

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、 α -Galactosylceramide (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、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 α GalCer 反応性インターフェロン（ $\text{IFN-}\gamma$ ）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、データマネー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
溝淵 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 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 α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与 (Chiba-NKT) に関する第 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 α 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 α 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、 α GalCer 刺激特異的インターフェロン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 α 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 α GalCer反応性インターフェロン産生細胞数は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) 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。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- γ 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、 α 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) データマネー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⁺ 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
 α -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 α -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, September 13-17, 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 α 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 \square/\square 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