

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子を用いた神経保護療法

分担研究者 高橋 和久 千葉大学医学部附属病院 整形外科 教授

研究要旨

脊髄損傷は、主として脊柱に強い外力が加わることにより脊椎の構造が破綻し、脊髄が損傷を受ける病態である。急性期（一般に受傷後数日以内とされる）の脊髄損傷を急性脊髄損傷と呼ぶ。脊髄損傷は本邦で年間約 4000 人が受傷、その疾患の難治性により、現在の患者総数は 20 万人以上といわれている。外傷により脊髄が損傷されると、四肢の運動・感覚麻痺および膀胱・直腸機能障害など種々の症状を呈する。現在の医学では損傷した脊髄そのものを復元させることは不可能とされ、治療法は脱臼・骨折した脊椎を除圧・固定して安定化させる手術と、残存した機能を最大限に活用するためのリハビリテーションのみが行われているのが現状である。したがって、脊髄損傷後の機能予後は受傷後早期の組織損傷の程度によりほぼ決定されてしまっているといえる。急性脊髄損傷の治療として、現在、唯一臨床使用されている薬剤はメチルプレドニゾロンである。メチルプレドニゾロンの大量投与療法はリン脂質の過酸化防止、膜安定化、カルシウムイオンで活性化される酵素の抑制などを介して二次損傷を軽減する効果があるとされる。本邦でも 1997 年より急性脊髄損傷の治療薬として認可され、現在も使用されている。しかし、近年その効果を疑問視する報告が散見され、さらに呼吸器、消化器系への副作用が高率に発生するため、代替薬の必要性が高まっている。

本臨床試験の目的は、急性脊髄損傷に対する G-CSF を用いた神経保護療法を確立することである。現在、脊髄損傷に対する有効な治療薬がないため、本研究にて有効な治療法が確立できれば、麻痺に苦しんでいる患者にとって大きな福音になると考えられる。

本年度は、先進医療「急性脊髄損傷患者に対する顆粒球コロニー刺激因子を用いたランダム化、実薬対照、並行群間比較試験（第Ⅲ相）」（平成 25 年秋頃、開始予定）の開始準備を進めた。平成 24 年 11 月当院治験審査委員会にて承認を受け、先進医療申請のための準備をほぼ終えた。現在、並行して薬事戦略事前相談（平成 25 年春頃、PMDA）を予定している。

A. 研究目的

急性脊髄損傷に対する G-CSF を用いた神経保護療法を確立するために、ランダム化、実薬対照、並行群間比較試験を実施する。

B. 研究方法

急性脊髄損傷患者（AIS=A,B,C）に対してランダム化実薬対照、並行群間比較試験を行い、G-CSF 神経保護療法の有効性を検証する。G-CSF 10 μ g/kg/日を 5 日間点滴静注し、対照群（メチルプレドニゾロン）との間で運動麻痺の推移を比較検討する。

(倫理面への配慮)

本試験は臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省告示、平成20年7月改正)、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守する。

C. 研究成果

顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF、一般名: フィルグラスチム)は血球系に作用する増殖因子であり、顆粒球系細胞の分化・増殖・生存促進などの作用を有する。本邦では、白血球減少症に対して、また末梢血幹細胞移植ドナーに対して、造血幹細胞の末梢血への動員のための投与が臨床的に行われている。中枢神経系においては、骨髄細胞を脳・脊髄中へ動員する作用や、脳卒中モデルに対する神経保護作用などが報告されており、海外では脳梗塞に対する臨床試験が報告されている。これらの報告から、我々はG-CSFが損傷脊髄に対しても神経保護作用を有するという仮説を立てた。そしてこの仮説を実証するため、我々はラットおよびマウスの脊髄損傷モデルにG-CSFの投与を行ったところ、投与後に後肢機能が有意に改善した。さらに我々は、G-CSFの損傷脊髄に対する作用機序について検討を進めた。現在までに得られたデータから、①G-CSFにより動員された骨髄由来幹細胞が脊髄損傷部に生着する、②直接的に神経細胞死を抑制する、③Oligodendrocyteの細胞死を抑制し髄鞘を保護する、④炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)発現を抑制する、⑤血管新生を促進する、という効果が明らかとなった。これらのデータから、G-CSFが急性脊髄損傷において神経保護作用を有する可能性が示唆された。G-CSFを経静脈的に投与すると末梢血中に造血幹細胞が多数動員される。この動員された造血幹細胞の中に表面にCD34抗原を持つ骨髄単核球細胞の分画がある。G-CSF動員末梢血幹細胞(CD34陽性細胞)が急性脊髄

損傷における神経保護のどのように関わっているかを解析する目的で、我々は動物モデルでの基礎研究を行った。すなわち、マウス脊髄不全損傷モデルを作成し、G-CSF動員末梢血幹細胞(CD34陽性細胞)の脊髄損傷部への移植の治療効果を検討した。その結果、CD34陽性細胞移植群においては対照群(Bufferのみを注入)に比し、移植後6週から8週にかけて有意な行動の改善を認めた。健常な脊髄においては血液脊髄関門(Blood Spinal Cord Barrier)が存在するため、G-CSFを投与して末梢血中に動員される造血幹細胞のうち脊髄内に生着しうる数はごく一部にすぎない。しかし、急性脊髄損傷においてはこのBlood Spinal Cord Barrierの破綻に伴い、G-CSFを投与することにより急性期には脊髄の損傷部に造血幹細胞が多数生着し、脊髄再生に関与すると考えられる。これらの根拠から、我々は急性脊髄損傷患者および圧迫性脊髄症急性増悪患者に対するG-CSFの臨床試験を千葉大学医学部附属病院の治験審査委員会に申請し、2008年3月に承認され、2008年6月より安全性・有効性確認を主目的とする医師主導型自主臨床試験を開始した。このプロジェクトは、平成20~22年度の厚生労働科学研究費補助金(H20-臨床研究-一般-013)の交付を受けた。平成20~21年度に安全性評価を主目的とする臨床試験Phase I/IIaを施行した。この試験デザインはオープンラベル用量漸増試験で、コントロールを設定しないものである。第一段階として5例にG-CSFとして5 μ g/kg/日を連続5日間経静脈点滴静注投与し、第二段階として12例に10 μ g/kg/日を連続5日間点滴静注投与した。その結果、全例で程度の差はあるものの運動、感覚麻痺の改善を認めた。血液所見において投与期間中に白血球数の有意な上昇を認めたが投与終了後速やかに投与前の値に戻り、また、重篤な有害事象の発生を認めることはなく、急性脊髄損傷患者および圧

急性脊髄症急性増悪患者における G-CSF 投与の安全性を確認した。この結果から、G-CSF の至適投与量・投与期間・投与方法は $10 \mu\text{g/kg/日}$ の 5 日間経静脈点滴静注投与と判断した。しかし急性脊髄損傷では、受傷時の損傷の程度により神経症状の改善の程度が異なる。また、自然経過で神経症状の改善がある程度得られるため、G-CSF 投与が有意に神経症状の改善をもたらしたか否かの評価は容易ではない。そこで引き続き我々は、G-CSF 神経保護療法の有効性を検証するため、平成 21～22 年度に多施設前向き比較対照試験(Phase IIb 臨床試験)を施行した。この試験では、G-CSF の投与量・投与期間を、前段階の Phase I/IIa 臨床試験の結果から、 $10 \mu\text{g/kg/日}$ の 5 日間連続投与とし、対象を頸髄損傷患者に限定した。さらに、G-CSF を投与せずに同様の治療を行う対照群との比較を行った。2009 年 8 月以降、急性期頸髄損傷患者(受傷後 48 時間以内)を試験に登録し、G-CSF 群(G-CSF $10 \mu\text{g/kg/日}$ を連続 5 日間点滴静注)および対照群 (G-CSF 投与なし) に振り分けた。G-CSF 群 19 例、対照群 26 例が 3 ヶ月以上観察可能であった。受傷時、受傷後 3 ヶ月時の American Spinal Injury Association (ASIA)スコア (運動: 0～100 点、痛覚: 0～112 点) および ASIA Impairment Scale (AIS) (A: 完全麻痺、B: 感覚のみ残存、C: 運動不全麻痺 MMT3 未満、D: 運動不全麻痺 MMT3 以上、E: 正常の 5 段階評価) を評価し、ASIA 運動・痛覚スコア改善点数を算出した。AIS で 1 段階以上の改善を認めた例が G-CSF 群で 11 例 (57.9%)、対照群で 9 例(34.6%)であった。ASIA 運動スコア改善点数は G-CSF 群で 26.1 ± 18.9 、対照群で 12.2 ± 14.7 であり、G-CSF 群で有意に運動麻痺の改善を認めた ($p < 0.01$) [参考文献 38, 30, 31]。この結果から、G-CSF 神経保護療法は急性脊髄損傷患者における脊髄麻痺の改善を促進させる効果を有すると考えられ、

G-CSF が急性脊髄損傷に対する新たな治療薬となり得る可能性が示された。前述のように、我々は平成 21～22 年度に G-CSF 神経保護療法の有効性評価を主目的とする Phase IIb 臨床試験 (多施設前向き比較対照試験) を施行した。急性脊髄損傷患者を試験に登録し、G-CSF 群 (G-CSF $10 \mu\text{g/kg/日}$ を連続 5 日間点滴静注) および対照群 (G-CSF 投与なし) に振り分けた。その結果、G-CSF 群で運動麻痺の改善が有意に良好であった。また、G-CSF 投与期間中および投与後に重篤な有害事象の発生はなかった。以上より、G-CSF 神経保護療法は、急性脊髄損傷に対する新たな治療薬となりうる可能性が十分に考えられた。しかし、これまでの試験デザインがオープンラベル試験であり、G-CSF 投与のプラセボ効果の影響を否定できない。G-CSF 神経保護療法の有効性についてのエビデンスレベルを上げるためには、ランダム化、実薬対照、並行群間比較試験を施行することが必要である。

本年度は、先進医療「急性脊髄損傷患者に対する顆粒球コロニー刺激因子を用いたランダム化、実薬対照、並行群間比較試験 (第Ⅲ相)」(平成 25 年秋頃、開始予定) の開始準備を進めた。平成 24 年 11 月当院治験審査委員会にて承認を受け、先進医療申請のための準備をほぼ終えた。現在、並行して薬事戦略事前相談 (平成 25 年春頃、PMDA) を予定している。

D. 考察

先進医療申請のための準備をほぼ終えた。並行して薬事戦略事前相談 (平成 25 年春頃、PMDA) を予定している。

E. 結論

先進医療申請のための準備をほぼ終えた。並行して薬事戦略事前相談 (平成 25 年春頃、PMDA) を予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi H, Yamazaki M, Okawa A, Sakuma T, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Yamauchi T, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Hashimoto M, Ito Y, Takahashi K, Koda M. : Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 2012; 21(12):2580-7.

2. Sakuma T, Yamazaki M, Okawa A, Takahashi H, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Miyashita T, Kadota R, Someya Y, Ikeda O, Yamauchi T, Hashimoto M, Aizawa T, Ono A, Imagama S, Kanemura T, Hanaoka H, Takahashi K, Koda M. : Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for patients with worsening symptoms of thoracic myelopathy: a multicenter prospective controlled trial. *Spine (Phila Pa 1976).* 2012 1; 37(17):1475-8.

3. Sakuma T, Yamazaki M, Okawa A, Takahashi H, Kato K, Hashimoto M, Hayashi K, Furuya T, Fujiyoshi T, Kawabe J, Mannoji C, Kadota R, Hashimoto M, Takahashi K, Koda M. : Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for patients with worsening symptoms of compression myelopathy, Part 1: A phase I and IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 2012; 21(3):482-9.

4. Kadota R, Koda M, Kawabe J, Hashimoto M, Nishio Y, Mannoji C, Miyashita T, Furuya T, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. : Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats. *Plos One.* 2012; 7(11):e50391.

5. Kato K, Yamazaki M, Okawa A, Furuya T, Sakuma T, Takahashi H, Kamiya K, Inada T, Takahashi K, Koda M. : Intravenous administration of granulocyte colony-stimulating factor for treating neuropathic pain associated with compression myelopathy: a phase I and IIa clinical trial. *Eur Spine J.* 2013; 22(1):197-204.

6. 山崎正志 : 後縦靭帯骨化症. 希少疾患/難病の診断・治療と製品開発. 技術情報協会. 東京. 2012 PP1195-1202.

7. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 古矢丈雄, 須田浩太, 伊藤康夫, 植田尊善, 国府田正雄. : 急性脊髄損傷に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を用いた神経保護療法: 多施設前向き比較対照臨床試験. *日脊障医誌.* 2012; 25(1): 28-29.

8. 佐久間毅, 山崎正志, 大河昭彦, 古矢丈雄, 高橋宏, 加藤啓, 高橋和久. : アテトーゼ型脳性麻痺に伴う頸髄症に対するボツリヌス毒素併用頸椎後方除圧固定術の検討. *JSR.* 2012; 3(10) :1356-1359.

9. 古矢丈雄, 山崎正志, 小西宏昭, 藤由崇之, 大河昭彦, 奥平毅, 山根宏敏, 久芳昭一, 津田圭一, 佐久間毅, 高橋宏, 加藤啓. : K-line(-)型頸椎後縦靭帯骨化症に対する脊柱管拡大術と後方除圧固定術の手術成績. *JSR.* 2012; 3(10): 1373-1376.

10. 高橋宏, 山崎正志, 大河昭彦, 古矢丈雄, 佐久間毅, 加藤啓, 高橋和久. : 若年発症で旺盛な骨化進展、急激な脊髄症増悪を呈する脊柱靭帯骨化症例の検討. *JSR.* 2012; 3(10): 1377-1382.

11. 加藤啓, 山崎正志, 佐久間毅, 高橋宏, 古矢丈雄, 大河昭彦, 高橋和久. : 上位胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧固定術後に脊髄症が座位にて増悪、仰臥位にて軽快した1例. *JSR.* 2012; 3(10): 1397-1400.

12.山崎正志, 国府田正雄, 佐久間毅, 高橋 宏, 加藤 啓, 橋本光宏, 林 浩一, 川辺純子, 藤由崇之, 古矢丈雄, 山内友規, 門田 領, 萬納寺誓人, 宮下智大, 染谷幸男, 鎌田尊人, 池田 修, 橋本将行, 須田浩太, 楫野知道, 上田明希, 伊藤康夫, 植田尊善, 相澤俊峰, 小野 睦, 今釜史郎, 金村徳相, 大河昭彦, 高橋和久. :特集: 脊髄再生研究の臨床応用における課題とその最先端 -基礎から臨床へ- 「急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対する G-CSF 神経保護療法: 医師主導型自主臨床試験」. 日整会誌. 2012; 86: 891-896.

2. 学会発表

1.Hiroshi Takahashi, Masashi Yamazaki, Akihiko Okawa, Takeo Furuya, Tsuyoshi Sakuma, Kei Kato, Taigo Inada, Koshiro Kamiya, Kota Suda, Yasuo Ito, Takayoshi Ueta, Kazuhiisa Takahashi, Masao Koda.A Multi-center Prospective-controlled Clinical Trial of G-CSF Neuroprotective Therapy for Acute Spinal Cord Injury: Analyses of Follow-up Cases after at Least One Year. 40th annual meeting of the cervical spine research society.December 6-8, 2012、Sheraton Chicago Hotel & Towers Chicago, IL(Abstract p87)

2.Kei Kato, Masashi Yamazaki, Akihiko Okawa, Takeo Furuya, Koshiro Kamiya, Taigo Inada, Tsuyoshi Sakuma, Hiroshi Takahashi, Masayuki Hashimoto, Masao Koda, Kazuhiisa Takahashi .Intravenous Administration of Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) Reduces Neuropathic Pain Associated with Compression Myelopathy: A Phase I and Iia Clinical Trial 40th annual meeting of the cervical spine research society.December 6-8, 2012、Sheraton Chicago Hotel & Towers Chicago, IL(Abstract p162)

3.Kei Kato, Masao Koda, Takeo Furuya, Hiroshi Takahashi, Koshiro Kamiya, Taigo Inada,

Masayuki Hashimoto, Akihiko Okawa, Kazuhiisa Takahashi, Masashi Yamazaki.Experimental Studies Analyzing the Effect of Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) on Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury in Rats 40th annual meeting of the cervical spine research society.December 6-8, 2012、Sheraton Chicago Hotel & Towers Chicago, IL(Abstract p263)

4.加藤啓『脊髄損傷後神経障害性疼痛に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の治療効果』第 1259 回 千葉医学会整形外科例会.平成 24 年 12 月 1 日-2 日 千葉大学医学部附属病院 第一講堂 千葉市

5.橋本将行, 国府田正雄, 加藤啓, 大河昭彦, 村田淳, 山崎正志.『ラット神経障害性疼痛モデルにおける Noggin タンパクのくも膜下腔投与による疼痛の軽減』.第 1259 回 千葉医学会整形外科例会.平成 24 年 12 月 1 日-2 日 千葉大学医学部附属病院 第一講堂 千葉市

6.神谷光史郎.『圧迫性頸髄症急性増悪例に対する顆粒球コロニー刺激因子を用いた神経保護療法 -急性増悪の程度による効果の差異について-』.第 1259 回 千葉医学会整形外科例会.平成 24 年 12 月 1 日-2 日 千葉大学医学部附属病院 第一講堂 千葉市

7.稲田大悟.『急性脊髄損傷に対する G-CSF 神経保護療法の多施設前向き比較対照試験: 投与後 1 年経過例の解析』.第 1259 回 千葉医学会整形外科例会.平成 24 年 12 月 1 日-2 日 千葉大学医学部附属病院 第一講堂 千葉市

G. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

クローン病患者を対象として EP4 拮抗剤の安全性及び有効性に関する POC 試験

分担研究者 横須賀 収 千葉大学医学部附属病院 消化器・腎臓内科学 教授

研究要旨

クローン病は、大腸および小腸の粘膜に慢性の炎症又は潰瘍を引き起こす炎症性腸疾患の一種であり、主に若年層に多く発症する。クローン病は原因不明、治療方法が未確立であり、かつ経過が慢性にわたり身体的、経済的、精神的にも負担の大きい疾病として、昭和 50 年に特定疾患に指定された。クローン病の原因に諸説があるが、最近の研究では、何らかの遺伝子の異常を背景に免疫細胞の異常反応が関与していることが明らかになってきている。近年抗 TNF- α 抗体が開発され、生物学的製剤の有効性が注目されているが、維持投与中に効果が減弱する二次無効症例が報告されている。また、治療法としてインターロイキンやインターフェロンの開発も進められているが、薬剤の選択肢は限られているのが現状である。EP4 拮抗剤はインターロイキンに対する抑制効果が報告されていることより、クローン病に対する臨床効果が期待される。罹病期間が長期に渡るクローン病において、EP4 拮抗剤は新たな治療の選択肢となりうる候補物質であり、臨床開発は急務と考えられる。

本年度はシーズを保有している日本国内のベンチャー企業と、第 1 相試験および POC 試験計画について骨子を検討した。また、検査会社に依頼して、当該治験薬の血清濃度測定のためのバリデーション試験を終了した。さらに、P-1 試験実施候補の施設を訪問し、スケジュール相談や準備について協議を行った。治験薬製造委託施設の候補を選定してスケジュール調整中である。当該治験薬は海外で投与されているが、日本人初の投与であるので安全性に注意しながら開発計画を進める。今後は EP4 拮抗剤の全体的な開発計画を見据えた上で、種々のステークホルダーと協議しながら試験計画について検討する予定である。

A. 研究目的

クローン病患者に対する EP4 拮抗剤の開発を目指して、日本人における臨床試験を実施する。

2. 日本人クローン病患者対象の POC 試験を実施して治療薬としての可能性を検討する。

(倫理面への配慮)

B. 研究方法

1. 日本人健常成人男性対象の第 1 相試験における投与の安全性・忍容性を検討する。
薬物動態試験データを評価して検討する。

海外では他疾患対象の治験薬として投与されているが、日本人初の投与であるので、薬物動態試験等を精査に比較して慎重に進める。

C. 研究成果（資料Ⅱ-5-1～2）

企業との会議 11 回を開催し、P-1 試験及び POC 試験を進める上での問題点洗い出し、治験薬入手等についての討議を行った。

また、P-1 試験実施施設の調査を実施するとともに、生体試料測定法のバリデーション試験を実施した。

D. 考察

クローン病な難病に指定されており、新薬の開発は臨床上有益であるが、消化器症状に障害のある場合、特に慎重に進める必要がある。本年度は第 1 相試験の計画骨子について協議を進めると同時に開発全体計画を含む PMDA 相談要旨についても検討した。本試験は検査会社、試験実施施設、治験薬製剤委託会社と様々なステークホルダーが関わる予定の試験であるので、協議しながら進める。

E. 結論

P-1 試験で健常人での安全性が確認された後、POC 試験を進める予定である。POC 試験計画については安全性に特に注意しながら条件を定める。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

非小細胞肺癌に対する EP4 拮抗薬の POC 試験

分担研究者 本橋 新一郎 千葉大学医学部附属病院 免疫細胞医学 准教授

研究要旨

肺癌は日本における全悪性腫瘍死の第1位を占めており、2009年の死亡数は67583名であり、今後増加傾向にある。肺癌の5年生存率は15%未満であり、切除不能の場合生存期間中央値は11～14か月と予後の悪い癌とされている。原発性肺癌はその特性や治療に対する反応性から非小細胞肺癌（NSCLC）と小細胞肺癌（SCLC）に大別されて論じられる。NSCLCは全原発性肺癌の約80%を占める癌であり、化学療法や放射線療法による反応性は乏しく、外科的切除が治療の主体となる。しかし、手術可能性は25%未満であり、切除不能進行・再発NSCLCに対しては化学療法が中心の治療が選択される。化学療法の忍容性から現在血管新生阻害剤などの分子標的薬剤が開発されているが、選択肢は限られているのが現状である。EP4拮抗剤も成長因子に作用すると考えられており、*In vivo*の結果より肺癌に対する薬効が期待される。化学療法に比較して副作用の少ない経口剤である薬剤の開発は肺癌の分野において必要かつ重要であると考えられる。

本年度はEP4拮抗剤のクローン病に対する開発計画とも合わせて、候補シーズの安全性および海外のデータ等を検討し、肺癌における開発戦略について討議を行った。今後はクローン病における開発進捗も鑑みながら肺癌患者対象のPOC試験について計画を検討する予定である。

A. 研究目的

肺癌病患者に対するEP4拮抗剤の開発を目指して、日本人における臨床試験を実施する。

B. 研究方法

1. 肺癌患者対象のPOC試験について概要を策定する。

(倫理面への配慮)

海外では他疾患対象の治験薬として投与されているが、日本人初の投与であるので、クローン病における開発結果を評価して慎重に進める。

C. 研究成果

先行するEP4拮抗剤のクローン病に対する開発計画を見据え、非小細胞性肺癌に対する開発の戦略について討議を重ねた。

D. 考察

肺癌における化学療法は患者さんのQOLを損ねる場合が多く、副作用が緩徐な薬剤の開発が急務である。今後は安全性に注意して開発計画に取り組む。

E. 結論

先行するクローン病に対する EP4 の開発データも考慮しながら、計画を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山崎正志	第12章：骨・関節系疾患のニーズ 第1節 後縦靭帯骨化症	-	希少疾患/難病の診断・治療と製品開発	(株)技術情報教会	東京	2012	1195-1202.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nagato K, <u>Hanaoka H</u> et al	Accumulation of Activated Invariant Natural Killer T Cells in the Tumor Microenvironment after α -Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells	J Clin Immunol	32(5)	1071-81	2012
花岡英紀 他	中央IRB等への移行過程で生じた課題とその解決に向けた取り組み	薬理と治療	40(6)	457-458	2012
Yamada Y, <u>Kuwabara S</u> et al	Multiple angiogenic factors are upregulated in POEMS syndrome	Ann Hematol	92	245-248	2013
Kanai K, <u>Kuwabara S</u> et al	Markedly upregulated serum interleukin-12 as a novel biomarker in POEMS syndrome	Neurology	79	575-582	2012
Shimizu N, <u>Kuwabara S</u> et al	Mobilization of PBSCs in poor mobilizers with POEMS syndrome using G-CSF with plerixafor	Bone Marrow Transplantation	47	1587-1588	2012
Fujinuma Y, <u>Kuwabara S</u> et al	Preserved autonomic function in patients with POEMS syndrome	Journal of the Neurological Sciences	318	131-134	2012

Nasu S, <u>Kuwabara S</u> et al	Different neurological and physiological profiles in POEMS syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy	J Neurol Neurosurg Psychiatry	83	476-479	2012
Shimizu N, <u>Kuwabara S</u> et al	Factors associated with the efficiency of PBSC collection in POEMS syndrome patients undergoing autologous PBSC transplantation	Bone Marrow Transplantation	47	1010-1012	2012
<u>Kuwabara S</u> et al	Treatment for POEMS(polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M-protein, and skin changes)syndrome(Review)	Cochrane library	-	CD006828	2012
桑原聡	M蛋白血症と末梢神経障害	日本内科学会雑誌	101(8)	2238-2241	2012
三澤園子	POEMS(Crow-Fukase)症候群	最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 75/神経6	-	103-112	2012
Takahashi H, Yamazaki M, <u>Takahashi K</u> et al	Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for acute spinal cord injury: a phase I/IIa clinical trial	Eur Spine J	21	2580-2587	2012
Sakuma T, Yamazaki M, <u>Hanaoka H</u> , <u>Takahashi K</u> et al	Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for patients with worsening symptoms of thoracic myelopathy	Spine	37(17)	1475-1478	2012
Sakuma T, Yamazaki M, <u>Takahashi K</u> et al	Neuroprotective therapy using granulocyte colony-stimulating factor for patients with worsening symptoms or compression myelopathy, part 1: a phase I and IIa clinical trial	Eur Spine J	21	482-489	2012

Kadota R, <u>Takahashi K</u> , Yamazaki M et al	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) protects oligodendrocyte and promotes hindlimb functional recovery after spinal cord injury in rats	PLOS ONE	7(11)	e50391	2012
Kato K, Yamazaki M, <u>Takahashi K</u> et al	Intravenous administration of granulocyte colony-stimulating factor for treating neuropathic pain associated with compression myelopathy: a phase I and IIa clinical trial	Eur Spine J	22	197-204	2013
山崎正志 他	急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対するG-CSF神経保護療法 医師主導型自主臨床試験の成績	日本脊髄障害医学会誌	25(1)	30-31	2012
佐久間毅、山崎正志、 <u>高橋和久</u> 他	アテトーゼ型脳性麻痺に伴う頸髄症に対するボツリヌス毒素併用頸椎後方除圧固定術の検討	Journal of Spine Research	3(10)	1356-1359	2012
古矢丈雄、山崎正志、 <u>高橋和久</u> 他	K-line(一)型頸椎後縦靭帯骨化症に対する脊柱管拡大術と後方除圧固定術の手術成績	Journal of Spine Research	3(10)	1373-1376	2012
高橋宏、山崎正志、 <u>高橋和久</u> 他	若年発症で旺盛な骨化進展、急激な脊髄症増悪を呈する脊柱靭帯骨化症例の検討	Journal of Spine Research	3(10)	1377-1382	2012
加藤啓、山崎正志、 <u>高橋和久</u> 他	上位胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方除圧固定術後に脊髄症が座位にて増悪、仰臥位にて軽快した1例	Journal of Spine Research	3(10)	1397-1400	2012
山崎正志、 <u>高橋和久</u> 他	急性脊髄損傷および圧迫性脊髄症急性増悪例に対するG-CSF神経保護療法：医師主導型自主臨床試験	日整会誌	86(10)	891-896	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Accumulation of Activated Invariant Natural Killer T Cells in the Tumor Microenvironment after α -Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells

Kaoru Nagato · Shinichiro Motohashi ·
Fumihiko Ishibashi · Kohsuke Okita ·
Kazuki Yamasaki · Yasumitsu Moriya ·
Hidehisa Hoshino · Shigetoshi Yoshida ·
Hideki Hanaoka · Shin-ichiro Fujii ·
Masaru Taniguchi · Ichiro Yoshino ·
Toshinori Nakayama

Received: 31 January 2012 / Accepted: 10 April 2012 / Published online: 26 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract

Purpose The intravenous administration of α -Galactosylceramide (α -GalCer)-pulsed antigen presenting cells (APCs) is well tolerated and the increased IFN- γ producing cells in the peripheral blood after the treatment appeared to be associated with prolonged survival. An exploratory study protocol was designed with the preoperative administration of α -GalCer-pulsed APCs to clarify the mechanisms of these findings, while especially focusing on the precise tumor site.

Methods Patients with operable advanced lung cancer received an intravenous injection of α -GalCer-pulsed APCs before surgery. The resected lung and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) as well as peripheral blood mononuclear cells

were collected and the invariant NKT (iNKT) cell-specific immune responses were analyzed.

Results Four patients completed the study protocol. We observed a significant increase in iNKT cell numbers in the TILs and augmented IFN- γ production by the α -GalCer-stimulated TILs.

Conclusion The administration of α -GalCer-pulsed APCs successfully induced the dramatic infiltration and activation of iNKT cells in the tumor microenvironment.

Keywords Invariant NKT cell · antigen presenting cell · immunotherapy · tumor infiltrating lymphocyte · non-small cell lung cancer

K. Nagato · S. Motohashi · F. Ishibashi · K. Okita · K. Yamasaki ·
T. Nakayama
Department of Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba
University, Clinical Research Center, Chiba University Hospital,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku,
Chiba 260-8670, Japan

K. Nagato · S. Motohashi (✉) · F. Ishibashi · Y. Moriya ·
H. Hoshino · S. Yoshida · I. Yoshino
General Thoracic Surgery, Graduate School of Medicine, Chiba
University, Clinical Research Center, Chiba University Hospital,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku,
Chiba 260-8670, Japan
e-mail: motohashi@faculty.chiba-u.jp

H. Hanaoka
Graduate School of Medicine, Chiba University,
Clinical Research Center, Chiba University Hospital,
1-8-1 Inohana, Chuo-ku,
Chiba 260-8670, Japan

S.-i. Fujii
Research Unit for Cellular Immunotherapy,
RIKEN Research Center for Allergy and Immunology,
1-7-22, Suehiro-cho, Tsurumi-ku,
Yokohama, Japan

M. Taniguchi
Laboratory for Immune Regulation,
RIKEN Research Center for Allergy and Immunology,
1-7-22, Suehiro-cho, Tsurumi-ku,
Yokohama, Japan

Introduction

V α 24 invariant natural killer T (V α 24 iNKT) cells are a unique innate lymphocyte subpopulation characterized by the expression of a canonical invariant T cell receptor with a specific α -chain gene rearrangement (V α 24-J α 18) and pairing mostly with a V β 11 β -chain in human. Synthetic glycolipid, α -Galactosylceramide (α -GalCer) is a mouse and human iNKT cell ligand, presented by a monomorphic class I-like antigen presenting molecule CD1d [1–3]. Ligand activated iNKT cells exhibit both direct and indirect potent anti-tumor activity.

Patients with malignant diseases show either a decreased number or functionally impaired V α 24 iNKT cells in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [4–9]. Head and neck cancer patients with poor circulating iNKT cell number show significantly worse clinical outcomes, suggesting an important contribution of iNKT cells to anti-tumor responses [10]. In addition, the ability to produce IFN- γ from circulating iNKT cells in cancer patients is preserved even though the absolute number of iNKT cells decreases, and thus, residual iNKT cells might still have a good competence to exert anti-tumor responses. Therefore, the expansion and activation of these cells *in vivo* may be therapeutically meaningful in patients with severely decreased or functionally deficient V α 24 iNKT cells. Clinical studies of α -GalCer-pulsed antigen presenting cells (APC)s have been conducted to recover a functionally sufficient number of V α 24 iNKT cells [11–14]. A phase I/II study of α -GalCer-pulsed APCs in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer (NSCLC) found that the treatment elicits V α 24 iNKT cell-dependent immune responses, which are correlated with prolonged overall survival time [13]. The mechanisms that underlie this positive clinical outcome are still unclear.

The current clinical trial focused on the iNKT cell-specific immunological responses in the tumor microenvironments to investigate further anti-tumor mechanisms of V α 24 iNKT cells after α -GalCer-pulsed APC treatment. Therefore, in this exploratory study, the preoperative administration of α -GalCer-pulsed APCs was performed to clarify the iNKT cell specific immune responses at the tumor site more precisely. The results indicated that α -GalCer-pulsed APCs successfully induced the activation of tumor infiltrating V α 24 iNKT cells in the lung.

Material and Methods

Patient Eligibility Criteria

The study included patients between 20 and 80 years of age, with a diagnosis of clinical stage IIB or IIIA NSCLC that was to be treated surgically. Further inclusion criteria were a

performance status of 0, 1, or 2; normal or near normal renal, hepatic and hematopoietic function; and no chemotherapy or radiotherapy received for at least 4 weeks before enrollment. V α 24⁺V β 11⁺ iNKT cells were detected by flow cytometry in the enrolled patients at a level of >10 cells in 1 ml peripheral blood. The exclusion criteria were a positive response to HIV, hepatitis C virus, or human T-cell lymphotropic virus antibodies; positive for hepatitis B antigen; the presence of active inflammatory disease or active autoimmune disease; a history of hepatitis; pregnancy or lactation; concurrent corticosteroid therapy and evidence for another active malignant neoplasm. The α -GalCer-pulsed APC non-treatment cases were investigated as a control group to elucidate the effects of α -GalCer-pulsed APC treatment. The inclusion and exclusion criteria of the control group were the same as for the treatment group. The histological type, tumor-node-metastasis classification and the anti-tumor effect of treatment were classified according to the general rules for the clinical and pathologic recording of lung cancer as described by the Japan Lung Cancer Society.

Clinical Protocol and Study Design

The study was carried out in the Department of Chest Surgery, Chiba University Hospital, Japan, according to the standards of Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in Japan. The protocol was approved by the Institutional Ethics Committee (No. 1972). In addition, this trial underwent ad hoc reviews by the Chiba University Quality Assurance Committee on Cell Therapy.

The study design is illustrated in Fig. 1. Written informed consent was obtained from all of the patients before undergoing a screening evaluation to determine eligibility. Clinical and laboratory assessments were conducted once a week, including of a complete physical examination and standard laboratory values. Any adverse events and changes in laboratory values were graded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 4.0.

Preparation of APCs from Peripheral Blood

All procedures were carried out according to the Good Manufacturing Practice standards. Eligible patients underwent peripheral blood leukapheresis (COBE Spectra, Gambro BCT,

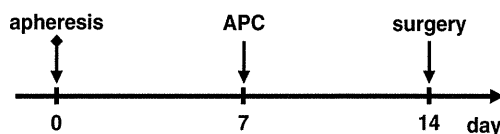


Fig. 1 Study design of α -GalCer-pulsed APC administration. The patients received α -GalCer-pulsed APCs. The timing for both apheresis and α -GalCer-pulsed APC administration are shown. APC, α -GalCer-pulsed APC administration

Inc., Lakewood, CO) and PBMCs were collected and further separated by density gradient centrifugation (OptiPrep, Nycomed Amersham, Oslo, Norway). Thereafter, whole PBMCs were cultured with GM-CSF and IL-2, as previously described [11, 15]. Briefly, PBMCs were washed three times and resuspended in AIM-V (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) with 800 units/ml of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GeneTech Co., Ltd., China) and 100 Japanese reference units per milliliter of recombinant human IL-2 (Imunace, Shionogi, Osaka, Japan). The cultured cells were pulsed with 100 ng/ml of specific ligand, α -GalCer (KRN7000; Kirin Brewery, Gunma, Japan) on the day before administration. Whole cells were harvested after 7 days of cultivation, washed 3 times and resuspended in 100 ml of 2.5 % albumin in saline. The patients received an intravenous injection of the cultured cells once (Fig. 1). The criteria for α -GalCer-pulsed APC administration included a negative bacterial culture 48 h before APC injection, cell viability >70 % and an endotoxin test 48 h before APC injection with a result <0.7 Ehrlich units/ml. The patients were injected with 1×10^9 cells/m²/injection of APCs.

Phenotype Evaluation of APCs

The phenotypes of α -GalCer-pulsed APCs were determined using a FACSCalibur flow cytometer (BD biosciences). The monoclonal antibodies (mAb) used were FITC-labeled anti-HLA-DR, CD83, CD14; phycoerythrin-labeled anti-CD86, CD1d; and allophycocyanin-labeled anti-CD11c, CD40 (Becton Dickinson, San Diego, CA). Isotype-matched control mAbs were used as negative controls.

Preparation of Tumor Infiltrating Lymphocytes, Tumor Cells, Normal Lung Mononuclear Cells and Lymph Nodes Mononuclear Cells

Fresh tumor tissue specimens were obtained from the surgical specimens and the tissue was cut into small pieces with scissors. The tissue specimen was placed in a flask with a mixture of 0.1 mg/ml DNase type I, 1 mg/ml collagenase type IV and 0.5 mg/ml hyaluronidase type V (all from Sigma, St. Louis, MO) in RPMI 1640 and stirred at room temperature for 1 h. The resultant cell suspension was washed in HBSS and subjected to two-layered (75 and 100 %) Ficoll-Hypaque discontinuous density gradient centrifugation at 1200 g for 20 min. The cells from the 100 % interface and 75 % interface were used as tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and tumor cells, respectively. Normal lung tissue and lymph nodes were excised from the surgical specimen, cut with scissors in RPMI 1640 containing enzymes and passed through a gauze filter. The resultant cell suspension was washed in HBSS and subjected to Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. The

interface was collected and used as either a normal lung or lymph node.

Immunological Monitoring

PBMC samples were obtained at least twice before APC administration and 1 week after APC injection.

Flow Cytometric Analysis of V α 24⁺V β 11⁺ Inkt Cells in the Peripheral Blood and TILs

The cell concentrations of V α 24⁺V β 11⁺ iNKT cells in PBMCs, TILs and mononuclear cells from normal lung tissue or lymph node were assessed by flow cytometry. Mononuclear cells were three-color stained with FITC-conjugated anti-T-cell receptor (TCR) V α 24 mAb (C15; Immunotech, Marseilles, France), phycoerythrin-conjugated anti-TCR V β 11 mAb (C21, Immunotech) and APC-conjugated anti-CD3 mAb (UCTH1; BD Bioscience). The stained cells were subjected to flow cytometry and the percentages of V α 24⁺V β 11⁺CD3⁺ cells among mononuclear cells were calculated. Thereafter, the number of iNKT cells (counts/ml) was estimated based on the PBMC counts.

Single-Cell Enzyme-Linked Immunospot Assay

PBMCs, TILs and cells from normal lung tissue or lymph nodes were washed 3 times with PBS and then were stored in liquid nitrogen until use. IFN- γ -secreting cells were assayed in 96-well filtration plates (Millipore, Bedford, MA) coated with mouse anti-human IFN- γ (10 μ g/ml; Mabtech, Nacka Strand, Sweden). The cells (5×10^5 per well) were incubated for 16 h with or without α -GalCer (100 ng/ml) in 10%FCS containing RPMI. Phorbol 12-myristate 13-acetate (10 μ g/ml) plus ionomycin (10 nmol/l) was used as a positive control. After culture, the plates were washed and incubated with biotinylated anti-IFN- γ (1 μ g/ml; Mabtech). Spot-forming cells were quantified by microscopy.

Quantitative Real Time PCR of V α 24 Invariant TCR and CD1d Expression

Total RNA was extracted from the tumors, normal lung tissue and lymph nodes using TRIzol Reagent (Sigma Aldrich) and reverse transcribed using Superscript II RT (Invitrogen Life Technologies) and oligo (dT12–18) primers (Invitrogen Life Technologies). The primers specific for the constant region of TCR α chain (C α) (sense, CGCCTCAA CAACAGCATTA; antisense, ACCAGCTTGACATCA CAGGA), TCR V α 24 (sense, GCAAAGCTCTCT GCACATCA; antisense, CCAGGGTTGAGCCTCTGTC), CD1d (sense, gtcaggaagtgcggaactga; antisense, atcctgagacatggcacac) were used with 5 μ g of sample cDNA and

amplified with *Taq* polymerase (Promega). Quantitative real-time PCR was performed using real-time Taq-Man technology and an ABI PRISM 7000 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). The expression was normalized using the C α signal for V α 24 and GAPDH for CD1d.

Statistical Methods

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test.

Results

Patient Characteristics

A total of 4 patients met the inclusion criteria and were enrolled in the study. The patient characteristics are summarized in Table I. The study included one patient with adenocarcinoma and three patients with squamous cell carcinoma. Two patients were stage IIb and two were stage IIIa primary lung cancer. No patients had received any previous treatments.

In addition, a total of 6 patients who had not received α -GalCer-pulsed APC injection were enrolled as the control group. Fresh tumor tissue, normal lung tissue and lymph nodes were excised from the surgical specimens. The patient characteristics of the control group are also listed in Table I.

Phenotypes of α GalCer-Pulsed APCs

The phenotypes of α GalCer-pulsed APCs prepared for administration were analyzed by flow cytometry. All profiles for each patient are shown in Fig. 2. The percentages of HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD86⁺, CD40⁺, CD83⁺ and CD1d⁺ cells were determined by the overtone subtraction test using the population comparison platform in the FlowJo software package. More than 50 % of the cultured cells were HLA-DR⁺ cells, 10 % to 50 % were CD11c⁺ cells and 50 % to

80 % were CD86⁺ cells. Interestingly, the majority of the cultured cells were CD3⁺ T cells or CD56⁺CD3⁻ NK cells, indicating the expression of HLA-DR⁺, CD11c⁺ or CD86⁺ on human T cells or NK cells (data not shown). Some variations were observed in the expression of CD83 (23.9–55.4 %), CD40 (8.5–17.1 %) and CD1d (23.1–69.9 %; Fig. 2).

Adverse Events

No serous (grade >2) toxicity or severe side effects were observed in any patients.

Immunological Monitoring of PBMCs and Resected Specimens

Immunological assays were conducted for all patients. The frequency of peripheral blood V α 24 iNKT cells in all patients was measured by FACS. Figure 3 shows that two patients (cases 002 and 004) showed an increased number of circulating V α 24 iNKT cells after the α -GalCer-pulsed APC administration. No clear relationship was found between the number of circulating V α 24 iNKT cells and the α -GalCer-pulsed APC administration in the remaining two patients (cases 001 and 003).

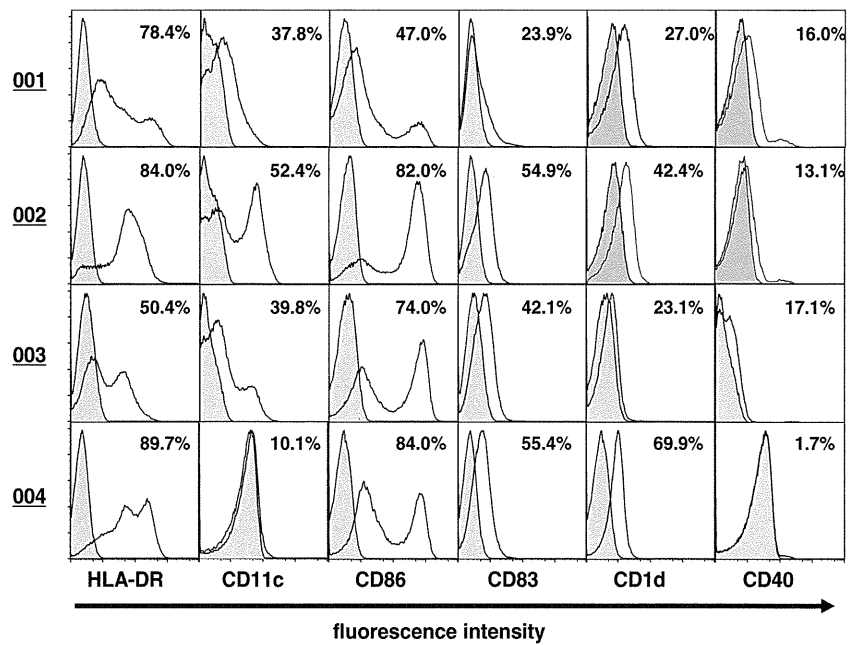
Immunological assays were also performed for TILs and mononuclear cells (MNC)s from normal lung and lymph node tissues. TILs from all 4 cases in the α -GalCer-pulsed APC administration group contained a high percentage of V α 24 iNKT cells in comparison to the normal lung MNCs (TILs; 1.86 %, 0.32 %, 0.15 % and 0.39 % vs. lung MNCs; 0.031 %, 0.013 %, 0.003 % and 0.01 %, Fig. 4a). The frequency of V α 24 iNKT cells in the TILs in case 001 was 60 times higher than the normal lung MNCs. Though the content of V α 24 iNKT in the normal lung MNCs was extremely low in case 003, the V α 24 iNKT cells were found to have accumulated in the TILs. The average percentage of V α 24 iNKT cells in the TILs was 50 times higher than that

Table I Patient characteristics of α -GalCer-pulsed APC group and control group

Case	Treat ^a	Age/Sex	Histology	c-stage	Operation method
001	APC ^b	75/M	Ad ^d	T2N1M0 (stage IIB)	Lobectomy+LND ^g
002	APC	76/M	Sq ^e	T2N1M0 (stage IIB)	Lobectomy+LND
003	APC	74/M	Sq	T1N2M0 (stage IIIA)	Lobectomy+LND
004	APC	68/M	Sq	T3N1M0 (stage IIIA)	Pneumonectomy+LND
c-01	cont ^c	71 M	Sq	T2N1M0 (stage IIB)	Lobectomy+LND
c-02	cont	55 M	large ^f	T2N1M0 (stage IIB)	Lobectomy+LND
c-03	cont	70 M	Sq	T3N0M0 (stage IIB)	Lobectomy+LND
c-04	cont	72 M	Sq	T3N1M0 (stage IIIA)	Bilobectomy+LND
c-05	cont	56/M	Sq	T2N1M0 (stage IIB)	Lobectomy+LND
c-06	cont	63/M	Ad	T2N2M0 (stage IIIA)	Lobectomy+LND

^aTreat, Treatment; ^bAPC, α -GalCer-pulsed APC administration; ^c cont, control; ^dAd, Adenocarcinoma; ^e Sq, Squamous cell carcinoma; ^f large, large cell carcinoma; ^g LND, Lymph Node dissection

Fig. 2 Flow cytometric analysis of α -GalCer-pulsed APCs. The expression levels of HLA-DR, CD11c, CD86, CD83, CD1d and CD40 were assessed by flow cytometry. Shaded areas: background staining with an iso-type control. Solid lines: staining profiles of the indicated molecules. Values represent the percentages of positive cells



in normal lung MNCs. The $V\alpha 24$ iNKT cell frequency in the draining lymph nodes of each case was almost the same as that in the normal lung MNCs (Fig. 4a).

The proportion of $V\alpha 24$ iNKT cells in the control group showed a relatively high percentage of TILs in comparison to the normal lung MNCs (TILs; 0.031 %, 0.058 %, 0.13 %, 0.47 %, 0.18 % and 0.12 % vs. lung MNCs; 0.034 %, 0.011 %, 0.004 %, 0.039 %, 0.014 % and 0.02 %,

Fig. 4b). The average percentage of $V\alpha 24$ iNKT cells in the TILs was only 8 times higher than that in the normal lung MNCs.

Normal lung MNCs in the control group demonstrated a trend toward a higher $V\alpha 24$ iNKT cell rate in comparison to the treatment group (Fig. 4c). On the other hand, the proportion of $V\alpha 24$ iNKT cells in TILs tended to increase in the α -GalCer-pulsed APC injected group in comparison to the

Fig. 3 Immunological monitoring of PBMCs of patients with α -GalCer-pulsed APC administration. The absolute number of peripheral blood iNKT cells ($V\alpha 24^+V\beta 11^+$ cells) and NK cells ($CD56^+CD3^-$ cells). Flow cytometric analysis and automated full blood counts (Chiba University Hospital) indicated the absolute number of $V\alpha 24$ iNKT cells and NK cells. APC, α -GalCer-pulsed APC administration; ope., operation

