

# **iNKT cellen; de basis voor een nieuwe behandeling tegen tumoren.**

**Bachelorscriptie van Gerjan Dekkema  
Student Biomedische Wetenschappen, Rijksuniversiteit Groningen.**

**Begeleider: Dr. BJ Kroesen**

Datum: 21-06-2010



## Inhoudsopgave

Samenvatting	4
Inleiding	5
Wat zijn iNKT cellen?	6
Ontwikkeling en maturatie van iNKT cellen	6, 7
Antigeenpresentatie en antigeenherkenning	8
De activiteit van iNKT cellen	9, 10
iNKT cellen in de tumorimmunosurveillance	10 - 12
Verlaging van iNKT cellen in kankerpatiënten	13
Antikanker therapieën op basis van iNKT cellen	13 - 16
Perspectief	17 - 18
Discussie	18 - 19
Literatuurlijst	20 - 24

## **Samenvatting**

Jaarlijks sterven er wereldwijd 7,1 miljoen mensen aan de gevolgen van kanker, hiermee is kanker de tweede doodsoorzaak ter wereld. Naast de reguliere behandelingen tegen kanker die tegenwoordig gebruikt worden, wordt er steeds meer gekeken naar het gebruik van het immuunsysteem in de behandeling tegen kanker. Er wordt voornamelijk gekeken naar de cytotoxische activiteit van NK en T cellen.

Sinds een aantal decennia is een nieuwe subset van de T lymfocyten gevonden, de natural killer T cellen (NKT). Deze groep immuuncellen heeft zowel een T lymfocyt fenotype (TcR) als een NK fenotype (NK cel receptor). Via de expressie van de T cel receptor zijn de NKT cellen onder te verdelen in twee groepen, de invariant (i)NKT cellen en de non-invariant (non)NKT cellen.

Bekend is dat de iNKT cellen een grote rol spelen in de tumorimmunosurveillance. De rol die de iNKT cellen spelen is tweeledig, allereerst kunnen iNKT cellen zelf de tumor doden via een cytotoxische reactie. Daarnaast produceert de iNKT cel een aantal regulatoire cytokines zoals IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$ . Door de productie van IFN- $\gamma$  zorgt voor activatie van de CTL en NK cellen, en daarmee voor tumornecrose.

Omdat de iNKT cellen een grote rol spelen in de tumorimmunosurveillance, is in klinische onderzoeken geprobeerd om de iNKT cellen als basis van een tumorbehandeling te gebruiken. Door iNKT cellen in vitro of in vivo te activeren is het gelukt om in kankerpatiënten de tumorimmunosurveillance te verhogen. Daarbij trad in enkele patiënten tumornecrose op.

Daarnaast zijn ook verschillende combinatiebehandelingen van iNKT cellen en monoclonale antilichamen (Mabs) getest, om zo de tumornecrose te verhogen. In muizenstudies worden veelbelovende resultaten gevonden, zo treedt er na behandeling een vrijwel gehele tumornecrose op.

Kortom, iNKT cellen spelen een grote rol in de tumorimmunosurveillance waardoor de iNKT cellen goed als basis voor een nieuwe tumorbehandeling kunnen dienen.

# **iNKT cellen; de basis voor een nieuwe behandeling tegen tumoren.**

## **Inleiding**

Jaarlijks overlijden 7,1 miljoen mensen aan de gevolgen van kanker, hiermee is kanker de tweede doodsoorzaak ter wereld (1). Kanker ontstaat doordat de cellen de mechanismen die genetische mutaties en veranderingen tegen moeten gaan of verbeteren, deze niet meer kunnen herstellen (2). Hierdoor treedt er in sommige gevallen onherstelbare schade op aan het DNA. Deze schade kan uiteindelijk leiden tot een verhoogde celdeling en daarmee tot kanker.

Naast de reguliere behandelingen tegen kanker die tegenwoordig gebruikt worden, wordt er steeds meer gekeken naar het gebruik van het immuunsysteem in de behandeling tegen kanker. Bekend is dat het immuunsysteem een grote rol speelt in de tumorimmunosurveillance, de mogelijkheid om tumoren te herkennen en te doden. Bij de tumorimmunosurveillance zijn vooral de cytotoxische T lymfocyten (CTL's) en natural killer (NK) cellen betrokken. De CTL's en de NK cellen kunnen een cytotoxische reactie opwekken, waarmee tumorcellen gedood kunnen worden.

In de jaren '80-'90 van de vorige eeuw is een nieuw subtype T lymfocyt ontdekt, namelijk de NKT cel. De NKT cel is een T lymfocyt die een TcR en meestal een NK receptor tot expressie brengt (3). Hiermee vormt de NKT cel een brug tussen het aangeboren en het verworven immuunsysteem. De populatie van NKT cellen ligt voor een gezond individu rond 25% van alle T lymfocyten (4).

Dat NKT cellen een regulerende rol spelen in het immuunsysteem is algemeen geaccepteerd. De NKT cellen produceren verschillende, zowel Th1 als Th2 cytokines, waarmee de NKT cellen onder andere CTL's, NK cellen en in mindere mate ook B cellen aansturen. Hierdoor is de verandering in NKT levels gecorreleerd aan allerlei ziektebeelden zoals allergie, auto-immuniteit, transplantaat afstoting en verandering in de tumorimmunosurveillance (5, 6).

De populatie van NKT cellen zijn op basis van de T cel receptor (TcR) onder te verdelen in twee groepen. De invariant NKT cellen met een invariant TcR en de non-invariant NKT cellen met een heterogene expressie van de TcR. Deze twee groepen van NKT cellen zijn normaliter in een vaste verhouding aanwezig.

Een verlaging of verstoring van de NKT balans heeft in kankerpatiënten een verslechterde tumorimmunosurveillance tot gevolg. Vooral de afname van invariant (i)NKT cellen heeft een negatief effect op de tumorimmunosurveillance. Gedacht wordt dat iNKT cellen effectorcellen van het immuunsysteem aansturen. Waardoor de verlaging van iNKT cellen in kankerpatiënten direct effect heeft op de CTL's en NK cellen, die verminderd geactiveerd worden (7). Door de belangrijke centrale en regulerende rol de iNKT cellen spelen in de tumorimmunosurveillance, zouden iNKT cellen de basis kunnen zijn van een nieuwe tumor behandeling.

Deze scriptie probeert de vraag te beantwoorden of iNKT cellen gebruikt kunnen worden in een nieuwe behandelingsmethode tegen tumoren. Er zal gekeken worden naar de ontwikkeling, maturatie en de rol van iNKT cellen in het immuunsysteem. Daarnaast zal de functie van de iNKT en nonNKT cellen in de tumorimmunosurveillance worden besproken en wordt het gebruik iNKT celbehandelingen in kankerpatiënten in klinische studies geëvalueerd.

## **Wat zijn NKT cellen?**

De eerste definitie van NKT cellen als T lymfocyten die zowel een T cel receptor (TcR) als een NK celreceptor tot expressie brengen, is niet meer toepasbaar. Hoewel de meerderheid van de NKT cellen een NK celreceptor tot expressie brengen, bezitten niet alle NKT cellen de NK receptor. Daarnaast wordt de NK receptor ook tot expressie gebracht door andere groepen T lymfocyten, zoals cytotoxische T Lymfocyten (CTL's) (8). Een betere definitie van NKT cellen ligt in de manier waarop antigenen worden herkend.

Karakteristiek voor NKT cellen is dat NKT cellen glycolipide antigenen herkennen in de context van CD1d (9). CD1d maakt deel uit van de CD1 eiwitfamilie, die sterk lijkt op het Major Histocompatibility complex (MHC), waarin normaliter antigenen worden herkend. In het geval van NKT cellen vindt de antigeenherkenning plaats via de TcR, die het antigeen-CD1d complex herkent. Een sterkere definitie voor NKT cellen is, T lymfocyten die glycolipide antigenen herkennen die gepresenteerd worden via het CD1d (10).

Tussen de twee subtypen van NKT cellen is er een verschil in de expressie van de TcR. De invariant (iNKT) of type 1 NKT cellen brengen een invariant van de TcR tot expressie. Dit betekent dat alle iNKT cellen dezelfde TcR tot expressie brengen, namelijk de Va24Ja18. De non-invariant (nonNKT) of de type 2 NKT cellen brengen een heterogene TcR tot expressie (11).

Naast de TcR brengen de meeste NKT cellen ook een NK cel receptor tot expressie, namelijk de CD161 of NKR P1B receptor. Zoals eerder aangegeven wordt deze NK celreceptor niet altijd door de NKT cellen tot expressie gebracht. Gedacht wordt dat na de maturatie er een functieverandering optreedt van de iNKT cel. Deze functieverandering zorgt er mede voor dat de iNKT cel een meer NK fenotype krijgt. Hierbij hoort ook de expressie van CD161 receptor.

Via de CD161 receptor reguleren de NKT cellen een aangeboren immuunrespons, door NK cellen aan te sturen tijdens een bacteriële infectie (12). De NKT cellen spelen in zowel het aangeboren (CD161 receptor) als het verworven (TcR) immuunsysteem een belangrijke regulerende rol.

De iNKT celpopulatie is op basis van de expressie van CD4 en CD8 verder onder te verdelen in drie subgroepen. De eerste groep brengt alleen CD4 tot expressie, de tweede groep brengt alleen CD8 tot expressie en de laatste groep brengt geen van beide tot expressie en wordt ook wel de dubbel negatieve (DN) subgroep genoemd (13).

Over de nonNKT celpopulatie is door het ontbreken van een eigen celmarker weinig bekend. Waarschijnlijk kunnen ook de nonNKT cellen onderverdeeld worden in een aantal subgroepen, echter nog niet duidelijk is of dit op eenzelfde wijze via CD4 en CD8 kan als bij de iNKT cellen (7). In deze scriptie zal worden ingegaan op de iNKT cellen, aangezien deze subpopulatie van NKT cellen de belangrijkste functie vervult in de tumorimmunosurveillance. En daarnaast is er door het ontbreken van een nonNKT celmarker weinig onderzoek gedaan. Daardoor is weinig bekend over de nonNKT cellen.

## **Ontwikkeling en maturatie van NKT cellen**

De ontwikkeling en maturatie van iNKT cellen vindt, net als voor conventionele T lymfocyten plaats in de thymus. De iNKT cellen splitsen zich tijdens het dubbel positieve (CD4 en CD8 positief) stadium af van de conventionele T lymfocyten (fig. 1). De splitsing ontstaat door een TcR rearrangement die optreedt in de TcR van de dubbel positieve (DP) T lymfocyt. Door de

rearrangement brengt de T lymfocyt de iNKT cel TcR tot expressie. De rearrangement vindt op een zeer lage frequentie plaats, waardoor er relatief weinig iNKT cellen voorkomen in mensen (8).

Na de TcR rearrangement is voor de ontwikkeling van de iNKT cel van belang dat er herkenning van zelf optreedt. Dit vindt plaats via het CD1d, dat op alle dubbel positieve thymocyten en op de epitheelcellen van de thymus tot expressie wordt gebracht (8).

Bij de herkenning van zelf treden naast het herkennen van CD1d ook andere interacties op tussen de iNKT cel en de CD1d positieve cel, hierbij wordt de iNKT cel via secundaire signalen mature.

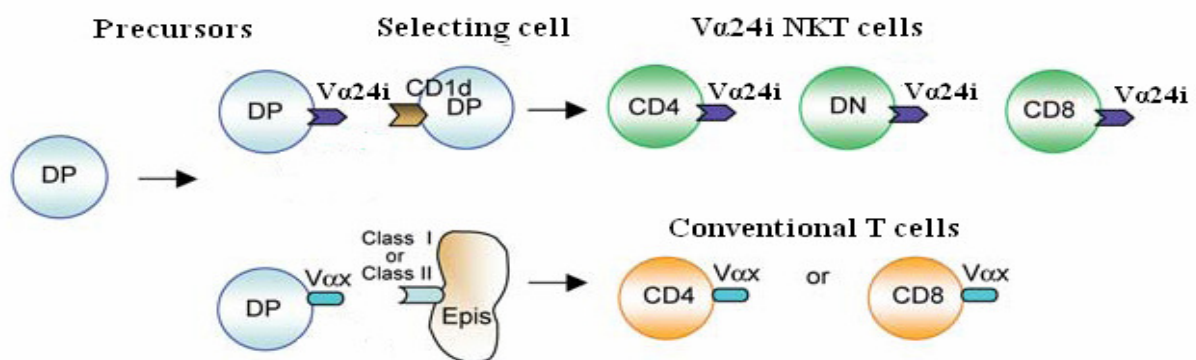
Een van de belangrijkste secundaire signalen loopt via de herkenning en binding van de signaling lymphocytic-activation molecule (SLAM). Via Slamf1 en Slamf6, worden de iNKT cellen geactiveerd. Dit signaal is van essentieel belang voor de differentiatie en latere expansie van iNKT cellen (8).

Na de herkenning van zelf, worden de iNKT cellen onder invloed van verschillende cytokines en via verschillende signaaltransductie routes, mature. Een van de belangrijkste cytokines voor de maturatie en homeostase van de iNKT cellen is IL-15. Onder invloed van IL-15 verandert het iNKT fenotype van een T cel fenotype naar een NK cel fenotype. Ook wordt dan de NK cel receptor CD161 tot expressie gebracht. Een ander belangrijk cytokine is GM-CSF. GM-CSF zorgt voor de ontwikkeling van de iNKT cel, zodat deze in staat is om zelf cytokines te gaan produceren (15).

Nadat de iNKT cellen mature zijn migreren de iNKT cellen uit de Thymus naar de periferie. Voor de migratie van iNKT cellen uit de thymus is de productie van chemokines nodig door de medullaire cellen van de thymus. Onder invloed van lymfotaxine (LT), wat geproduceerd wordt door de iNKT cellen, wordt door de medullaire cellen chemokines geproduceerd. Deze chemokines stimuleren de migratie van de iNKT cellen uit de thymus (8).

Waar de iNKT cellen heen migreren is verschillend, er is een duidelijk verschil in populatiegrote tussen verschillende organen. Onder andere in de milt, in de lever, in het beenmerg en in het perifere bloed bevinden zich procentueel de meeste iNKT cellen. Het percentage iNKT cellen ligt daar rond de 1%, ten opzichte van andere organen waar ongeveer 0,5% van alle T lymfocyten iNKT cel zijn.

De expansie en homeostase van de perifere iNKT cellen wordt gereguleerd door IL-15. Onder invloed van IL-15 vinden er op een lage basale waarde delingen plaats. De iNKT cellen delen onder invloed van IL-15 ongeveer 0-2 per week.



**Afbeelding 1: Ontwikkeling van iNKT cellen.** De iNKT cellen ontstaan uit de DP lyfoïde cellen, en splitsen zich via de rearrangement van de TcR af van de conventionele T lymfocyten. De afsplitsing wordt mede veroorzaakt door de herkenning van CD1d (Kronenberg 2005).

## Antigeenpresentatie en antigeenherkenning

iNKT celen worden geactiveerd als de TcR van de iNKT cel een glycolipide antigeen herkent die door het CD1d aan de iNKT cel wordt gepresenteerd. Het CD1d maakt onderdeel uit van de CD1 eiwitfamilie (16). CD1 eiwitten vertonen sterke gelijkens met het Major Histocompatibility Complex (MHC) waarin in veel gevallen de antigenen worden gepresenteerd (10, 18).

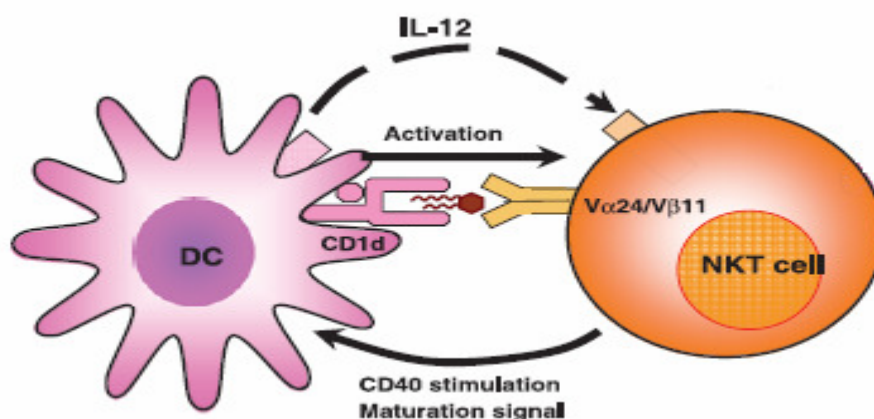
Een ander verschil met de normale antigeen presentatie is dat er glycolipide antigenen worden gepresenteerd in het CD1d. Normaliter worden er in het MHC eiwitantigenen gepresenteerd.

CD1d wordt tot expressie gebracht door onder andere keratinocyten, perifere stromale cellen, dendritische cellen, macrofagen, hepatocyten, tymocyten, sommige subsets van B cellen en tumorcellen (19-21). Doordat deze cellen CD1d tot expressie brengen, kunnen zij dienen als antigeen presenterende cel (APC) voor de iNKT cel. In vivo vindt antigeenpresentatie via CD1d voor de iNKT cellen voornamelijk plaats via de dendritische cellen en epitheel cellen.

De antigeen processing in de antigeen presenterende cel vindt op dezelfde wijze plaats als voor MHC 2. Er wordt een vesicel/micro-organisme door middel van fagocytose opgenomen in de cel, waarna deze in het lysosoom wordt afgebroken. Het antigeen wordt gebonden aan CD1d, hierna wordt het CD1d-antigeen complex op het celmembraan tot expressie gebracht (5).

Naast de activatie via CD1d kan de iNKT cel ook gestimuleerd worden door co-stimulatoire signalen van de dendritische cellen. De dendritische cellen produceren onder invloed van een CD40-CD40L binding met de iNKT cel een co-stimulatoire cytokine, IL-12 (fig. 2). Onder invloed van IL-12 wordt de NKT cel naast de antigeenherkenning sterker gestimuleerd en daardoor beter actief (22).

De dendritische cel zelf wordt door de iNKT cel geactiveerd via een CD40-CD40L binding. Onder invloed van deze binding worden de dendritische cel mature, wat leidt tot een verbeterde en verhoogde productie van IL-12 (22) (fig. 2).



**Figuur 2: Antigeenherkenning door en activatie van de iNKT cel.** Doordat de iNKT cel het antigeen herkent en door het co-stimulatoire IL-12 van de dendritische cel (DC) treedt er activatie op van de iNKT cel. Daarnaast zorgt de CD40-CD40L binding tussen de iNKT cel en de dendritische cel voor maturatie van de dendritische cel (Motohashi 2008).



### **Effector functies van iNKT cellen**

De iNKT cellen hebben na activatie twee verschillende effecten, namelijk een direct effect en een indirect effect. Het directe effect van iNKT cellen hangt samen met de cytotoxische activiteit van iNKT cellen (fig. 3). Naast het directe effect van de iNKT cellen bezitten ze ook een indirect effect, dit wordt gekenmerkt door de productie van cytokines. Met de productie van cytokines kunnen iNKT cellen het immuunsysteem reguleren (fig. 3).

Net als NK cel bezit de iNKT cel ook cytotoxische/cytolytische activiteit waarmee targetcellen gedood kunnen worden. Dit kan de iNKT cel op twee manieren doen, via uitscheiding van enzymen of via cel-cel contact.

De enzymen die de iNKT cellen gebruikt worden voor het doden van targetcellen zijn granzyme B en perforine. Deze twee cytolytische enzymen worden veel aangemaakt door de iNKT cellen (8). De enzymen worden na herkenning van de targetcel door de iNKT cel (via CD1d), door de iNKT cel uitgescheiden. Hierdoor worden de targetcellen via een cytolytische reactie gedood.

Daarnaast brengen iNKT cellen FasL hoog tot expressie op het celmembraan, hiermee kunnen iNKT cellen ook targetcellen doden. Onder invloed van stress in cellen wordt de Fas receptor hoog tot expressie gebracht. De Fas receptor is een van de tumor necrosis factor receptors.

De tumorcellen staan door het versnelde delingsproces onder stress, hierdoor brengen de tumorcellen de Fas receptor tot expressie. Wanneer de FasL van de iNKT cel het Fas van de tumor/target cel herkent en activeert, treedt er in de tumor/target cel caspase afhankelijke apoptose op (8).

Het indirecte effect bestaat uit de productie van verschillende cytokines, die zorgen voor activatie en deactivatie van effectorcellen van het immuunsysteem. Na activatie worden er via de NF- $\kappa$ B signaaltransductie pathway, cytokines geproduceerd. Welke cytokines worden geproduceerd hangt af van het subtype iNKT cel. De CD8 positieve en de dubbel negatieve iNKT cellen produceren voornamelijk Th1 cytokines zoals IL-12, IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$ . De CD4 positieve iNKT cellen produceren vooral een Th2 respons die gekenmerkt wordt door IL-4 en IL-13.

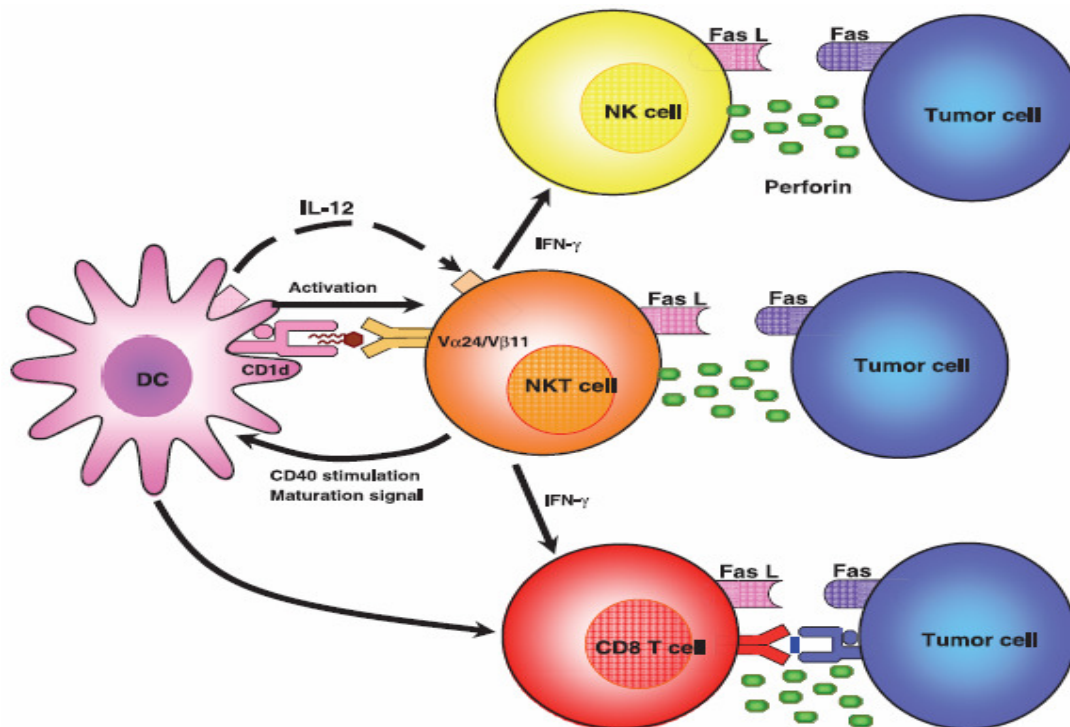
De verdeling in een Th1 en Th2 respons van de iNKT cellen is niet rigide. De CD 8 positieve en dubbel negatieve cellen produceren ook Th 2 cytokines, alleen minder dan de Th 1 cytokines. Hetzelfde geldt voor de CD 4 positieve cellen (23, 24).

Een verklaring voor het verschil in cytokineproductie tussen de CD4 positieve en CD8 positieve en DN iNKT cellen ligt in de manier van activatie. Het CD4 van de CD4 positieve iNKT cel kan een co-stimulatoire interactie aangaan met CD1d. Hierdoor wordt de CD4 positieve iNKT cel sterker geactiveerd dan de CD8 positieve en DN iNKT cellen (15). De sterkere activatie induceert in de CD4 positieve iNKT cel een Th2 cytokinerespons.

Het verschil in cytokineproductie van de iNKT cellen heeft een effect op de immunreactie die wordt opgewekt. De Th1 cytokineproductie door de CD8 positieve en dubbel negatieve iNKT cellen heeft een NK, T en B cel respons tot gevolg. INF- $\gamma$  zorgt in B cellen voor een isotype switch naar en de productie van IgG., waardoor er via IgG opsonisatie van antigenen/tumorcellen plaatsvindt. IL-12 en IFN- $\gamma$  stimuleren de NK en T (CTL) cellen waardoor de NK cellen en CTL's verhoogd cytotoxisch worden (25, 26).

De Th2 cytokineproductie door de CD4 positieve cellen zorgt voor een IgE productie door de B cellen. En daarnaast zorgen de Th2 cytokines voor een remming van de IFN- $\gamma$  productie waardoor de cytotoxische activiteit van de NK en CTL's verminderd wordt (25, 26).

Net als over de verschillende subgroepen van de nonNKT cellen is er ook weinig bekend over de precieze cytokinerespons die optreedt als de nonNKT cellen worden geactiveerd. Gedacht wordt dat hoewel de nonNKT cellen zowel Th1 als Th2 cytokines kunnen produceren, de nonNKT cellen voornamelijk Th2 cytokines produceren (7).



**Figuur 3: Samengevat de werking en activatie van iNKT cellen.** Na activatie hebben de iNKT cellen zowel een directe werking als een indirecte werking. De directe werking doodt de target/tumorcellen via een cytotoxische respons of via cel-celcontact. De indirecte werking gaat via de productie van cytokines die voornamelijk NK cellen en CTL's stimuleren (Motohashi 2008).

Naast de effector/regulator functies van iNKT cellen, worden de iNKT cellen ook gereguleerd. Deze regulatie vindt plaats via regulatorische T cellen (Tregs) en via nonNKT cellen.

De remming van iNKT cellen door Tregs is volledig afhankelijk van een cel-cel interactie. Hierdoor wordt de activiteit van de iNKT cellen geremd. De manier van remmen is identiek aan de remming van T en B cellen door Tregs (7, 27).

De nonNKT cellen remmen voornamelijk de werking van iNKT cellen, de remming vindt plaats via de productie van IL-4 en IL-13. Door de productie van deze cytokines wordt de productie van IFN- $\gamma$  sterk verlaagd. Dit zorgt voor een verlaging van de cytotoxiciteit van de CTL's en de NK cellen (7).

### **iNKT cellen in de tumorimmunosurveillance**

De rol die NKT cellen spelen in de tumorimmunosurveillance is via een CD1d knock-out studie onderzocht. In deze studie was het CD1d, wat normaal antigenen presenteert, afwezig. Hierdoor trad er geen antigeenherkenning op en daardoor, ook geen activatie van de NKT cellen. Na het induceren van tumoren was er ten opzichte van de controle met CD1d, een verhoogde mortaliteit.

Dit resultaat impliceert dat het CD1d, en daarmee de NKT cellen, een beschermende rol spelen in het tegengaan van de ontwikkeling van tumoren, en dus in de tumorimmunosurveillance (28). Echter, de iNKT en nonNKT cellen hebben een andere, tegengestelde werking op de tumorimmunosurveillance. Door een knock-out van de Va14-Ja18 receptor bij muizen (Va24Ja18 bij mensen), waren er alleen nonNKT cellen aanwezig in de knock-out muizen. Na inductie van een tumor nam de mortaliteit ten opzichte van de controlegroep sterk toe. Door aan de knock out muizen iNKT cellen toe te dienen nam de mortaliteit af. Dit resultaat wijst op een beschermende werking van iNKT cellen in de tumorimmunosurveillance, en een remmende werking van de nonNKT cellen in de tumorimmunosurveillance (28).

Zoals al eerder behandeld is, kunnen iNKT cellen op twee manieren een effect hebben in het immuunsysteem. Een direct effect dat berust op de cytotoxische capaciteit van de iNKT cel. En een indirect effect dat door cytokines, die de iNKT cel produceert, wordt gemedieerd.

In de tumorimmunosurveillance is het directe, cytotoxische effect van iNKT cellen niet het belangrijkste mechanisme waardoor tumorcellen worden gedood. De cytotoxisch functie van iNKT cellen is voornamelijk van belang bij het bestrijden van bacteriële en virale infecties. En is minder van belang in de tumorimmunosurveillance (12).

Veel belangrijker voor de tumorimmunosurveillance is het indirecte effect via de cytokineproductie. En vooral door middel van IFN- $\gamma$ , waarmee de CTL en NK activiteit wordt gereguleerd. Hoofdzakelijk kunnen de indirecte effecten van iNKT cellen in vier mechanismen worden ingedeeld (29). (fig. 4).

Het eerste antitumor mechanisme wordt geïnduceerd door moleculen die vrijkomen uit tumorcellen. Doordat tumorcellen ongeremd gaan delen, raken de tumorcellen gestrest. Hierdoor wordt onder andere het Heat shock protein (Hsp) 110 uitgescheiden door de tumorcellen (30, 31). Het uitgescheiden Hsp 110 wordt herkend door dendritische cellen en epitheelcellen die in de buurt van de tumor liggen. Onder invloed van Hsp 110 brengen deze cellen meer CD1d tot expressie, wat leidt tot een verhoogde antigeen presentatie via de dendritische en epitheelcellen (32, 33). De antigenen die gepresenteerd worden door de dendritische cellen en epitheelcellen zijn veelal afkomstig van de tumor.

Door de toegenomen antigeenpresentatie in de context van CD1d, worden er meer iNKT cellen geactiveerd. De toegenomen geactiveerde iNKT cellen zorgen voor immuunrespons die bestaat uit activatie van B en NK cellen. De geactiveerde B cel produceert tumorspecifieke IgG antilichamen, die de tumorcellen opsoniseren. Door de opsonisatie van de tumorcellen treedt via de NK cellen antigeen afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit (ADCC) op (34, 35).

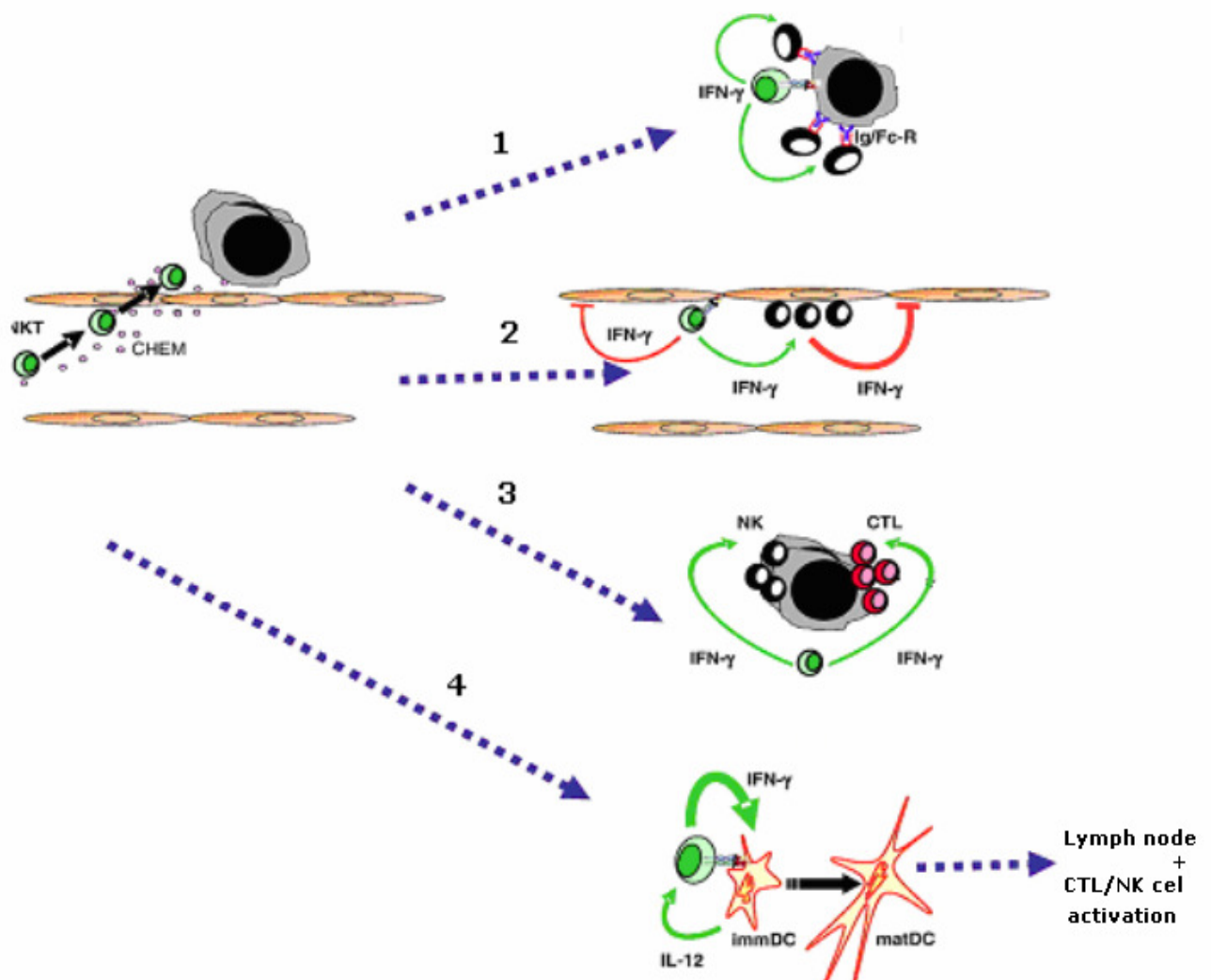
Het tweede antitumor mechanisme beschermt tegen angiogenese, het voorkomen van het vormen van uitzaaiingen (36). Via het CD1d van het epitheel dat bij de tumor ligt, worden tumorantigenen gepresenteerd. Hierdoor worden iNKT cellen sneller en meer geactiveerd, en gaan de iNKT cellen IFN- $\gamma$  produceren. De IFN- $\gamma$  productie leidt tot twee reacties.

Allereerst zorgt het voor activatie van dendritische cellen, die daarna ook IFN- $\gamma$  gaan produceren (37). Daarnaast zorgt IFN- $\gamma$  ervoor dat het epitheel niet meer doorlaatbaar is voor de maligne cellen, en daardoor wordt de angiogenese geremd (24).

Het derde mechanisme loopt via de rechtstreekse herkenning van tumorcellen. De tumorcellen van een aantal soorten kanker brengen zelf CD1d tot expressie. Op de CD1d receptor van tumorcellen worden ook tumorcel eigen antigenen tot expressie gebracht. Door de expressie van het CD1d-antigeen complex kunnen iNKT cellen worden geactiveerd en treedt er een cytokinerespons op (29). Door de productie van voornamelijk IFN- $\gamma$  worden de CTL's en de NK cellen geactiveerd. Deze effectorcellen kunnen na activatie de tumor doden.

Het vierde mechanisme is een indirect mechanisme dat gemedieerd wordt via dendritische cellen. Tumorcellen kunnen chemokines uitscheiden waardoor iNKT cellen naar de plaats van de tumor migreren. De iNKT cellen worden op de tumorplaats geactiveerd door de CD1d die de tumor tot expressie brengt. Na de herkenning activeren iNKT cellen, door middel van IFN- $\gamma$ , immature dendritische cellen die in het naburige weefsel liggen (38, 39).

De immature dendritische cellen worden geactiveerd en worden mature, waarna de mature dendritische cellen naar de dichtstbijzijnde lymfeknoop migreren. Hier presenteren de dendritische cellen tumorantigenen en rekruteren ze T helper cellen en CTL's om de tumor op te doden.



**Afbeelding 4: De vier mechanismen van antitumor activiteit van iNKT cellen.** 1; iNKT cel activeert de B en NK cellen. Hierdoor treedt er antilichaam afhankelijke cellulair cytotoxiciteit (ADCC). 2; IFN- $\gamma$  productie door iNKT cellen en dendritische cellen beschermt tegen angiogenese. 3; Na activatie door iNKT cel, doden NK en CTL cellen de tumor. 4; iNKT cel activeert dendritische cel, waarna deze in lymfeknoop effectorcellen werft (Molling 2008).

### **Verlaging van iNKT cellen in kankerpatiënten**

Hoewel er een groot verschil is tussen de hoeveelheid iNKT cellen bij mensen, is gemiddeld ongeveer 1% van alle T lymfocyten iNKT cel (10). In kankerpatiënten is het percentage van iNKT cellen sterk afgenomen, zelfs zoveel dat de hoeveelheid iNKT cellen in sommige patiënten niet meer te meten is. De oorzaak van de vermindering van de iNKT cellen is nog onbekend, wel zijn er twee mogelijke verklaringen.

De eerste mogelijkheid is dat de stoffen die de tumorcellen uitscheiden, een effect hebben op de iNKT cellen. Door de tumorcellen wordt onder andere sulfatide uitgescheiden. Sulfatide verhoogt enerzijds het aantal nonNKT cellen en door de toename van nonNKT cellen worden de iNKT cellen meer geremd. Anderzijds zorgt sulfatide voor anergie in de iNKT cellen, waardoor het aantal iNKT cellen ook afneemt (40).

De tweede mogelijkheid is dat de iNKT cellen worden geremd door Tregs. Tregs zijn in kankerpatiënten sterk verhoogd aanwezig zijn. De verhoging van de Tregs zorgt voor de regulatie van de iNKT cellen door ze te remmen via cel-cel contact (41). Waardoor de Tregs in kankerpatiënten sterk verhoogd zijn is niet bekend.

De verlaging van het aantal iNKT cellen heeft een negatief effect op de tumorimmunosurveillance. In een C26 longmetastase model bij muizen zijn de iNKT cellen geremd. Door de remming van de iNKT cellen trad er een versterkte tumorgroei op ten opzichte van de controlemuizen (42). Dit onderzoek laat zien dat de iNKT cellen een cruciale rol spelen in de tumorimmunosurveillance. De verlaging van de iNKT cellen zorgde voor een verslechterde activiteit van de effectorcellen zoals de CTL's en de NK cellen, waardoor er geen tumornecrose meer plaatsvond.

Voor kankerpatiënten geldt dat de hoeveelheid aanwezige iNKT cellen, zowel perifeer als tumorgeïnfiltreerd, de levensverwachting bepalen. Als er een minder sterke verlaging van het aantal iNKT cellen is, hebben de patiënten een verhoogde overlevingskans ten opzichte van de patiënten waarbij de iNKT cellen sterk verlaagd zijn (43, 44).

Hoewel de iNKT cellen in kankerpatiënten verlaagd zijn, kan niet gezegd worden dat in 'gezonde' mensen een verlaging van de iNKT cellen een tumor tot gevolg heeft. De iNKT cellen zijn geen voorspeller voor het ontstaan van tumoren, alleen een voorspeller van de overlevingskans wanneer er tumor aanwezig is.

### **Antikanker therapieën op basis van iNKT cellen**

Per toeval is uit de spons *Agela Maritimus* een stof gevonden met een sterke antitumor werking. Deze stof,  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ -Galcer) laat na toediening in hoge concentraties een sterke antitumor werking zien. De dosis die normaliter toegediend wordt om tumoren te doden, is schadelijk voor andere cellen en organen van de patiënt (45). En daarom slecht te gebruiken als tumorbehandeling. Echter voor lagere concentraties van  $\alpha$ -Galcer is aangetoond dat  $\alpha$ -Galcer in vitro iNKT cellen kunnen activeren en laten prolifereren (46).

Hypothetisch zou een behandeling met  $\alpha$ -Galcer de verlaagde iNKT cel hoeveelheid in kankerpatiënten kunnen herstellen. Mogelijk in grote mate, zodat de iNKT cellen een antitumor respons wekken. Bijkomend voordeel is een lage concentratie van  $\alpha$ -Galcer minder toxisch voor de kankerpatiënt en dat er daardoor minder bijwerkingen optreden.

Deze theorie, is in een aantal klinische studies onderzocht. Bij deze studies is veelal gelet op drie zaken, of de iNKT cellen worden geactiveerd en gaan prolifereren, of er een verandering in de immuunrespons optreedt en of er tumornecrose optreedt. De gegevens van de klinische onderzoeken staan samengevat in tabel 1 en worden uitvoerig besproken.

Het eerste klinische onderzoek naar de effecten van  $\alpha$ -Galcer op proliferatie en activatie van iNKT cellen in mensen is uitgevoerd door Gaiconne et al. In het onderzoek van Gaiconne et al. werd  $\alpha$ -Galcer intra veneus toegediend aan 24 patiënten die verschillende vaste weefsel tumoren hadden. De resultaten van het onderzoek van Gaiconne waren onverwacht, de circulerende iNKT cellen namen na de behandeling in hoeveelheid af en er trad geen antitumor respons op. Wel werd er een verhoging van IL-12, IFN- $\gamma$  en GM-CSF gemeten, deze toename wijst op een mogelijke activatie van het immuunsysteem (51).

Het meest onverwachte resultaat was dat de hoeveelheid circulerende iNKT cellen af nam, wat niet overeenkwam met wat in de in vitro studies gevonden was. Een mogelijke verklaring voor de afname van de iNKT cellen is dat de iNKT cellen mogelijk naar de periferie zijn gemigreerd om daar een antitumor respons op te wekken, echter dit werd niet waargenomen. Een andere verklaring is dat door de manier van toediening de iNKT cellen een te sterke stimulus hebben gekregen waardoor ze anergisch zijn geworden.

De resultaten van Gaiconne et al. werden bevestigd door andere klinische onderzoeken die ook gebruik maakten van de intra veneuze toediening van  $\alpha$ -Galcer. De afname van iNKT cellen werd gemeten in patiënten met melanomen, prostaatkanker, longkanker en carcinomen. Hierbij trad er in geen van de patiënten een antitumor respons op (47-50).

Omdat de rechtstreekse toediening van  $\alpha$ -Galcer leidt tot anergie, moet er gekozen worden voor een andere toediening van  $\alpha$ -Galcer. Een mogelijkheid zou zijn om dendritische cellen te gebruiken als antigeen presenterende cel.  $\alpha$ -Galcer kan via het CD1d van de dendritische cellen gepresenteerd worden aan de iNKT cellen. Door  $\alpha$ -Galcer te laden op CD1d van de dendritische cellen zou het directe anergische effect van  $\alpha$ -Galcer verlaagd moeten worden. Daarnaast zou in theorie de dendritische cellen ook nog voor een extra co-stimulator signaal kunnen zorgen waardoor de iNKT cellen beter en sterker worden geactiveerd.

In de klinische onderzoeken van Nieda et al. en Okai et al. zijn patiënten behandeld met  $\alpha$ -Galcer geladen immature dendritische cellen. Beide onderzoeken lieten direct na toediening van in vitro gekweekte  $\alpha$ -Galcer geladen dendritische cellen een afname zien van de circulerende iNKT cellen. Echter, de afname werd gevolgd door een toename van de circulerende iNKT cellen tot boven de beginwaarde van de behandelde patiënten. Daarnaast leidde de behandeling tot een toename van NK cellen en T cellen (CTL's), wat uiteindelijk in één patiënt leidde tot tumornecrose (52, 53).

De afname gevolgd door de toename van iNKT cellen in dit onderzoek wijst mogelijk op gedeeltelijke anergie. Waarschijnlijk leidde de behandeling met immature dendritische cellen in een deel van de iNKT celpopulatie tot anergie. Echter, een ander deel van de iNKT cellen werd door de behandeling geactiveerd, waardoor het aantal iNKT cellen toenam.

Chang et al. en Ishikawa et al. vonden voor een zelfde behandeling, maar dan met mature  $\alpha$ -Galcer geladen dendritische cellen veelbelovende resultaten. Zowel Ishikawa en Chang laten een toename van circulerende iNKT cellen zien, zelfs tot 20 tot 100 keer hoger dan de beginwaarde. Verder werd er ook een toename gemeten van CTL's en NK cellen. Echter, de toename leidde niet tot een antitumor respons. In alle patiënten bleef de tumorgroter vrijwel stabiel (54, 55).

Waarom er geen antitumor respons optreedt na de toename van iNKT cellen is onduidelijk. Mogelijkerwijs zouden de iNKT cellen niet goed geactiveerd worden, waardoor ze zelf niet goed in staat zijn om CTL's en NK cellen goed te activeren. Voor een goede CTL en NK activatie is een Th1 cytokinerespons nodig.

Om een goede activatie van de iNKT cellen, NK cellen en CTL's te krijgen, is geprobeerd om de iNKT cellen in vitro zo te stimuleren zodat deze een voornamelijk Th1 cytokines produceren. Door iNKT cellen in vitro te stimuleren met  $\alpha$ -Galcer geladen mature dendritische cellen en IL-2, gaan de iNKT cellen voornamelijk Th1 cytokines produceren (59).

In een muizenstudie is het resultaat van de toediening van in vitro gestimuleerde en Th1 gepolariseerde iNKT cellen veelbelovend. De iNKT cellen beschermden tegen de inductie van een B16/F10 longmetastasen (60, 61). Dit resultaat geeft aan dat de Th1 gepolariseerde iNKT cellen beter in staat zijn om een goede antitumor respons te induceren.

In het klinisch onderzoek van Kunii et al. is een behandeling met in vitro Th1 gepolariseerde iNKT cellen samen met  $\alpha$ -Galcer geladen mature dendritische cellen, getest in patiënten met hoofd-nek tumoren. Kunii et al. vonden een toename van de hoeveelheid circulerende iNKT cellen en een toename van de NK cellen. Uiteindelijk leidde de toegenomen NK en iNKT cellen in drie van de acht patiënten tot een afname van de tumorgroter. In één van de drie patiënten leidde de toename van NKT en NK cellen tot een afname van de tumorgroter met 48% (58).

Een verklaring voor waarom de tumornecrose in het klinische onderzoek van Kunii et al. sterk toenam moet worden gezocht in de in vitro stimulatie van de iNKT cellen. De Th1 gepolariseerde iNKT cellen zijn beter in staat om CTL's en NK cellen te activeren. En door de toegenomen activatie van voornamelijk NK cellen kan er een antitumor repons optreden.

Daarnaast is in het onderzoek van Kunii et al. gekozen voor een andere manier van behandelen. De iNKT cellen zijn niet zoals in de meeste klinische studies intra veneus toegediend maar intra arterieel en bij de tumorplaats. Vooral de toediening van iNKT cellen bij de tumorplaats zou een groot effect kunnen hebben, meer iNKT cellen kunnen zo direct de tumor vinden en herkennen. Waardoor er mogelijk een sterkere respons en werving van CTL's en NK cellen optreedt.

Diagnose	Patiënten	Behandeling	Immunologische respons	Circulerende iNKT cellen	Effect op circulerende cellen	Klinische respons
Vast tumor (Giaconne (51))	24	i.v. αGalcer	Toename IL-12, IFN-γ, GM-CSF	afname	Reductie NK cellen	-Stabiele tumor
Metastasen (Okai (52))	4	i.v. αGalcer geladen onvolw. MoDC	-	Afname dan toename	-	-
Metastase carcinoom (Nieda (53))	12	i.v. αGalcer geladen onvolw. MoDC	Toename IL-12, IFN-γ	Afname dan toename	Toename T en NK cellen	-Verlaging tumormarkers -Necrose tumor (1pt)
Myelonoom Carcinoom (Chang (54))	3 + 2	i.v. αGalcer geladen vol. MoDC	Toename IL-10	100* verhoging	Toename CD8+ T cel	-Verlaging tumormarkers
Vergevord. Longkanker (Ishikawa (55))	11	i.v. αGalcer geladen vol. MoDC	Toename IFN-γ	20* verhoging	-	-Stabiele tumor
Longkanker (Motohashi (56))	6	i.v. iNKT cellen (in vitro gekweekt).	Toename IFN-γ	Kleine toename	Kleine toename NK cellen	-Stabiele tumor
Hoofd-nek kanker (Uchida (57))	9	i.m.(nasaal)α Galcer geladen moDC	Toename IFN-γ	Kleine toename	Toename NK cellen (1p)	-Gedeeltelijke respons (1p) -Stabiele tumor
Hoofd-nek kanker (Kunii (58))	8	i.a. in vitro iNKT cellen. i.m.αGalcer-APC	Toename IFN-γ	Toename 2 - 4*	Toename NK Cytotoxiciteit	- Stabiele tumor (4pt) - Regressie(3pt) - Toename (1pt)

**Tabel 1: Samenvatting van acht klinische onderzoeken naar de werking van α-Galcer en de stimulatie van iNKT cellen.** In de klinische onderzoeken is gekeken naar een mogelijke manier om iNKT cellen in kankerpatiënten te verhogen, om zo een antitumor respons op te wekken. De acht onderzoeken hebben gebruik gemaakt van α-Galcer en hebben vrijwel allemaal een andere manier van behandeling. Van een aantal onderzoeken zijn niet alle gegevens beschikbaar. Samengevat leidt alleen de behandeling met iNKT cellen in het onderzoek van Kunii et al. tot een meetbare antitumor respons in meer dan in één patiënt. i.v. is intra veneus, i.m. intra mucosaal en i.a. intra arterieel. moDC is monocyt dendritische cellen.



## Perspectief

De eerste klinische onderzoeken laten een veelbelovend resultaat zien, vooral in het onderzoek van Kunii et al. trad er gedeeltelijk tumornecrose op. Maar voordat een iNKT celtherapie gebruikt kan worden als nieuwe antitumor therapie moet er gekeken worden naar een mogelijkheid om de antitumor respons te verbeteren.

Het uitblijven van een volledige antitumor respons in de behandelde patiënten zou verklaard kunnen worden door het feit dat alle behandelde patiënten vergevorderde tumoren hadden. En dat hierdoor het immuunsysteem van de behandelde patiënten sterk verslechterd is. De CTL's en NK cellen hebben in deze patiënten een sterk verminderde werking, en kunnen mogelijk niet goed meer worden geactiveerd. Mogelijk zouden patiënten met minder vergevorderde tumoren meer baat hebben bij de behandeling met in vitro Th1 gepolariseerde iNKT cellen. Deze theorie is echter nog niet in een klinisch onderzoek bevestigd.

Het verbeteren van de iNKT celtherapie zou kunnen door deze vorm van behandelen te combineren met andere, op immunologie gebaseerde, behandelingen. Gedacht kan worden aan een combinatie met vaccinatie of een combinatie met monoclonale antilichamen (Mabs) (62). Tot nu toe laten de combinatietherapieën met Mabs de meest veelbelovende resultaten zien. Een van de monoclonale antilichaam therapieën is Trimab, waarbij gebruik wordt gemaakt van antilichamen tegen DR5, CD137 en CD40 (tab. 2). Hierbij wordt de Trail receptor van de tumorcellen, de CTL's en de dendritische cellen gestimuleerd. De resultaten van de behandeling met Trimab waren veelbelovend, de therapie liet een verhoging van de CTL's zien. Daarnaast trad er vrijwel volledige tumornecrose op. Echter anti CD40 is zeer giftig gebleken voor mensen, en dus onbruikbaar als behandeling (63).

In het eerste muizenonderzoek dat het effect van een mogelijke combinatietherapie bekeek, is gebruik gemaakt van anti DR5 en anti CD137 samen met intra veneuze toediening van  $\alpha$ -Galcer (iNKTmab). In deze behandeling verving  $\alpha$ -Galcer de rol van anti CD40. Verwacht werd dat door de stimulatie van iNKT cellen, de TRAIL receptor en de CTL's, de antitumor respons zou toenemen. In mensen zou deze behandeling gelijk zijn aan een behandeling met anti DR5, anti CD137 en Th1 gepolariseerde iNKT cellen, aangezien de behandeling met intra veneuze toediening in mensen een verlagend effect heeft op de iNKT celhoeveelheid (63).

De resultaten van deze studie waren veelbelovend, iNKTmab bleek effectief in staat om de tumoren te doden. Omdat de behandeling met iNKTmab geen anti CD40 bevat is de verwachting dat deze behandeling beter door mensen wordt getolereerd.

Een ander onderzoek bewees hetzelfde principe, dat monoclonale antilichamen effectief in staat zijn om een antitumor respons op te wekken via iNKT cellen. In de studie werd gebruik gemaakt van de monoclonale antilichamen tegen CD137, CD40 en CD1d. Doordat het anti CD1d aangrijpt op CD1d dat tot expressie wordt gebracht door dendritische cellen, worden onder invloed van het anti CD1d de dendritische cellen geactiveerd. Door de activatie produceren de dendritische cellen IL-12, waardoor de iNKT cellen in vivo worden geactiveerd.

Na de behandeling nam het aantal CTL's sterk toe, hierdoor trad er een vrijwel volledige tumornecrose op (64). Er werden geen bijwerkingen waargenomen in de behandelde muizen.

Echter, in deze studie is gebruik gemaakt van CD40, wat giftig is voor mensen, hierdoor is deze behandeling niet toepasbaar in mensen. Een mogelijkheid zou kunnen zijn om het CD40 te vervangen door in vitro gestimuleerde iNKT cellen.

Monoclaal antilichaam	Antilichaam herkend	Effect
Anti DR5	DR5 (TRAIL 2 receptor) op tumorcellen	TRAIL afhankelijke apoptose van de tumorcellen.
Anti CD137	CD137 op CTL's	Activatie van CTL's waardoor een antitumor respons wordt opgewekt.
Anti CD40	CD40 op dendritische cellen	Maturatie van dendritische cellen.
Anti CD1d	CD1d op antigeen presenterende cellen; oa. Dendritische cellen.	Maturatie van dendritische cellen; het aanzetten tot de productie van IL-12.

**Tabel 2: Gebruikte monoclonale antilichamen in muizenstudies, met de belangrijkste werking.**

## Discussie

Concluderend kunnen iNKT cellen een belangrijke target zijn in de ontwikkeling van nieuwe behandelmethoden tegen tumoren. Mede doordat de iNKT cellen een grote rol spelen in de tumorimmunosurveillance, heeft een behandeling die hierop ingrijpt veel potentieel.

In verschillende klinische onderzoeken waarbij patiënten behandeld zijn met  $\alpha$ -Galcer geladen dendritische cellen en/of in vitro gestimuleerde iNKT cellen laten een overwegend positief resultaat zien. Vooral na toediening van de in vitro gestimuleerde en Th1 gepolariseerde iNKT cellen trad er een verbetering op in de tumorimmunosurveillance. En een gedeeltelijke antitumor respons in een aantal patiënten.

Belangrijk is dat de behandeling met  $\alpha$ -Galcer geladen dendritische cellen en/of in vitro gestimuleerde iNKT cellen in mensen wordt getolereerd. In geen van de klinische onderzoeken is melding gemaakt van ernstige bijwerkingen.

De twee combinatietherapieën met Mabs laten een toegenomen, vrijwel volledige tumornecrose zien. Deze therapieën zijn gebaseerd op de werking van iNKT cellen, waardoor er via de iNKT cellen een toegenomen tumorimmunosurveillance optreedt.

Echter, het idee van een combinatietherapie is nog niet in een klinisch onderzoek getest. Waardoor het onbekend is of de combinatietherapie door mensen wordt getolereerd. Daarnaast is in de laatste muizenstudie gebruik gemaakt van CD40, wat er voor zorgt dat de klinische relevantie van dit onderzoek laag is.

Maar het belangrijkste idee achter de combinatietherapie, dat een combinatie van in vitro gestimuleerde iNKT cellen samen met antilichamen een vrijwel volledige tumornecrose kunnen bewerkstelligen, is in deze muizenstudies bewezen.

Wel moet gelet worden op het feit dat een behandeling met of door iNKT cellen ingrijpt op de bestaande balans in het immuunsysteem. Mogelijkerwijs kan een behandeling met of door iNKT cellen leiden tot auto-immuniteit doordat de balans tussen iNKT en nonNKT cellen verstoord wordt. Echter hierbij moet wel worden aangetekend dat kanker een dodelijke ziekte is en dat in geen van de klinische onderzoeken melding is gemaakt van ernstige bijwerkingen.

Kortom, een behandelmethode op basis van iNKT cellen heeft een groot potentieel in de behandeling tegen tumoren. Echter, om ernstige bijwerkingen uit te sluiten is meer onderzoek nodig naar de manier van toedienen, via in vitro gestimuleerde iNKT cellen of via monoclonale antilichaamtherapie.

## Literatuurlijst

1. The World Health Organization's Fight Against Cancer: Strategies That Prevent, Cure and Care. 2007.
2. Schroering AG, Edelbrock MA, Richards TJ, Williams KJ. 2007. The cell cycle and DNA mismatch repair. *Exp Cell Res* 313(2):292-304.
3. Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. 2003. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 12:1164-5.11.
4. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med.* 195(5):625-36
5. Wu L, Van Kaer L. 2009. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 9(1):4-14.
6. Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2007. iNKT cells in allergic disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 314:269-91.
7. Terabe M, Berzofsky JA. 2007. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol.* 11:491-6.
8. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. 2008. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr. Op. Immunol.* 20:358-368.
9. Godfrey DI, Kronenberg M. 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 114(10):19-88.
10. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* (11):573-83.
11. Balato A, Unutmaz D, Gaspari AA. 2009. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *J Invest Dermatol.* 129(7):1628-42.
12. Emoto M., Emoto Y. 2009. Intracellular Bacterial Infection and Invariant NKT Cells. *Yonsei Med J* 50(1):12 – 21
13. Berzofsky JA, Terabe M. 2008. NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. *J Immunol.* 180(6):3627-35.
14. Kronenberg M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 26:877-900.
15. Godfrey DI, Berzins SP. 2007. Control points in NKT-cell development. *Nature rev.* 7:505- 516
85. Kronenberg M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 26:877-900.
16. Ishihara S, Nieda M, Kitayama J, Osada T, Yabe T, Ishikawa Y, Nagawa H, Muto T, Juji T. 1999. CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur J Immunol.* 8:2406-13.
17. Dougan SK, Kaser A, Blumberg RS. 2007. CD1 expression on antigen-presenting cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 314:113-41.
18. Kronenberg M, Gapin L. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 8:557-68

19. Sieling PA, Porcelli SA, Duong BT, Spada F, Bloom BR, Diamond B, Hahn BH. 2000. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J Immunol.* 165(9):5338-44.
20. Fischelevich R, Malanina A, Luzina I, Atamas S, Smyth MJ, Porcelli SA, Gaspari AA. 2006. Ceramide-dependent regulation of human epidermal keratinocyte CD1d expression during terminal differentiation. *J Immunol.* 176(4):2590-9.
21. Fiedler T, Walter W, Reichert TE, Maeurer MJ. 2002. Regulation of CD1d expression by murine tumor cells: escape from immunosurveillance or alternate target molecules? *Int J Cancer.* 98(3):389-97.
22. Motohashi S, Nakayama, T. 2008. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Science* 99( 4) 638 – 645.
23. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. 2002. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med.* 195(5):637-41
24. Kim CH, Butcher EC, Johnston B. 2002. Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol.* 11:516-9.
25. Del Prete G. 1996. The Concept of Type-I and Type-2 Helper T Cells and Their Cytokines in Humans. *Int Rev Immunol.* 1998;16(3-4):427-55
26. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. 2007. *Cellular and Molecular immunology*, 6<sup>th</sup> edition. Chapter 12: Cytokines.
27. La Cava A, Van Kaer L, Dong-Shi F. 2006. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *TRENDS in Immunology* 27; 7: 322-327.
28. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191(4):661-8.
29. Molling JW, Moreno M, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, von Blumberg BM, Bontkes HJ. 2008. Invariant natural killer T cells and immunotherapy of cancer. *Clin Immunol.* 129(2):182-94.
30. Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udono H, Murata I, Ohtsuka K, Kohno S. 2003. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 198(2):219-28.
31. Sasaki J, Dejeansart M, De Bruyn J. 1994. The expression of mycobacterial heat shock protein (HSP64) on Meth A tumour cells. *Immunol Cell Biol.* 72(5):415-8.
32. Colgan SP, Pitman RS, Nagaishi T, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Mayer LF, Shao L, Sartor RB, Subjectk JR, Blumberg RS. 2003. Intestinal heat shock protein 110 regulates expression of CD1d on intestinal epithelial cells. *J Clin Invest.* 112(5):745-54.
33. Nicchitta CV. 2003. Come forth CD1d: Hsp110 in the regulation of intestinal epithelial CD1d expression. *J Clin Invest.* 112(5):646-8.
34. Lin H, Nieda M, Rozenkov V, Nicol AJ. 2006. . Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells. *Exp Hematol.* 34(3):289-95.

35. Galli G, Pittoni P, Tonti E, Malzone C, Uematsu Y, Tortoli M, Maione D, Volpini G, Finco O, Nuti S, Tavarini S, Dellabona P, Rappuoli R, Casorati G, Abrignani S. 2007. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(10):3984-9.
36. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. 2006. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2(3):213-9
37. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Van Kaer L, Okumura K, Saiki I. 2002. IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood*. 100(5):1728-33.
38. Hermans IF, Silk JD, Gileadi U, Salio M, Mathew B, Ritter G, Schmidt R, Harris AL, Old L, Cerundolo V. 2003. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol*. 171(10):5140-7.
39. Liu K, Idoyaga J, Charalambous A, Fujii S, Bonito A, Mordoh J, Wainstok R, Bai XF, Liu Y, Steinman RM. 2005. Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. *J Exp Med*. 202(11):1507-16.
40. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. 2009. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol*. 218(2):246-50. Review.
41. Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublely GJ, Wilson SB, Balk SP, Exley MA. 2001. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol*. 167(7):4046-50.
42. Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, Yamamura T, Kumar V, Berzofsky JA. 2007. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J Immunol*. 179(8):5126-36.
43. Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, Imamura M. 2005. Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res*. 11(20):7322-7
44. Molling JW, Langius JA, Langendijk JA, Leemans CR, Bontkes HJ, van der Vliet HJ, von Blumberg BM, Scheper RJ, van den Eertwegh AJ. 2007. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 25(7):862-8.
45. Kawano T, Cui J, Koezuka Y. 1997. CD1d restricted and TCR-mediated activation of Va14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-29.
46. Schmiege J, Yang G, Franck RW, Tsuji M. 2003. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med*. 198(11):1631-41.
47. Kawano T, Nakayama T, Kamada N, Kaneko Y, Harada M, Ogura N, Akutsu Y, Motohashi S, Iizasa T, Endo H, Fujisawa T, Shinkai H, Taniguchi M. 1999. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res*. 59(20):5102 -5.
48. Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublely GJ, Wilson SB, Balk SP, Exley MA. 2001. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol*. 167(7):4046-50.

49. Konishi J, Yamazaki K, Yokouchi H, Shinagawa N, Iwabuchi K, Nishimura M. 2004. The characteristics of human NKT cells in lung cancer--CD1d independent cytotoxicity against lung cancer cells by NKT cells and decreased human NKT cell response in lung cancer patients. *Hum Immunol.* 65(11):1377-88.
50. Yanagisawa K, Seino K, Ishikawa Y, Nozue M, Todoroki T, Fukao K. 2002. Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J Immunol.* 168(12):6494-9
51. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, von Blomberg BM, Scheper RJ, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJ, Roelvink M, Beijnen J, Zwierzina H, Pinedo HM. 2002. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res.* 8(12):3702-9.
52. Okai M, Nieda M, Tazbirkova A, Horley D, Kikuchi A, Durrant S, Takahashi T, Boyd A, Abraham R, Yagita H, Juji T, Nicol A. 2002. Human peripheral blood Valpha24+ Vbeta11+ NKT cells expand following administration of alpha-galactosylceramide-pulsed dendritic cells. *Vox Sang.* 83(3):250-3.
53. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, Abraham R, Juji T, Macfarlane DJ, Nicol AJ. 2004. Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood.* 103(2):383-9.
54. Chang DH, Osman K, Connolly J, Kukreja A, Krasovsky J, Pack M, Hutchinson A, Geller M, Liu N, Annable R, Shay J, Kirchoff K, Nishi N, Ando Y, Hayashi K, Hassoun H, Steinman RM, Dhodapkar MV. 2005. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med.* 201(9):1503-17.
55. Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, Fuchida H, Higashino K, Otsuji M, Iizasa T, Nakayama T, Taniguchi M, Fujisawa T. 2005. A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 11(5):1910-7.
56. Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, Otsuji M, Iizasa T, Hanaoka H, Shimizu N, Horiguchi S, Okamoto Y, Fujii S, Taniguchi M, Fujisawa T, Nakayama T. 2006. A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 12(20):6079-86.
57. Uchida T, Horiguchi S, Tanaka Y, Yamamoto H, Kunii N, Motohashi S, Taniguchi M, Nakayama T, Okamoto Y. 2008 Phase I study of alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother* 57:337-345
58. Kunii N, Horiguchi S, Motohashi S, Yamamoto H, Ueno N, Yamamoto S, Sakurai D, Taniguchi M, Nakayama T, Okamoto Y. 2009. Combination therapy of *in vitro*-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci* 100: 1092-1098.
59. Ayello J, v/d Ven C, Cairo E, Hochberg J, Baxi L, Satwani P, Cairo MS. 2009. Characterization of natural killer and natural killer-like T cells derived from ex vivo expanded and activated cord blood mononuclear cells: Implications for adoptive cellular immunotherapy. *Exp. Hemato.* 37:1216-

122977. Motohashi S, Nakayama, T. 2008. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Science* 99( 4) 638 – 645.
60. Molling JW, Moreno M, de Groot J, van der Vliet HJ, von Blomberg BM, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Bontkes HJ. 2008. Chronically stimulated mouse invariant NKT cell lines have a preserved capacity to enhance protection against experimental tumor metastases. *Immunol Lett* 118(1):36-43.
61. Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med*. 202(9):1279-88.
62. Takeda K, Okumura K, Smyth MJ. 2007. Combination antibody-based cancer immunotherapy. *Cancer Sci*. 98(9):1297-302.
63. Arsene D, Galais MP, Bouhier-Leporrier K, Reimund JM. 2006. Recent developments in colorectal cancer treatment by monoclonal antibodies. *Expert Opin Biol Ther*. 11:1175-92.
64. Teng MWL, Sharkey J, McLaughlin NM, Exley MA, Smyth MJ. 2009. CD1d based combination therapy eradicates established tumors in mice. *Jour. Immunol*. 183:1911-1920.