

201309046A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本橋 新一郎

平成 26 (2014) 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	-----1
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	-----8
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	-----15
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	-----22
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	-----30
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		-----34
IV. 研究成果の刊行物・別刷		-----35

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 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・再発非小細胞肺癌に対する一次抗癌剤治療後の症例に対して、 $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ 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 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を調製し、最終検査基準を満たした培養細胞を用いて計4回、静脈内投与を行った。試験開始より2014年3月末までに19例を登録し、15例でプロトコル完遂、1例はstudy off、3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、5例において原病悪化による死亡が確認され、他の症例に関しては生存が確認されている。引き続き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。プロトコル治療の終了した16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）6名、進行（PD）9名であった。また本年度樹状細胞治療を実施した症例において、重篤な有害事象を認めなかった。治療前後の患者末梢血 NKT 細胞数および NK 細胞は16例中5例および10例で増加を認め、末梢血単核球中の $\alpha$ GalCer 反応性インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）産生細胞数は7例で増加を認めた。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	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	千葉大学医学部附属病院	耳鼻咽喉・頭頸部外科	助教

藤川 陽	千葉大学大学院医学研究院	免疫発生学	特任研究員
加藤 美紀	千葉大学未来医療教育研究センター		特任研究員
鎌田 稔子	千葉大学大学院医学薬学府		大学院生
三瀬 直子	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

## A. 研究目的

進行・再発非小細胞肺癌の予後は不良で、年間 7 万人以上が死亡している。診療ガイドライン推奨 2 次治療の生存期間中央値 (MST) は 6~10 ヶ月余と著しく短く、予後延長効果は極めて限定的である。加えて化学療法においては副作用の発生が必発であり、時には致死的事であることから、副作用が限定的でかつ有効な新規の免疫治療の開発が望まれている。そこでこれま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  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer) に着目し、体内での NKT 細胞活性化を目指す  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞療法の開発研究を行い、治療による全生存期間延長の可能性を示してきた。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  $\alpha$ 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 NKT 細胞特異的免疫反応を解析して、臨床効果との関連を検討す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 (生細胞数、細胞生存率、外観試験、エンドトキシン試験) を行った上で、培養 7 日目と 14 日目に調製済  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を出荷した。
- 3) 当該患者に対して、調製済  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を、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、NK 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、NK 細胞数を算出し、増加率を求めた。さらに凍結保存した末梢血単核球を用いて、 $\alpha$ GalCer 刺激特異的インターフェロン  $\gamma$  産生細胞数を治療経過とともに経時的に測定した。
  - 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った。
  - 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) 本年度は 2014 年 3 月末までに 10 名の新規登録を行い、昨年度からの治療期間継続症例 1 名を加えた 11 名で細胞治療を行った。試験開始からは 19 名の患者を登録し、そのうち 15 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、3 名が進行中である。昨年度は 1 例で明らかな腫瘍の増大を認めたため study off となったが、本年度は全例で 2 コースを完遂することが可能であった。
- 2) これまでに 68 回の  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の調製を行い、症例 9 の 4 回目の投与細胞を除く全ての細胞調製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、投与のための最終検査基準を満たした。不適合品と判断された症例 9 の 4 回目の培養細胞は、最終製品の細胞生存率が基準を下回ったため、製品出荷判定に関する手順書および不適合品管理に関する手順書に従って出荷を行わなかった。
- 3) 安全性の評価としては、本年度に細胞投与を受けた 11 例で重篤な有害事象

- を認めなかった。1例でグレード3の高血圧を2回目の成分採血後に認めた。また登録時より血清アミラーゼ値の上昇を認めていた2症例で無症候性の血清アミラーゼ値上昇を認め、グレード3と判定した。グレード2以上の有害事象として、血清カリウム高値を3例に認めた。その他の有害事象はすべてグレード1と判断された。試験開始から発生した重篤な有害事象として原病悪化による癌性疼痛を1例に認めた。
- 4) 治療期間終了後に追跡調査を行い、全例で追跡が可能となっている。主要評価項目としての全生存期間として、5例において原病死を認めた(11.6ヶ月、9.0ヶ月、11.5ヶ月、10.4ヶ月、9.5ヶ月)。他の14症例に関しては、現在まで生存が確認されている。
  - 5) これまでにプロトコル治療を受け、画像評価が行われた16例の試験終了時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)6名、増悪(PD)9名であった。このうち、PRと評価された1例およびSDと評価された4例では、追跡期間において病勢の進行を認めた。
  - 6) 投与に用いた培養細胞表面におけるHLA-DR、CD11c、CD86、CD14分子の発現割合は症例間で発現率に差は認められたものの、各症例ともに4回の投与細胞で安定した発現を示した。末梢血NKT細胞の増加にHLA-DRの発現が重要な可能性があるが、臨床効果との
- 相関は明らかではなく、今後もデータの蓄積を継続する。
- 7) 治療開始前と比較し、1コースもしくは2コースの樹状細胞投与によってNKT細胞数の増加を認めた症例は16例中5例、NK細胞の増加を認めた症例は10例であった。末梢血単核球中の $\alpha$ GalCer反応性インターフェロン $\gamma$ 産生細胞数は7例で増加を認めた。
  - 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。
  - 10) 試験の実施状況は、当院倫理審査委員会において確認を行っている(実施状況報告書の提出)。
  - 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(CDMS)構築の上、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ている。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うための手順を確立させ、臨床試験の品質確保とデータの信頼性の向上を図っている。

#### D. 考察

- 1) 本臨床研究の目標症例数は 35 例、登録期間は 3 年間であり、2 年経過時点で 19 例の登録が完了している。計画通りに症例登録を終了させるために、未来開拓センターCPC 調整委員会にて調製室の調整を行うとともに、関連病院に対して適切な症例紹介につながる臨床研究の説明会を実施することで、症例登録を加速化しており、来年度には症例登録を完了し追跡期間に移行する予定である。
- 2)  $\alpha$ 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。細胞生存率が基準値に達せず不適合品と判断された 1 回の細胞培養の規格外試験結果原因調査では、製造工程上に異常は認められなかった。
- 3) 安全性について、グレード 3 の高血圧を認めた症例 12 では、血圧上昇は成分採血施行後の一過性のものであり、特別な処置を必要とせず、細胞治療との関連は無いと考えられた。また血清アミラーゼ値の上昇も無症候性であった。本年度は重篤な有害事象を認めず、安全に施行可能と考えられた。
- 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に関しては、本臨床研究開始より 2 年を経過したところであり、原病死が 5 例確認されている。今後プロトコールに沿って継続して追跡調査を確実に実施し生存期間を確定させる予定である。
- 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 に加えて、CD14 分子の発現を検討している。同一症例内では、各表面抗原分子の発現は比較的安定している一方で、症例間で認めている発現の差違が、その後の免疫反応や臨床効果にどのように影響を及ぼしていくか、引き続き症例を重ねて検討する必要があると考えられた。
- 6) 治療後に NKT 細胞の増加を認める症例の割合は、これまでの臨床研究とほぼ同等である。また生存期間により密接に関連する可能性がある NKT 細胞の機能増強としての IFN- $\gamma$ 産生能も、ほぼ同じ割合で増加が認められている。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、今後症例を追加し検討していく。
- 7) 腫瘍縮小効果に関しては、本年度登録の症例では腫瘍縮小効果を認めた症例はなかったが、昨年度は 1 例の PR を経験し、他の 1 例でも肺内の病変に関しては腫瘍の有意な縮小を認め、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞投与により腫瘍縮小効果を示す症例が存在することが明らかとなっている。腫瘍縮小効果はこれまでの臨床研究では認めていなかったことから、頻度は低いことが

想定されるが、今後予定症例数まで追加し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 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の調製とそれを利用した細胞治療は安全に施行

可能であると考えている。今後もプロトコールに沿って予定症例数まで登録を継続し、生存期間の延長効果を検討するとともに、NKT細胞特異的免疫モニタリングの有用性を検討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. Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., and Taniguchi, M. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front. Immunol.* 2013; 4: 409
2. Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato, M., Shinoda, K., Tohyama, H., Hanazawa, A., Tamaki, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Sakikawa, I., Morita, A., Nagira, M., Poyurovsky, V. M., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110(46):18626-31
3. Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4<sup>+</sup> T helper type-1 and type-2 cells. *Immunity* 2013; 39(5):819-32
4. Homma, T., Kinugawa, S., Takahashi, M., Sobirin, M. A., Saito, A., Fukushima, A., Suga, T., Takada, S., Kadoguchi, T., Masaki, Y., Furihata, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Ishimori, N., Iwabuchi, K., and Tsutsui, H.: Activation of invariant

natural killer T cells by  
 $\alpha$ -galactosylceramide ameliorates  
myocardial ischemia/reperfusion injury in  
mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013;  
62:179-188

## 2. 学会発表

1. Fujikawa, A., Kunii, N., Horinaka, A., Makita, Y., Uchida, R., Ihara, F., Motohashi, S., Okamoto, Y., and Nakayama, T. Phase I/II clinical study of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells as adjuvant immunotherapy for patients with head and neck mucosal malignant melanoma after carbon ion radiotherapy. 第42回日本免疫学会総会学術集会, 千葉市, 2013年12月11-13日
2. 中山俊憲, 本橋新一郎, 國井直樹, 岡本美孝. 抗腫瘍免疫機構の最先端 第66回日本胸部外科学会定期学術集会, 仙台市, 2013年10月16-19日
3. 伊藤俊広, 平原潔, 本橋新一郎, 矢野郁也, 中山俊憲. BCG-LMによる好酸球活性化の抗腫瘍効果 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2013年10月3-5日
4. Motohashi, S., Kunii, N., Taniguchi, M., Yoshino, I., Okamoto, Y., and Nakayama, T. NKT cell-targeting therapy for lung cancer and head and neck cancer. 7th International symposium on CD1 and NKT cells. Tours France, September13-17, 2013
5. 中山俊憲 NKT細胞免疫系を標的にしたがん免疫治療の開発研究 第7回長崎呼吸器がんセミナー, 長崎, 2013年7月19日
6. 中山俊憲, 本橋新一郎, 國井直樹, 岡本美孝. 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- 第17回日本がん免疫学会総会, 宇部市, 2013年7月3-5日

7. 藤川陽, 國井直樹, 櫻井大樹, 長谷川安都佐, 鎌田正, 溝江純悦, 岡本美孝, 本橋新一郎, 中山俊憲. 炭素イオン線治療後の頭頸部粘膜悪性黒色腫患者に対する $\alpha$ ガラクトシルセラミドパルス抗原提示細胞を用いたアジュバント免疫治療に関する第I/II相臨床研究 第17回日本がん免疫学会総会, 宇部市, 2013年7月3-5日
8. 中山俊憲 NKT細胞免疫系をターゲットにした肺癌と頭頸部癌の免疫細胞治療-10年間の臨床研究の成果と今後の展望- 第11回京阪神耳鼻咽喉科臨床懇話会, 大阪, 2013年6月29日
9. 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- 肺がんセミナー, 福岡, 2013年6月21日
10. Nakayama, T. iNKT Cell-Based Immunotherapy for Cancer. Keck School of Medicine of USC Research Seminar Series, Los Angeles USA, 6/14/2013

## 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

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 教授  
研究協力者：國井 直樹 千葉大学医学部附属病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 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

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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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、細胞培養にて必要十分な細胞数を調製することが可能であり、1回の不適合品を除いて培養細胞出荷のための最終検査基準を満たした。本年度は10名の新規登録を行い、昨年度からの治療期間継続症例1名を加えた11名で細胞治療を行った。8名で治療期間を終了した後に追跡期間に移行し、3名は治療期間中である。昨年度1例で認められた原病悪化による癌性疼痛は重篤な有害事象と判断され、1コースで終了となったが、本年度は全例2コースのプロトコール治療を施行可能であり、重篤な有害事象を認めること無く安全に施行可能であった。

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、根治は得られず延命や生活の質向上を目的としている。高齢者では合併症を有する症例や臓器機能の低下を認める症例が多く、抗癌剤による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  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer) に着目し、体内での NKT 細胞活性化を目指す  $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ GalCer 反応性 IFN $\gamma$ 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 $\alpha$ 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。

適格基準:①非小細胞癌の組織学的確定診断が得られている、②臨床病期ⅢB/Ⅳ期または術後再発、③抗癌剤による一次治療（プラチナ併用化学療法もしくは EGFR-TKI）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、肺、肝、腎等の機能が規準を満たす、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処置を要する胸水、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重篤な心疾患もしくは肺疾患、⑩アルブミン過敏症の既往、⑪妊婦および授乳期、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、細胞培養に充分と考えられる  $3 \sim 4 \times 10^9$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の投与を行う（図 1）。

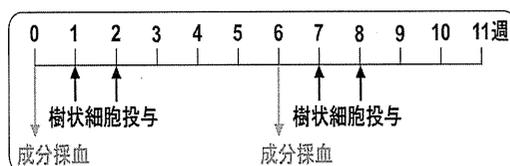


図1 臨床研究スケジュール

### 2) $\alpha$ 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末梢血単核球を中心とした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）にて培養を開始する。まず、得られた末梢血から比重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 $\alpha$ GalCer を加えて、 $\alpha$ 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  $1 \text{ m}^2$  当たり  $1 \times 10^9$  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

(生細胞数、細胞生存率、外観試験、エンドトキシン試験)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審査と承認を受けている。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) 本年度は10名の新規登録を行い、昨年度からの治療期間継続症例1名を加えた11名で細胞培養を行った。8名でプロトコル治療期間である11週間を終了した後、追跡期間に移行し、3名は治療期間中である。試験開始からは、2014年3月末までに19名の患者を登録し、そのうち15名でプロトコル治療を完遂、1名は1コース終了後にstudy off、3名は進行中である。登録した19症例の背景を表1に示す。昨年度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ため、プロトコルに沿って2クール目を開始する前にstudy offとしたが、本年度は全例で2コースを完遂することが可能であった。

2) 本年度はこれまでに延べ34回の

αGalCer パルス樹状細胞の調製を施行し、臨床試験開始からは計68回のαGalCer パルス樹状細胞の調製を行っている。症例9の4回目の培養細胞(DC#4)を除く全ての細胞調製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、投与のための最終検査(生細胞数、細胞生存率、外観試験、エンドトキシン試験)にて基準を満たした。不適合品と判断された症例9の培養細胞は、最終製品の細胞生存率が基準を下回ったため(基準値60%以上に対して23.5%)、製品出荷判定に関する手順書および不適合品管理に関する手順書に従って出荷停止とした。

3) 安全性の評価としては、本年度細胞投与を実施した11例に重篤な有害事象は発生しなかった。症例12の成分採血2回目施行後に一時的に血圧上昇を認め、グレード3と判定したが、特に処置等を要しなかった。登録時より血清アミラーゼ値が上昇を認めていた2症例で無症候性の血清アミラーゼ値上昇を認め、当院基準値上限の2倍(220 U/L)を越えたため(221 U/L, 223 U/L)、グレード3と判定した。グレード2の有害事象として、高カリウム血症を3例に認めた。グレード1の有害事象として、咽頭痛やしびれなどの異常感覚、咳嗽、胸背部痛などを認め、各種臨床検査値の異常として高カリウム血症などを認めた。試験開始時からこれまでに発生した有害事象と発生頻度を表2

に示す。

#### D. 考察

- 1) 本臨床研究の目標症例数は 35 例、登録期間は 3 年間であり、2 年経過時点で 19 例の登録が完了している。計画通りに症例登録を終了させるために、未来開拓センターの CPC 調整委員会にて細胞調製室の調整を行った。また適切な症例の更なる紹介を増やすために、当院の関連する臨床科および関連病院に対して臨床研究の説明会を実施することで症例登録を加速化しており、来年度には症例登録を完了し追跡期間に移行する予定である。
- 2)  $\alpha$ 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、不適合品となった 1 回を除いたすべての培養において安全かつ十分に誘導することが可能であった。不適合品発生時に実施した規格外試験結果の原因調査では、最終製品の無菌性試験、エンドトキシン試験、マイコプラズマ検査が陰性で細菌などの汚染は否定され、製造工程、製造中の環境モニタリングデータ、使用機器および使用薬品の確認を行ったが、異常は認められなかった。またこの症例の 1 コース目の 7 日間および 14 日間の培養細胞および 2 コース目の 7 日間培養細胞に不適合品は発生していない。細胞培養の原料となる末梢血単核球の 1 コース目と 2 コース目における違いを FACS にて検討

してみると、2 コース目の単核球中の単球分画が約 2 倍に増加している (1 コース目 : 13.2%、2 コース目 : 26.1%) ことが明らかとなった。近年、免疫抑制細胞として骨髄系由来抑制細胞 (MDSC: myeloid derived suppressor cell) の存在が癌患者の末梢血においても報告されており、本症例の成分採血由来単核球中の単球分画を更に解析してみると、Lineage<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup>/の単球系 MDSC の割合が約 3.4 倍増加していることが判明している。最終製品の生細胞数が少なく検査が困難なため、細胞生存率低下の直接の原因が MDSCにあるかどうかを明らかにすることは困難であったが、今後登録時に明らかに単球成分が増加している場合には、抑制性細胞の増加の有無の検討および 14 日間の培養が可能かどうかあらかじめ small scale で検討することも一つの方法であると考えられた。

- 3) 安全性に関しては、昨年度 1 例において認めた、急速に増大する腫瘍を原因とする重篤な腫瘍性疼痛を生じるような症例は認めず、安全に施行することが可能であった。2 例にグレード 3 の血清アミラーゼ値の上昇を認めたが、当院での血清アミラーゼ値の基準値上限 110 U/L に対して、2 例とも登録時の値が 175 U/L (グレード 2 相当)、155 U/L (グレード 1 相当) とすでに上昇を認めていた。また治療期間中も高値が継続していたが、登録前および治療

期間中に膵炎や唾液腺炎などを疑わせる所見は認めず、血清アミラーゼ値がグレード 3 の高値を示した日の CRP は 2 例とも 0 であった。また初回追跡調査においても、その後に膵炎等の発症は認めていない。臨床的には有意な所見を認めない検査値のみ高値の状態であったと考えられる。

高カリウム血症がグレード 2 の有害事象として 3 例、グレード 1 の有害事象として 3 例、計 6 例で出現している。いずれの症例も追加治療等を要せず、重篤と判断される状態でもなかった。高カリウム血症が発症した原因として、2 例では軽度の腎機能障害を有していた症例において、消炎鎮痛剤などの併用薬による薬剤性の一過性腎機能障害が発症したと考えられた。1 例では後腹膜への巨大な転移巣の急速な増大による右腎圧排とそれによる腎機能障害に起因するものと考えられた。2 例は採血結果のコメントから採血時の溶血が原因と考えられた。以上の 5 例では高カリウム血症と細胞治療との関連は低いと考えている。ただこれまで登録となった 19 例中 16 例で白金製剤が併用された化学療法が施行されており、そのうち 7 例で腎毒性が強いシスプラチンを併用した 2 剤もしくは 3 剤による抗癌剤治療が実施されている。適格基準である「血清クレアチニン値 1.5 mg/dL 以下」を満たすものの、正常上限を越えている軽度の腎機能障害を有

する症例では、薬剤や軽度の脱水など様々な誘因により腎機能障害の悪化が引き起こされると考えられ、特に高齢者ではこの点にも十分に注意をして臨床研究を進めて行く必要があると考えられた。残りの 1 例の高カリウム血症は腎機能障害を伴わないものであった。治療細胞の投与に起因して腎機能障害を伴わずに高カリウム血症を引き起こす機序として、治療効果による腫瘍崩壊や投与細胞のアポトーシスなどが考えられる。この症例では経過によりどちらとも否定的であり、これまでに原因は明らかではなかった。

## E. 結論

$\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与の臨床研究は、本年度は重篤有害事象の発生を認めず、安全に施行可能であった。また進行・再発肺癌患者末梢血を用いた 7~14 日間までの培養にて、プロトコール治療に必要な  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を調製することは可能であるが、患者の免疫状態も含めた様々な要因により培養が困難になる可能性も念頭に置き、培養工程を管理する必要があると思われた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., and Taniguchi, M. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front.*

- Immunol.* 2013; 4: 409
2. Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato, M., Shinoda, K., Tohyama, H., Hanazawa, A., Tamaki, Y., Hirahara, K., Yagi, R., Sakikawa, I., Morita, A., Nagira, M., Poyurovsky, V. M., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110(46):18626-31
  3. Tumes, D. J., Onodera, A., Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., Suzuki, Y., Motohashi, S., and Nakayama, T. The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4<sup>+</sup> T helper type-1 and type-2 cells. *Immunity* 2013; 39(5):819-32
2. 学会発表
1. Fujikawa, A., Kunii, N., Horinaka, A., Makita, Y., Uchida, R., Ihara, F., Motohashi, S., Okamoto, Y., and Nakayama, T. Phase I/II clinical study of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells as adjuvant immunotherapy for patients with head and neck mucosal malignant melanoma after carbon ion radiotherapy. 第42回日本免疫学会総会学術集会, 千葉市, 2013年12月11-13日
  2. 中山俊憲, 本橋新一郎, 國井直樹, 岡本美孝. 抗腫瘍免疫機構の最先端 第66回日本胸部外科学会定期学術集会, 仙台市, 2013年10月16-19日
  3. 伊藤俊広, 平原潔, 本橋新一郎, 矢野郁也, 中山俊憲. BCG-LMによる好酸球活性化の抗腫瘍効果 第72回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2013年10月3-5日
  4. Motohashi, S., Kunii, N., Taniguchi, M., Yoshino, I., Okamoto, Y., and Nakayama, T. NKT cell-targeting therapy for lung cancer and head and neck cancer. 7th International symposium on CD1 and NKT cells. Tours France, September13-17, 2013
  5. 中山俊憲, 本橋新一郎, 國井直樹, 岡本美孝. 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— 第17回日本がん免疫学会総会, 宇部市, 2013年7月3-5日
  6. 藤川陽, 國井直樹, 櫻井大樹, 長谷川安都佐, 鎌田正, 溝江純悦, 岡本美孝, 本橋新一郎, 中山俊憲. 炭素イオン線治療後の頭頸部粘膜悪性黒色腫患者に対する $\alpha$ ガラクトシルセラミドパルス抗原提示細胞を用いたアジュバント免疫治療に関する第I/II相臨床研究 第17回日本がん免疫学会総会, 宇部市, 2013年7月3-5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 登録症例背景

症例	年齢/性別	PS	組織型/臨床病期	前治療	病変部位
1	66/M	1	腺癌/IIIB期	プラチナ併用化学療法	肺、縦隔リンパ節、骨盤内
2	49/M	1	腺癌/V期	プラチナ併用化学療法	肺、脳、肺門・縦隔・鎖骨上リンパ節
3	52/F	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜、肝、骨、肺門・縦隔・鎖骨上リンパ節
4	64/F	1	扁平上皮癌/IIIB期	プラチナ併用化学療法	肺、気管支
5	53/M	1	腺癌/術後再発	プラチナ併用化学療法	肺、骨
6	69/M	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜、鎖骨上リンパ節
7	51/F	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、骨
8	45/M	1	大細胞癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、後腹膜
9	41/F	1	腺癌/IV期	ゲフィチニブ	肺
10	71/M	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、副腎、肺門・縦隔リンパ節
11	63/M	1	扁平上皮癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、縦隔・鎖骨上リンパ節
12	56/M	0	扁平上皮癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、縦隔リンパ節、骨
13	57/M	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、肺門・縦隔リンパ節
14	60/M	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、肺門・鎖骨上・腋窩リンパ節、骨
15	64/F	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法	肺、縦隔リンパ節、胸膜、骨
16	65/F	1	腺癌/術後再発	ゲフィチニブ	肺
17	54/F	1	腺癌/術後再発	プラチナ併用化学療法	肺
18	64/M	1	腺癌/術後再発	ゲフィチニブ	胸膜、腹膜、肺門・縦隔・腋窩リンパ節、肝、骨
19	69/M	1	腺癌/IV期	プラチナ併用化学療法、γ-ナイフ	肺、縦隔・腋窩リンパ節

表 2 これまでに発生した有害事象と頻度 (CTCAE 4.0)

重篤な有害事象: 1件			
癌性疼痛 (Grade 3): 原病悪化により疼痛増悪、要入院加療			
その他の有害事象			
Grade 3			
血清アミラーゼ増加	2例		
高血圧	1例		
Grade 2			
高カリウム血症	3例		
便秘	1例		
Grade 1			
咽頭痛	5例	高カリウム血症	3例
異常感覚(痺れ等)	5例	クレアチニン増加	2例
咳嗽	4例	γ-GTP増加	2例
胸背部痛	3例	低ナトリウム血症	2例
倦怠感	2例	血中ビリルビン増加	1例
皮疹	2例	AST増加	1例
疼痛(肩等)	2例	ALT増加	1例
発熱	1例	貧血	1例
皮膚障害(疣贅)	1例	低アルブミン血症	1例
その他	1例	検査値異常(LDH, CRP等)	14例

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、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）を行った。試験開始より 2014 年 3 月末までに 19 例が登録され、15 例でプロトコール完遂、1 例は study off、3 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、5 例において原病悪化による死亡が確認され、他の症例に関しては生存を確認した。生存が確認されている症例に対しては引き続きプロトコールに沿って追跡調査を行う。study off も含めてプロトコール治療の終了した 16 例における臨床効果は、完全奏功（CR）0 例、部分奏功（PR）1 例、安定（SD）6 例、進行（PD）9 例であった。今後 35 例の予定登録数まで検討を続けるとともに、治療後 2 年間の追跡調査を実施し、生存期間を含めた調査を行う予定である。

A. 研究目的

2012 年の本邦における原発性肺癌の新規罹患患者数は約 11 万人と推定されているのに対して、年間 7 万人以上が原発性肺癌により死亡しており、肺癌は極めて難治性な疾患である。また近年の高齢者数の増加とともに、高齢者に多く発生する肺癌の患者数は増加の一途を辿っている。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半数以下である。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。近年開発が進んだ新規の抗癌剤や分子標的薬など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、 $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

腫瘍縮小効果の判定として、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。ま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。

（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) 本年度は2014年3月末までに10例の

新規登録を行い、昨年度から継続している1例と合わせて11例で細胞治療を行った。8例で治療期間を終了した後追跡期間に移行し、3例は治療期間中である。試験開始から19例の患者が登録されており、15例でプロトコル完遂、1例はstudy off、3例は進行中である。昨年度は明らかな腫瘍増大により1コースにてstudy offとなった症例を認めたが、本年度はこれまでのところ全例で2コースのプロトコル治療を完遂することが可能であった。

- 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を実施している。study offも含めた登録全症例の中で治療期間が終了した16例に対して、本年度は試験終了6ヶ月後の初回の追跡調査を7例に、2回目の12ヶ月後の追跡調査を7例に、18ヶ月後の3回目の追跡調査を1例に実施した。その結果、本年度4例の原病死を確認した（表1）。昨年度1例の原病死を確認していることから、試験開始からは5例の原病死を認めている。また追跡調査により試験開始からこれまでに、PRと評価された1例およびSDと評価された6例中4例で病勢の進行を確認している。
- 3) 本年度プロトコル治療が実施され、これまでに評価可能であった8症例におけるRECISTを用いた臨床効果につ

いては、完全奏功（CR）および部分奏功（PR）はともに認めず、安定（SD）は 2 例、進行（PD）は 6 例であった。試験開始からこれまでの合計として、PR 1 例、SD 6 例、PD 9 例となった（表 1）。

#### D. 考察

- 1) 治療期間終了後の最長 1 年半の追跡調査の結果から、これまでに登録された症例において 5 例の原病死を確認しており、治療開始時よりの生存期間として 11.6 ヶ月、9.0 ヶ月、11.5 ヶ月、10.4 ヶ月、9.5 ヶ月であった。また治療終了時に PR および SD と評価された症例に対する追跡調査で確認した無増悪生存期間は、6.2 ヶ月、3.0 ヶ月、4.9 ヶ月、6.8 ヶ月、5.2 ヶ月であった。進行・再発非小細胞肺癌の予後の厳しさを考えると、今後益々原病悪化および原病死を迎える症例が増加することが予想される。これまでのところ全症例で追跡調査が可能であり、予後の把握が出来ているが、今後も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、全生存期間および無増悪生存期間を明らかとしていく方針である。
- 2) 腫瘍縮小効果に関しては、昨年度登録の 1 例で PR を認め、1 例で一部の病変に縮小効果を認めたが、本年度登録し評価可能であった 8 症例においては、SD が 2 例、PD が 6 例であった。これ

までの先行試験では PR を確認できた症例は認めておらず、腫瘍縮小効果が得られる症例は少ないことが予想されるが、今後も画像評価を確実に実施し、生存期間と併せて腫瘍縮小効果の意義を検討していく予定である。

- 3) 本年度本治療プロトコールに登録された患者は腺癌 8 例、扁平上皮癌 2 例であり、昨年 study off となった大細胞癌症例は認めなかった。大細胞癌は腺癌や扁平上皮癌に比較すると症例の絶対数は少ないものの、癌の進行が極めて早い症例が多いことが特徴である。大細胞癌の一部の症例では小細胞癌と同様の生物学的特徴を有することが明らかとなっていることから、本アプローチの適応とはならない可能性があり、今後適格基準を検討する症例の中で、大細胞癌症例に対しては、腫瘍倍加速度や前治療に対する反応など病勢に充分注意して登録の適否を行うなど、慎重な検討をしていく必要があると思われる。

#### E. 結論

本臨床研究におけるプロトコール治療を予定通りに実施し、プロトコールに沿った追跡調査を実施した。追跡調査により原病死が確認された症例では全生存期間が明らかとなってきている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Guo F, Hiroshima K, Wu D, Satoh M, Abulazi M, Nomura F, Yoshino I, Tomonaga T, Nakatani Y. Prohibitin and its rapidly emerging role as a biomarker of systemic malignancies-Reply. *Hum Pathol.* 2013; 44(4): 679-80
2. Ohba, T., Wada, H., Yoshino, I., Yoshida, S., Tagawa, T., Shoji, F., Yamazaki, K., and Maehara, Y. Increase of bone morphogenetic protein-7 expressing pulmonary resident cells in pneumonectomized rats. *Surg Today.* 2014;44(2)324-331
3. Sakurai H, Asamura H, Miyaoka E, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Okumura M, Yokoi K; for the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Differences in the prognosis of resected lung adenocarcinoma according to the histological subtype: a retrospective analysis of Japanese lung cancer registry data. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45(1):100-7
4. Nakajima T, Yasufuku K, Saegusa F, Fujiwara T, Sakairi Y, Hiroshima K, Nakatani Y, Yoshino I. Rapid on-site cytologic evaluation during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for nodal staging in patients with lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2013; 95(5): 1695-9
5. Iida T, Nomori H, Shiba M, Nakajima J, Okumura S, Horio H, Matsuguma H, Ikeda N, Yoshino I, Ozeki Y, Takagi K, Goya T, Kawamura M, Hamada C, Kobayashi K; Metastatic Lung Tumor Study Group of Japan. Prognostic factors after pulmonary metastasectomy for colorectal cancer and rationale for determining surgical indications: a retrospective analysis. *Ann Surg.* 2013; 257(6): 1059-64
6. Sakairi Y, Hoshino H, Fujiwara T, Nakajima T, Yasufuku K, Yoshida S, Yoshino I. Validation of EBUS-TBNA-integrated nodal staging in potentially node-positive non-small cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 61(9):522-7
7. Watanabe SI, Asamura H, Miyaoka E, Okumura M, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Yokoi K; for the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Results of T4 Surgical Cases in the Japanese Lung Cancer Registry Study: Should Mediastinal Fat Tissue Invasion Really be Included in the T4 Category? *J Thorac Oncol.* 2013; 8(6): 759-765
8. Kometani T, Okamoto T, Yoshida S, Yoshino I. Acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 61(9):504-12
9. Nakajima T, Yasufuku K, Yoshino I. Current status and perspective of EBUS-TBNA. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 61(7): 390-6
10. Mizobuchi T, Chen F, Yoshino I, Iwata T, Yoshida S, Bando T, Date H. Radiologic evaluation for volume and weight of remnant lung in living lung donors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 146(5): 1253-8
11. Yasufuku K, Nakajima T, Waddell T, Keshavjee S, Yoshino I. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration for Differentiating N0 Versus N1 Lung Cancer. *Ann Thorac Surg.* 2013; 96(5):1756-60
12. Mizobuchi T, Wada H, Sakairi Y, Suzuki H, Nakajima T, Tagawa T, Iwata T, Motoori K, Yoshida S, Yoshino I. Spirometric and radiological evaluation of the remnant lung long after major pulmonary resection: can