

201409028A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本橋 新一郎

平成 27 (2015) 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 -----17

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 -----26

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 -----37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----43

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）
総括研究報告書

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治療としての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。目標症例数35例に対して、試験開始より2015年3月末までに33例を登録し、28例でプロトコル完遂、3例はstudy off、2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、11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。プロトコル治療が完遂もしくは途中終了した31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）13名、進行（PD）17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、細胞治療に関連する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31例中12例および18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 γ 産生細胞数は29例中20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
岩田 剛和	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	講師
鈴木 秀海	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	助教

中島 崇裕	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	特任助教
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
蒔田 勇治	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

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 II 相臨床研究を先進医療として行い、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、先進医療として施行される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 コース目開始日 (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、無菌試験、マイコプラズマ否定試験) を行った上で、培養 7 日目と 14 日目に α GalCer パルス樹状細胞を出荷した。
- 3) 当該患者に対して、 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 0 より 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 γ (IFN- γ) 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 2015 年 3 月末までに 14 名の新規登録を行い、昨年度からの治療期間継続症例を加えた 16 名で細胞治療を行った。試験開始からは 33 名の患者を登録し、そのうち 28 名でプロトコル治療を完遂、3 名は 1 コース終了後に試験中止、2 名が進行中である。試験中止となった 3 症例はいずれも、1 コース終了後に明らかに腫瘍の増大を認め原病悪化と判断したため試験を中止し、標準的な抗癌剤による治療に変更した。
- 2) これまでに 118 回の α GalCer パルス樹状細胞の調製を行った。本年度施行した 48 回の全ての細胞調製において、出荷条件（細胞生存率、外観試験、エンドトキシン試験）を満たさない細胞製剤は発生しなかった。
- 3) 安全性の評価としては、本年度に細胞

投与を受けた 16 例で重篤な有害事象を認めなかった。原病悪化により試験中止となった 2 例では、標準的化学療法を施行予定の入院となったため有害事象報告を行ったが、入院と細胞治療との関連は無く、また自他覚症状ともに重篤な有害事象を認めていない。登録時より血清アミラーゼ値の上昇を認めていた 1 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。その他の有害事象はすべてグレード 2 以上と判断された。

- 4) 治療期間が終了した症例の追跡調査を試験中止の症例も含めて全例で行い、31 例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、11 例において原病死を認めた。他の 20 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 31 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) 13 名、増悪 (PD) 17 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 8 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 31 例中 12 例、NK 細胞の増加を認めた症例は 18 例であった。末梢血単核球中の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数は 20 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 (本年 12 回実施)。
- 9) 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 35 例を平成 26 年 12 月までに登録完了する予定であったが、平成 26 年 10 月に 28 例を登録した時点で予定登録期間内での登録完了が困難と判断し、先進医療技術審査部会に臨床研究期間の延長申請を行い、平成 26 年 11 月 12 日に承認を得た。登録期間は平成 27 年 12 月末としたが、平成 26 年 3 月末の時点ですでに 33 例まで症例の組み入れと 34 例目の登録準備が行われていることから、平成 27 年度早期に症例登録を完了することは確実と考えている。
- 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) 重篤な有害事象報告を行った 2 例の試験継続中止症例では、原病悪化のために早期に標準的治療である抗癌剤治療を実施するために、入院加療となったため報告を行った。両症例とも細胞治療との因果関係を認めず、また重篤と判断される自他覚症状の増悪はなかった。グレード 3 の血清アミラーゼ値の上昇を認めた症例は登録前より高値を示していた無症候性の血清アミラーゼ上昇であった。
- 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 3 年を経過したところで、原病死が 11 例に確認され生存

期間が確定した。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全症例において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検討した樹状細胞マーカーである HLA-DR と CD11c、CD86、CD14 分子の発現は、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た。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。特に腫瘍縮小効果に関しては、初年度に 1 例の PR を経験した後には、腫瘍縮小効果が確認された症例は認めておらず、これまでの臨床研究においても認めてこなかったことから、Chiba-NKT により腫瘍縮小効果を認めずに生存期間延長効果が得られる機序の解明としての免疫学的解析

は極めて重要と考えられる。

- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 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。
- 10) 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（Chiba-NKT）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。今後早期に予定症例数の登録を完了し、追

跡調査にて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. Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O. U., Guedan, S., McGettigan, S., Posey, A Jr., Ang, S., Cooper, L. J., Platt, J., Johnson, F. B., Paulos, C. M., Zhao, Y., Kalos, M., Milone, M. and June, C. H. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol. Res.* 3(4):356-367(2015)
2. Endo, Y., Hirahara, K., Iinuma, T., Shinoda, K., Tumes, D. J., Asou, H. K., Matsugae, N., Obata-Ninomiya, K., Yamamoto, H., Motohashi, S., Oboki, K., Nakae, S., Saito, H., Okamoto, Y., and Nakayama, T. The Interleukin-33-p38 Kinase Axis Confers Memory T Helper 2 Cell Pathogenicity in the Airway. *Immunity* 42(2):294-308(2015)
3. Sun, Y., Furihata, T., Ishii, S., Nagai, M., Harada, M., Shimozaoto, O., Kamijo, T., Motohashi, S., Yoshino, I., Kamiichi, A., Kobayashi, K. and Chiba, K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers: potential biomarker implications. *Clin. Transl. Med.* 3:37(2014)
4. Sakurai, T., Inamine, A., Iinuma, T.,

- Funakoshi, U., Yonekura, S., Sakurai, D., Hanazawa, T., Nakayama, T., Ishii, Y. and Okamoto, Y. Activation of invariant natural killer T cells in regional lymph nodes as new antigen-specific immunotherapy via induction of interleukin-21 and interferon- γ . *Clin. Exp. Immunol.* 178(1):65-74 (2014)
5. Watanabe, Y., Onodera, A., Kanai, U., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Iwamura, C., Tumes, DJ., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K. and Nakayama, T. Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(35):12829-34(2014)
2. 学会発表
1. Kunii, N., Makita, Y., Ihara, F., Uchida, R., Fujikawa, A., Sakurai, D., Motohashi, S., Nakayama, T. and Okamoto, Y. Antigen Specific Immunotherapy Based on Chimeric Antigen Receptor Expressing T Cells Targeted to Salivary Gland Tumor. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日, 京都
 2. Watanabe, Y., Onodera, A., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kikuchi, M., Morimoto, Y., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K. and Nakayama, T. The trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日, 京都
 3. Nagato, K., Motohashi, S., Nakayama, T., Yoshino, I. and Nishimura, M. I. Human melanoma antigen-specific iNKT cells engineered by the TIL 1383I T cell receptor gene transfer. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日, 京都
 4. 鎌田 稔子, 鈴木 茜, 藤川 陽, 三瀬直子, 蒔田 勇治, 吉田 成利, 鈴木 秀海, 中島 崇裕, 岩田 剛和, 吉野 一郎, 中山 俊憲, 本橋 新一郎 原発性肺癌に対する NKT 細胞免疫療法における PD-1 阻害の有用性 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014 年 11 月 15 日, 京都
 5. 堀中 敦史, 本橋 新一郎, 岡本 美孝 骨髓系免疫抑制細胞の頭頸部腫瘍における検討 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日, 横浜
 6. 本橋 新一郎 NKT cell-targeting immunotherapy for non-small cell lung cancer. 第 18 回日本がん免疫学会総会 2014 年 8 月 1 日, 松山
 7. 鎌田 稔子, 本橋 新一郎, 吉田 成利, 鈴木 秀海, 中島 崇裕, 田川 哲三, 岩田 剛和, 溝渕 輝明, 吉野 一郎 原発性肺癌患者における NKT 細胞免疫治療と PD-1 阻害療法の有用性 第 31 回日本呼吸器外科学会総会 2014 年 5 月 29 日, 東京
- H. 知的財産権の出願・登録情報
1. 特許取得
登録日：平成 27 年 1 月 9 日, 登録番号：特許第 5674082 号, 出願日：平成 21 年 8 月 31 日, 「NKT 細胞リガンドをパルスした抗原提示細胞による抗腫瘍療法の有効性の予測方法」, 発明者：本橋 新一郎 (国立大学法人千葉大学大学院医学研究院), 中山 俊憲 (国立大学法人千葉大学大学院医学研究院), 沖田 幸祐 (発明完成時：千葉大学特別研究学生), 出願人：国立大学法人千葉大学、高信化学株式会社, 出願番号：特願 2009-200911 号
 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
蒔田 勇治	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相臨床研究を先進医療として施行している。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。本年度は 14 名の新規登録を行い、昨年度からの治療期間継続症例を加えた 16 名で細胞治療を行った結果、進行・再発肺癌症例の末梢血を用いて、出荷判定基準を満たす細胞製剤の培養は可能であった。本年度施行した 16 例中 2 例で原病悪化により 1 コースで試験終了となったが、それ以外の症例では 2 コースのプロトコル治療を施行可能であり、細胞治療に関連する重篤な有害事象を認めることな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、2014 年には年間約 14 万人以上の新規発症患者数と、7 万人を越える死亡者数が予想されている。肺癌の約半数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いことから、抗癌剤による侵

襲性の強い治療は時として困難となることから、副作用が軽微で有効な新規治療法の開発が喫緊の課題である。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 I / II 相試験を施行し、登録 23 例中 17 例がプロトコルを完遂した。末梢血 α GalCer 反応性インターフェロン γ (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 III B/IV 期または術後再発、③抗癌剤による一次治療であるプラチナ併用化学療法もしくは Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) による治療を終了している、④測定可能病変を有する、⑤20 ~ 75 歳、⑥Performance status 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文書による同意が得られている

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同時性もしくは 5 年以内の重複癌、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 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)。

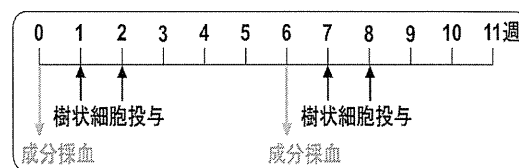


図1 臨床研究スケジュール

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判定検査（細胞生存率、外観試験、エンドトキシン試験）を行うとともに、無菌試験、マイコプラズマ否定試験を実施する。また最終製品を凍結保存し保管する。

3) 安全性の評価

臨床研究治療期間として、成分採血開始（day 0）から 11 週（day 77）までの間に発生したすべての有害事象について、CTCAE ver 4.0 に基づいたグレードの評価や有害事象の転帰を含めた評価を行った。

（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) 平成 26 年度は 14 名の新規登録を行い、そのうちの 1 名は登録完了後培養開始前であること、昨年度からの治療期間継続症例が 3 名いることから、16 名で細胞培養を行った。このうち 15 名はプロトコール治療期間である 11 週間を終了し追跡期間に移行した。試験開始からとして、2015 年 3 月末までに 33

名の患者を登録し、そのうち 28 名でプロトコール治療を完遂、3 名は 1 コース終了後に study off、2 名は進行中である。登録した 33 症例の背景を表 1 に示す。33 例の平均年齢は 58.9 歳であり、男性 22 例、女性 11 例であった。PS は 2 人のみが無症状の 0 であったが、残りの 31 人は何らかの症状を有しており、PS は 1 と判断された。本年度 study off となった症例 21 および症例 31 においては、1 コース終了時点で原病悪化を認めたことにより、プロトコールに沿って 2 クール目を開始する前に試験継続を中止とし、標準治療の抗癌剤治療へと変更した。

2) 本年度はこれまでに延べ 48 回の α GalCer パルス樹状細胞の調製を施行した。臨床試験開始からは計 118 回の α GalCer パルス樹状細胞の調製を行っている。本年度施行した全ての細胞調製において出荷条件（細胞生存率、外観試験、エンドトキシン試験）を満たさず不合格となった細胞製剤は発生しなかった。

3) 安全性の評価として、本年度に原病悪化により試験中止となった 2 例では、試験中止後早期に標準的化学療法施行のため入院となったことから、有害事象報告を行った。細胞治療との関連は無いと判断しており、さらにその 2 例では自他覚症状ともに重篤と判断される有害事象の発生も認めなかった。残りの 14 例においても重篤と判断され

る有害事象は発生しなかった。試験開始時からこれまでに細胞投与が実施された31例について、これまでに発生した有害事象と発生頻度を表2に示す（原病悪化の2例を除く）。これまでに重篤と判断されたグレード3の有害事象は症例8の癌性疼痛のみである。グレード3と判定されたものの重篤とは判断されなかった有害事象として、成分採血2回目施行後の一時的な血圧上昇（特に処置等を要せず）と、登録時より血清アミラーゼ値が上昇を認めていた3症例での無症候性の血清アミラーゼ値上昇が認められている。グレード2の有害事象と判定された胸水の1例は、胸水の穿刺細胞診にて悪性細胞を認めた。そのほかに高カリウム血症を3例に認めたほか、呼吸困難が2例、便秘を1例に認めた。グレード1の有害事象として、咳嗽や咽頭痛、成分採血時のしびれなどの異常感覚、胸背部痛や肩などの疼痛を認め、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。また、成分採血と1回目の細胞投与の間にインフルエンザ様の症状が発生し、抗インフルエンザ薬の治療を受けた症例を1例に認めた。細胞投与直前には解熱していたものの感染が継続している可能性を考慮し、1回目の細胞投与を実施せず、2回目の細胞投与から行ったが、特に有害事象の発現を認めなかった。

D. 考察

- 1) 本臨床研究の目標症例数 35 例を平成 26 年 12 月までに登録完了する予定であったが、平成 26 年 10 月に 28 例を登録した時点で予定登録期間内での登録完了が困難と判断し、先進医療技術審査部会に臨床研究期間の延長申請を行い、平成 26 年 11 月 12 日に承認を得た。延長期間は 1 年間（平成 27 年 12 月末まで）としたが、平成 26 年 3 月末の時点ですでに 33 例まで症例の組み入れが行われており、34 例目の登録準備がすでに進行していることから、平成 27 年度早期に症例登録を完了することは十分に可能と考えている。症例登録の加速化には、昨年度から適切な症例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実施した臨床研究説明会が貢献したと考えられる。また CPC の効率的な運用のために、先進医療で実施されている臨床研究を中心とした実施担当者と施設管理者による調整会議も効果があったと考えており、今後も継続して行っていく予定である。来年度登録された症例の治療を終了した後に追跡期間に移行して、予定された臨床研究の早期の終了を目指す。
- 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、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。最終製品の出荷判定には、培養工程中のサン

ブルを用いたエンドトキシン試験と最終製品の外観試験を採用しているが、無菌試験やマイコプラズマ否定試験の結果は細胞投与後に結果が判明する。出荷判定に際して培養細胞の信頼性をさらに高めるために、最終製品を用いて迅速に結果が得られる簡易型エンドトキシン測定システムの併用や PCR 法を用いたマイコプラズマ否定試験の採用などで投与前に安全性が高まると考え、施設内での事前検討を開始している。無菌試験に関しては他の方法での代用は困難であるが、今後も細胞製剤の安全性を高めるための情報収集に努めて、可能な方法については検討を行っていきたいと考えている。

- 3) 安全性に関しては、これまでに 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。本年度 1 例のグレード 3 のアミラーゼ上昇を認め、これまでに計 3 例となったが、3 例とも登録時からすでに上昇を認めており、治療期間中およびこれまでにを行った追跡期間において肺炎や唾液腺炎等の症状を呈することなく推移していることから、腫瘍に関連するアミラーゼ上昇と考えられた。

グレード 2 の有害事象として、胸水貯留を 1 例に認めたが、本症例は登録前に胸膜病変と胸水を認めていた。治療前には悪性胸水の診断は得られてい

なかったものの、前治療として施行された化学療法にて胸水がコントロールされたことから癌性胸水と判断していた。臨床研究登録前に胸水の明らかな増加傾向は認めなかったため、胸膜癒着術は施行されず臨床研究に登録されたが、臨床研究治療期間中に胸水の増量を認め、穿刺細胞診にて悪性細胞が確認されたことから、プロトコール治療の有効性が得られずに増悪したものと考えられた。

昨年度までの有害事象として高カリウム血症がグレード 2 として 3 例、グレード 1 として 3 例、計 5 例が出現したが、本年度はグレード 1 の 2 例のみに留まった。高カリウム血症が発症した原因として、薬剤性の一過性腎機能障害、腫瘍による物理的な腎圧迫による腎機能障害、採血時の溶血、原因不明などが考えられている。本年度の 1 例においても消炎鎮痛剤の服用歴があり、溶血の影響も認めていないことから薬剤性が最も考えられた。もう 1 例は採血時の溶血を認めており、この影響が考えられた。ただ登録前に軽度の腎機能障害を有していた症例において高カリウム血症を発症した症例はなかった。前治療の抗癌剤などにより腎機能障害を認めていた症例においては、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ことを念頭におき、脱水にならない等の注意を充分にして臨床研究を進めて

いることが有効と考えられ、今後も同様の点に注意してプロトコール治療を行う。

E. 結論

α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与 (Chiba-NKT) の臨床研究は、本年度は原病悪化による抗癌剤治療のための入院加療以外には重篤と判断される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が可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O. U., Guedan, S., McGettigan, S., Posey, A Jr., Ang, S., Cooper, L. J., Platt, J., Johnson, F. B., Paulos, C. M., Zhao, Y., Kalos, M., Milone, M. and June, C. H. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol. Res.* 3(4):356-367(2015)
2. Endo, Y., Hirahara, K., Iinuma, T., Shinoda, K., Tumes, D. J., Asou, H. K., Matsugae, N., Obata-Ninomiya, K., Yamamoto, H., Motohashi, S., Oboki, K., Nakae, S., Saito, H., Okamoto, Y., and Nakayama, T. The Interleukin-33-p38 Kinase Axis Confers Memory T Helper 2 Cell Pathogenicity in the Airway. *Immunity* 42(2):294-308(2015)
3. Sun, Y., Furihata, T., Ishii, S., Nagai, M., Harada, M., Shimozato, O., Kamiyo, T., Motohashi, S., Yoshino, I., Kamiichi, A., Kobayashi, K. and Chiba, K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers: potential biomarker implications. *Clin. Transl. Med.* 3:37(2014)
4. Watanabe, Y., Onodera, A., Kanai, U., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Iwamura, C., Tumes, DJ., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K. and Nakayama, T. Trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111(35):12829-34(2014)

2. 学会発表

1. Kunii, N., Makita, Y., Ihara, F., Uchida, R., Fujikawa, A., Sakurai, D., Motohashi, S., Nakayama, T. and Okamoto, Y. Antigen Specific Immunotherapy Based on Chimeric Antigen Receptor Expressing T Cells Targeted to Salivary Gland Tumor. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日, 京都
2. Watanabe, Y., Onodera, A., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kikuchi, M., Morimoto, Y., Shinoda, K., Yagi, R., Motohashi, S., Hirahara, K. and Nakayama, T. The trithorax complex component Menin controls differentiation and maintenance of T helper 17 cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日, 京都
3. Nagato, K., Motohashi, S., Nakayama, T., Yoshino, I. and Nishimura, M. I. Human melanoma antigen-specific iNKT cells engineered by the TIL 1383I T cell receptor gene transfer. 第 43 回日本免疫学会学術集会 2014 年 12 月 11 日, 京都

4. 鎌田 稔子, 鈴木 茜, 藤川 陽, 三瀬 直子, 蒔田 勇治, 吉田 成利, 鈴木 秀海, 中島 崇裕, 岩田 剛和, 吉野 一郎, 中山 俊憲, 本橋 新一郎 原発性肺癌に対する NKT 細胞免疫療法における PD-1 阻害の有用性 第 55 回日本肺癌学会学術集会 2014 年 11 月 15 日, 京都
5. 堀中 敦史, 本橋 新一郎, 岡本 美孝 骨髄系免疫抑制細胞の頭頸部腫瘍における検討 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日, 横浜
6. 本橋 新一郎 NKT cell-targeting immunotherapy for non-small cell lung cancer 第 18 回日本がん免疫学会総会 2014 年 8 月 1 日, 松山
7. 鎌田 稔子, 本橋 新一郎, 吉田 成利, 鈴木 秀海, 中島 崇裕, 田川 哲三, 岩田 剛和, 溝渕 輝明, 吉野 一郎 原発性肺癌患者における NKT 細胞免疫治療と PD-1 阻害療法の有用性 第 31 回日本呼吸器外科学会総会 2014 年 5 月 29 日, 東京

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

登録日：平成 27 年 1 月 9 日, 登録番号：特許第 5674082 号, 出願日：平成 21 年 8 月 31 日, 「NKT 細胞リガンドをパルスした抗原提示細胞による抗腫瘍療法の有効性の予測方法」, 発明者：本橋 新一郎 (国立大学法人千葉大学大学院医学研究院), 中山 俊憲 (国立大学法人千葉大学大学院医学研究院), 沖田 幸祐 (発明完成時：千葉大学特別研究学生), 出願人：国立大学法人千葉大学、高信化学株式会社, 出願番号：特願 2009-200911 号

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、肺門・縦隔・鎖骨上リンパ節、脳
3	52/F	1	腺癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜、肺門・縦隔・鎖骨上リンパ節、肝、骨
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、肺門・縦隔リンパ節、副腎
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、肺門・縦隔・腋窩リンパ節、腹膜、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
20	70/M	0	腺癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺
21	66/M	1	腺癌/ V期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜
22	57/F	1	腺癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺、脾臓、腹腔、骨
23	68/F	1	腺癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜
24	60/M	1	扁平上皮癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜、心膜
25	51/M	1	腺癌/ IIIB期	プラチナ併用化学療法＋放射線	肺、縦隔リンパ節
26	50/M	1	腺癌/ IIIB期	プラチナ併用化学療法＋放射線	肺、鎖骨上リンパ節
27	69/F	1	非定型カルチノイド/ 再発	プラチナ併用化学療法	肺、肝
28	40/M	1	腺癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜
29	73/M	1	腺癌/ IIIB期	プラチナ併用化学療法＋放射線	肺、肺門・縦隔リンパ節
30	38/M	1	扁平上皮癌/ IV期	プラチナ併用化学療法＋放射線	肺、副腎、脾臓、骨
31	68/M	1	扁平上皮癌/ IIIB期	プラチナ併用化学療法	肺、縦隔リンパ節、心膜
32	75/M	1	扁平上皮癌/ IV期	プラチナ併用化学療法	肺、胸膜
33	52/M	1	腺癌/ 再発	プラチナ併用化学療法	肺

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	3例		
高血圧	1例		
Grade 2			
高カリウム血症	3例	便秘	1例
呼吸困難	2例	胸水	1例
Grade 1			
咳嗽	8例	高カリウム血症	5例
咽頭痛	6例	低アルブミン血症	5例
異常感覚(痺れ等)	6例	γ-GTP増加	4例
胸背部痛	4例	クレアチニン増加	4例
疼痛(肩等)	4例	低ナトリウム血症	2例
倦怠感	4例	AST増加	2例
発熱	2例	ALT増加	1例
皮疹	2例	貧血	1例
皮膚障害(疣贅等)	2例	血中ビリルビン増加	1例
呼吸困難	2例	血清アミラーゼ増加	1例
食欲不振	1例	検査値異常(LDH, CRP等)	24例
インフルエンザ様症状	1例		
その他	1例		

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
岩田 剛和	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	講師
鈴木 秀海	千葉大学医学部附属病院	呼吸器外科	助教
中島 崇裕	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
田中 教久	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。試験開始より 2015 年 3 月末までに 33 例が登録され、28 例でプロトコル完遂、3 例は study off、2 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確定のための追跡調査の結果、11 例において原病死が確認され、それ以外の症例に関しては生存を確認した。生存が確認された症例に対しては引き続きプロトコルに沿って追跡調査を行う。プロトコル治療の終了した 31 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）13 例、進行（PD）17 例であった。来年度早期に予定症例数である 35 例までの症例組み入れを完了した上で、治療期間を終了後に 2 年間の追跡調査を実施し、全生存期間・無増悪生存期間の確定を行う予定である。

A. 研究目的

日本における原発性肺癌の新規罹患患者数は 2012 年には約 11 万人と推定されているのに対して、7 万人以上が原発性肺癌によって死亡しており、極めて難治性な疾患の一つであり、がん死の原因疾患として 1 位を占める。加えて近年の高齢者数の急速な増加とともに、高齢者に多く発生する肺癌の罹患患者数は増加の一途を辿ってお

り、それによってもって死亡者数も今後ますます増加することが予想されている。肺癌の根治を目指した治療法は外科的切除であり、早期発見による切除可能な肺癌が増えているものの、発見時に手術適応となるのは約半数と限られている。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。近年開発が進んだ新規の抗癌剤や分子標的薬など

の登場により、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ことから、治療成績の向上が強く望まれている。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きた、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相臨床研究を先進医療として実施し、その有効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。

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6ヶ月ごとの

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) 試験開始から2015年3月末までに53例に対して文書による説明の上、同意取得を行い適応精査を行ったところ、33例において適格基準・除外基準に適合し、登録を行った。そのうち本年度の新規登録は14例であり、昨年度から継続している3例と合わせて16例で細胞治療を施行した。残りの1例は登録を完了し、治療開始直前の状態である。これまでに登録された全33例のうち、28例ですでにプロトコル治療を完遂し追跡期間へと移行、3例は試験途中で原病悪化により明らかな腫瘍増大を認めたために標準治療へと変更することとし、1コースにて試験を中止して追跡期間へと移行、2例は2015年度末現在で治療期間中である。
- 2) 主要評価項目である全生存期間に関しては、試験中止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。登録された全症例の中で治療期間が終了した31例に対