

201216013A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

非小細胞肺癌に対する NKT 細胞を用いた
免疫細胞治療の開発研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本橋 新一郎

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
非小細胞肺癌に対するNKT細胞を用いた免疫細胞治療の開発研究	本橋 新一郎	-----3
II. 分担研究報告		
1. NKT細胞を用いた免疫細胞治療の実施に関する研究	本橋 新一郎	-----9
2. NKT細胞を用いた免疫細胞治療の実施と追跡調査に関する研究	吉野 一郎	-----14
3. 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	中山 俊憲	-----18
4. 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	花岡 英紀	-----22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----62
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----63

非小細胞肺癌に対する NKT 細胞を用いた免疫細胞治療の開発研究

研究代表者 本橋 新一郎（千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学 准教授）

研究要旨

肺癌に対するNKT細胞を標的とした臨床研究として、進行・再発非小細胞肺癌の抗癌剤による初回治療後の症例に対して、 α GalCer パルス樹状細胞を用いた免疫細胞治療（Chiba-NKT）の開発研究を実施している。成分採血にて採取した末梢血単核球より α GalCer パルス樹状細胞を調製したところ、十分な細胞数を培養することが可能であり、かつ全ての培養細胞において投与のための最終検査基準を満たした。これら培養細胞を用いて計4回、静脈内投与を行った。2013年3月末時点で9例を登録し、7例でプロトコール完遂、1例は study off、1例は進行中である。本臨床研究の主要評価項目である全生存期間は、1例において12ヶ月経過時点での原病死を認め、他の症例に関しては現在のところ生存が確認されている。今後プロトコールに沿って継続して追跡調査を行う予定である。プロトコール治療の終了した8例における臨床効果は、完全奏功（CR）0名、部分奏功（PR）1名、安定（SD）4名、進行（PD）3名であった。1例でグレード3の癌性疼痛を認めたが、他の症例においてはグレード2以上の有害事象を認めなかった。また、治療前後の患者末梢血 NKT 細胞数は8例中5例で有意な増加を認め、臨床効果がPRであった症例3では唯一、1コース目と2コース目の両方での増加が確認された。また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。

研究分担者

吉野 一郎	千葉大学大学院医学研究院	呼吸器病態外科学	教授
中山 俊憲	千葉大学大学院医学研究院	免疫発生学	教授
花岡 英紀	千葉大学医学部附属病院	臨床試験部	診療教授

研究協力者

吉田 成利	千葉大学大学院医学研究院	呼吸器病態外科学	准教授
溝渕 輝明	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	講師
岩田 剛和	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	助教

國井 直樹 千葉大学大学院医学研究院
鎌田 稔子 千葉大学大学院医学薬学府
三瀬 直子 千葉大学大学院医学薬学府
川村 美香 千葉大学大学院医学薬学府
中野 友理 千葉大学大学院医学薬学府

免疫発生学 特任研究員
大学院生
大学院生
大学院生
大学院生

A. 研究目的

原発性肺癌は発生頻度が高く、予後も不良であり、新規治療法の開発が求められている。そこで千葉大学では強力な抗腫瘍効果を持つ natural killer T (NKT) 細胞とその特異的リガンド α -galactosylceramide (α GalCer)に着目し、体内での NKT 細胞活性化を目指す α GalCer パルス樹状細胞療法の実用化の研究を行っている。2001 年から切除不能進行期及び術後再発非小細胞肺癌症例 11 例に対して、 α GalCer パルス樹状細胞療法を用いた第 I 相臨床研究、2004 年から第 I/II 相試験を施行し、安全性を確認するとともに、一定の臨床効果を示してきた。これらの結果を踏まえ、切除不能進行期もしくは再発非小細胞肺癌に対する α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与 (Chiba-NKT) に関する第 II 相臨床研究を行い、その有効性と安全性を検討するとともに培養細胞の安定供給ならびに調製細胞の評価法を確立し、さらに患者の体内での NKT 細胞特異的な反応を確認して、臨床効果との相関を調べることを本研究の目的とする。また、本臨床研究を適切に遂行していくため、ICH-GCP 基準の臨床試験実施体制の整備を行い、これに基づく試験を展開する。

B. 研究方法

- 1) 適格基準を全て満たし、かつ除外基準全てに該当しない患者を登録した。全ての症例に関し、試験担当医師が症例登録票に記入、適格基準判定委員会にて判定を行った上で登録を行った。
- 2) 登録患者に対し試験開始日 (day 0) と 2 クール目開始日 (day 42) に成分採血を行い、 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個の末梢血単核球を採取、細胞調製担当者が決められた Standard Operation Procedure (SOP) に従って細胞培養を行い、出荷のための最終検査 (細胞数、生存率、エンドトキシンの測定) を行った上で、培養 7 日目と 14 日目に調製済 α GalCer パルス樹状細胞を出荷した。
- 3) 調製済 α GalCer パルス樹状細胞を当該患者に対し、day 7, 14, 49, 56 の計 4 回点滴静注した。安全性の評価として、day 77 まで有害事象の発生の確認を行い、CTCAE ver 4.0 日本語訳 JCOG 版に基づいて評価を行った。
- 4) 試験終了後の患者に対し追跡調査を行い、全生存期間ならびに無増悪生存期間を求めた。

- 5) 抗腫瘍効果の判定として、試験開始前に撮影した胸腹部 CT にて検出された測定可能病変から標的病変を設定し、終了時に撮影した画像と比較検討し、RECIST ver.1.1 に基づいて効果判定を行った。
- 6) 調製した樹状細胞について、表面抗原発現の詳細な解析についてフローサイトメトリー法を用いて行い、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。
- 7) 末梢血リンパ球中の NKT 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 細胞数を算出し、NKT 細胞数の増加率を求め、臨床効果との比較を行った。
- 8) 臨床試験の施行にあたり実施体制の整備を行い、これに基づいて試験を実施した。
- 9) 臨床試験の施行にあたりモニタリング体制の整備を行い、これに基づいてモニタリングを実施した。
- 10) 臨床試験の施行にあたり監査体制の整備を行い、これに基づいて監査を実施した。
- 11) 臨床試験の施行にあたりデータマネージメントの整備を行い、これに基づいてデータマネージメントを実施した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたり、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。また全ての被験者に対し口頭ならびに文書によるインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

- 1) 2013 年 3 月末現在、9 名の患者を登録し、そのうち 7 名でプロトコール治療を完遂、1 名は study off、1 名は進行中である。症例 8 においては、1 クール終了時点で明らかな腫瘍の増大を認めため、本治療の無効例であると判断し、プロトコールに沿って 2 クール目を開始する前に study off とした。
- 2) α GalCer パルス樹状細胞の調製において全ての培養において投与目標細胞数を上回る細胞の培養が可能であり、かつ全ての培養細胞は投与のための最終検査基準を満たした。
- 3) 安全性の評価としては、1 例でグレード 3 の癌性疼痛を認めたが、他の症例においてはグレード 2 以上の有害事象を認めなかった。
- 4) 試験終了後の初回の追跡調査を 4 例に行い、1 例において 12 ヶ月経過時点での原病死を認めた。他の症例に関しては、現在のところ生存が確認されている。また試験終了時に部分奏功 (PR) と評価された 1 例および安定 (SD) と評価された 2 例で病勢の進行 (PD) を認めた。
- 5) 全 4 回の細胞投与に用いた細胞群における HLA-DR 陽性 CD11c 陽性 CD86 陽性樹状細胞の割合は、0.8%から

77.6%と非常に多様な発現率を示し、末梢血 NKT 細胞の増加率ならびに腫瘍縮小効果との相関は認めていない。

- 6) 各コースにおける樹状細胞投与後に、8例中5例で1.5倍以上の有意なNKT細胞の増加を認め、臨床効果がPRであった症例3においてのみ1コース目と2コース目の両方で有意な上昇が確認された。
- 7) プロトコール治療の終了した8例における臨床効果は、完全奏功(CR)0名、PRは1名、SDは4名、PDは3名であった。PDと評価された1例では原発巣は本治療プロトコールにて、治療前のベースラインに比して55%の縮小を認めたが、新規病変の出現を認めたためPDと判定された。
- 8) 臨床試験の実施において、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。
- 9) 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。一方で、責任医師および分担医師の協力のもと、疾患と細胞治療に関する教育をモニターに対し実施し、その教育研修も同時に行った。
- 10) システム監査および試験の実施状況の監査については臨床試験部内の倫理支

援監査部門が対応をした。

- 11) データマネジメント業務において、本試験を実施するためのシステムの構築を行い、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た。症例報告書の問題点の指摘や有害事象への対応などを行い、試験の質の確保とデータの信頼性の向上をはかった。

D. 考察

- 1) 本臨床研究の目標症例数は35例、登録期間は3年間であることから、1年経過時点で9例の登録が完了しており、ほぼ計画通り進行していると思われる。今後、大きな問題が生じない限り、現在のペースで試験を継続して行く予定である。
- 2) α GalCer パルス樹状細胞の調製に関して、臨床研究遂行のための樹状細胞は安全かつ十分に培養することが可能であった。
- 3) 安全性について、グレード3の癌性疼痛を認めた症例8では治療プロトコール開始前より後腹膜に存在した転移巣に伴う激しい腰痛の訴えがあり麻薬性鎮痛薬を使用していたが、コントロールはやや不良で鎮痛薬を増量していた。また腫瘍も増大傾向であったため、観察期間中の増悪もある程度危惧されていた。本症例における疼痛の増悪に関しては、原病の悪化に伴うもので、細胞治療による影響である可能性は低いと判断された。

- 4) 試験終了後の追跡調査による全生存期間および無増悪生存期間の評価に関しては、本臨床研究開始より約 1 年しか経過しておらず、今後プロトコルに沿って継続して追跡調査を行う予定である。
- 5) 調製された樹状細胞のモニタリングとしては、樹状細胞マーカーである HLA-DR と CD11c、CD86 による評価では不十分であり、新たな評価方法が必要である可能性が示唆された。
- 6) 臨床効果を誘導するためには全身的な NKT 細胞特異的免疫反応の誘導が重要であり、これらの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り得ると考えられた。治療効果の誘導には、1 クールのみ免疫反応では不十分であり、繰り返す免疫反応が必要である可能性が示され、 α GalCer パルス樹状細胞の 4 回投与の根拠となると思われた。
- 7) 臨床効果に関しては、症例 3 において PR を経験し、症例 7 でも肺内の病変に関しては腫瘍の有意な縮小を認めた。静脈内投与された樹状細胞は肺内でトラップされ、肺内に存在する NKT 細胞を活性化して抗腫瘍活性を発揮するものと考えられる。従って、本治療アプローチは肺外病変に対する治療としては不十分な可能性があり、今後の症例の蓄積を待って検討する必要があると考えられた。
- 8) 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。
- 9) 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。
- 10) 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。本研究において今後効果的な方法を確立していく必要があると考えられる。
- 11) 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

非小細胞肺癌に対する NKT 細胞を用いた免疫細胞治療の臨床研究を ICH-GCP 基準として実施するための体制整備を行い、実施した。進行・再発肺癌患者末梢血を用いた α GalCer パルス樹状細胞の調製は可能であり、本細胞治療は症状の増悪を来すような急激な腫瘍増大を認めている患者を除けば安全に施行できると考えられた。一部の症例においては有意な腫瘍の縮小も認め、NKT 細胞特異的免疫反応との関

連も認められることから、本治療アプローチの有効性が示唆されている。今後もプロトコールに沿って症例登録を継続していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fuji, S., Taniguchi, M., Yoshino, I., and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α -Galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *J. Clin. Immunol.* 2012; 32(5): 1071-1081
2. Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Tumes, D.J., Motohashi, S., Kawahara, K., Kinjo, Y. and Nakayama, T. Regulation of memory CD4 T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109 (42): 16992-16997

2. 学会発表

1. 本橋新一郎. NKT細胞を標的とした免疫細胞治療の現状と今後の展望 第9回がんワクチン療法研究会学術集会, 筑波, 2012年11月17日
2. 本橋新一郎, 吉野一郎, 谷口克, 中山俊憲. 非小細胞肺癌に対する α ガラクトシルセラミドパルス樹状細胞療法 第50回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2012年10月25-27日
3. 本橋新一郎, 石橋史博, 長門芳, 國井直樹, 谷口克, 吉野一郎, 中山俊憲. 原発性肺癌に対するNKT細胞免疫治療

後の腫瘍局所における免疫応答の解析
第71回日本癌学会学術総会, 札幌,
2012年9月19-21日

4. Nakayama, T., and Motohashi, S.: Tumor immunity: Regulation by innate and acquired immunity. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
5. 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-千里ライフサイエンスセミナーD3 がん免疫療法の新展開, 大阪, 2012年9月7日
6. 國井直樹, 本橋新一郎, 中山俊憲. Enhanced function of redirected human T cells expressing LAT that is resistant to ubiquitylation. 第16回日本がん免疫学会総会, 札幌, 2012年7月26日
7. Nagato, K., Motohashi, S. and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant NKT cells in the tumor microenvironment after α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. CIs 2012 Annual Meeting, Chicago USA, May17-20, 2012
8. 中山俊憲. 免疫記憶を利用した難治性喘息と肺癌の新規免疫治療法開発のトランスレーショナルリサーチ 第11回国際バイオテクノロジー展/技術会議, 東京, 2012年4月25日

H. 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

NKT 細胞を用いた免疫細胞治療の実施に関する研究

研究分担者：本橋 新一郎 千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学 准教授
研究協力者：鎌田 稔子 千葉大学大学院医学薬学府 大学院生

研究要旨

原発性肺癌に対するNKT 細胞を標的とした臨床研究として、 α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）に関する第II相臨床研究を施行している。適格基準を満たした進行・再発非小細胞肺癌症例に対して、前治療から4週間の休薬期間を置いた後に day 0 に成分採血を行い、採取した末梢血単核球由来の α GalCer パルス樹状細胞を調製、day 42 より2コース目を同様に施行し、計4回の樹状細胞投与を行った。その結果、必要十分な細胞数を培養することが可能であり、かつ全ての培養細胞において投与のための最終検査基準を満たした。2013年3月末時点で9例の症例登録を行い、7例にて2コースのプロトコール治療を完遂した。1例にて1コースのプロトコール治療後の原病悪化により中止となったが、それ以外に重篤な有害事象を認めていない。

A. 研究目的

日本における超高齢社会の到来とともに、高齢者に多い原発性肺癌の患者数は増加を続け、現在7万人を越える方が肺癌で亡くなっている。肺癌の多くを占める切除不能進行期肺癌や肺癌術後再発の治療は主に抗癌剤による化学療法が中心となるが、高齢者は臓器機能が低下していたり合併症を抱えているケースが多く、侵襲性の強い治療は時として困難となる。そこで千葉大学では強力な抗腫瘍効果を持つ natural killer T (NKT) 細胞とその特異的リガンド α -galactosylceramide (α GalCer) に着目し、体内でのNKT細胞活性化を

指す α GalCer パルス樹状細胞療法の開発研究を行っている。2001年から切除不能進行期及び術後再発非小細胞肺癌症例11例に対して施行した α GalCer パルス樹状細胞療法を用いた第I相臨床研究では、安全性とNKT細胞の免疫反応を確認した。続いて、2004年3月より第I/II相試験を施行し、登録23例中17例がプロトコールを完遂した。末梢血 α GalCer 反応性IFN γ 産生細胞数の明らかな増加を10例に認め、この10例では非増加群7例と比較し有意に全生存期間の延長を認めた。これらの結果を踏まえ、切除不能進行期もしくは再発非小細胞肺癌に対する α GalCer パ

ルス樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）に関する第Ⅱ相臨床研究を先進医療として実施し、その有効性と安全性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1) 症例登録およびプロトコール治療

以下の適格基準を全て満たし、かつ除外基準全てに該当しなかった症例を臨床研究に登録した。

選択基準：①非小細胞癌の確定診断、②ⅢB/Ⅳ期または術後再発、③化学療法を終了している、④測定可能病変を有する、⑤20～75歳、⑥PS 0～1、⑦先行治療から4週間以上経過、⑧骨髄、肝、腎、肺等の機能が基準を満たす、⑨予後が3ヶ月以上期待される、⑩末梢血にNKT細胞が存在する、⑪文書による同意

除外基準：①重篤な感染症および重大な合併症、②胸水、腹水、心嚢水の大量貯留、③未治療の脳転移、④同時性重複癌、⑤コルチコステロイド使用中、⑥自己免疫疾患、⑦肝炎の既往、⑧HBs抗原、HCV抗体、HIV抗体又はHTLV-1抗体が陽性、⑨重篤な心疾患症例もしくは肺疾患、⑩アルブミン過敏症の既往、⑪妊娠および授乳期、⑫成分採血禁忌症例、⑬担当医の判断

登録患者に対し試験開始日（day 0）に成分採血を行い、 $3 \sim 4 \times 10^9$ 個の末梢血単核球を採取し、その後、1週目（day 7）および2週目（day 14）に α GalCerパルス樹状細胞を点滴静注にて投与する。同様のスケジュールで6週目（day 42）から2

コース目を施行し、計4回の α GalCerパルス樹状細胞の投与を行う（図1）。

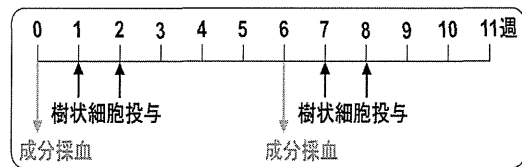


図1 臨床研究スケジュール

2) α GalCerパルス樹状細胞の調製

投与する治療細胞の調製として、成分採血にて得られた患者血液を試験担当医師より受け取り、千葉大学医学部附属病院未来開拓センター内のCell Processing Center (CPC)で培養を開始する。まず、得られた末梢血から遠心分離法にて単核球細胞を回収し、所定濃度のIL-2とGM-CSFを添加した培地にて7日ないし14日間培養する。投与前日に α GalCerを加えて、 α GalCerパルス樹状細胞とする。培養終了後に細胞を回収し、洗浄後に体表面積 1 m^2 当たり 1×10^9 個の細胞をアルブミン添加生理食塩水100 mLに懸濁して出荷する。全ての培養細胞について出荷のための最終検査（細胞数、生存率、エンドトキシンの測定）を行う。

3) 安全性の評価

臨床研究治療期間として、11週（day 77）まで有害事象の発生の確認を行い、CTCAE ver 4.0に基づいて評価を行った。（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたり、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。また全ての被験者に対し口頭ならびに文書によるインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

- 1) 2013年3月末現在、9名の患者を登録し、そのうち7名でプロトコール治療を完遂、1名は1コース終了後に study off、1名は進行中である。(表1) study off となった症例8においては、1クール終了時点で明らかな腫瘍の増大を認めたことによる癌性疼痛の悪化を認めため、プロトコールに沿って2クール目を開始する前に study off とした。
- 2) 全ての培養において投与目標細胞数を上回る α GalCer パルス樹状細胞の培養が可能であり、かつ全ての培養細胞は投与のための最終検査基準を満たした。
- 3) 安全性の評価としては、症例8において原病悪化に伴う癌性疼痛の悪化を認め、日常動作の制限があったためグレード3と判定した。他の症例においてはグレード2以上の有害事象を認めなかった(表2)。

D. 考察

- 1) 本臨床研究の目標症例数は35例、登録期間は3年間であることから、1年経過時点で9例の登録が完了しており、ほぼ計画通り進行していると思われる。今後、大きな問題が生じない限り、現在のペースで試験を継続して行く予定である。
- 2) α GalCer パルス樹状細胞の調製に関しては、臨床研究遂行のための樹状細胞は安全かつ十分に培養することが可能であった。

- 3) 安全性に関しては、グレード3の癌性疼痛を認めた症例8では治療プロトコール開始前より後腹膜に存在した転移巣に伴う激しい腰痛の訴えがあり麻薬性鎮痛薬を使用していたが、コントロールはやや不良で鎮痛薬を増量していた。また腫瘍の増大傾向が明らかであったため、観察期間中の急速な増悪も危惧されていたが、御本人の強い希望もあり登録とした。本症例における疼痛の増悪に関しては、千葉大学大学院医学研究院倫理審査委員会にて原病の悪化に伴うもので、細胞治療による影響である可能性は低いと判断された。

E. 結論

α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与の臨床研究を予定通り順調に進めている。進行・再発肺癌患者末梢血より、プロトコール治療に必要な α GalCer パルス樹状細胞を調製することが可能であった。また安全性に関しては、症状増悪を来すような急激な腫瘍増大を認めている症例を除けば安全に施行可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fuji, S., Taniguchi, M., Yoshino, I., and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor

microenvironment after
 α -Galactosylceramide-pulsed antigen
presenting cells. *J. Clin. Immunol.* 2012;
32(5): 1071-1081

2. Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y.,
Watanabe, Y., Tumes, D.J., Motohashi, S.,
Kawahara, K., Kinjo, Y. and Nakayama, T.
Regulation of memory CD4 T-cell pool size
and function by natural killer T cells in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109 (42):
16992-16997

2. 学会発表

1. Nagato, K., Motohashi, S. and Nakayama
T. Accumulation of activated invariant
NKT cells in the tumor microenvironment
after α -galactosylceramide-pulsed antigen
presenting cells. CIS 2012 Annual Meeting,
Chicago USA, May17-20, 2012
2. 田川啓三, 岩田剛和, 山田義人, 鈴木秀
海, 坂入祐一, 山本高義, 田中教久, 畑
敦, 豊田行英, 溝渕輝明, 本橋新一郎,
吉田成利, de Perrot Marc, 吉野一郎.
マウス胸膜中皮腫における IFN- γ 産生
性 iNKT 細胞の役割 第 53 回日本肺癌
学会総会, 岡山, 2012 年 11 月 8-9 日
3. 本橋新一郎, 吉野一郎, 谷口克, 中山俊
憲. 非小細胞肺癌に対する α ガラク
トルシルセラミドパルス樹状細胞療法
第 50 回日本癌治療学会学術集会, 横浜,
2012 年 10 月 25-27 日
4. 本橋新一郎, 石橋史博, 長門芳, 國井直
樹, 谷口克, 吉野一郎, 中山俊憲. 原発
性肺癌に対する NKT 細胞免疫治療後の
腫瘍局所における免疫応答の解析 第
71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
年 9 月 19-21 日
5. Nakayama, T., and Motohashi, S.: Tumor
immunity: Regulation by innate and
acquired immunity. 第 71 回日本癌学会
学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 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 患者背景

症例	年齢	性別	PS	臨床診断			前治療
				病理診断	臨床病期	腫瘍の局在	
1	66	M	1	腺癌	T4N2M0	肺、縦隔リンパ節、骨盤内	CBDCA/PAC/RT
2	49	M	1	腺癌	T2N0M1	肺、脳	CBDCA/PAC/γ-knife
3	52	F	1	腺癌	T2N3M1	肺、肝	CBDCA/PEM/BEV
4	64	F	1	扁平上皮癌	T4N3M0	肺	CDDP/DOC
5	53	M	0	腺癌	T2N2M1	肺、骨	CBDCA/PEM/BEV
6	69	M	1	腺癌	T2N0M0 再発	胸膜	OPE/CDDP/PEM
7	51	F	1	腺癌	T2N3M1	肺、骨	CDDP/PEM/BEV
8	45	M	1	大細胞癌	T3N0M1	肺、後腹膜	CDDP/DOC

略語: Bev(ベバシズマブ)、CBDCA(カルボプラチン)、CDDP(シスプラチン)、DOC(ドセタキセル)、OPE(手術)、PAC(パクリタキセル)、PEM(ペメトレキセド)、PS(パフォーマンスステータス)、RT(放射線治療)

表2 有害事象

症例	有害事象		
	グレード1	グレード2	グレード3
1			
2	発熱、咳嗽		
3	知覚異常、発疹 疼痛、倦怠感		
4			
5	疼痛、発疹		
6	発熱、咳嗽		
7	咽頭痛		
8			癌性疼痛

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

NKT 細胞を用いた免疫細胞治療の実施と追跡調査に関する研究

研究分担者：吉野 一郎	千葉大学大学院医学研究院	呼吸器病態外科学	教授
研究協力者：吉田 成利	千葉大学大学院医学研究院	呼吸器病態外科学	准教授
溝渕 輝明	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	講師
岩田 剛和	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	助教
鎌田 稔子	千葉大学大学院医学薬学府		大学院生

研究要旨

進行・再発非小細胞肺癌の抗癌剤による初回治療後の症例に対して、 α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）を行った。2013年3月末時点で9例が登録され、7例でプロトコルを完遂、1例で study off、1例は進行中である。プロトコルに沿った追跡調査を実施し、症例1において12ヶ月経過時点での原病死を認め、残りの症例では生存が確認されている。プロトコル治療の終了した8例における臨床効果は、完全奏功（CR）0名、部分奏功（PR）1名、安定（SD）4名、進行（PD）3名であった。今後さらに症例を増やし検討を続けるとともに、治療後2年間追跡し予後を含めた調査を行う予定である。

A. 研究目的

原発性肺癌は本邦における全悪性腫瘍による死亡の約20%を占める疾患である。現在の肺癌の根治を目指した治療法で中心をなすのは手術療法であるが、肺癌発見時に手術適応となるのは約30%に過ぎず、肺癌全体の5年生存率は25~30%とされている。切除不能進行期肺癌や肺癌術後再発の治療は主に抗癌剤による全身治療が中心となる。近年開発が進んでいる新規の抗癌剤や分子標的薬などの治療薬により切除不能進行期肺癌や肺癌術後再発の治療成績は徐々に向上しているものの、依然完治は望めず、治療成績はいまだ満足で

きるものではない。そこで肺癌に対する新規治療開発研究としてこれまでに千葉大学で研究を進めている、Natural Killer T (NKT) 細胞を標的とした免疫細胞治療として、切除不能進行期及び術後再発非小細胞肺癌症例に対する、

α -Galactosylceramide (α GalCer) パルス樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）の第II相臨床研究を行い、その有効性と安全性を検討することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

適格基準を全て満たし、かつ除外基準全てに該当しない患者を登録した。全ての

症例に関し、試験担当医師が症例登録票に記入、適格基準判定委員会にて判定を行った上で登録を行った。

登録患者に対し、成分採血にて採取した自己末梢血単核球由来 α GalCer パルス樹状細胞を受け取り、当該患者に対し点滴静注を施行した。同様のスケジュールで6週目（day 42）から2クール目を施行した。試験終了後の患者に対し追跡調査を行い、全生存期間ならびに無増悪生存期間を求めた。

抗腫瘍効果の判定として、試験開始前に撮影した胸腹部 CT にて検出された測定可能病変から標的病変を設定し、終了時に撮影した画像と比較検討し、RECIST ver.1.1 に基づいて効果判定を行った。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたり、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。また全ての被験者に対し口頭ならびに文書によるインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

- 1) 2013年3月末現在、9名の患者を登録し、そのうち7名でプロトコル治療を完遂、1名は study off、1名は進行中である。症例8においては、1クール終了時点で明らかな腫瘍の増大を認めため、本治療の無効例であると判断し、プロトコルに沿って2クール目を開始する前に study off とした。
- 2) 主要評価項目である全生存期間に関し

ては、study off となった症例も含めて臨床研究治療期間を終了した全ての症例にて、プロトコルに沿った追跡調査が実施される。試験終了後の初回の追跡調査を4例に行い、1例において12ヶ月経過時点での原病死を認めた。他の症例に関しては、現在のところ生存が確認されている。また試験終了時に部分奏功（PR）と評価された1例および安定（SD）と評価された2例で病勢の進行（PD）を認めた。

- 3) 副次評価項目である RECIST を用いた臨床効果については、完全奏功（CR）0名、PRは1名、SDは4名、PDは3名であった（表1）。PDと判定された3名のうち1例（症例7）では原発巣は本治療プロトコルにて、治療前のベースラインに比して45%（-55%）に縮小を認めた（PR相当、図1）が、新規病変の出現を認めため PD と判定された。

D. 考察

- 1) 臨床効果に関しては、これまでの先行試験ではPR例は認めていなかったが、今回初めて症例3においてPRを経験した。また、症例7でも肺内の病変に関しては腫瘍の有意な縮小を認めため、肺外に新規病変を認めため、PDの判定となった。静注投与された樹状細胞は肺内でトラップされ、肺内に存在するNKT細胞を活性化して抗腫瘍活性を発揮するものと考えられる。

従って、本治療アプローチは肺外病変に対する治療としては不十分な可能性がある。しかし、先行して行った臨床研究では全身的な NKT 細胞特異的免疫反応が確認されており、理論上は遠隔転移巣に対しての効果も期待できる筈である。今後、症例を追加して検討する必要があると考えられた。

- 2) これまでの先行試験も含めて本治療プロトコールに参加した患者は全て腺癌または扁平上皮癌患者であった。今回、初めて症例 8 において大細胞癌の患者に対して細胞投与を行ったが、腺癌や扁平上皮癌に比して大細胞癌では進行が早く、本アプローチの適応とはならない可能性がある。今後、他の症例における検討を追加する必要があると思われる。
- 3) 試験終了後の追跡調査に関しては、本臨床研究開始より約 1 年しか経過しておらず、今後プロトコールに規定した追跡調査を確実に実施していくことでデータを蓄積し、明らかとしていく方針である。

E. 結論

本臨床研究におけるプロトコール治療は予定通りに実施している。一部の症例においては有意な腫瘍の縮小も認められている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fuji, S., Taniguchi, M., Yoshino, I., and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α -Galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *J. Clin. Immunol.* 2012; 32(5): 1071-1081

2. 学会発表

1. 田川啓三, 岩田剛和, 山田義人, 鈴木秀海, 坂入祐一, 山本高義, 田中教久, 畑敦, 豊田行英, 溝渕輝明, 本橋新一郎, 吉田成利, de Perrot Marc, 吉野一郎. マウス胸膜中皮腫における IFN- γ 産生性 iNKT 細胞の役割 第 53 回日本肺癌学会総会, 岡山, 2012 年 11 月 8-9 日
2. 本橋新一郎, 吉野一郎, 谷口克, 中山俊憲. 非小細胞肺癌に対する α ガラクトシルセラミドパルス樹状細胞療法 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2012 年 10 月 25-27 日
3. 本橋新一郎, 石橋史博, 長門芳, 國井直樹, 谷口克, 吉野一郎, 中山俊憲. 原発性肺癌に対する NKT 細胞免疫治療後の腫瘍局所における免疫応答の解析 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19-21 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 臨床効果

症例	臨床効果		予後 (観察期間)
	判定(%)	新規病変	
1	SD(118%)	-	死亡(11ヶ月)
2	PD(108%)	+	生存(9ヶ月)
3	PR(66%)	-	生存(10ヶ月)
4	SD(115%)	-	生存(8ヶ月)
5	SD(113%)	-	生存(3ヶ月)
6	SD(105%)	-	生存(3ヶ月)
7	PD(45%)	+	生存(3ヶ月)
8	PD(123%)	-	生存(3ヶ月)

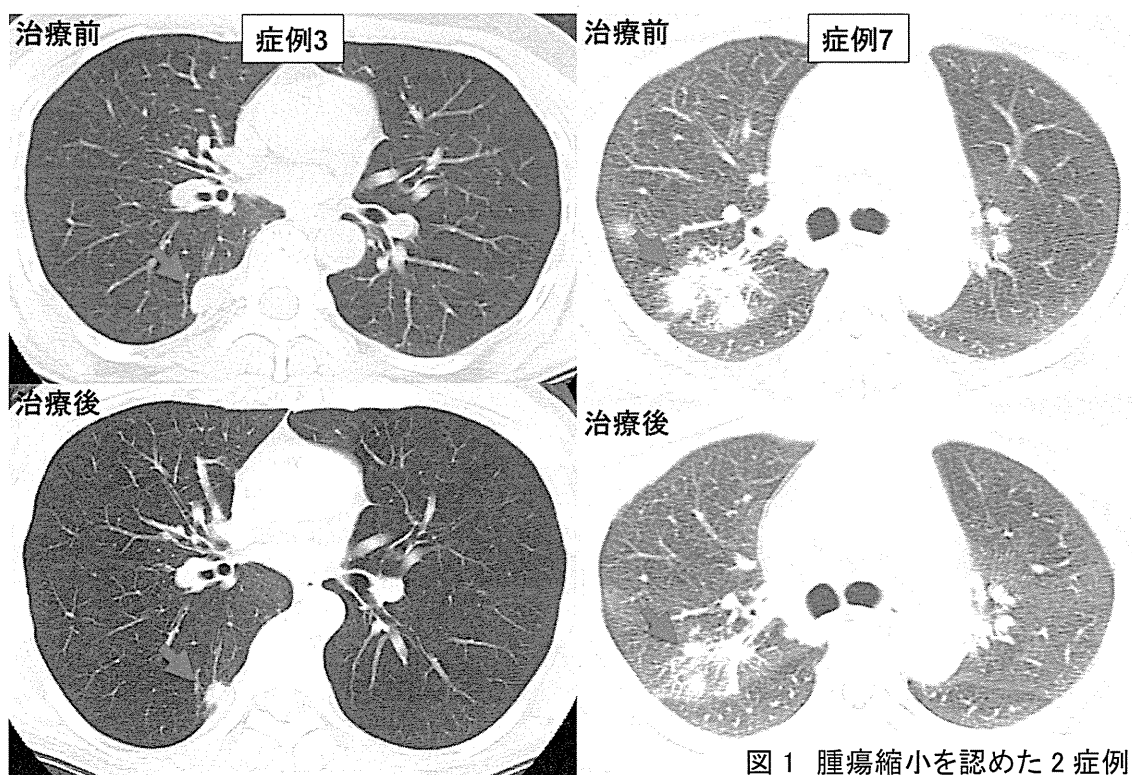


図1 腫瘍縮小を認めた2症例

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：三瀬 直子	千葉大学大学院医学薬学府	大学院生
川村 美香	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 GalCer パルス樹状細胞の表面抗原分子の検討を行った。その結果、従来の樹状細胞マーカーとされる HLA-DR と CD11c、CD86 による評価では不十分であることが分かった。また、治療前後の患者末梢血 NKT 細胞の増加率を算出したところ、8 例中 5 例で有意な増加を認め、臨床効果が PR であった症例 3 では唯一、1 コース目と 2 コース目の両方での増加が確認された。投与細胞や免疫反応のモニタリングに関する評価として、これらだけでは不十分であり、新たな解析方法の検討が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

アフレーシスによって採取された血液より、 α GalCer パルス樹状細胞を調製するとともに、これら調製細胞の評価を行い、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、細胞投与と臨床効果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ため、患者末梢血での NKT 細胞特異的な反応を調べた。

状細胞を用いて効率良く 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。しかし表面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、表面抗原発現の詳細な解析についてフローサイトメトリー法を用いて行い、末梢血における免疫反応や臨床効果との関係を検証した。

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

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

末梢血 NKT 細胞の表面抗原をフローサイトメトリー法にて検討した。CD3 陽性、V α 24 陽性、V β 11 陽性細胞を NKT 細胞と定義し、末梢血リンパ球中の NKT 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 細胞数を算出した。細胞投与前の NKT 細胞数を 1 として治療介入後の NKT 細胞数の増加率を求め、臨床効果との比較を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に付随する研究であり、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おり、全ての被験者から文書によるインフォームドコンセントを得ている。また、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行っている。

C. 研究結果

1) 投与細胞の免疫モニタリング

全4回の細胞投与に用いた細胞群における HLA-DR 陽性 CD11c 陽性 CD86 陽性樹状細胞の割合を算出したところ、全ての患者において同一の培地・薬剤・Standard Operation procedure (SOP) を用いて培養を行ったにもかかわらず、0.03%から 40.1%と非常に多様な発現率を示した (表 1)。この割合

には各症例で一定の傾向はあるものの、一部の症例においては各投与日の間でも大きな違いがあった。また、この割合と、末梢血 NKT 細胞の増加率ならびに臨床効果との相関は認めなかった。

表1 投与細胞中のHLA-DR⁺CD11c⁺樹状細胞の割合(%)

症例	1コース目		2コース目	
	Day 7	Day 14	Day 49	Day 56
1	4.2	4.2	6.5	0.4
2	9.1	9.0	9.2	12.8
3	4.0	7.6	11.2	1.6
4	9.6	12.4	11.1	31.2
5	3.5	2.2	6.4	0.03
6	10.5	30.0	0.6	20.3
7	7.7	4.9	12.3	10.3
8	12.0	40.1	-	-

2) 治療前後の末梢血単核球モニタリング

1 コース目および2 コース目における各2回の α GalCer パルス樹状細胞投与による末梢血 NKT 細胞の増加率を別個に評価するため、各コースにおける α GalCer パルス樹状細胞投与前の末梢血 NKT 細胞数を1とした場合の各コースにおける最大増加率を算出したところ、8 例中 5 例で1 コース目または2 コース目で1.5 倍以上の有意な NKT 細胞の増加を認めた (表 2)。さらに、臨床効果が PR であった症例 3 においてのみ1 コース目と2 コース目の療法で NKT 細胞の有意な上昇が確認された。

表2 樹状細胞投与前後の末梢血iNKT細胞数の増加率 (%)

症例	増加率	
	1コース目	2コース目
1	0.56 (day 35)	2.93 (day 56)
2	0.18 (day14)	0.92 (day 77)
3	1.75 (day 35)	1.81 (day 56)
4	1.16 (day 14)	1.57 (day 56)
5	0.34 (day 35)	0.83 (day 56)
6	0.96 (day 35)	5.67 (day 56)
7	0.63 (day 35)	0.59 (day 56)
8	1.61 (day 14)	—

D. 考察

樹状細胞のモニタリングとしては、樹状細胞マーカーである HLA-DR と CD11c、CD86 による評価では不十分であり、新たな評価方法が必要であることが示唆された。

また、治療前後の末梢血単核球のモニタリング結果から、臨床効果を誘導するためには全身的な NKT 細胞特異的免疫反応の誘導が重要であり、これらの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り得ると考えられた。また、8 例中 5 例で 1 コース目または 2 コース目で 1.5 倍以上の有意な NKT 細胞の増加を認めた。特に、唯一 1 コース目と 2 コース目の両方で NKT 細胞の有意な上昇が確認された症例 3 において PR が得られたことから、治療効果の誘導には、1 コース目のみの免疫

反応では不十分であり、繰り返す免疫反応が必要である可能性が示され、本治療プロトコールにおける α GalCer パルス樹状細胞の 4 回投与の根拠となると思われた。これらの研究に加え、治療効果予測に利用しうるバイオマーカーの検索も進めていく必要があると考えられた。

E. 結論

樹状細胞のモニタリングとしては従来から用いていた樹状細胞マーカーによる評価だけでは不十分であり、新たな評価方法の確立が必要である。8 例中 5 例で 1 コース目または 2 コース目で 1.5 倍以上の有意な NKT 細胞の増加を認め、末梢血 NKT 細胞数の有意な増加が 1 コース目と 2 コース目の両方で確認された症例 3 において腫瘍縮小効果が認められ、複数回の NKT 細胞特異的免疫反応の誘導が強力な抗腫瘍活性を誘導した可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fuji, S., Taniguchi, M., Yoshino, I., and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α -Galactosyl ceramide-pulsed antigen presenting cells. *J. Clin. Immunol.* 2012; 32(5): 1071-81
2. Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Tumes, D.J., Motohashi,