

## クリプトシアニン色素 (NK-4) による Natural Killer T (NKT) 細胞活性化作用

國方敏夫,\* 河野恵三, 牛尾慎平, 福田恵温

## Activation of Natural Killer T Cells by NK-4, a Cryptocyanine Dye

Toshio KUNIKATA,\* Keizo KOHNO, Shimpei USHIO, and Shigeharu FUKUDA  
Biomedical Institute, Research Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.,  
675-1 Fujisaki, Naka-ku, Okayama 702-8006, Japan

(Received April 28, 2011; Accepted August 2, 2011; Published online August 9, 2011)

We previously reported that oral administration of NK-4, a cryptocyanine dye, enhances interleukin (IL)-12-dependent interferon (IFN)- $\gamma$  production by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mouse splenocytes. These findings raised a possibility that NK-4 potentiated IFN- $\gamma$  production by T cells, natural killer (NK) cells or natural killer T (NKT) cells in response to IL-12 produced by macrophage and dendritic cells. To explore this possibility, we first analyzed percentages of T, NK or NKT cells in splenocytes of mice that were administered NK-4 orally for three days. The percentage of NKT cells in splenocytes from NK-4-treated mice was significantly ( $p < 0.05$ ) increased compared to vehicle-treated mice. When splenocytes were stimulated with  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer), an NKT cell ligand, IFN- $\gamma$  production by splenocytes from NK-4-treated mice tended to increase, while no difference in the IL-4 production and proliferation were observed between the vehicle- and NK-4-treated mice. When IFN- $\gamma$ /IL-4 ratios were calculated in individual mice, the ratios were significantly ( $p < 0.05$ ) elevated in NK-4-treated mice. Furthermore, IL-12 production by  $\alpha$ -GalCer-stimulated splenocytes from NK-4-treated mice was also significantly ( $p < 0.05$ ) increased. These results suggest that oral administration of NK-4 increases the population of type I NKT cells with potent IFN- $\gamma$ -producing activities. Since IL-12 and IFN- $\gamma$  have been shown to play important roles in anti-tumor immunity as well as in the defence against bacterial infection, our results further imply that NK-4 may provide a potential therapeutic tool in cancer immunotherapy.

**Key words**—NK-4; natural killer T (NKT) cell;  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer); interferon (IFN)- $\gamma$ ; interleukin (IL)-12

## 緒 言

染料は古くからその染色性により、生物学や医学の分野においても、バクテリアや組織の観察を主な目的として研究が重ねられてきた。こうした中で、Domagk によりアゾ色素の一種である赤色プロントジルに、連鎖球菌による感染症に対する高い治療効果があることが見いだされた。プロントジルは世界初のサルファ剤系合成抗菌薬として利用されるとともに、その後の微生物感染症に対する化学合成治療薬の発展につながったといわれている。<sup>1)</sup> 写真乳剤用の染料として広く用いられてきた感光色素には、抗菌作用<sup>2)</sup>を始め抗腫瘍作用、<sup>3)</sup> 抗酸化作用、<sup>4)</sup> マクロファージ活性化作用<sup>5)</sup>などが報告されており、免

疫賦活剤として、アレルギー治療<sup>6,7)</sup>やリウマチ治療<sup>8)</sup>にも用いられている。また、シアニン系感光色素には、ヌードマウスに移植したヒト胃がん、ヒト肺がん、マウス悪性黒色腫等に対し抗腫瘍作用があること、<sup>9,10)</sup> 肝がん治療や胃がん治療に行われるエタノールのがん巣内投与系において、エタノールにシアニン系感光色素を加えることでがんの凝固壊死を誘導すること、<sup>9,11)</sup> ラット虚血再灌流モデルにおける大脳への傷害を軽減する作用があること<sup>12)</sup>などが報告されている。

Natural killer T (NKT) 細胞は T 細胞と natural killer (NK) 細胞の両方の性質を併せ持つ第 4 のリンパ球として 1990 年代に分画された。NKT 細胞は数が非常に少なく、ヒト末梢血においては単核球の 0.1%程度といわれているが、種を超えて保存されていることから、極めて重要な機能を持つと考えられている。Helper T (Th) 細胞が T cell receptor (TCR)

株式会社林原生物化学研究所研究センター医薬研究部門

\*e-mail: t-kuni@hayashibara.co.jp

/CD3 複合体により抗原提示細胞の Major Histocompatibility Complex (MHC) クラス II 分子とともに提示された抗原ペプチドを認識するのは対照的に, NKT 細胞は  $V\alpha 14V\beta 8$  (ヒトでは  $V\alpha 24V\beta 11$ ) /CD3 複合体により抗原提示細胞の CD1d 分子に結合したスフィンゴ糖脂質である  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) を認識して活性化する.<sup>13)</sup> 活性化すると interferon (IFN)- $\gamma$  や interleukin (IL)-4, IL-10 などのサイトカインを迅速に産生する<sup>14)</sup> ことによって, 感染免疫, 移植免疫, 自己免疫, アレルギーなどにおいて, 免疫制御性リンパ球として重要な機能を発揮するといわれている. NKT 細胞にはいくつかのサブセットが知られており, 特に発現する TCR $\alpha$  鎖の違いによって, 上記の単一の  $\alpha$  鎖 (マウスでは  $V\alpha 14J\alpha 18$ , ヒトでは  $V\alpha 24J\alpha 18$ ) を発現し, 主に腫瘍免疫を促進する type I と, 多様な TCR を有し腫瘍免疫を抑制する type II の 2 種類に分けられる. Type I NKT 細胞は, 未成熟な樹状細胞の CD1d 分子によって提示された  $\alpha$ -GalCer や内因性の糖脂質との結合並びに, CD40/CD40 ligand (L) 相互作用によって活性化され, IFN- $\gamma$  を産生する. この CD40-CD40L 相互作用と IFN- $\gamma$  によって未成熟な樹状細胞は成熟化し, 抗腫瘍活性を有する液性因子である IL-12 の産生を介して, さらに type I NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を増大させる.<sup>15)</sup> この IL-12 や IFN- $\gamma$  が NK 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞, マクロファージを活性化し, 腫瘍免疫作用を発揮する. また, toll-like receptor (TLR) リガンドがこれらサイトカイン産生を増強させるともいわれている.

われわれはこれまでに, シアニン系感光色素である NK-4 (4,4'-{3-[2(1-ethyl-4-(1-H) quinolylidene) ethylidene]} propenylene [bis(1-ethyl quinolinium iodide)]) を経口投与したマウスの脾臓細胞を lipopolysaccharide (LPS) で刺激すると, IL-12 産生を介した IFN- $\gamma$  産生が増強されることを報告した.<sup>16)</sup> このことから, NK-4 はマクロファージや樹状細胞から産生される IL-12 に応答して IFN- $\gamma$  を産生する T 細胞, NK 細胞及び NKT 細胞等の IL-12 のターゲット細胞を活性化している可能性が考えられた. そこでわれわれは, この可能性について検討するため, 最初に NK-4 を経口投与したマウス脾臓細胞中の T, NK あるいは NKT 細胞の比率

について解析した. その結果, NK-4 の経口投与により NKT 細胞の割合が有意に増加している知見を得た. こうした NK-4 の作用には, NKT 細胞の中でも特に type I NKT 細胞が深く関与していると考え, NKT 細胞リガンドである  $\alpha$ -GalCer を用いてさらに NKT 細胞の活性化作用について検討した.

## 材料と方法

**1. 標品** NK-4 (4,4'-{3-[2(1-ethyl-4-(1-H) quinolylidene) ethylidene]} propenylene [bis(1-ethyl quinolinium iodide)], Fig. 1) は, 榊林原生物化学研究所 (Okayama, Japan) において合成したものを重碳酸ナトリウムにより 200 倍希釈 (w/w) したものをを用いた. 以下標品濃度は NK-4 あたりの濃度で表記した.

**2. 動物及び試薬** C57BL/6N マウス (メス) は日本チャールスリバー (Kanagawa, Japan) より 5 週齢で購入し 6 週齢で使用した.  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer; KRN7000, Funakoshi, Japan), lipopolysaccharide (LPS, Difco, Detroit, MI, USA), fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識-ハムスター抗マウス T cell receptor  $\beta$  chain (TCR $\beta$ ) 抗体 (PharMingen, CA, USA), ビオチン標識-マウス抗マウス NK1.1 抗体 (PharMingen), FITC 標識-ハムスター抗マウス CD11c 抗体 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), phycoerythrin (PE) 標識-ストレプトアビジン (PharMingen), ラット抗マウス CD16/CD32 抗体 (Fc Block<sup>®</sup>, PharMingen) は市販品を購入した.

**3. NK-4 の投与** 動物実験においては, 榊林

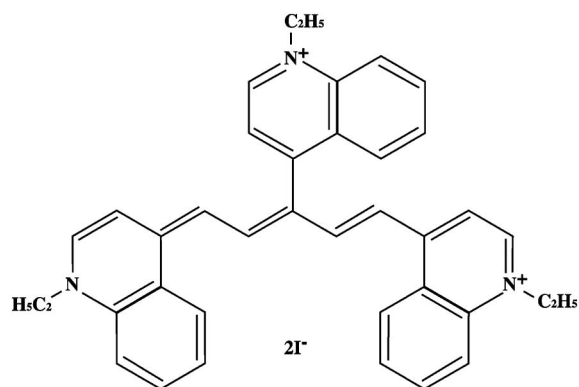


Fig. 1. Chemical Structure of NK-4 (4,4'-{3-[2(1-ethyl-4-(1-H) quinolylidene) ethylidene]} propenylene [bis(1-ethyl quinolinium iodide)])

原生物化学研究所動物実験指針に従い実施した。NK-4は生理食塩水により100 µg/mlあるいは300 µg/mlに溶解し、マウスの体重に対し1 mg/kgあるいは3 mg/kgを胃ゾンデで強制的に投与した。1日1回、3日間連続投与した翌日に脾臓を摘出し、脾細胞の浮遊液を調製した。コントロール群として、同濃度に調製した重炭酸ナトリウム溶液を投与した。

**4. サイトカイン産生試験** NK-4を投与した各マウスから脾臓を摘出し、細胞浮遊液を調製した。脾細胞は氷冷下、トリス-塩化アンモニウム (ACT) 溶液 (pH 7.6) で5分間処理し、赤血球を溶血させた後、10% fetal bovine serum (FBS) 及び10 mM HEPESを含むPRMI-1640培地で洗浄した。同培地により適宜種々の濃度に懸濁し、試験に用いた。

脾細胞は $5 \times 10^6$ 個/mlあたり5 µg/ml LPSあるいは100 ng/ml  $\alpha$ -GalCer刺激下、37°C、5% CO<sub>2</sub>環境下で培養した。

LPS刺激による試験は、われわれの以前の報告における方法<sup>16)</sup>に従い、刺激時間を72時間とした。また、 $\alpha$ -GalCer刺激した脾細胞からのIFN- $\gamma$ 並びにIL-4産生は、刺激後48時間で最大となるが、それに先立って、18時間から24時間後にIL-12産生が最大になる<sup>17)</sup>といわれている。したがって、培養開始から18時間後、48時間後、あるいは72時間後に上清を回収し、上清中の各種サイトカイン量を、特異的サンドウィッチ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。

培養上清回収後の細胞については、alarBlue® (TREK DIAGNOSTIC SYSTEMS, Cleve Land, OH, USA)を添加した培地により一定時間培養し、上清の蛍光強度を測定し、細胞の増殖に与える影響を確認した。

**5. フローサイトメーターによるNKT細胞及び樹状細胞の解析** 脾細胞はラット抗マウスCD16/CD32抗体を反応させた後、NKT細胞の解析についてはFITC標識-抗TCR $\beta$ 抗体及びビオチン標識-抗NK1.1抗体と反応させ、さらにPE標識ストレプトアビジンを反応させた。樹状細胞の解析については、FITC標識-抗CD11c抗体を反応させた。反応は氷冷下で行い、各反応の終了毎に脾細胞を0.5% BSAを含むPBSで2回洗浄した。染色後

の脾細胞はEPICS XL system IIフローサイトメーター (Beckman Coulter Electronics Inc., Hialeah, FL, USA) により分析した。

**6. 有意差検定** データは平均値 $\pm$ S.D.で示し、2群間の平均値の比較は*t*検定によりVehicle群に対する有意差を検定した。3群間の平均値の比較は、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合にTurkey検定による多重比較を行った。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

## 結 果

**1. LPS刺激C57BL/6Nマウス脾細胞のIFN- $\gamma$ 産生に対するNK-4の作用** C57BL/6Nマウスを使用するにあたって、BALB/cマウスを使用した前報<sup>16)</sup>と同様にNK-4を経口投与したマウスの脾臓細胞をLPSで刺激することで、IFN- $\gamma$ 産生の亢進作用が認められるか否かの確認を行った。C57BL/6Nマウスに対して、NK-4を1 mg/kgあるいは3 mg/kgで3日間経口投与し、翌日脾細胞を調製した。5 µg/ml LPS存在下で72時間培養し、上清中のIFN- $\gamma$ 量をELISAにより測定した。Figure 2にはNK-4 1 mg/kg投与群とvehicle投与群との比較を示したが、vehicle群と比較して、NK-4投与群で有

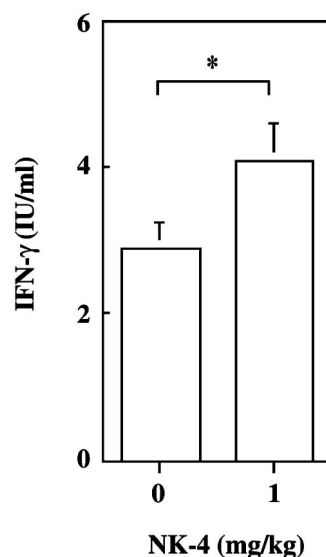


Fig. 2. Effect of NK-4 on the IFN- $\gamma$  Production by LPS-stimulated Splenocytes

Splenocytes obtained from vehicle- or NK-4-administered mice were stimulated with LPS at 5 µg/ml for 72 h. Culture supernatants were collected and IFN- $\gamma$  levels were determined by specific sandwich ELISA. The data show the result of one representative experiment of two similar experiments. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the IFN- $\gamma$  levels between vehicle- and NK-4-administered groups was observed.

意 ( $p < 0.05$ ) に IFN- $\gamma$  産生量が亢進していた。1 mg/kg 投与群と 3 mg/kg 投与群の間では有意な差は認められなかったため、以下の実験は 1 mg/kg で実施した。

**2. マウス脾細胞中の NKT 細胞の割合に対する NK-4 の作用** C57BL/6N マウスに対して NK-4 を 3 日間経口投与し、翌日脾細胞中の NKT 細胞、NK 細胞及び T 細胞の割合を、抗 NK1.1 抗体及び抗 TCR $\beta$  抗体を用いて解析した。Vehicle 群では脾臓における NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> 細胞 (NKT 細胞) の割合が  $2.97 \pm 0.26\%$  であったのに対し、NK-4 投与群では  $3.37 \pm 0.29\%$  と有意に上昇していた ( $p < 0.05$ , Fig. 3)。一方、NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>-</sup> 細胞 (NK 細胞) 及び NK1.1<sup>-</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> 細胞 (T 細胞) に有意な変化はみられなかった。

**3.  $\alpha$ -GalCer 刺激脾細胞の Th1/Th2 サイトカイン産生に対する NK-4 の作用** マウスより調製した脾細胞を 100 ng/ml  $\alpha$ -GalCer 存在下で 48 時間培養し、上清中の IFN- $\gamma$  並びに IL-4 を ELISA により測定した。その結果、NK-4 投与群で IFN- $\gamma$  の産生が促進される傾向 [ $p = 0.182$ , Fig. 4(B)] にあつ

た。このとき、IL-4 産生には差はみられなかった [Fig. 4(C)]。各個体において、IFN- $\gamma$  産生量と IL-4 産生量の比率 (IFN- $\gamma$ /IL-4 比) を算出した結果、NK-4 投与群においては有意 ( $p < 0.01$ ) に IFN- $\gamma$ /IL-4 比が高く、NK-4 の経口投与により、 $\alpha$ -GalCer の刺激で IL-4 よりも IFN- $\gamma$  産生能の高い NKT 細胞が増加していることが示唆された [Fig. 4(D)]。なお、脾細胞の増殖に差はみられなかった [Fig. 4(A)]。

**4.  $\alpha$ -GalCer 刺激脾細胞の IL-12 産生に対する NK-4 の作用** NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生に先立って、NKT に  $\alpha$ -GalCer を提示する樹状細胞からの IL-12 産生が起こるといわれている。今回、NK-4 投与マウス脾細胞を  $\alpha$ -GalCer 刺激することにより、IFN- $\gamma$  産生のみが増加する傾向にあったことから、IL-12 の関与が考えられた。そこで、 $\alpha$ -GalCer 刺激条件下で、培養開始から 18 時間後における上清中の IL-12 量を測定した結果、NK-4 投与群で有意 ( $p < 0.05$ ) に IL-12 産生量が高かった (Fig. 5)。

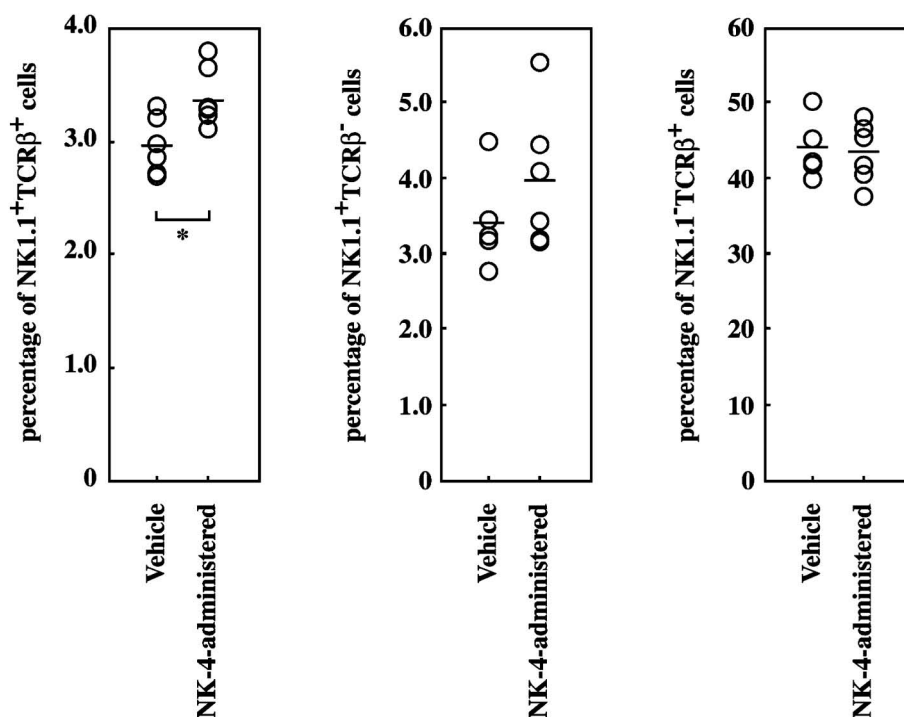


Fig. 3. Oral Administration of NK-4 Increases the Population of NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> Cells in Splenocytes

NK-4 was administered orally at 1 mg/kg into C57BL/6N mice ( $n=6$ ) daily for 3 days. Splenocytes were analyzed by flow cytometry. The data shows the result of one representative experiment of four similar experiments. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the mean NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> cell percentage between vehicle- and NK-4-administered groups was observed.

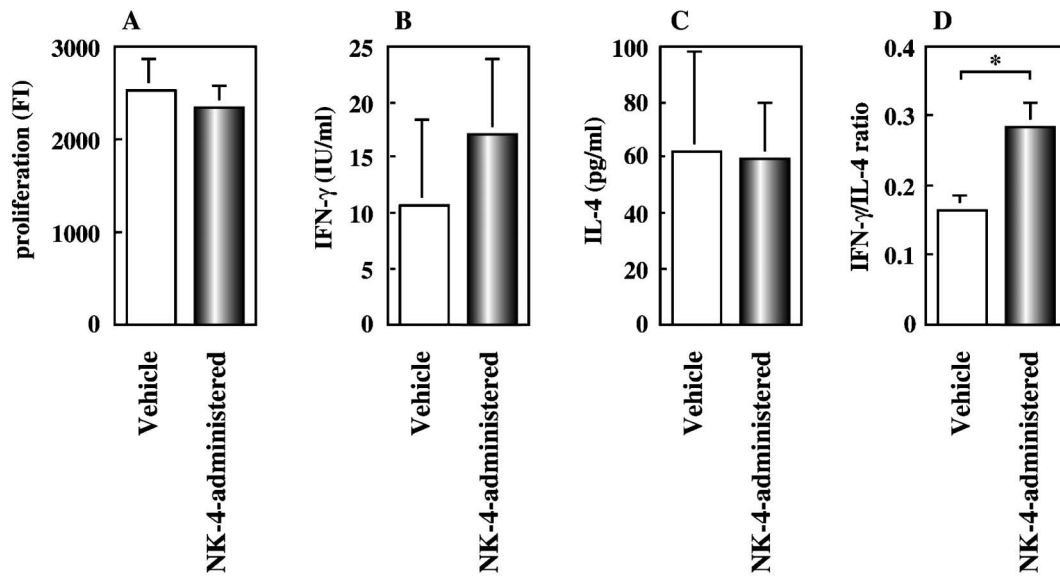


Fig. 4. Effect of NK-4 on the Proliferation and Cytokine Production by  $\alpha$ -GalCer-stimulated Splenocytes

Splenocytes obtained from vehicle- or NK-4-administered mice were stimulated with  $\alpha$ -GalCer at 100 ng/ml for 48 h. Culture supernatants were collected and IFN- $\gamma$  and IL-4 levels were determined by specific sandwich ELISAs. IFN- $\gamma$ /IL-4 ratios were calculated individually. Cell proliferation was assessed by adding alamarBlue<sup>®</sup> to the culture for 1 h at 37°C and cultured supernatant were determined by fluorescence microplate reader. The data show the result of one representative experiment of four similar experiments. A statistically significant difference ( $p < 0.01$ ) in the mean IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio between vehicle- and NK-4-administered groups was observed.

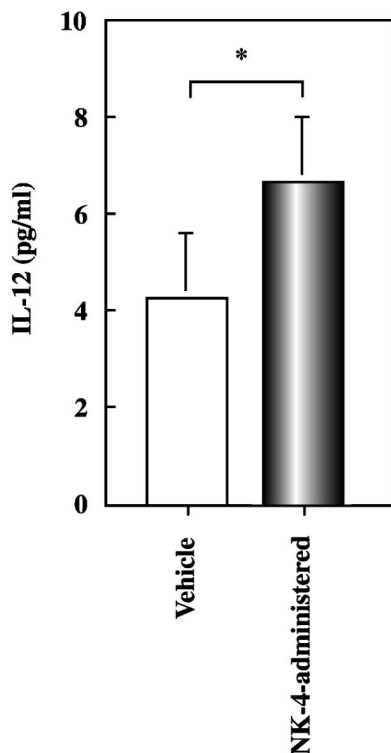


Fig. 5. Effect of NK-4 on the IL-12 Production by  $\alpha$ -GalCer-stimulated Splenocytes

Splenocytes obtained from vehicle- or NK-4-administered mice were stimulated with  $\alpha$ -GalCer for 18 h. Culture supernatants were collected and IL-12 levels were determined by specific sandwich ELISA. The data show the result of one representative experiment of three similar experiments. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) in the IL-12 levels between vehicle- and NK-4-administered groups was observed.

## 考 察

われわれはこれまでに、NK-4を1 mg/kgで3日間経口投与したBALB/cマウス脾臓細胞をLPSで刺激することにより、IFN- $\gamma$ 産生を有意に促進することを報告している。<sup>16)</sup>同時に、この作用は刺激時に抗IL-12抗体を添加することで抑制されることを確認している。これらのことから、NK-4には抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞からのIL-12産生を増強させ、このIL-12によって活性化されるT細胞、NK細胞及びNKT細胞の機能を増強する作用を有する可能性が考えられた。そこで今回、まずNK-4によるこれらの細胞群の脾臓細胞中の割合について解析した。

NKT細胞の識別にしばしば用いられる代表的なマーカーはNK1.1抗原であり、NKT細胞の機能解析を目的とする広範囲の実験において、NK1.1抗原を発現するC57BL/6マウスが用いられている。以前の試験<sup>16)</sup>で用いたBALB/cマウスは、NK1.1抗原を発現していない。<sup>18)</sup>また、BALB/cマウスにおけるNKT細胞のマーカーとしてはLy49ファミリーなどが知られているが、発現量が低く、解析が困難であったため、C57BL/6NマウスにおけるNK1.1抗原による検討を行うことにした。C57BL/

6N マウスを用いるにあたって、NK-4 の経口投与により、LPS 刺激下で脾細胞からの IFN- $\gamma$  産生が亢進されることの確認を行った結果、C57BL/6N マウスでも BALB/c マウスと同様の作用が認められた。

NKT 細胞の各臓器における割合は肝臓で 30%、脾臓で 2%、胸腺で 1% 未満といわれており、<sup>19)</sup> 特に肝臓での発現が高い。しかしながら、免疫系の評価に用いる臓器としては、われわれの以前の報告<sup>16)</sup> と同様に免疫担当細胞を多く含む脾臓が適していると考え、まず NK-4 を経口投与した C57BL/6N マウス脾臓における、NKT 細胞のポピュレーションをフローサイトメーターにより解析した。今回のわれわれの解析では Vehicle 群マウスの脾臓における NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> NKT 細胞の割合は  $2.97 \pm 0.26\%$  であったのに対し、NK-4 投与群マウスでは  $3.37 \pm 0.29\%$  と有意 ( $p < 0.05$ ) に増加することが確認された (Fig. 3)。このとき、NK1.1<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>-</sup> NK 細胞や NK1.1<sup>-</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup> T 細胞には有意な変化は認められなかったことから、NK-4 には自然免疫と獲得免疫の両免疫系に重要な役割を果たすといわれる NKT 細胞を増加させる作用があると考えられる。

次に、NK-4 投与により有意に増加した NKT 細胞が実際に活性化されているか否かを確認するため、NKT 細胞を特異的に刺激する  $\alpha$ -GalCer 存在下で 48 時間マウス脾細胞を培養し、培養上清中のサイトカイン量を測定した。その結果、NK-4 投与マウスの脾臓細胞においては、IFN- $\gamma$  産生を亢進する傾向が認められた [Fig. 4(B)]。一方で、IL-4 の産生量には差が認められなかった [Fig. 4(C)]。両群で  $\alpha$ -GalCer 刺激による細胞増殖に差がみられなかった [Fig. 4(A)] ことから、IFN- $\gamma$  産生の亢進は単に NKT 細胞の数が増加したことによるものではなく、NKT 細胞の活性化による可能性が示唆された。NKT 細胞にはいくつかのサブセットが知られており、発現する TCR $\alpha$  鎖の種類によって V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 (ヒトでは V $\alpha$ 24) を発現する type I と、多様な TCR $\alpha$  鎖を発現する type II の 2 種類に分けられる。このうち、type I NKT 細胞が発現する TCR と CD1d は  $\alpha$ -GalCer と強い親和性を有し、IL-4 産生とともに IFN- $\gamma$  産生を誘導するといわれている。<sup>20)</sup> 本研究において、NK-4 を経口投与したマウス脾臓細胞を  $\alpha$ -GalCer 刺激すると、IL-4 よりも IFN- $\gamma$  産生

能の高い NKT 細胞の比率が上昇することがわかった。腫瘍免疫における NKT 細胞の機能に関しては、type I NKT 細胞は IFN- $\gamma$  産生を通じて NK 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞の腫瘍免疫を活性化し、これらエフェクター細胞からのパーフォリンや nitric oxide (NO)、Fas ligand (FasL) の産生により抗腫瘍作用を示すと考えられている。<sup>21)</sup> これらの報告と今回のわれわれの結果を併せて考慮すると、NK-4 は type I NKT 細胞だけでなく、IFN- $\gamma$  産生を介して抗腫瘍エフェクター細胞をも活性化することにより、腫瘍免疫増強作用を示す可能性が示唆された。

Type I NKT 細胞は、未成熟な樹状細胞が提示する抗原を認識し、なおかつ CD40/CD40L 間の相互作用により IFN- $\gamma$  を産生する<sup>17)</sup> が、これによって樹状細胞が成熟化し、IL-12 の産生が亢進されるとともに NKT 細胞の IL-12 receptor (IL-12R) 発現を上昇させる。<sup>15)</sup> IL-12 はさらに NKT 細胞を活性化し、IFN- $\gamma$  の産生を亢進することから、IL-12 産生は IFN- $\gamma$  産生に必須と考えられている。<sup>17)</sup> 今回、脾臓細胞の  $\alpha$ -GalCer 刺激条件下での培養 18 時間後における IL-12 産生量が、NK-4 投与群で有意に上昇していたことから、NK-4 投与群における  $\alpha$ -GalCer 刺激による IFN- $\gamma$  産生亢進は、活性化 NKT 細胞との相互作用により成熟化した樹状細胞からの IL-12 産生亢進によるものと考えられる。データには示さないが、NK-4 投与した C57BL/6N マウスにおいても、脾臓における樹状細胞の存在は確認された。樹状細胞が成熟化していることの確認及び、亢進された IL-12 を産生している細胞の特定は、今後の検討項目であると考えている。

がん細胞に対するキラー活性の発揮には NKT 細胞の誘導のみでは不十分で、IL-12 によって誘導される Th1 タイプサイトカインである IFN- $\gamma$  が免疫反応を助長するアジュバントとして必要である<sup>15,22)</sup> 一方、type I NKT 細胞から産生される IL-4 や IL-5、IL-10 といった Th2 サイトカインは腫瘍免疫に抑制的に働く。<sup>23)</sup>  $\alpha$ -GalCer 刺激した脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  及び IL-4 産生量について、個体毎に IFN- $\gamma$  産生量に対する IL-4 産生量の比率 (IFN- $\gamma$ /IL-4 比) を算出したところ、NK-4 投与群において、IFN- $\gamma$ /IL-4 比が有意に上昇していた [Fig. 4(D)]。IFN- $\gamma$  産生量には有意な差はみられなかったものの、IFN- $\gamma$ /IL-4 比においては両群とも標準偏差値が小

さく、低い危険率での有意差が認められたことは、個体毎に評価すると、NK-4 投与群では IL-4 産生能には変化がない一方で IFN- $\gamma$  産生能が高まっていることのあらわれであると考えられた。これらの結果からさらに、NK-4 は type I NKT 細胞を活性化し、樹状細胞の成熟化を促すことで IL-12 産生を亢進させ、さらに type I NKT 細胞からの IFN- $\gamma$  産生を増強させる一方で、腫瘍免疫系に抑制的に働く IL-4 の産生には影響を与えないことにより、腫瘍免疫系を増強させる可能性が示された。今後は、実際にモデル動物を用いた NK-4 による抗腫瘍作用の確認試験を実施したいと考えている。

$\alpha$ -GalCer はマウスモデルにおいて、抗腫瘍効果が確認されており、<sup>24)</sup>  $\alpha$ -GalCer の単回投与で NKT 細胞を介した Th1 タイプの免疫反応を引き起こす<sup>25)</sup>ことから、NKT 細胞を活性化するために有効であると考えられる。しかし、 $\alpha$ -GalCer の頻回投与ではむしろ免疫抑制的に働くといわれており、<sup>26)</sup> IL-12 の作用を増強させることのできる NK-4 は、 $\alpha$ -GalCer に代わる NKT 細胞活性化のための有効な薬剤として期待できると思われる。臨床において、がん患者の末梢血中の type I NKT 細胞の数が減少しており、<sup>27,28)</sup> NKT 細胞の数と予後が相関する<sup>29)</sup>といわれている。また、一部のがん患者においては type I NKT 細胞の活性化が不十分なため、IFN- $\gamma$  産生能が低下し、IFN- $\gamma$ /IL-4 比の低下がみられる<sup>30)</sup>ことから、NK-4 は、がん患者の腫瘍免疫系の増強に有効な薬剤となる可能性も考えられる。

## REFERENCES

- 1) Laub G. R., *South. Med. J.*, **79**, 782–785 (1986).
- 2) Mito K., *Front. Med. Biol. Eng.*, **9**, 275–284 (1999).
- 3) Berthiaume F., Reiken S. R., Toner M., Tompkins R. G., Yarmush M. L., *Nat. Biotechnol.*, **12**, 703–706 (1994).
- 4) Utsumi K., Aono K., *Med. Res. Photosensitizing Dyes*, **81**, 38–44 (1972).
- 5) Nakagawa Y., Homma S., Yamamoto I., Banno M., Nakazato H., Imanaga H., Yamamoto N., *Cancer Immunol. Immunother.*, **37**, 157–162 (1993).
- 6) Trauner K. B., Gandpur-Edwards R., Bamberg M., Shoekroff S., Sledge C., Hasan T., *Photochem. Photobiol.*, **67**, 133–139 (1998).
- 7) Chowdhary R. K., Ratkay L. G., Canaan A. J., Waterfield J. D., Richter A. M., Levy J. G., *Biopharm. Drug Dispos.*, **19**, 395–400 (1998).
- 8) Motoyoshi F., Kondo N., Ono H., Orii T., *Biotherapy*, **3**, 241–244 (1991).
- 9) Kimoto T., *Kawasaki Igakkaishi*, **20**, 91–109 (1994).
- 10) Kimoto T., Yamamoto N., Nakagawa Y., Kurimoto M., *Nihon Iji Shinpo*, **3526**, 30–34 (1992).
- 11) Kimoto T., Mito K., Homma S., Yamamoto N., Nakagawa Y., Arai S., Kurimoto M., *Nihon Iji Shinpo*, **3625**, 30–34 (1993).
- 12) Koya-Miyata S., Ohta H., Akita K., Arai S., Ohta T., Kawata T., Fukuda S., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1872–1877 (2010).
- 13) Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., Ueno H., Nakagawa R., Sato H., Kondo E., Koseki H., Taniguchi M., *Science*, **278**, 1626–1629 (1997).
- 14) Burdin N., Brossay L., Kronenberg M., *Eur. J. Immunol.*, **29**, 2014–2025 (1999).
- 15) Kitamura H., Iwakabe K., Yahata T., Nishimura S., Ohta A., Ohmi Y., Sato M., Takeda K., Okumura K., Kaer L. V., Kawano T., Taniguchi M., Nishimura T., *J. Exp. Med.*, **189**, 1121–1127 (1999).
- 16) Kunikata T., Ishihara T., Ushio S., Iwaki K., Ikeda M., Kurimoto M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1018–1021 (2002).
- 17) Tomura M., Yu W. G., Ahn H. J., Yamashita M., Yang Y. F., Ono S., Hamaoka T., Kawano T., Taniguchi M., Koezuka Y., Fujiwara H., *J. Immunol.*, **163**, 93–101 (1999).
- 18) Carlyle J. R., Mesci A., Ljutic B., Belanger S., Tai L. H., Rousselle E., Troke A. D., Proteau M. F., Makriganis A. P., *J. Immunol.*, **176**, 7511–7524 (2006).
- 19) Ohteki T., MacDonald H. R., *J. Exp. Med.*, **180**, 699–704 (1994).
- 20) Oki S., Chiba A., Yamamura T., Miyake S., *J. Clin. Invest.*, **113**, 1631–1640 (2004).
- 21) Terabe M., Berzofsky J. A., *Adv. Cancer Res.*, **101**, 277–348 (2008).
- 22) Takeda K., Hayakawa Y., Atsuta M., Hong S., Van Kaer L., Kobayashi K., Ito M., Yagita

- H., Okumura K., *Int. Immunol.*, **12**, 909–914 (2000).
- 23) Osada T., Morse M. A., Lyerly H. K., Clay T. M., *Int. Immunol.*, **17**, 1143–1155 (2005).
- 24) Nakui M., Iwakabe K., Ohta A., Sekimoto M., Sato M., Makuuchi H., Kawano T., Taniguchi M., Nishimura T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 801–804 (1999).
- 25) Fujii S., Shimizu K., Smith C., Bonifaz L., Steinman R. M., *J. Exp. Med.*, **198**, 267–279 (2003).
- 26) Kojo S., Seino K., Harada M., Watarai H., Wakao H., Uchida T., Nakayama T., Taniguchi M., *J. Immunol.*, **175**, 3648–3655 (2005).
- 27) van der Vliet H. J., von Blomberg B. M., Nishi N., Rejim M., Voskuyl A. E., van Bodegraven A. A., Polman C. H., Rustemeyer T., Lips P., van den Eertwegh A. J., Giaccone G., Scheper R. J., Pinedo H. M., *Clin. Immunol.*, **100**, 144–148 (2001).
- 28) Molling J. W., Kölgen W., van der Vliet H. J., Boomsman M. F., Kruizenga H., Smorenburg C. H., Molenlamp B. G., Langendijk J. A., Leemans C. R., von Blomberg B. M., Scheper R. J., van den Eertwegh A. J., *Int. J. Cancer*, **116**, 87–93 (2005).
- 29) Molling J. W., Langius J. A., Langendijk J. A., Leemans C. R., Bontkes H. J., van der Vliet H. J., von Blomberg B. M., Scheper R. J., van den Eertwegh A. J., *J. Clin. Oncol.*, **25**, 862–868 (2007).
- 30) van der Vliet H. J., Wang R., Yue S. C., Koon H. B., Balk S. P., Exley M. A., *J. Immunol.*, **180**, 7287–7293 (2008).