

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

. 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 -----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

. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----41

. 研究成果の刊行物・別刷 -----43

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 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実験研究を行い、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 3 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 ($\text{IFN-}\gamma$) 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に考えている。
- 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覚症状の増悪は無かった。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（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., Inuma, 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., Shimosato, 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., Inuma, 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

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

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 コースのプロトコー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、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実用化研究を行っている。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 ($\text{IFN-}\gamma$) 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 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)。

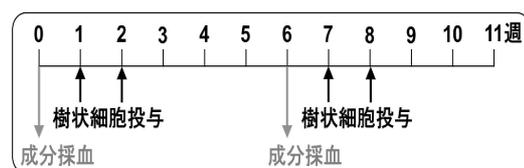


図1 臨床研究スケジュール

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 m² 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、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い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無かった。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			
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		

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 例でプロトコール完遂、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ールに沿って追跡調査を行う。プロトコール治療の終了した 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者数は増加の一途を辿ってお

り、それにともな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 Ⅰ 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め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

して、本年度は試験終了後 6 ヶ月の初回の追跡調査を 13 例に、2 回目の 12 ヶ月目の追跡調査を 8 例に、18 ヶ月目の 3 回目の追跡調査を 2 例に行い、予後を確認した（表 1）。2 年間の追跡期間の最終回にあたる 4 回目の追跡調査が可能であったのは、これまでに 1 例のみであった。

これまでの追跡調査の結果、本年度 4 例の原病死を確認し、試験開始から 11 例の原病死を確認している。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 13 例中 8 例で、病勢の進行を確認している。

- 3) プロトコール治療が実施され、これまでに評価可能であった 31 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）は認めず、部分奏功（PR）は 1 例、安定（SD）は 13 例、進行（PD）は 17 例であった（表 1）。

D. 考察

- 1) 治療期間終了後、最長 2 年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 11 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、19.7 ヶ月、10.4 ヶ月、14.9 ヶ月、9.5 ヶ月、12.2 ヶ月、14.4 ヶ月、12.3 ヶ月、9.7 ヶ月であった。この中で、予後が不良（9.5 ヶ月、9.7 ヶ月）であった 2 症例は、試験途中で増悪となり中止とした

症例である。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されている無増悪生存期間は、3.0 ヶ月、6.2 ヶ月、4.9 ヶ月、6.8 ヶ月、5.2 ヶ月、6.8 ヶ月、8.3 ヶ月、7.8 ヶ月であった。進行・再発非小細胞肺癌の予後は大変厳しく、今後も原病悪化および原病死が確認される症例が増加することが予想されるため、プロトコールに規定した追跡調査を確実に実施していくことが重要である。これまでのところ全症例での追跡調査により予後の把握が出来ていることから、これらの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、これまでに 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 15 症例においては、SD が 7 例、PD が 8 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、今回 PR が得られた症例は 2 年間の追跡調査にて生存が確認され、長期予後が得られている。残りの症例において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) これまでに本治療プロトコールに登録された症例における臨床病期としては、局所進行期である IIIB 期が 6 例、遠隔

転移を有する IV 期が 21 例、完全切除後の術後再発が 6 例であった。組織型としては、腺癌 24 例、扁平上皮癌 7 例、大細胞癌などその他 2 例であった。腺癌の中では、Epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子変異を認めた症例は 4 例のみであり、症例全体の 12.1%、腺癌症例の 16.7%と少数に留まっていた。また EGFR-tyrosine kinase inhibitor (TKI) が登録前に未使用であり、臨床研究終了後に EGFR-TKI が使用可能であった症例は 1 例のみであった。癌の進行が極めて早い症例が多いことから、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慎重に登録の適否を行う必要があると思われる大細胞癌の症例はこれまで 1 例のみの登録であった。これまでに試験途中で中止となった 3 症例のうち 1 例はこの大細胞癌の症例で、腫瘍増大による疼痛のコントロールが必要となり試験を中止した。試験中止となった別の 1 例は、腫瘍が左肺門部に存在していたために容易に左主気管支以降の気道を圧排・閉塞する可能性があったことから、注意してプロトコール治療を行っていたところ、治療期間中に腫瘍増大を示唆する軽度の気道狭窄音が発生したために、画像的に腫瘍の増大を確認し、試験を中止した。早期に抗癌剤治療を行う目的に入院となったため有害事象報告を行ったが、試験との因果関係は認めず、自覚症

状として重篤と判断される有害事象の発生は認めなかった。一般的に中枢気道の腫瘍性病変はその僅かな増大が症状を引き起こすことから、腫瘍の局在を登録前に十分に把握し、登録時に中枢気道狭窄が存在する症例では、注意深く症状経過観察を行いながらプロトコール治療を行う必要があると考えられた。

E. 結論

本臨床研究における組み入れ予定症例数の 94.3%まで症例登録を完了し、プロトコール治療を実施した。プロトコールに沿った追跡調査を全例で実施し、2 年を越える生存期間が確認された症例とともに、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いる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Uzawa, A., Kawaguchi, N., Kanai, T., Himuro, K., Oda, F., Yoshida, S., Yoshino, I. and Kuwabara, S. Two-year outcome of thymectomy in non-thymomatous late-onset myasthenia gravis. *J Neurol.* in press.
2. Tagawa, T., Suzuki, H., Nakajima, T., Iwata, T., Mizobuchi, T., Yoshida, S. and Yoshino, I. Long-Term Outcomes of Surgery for Thymic Carcinoma: Experience of 25 Cases at a Single Institution. *Thorac Cardiovasc Surg.* in press.
3. Tagawa, T., Morimoto, J., Yoshida, S. and Yoshino, I. Sarcomatous components may

- predict prognosis in patients with pulmonary pleomorphic carcinoma. *Thorac Cardiovasc Surg.* in press.
4. Iwata, T., Yoshida, S., Nagato, K., Nakajima, T., Suzuki, H., Tagawa, T., Mizobuchi, T., Ota, S., Nakatani, Y. and Yoshino, I. Experience with perioperative pirfenidone for lung cancer surgery in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Surg Today.* in press.
 5. Tanaka, K., Suzuki, H., Nakajima, T., Tagawa, T., Iwata, T., Mizobuchi, T., Yoshida, S. and Yoshino I. Recurrent pneumothorax associated with bronchial atresia: report of a case. *Surg Today.* in press.
 6. Yamada, Y., Yoshida, S., Iwata, T., Suzuki, H., Tagawa, T., Mizobuchi, T., Kawaguchi, N. and Yoshino I. Risk Factors for Developing Postthymectomy Myasthenia Gravis in Thymoma Patients. *Ann Thorac Surg.* 99(3):1013-9 (2015)
 7. Wada, H., Hirohashi, K., Nakajima, T., Anayama, T., Kato, T., Grindlay, A., McConnell, J., Yoshino, I. and Yasufuku, K. Assessment of the new thin convex probe endobronchial ultrasound bronchoscope and the dedicated aspiration needle: a preliminary study in the porcine lung. *J Bronchology Interv Pulmonol.* 22(1):20-7 (2015)
 8. Tanaka, A., Yoshino, I., Makino, S., Katsumata, N., Takahashi, K., Kuwano, H., Maehara, Y. and Nishiyama, M. Questionnaire-based survey on chemotherapy-induced anemia. *Int J Clin Oncol.* 19(3):411-20 (2014)
 9. Kameyama, K., Okumura, N., Miyaoka, E., Asamura, H., Yoshino, I., Tada, H., Fujii, Y., Nakanishi, Y., Eguchi, K., Mori, M., Kobayashi, H., Sawabata, N., Okumura, M., Yokoi, K.; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Prognostic value of intraoperative pleural lavage cytology for non-small cell lung cancer: the influence of positive pleural lavage cytology results on T classification. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 148(6): 2659-64 (2014)
 10. 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. *Clin Transl Med.* 3:37 (2014)
 11. Suzuki, T., Tsushima, K., Sakairi, Y., Yoshida, S., Yoshino, I. and Tatsumi, K. Severe tracheobronchial stenosis and bronchiectasis complicating ulcerative colitis. *Respirol Case Rep.* 2(1):48-50 (2014)
 12. Mizobuchi, T., Wada, H., Sakairi, Y., Suzuki, H., Nakajima, T., Tagawa, T., Iwata, T., Motoori, K., Yoshida, S. and 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* 44(9):1735-43 (2014)
 13. Inage, T., Nakajima, T., Yoshida, S. and Yoshino, I. Endobronchial elastography in the evaluation of esophageal invasion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 149(2):576-7 (2014)
 14. Hata, A., Iwata, T., Naito, A., Takahashi, Y., Takiguchi, Y., Nakatani, Y., Yoshida, S. and Yoshino, I. A case of acute respiratory failure due to bronchial rupture of an intrapulmonary cyst. *Emergency Medicine and Health Care* <http://dx.doi.org/10.7243/2052-6229-2-1> (2014)

15. Takei, H., Kondo, H., Miyaoka, E., Asamura, H., Yoshino, I., Date, H., Okumura, M., Tada, H., Fujii, Y., Nakanishi, Y., Eguchi, K., Dosaka-Akita, H., Kobayashi, H., Sawabata, N., Yokoi, K.; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. Surgery for small cell lung cancer: a retrospective analysis of 243 patients from Japanese Lung Cancer Registry in 2004. *J Thorac Oncol.* 9(8):1140-5 (2014)
 16. Sekine, Y., Sakairi, Y., Yoshino, M., Koh, E., Hata, A., Suzuki, H. and Yoshino, I. The impact of combined pulmonary fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease on long-term survival after lung cancer surgery. *Thorac Cardiovasc Surg.* 62(4): 332-7 (2014)
 17. Yamamoto, T., Sakairi, Y., Nakajima, T., Suzuki, H., Tagawa, T., Iwata, T., Mizobuchi, T., Yoshida, S., Nakatani, Y. and Yoshino I. Comparison between endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of postoperative nodal recurrence in patients with lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 47(2):234-8 (2014)
 18. Sato, M., Okada, Y., Oto, T., Minami, M., Shiraishi, T., Nagayasu, T., Yoshino, I., Chida, M., Okumura, M., Date, H., Miyoshi, S., Kondo, T.; The Japanese Society of Lung and Heart-Lung Transplantation. Registry of the Japanese Society of Lung and Heart-Lung Transplantation: official Japanese lung transplantation report, 2014. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 62(10):594-601 (2014)
 19. Nakajima, T., Yasufuku, K., Sakairi, Y., Shibuya, K., Yoshida, S. and Yoshino, I. Successful Treatment of Lung Cancer by Multimodal Endobronchial Interventions. *Respiration* 88(2):144-7 (2014)
 20. Okuda, K., Yano, M., Yoshino, I., Okumura, M., Higashiyama, M., Suzuki, K., Tsuchida, M., Usuda, J. and Tateyama, H. Thymoma patients with pleural dissemination: nationwide retrospective study of 136 cases in Japan. *Ann Thorac Surg.* 97(5): 1743-8 (2014)
 21. Sakairi, Y., Yoshino, I., Yoshida, S., Suzuki, H., Tagawa, T., Iwata, T. and Mizobuchi, T. Pattern of metastasis outside tumor-bearing segments in primary lung cancer: rationale for segmentectomy. *Ann Thorac Surg.* 97(5): 1694-700 (2014)
 22. Yun, T., Suzuki, H., Tagawa, T., Iwata, T., Mizobuchi, T., Yoshida, S., Yamazaki, M. and Yoshino, I. Cavernous hemangioma of the posterior mediastinum with bony invasion. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* Published online: 18 Apr 2014
2. 学会発表
1. 鈴木秀海, 畑敦, 尹貴正, 山本高義, 田中教久, 鎌田稔子, 森本淳一, 中島崇裕, 長門芳, 岩田剛和, 吉田成利, 吉野一郎 皮膚筋炎に合併した間質性肺炎 (CADM-IP)し両側上葉温存生体肺移植後、管理に難渋した一例 第31回日本肺および心肺移植研究会 2015年1月31日, 東京
 2. 吉野一郎 肺癌のリンパ節郭清における Evidence-based surgery と Rationale-based surgery 呼吸器外科 Expert Meeting 2014年12月12日, 東京
 3. 吉野一郎 末梢小型肺がんの外科治療 ~ 動向と課題 ~ 千葉 COPD・肺がんセミナー 2014年11月27日, 千葉
 4. 吉野一郎 期非扁平上皮・非小細胞肺癌に対するペバシズマブ併用術前導入療法の第 相試験 : TCOG1002 第55回日本肺癌学会学術集会 2014年11月15日, 京都

5. 吉野一郎 肺がん外科治療における機能温存の現状と課題 第8回鹿児島がん診療セミナー 2014年11月4日, 鹿児島
6. 吉野一郎 肺再生・移植の臨床と研究 第12回福岡外科セミナー 2014年10月10日, 福岡
7. 吉野一郎 縦隔腫瘍に対する外科療法の実際「全国胸腺上皮性腫瘍データベースにおける 期胸腺腫の手術成績」第67回日本胸部外科学会定期学術集会 2014年10月2日, 福岡
8. 吉野一郎 間質性肺炎合併肺癌の外科治療 徳島呼吸器疾患談話会 2014年9月11日, 徳島
9. 吉野一郎 肺癌外科治療における機能温存戦略とその課題 第5回大分肺がんセミナー 2014年9月5日, 大分
10. 吉野一郎 肺癌に対する免疫療法の可能性 Oncology Seminar 2014年9月2日, 広島
11. 吉野一郎 肺癌手術のリンパ節郭清における Evidence-based medicine と Rationale-based medicine 第47回日本胸部外科学会九州地方会総会 2014年8月7日, 沖縄
12. 吉野一郎 肺がん手術という選択 (公財)千葉市文化振興財団 2014年7月16日, 千葉
13. Yoshino, I. Adequacy of video-assisted thoracic surgery thymectomy for oncological operation : comparison with the transsternal approach. ESTS2014 6/15-18/2014, Copenhagen-Denmark
14. Iwata, T., Suzuki, H., Nakajima, T., Nagato, K., Yamada, Y., Tagawa, T., Mizobuchi, T., Yoshida, S. and Yoshino I. Pleural factor and nodal metastasis in small-sized lung adenocarcinoma. ESTS2014 6/15-18/2014, Copenhagen-Denmark
15. 吉野一郎 肺移植 - 困難病態との戦い - 第3回千葉心臓・肺移植セミナー 2014年6月6日, 千葉
16. 吉野一郎 小型浸潤肺癌の縮小手術における考案 第6回呼吸器外先進フォーラム 2014年5月24日, 大阪
17. Yun, T., Suzuki, H., Nakajima, T., Tagawa, T., Iwata, T., Mizobuchi, T., Yoshida, S., Nakatani, Y. and Yoshino, I. Surgical Treatment of Primary Chest Wall Tumor . ATS 2014 International Conference 5/16-21/2014, San Diego
18. Mizobuchi, T., Yun, T., Suzuki, H., Inage, T., Kamata, T., Morimoto, J., Nakajima, T., Tagawa, T., Yoshida, S. and Yoshino, I. Surveillance Of Bacterial Airway Colonization During General Anesthesia Does Not Predict Postoperative Pneumonia In Lung Cancer Patients After Pulmonary Resections: Retrospective Analysis Of Risk Factors. ATS 2014 International Conference 5/16-21/2014, San Diego
19. Nagato, K. and Yoshino, I. Invariant NKT cells generated by the TIL 13831 T cell receptor gene transfer with retroviral vectors allows efficient redirection of human antigen specificity. The 12th Annual Meeting of the Association for Cancer Immunotherapy 5/30/2014, Mainz Germany
20. Wada, H., Hirohashi, K., Anayama, T., Nakajima, T., Kato, T., Chan, H., Qiu, J., Daly, M., Weersink, R., Jaffray, D., Jonathan, I., Waddell, T., Keshavjee, S., Yoshino, I. and Yasufuku, K. Ultra-minimally Invasive Sentinel Lymph Node Mapping Using a Combination of Transbronchial Injection of Indocyanine Green and Near-infrared Fluorescence Thoracoscope. AATS ANNUAL MEETING 2014 4/26-30/2014, Toronto Canada

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	26.5ヶ月	生存
4	SD	11.5ヶ月	原病死
5	SD	19.7ヶ月	原病死
6	SD	10.4ヶ月	原病死
7	PD	14.9ヶ月	原病死
8	PD	9.5ヶ月	原病死
9	PD	21.0ヶ月	生存
10	PD	12.2ヶ月	原病死
11	PD	14.4ヶ月	原病死
12	SD	19.8ヶ月	生存
13	SD	20.5ヶ月	生存
14	PD	20.0ヶ月	生存
15	PD	18.4ヶ月	生存
16	PD	12.3ヶ月	原病死
17	SD	14.3ヶ月	生存
18	PD	8.9ヶ月	生存
19	PD	10.0ヶ月	生存
20	SD	9.2ヶ月	生存
21	PD	9.7ヶ月	原病死
22	PD	9.3ヶ月	生存
23	PD	9.3ヶ月	生存
24	SD	8.7ヶ月	生存
25	SD	7.8ヶ月	生存
26	SD	6.0ヶ月	生存
27	SD	2.5ヶ月	生存
28	SD	2.5ヶ月	生存
29	PD	2.5ヶ月	生存
30	PD	2.5ヶ月	生存
31	PD	1.0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

研究要旨

α GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与(Chiba-NKT)に関する第 相臨床研究を施行するために調製された、患者自己末梢血単核球由来 α Galactocylceramide (α GalCer)提示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 および単球マーカーである CD14 の発現率を検討したところ、各樹状細胞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 31 例中 12 例および 18 例で有意な増加を認めた。さらに α GalCer 特異的インターフェロン 産生細胞能の検討を 29 例で行い、20 例で Chiba-NKT 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 α Galactocylceramide (α 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 α 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ことに加えて、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抗原提示細胞としての機能を適切に反映し、治療効果の予測が可能となりうるマーカーが存在しないことから、樹状細胞の代表的な表面抗原マーカーである 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。さらに成分採血にて採取した直後の末梢血単球にて強い発現を認め、樹状細胞への分化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

Chiba-NKT 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 細胞数および NKT 細胞活性化にて 2 次的な活性化が期待される NK 細胞数について、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 α 24 抗原受容体陽性、V β 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。さらに α GalCer が提示された樹状細胞によって刺激される細胞は主に V α 24⁺V β 11⁺ NKT 細胞であるが、

α GalCer 反応性のすべての細胞を測定するためのもう一つの方法として、 α GalCer-CD1d テトラマーを用いたフローサイトメトリー解析を一部の症例にて行い、CD3⁺ α GalCer-CD1d テトラマー陽性細胞数の検討を行った。末梢血リンパ球中の NKT 細胞、NK 細胞、 α GalCer-CD1d テトラマー陽性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、 α GalCer-CD1d テトラマー陽性細胞数を算出した。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 α GalCer によって再刺激した際の α GalCer 特異的インターフェロン (IFN- γ) 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- γ 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

で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、治療に用いた投与細胞における表面抗原として、HLA-DR、CD11c、CD86 および CD14 分子の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補助シグナル分子である CD86 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 63.6%、CD11c が 24.2%、CD86 が 72.6%、CD14 は 2.3%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 31 例中 12 例であり、NK 細胞が 1.5 倍以上増加を認めたのは 18 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、31 例中 14 例であった。またこれまでに 16 例にて α GalCer-CD1d テトラマー

解析が実施された。 α GalCer-CD1d テトラマー陽性細胞は $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞と同様の動態を示すが、 α GalCer に反応する細胞として $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞より幅広い細胞群を検出することから、Chiba-NKT によって $V\alpha 24+V\beta 11+$ NKT 細胞が 7 例の増加に留まったのに対して、 α GalCer-CD1d テトラマー陽性細胞は 14 例で増加を示すことが判明した。

機能解析のための末梢血単核球中の α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の検討を 29 例で行い、治療開始時と比較し 20 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- γ 産生細胞数が増加を認めた 20 例における腫瘍縮小効果は、partial response (PR) 1 名、stable disease (SD) 8 名、progressive disease (PD) 11 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 PR 0 名、SD 5 名、PD 4 名であった。今後、 α GalCer 反応性 IFN- γ 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

α GalCer パルス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, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 30) とそれ以外の症例群における、樹状細胞

胞上の表面抗原発現率を比較してみると、HLA-DR 発現は増加群 63.8%、非増加群 64.1%、CD11c 発現は増加群 25.5%、非増加群 23.5%、CD86 発現は増加群 70.0%、非増加群 74.9%、CD14 発現は増加群 2.1%、非増加群 2.4%と顕著な差を認めなかった。

一方、樹状細胞の表面抗原発現が α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数に及ぼす影響を検討するために、IFN- γ 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 67.6%、非増加群 54.5%、CD11c 発現割合は増加群 25.0%、非増加群 22.1%、CD86 発現割合は増加群 73.5%、非増加群 73.0%、CD14 発現割合は増加群 2.4%、非増加群 1.9%であり、IFN- γ 産生細胞増加群で HLA-DR の発現が高い傾向を認めしたが、その他に表面抗原発現に差は認められなかった。今後さらに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

α GalCer パルス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 および単球マーカーの CD14 分子による評価を継続して行った。その結果、特に樹状細胞と NKT 細胞の相互作用に必要な補助シグナル分子であり、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 分子がこれまで同様に安定して高発現していることが明らかとなった。また樹状細胞のもととなる単球で高発現する表面マーカー 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は問題無くなされていると考えられた。また昨年度の解析にても抗原提示細胞における重要性が示唆された HLA-DR 分子の発現が、症例数を重ねて行った本年度の解析においても IFN- γ 産生細胞増加群において高い傾向を示したことは、本培養系における抗原提示細胞の機能発現に HLA-DR 分子が重要なマーカーとなる可能性を示唆しており、今後 35 例までの検討にて NKT 細胞活性化における HLA-DR 分子発現の意義とその役割を明らかにしていく。

治療前後での末梢血単核球を用いた NKT 細胞特異的免疫反応のモニタリングを施行することで、惹起することが期待されている Chiba-NKT 特異的な免疫反応を捉え、抗腫瘍効果における免疫学的作用機序解明が進むことが期待されている。さらには Chiba-NKT 特異的免疫反応と臨床効果との関係を証明することが可能となれば、臨床効果を反映するバイオマーカーとして利用することも期待出来る。今回免疫モニタリングとして、NKT 細胞、NK 細胞数の変化に加えて、 α GalCer-CD1d テトラマーを用いた α GalCer 反応性 T 細胞の検出を試みた。 α GalCer-CD1d テトラマーにて染色され

る細胞のほとんどは $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ invariant NKT 細胞であるが、T 細胞抗原受容体が $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ の組み合わせでない non-invariant T 細胞抗原受容体を発現する conventional T 細胞を含むことがこれまでに報告されている。しかしこの細胞の多寡や増減が腫瘍免疫において果たす役割や意義については明らかとなっておらず、Chiba-NKT 投与後の動態の意義についても不明である。今後更にデータを追加し検討を重ねることで、 $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT 細胞と α GalCer-CD1d テトラマー陽性細胞の免疫モニタリングとしての役割の違いを明らかにしていく。

さらに NKT 細胞の機能変化として、 α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の検討を行った。 α GalCer 反応性 IFN- γ 産生細胞数の検討が終了した 29 例中、20 例で 2 倍以上の IFN- γ 産生細胞数の増加を認め、臨床効果 PR の 1 例および SD の 8 例で、 α GalCer 反応性 IFN- γ 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、これまでの報告からは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

Chiba-NKT における α GalCer パルス樹状細胞の細胞表面抗原発現解析から、樹状細胞関連マーカーが細胞調製にて比較的安定した発現を示すことが明らかとなり、その中でも HLA-DR 発現の重要性が示唆された。また、 α GalCer パルス樹状細胞投与後に α GalCer 特異的 IFN- γ 産生細胞能の増強を認めた症例は全体の 69%であった。これまでの報告から、これらの症例では生存期間延長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の確定とともに更なる検討を加えていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iinuma, T., Okamoto, Y., Yamamoto, H., Inamine-Sasaki, A., Ohki, Y., Sakurai, T., Funakoshi, U., Yonekura, S., Sakurai, D., Hirahara, K. and Nakayama, T. Interleukin-25 and mucosal T cells in noneosinophilic and eosinophilic chronic rhinosinusitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* in press.
2. Nakagomi, D., Suzuki, K., Meguro, K., Hosokawa, J., Tamachi, T., Takatori, H., Suto, A., Matsue, H., Ohara, O., Nakayama, T., Shimada, S. and Nakajima, H. Matrix metalloproteinase 12 is produced by M2 macrophages and plays important roles in the development of contact hypersensitivity. *J. Allergy. Clin. Immunol.* in press.
3. Endo, Y., Hirahara, K., Iinuma, T., Shinoda, K., Tumes, D. J., Asou, K. H., 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)
4. Mishima, Y., Wang, C., Miyagi, S., Saraya, A., Hosokawa, H., Mochizuki, K. M., Nakajima, T. Y., Koide, S., Negishi, M., Sashida, G., Naito, T., Ishikura, T., Onodera, A., Nakayama, T., Tenen, D. G., Yamaguchi, N., Koseki, H., Taniuchi, I. and Iwama, A. Histone acetylation mediated by Brd1 is crucial for *Cd8* gene activation during early thymocyte development. *Nat. Commun.* 5:5872 (2014)
 5. Tanaka, S., Suto, A., Iwamoto, T., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Suzuki, K., Takatori, H., Tamachi, T., Hirose, K., Onodera, A., Suzuki, J., Ohara, O., Yamashita, M., Nakayama, T. and Nakajima, H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. *J. Exp. Med.* 211(9):1857-1874 (2014)
 6. Watanabe, Y., Onodera, A., Kanai, U., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, M., Iwamura, C., Tumes, D. J., 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):12829-12834 (2014)
 7. Sakurai, T., Inamine, A., Inuma, 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)
 8. Kuwahara, M., Suzuki, J., Tofukuji, S., Yamada, T., Kanoh, M., Matsumoto, A., Maruyama, S., Kometani, K., Kurosaki, T., Ohara, O., Nakayama, T. and Yamashita, M. The Menin-Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. *Nat. Commun.* 5:3555 (2014)
 9. Suzuki, K., Nagao, T., Itabashi, M., Hamano, Y., Sugamata, R., Yamazaki, Y., Yumura, W., Tsukita, S., Wang, P. C., Nakayama, T. and Suzuki, K. A novel autoantibody against moesin in the serum of patients with MPO-ANCA-associated vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29(6):1168-1177 (2014)
 10. Beaulieu, A. M., Zawislak, C. L., Nakayama, T. and Sun, J. C. The transcription factor Zbtb32 controls the proliferative burst of virus-specific natural killer cells responding to infection. *Nat. Immunol.* 15(6):546-553 (2014)
 11. Onodera, A., Tumes, D. J. and Nakayama, T. Epigenetic control of immune T cell memory. *Transcriptional and Epigenetic Mechanisms Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development* 367-382 (2014)
2. 学会発表
1. 中山 俊憲 Pathogenic Th2 細胞による慢性アレルギー性気道炎症制御 第16回京都アレルギークロストーク 2015年2月19日, 京都
 2. 中山 俊憲 眼からウロコの免疫による炎症病態制御 角膜カンファレンス2015 共催セミナー 2015年2月12日, 高知
 3. 中山 俊憲 Pathogenic memory Th2 細胞とアレルギー性炎症制御 角膜カンファレンス2015 2015年2月11-13日, 高知
 4. 中山 俊憲 免疫記憶研究と免疫システム統御治療学～研究者を目指す若手

- 医師へのメッセージ～Meet the Experts in Niigata 2015年1月22日, 新潟
5. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in airway inflammation. IMP Seminar, 12/18/2014, New York
 6. Watanabe, Y., Onodera, A., Ichikawa, T., Obata-Ninomiya, K., Wada, T., Kiuchi, 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回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 7. Tanaka, S., Suto, A., Iwamoto, T., Suzuki, K., Takatori, H., Tamachi, T., Hirose, K., Onodera, A., Suzuki, J., Ohara, O., Yamashita, M., Nakayama, T. and Nakajima, H. Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 8. Izumoto, M., Kuwahara, M., Kiyoi, T., Shinoda, K., Nakayama, T., Kurosaki, T. and Yamashita, M. Bach2-Blimp1 axis plays an important role in the regulation of allergic airway inflammation. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 9. Onodera, A. and Nakayama, T. Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 10. Yagi, R., Sarkar, H. M., Soh, T., Nakayama, T. and Zhu, J. IL-9 production is a transient feature of differentiating Th2 cells in response to TGF β . 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 11. Hosokawa, H., Shinoda, K., Suzuki, A., Ito, T. and Nakayama, T. Functionally distinct GATA3 complexes regulate Th2 cell differentiation and proliferation. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 12. Obata-Ninomiya, K., Nei, Y., Tsutsui, H., Ishiwata, K., Miyasaka, M., Matsumoto, K., Nakae, S., Kanuka, H., Inase, N., Nakayama, T. and Karasuyama, H. GATA-1 controls the generation and function of basophils. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 13. Hashimoto, K., Goto, S., Hatogai, Y., Sawai, R., Ohosawa, H. and Nakayama, T. Immunosenescence in B cell differentiation related to the expression Toll-like receptor gene. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 14. Hirahara, K., Wada, T., Nakayama, T. and O'Shea, J. J. Asymmetry of STAT action to define specificity and redundancy of IL-27 and IL-6 signals. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 15. Nagato, K., Motohashi, S., Nakayama, T., Yoshino, I. and Nishimura, I. M. Human melanoma antigen-specific iNKT cells engineered by the TIL 1383I T cell receptor gene transfer. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 16. 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回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日, 京都
 17. Kimura, M., Hayashizaki, K., Singer, A. and Nakayama, T. Molecular basis for

- functional (helper versus cytotoxic) lineage fate decisions during thymocyte development. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 10-12 日, 京都
18. Tanno, H., Kanno, E., Suzuki, A., Takagi, N., Kamimatsuno, R., Ishii, K., Nakayama, T., Taniguchi, M. and Kawakami, K. Lack of NKT cells leads to persisted infiltration of neutrophils and delayed wound healing process in skin. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 10-12 日, 京都
 19. Nakayama, T., Endo, Y., Tumes, J. D. and Hirahara, K. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会 2014 年 12 月 10-12 日, 京都
 20. 中山 俊憲 病原性記憶 Th2 細胞によるアレルギー性気道炎症制御 分子免疫学セミナー 2014 年 12 月 5 日, 徳島
 21. 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がんの免疫細胞治療—これまでの臨床研究の成果と今後の展望— 第 27 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2014 年 12 月 4-5 日, 大阪
 22. 中山 俊憲 Pathogenic 記憶 Th2 細胞の形成と維持機構 感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2014 2014 年 11 月 15 日, 千葉
 23. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. Symposium of the International Leibniz Research Cluster ImmunoMemory, Organisation of Immunological Memory, 11/4-5/2014, Berlin
 24. Nakayama, T. Pathogenic memory Th2 cells in airway inflammation. The Fourth International Conference on Regulatory T Cells and T Helper Cell Subsets and Clinical Application in Human Diseases, 11/1-4/2014, Shanghai
 25. Nakayama, T. Effector T cell differentiation for allergic responses. Novo nordisk innovation summit 10/1-2/2014, Tokyo
 26. 長谷川 明洋, 荻野 英賢, 大津山 賢一郎, 中山 俊憲 アレルギー性炎症の誘導にともなうリンパ球浸潤に関与する分子の解析と細胞集積のイメージング 第 23 回日本バイオイメージング学会学術集会 2014 年 9 月 4-6 日, 大阪
 27. Nakayama, T., Endo, Y., Tumes, D. J. and Hirahara, K. Pathogenic memory Th2 cells in the airway. The 2nd Symposium of International Immunological Memory and Vaccine Forum (IIMVF). 8/25/2014, USA
 28. 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— 琉球大学大学院医学研究科(臨床研究)特別セミナー 2014 年 7 月 4 日, 沖縄
 29. 中山 俊憲 Pathogenic 記憶 Th2 細胞と気道炎症制御 沖縄感染免疫シンポジウム 2014 2014 年 7 月 3 日, 沖縄
 30. Nakayama, T. Generation and maintenance of pathogenic memory Th2 cells. RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2014, 6/26-27/2014, Yokohama
 31. 中山 俊憲 Pathogenic 記憶 Th2 細胞と気道炎症制御 Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology 2014 年 6 月 18 日, 大阪
 32. 細川 裕之, 加藤 美紀, 中山 俊憲 Functionally distinct GATA3 complexes regulate Th2 cell differentiation and proliferation. 第 24 回 Kyoto T cell Conference 2014 年 5 月 16-17 日, 京都
 33. Tumes, J. D., Onodera, A., Hosokawa, H., Koseki, H., 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.

- 第 24 回 Kyoto T cell Conference 2014
年 5 月 16-17 日, 京都
34. Kimura, Y. M., Yagi, R., Nakayama, T.
and Singer, A. Strong TCR signaling
prolongs lineage uncertainly during
MHC-I specific positive selection. 第 24
回 Kyoto T cell Conference 2014 年 5 月
16-17 日, 京都
35. 飯沼 智久, 山本 陸三朗, 櫻井 利興,
船越 うらら, 米倉 修二, 櫻井 大樹,
中山 俊憲, 岡本 美孝 アレルギー性
鼻炎における pathogenic memory T 細胞
の検討 第 26 回日本アレルギー学会春
季臨床大会 2014 年 5 月 9-11 日, 京都
36. 中山 俊憲 Pathogenic 記憶 Th2 細胞に
よる慢性気道炎症制御 第 54 回日本
呼吸器学会学術講演会 2014 年 4 月
25-27 日, 大阪

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 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	1.0±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	12.7±4.5	82.9±6.3	1.1±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
17	73.8±15.2	41.2±14.3	66.7±27.7	5.4±2.1
18	86.0±10.5	14.1±2.5	79.5±13.7	6.6±4.7
19	95.1±3.2	9.6±3.8	90.4±5.6	4.8±0.9
20	93.4±2.6	33.1±3.4	83.8±6.8	4.8±2.6
21	44.6±5.3	29.9±0.9	33.1±14.5	5.8±3.9
22	74.2±11.0	42.0±9.3	77.1±21.3	2.8±1.3
23	58.5±3.8	24.8±5.8	51.7±26.4	4.2±2.2
24	21.1±16.1	26.0±8.6	52.3±24.9	3.6±3.1
25	62.5±11.1	20.1±3.4	51.1±20.1	1.8±1.0
26	24.7±5.1	24.2±8.1	51.6±26.1	1.5±0.7
27	47.7±7.9	29.9±13.3	74.1±17.8	1.6±0.3
28	90.3±4.2	18.0±2.9	89.7±4.8	1.6±0.8
29	50.9±10.9	21.9±9.3	50.8±25.6	2.4±0.4
30	38.0±9.4	28.5±12.0	54.7±22.7	2.9±0.6
31	84.5±6.1	19.3±1.9	81.4±8.4	2.7±0.9

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- γ 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	5.2
16	PD	0.5	1.5	2.5
17	SD	1.0	1.7	2.6
18	PD	1.3	1.2	3.8
19	PD	0.4	2.7	5.1
20	SD	3.7	1.4	6.7
21	PD	0.5	1.0	1.4
22	PD	3.3	1.8	3.4
23	PD	2.1	1.3	2.2
24	SD	1.4	1.3	2.8
25	SD	7.5	1.7	1.9
26	SD	3.2	1.8	1.8
27	SD	1.6	0.7	2.6
28	SD	1.4	2.3	3.1
29	PD	0.3	1.3	4.1
30	PD	2.3	3.1	n.d.
31	PD	0.5	3.2	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 特任助教

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継続的に毎月

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 回開催した）。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) 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と症例登録業務を実施している。CRF の

回収状況としては、全体の 50%程度である。毎月 SDV を 1~2 回行い、クエリー対応も実施中である。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。有害事象については SAE 報告が今年度 2 回（2 症例）発生した。これらに対する CRC の支援を行った。

原疾患の悪化による試験継続中止の後、標準治療の化学療法のため入院となった事例であり、因果関係なしと報告されている。

D. 考察

本研究において以下の考察を行った。

- (1) 本研究においては、試験の実施体制として継続的な研究チーム内部の連携を図ることによって、試験全体の推進をスムーズに行うことが可能となっている。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により試験の継続が可能となっている

- (2) モニタリングによるデータの回収作業およびその登録作業について、ひきつづき実施していく必要がある。最終の症例が来年度組み入れられる予定であり、今後、終了に向けた作業に着いても準備が必要である。

- (3) 監査業務については、前向きな監査の実施が必要であり、これによって試験の実施を適切なものとする必要がある。

- (4) データマネジメント業務は、症例の適格性とデータの信頼性の上で実施されているが、継続的なデータマネジメント業務により試験全体の進捗にも大きく影響を及ぼすものとなる。また安全性情報の適切な管理も必要であり、SAE を含めた管理が実施可能となっている。

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）の試験を一部体制の修正を行いながら ICH-GCP 基準として継続して実施することが可能となった。

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

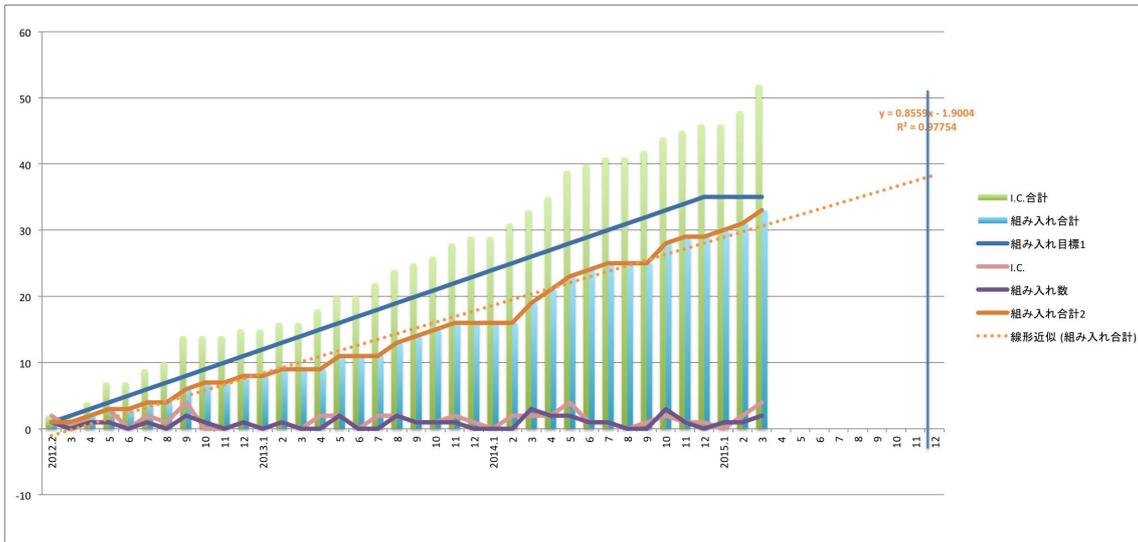
2. 実用新案登録

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
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	356-67	2015
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	294-308	2015
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	65-74	2014
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.	111	12829-34	2014