANCER AND HEAD AND NECK TUMORS

For effective NKT cell activation, α -GalCer/DC has distinct advantages to induce significant expansion of NKT cells and to inhibit *in vivo* tumor growth in a mouse model of metastatic lung cancer and liver metastasis in melanoma (25, 26). In a preclinical study, we used mouse melanoma cells, which were injected into the spleen to induce liver metastasis. Treatment of tumor-bearing mice by intravenous administration of α -GalCer/DCs (3×10^6) resulted in complete eradication of the liver metastasis within 7 days after treatment (27).

Based on the dramatic effects of α -GalCer/DCs in the pre-clinical studies, a clinical trial of NKT cell-targeted immunotherapy was conducted at Chiba University hospital in patients with advanced non-small cell lung cancer to evaluate the safety, feasibility, immunological responses, and clinical outcomes (28). Seventeen patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer refractory to the standard treatments, including surgery, chemotherapy, and radiation therapy, completed the protocol. The patient's peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained by apheresis were cultured with GMP grade GM-CSF and IL-2 for 7 days and then pulsed with α -GalCer (29). The α -GalCer-pulsed PBMCs were then intravenously administered (1×10^9 cells/ m^2 /injection) back into autologous patients twice with a 1-week interval followed by two courses with a 1-month interval between the second and third administration.

In the 17 patients who completed the protocol of a phase IIa clinical trial, the treatment was well-tolerated, and no severe adverse events related to the cell therapy were observed (28, 30). To monitor IFN- γ production by NKT cells from the patients, an enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay was performed (31). The results demonstrated that a significant increase in the number of IFN- γ -producing PBMCs was detected in 10 out of

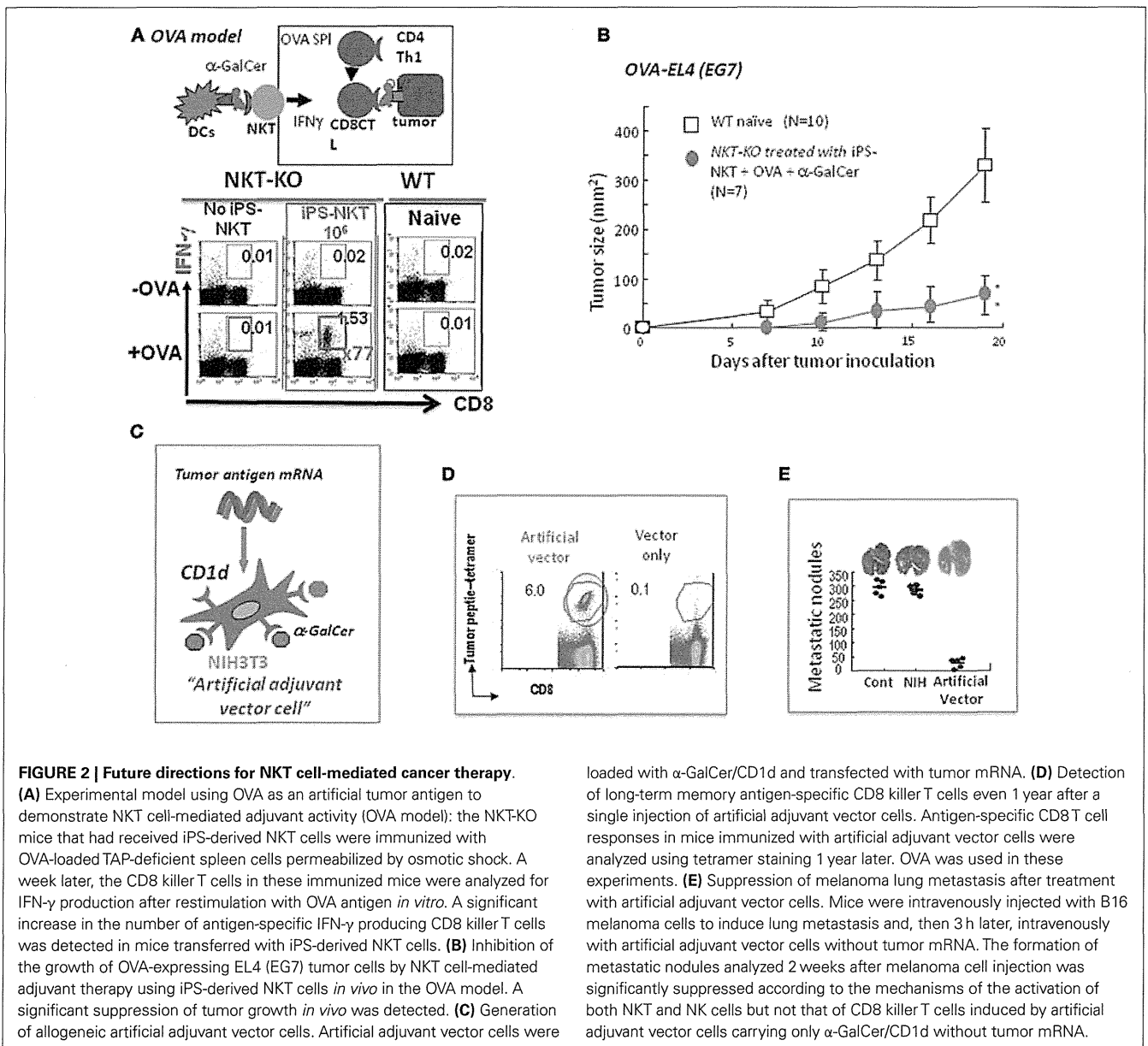


FIGURE 2 | Future directions for NKT cell-mediated cancer therapy.

(A) Experimental model using OVA as an artificial tumor antigen to demonstrate NKT cell-mediated adjuvant activity (OVA model): the NKT-KO mice that had received iPS-derived NKT cells were immunized with OVA-loaded TAP-deficient spleen cells permeabilized by osmotic shock. A week later, the CD8 killer T cells in these immunized mice were analyzed for IFN- γ production after restimulation with OVA antigen *in vitro*. A significant increase in the number of antigen-specific IFN- γ producing CD8 killer T cells was detected in mice transferred with iPS-derived NKT cells. **(B)** Inhibition of the growth of OVA-expressing EL4 (EG7) tumor cells by NKT cell-mediated adjuvant therapy using iPS-derived NKT cells *in vivo* in the OVA model. A significant suppression of tumor growth *in vivo* was detected. **(C)** Generation of allogeneic artificial adjuvant vector cells. Artificial adjuvant vector cells were

loaded with α -GalCer/CD1d and transfected with tumor mRNA. **(D)** Detection of long-term memory antigen-specific CD8 killer T cells even 1 year after a single injection of artificial adjuvant vector cells. Antigen-specific CD8 T cell responses in mice immunized with artificial adjuvant vector cells were analyzed using tetramer staining 1 year later. OVA was used in these experiments. **(E)** Suppression of melanoma lung metastasis after treatment with artificial adjuvant vector cells. Mice were intravenously injected with B16 melanoma cells to induce lung metastasis and, then 3 h later, intravenously with artificial adjuvant vector cells without tumor mRNA. The formation of metastatic nodules analyzed 2 weeks after melanoma cell injection was significantly suppressed according to the mechanisms of the activation of both NKT and NK cells but not that of CD8 killer T cells induced by artificial adjuvant vector cells carrying only α -GalCer/CD1d without tumor mRNA.

17 patients, which was correlated with a significantly prolonged median survival time (MST; 29.3 months) in comparison with the group with no increase compared to the pretreatment status in IFN- γ -producing cells (MST of 9.7 months) (Figure 1B) (32). The α -GalCer-reactive IFN- γ spot forming cells appeared to include both NKT cells and NK cells (31, 33), consistent with the notion that α -GalCer-activated NKT cells subsequently stimulate NK cells to produce IFN- γ (34, 35). We also investigated NKT cell infiltration in the surgically resected tumor samples and found a significant increase (25- to 60-fold) in the number of NKT cells in the tumor *in situ* (36). Because of the clinical correlation between increased IFN- γ production and prolonged overall survival, we conclude that IFN- γ may be a good biological marker for predicting clinical efficacy of this treatment. Although this prediction cannot be made prior to α -GalCer/DCs administration,

the monitoring of IFN- γ production would still be valuable for patients receiving this immunotherapy. Although none of the cases showed significant tumor regression, the overall MST of all 17 patients (18.6 months) was superior to that of patients with best supportive care (4.6 months) or those treated with other types of therapies (average 10 months) in Figure 1B (37–40).

In the case of the head and neck tumors, we used a combination therapy with α -GalCer/DCs (10^8) and activated NKT cells (5×10^7) and completed 10 cases, including patients with pharyngeal, laryngeal, esophageal, maxillary, and oral carcinomas, who had advanced or recurrent disease after standard treatments (41). All treated patients showed either a partial response or achieved a stable disease state, indicating significant clinical efficacy (Figure 1C), which was associated with significant NKT cell infiltration into the tumor *in situ* (Figure 1D). To evaluate