

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 25 年度 総括・分担研究報告書

**研究代表者 本橋 新一郎**

平成 26 ( 2014 ) 年 5 月

## 目 次

### . 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

### . 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 -----15

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 -----22

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 -----30

. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----34

. 研究成果の刊行物・別刷 -----35



## 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、 $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ GalCer 反応性インターフェロン（ $IFN-\gamma$ ）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  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer) に着目し、体内での NKT 細胞活性化を目指す  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 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  $\alpha$ 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 $\alpha$ 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)  $\alpha$ 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- $\gamma$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>+</sup> 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  
 $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$  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

## 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、 $\alpha$ 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  $\alpha$ 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  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer) に着目し、体内での NKT 細胞活性化を目指す  $\alpha$ 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、 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の投与を行う (図 1)。

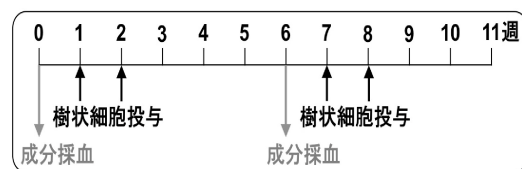


図1 臨床研究スケジュール

### 2) $\alpha$ 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 $\alpha$ GalCer を加えて、 $\alpha$ 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  $1 \text{ m}^2$  当たり  $1 \times 10^9$  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

$\alpha$ GalCer 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 $\alpha$ GalCer 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<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup>/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

$\alpha$ 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  $\alpha$ 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<sup>+</sup> 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  $\alpha$ -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 $\alpha$ 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

## 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
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
鎌田 稔子	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、 $\alpha$ 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 2014 年 3 月末までに 19 例が登録され、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を確認した。生存が確認されている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。study off も含めて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 例、部分奏功（PR）1 例、安定（SD）6 例、進行（PD）9 例であった。今後 35 例の予定登録数まで検討を続けるとともに、治療後 2 年間の追跡調査を実施し、生存期間を含めた調査を行う予定である。

### A. 研究目的

2012 年の本邦における原発性肺癌の新規罹患患者数は約 11 万人と推定されているのに対して、年間 7 万人以上が原発性肺癌により死亡しており、肺癌は極めて難治性な疾患である。また近年の高齢者数の増加とともに、高齢者に多く発生する肺癌の患者数は増加の一途を辿っている。肺癌の根治を目指した治療法で中心をなすのは手術療法であるが、肺癌発見時に手術適応となるのは半数以下である。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。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いる、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、 $\alpha$ -Galactosylceramide（ $\alpha$ GalCer）パルス

樹状細胞の静脈内投与（Chiba-NKT）の第 相臨床研究を行い、その有効性と安全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 $\alpha$ 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) 本年度は2014年3月末までに10例の

新規登録を行い、昨年度から継続している1例と合わせて11例で細胞治療を行った。8例で治療期間を終了した後に追跡期間に移行し、3例は治療期間中である。試験開始から19例の患者が登録されており、15例でプロトコル完遂、1例はstudy off、3例は進行中である。昨年度は明らかな腫瘍増大により1コースにてstudy offとなった症例を認めしたが、本年度はこれまでのところ全例で2コースのプロトコル治療を完遂することが可能であった。

- 2) 主要評価項目である全生存期間に関しては、study off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。study offも含めた登録全症例の中で治療期間が終了した16例に対して、本年度は試験終了6ヶ月後の初回の追跡調査を7例に、2回目の12ヶ月後の追跡調査を7例に、18ヶ月後の3回目の追跡調査を1例に実施した。その結果、本年度4例の原病死を確認した（表1）。昨年度1例の原病死を確認していることから、試験開始からは5例の原病死を認めている。また追跡調査により試験開始からこれまでに、PRと評価された1例およびSDと評価された6例中4例で病勢の進行を確認している。
- 3) 本年度プロトコル治療が実施され、これまでに評価可能であった8症例におけるRECISTを用いた臨床効果につ

いては、完全奏功（CR）および部分奏功（PR）はともに認めず、安定（SD）は2例、進行（PD）は6例であった。試験開始からこれまでの合計として、PR 1例、SD 6例、PD 9例となった（表1）。

#### D. 考察

- 1) 治療期間終了後の最長1年半の追跡調査の結果から、これまでに登録された症例において5例の原病死を確認しており、治療開始時よりの生存期間として11.6ヶ月、9.0ヶ月、11.5ヶ月、10.4ヶ月、9.5ヶ月であった。また治療終了時にPRおよびSDと評価された症例に対する追跡調査で確認した無増悪生存期間は、6.2ヶ月、3.0ヶ月、4.9ヶ月、6.8ヶ月、5.2ヶ月であった。進行・再発非小細胞肺癌の予後の厳しさを考えると、今後益々原病悪化および原病死を迎える症例が増加することが予想される。これまでのところ全症例で追跡調査が可能であり、予後の把握が出来ているが、今後もプロトコルに規定した追跡調査を確実に実施していくことでデータを蓄積し、全生存期間および無増悪生存期間を明らかとしていく方針である。
- 2) 腫瘍縮小効果に関しては、昨年度登録の1例でPRを認め、1例で一部の病変に縮小効果を認めたが、本年度登録し評価可能であった8症例においては、SDが2例、PDが6例であった。これ

までの先行試験ではPRを確認できた症例は認めておらず、腫瘍縮小効果が得られる症例は少ないことが予想されるが、今後も画像評価を確実に実施し、生存期間と併せて腫瘍縮小効果の意義を検討していく予定である。

- 3) 本年度本治療プロトコルに登録された患者は腺癌8例、扁平上皮癌2例であり、昨年 study off となった大細胞癌症例は認めなかった。大細胞癌は腺癌や扁平上皮癌に比較すると症例の絶対数は少ないものの、癌の進行が極めて早い症例が多いことが特徴である。大細胞癌の一部の症例では小細胞癌と同様の生物学的特徴を有することが明らかとなっていることから、本アプローチの適応とはならない可能性があり、今後適格基準を検討する症例の中で、大細胞癌症例に対しては、腫瘍倍加速度や前治療に対する反応など病勢に充分注意して登録の適否を行うなど、慎重な検討をしていく必要があると思われる。

#### E. 結論

本臨床研究におけるプロトコル治療を予定通りに実施し、プロトコルに沿った追跡調査を実施した。追跡調査により原病死が確認された症例では全生存期間が明らかとなってきている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Guo F, Hiroshima K, Wu D, Satoh M, Abulazi M, Nomura F, Yoshino I, Tomonaga T, Nakatani Y. Prohibitin and its rapidly emerging role as a biomarker of systemic malignancies-Reply. *Hum Pathol.* 2013; 44(4): 679-80
2. Ohba, T., Wada, H., Yoshino, I., Yoshida, S., Tagawa, T., Shoji, F., Yamazaki, K., and Maehara, Y. Increase of bone morphogenetic protein-7 expressing pulmonary resident cells in pneumonectomized rats. *Surg Today.* 2014;44(2)324-331
3. Sakurai H, Asamura H, Miyaoka E, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Okumura M, Yokoi K; for the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Differences in the prognosis of resected lung adenocarcinoma according to the histological subtype: a retrospective analysis of Japanese lung cancer registry data. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45(1):100-7
4. Nakajima T, Yasufuku K, Saegusa F, Fujiwara T, Sakairi Y, Hiroshima K, Nakatani Y, Yoshino I. Rapid on-site cytologic evaluation during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for nodal staging in patients with lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2013; 95(5): 1695-9
5. Iida T, Nomori H, Shiba M, Nakajima J, Okumura S, Horio H, Matsuguma H, Ikeda N, Yoshino I, Ozeki Y, Takagi K, Goya T, Kawamura M, Hamada C, Kobayashi K; Metastatic Lung Tumor Study Group of Japan. Prognostic factors after pulmonary metastasectomy for colorectal cancer and rationale for determining surgical indications: a retrospective analysis. *Ann Surg.* 2013; 257(6): 1059-64
6. Sakairi Y, Hoshino H, Fujiwara T, Nakajima T, Yasufuku K, Yoshida S, Yoshino I. Validation of EBUS-TBNA-integrated nodal staging in potentially node-positive non-small cell lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 61(9):522-7
7. Watanabe SI, Asamura H, Miyaoka E, Okumura M, Yoshino I, Fujii Y, Nakanishi Y, Eguchi K, Mori M, Sawabata N, Yokoi K; for the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Results of T4 Surgical Cases in the Japanese Lung Cancer Registry Study: Should Mediastinal Fat Tissue Invasion Really be Included in the T4 Category? *J Thorac Oncol.* 2013; 8(6): 759-765
8. Kometani T, Okamoto T, Yoshida S, Yoshino I. Acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 61(9):504-12
9. Nakajima T, Yasufuku K, Yoshino I. Current status and perspective of EBUS-TBNA. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 61(7): 390-6
10. Mizobuchi T, Chen F, Yoshino I, Iwata T, Yoshida S, Bando T, Date H. Radiologic evaluation for volume and weight of remnant lung in living lung donors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 146(5): 1253-8
11. Yasufuku K, Nakajima T, Waddell T, Keshavjee S, Yoshino I. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration for Differentiating N0 Versus N1 Lung Cancer. *Ann Thorac Surg.* 2013; 96(5):1756-60
12. Mizobuchi T, Wada H, Sakairi Y, Suzuki H, Nakajima T, Tagawa T, Iwata T, Motoori K, Yoshida S, Yoshino I. Spirometric and radiological evaluation of the remnant lung long after major pulmonary resection: can compensatory phenomena be recognized in

- clinical cases? *Surg Today*. in press
2. 学会発表
    1. 吉野一郎. 肺癌外科の現状と展望 第113回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2013年4月12日
    2. 吉野一郎. 日本人肺癌の術後補助化学療法にプラチナは必要か? 第30回日本呼吸器外科学会, 名古屋, 2013年5月9-10日
    3. 吉野一郎. 非小細胞肺癌術後アジュバント治療における TS1 vs.CDDP+TS1の無作為化第II相臨床試験 WJOG4107 第30回日本呼吸器外科学会, 名古屋, 2013年5月9-10日
    4. 田中朝志, 牧野茂義, 高橋孝喜, 勝俣範之, 吉野一郎, 桑野博行, 前原喜彦, 西山正彦. がん化学療法に伴う貧血(CIA)に関する全国調査結果 第61回日本輸血・細胞治療学会, 横浜, 2013年5月17日
    5. 吉野一郎. がん化学療法にともなう貧血(CIA)に対する対策:本邦における現状と問題点 第61回日本輸血・細胞治療学会, 横浜, 2013年5月17日
    6. 吉野一郎. Lung cancer surgery Patient selection & spectrum of surgical procedures 3rd World Congress of Thoracic Imaging, ソウル, 2013年6月10-11日
    7. 吉野一郎. 長微量検体による肺癌術前遺伝子プロファイル検索システムの構築 第36回日本呼吸器内視鏡学会学術集会, 大宮, 2013年6月20日
    8. 吉野一郎. 間質性肺炎合併肺癌の外科治療 第5回福島県肺癌研究会, 郡山, 2013年7月6日
    9. 吉野一郎. 肺癌治療における Evidence-Based Surgery と Rationale-based Surgery: - リンパ節郭清を中心に 岡山呼吸器外科カンファレンス, 岡山, 2013年8月31日
    10. 吉野一郎. 肺癌根治術としての Sublobar resection と論点(講義)
  - Learning Expertise in Thoracic Surgery 2013, 東京, 2013年9月21日
  11. Inoue M, Yoshino I (Co Author). Clinicopathological characteristics and surgical results of lung cancer patients aged up to 50 years; The Japanese lung cancer registry study 2004 International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
  12. Okumura M, Yoshino I (Co Author). Outcome of surgical treatment for thymic epithelial tumors based on the nationwide retrospective database of 3033 patients in Japan International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
  13. Nakagawa Y, Yoshino I (Co Author). Analysis of lymphatic metastases of thymic epithelial tumor on Japanese database International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
  14. Sekine Y, Yoshino I (Co Author). The impact of combined pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease on long term survival after lung cancer surgery. International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
  15. Kometani T, Yoshino I (Co Author). A pilot study on the effects of perioperative administration of the neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, to Non Small Lung Cancer patients with Preoperative risk factors of acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
  16. Sawabata N, Yoshino I (Co Author). Japanese nation wide lung cancer registries conducted by the Japanese joint committee of lung cancer registry

- (JJCLCR) International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
17. Tada H, Yoshino I (Co Author). Update data of biomarker analysis of WJOG4107(A randomized phase II trial of adjuvant chemotherapy with S-1 versus CDDP+S-1 for resected stage II-III A Non-small cell lung cancer (NSCLC) International Association for the Study of Lung Cancer, シドニー, 2013年10月27-30日
18. 尹貴正、岩田剛和、佐田諭己、椎名裕樹、山本高義、鎌田稔子、森本淳一、中島崇裕、鈴木秀海、田川哲三、溝淵輝明、吉田成利、吉野一郎. 長期生存を得た肺癌肺転移の一例 第163回日本胸部外科学会関東甲信越地方会, 東京, 2013年11月2日
19. 吉野一郎、坂入祐一、中島崇裕、鈴木秀海、岩田剛和、田川哲三、溝淵輝明、吉田成利. 肺癌進展形式に Segmental Compartment concept は成立するか? 第54回日本肺癌学会総会, 東京, 2013年11月21-22日
20. 中島崇裕、坂入祐一、稲毛輝長、山本高義、森本淳一、鎌田稔子、尹貴正、鈴木秀海、田川敬三、岩田剛和、溝淵輝明、吉田成利、吉野一郎. 分子標的治療時代における EBUS-TBNA 検体を用いたバイオマーカー診断 第54回日本肺癌学会総会, 東京, 2013年11月21-22日
21. 溝淵輝明、山本直敬、中嶋美緒、馬場雅行、鎌田正、藤澤武彦、吉田成利、吉野一郎. 炭素線治療後局所再発に対するサルベージ手術例の検討 第54回日本肺癌学会総会, 東京, 2013年11月21-22日
22. 岩田剛和、吉田成利、星野英久、椎名裕樹、稲毛輝長、山本高義、尹貴正、鎌田稔子、森本淳一、坂入祐一、鈴木秀海、中島崇裕、田川哲三、溝淵輝明、

中谷行雄、吉野一郎. NBI 併用拡大観察用胸腔鏡を用いた肺癌胸膜浸潤の術中診断 第54回日本肺癌学会総会, 東京, 2013年11月21-22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 臨床結果

症例	効果判定	観察・追跡期間	転帰
1	SD	11.6ヶ月	原病死
2	PD	9.0ヶ月	原病死
3	PR	21.4ヶ月	生存
4	SD	11.5ヶ月	原病死
5	SD	14.7ヶ月	生存
6	SD	10.4ヶ月	原病死
7	PD	14.0ヶ月	生存
8	PD	9.5ヶ月	原病死
9	PD	9.2ヶ月	生存
10	PD	9.0ヶ月	生存
11	PD	9.3ヶ月	生存
12	SD	2.8ヶ月	生存
13	SD	3.9ヶ月	生存
14	PD	2.6ヶ月	生存
15	PD	5.2ヶ月	生存
16	PD	2.6ヶ月	生存



## 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

研究分担者：中山 俊憲	千葉大学大学院医学研究院 免疫発生学	教授
研究協力者：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
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

### 研究要旨

$\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与に関する第 Ⅲ 相臨床研究を施行するために調製された、患者自己末梢血単核球由来 $\alpha$ Galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer) パルス樹状細胞の表面上に発現する抗原分子の検討を行った。従来の樹状細胞マーカーとされる HLA-DR、CD11c、CD86 に加え、樹状細胞誘導により発現が低下する CD14 の発現率を検討したところ、各表面マーカーは症例間で発現率に差は認められたものの、各症例ともに各投与細胞間で比較的安定した発現を示すとともに、CD14 分子の発現低下を認めた。また、治療前後の患者末梢血 NKT 細胞、NK 細胞の増加率を算出したところ、それぞれ 16 例中 5 例および 10 例で有意な増加を認めた。さらに $\alpha$ GalCer 特異的インターフェロン 産生細胞能の検討を 14 例で行い、7 例で治療後の産生細胞数の増加を検出した。これらの免疫パラメーターが主要評価項目である生存期間とどのように相関するか、今後の追跡調査の結果と合わせて引き続き検討を加える必要がある。

### A. 研究目的

アフエレーシスによって採取された末梢血より誘導し、NKT 細胞特異的リガンドである $\alpha$ Galactosylceramide( $\alpha$ GalCer) をパルスし提示させた樹状細胞は *in vivo* で NKT 細胞を認識し、活性化することが期待される。患者末梢血より誘導した樹状細胞について、表面抗原マーカーを中心とした質的評価を行い、免疫細胞療法における臨床効果との関係を検討する。また、この治療用免疫細胞である $\alpha$ GalCer パルス

樹状細胞の作用機序として、体内で NKT 細胞を活性化することによって抗腫瘍効果に役割を果たす他の免疫細胞も活性化することが考えられていることから、細胞投与と臨床効果との因果関係を証明するには、*in vivo* における免疫反応を客観的に評価する必要がある。そこで治療期間中に採取した患者末梢血単核球を用いて *in vivo* での NKT 細胞特異的な免疫反応を解析した。

## B. 研究方法

### 1) 投与細胞の免疫モニタリング

患者末梢血単核球より誘導した樹状細胞分画を含んだ培養細胞集団を用いることで、効率良く NKT 細胞を活性化できることはすでに示されており、樹状細胞の特徴となる基本的な表面抗原に関する発現検討がなされてきている。しかし培養細胞の発現する抗原分子の中で効果予測可能となりうるマーカーが存在しないことから、表面抗原発現として、樹状細胞の代表的なマーカーである HLA-DR、CD11c、CD86 の発現をフローサイトメトリー法にて検討した。さらに末梢血単球での強い発現を認め、樹状細胞への誘導にて発現が著しく低下することが知られている CD14 分子の細胞表面発現割合の検討を行い、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。

### 2) 治療前後の末梢血単核球モニタリング

$\alpha$ GalCer パルス樹状細胞投与による生体内での反応を確認するため、末梢血単核球中における NKT 細胞および NKT 細胞活性化にて2次的な活性化が期待される NK 細胞について、フローサイトメトリー法にて検討した。NKT 細胞は CD3 陽性、 $V\alpha 24$  抗原受容体陽性、 $V\beta 11$  抗原受容体陽性細胞と定義し、NK 細胞は CD3 陰性かつ CD56 陽性と定義した。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 細胞数を算出した。治療開始時の NKT 細胞数、NK 細胞数を基準として、治療介入後の NKT 細胞数、NK 細胞数の増加割合とその中での最大増加割合を求め、臨床効果との比較を行った。さらに凍結保存した末梢血単核球を用いて、*in vitro* で  $\alpha$ GalCer によって再刺激した際の  $\alpha$ GalCer 特異的インターフェロン ( $IFN-\gamma$ ) 産生細胞数を、ELISPOT 法を用いて各症例ごとに同時に測定した。この assay 系における  $IFN-\gamma$  産生細胞は、活性化した NKT 細胞のみならず、NKT 細胞の発揮する免疫増強効果によって活性化した NK 細胞の一部も寄与することが判明している。

(倫理面への配慮)

本研究は免疫モニタリングとして臨床研究に含まれる研究であり、臨床研究全体として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。全ての被験者に対して文書による説明と同意を得ている。用いた検体は全て匿名化されており、個人情報の管理にも十分配慮をして研究を実施している。

## C. 研究結果

### 1) 投与細胞の免疫モニタリング

成分採血にて得られた末梢血単核球より誘導し、治療に用いた培養細胞投与群における、HLA-DR、CD11c、

CD86 および CD14 分子の細胞表面発現割合を検討すると、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 回の投与細胞で比較的安定した発現を示した (表 1)。特に NKT 細胞と樹状細胞の相互作用に重要な CD86 分子の発現は各症例とも高い割合で発現を認めている。これまでに投与された培養細胞全体の各マーカーの平均発現率は、HLA-DR が 64.5%、CD11c が 23.2%、CD86 が 78.8%、CD14 は 1.3%であった。

## 2) 治療前後の末梢血単核球モニタリング

治療開始時と比較し、全コースを通じて NKT 細胞数が 1.5 倍以上の増加を認めたのは 16 例中 5 例であり、NK 細胞が 1.5 倍以上増加を認めたのは 10 例であった (表 2)。さらに各コース開始時点を基準として、NKT 細胞数の増減を解析してみると、1 コースまたは 2 コース開始時から増加を認めた症例は、16 例中 9 例であった。

NKT 細胞の機能解析のための末梢血単核球中の  $\alpha$ GalCer 反応性 IFN- $\gamma$  産生細胞数の検討を 14 例で行い、治療開始時と比較し 7 例で治療経過中に 2 倍以上の明らかな増加を認めた (表 2)。IFN- $\gamma$  産生細胞数が増加を認めた 7 例における腫瘍縮小効果は、partial response (PR) 1 名、stable disease (SD) 3 名、progressive disease (PD) 4 名である一方、増加を認めなかった症例における腫瘍縮小効果は SD 3 名、

PD 5 名であった。今後、 $\alpha$ GalCer 反応性 IFN- $\gamma$  産生細胞数と全生存期間との関連について、追跡調査によって全生存期間を確定させた後に検討を行う。

## 3) 樹状細胞上の表面抗原発現率と NKT 細胞特異的免疫反応の関連性の検討

樹状細胞の表面抗原発現と末梢血 NKT 細胞の増加の関係を検討するために、末梢血 NKT 細胞が開始時より増加した症例群 (症例 6, 8, 9, 12, 13) とそれ以外の症例群における、樹状細胞上の表面抗原発現率を比較してみると、HLA-DR (増加群 73.4%、非増加群 60.9%)、CD11c (増加群 20.1%、非増加群 24.3%)、CD86 (増加群 79.9%、非増加群 78.4%)、CD14 (増加群 1.5%、非増加群 1.1%) と HLA-DR 発現が NKT 細胞上昇群で高い傾向にあったが、他の表面マーカーには差を認めなかった。

一方、樹状細胞の表面抗原発現が  $\alpha$ GalCer 反応性 IFN- $\gamma$  産生細胞数に及ぼす影響を検討すると、IFN- $\gamma$  産生細胞増加群と非増加群における表面マーカーの発現割合を検討すると、HLA-DR 発現は増加群 65.6%、非増加群 61.5%、CD11c 発現割合は増加群 25.4%、非増加群 20.6%、CD86 発現割合は増加群 78.3%、非増加群 80.4%、CD14 発現割合は増加群 1.1%、非増加群 1.2%であり、2 群間に差は認められなかった。今後症例を重ねて検討するとともに、主要評価項目である全生存

期間のデータ確定を得てさらに検討を行う予定である。

#### D. 考察

樹状細胞のモニタリングとして、樹状細胞の代表的な表面マーカーである HLA-DR と CD11c、CD86 分子および樹状細胞の誘導により発現が著しく低下もしくは消失する CD14 分子による評価を行い、特に樹状細胞と NKT 細胞の相互作用に必要で、樹状細胞の成熟化や NKT 細胞の活性化とサイトカイン産生に重要な働きをする CD86 分子が安定して高発現していることが明らかとなった。また単球で高発現する表面マーカーである CD14 分子は低下もしくはほぼ消失しており、単球から樹状細胞への誘導が問題無くなされていることが確認された。NKT 細胞の活性化の指標から樹状細胞の機能を検討すると、NKT 細胞の増加が認められた症例群で投与された樹状細胞の HLA-DR 発現が高い傾向にあることが示唆されていることから、樹状細胞誘導に重要なマーカー候補になる可能性が考えられる。しかしこれまでの 16 例の検討では発現率の差（12.5%）が大きくないことから、今後も症例を追加しデータを蓄積していくことで、HLA-DR 分子の発現の意義を明らかとしていく。

治療前後での末梢血単核球を用いた免疫モニタリングは、全身的な NKT 細胞特異的免疫反応の誘導を示し、これらの免疫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ることが期待されている。今回の免疫モニタリングとして、NKT 細胞、NK 細胞数といった単純な数の変化に加えて、NKT 細胞の機能変化として、 $\alpha$ GalCer 反応性 IFN- $\gamma$ 産生細胞数の検討を行った。 $\alpha$ GalCer 反応性 IFN- $\gamma$ 産生細胞数の検討が終了した 14 例中、7 例で 2 倍以上の IFN- $\gamma$ 産生細胞数の増加を認め、臨床効果 PR の 1 例および SD の 2 例で、 $\alpha$ GalCer 反応性 IFN- $\gamma$ 産生細胞数の増加を認めている。現時点では臨床効果との関連は明らかでは無いが、今後全生存期間との関連が最も重要となることから、今後の予後追跡調査から得られる全生存期間の確定を行って、免疫反応データとの関連を検討していく。またこれらの治療経過に沿って得られる免疫バイオマーカーに加えて、治療前に得られている免疫モニタリングのデータが、治療効果の予測を可能とするバイオマーカーとなりうるか、検討を進めていく予定である。

#### E. 結論

樹状細胞の表面抗原は、細胞調製にて比較的安定した発現を示し、HLA-DR の発現が重要な可能性が示唆された。また  $\alpha$ GalCer 特異的インターフェロン産生細胞能の増強症例では、良好な臨床効果が得られる可能性があり、今後主要評価項目である生存期間とどのように関連するか検討を加えていく。

#### F. 研究発表

## 1. 論文発表

1. Onodera, A., Tumes, D. J., and Nakayama, T.: Too much of a good thing. *Nat. Immunol.* 2013; 14(2): 112-114
2. Mucida, D., Husain, M. M., Muroi, S., van Wijk, F., Shinnakasu, R., Naoe, Y., Reis, B. S., Huang, Y., Lambolez, F., Docherty, M., Attinger, A., Shui, J. -W., Kim, G., Lena, J. C., Sakaguchi, S., Miyamoto, C., Wang, P., Atarashi, K., Park, Y., Nakayama, T., Honda, K., Ellmeier, W., Kronenberg, M., Taniuchi, I., and Cheroutre, H.: Transcriptional reprogramming of mature CD4<sup>+</sup> helper T cells generates distinct MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2013; 14(3): 281-289
3. Hosokawa, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Endo, Y., Onodera, A., Tumes, D. J., Kanai, A., Sugano, S., and Nakayama, T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 2013; 110(12): 4691-4696
4. Suzuki, J., Kuwahara, M., Tofukuji, S., Imamura, M., Kato, F., Nakayama, T., Ohara, O., and Yamashita, M.: A novel small compound SH-2251 suppresses Th2 cell-dependent airway inflammation through selective modulation of chromatin status at the *Il5* gene locus. *PLOS ONE.* 2013; 8(4): e61785.
5. Jabara, H. H., Ohsumi, T., Chou, J., Massaad, M. J., Benson, H., Megarbane, A., Chouery, E., Mikhael, R., Gorka, O., Gewies, A., Portales, P., Nakayama, T., Hosokawa, H., Revy, P., Herrod, H., Le Deist, F., Lefranc, G., Ruland, J., and Geha, R. S.: A homozygous mucosa-associated lymphoid tissue 1 (*MALTI*) mutation in a family with combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132(1): 151-158
6. Hasegawa, A., Iwamura, C., Kitajima, M., Hashimoto, K., Otsuyama, K., Ogino, H., Nakayama, T., and Shirai, M.: Crucial role for CD69 in the pathogenesis of dextran sulphate sodium-induced colitis. *PLOS ONE.* 2013; 8(6): e65494.
7. Yamashita, J., Iwamura, C., Ito, T., Narita, M., Hara, Y., Sasaki, T., Masuda, D., Takahashi, M., Tsuchiya, M., Hada, K., Ishikawa, M., Matsuo, T., Ohno, Y., Tanaka, H., Maruyama, H., Ogawa, Y., and Nakayama, T.: Paraoxonase-1 suppresses experimental colitis via the inhibition of IFN- $\gamma$  production from CD4 T cells. *J. Immunol.* 2013; 191(2): 949-960
8. Sasaki, T., Onodera, A., Hosokawa, H., Watanabe, Y., Horiuchi, S., Yamashita, J., Tanaka, H., Ogawa, Y., Suzuki, Y., and Nakayama, T.: Genomic-wide gene expression profiling revealed a critical role for GATA3 in the maintenance of the Th2 cell identity. *PLOS ONE.* 2013; 8(6): e66468.
9. 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  $\alpha$ -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 62:179-188
10. Hanazawa, A., Hayashizaki, K., Shinoda, K., Yagita, H., Okumura, K., Löhning, M., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Eckes, B., Radbruch, A., Tokoyoda, K., and Nakayama, T.: CD49b-dependent establishment of T helper cell memory.

- Immunol. Cell Biol.* 2013; 91:524-531
11. Nagao, T., Kusunoki, R., Iwamura, C., Kobayashi, S., Yumura, W., Kameoka, Y., Nakayama, T., and Suzuki, K.: Correlation of Interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 concentrations with crescent formation and myeloperoxidase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibody titer in SCG/Kj mice by treatment with anti-interleukin-6 receptor antibody or mizoribine. *Microbiol. Immunol.* 2013; 57(9): 640-650
  12. Suzuki, K., Suzuki, K., Nagao, T., and Nakayama, T.: Proposal of anti-moesin as a novel biomarker for ANCA-associated vasculitis. *Clin. Exp. Nephrol.* 2013; 17(5): 638-641
  13. 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): 18626-18631
  14. 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<sup>+</sup> T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 2013; 39(5): 819-832
  15. Nakamura, T., Fukiage, M., Higuchi, M., Nakaya, A., Yano, I., Miyazaki, J., Nishiyama, H., Akaza, H., Ito, T., Hosokawa, H., Nakayama, T., and Harashima, H.: Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *J. Control. Release.* 2013; 176:44-53
  16. 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. 学会発表
1. Nakayama, T. Generation and maintenance of pathogenic memory CD4 T cells. AAI Annual Meeting, Honolulu Hawaii, 5/3-7/2013
  2. 中山俊憲 Th2 細胞の分化維持機構におけるエピジェネティクスの役割 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜 2013 年 5 月 11-12 日
  3. 米倉修二、櫻井大樹、稲嶺絢子、中山俊憲、岡本美孝 スギ花粉症に対する抗原特異的免疫療法 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜 2013 年 5 月 11-12 日
  4. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. Department of Immunology Special Seminar, Toronto Canada, 6/12/2013
  5. Nakayama, T. iNKT Cell-Based Immunotherapy for Cancer. Keck School of Medicine of USC Research Seminar Series, Los Angeles USA, 6/14/2013
  6. 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
  7. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. RCAI International Summer Program 2013, Yokohama, 6/21-26/2013
  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、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, 山口, 2013年7月3-5日
10. 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
  11. Nakayama, T. Generation and maintenance of memory CD4 T cells. 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference, Greece, 9/8-13/2013
  12. Shinoda, K., and Nakayama, T. CD69 regulates the formation of resting T helper memory. 7th International Leukocyte Signal Transduction Conference, Greece, 9/8-13/2013
  13. 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, France, 9/13-17/2013
  14. 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, 2013年10月16-19日
  15. 中山俊憲 T細胞免疫記憶とアレルギー性気道炎症制御 第25回多摩アレルギー懇話会, 新宿, 2013年10月18日
  16. 中山俊憲 免疫記憶 CD4T細胞による慢性気道炎症制御 平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会 感染・免疫・炎症・発癌, 札幌, 2013年10月25日
  17. 中山俊憲 免疫記憶とアレルギー性気道炎症制御 第2回えひめ骨と免疫学セミナー, 愛媛, 2013年11月21日
  18. Nakayama, T., Iwamura, C., Shinoda, K., and Endo, Y. Pathogenic memory Th2 cells in the airway and regulation by activated NKT cells in vivo. 第36回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013年11月28-30日
  19. Nakayama, T., Endo, Y., Onodera, A., and Tumes, D. J. Generation and maintenance of pathogenic memory CD4 T cells. The 3rd CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology, Korea, 12/1-3/2013
  20. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月3-6日
  21. Nakayama, T. Generation and maintenance of CD4 T cell memory. Germany-Japan Immunology Seminar 2013 in Shizuoka - Challenge in Immunology for Opening the Door to the Understanding of Human System and Disease -, Shizuoka, 12/5-9/2013
  22. Nakayama, T. Effector and Memory CD4 T cells. Overview Talk 第42回日本免疫学会総会学術集会, 幕張, 2013年12月11-13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 投与細胞中の樹状細胞関連表面抗原発現割合**

症例	HLA-DR	CD11c	CD86	CD14
1	50.4 ± 13.2	33.2 ± 15.9	70.0 ± 6.4	2.2 ± 2.0
2	49.1 ± 7.7	29.2 ± 9.4	81.7 ± 12.1	0.7 ± 0.4
3	21.9 ± 12.7	44.1 ± 13.9	65.6 ± 19.3	0.6 ± 0.6
4	46.8 ± 10.7	32.4 ± 9.1	72.7 ± 15.5	2.4 ± 1.0
5	42.5 ± 19.3	7.7 ± 2.1	90.2 ± 5.7	1.0 ± 0.2
6	64.7 ± 17.6	28.6 ± 9.3	88.2 ± 11.0	1.6 ± 0.9
7	69.7 ± 1.7	12.5 ± 3.8	77.1 ± 9.8	0.6 ± 0.1
8	66.8 ± 13.3	36.3 ± 13.9	69.2 ± 19.9	0.8 ± 0.1
9	59.4 ± 9.7	15.0 ± 8.2	66.6 ± 3.2	0.6 ± 0.2
10	81.9 ± 7.0	13.6 ± 3.3	82.3 ± 5.9	0.3 ± 0.9
11	80.4 ± 9.5	22.8 ± 4.0	79.0 ± 17.3	0.7 ± 0.3
12	84.9 ± 4.9	15.2 ± 4.6	86.0 ± 7.4	1.0 ± 0.9
13	84.7 ± 4.6	12.4 ± 2.3	80.7 ± 10.2	1.1 ± 0.2
14	91.9 ± 3.9	28.9 ± 8.2	90.8 ± 7.2	1.0 ± 0.5
15	51.1 ± 10.8	27.9 ± 7.1	66.3 ± 15.7	3.3 ± 2.5
16	85.9 ± 5.7	15.3 ± 4.2	87.0 ± 6.4	1.3 ± 0.4

**表2 臨床効果およびNKT細胞特異的免疫反応**

症例	臨床効果	NKT細胞数増加	NK細胞数増加	IFN- $\gamma$ 産生細胞数増加
1	SD	1.0	1.1	2.3
2	PD	0.3	3.7	1.9
3	PR	1.4	3.0	5.9
4	SD	0.9	1.1	0.8
5	SD	0.3	1.2	1.5
6	SD	3.5	1.1	4.4
7	PD	1.0	2.2	6.5
8	PD	1.6	1.4	1.2
9	PD	3.5	1.5	4.6
10	PD	1.4	1.6	2.1
11	PD	0.4	1.2	1.7
12	SD	5.1	2.0	1.4
13	SD	4.0	2.1	1.8
14	PD	0.4	1.7	2.1
15	PD	0.4	1.8	n.d.
16	PD	0.5	1.5	n.d.

SD: stable disease, PD: progressive disease, PR: partial response, n.d.: not done



**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**

研究分担者：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：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

**研究要旨**

千葉大学医学部附属病院未来開拓センターで実施される細胞治療の試験の管理・推進を ICH-GCP 基準として実施する必要がある。このため、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。

**A. 研究目的**

本研究では、試験の適切な遂行を目的として、ICH-GCP 基準の臨床試験実施体制の整備を行い、さらに、これに基づく試験を展開することを目的とする

**B. 研究方法**

本研究においては、昨年につき、以下の検討を行った。

- (1) 試験の実施体制の整備と実施
- (2) モニタリング体制の整備と実施
- (3) 監査体制の整備と実施
- (4) データマネジメントの整備と実施

**C. 研究結果**

検討結果は以下の通り

- (1) 臨床試験の実施においては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(今年度は計 12 回開催)。また、本試験に関与する多くのスタッフの連携を図ることも調整会議およびプロジェクトを管理するスタッフの重要な役目である(資料 1)。

- (2) 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。
- (3) 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)。
- (4) 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クリニカルデータマネジメントシステム(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。

システムは、DATATRAK 社の DATATRAK ONE を採用した。システム構築に際して、CDISC による CDASH 及び SDTM 標準の概念を採用し、ベンダーによる構築トレーニングを受けた構築専門スタッフにより、SOP (標準業務手順書) に沿って構築及びコンピュータ・システム・バリデーション (CSV) を行った。

また、それらの業務に加えて、症例登録業務を実施している。症例登録業務においては、被験者の適格性を第三者の立場から確認する作業を SOP に沿って実施している。

データマネジメント業務においては、SOP 及び DM 計画書に定める業務手順に沿って、症例報告書管理、データ入力 (ダブルデータエントリー)、データクリーニングを中心に現在、業務を遂行している。CRF 作成からデータ固定までに発生する一連の作業手順を確立させ、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

本研究において以下の考察を行った。

- (1) 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。

- (2) 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。
- (3) 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。内部・外部委託含め、本研究において今後効果的な方法を確認していく必要があると考えられる。
- (4) 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

本研究では千葉大学医学部附属病院未来開拓センターで実施される NKT 細胞を用いた免疫細胞治療 (Chiba-NKT) の試験を ICH-GCP 基準として実施するための体制整備を行い、これを実行した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

## G. 知的財産権の出願・登録情報

### 1. 特許取得

なし

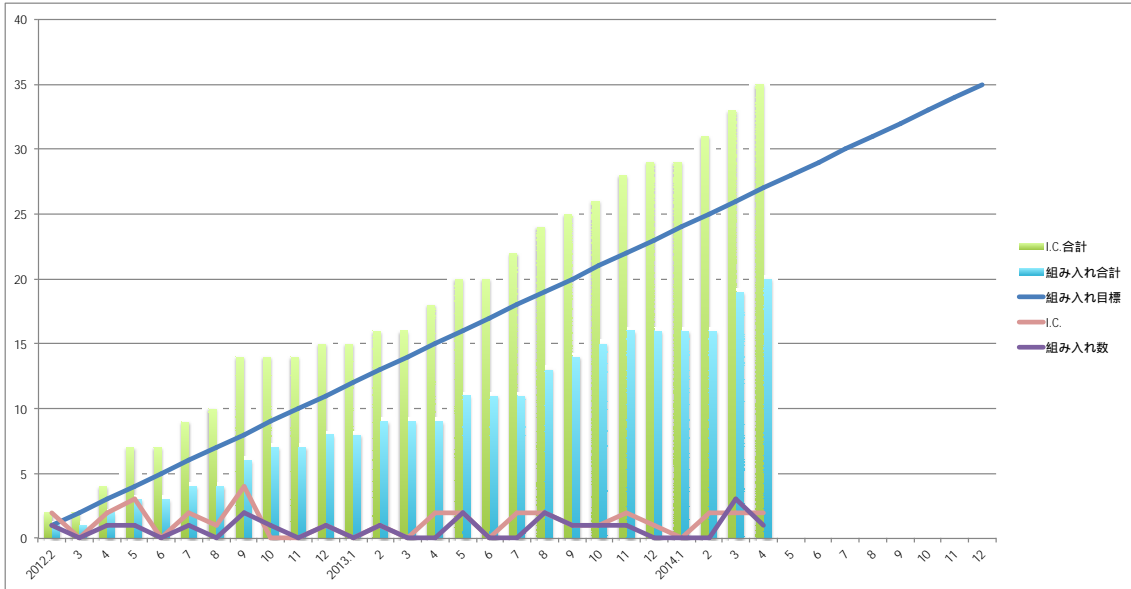
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

資料 1



## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	4	409	2013
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	110	18626-18631	2013
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 <sup>+</sup> T helper type-1 and type-2 cells.	Immunity	39	819-832	2013
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 $\alpha$ -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice.	J. Mol. Cell. Cardiol.	62	179-188	2013