

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592592

研究課題名(和文) 低容量抗癌剤と樹状細胞局所投与による新規免疫化学療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of DC immunotherapy with low-dose chemotherapy in HNSCC

研究代表者

増山 敬祐 (MASUYAMA, Keisuke)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：30181663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：再発頭頸部がんに対する新規治療法としての低容量抗がん剤併用樹状細胞療法の開発およびその安全性、完遂率、効果について解析を行った。当院の細胞プロセッシング施設において対象患者よりアフエーシスで回収した末梢血単核球からGM-CSFとIL-4刺激により樹状細胞を誘導した。回収率は1.08-16.7%であった。cyclophosphamide内服およびdocetaxel点滴による副作用はほとんど見られなかったが5例中4例にOK432局注後に38.5以上の発熱を認め、一例は敗血症性ショックを呈した。予定されたコースを完遂できた3症例について1例で局注部位のSD、2例が局注部位のPDであった。

研究成果の概要(英文)：Cancer immunotherapy with dendritic cells (DCs) and low-dose chemotherapy is novel therapeutic strategy for improvement of survival rate in recurrent head and neck cancer (HNC) patients. We developed this protocol, and followed by examination of safety and clinical benefits. DCs were collected from HNC patients by leukoapheresis and stimulated by GM-CSF and IL-4 for five days in cell-processing center. Rates of immature collection were 1.08% to 16.7%. There were no adverse effects caused by cyclophosphamide and docetaxel in 5 recurrent HNC patients. However, administration of OK432 after injection of DCs into tumor tissues significantly caused febrile symptoms (BT > 38.5) in 4 patients. Among these patients, septic shock was happened in one patient. Among 3 patients who accomplished planned therapeutic schedules of DCs immunotherapy with low-dose chemotherapy, one patient was regarded as stable disease, while two patients were regarded as progressive diseases.

研究分野：cancer immunotherapy

キーワード：がん免疫療法 頭頸部がん 樹状細胞 低容量抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

近年、PET や内視鏡検査など画像診断技術の発展によって頭頸部扁平上皮がんの早期発見早期治療ができるようになってきているものの、未だその半数近くは進行期(III期、IV期)で発見されている。進行頭頸部扁平上皮がん治療は主に外科的切除、抗がん剤治療、放射線治療を集学的に用いて行われるものの、50%にあたる症例で局所制御ができておらず局所残存、再発および遠隔転移を起こす。それらの症例の生存期間は12ヶ月に満たない事が多く、これらを改善は急務である。

第4の治療法として免疫療法が注目されている。生体内には腫瘍に対する免疫応答が本来備わっており、これらを賦活化することで抗腫瘍効果を生む。ここ数年、遺伝工学及び細胞工学手法の進歩に伴い、より詳細にがんに対する免疫応答を解析できるようになり、免疫賦活に有利な特性を持つより強いエフェクター細胞を誘導できる技術も広がってきた。現在、がん免疫療法には、がん抗原を用いたがんワクチン、樹状細胞を用いた細胞免疫療法、CAR療法、免疫チェックポイント阻害剤などといったいくつかが臨床応用されてきているものの、がんワクチンである Sipuleucel-T が進行前立腺がんに対して臨床第III相試験で生存期間延長効果が証明され、Nivolumab や ipilimumab などの免疫チェックポイント阻害剤などが悪性黒色腫を中心に有効性が証明されて臨床応用されてきている。しかしながら頭頸部扁平上皮がんを対象としたがん免疫療法はまだその有効性が確立されたものはない。

2. 研究の目的

免疫療法の一つに樹状細胞(DC)療法がある。樹状細胞は強力な抗原提示能を有しており、腫瘍抗原を取り込んで所属リンパ節に移動し、そこでCD4+またはCD8+T細胞活性を誘導する事ができる。これにより抗腫瘍効果を誘

導する。現在DC療法には腫瘍抗原ペプチド刺激により ex vivo で活性化させて生体に投与する細胞療法が主に行われているものの、腫瘍抗原が限定されるため効果が非常に限定的となる。過去の報告から、docetaxel および cyclophosphamide の抗腫瘍効果による腫瘍局所でのがん抗原の増強や、免疫抑制機構の解除に関するデータが報告されており頭頸部扁平上皮がんを対象とした今回抗がん剤の効果によるがん抗原の増加と免疫抑制機構の解除を目標に、これにDCによる細胞免疫療法を組み合わせた新しい治療としてのがん化学免疫療法の開発およびその安全性と抗腫瘍免疫応答の誘導について解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1)再発頭頸部扁平上皮がん患者に対する低用量抗がん剤を併用した樹状細胞療法のプロトコール

<対象患者>

選択基準

再発頭頸部癌と診断された患者

既存の標準的治療による効果が期待できない患者

20歳以上、性別は問わない

ECOGによるPS0または1

最終治療(放射線照射、抗癌剤投与)から4週間以上経過している患者

癌病巣への樹状細胞の直接投与が可能な患者

経口摂取が可能な患者

下記の条件をすべて満たす患者

ヘモグロビン : >9.0 mg/dl ヘマトクリット :

>25% 白血球 : >4000/mm³ 血小板 :

>100,000/mm³ 総ビリルビン : <1.5 mg/dl

GOT : 施設基準値の2.5倍以下 GPT : 施設基準値の2.5倍以下

血清クレアチニン : <1.5 mg/dl

本試験参加に関して同意が文書で得られている患者

<投与スケジュール>

エンドキサン：CTX (50mg), 1T 1x
day1-7, day22-28 経口投与

ドセタキセル：DOC (30 mg/m²) day 6, 27
点滴静注

Day1-7, 22-28

エンドキサン錠 (50mg) 1T 1x (朝食後30分)

Day6, 27

デキサメタゾン 5-HT ₃ 受容体拮抗薬制吐剤 生理食塩水	8 mg 1A 50 ml	} 点滴静注;15分
ドセタキセル 生理食塩水 or 5%ブドウ糖液	30mg/m ² 250 ml 250ml	

<樹状細胞の調整及び投与方法>

当院では細胞プロセッシング施設 (CPC) により樹状細胞ワクチン療法を行う。

癌患者より単核球の採取

Leukapheresis により採血を行い、採血量の4分の1を1回目の樹状細胞誘導に使用する。FICOLLにて重層し、比重遠心法にて中間層を採取し、単核球分画とする。4分の3の細胞は凍結保存液を加え、凍結保存とする。凍結した末梢血単核球からの誘導においては (day8, 22, 29) 融解後に2回PBSにて洗浄し、以下の単核球の分離へと進む。

単核球の分離

単核球は、AIM-V 培地 (GMP grade) に浮遊させる。1時間37℃の培養器の中で静置し単核球がプラスチック底に付着するのを確認する。

37℃のAIM-Vでゆっくり2回リンスし、非付着性のリンパ球を除去する。

樹状細胞の誘導

GM-CSF (Bayer 社:GMP grade) (5ng/ml) と IL-4 (プライムユーン社: GMP grade) (5ng/ml) を含む AIM-V 培地を各プラスチックあたり 20ml 加え、培養を開始する。

樹状細胞の投与

5日間の培養後、樹状細胞を回収する。すべての細胞を1つのチューブにPBSを用いて回収後、必要な細胞数を生食 (1-3ml) にて調整し、腫瘍局所に5~6ヶ所投与する。腫瘍に直接アプローチできない場合は、エコーガイド下に投与する。

・調整した樹状細胞浮遊液の安全性についてエンドトキシン、細菌培養検査を行う。

<OK-432 (ピシバニール) の投与>

樹状細胞投与した翌日 (d3, 5, 29, 36) にピシバニールを添付懸濁用溶解液にて溶解し5KEを、樹状細胞投与箇所とほぼ同じ部位に5~6ヶ所局注する。樹状細胞と同様に、腫瘍に直接アプローチできない場合は、エコーガイド下に投与する。

本プロトコールによる認められたすべての有害事象を記録する。

本試験開始後、試験中に認められたすべての有害事象を記録する。判定はNCI-Common Toxicity Criteria-日本語訳JCOG版第3版を用いる。

4. 研究成果

(1) 患者背景

本がん免疫化学療法を施行した5例について、年齢、性別、原発部位、既治療、再発部位について表1に示す。いずれの症例も再発病巣の増大を認め、最終治療施行から1ヶ月以上経過している状態で本治療を施行している。

症例	年齢	性別	疾患	既存治療	再発部位
1	76	M	上顎洞SCC	CRT, Surgery	局所再発
2	34	M	舌SCC	CRT, Surgery, Chemotherapy, BNCT	頭部リンパ節、肺転移、皮膚転移
3	70	M	中咽頭SCC	CRT, chemotherapy	頭部リンパ節、皮膚転移
4	49	M	顎下腺ACC	Surgery,	頭部リンパ節、肺、小脳、副腎、骨転移
5	59	M	声門上SCC	CRT, Surgery, Chemotherapy	頭部リンパ節、肺転移

表1 患者背景

(2) 回収状況

まずCPC内での操作ではプロトコールに沿った作業を行い細菌などのcontaminationを含めた目立ったトラブルはなく、無菌状態のまま樹状細胞の培養および回収ができた。GM-CSFとIL-4刺激の前後での樹状細胞を含む分画の細胞形態は突起を周囲に出す、形態を取っていた (図1上:刺激前、下:刺激後)。

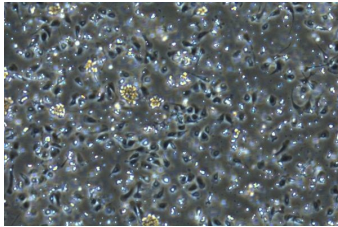
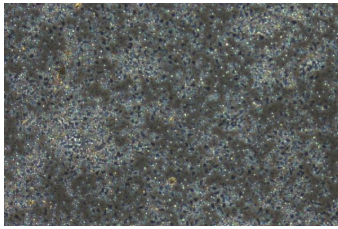


図1 樹状細胞を含む分画の細胞形態

続いて誘導された樹状細胞の回収率を調べた。5症例の投与細胞数については表2に示した。1-4症例では樹状細胞を含んだ分画は4回合計で $3.63-84.7 \times 10^7$ 個とPBMCの1-2.1%程度回収できていた(表2)。一般的に樹状細胞の分画はPBMCの1%未満という報告が散見されており、比較的回収効率は良好と考えられたが、回収する際にフラスコに接着している細胞を叩きで落とす方法を採用していたが、フラスコにかなりの樹状細胞が附着した状態となっていた(図2上:叩き落とし)。5症例目に関しては、スクレイパーを用いて樹状細胞を回収したところ、回収率16.7%と非常に高い回収率であった。

症例	疾患	投与細胞数	PBMC	回収率
1	上顎洞SCC	3.63×10^7	194.1×10^7	1.87%
2	舌SCC	5.56×10^7	515.5×10^7	1.08%
3	中咽頭SCC	5.36×10^7	443.6×10^7	1.21%
4	顎下腺ACC	8.47×10^7	399.6×10^7	2.10%
5	声門上SCC	128.4×10^7	767.2×10^7	16.70%

表2 樹状細胞を含む分画の回収率

(3) 副作用

Day1-7, 22-28でのcyclophosphamide 50mg経口投与、day6, 27でのdocetaxel (30mg/m2)の点滴静注では一般的に言われている骨髄抑制や出血性膀胱炎など抗がん剤による副作用は認めなかった。しかしながら、5例中4例でOK432の局注後に38.5以上の発熱を認めた。うち一例は敗血症性ショックとなった(表3)。

症例	副作用
1	発熱(40.2°C)
2	発熱(40.3°C)
3	誤嚥性肺炎、縦隔気腫
4	発熱(38.5°C)
5	発熱(40.1°C)、敗血症性ショック

表3 副作用

(4) 完遂率

CTX Day1-7, DTX Day6投与後DC局注およびOK-432局注を2回施行終了までを1コースとした場合、予定の2コースを完遂できた症例は5例中3例(60%)であった。完遂できなかった症例について、1例は1コース終了時に縦隔気腫増悪し、interval期間に心肺停止を起こして死亡、1例は2コース目の初回のOK432局注後に敗血症性ショックを起こしたため、医師判断で治療中断とした。

(5) 効果判定

予定された2コースを完遂できた症例3例について治療後施行したCT検査にて判定を行ったところ、1例で局注部位のSD、2例が局注部位のPDの判断であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

- 1) Tanaka S, Tamari M, Nakayama T, Ishii H, Hatsushika K, Hayashi A, Masuyama K, et al. Synergistic suppression of Poly(I:C)-induced CCL3 by a corticosteroid and a long acting b2 agonist in nasal epithelial cells. Allergol Int. 2015; 64(2): 196-9 (査読あり)
- 2) Ishii H, Saitoh M., Sakamoto K., Kondo T., Katoh R., Motizuki M., Tanaka S., Masuyama K, Miyazawa K. Epithelial splicing regulatory protein 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. J Biol Chem. 2014; 289(40): 27386-99. (査読あり)
- 3) Tanaka S., Hirota T., Kamijo A., Ishii H, Hatsushika K., Fujieda S., Ishitoya J., Masuyama K, Tamari M. Lung functions of Japanese patients with chronic rhinosinusitis who underwent endoscopic sinus surgery. Allergol. Int. 2014 63(1):27-35. (査読あり)
- 4) Chikamatsu K., Ishii H, Murata T., Sakakura K., Shino M., Toyoda M., Takahashi K., Masuyama K. Alternation of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell

carcinoma of the head and neck. Cancer Sci. 2013 104(11):1468-75.

5)Kamijo A, Hatsushika K, Kanemura S, Moriyama M, Kase Y, Masuyama K. Five adult laryngeal venous malformation cases treated effectively with sclerotherapy. Laryngoscope. 2013, 123(11):2766-9. (査読あり)

6) 当科下咽頭癌症例における重複癌の臨床的検討、石井裕貴, 増山敬祐, 山梨大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 日本気管食道科学会会報 63(6): 443 -450 2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

石井裕貴, 増山敬祐 ESRP1, ESRP2 は異なる機序でがん細胞の運動能を制御する (第73回日本癌学会) パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市、2014年9月25-27日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

増山 敬祐 (MASUYAMA, Keisuke)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号: 30181663

(2)研究分担者

石井 裕貴 (ISHII, Hiroki)
山梨大学・総合研究部・診療助教
研究者番号: 40568250