

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
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 Ⅲ 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ジメントの整備を行い、これに基づいてデータマネ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 以下と判断された。

- 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ール治療を受け、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 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。
- 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