

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19599004

研究課題名 (和文) ヒトナチュラルキラーT細胞を用いた免疫療法の開発

研究課題名 (英文) Immunotherapy with human natural killer T cells

研究代表者

高橋 強志 (TAKAHASHI TSUYOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 70332608

研究成果の概要：ヒトナチュラルキラーT (NKT) 細胞の血液悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果について検討した。NKT 細胞は、CD1d 分子に拘束され糖脂質を認識するが、CD1d 分子を発現した腫瘍細胞を直接傷害することが我々も含めて報告されている。しかし CD1d 分子を高発現している B 細胞性腫瘍などに対して直接の細胞傷害活性がみられない場合がある。これに関して、腫瘍細胞による NKT 活性化の抑制メカニズムが考えられた。実際、NKT 細胞は CD1d 分子を発現した CEM, MOLT4, Jurkat といった T 細胞性腫瘍株に対しては高い細胞傷害活性を示すが、同様に CD1d 分子を高発現している、RAMOS, IM9, BALL1 などの B 細胞性腫瘍株に対しては細胞傷害活性が認められない。これに対し、NKT 細胞が発現している可能性がある抑制性の NK レセプターを介した抑制の可能性があるか否かを検討した。Va24+/Vb11+TCR を持った NKT 細胞においては、抑制性 NK レセプターである NKG2A の発現が確認された。またそのリガンドである HLA-E 分子の発現を調べると、細胞傷害活性がみられる細胞株のいずれも HLA-E 分子を発現しておらず、また B 細胞性腫瘍株を中心とする CD1d 分子の発現がみられるが細胞傷害活性がみられない腫瘍株においては、HLA-E 分子を発現していることが確認された。このことより、腫瘍細胞株に発現する HLA-E 分子は、NKT 細胞の発現する NKG2A などの抑制性 NK レセプターと相互作用し、NKT の活性化を抑制し、抗腫瘍作用からエスケープしている可能性が示唆された。今後、より解析を進め、抑制性 NK レセプターに対するシグナルを阻害する等により、より効率よく NKT 細胞による癌免疫療法を進展させたいと考える。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：免疫制御学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ヒトナチュラルキラーT細胞（以下 NKT 細胞）は、近年免疫担当細胞としてその機能が明らかにされてきたリンパ球である。通常の T 細胞とは異なり、CD1d 分子に拘束され、糖脂質を認識する。NKT 細胞は、Th1, Th2 型の多種類のサイトカインを産生した FasL やパーフォリンなどを用いた細胞傷害活性を發揮し、腫瘍免疫をはじめとして、感染免疫や自己免疫、移植免疫等多くの免疫応答に関与することが報告されてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト NKT 細胞を用いた癌免疫細胞療法の基盤づくりにある。ヒト NKT 細胞は、IFN- γ や TNF- α などを産生し NK 細胞や腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞を誘導、活性化することにより抗腫瘍活性を發揮することができるが、さらに CD1d 発現腫瘍細胞を直接認識し、パーフォリン・グランザイム系を用いて細胞傷害を起こすことが可能である。T 細胞性腫瘍をはじめとして B 細胞性腫瘍や単球系腫瘍など主に血液悪性疾患における多くの腫瘍細胞は CD1d 分子を発現しているが、必ずしもこれらのすべての細胞が NKT 細胞に感受性があるわけではない。この原因の一つとして、腫瘍細胞が、NKT 細胞の活性化を抑制している可能性がある。本研究においては、NKT 細胞の CD1d 分子発現腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を調べるとともに腫瘍による NKT 細胞の活性化抑制のメカニズムについて検討する。

3. 研究の方法

3 - 1

健常人より単核球を分離し、 α -GalCer (NKT のリガンド) を添加した単球にて刺激を行う。

V α 24/V β 11 TCR 共陽性細胞をソートする。さらに α -GalCer 添加単球にて刺激を繰り返す。純度の高い NKT 細胞が充分量得られるまで上記を繰り返す。得られたヒト NKT 細胞を以下の実験に用いる。

3 - 2

種々の血液悪性腫瘍細胞株における CD1d 分子の発現および HLA-E 分子の発現を標識抗体とフローサイトメトリーを用いて調べる。また NKT 細胞において HLA-E 分子のリガンドとなる NKG2A 分子の発現を調べる。

3 - 3

上記 3 - 2 で調べた種々の血液悪性腫瘍細胞株に対し NKT 細胞の細胞傷害活性について ^{51}Cr 放出試験を用いて調べる。

4. 研究成果

健常人 3 名より 98% 以上の純度を持つ NKT 細胞を充分量得た。得られた NKT 細胞は α -GalCer を乗せた CD1d-dimer により特異的に染まった。また NKT 細胞は、 α -GalCer 添加単球により活性化されこれは抗 CD1d 抗体により阻害されるがコントロール抗体では阻害されなかった。またこの NKT 細胞集団は α -GalCer 添加単球による活性化で IFN- γ および IL-4 サイトカインを大量に産生した。

NKT 細胞による直接的な細胞傷害活性が抑制されているメカニズムとして NKT に発現する抑制性レセプターの関与の可能性を考え、抑制性 NK レセプターである NKG2A とそのリガンドである HLA-E 分子の発現を検討した。初めに、血液悪性腫瘍細胞株の CD1d 分子および HLA-E 分子発現についてフローサイトメトリーを用いて調べた。T 細胞性腫瘍株である、CEM は CD1d の発現は +, HLA-E の発現は陰性, MOLT4 は CD1d

の発現は++, HLA-Eの発現は陰性, JurkatはCD1dの発現は++, HLA-Eの発現は+/-であった。B細胞性腫瘍株である、RAMOSはCD1dの発現は++, HLA-Eの発現は+, IM9はCD1dの発現は+, HLA-Eの発現は+, BALL-1はCD1dの発現は+, HLA-Eの発現は陰性であった。骨髓球系腫瘍株であるK562はCD1dの発現は陰性, HLA-Eの発現は+, HL60はCD1dの発現は陰性, HLA-Eの発現は陰性, U937はCD1dの発現は+/-, HLA-Eの発現は陰性, THP-1はCD1dの発現は+/-, HLA-Eの発現は陰性であった。次に、純化したNKT細胞において、抑制性NKレセプターでありHLA-E分子と結合するNKG2A分子の発現について調べた。その結果、NKT細胞においては、十分量のNKG2A分子が発現していることが確認された。

次に増幅したNKT細胞を用いて、血液悪性腫瘍細胞株に対するNKT細胞の細胞傷害活性を⁵¹Cr放出試験にて調べた。腫瘍細胞株としては、T細胞性腫瘍株である、CEM, MOLT4, Jurkat, B細胞性腫瘍株である、RAMOS, IM9, BALL-1, 骨髓球系腫瘍株であるK562, HL60, U937, THP-1を用いた。エフェクターであるNKT細胞とターゲットである腫瘍細胞株を様々な比(E/T ratio)で4時間混合培養し細胞傷害活性の評価を行った。結果は、T細胞性腫瘍株である、CEM, MOLT4, Jurkat, に対してはいずれも高い細胞傷害活性を示した。また、B細胞性腫瘍株である、RAMOS, IM9, BALL-1に対しては、NKT細胞による細胞傷害活性は認められなかった。骨髓球系腫瘍株においてはK562, HL60に対して細胞傷害活性は認められず、U937, THP-1に対しては細胞傷害活性が認められた。

以上の結果より、NKT細胞が腫瘍細胞株に対し細胞傷害活性を発揮するのは、標的腫

瘍細胞がCD1d分子を発現し、かつHLA-E分子を発現していない条件の時のみであり、腫瘍細胞によるHLA-E分子発現がNKT細胞の活性を抑制する可能性が示唆された。

多くの血液悪性腫瘍細胞株では、CD1d分子を発現していることが、NKT細胞による直接細胞傷害には必須だが、その場合でもHLA-E分子など抑制性シグナルが入ることなどによりNKT細胞による細胞傷害活性が抑制される可能性が本研究で示唆された。今後、NKG2Aの結合阻害による抑制効果の減弱またこの系以外での抑制のメカニズムなどを検討していき、効率の良いNKT細胞による癌の免疫細胞療法の確立を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)
なし。

〔学会発表〕(計 0件)
なし。

〔図書〕(計 0件)
なし。

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
なし。

取得状況(計 0件)
なし。

〔その他〕
なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高橋 強志 (TAKAHASHI TSUYOSHI)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70332608

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

なし。