

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 Ⅲ 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 Ⅲ 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 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： 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、測定可能病変を有する、20 ~ 75 歳、Performance status 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、文書による同意が得られている

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、同時性もしくは 5 年以内の重複癌、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)。

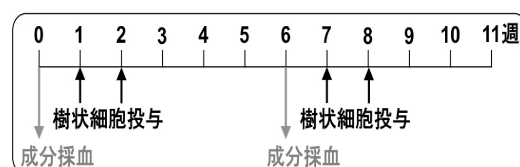


図1 臨床研究スケジュール

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 例では自覚症状と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

プ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膵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., 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. 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, 溝淵 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			
<u>その他の有害事象</u>			
<u>Grade 3</u>			
血清アミラーゼ増加	3例		
高血圧	1例		
<u>Grade 2</u>			
高カリウム血症	3例	便秘	1例
呼吸困難	2例	胸水	1例
<u>Grade 1</u>			
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		