

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、 α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）に関する第 Ⅰ 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、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 万人を超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 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 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 $IFN\gamma$ 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 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： 非小細胞癌の組織学的確定診断が得られている、臨床病期 B/ 期または術後再発、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、測定可能病変を有する、20~75 歳、PS 0~1、先行治療から 4 週間以上経過、骨髄、肺、肝、腎等の機能が規準を満たす、予後が 3 ヶ月以上期待される、末梢血に NKT 細胞が存在する、文書による同意

除外基準： 重篤な感染症および重大な合併症、処置を要する胸水、腹水、心嚢水の大量貯留、未治療の脳転移、同時性重複癌、コルチコステロイド使用中、自己免疫疾患、肝炎の既往、HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体又は HTLV-1 抗

体が陽性、重篤な心疾患もしくは肺疾患、アルブミン過敏症の既往、妊婦および授乳期、成分採血禁忌症例、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 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)。

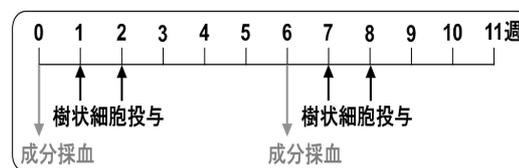


図1 臨床研究スケジュール

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 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

(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名でプロトコール治療期間である11週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。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名でプロトコール治療を完遂、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、プロトコールに沿って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。

□□□αGalCer 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⁻CD14⁺HLA-DR^{low}/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

α 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 α 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⁺ 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 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, 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 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□/□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/IV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