

平成21年 4月 18日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591613  
 研究課題名（和文） 肺癌に対する新しい免疫療法 自己ガンマデルタ T 細胞活性化療法の臨床的研究  
 研究課題名（英文） Clinical research of a new immunotherapy for the lung cancer: Autologous gamma delta T-cell adoptive immunotherapy  
 研究代表者  
 中島 淳 (NAKAJIMA JUN)  
 東京大学・医学部附属病院・准教授  
 研究者番号 90188954

## 研究成果の概要:

【目的】治療困難・予後不良な肺癌再発例に対して自己活性化  $\gamma$ -T 細胞( $\gamma$  T)による免疫療法を試み、安全性および有効性について明らかにする。

【対象と方法】原発性肺癌、非小細胞肺癌治療後再発例、本研究に同意された方。評価可能病変を有し、除外基準を持たないことを条件とした。

【結果】腺癌 8 例・扁平上皮癌 1 例・大細胞癌 1 例 計 10 例を対象とした。 $\gamma$  T は 3～12 回投与された(中央値 6 回)。全有害事象は Grade 1 のべ 3 回、Grade 3 のべ 2 回(細菌性肺炎・放射線肺炎)であった。いずれも  $\gamma$  T 治療と関連は無かった。投与後 240～850 日(中央値 445 日)観察され、最終観察時生存 6、死亡 4 例であった。 $\gamma$  T 投与中死亡は見られなかった。死因はいずれも肺癌再発増悪であった。RECICS 判定では 5 回投与後 CR/PR/SD/PD = 0/0/5/4 であった。後観察期間では 0/0/3/5 判定不能 2 であった。CR+PR+SD の割合を病勢コントロール率とすると 5 回投与後では 50%、後観察期間では 30%であった。投与後末梢血中の  $V$  9-  $\gamma$  T 細胞数は次第に増加傾向にあった。FACT-BRM total score の経時的測定においては Grade 3 有害事象症例をのぞき、投与期間中はスコア値が安定ないし上昇し、治療期間中の QOL は良好に保たれた。

【考察】非小細胞肺癌表面に過剰発現する MICA/B を認識する NKG2D を  $\gamma$  T は発現しており、isopentenyl pyrophosphate を TCR/CD3 のリガンドとして認識し、癌細胞に接触・破壊する。体内に多量の自己  $\gamma$  T を投与した場合の安全性ならびに有効性について明らかにしたが、さらに今後はこの細胞障害活性をより効果的に体内で発現させるための方策について検討を進めたい。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科臨床医学・胸部外科学

キーワード:(1) 臨床研究 (2) ガンマデルタ T 細胞 (3) 非小細胞肺癌 (4) 再発  
 (5) 免疫療法 (6) 有害事象 (7) FACT-BRM total score (8) QOL

# 1. 研究開始当初の背景

## 1.1 T細胞の抗腫瘍免疫活性

Tリンパ球には、または TCR を持つリンパ球が存在する。Tリンパ球が獲得免疫(acquired immunity)を担うのに対して、Tリンパ球は自然免疫(innate immunity) に属し、結核などの特殊な細菌感染や腫瘍に対する免疫応答のエフェクター細胞として働いている。また、癌細胞に強く発現している MICA/B を特異的に認識、細胞障害性を発揮するため、Tリンパ球の持つ強い抗腫瘍活性を利用した免疫療法の開発が注目されている。

## 1.2 免疫細胞療法

体外で培養増殖させた免疫細胞を生体内に戻して癌を治療する方法は用いる細胞の違いによって、LAK療法、CTL療法、TIL療法等に分類される。本治療法の最も有利な点は、通常の化学療法やIL2、インターフェロンを用いた免疫療法などで認められる不快な自覚症状や重篤な障害を伴う副作用が殆どないことである。

## 1.3 T細胞の癌免疫における役割

T細胞は、NK細胞のようなinnate immune cellの一種とされており、MHC非拘束性に細胞免疫活性を発揮する。T細胞はT細胞受容体(TCR)を介して、癌細胞内に蓄積したコレステロール代謝の中間産物であるIPP(isopentenyl pyrophosphate)を認識する。癌細胞に発現するMICA/B分子をNKG2D受容体を用いて認識するといわれている(図1)。

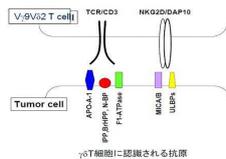


図1 T細胞に認識される抗原

近年 biphosphonate を用いてこの T細胞を細胞培養にて特異的に増殖させる方法が開発された。ヒト末梢血T細胞中の 分画の割合は高々3%程度であるが、biphosphonate を含む培養液中では2週間で細胞数が1000倍以上に増殖しT細胞中の割合も過半数を占める(図2) また、このような細胞を自己体内に戻し、再び末梢血を採血、培養後再び体内に戻すという治療を繰り返すことによって末梢血中に T細胞分画が増加することが示されている(図3)。このような知見を用いることによって、患者自身

の末梢血中の T細胞を実際に増殖、体内に戻す操作を繰り返し、本臨床研究を遂行した。

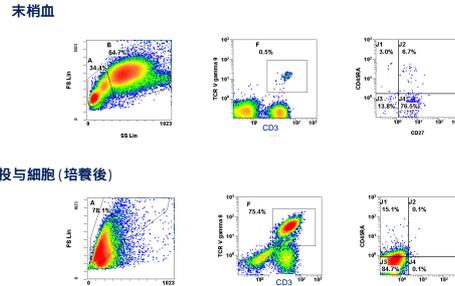


図2:末梢血中における T細胞分画:末梢血(上图)左:単核球成分の gating 中:CD3+ TCRV-gamma9+ T細胞分画(この症例では0.5%) 右:J1(CD45RA+ CD27-) memory cell, J2(CD45RA+CD27+): naïve cell, J3(CD45RA- CD27-) effector memory cell, J4(CD45RA-CD27+) central memory 細胞培養によって T細胞の分画が75.4%に増加、活性のあるCD45RA- CD27- (effector memory cell)が増加することがわかる。

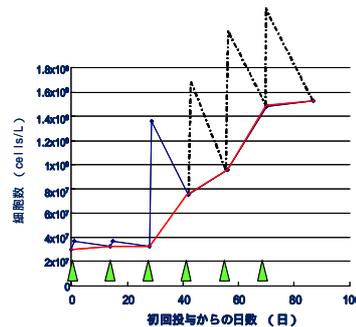


図3 T細胞治療中の末梢血中 T細胞数の推移を示した1例

## 2. 研究の目的

非小細胞肺癌に対する自己 T細胞療法の安全性を用量漸増法により評価・検討する。また副次的に、抗腫瘍効果(奏効率、奏効期間)、腫瘍マーカー、免疫学的パラメータ等を指標に用い、有効性を予備的に探索・検討する。

自己 T細胞療法は、化学療法・放射線療法とは異なる作用機序により、QOLを維持しつつ抗腫瘍効果を期待できる新しい療法であり、癌治療へ応用の検討は臨床上重要な意義をもつものである。

## 3. 研究の方法

### 3.1 対象患者

#### 3.1.1 倫理委員会による本研究の承認

非小細胞肺癌患者。本研究は自主臨床試験であり、本学の倫理委員会で承認された。

### 3.1.2 選択基準 (要約)

- ・非小細胞肺癌と細胞学的・組織学的に確定され、初回治療後に再発した、測定可能病変を有する、T細胞の増殖が可能と判断された成人患者
- ・その他一般状態が本治療に耐えられるもの

### 3.2. 免疫療法の方法 (要約)

- ・事前 T細胞検査により T細胞が増殖し、 $1 \times 10^8$  個以上の T細胞の回収が見込まれる場合、調製(培養)可能と判断する (表1)。

項目	基準値
T細胞増殖率	培養前の100倍以上
T細胞率	60%以上

・文書及び口頭による研究についての十分な説明を行った上で研究への参加を依頼し、患者が本試験の内容をよく理解したことを確認して、患者の自由意思による同意を文書で得る。

- ・試験の種類・デザイン  
単群オープン・用量漸増法の探索的臨床試験
- ・被験者の試験参加予定期間: 122 ~ 126 日間
- ・試験薬の用法、用量、投与期間
- ・初めの5例は<用法用量>に従い、低用量( $1 \times 10^7$  細胞)から投与を開始し、安全性に問題がなければ順次、中用量( $1 \times 10^8$  細胞)、高用量( $1 \times 10^8$  細胞以上)へと同様に漸増する(表2)。
- ・初めの5例において安全性に問題がないと判断された時点で、<用法用量>を用い、次の5症例にて評価、検討を行うものとする(表4)。

表2 <用法用量>

回目	投与量	投与経路	投与間隔
1	$1 \times 10^7$ 細胞	静脈内投与	2週間毎
2	$1 \times 10^8$ 細胞	〃	〃
3	$1 \times 10^8$ 細胞以上の 調製できた全細胞数	〃	〃
4		〃	〃
5		〃	〃
6		〃	〃

表3 <用法用量>

回目	投与量	投与経路	投与間隔
1	$1 \times 10^8$ 細胞以上の 調製できた全細胞数	静脈内投与	2週間毎
2		〃	〃
3		〃	〃
4		〃	〃
5		〃	〃
6		〃	〃

### 3.3 有害事象発生時の取扱

- ・試験責任医師又は試験分担医師は、有害事象の発症を認めたときは直ちに適切な処置を行うとともにカルテおよび症例報告書に記載する。
- ・試験責任医師又は試験分担医師は、試験期間中のすべての重篤な有害事象ならびに、試験終了(中止)後に試験薬との関連性が疑われる重篤な有害事象について、速やかに所属する医療機関の長および共同研究者に報告する。



図4: 研究スケジュールの概要

## 4. 研究成果

### 4.1. 本治療法の安全性に関する検討

本研究に12例が参加同意されたが、2例不適格、10例が参加した。不適格の理由は、2例ともT細胞の培養増殖が不良。

本研究に参加した10名の臨床的特徴は図5の通りであった。

性別 男 : 女 = 8 : 2  
組織型 腺癌 : 大細胞癌 : 扁平上皮癌 = 8 : 1 : 1  
年齢 範囲 40 - 83 (中央値 66)

	前治療	再発部位
03	S, M	肺
04	S, M, I	肺
05	S, C, R	肝臓、リンパ節
06	S	肺
07	S	肺
08	S, C, M, R	肺
09	S, C, R	肺、リンパ節
10	C, M, R	肺
11	S, C, R	肺、リンパ節
12	S, C	肺、リンパ節

S : Surgery, M : Molecular-targeted therapy, C : Chemotherapy  
R : Radiotherapy, I : Immunotherapy

図5 対象例の臨床的特徴

T細胞の投与回数は3回~12回(中央値6回)であった。全有害事象については、Grade1がのべ3例、Grade3がのべ2例に発生した。Grade1は感冒様症候群であり、1例で2回、1例で1回生じた。Grade3の1例は細菌性肺炎、1例は放射線肺炎であった。

Grade3の2例についてはいずれもT細胞治療が有害事象に関連しているとは判断しなかったが、1例についてはT細胞投与は3回行ったところで細菌性肺炎症状をきたした

め、その後投与を中止した。1例は放射性肺炎の増悪のため、4回投与した後投与を中止した。その他1例で投与期間中に肺癌所見の増悪が認められ、本人の希望にて3回投与した後それ以上の投与を中止したが、本症例では特に有害事象は見られなかった(図6)。

### 安全性評価

有害事象名	発生件数			合計
	Grade1	Grade2	Grade3	
感冒様症状群	3	-	-	3
肺/上気道-その他 (細菌性肺炎)	-	-	1	1
肺/上気道-その他 (放射線肺炎)	-	-	1	1
合計	3	0	2	5

図6 有害事象の発生とその内容

### 4.2. 本治療法の効果判定

T細胞投与開始後の観察期間は240-850日間(中央値445日)。最終観察時生存6例、死亡4例であった。T細胞投与中の死亡は無かった。遠隔期死因はいずれも肺癌の増悪であり、治療関連死亡は見られなかった。RECIST判定結果:投与5回目の時点でCR0, PR0, SD5, PD4, 判定不能1であった。後観察期間においてはCR0, PR0, SD3, PD5, 判定不能2であった。

CR+PR+SDの割合を病勢コントロール率とすると、投与5回目では50%、後観察期間では30%であった(図7)。

	3回目投与後	5回目投与後	後観察	無増悪期間(日)
03	PD	PD	PD	35
04	SD	PD	PD	64
05	SD	SD	PD	106
06	SD	SD	SD	197
07	SD	PD	PD	64
08	SD	-	-	35*
09	SD	SD	SD	106*
10	SD	SD	-	60*
11	PD	-	-	42
12	SD	SD	SD	142

図7 本治療における効果判定: T細胞3回目投与後、5回目投与後、後観察1の時点におけるRECIST判定。

実際の症例における測定可能な再発転移巣の経時的変化について1例画像を示す(図8)。

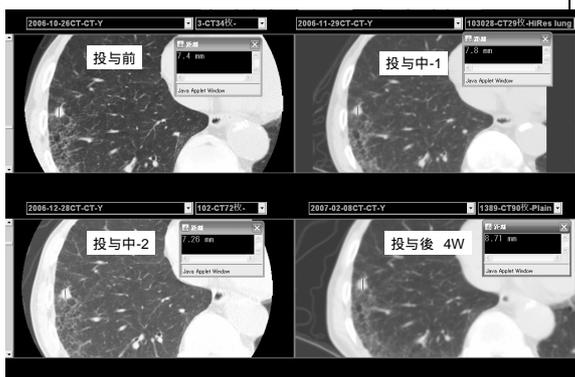


図8: T細胞治療中の評価病変の変化の1例(症例番号6 肺転移巣)

### 4.3. 末梢血中の T細胞数の変動:

T投与後に末梢血中の細胞数を検討した。末梢血におけるV $\beta$ 9-T細胞数を、FCMを用いて絶対数と単核球中に占める割合について経時的に検討した。当該分画は末梢血においても次第に増加する傾向にあった(図9)。

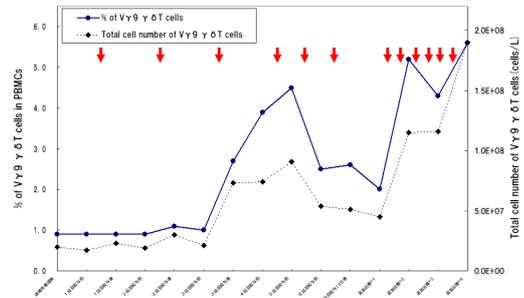


図9 T細胞投与と末梢血中の T細胞数の推移を示した1例

### 4.4 治療中のQOLに関する検討

治療中のQOLの指標としてFACT-BRM total scoreを経時的に測定した。投与期間中肺炎など合併症を起こした(直接投与に関連しないと思われる合併症)症例を除いて、投与期間中のFACT-BRMは安定むしろ上昇に転じており、本治療期間中にQOLが十分保たれることがわかった(図10)。

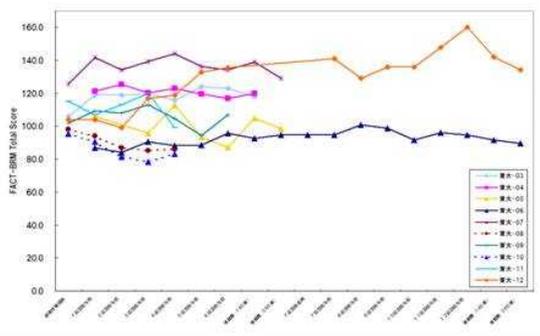


図10 FACT-BRM total scoreの変動(全例)。点線で示した症例(東大8,10)がGrade3有害事象のため投与を中止した。

### [考察]

T細胞分画はB細胞、T細胞分画と同様に4億五千万年前の有顎脊椎動物登場の頃に分化したと考えられている。本分画は比較的最近発見された。

T細胞は個体発生上T細胞より早期に出現し、T細胞とは異なった性質を有する細胞集団である。T細胞と比べるとT細胞のV領域のレパートリーは少なく、また鎖の組み合わせには一定の法則があり、多様

性は制限されている。また、レパトリーごとに特定の臓器に集中して存在する特徴を有している。末梢血中にはV 9V 2が過半数を占めている。また、幼少時には末梢血中のV 9V 2T細胞の多くはmemory cellであり、発生早期から繰り返し刺激が行なわれることが示唆されている。

T細胞はself "stress antigens"、たとえばheat shock proteinsに反応して活性化する。Heat shock proteinの刺激でMHC class I chain-related genes (MICA, MICB)が発現し、これをT細胞が認識することがわかった。

MICA/Bは感染細胞や癌細胞で過剰発現する。特に非小細胞肺癌では乳癌、腎癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌など同様にMICA、MICBがしばしば過剰発現されている。V 9V 2T細胞表面にはNK細胞と同様にNKG2Dが発現しており、これのリガンドとしてMICA/Bを認識する。

末梢血中のV 9V 2T細胞はMICA・Bを発現する細胞表面のリン酸化抗原を認識する。特に癌細胞においては、コレステロール代謝経路の中間産物であるisopentenyl pyrophosphate (IPP)を、TCR/CD3のリガンドとして認識する。

このように認識された細胞にV 9V 2T細胞が接触した後はCD8+ T細胞と同様の機序によってtarget cell lysisが起こるとされている。

V 9V 2T細胞のclonal expansionは通常はこの細胞接触刺激によっておこるが、近年ex vivoにてzoledronateを加えた培養液内で特異的な増殖をしますことがわかってきた。

Zoledronateはbiphosphonatesの1種である。biphosphonatesはカルシウムイオンのキレーターであり、腫瘍浸潤転移による溶骨による高カルシウム血症を治療するものとして開発された。作用機序としては、farnesyl diphosphate (FPP) synthaseを阻害し、破骨細胞の活性を阻害するとされている。この阻害作用は腫瘍細胞そのものにも影響があり、Rasを消失せしめ、下流のERK、Aktパスウェイを阻害することによって増殖抑制をおこすとされている。

また、前述のとおりZoledronateはコレステロール代謝においてfarnesyl pyrophosphate synthaseを阻害し、上流のIPPを蓄積させるが、これがV 9V 2Tによる腫瘍細胞の認識、さらにclonal expansionにむすびつくことにより、免疫活性化をきたす可能性が示唆されている。zoledronateそのものにanticancer effectがあるかどうかということについて検討がなされてきた。Gefitinibとの併用において、zoledronateが相乗作用があるという報告がなされている。ただしこれはcell line上の話である。

Pamidronateの投与が、T細胞の活性化に關与し、抗癌作用に結びついたのではないかという報告も見られる。

前立腺癌ではzoledronate + IL-2という臨床研究が行なわれている。zoledronate単独では無効だったが、IL-2を投与することによってPSA値を下げる作用が認められたとしている。

一方、逆にbiphosphonateが免疫作用を抑制するという報告も見られる。

体外でサイトカイン等を加えた培地にて増殖させた免疫細胞を生体内に戻して癌を治療する試みは1980年頃より米国National Cancer Institute (NCI) 外科のRosenberg教授を中心として行われてきた。免疫細胞は体外で腫瘍細胞と接触すると腫瘍細胞を障害、殺傷することができるという知見に基づくもので、治療に用いる細胞の培養方法の違いによって、LAK療法、Cytotoxic T-lymphocyte (CTL)療法、Tumor-infiltrating lymphocyte (TIL)療法等に分類される。

LAKは、米国NCIの外科を中心にして大規模な臨床試験が行なわれ1985~1987年に報告された。しかし、腎細胞癌と悪性黒色腫に対しての大量のInterleukin 2 (IL-2)投与におけるLAK療法の上乗せ効果は否定的であった。

しかし現在、わが国でLAK療法、または「活性化自己リンパ球移入療法」のほとんどは、患者への大量のIL-2の投与は行われておらず、LAK細胞の培養技術の革新とともに様々な投与方法がとられている。主流となっている方法は、末梢血中のT細胞を分離し、抗CD3抗体を用いてT細胞受容体を介した強力な刺激増殖シグナルをT細胞に送り、更にIL-2の存在下で培養して急速に増殖させた後に体内に戻す方法がとられている。この方法についてはわが国では有効性が認められており、高度先進医療として複数の施設で行われている。

ゾレドロン酸などのビスホスホネート製剤が、末梢血単核球培地中のV 9 2T細胞の増殖を誘導し、in vitroにおいてV 9 2T細胞の多発性骨髄腫に対する細胞傷害活性及び抗腫瘍効果を有するサイトカイン、Interferon-gamma (IFN)を増加させたと報告されている。

T細胞の自己戻し臨床試験については他の新生物では報告が見られる。Wilhelmらは、低悪性度非ホジキンリンパ腫或いは多発性骨髄腫患者らにパミドロネート及びIL-2を投与し、in vitro及びin vivoでT細胞の増殖が確認された5例のうち2例においてPR(部分寛解)が得られたと報告している。また32例の腎癌における臨床報告では、Kaplan-Meier法によるwithout disease progressionにおいて中間期間が25.7週という結果を得ている。1 - 8x10<sup>9</sup>の細胞を用いて治療をおこなったところ安全性については特に問題が無いと報告された。

われわれの臨床試験における自己増殖活性化T細胞における非小細胞肺癌再発例に対する検討においては、患者背景が、前治療にもかかわらず評価可能な明らかな病変としての再発を示した症例であり、通常の治療に抵抗性であるにもかかわらず、CR + PR + SDの割合を病勢コントロール率とすると、投与5回目では50%、後観察期間では30%であり、また本治療中、本治療が直接引き起こしたとおもわれる有

害事象は見られなかった。しいて言えば、放射線肺炎など間質性肺炎の活動期においては本治療法が体内におけるサイトカインバランスに関与し、間質性肺炎を悪化させるのではないかという懸念はもたれたが確たる証拠があるわけではなく、おおむね安全性については問題無いと判断された。さらに投与期間中、中途中止例を除き QOL は良好に保たれ、一定の結果が得られたものと評価する。

### [結果のまとめ・結論]

小細胞肺癌患者(再発例または標準治療抵抗例)に対する T 細胞治療の前向き臨床研究を行った。

安全性: T 細胞投与との関連性が疑われる有害事象はみられなかった。

有効性: T 細胞投与開始から約 2 ヶ月後(投与 5 回目)に 50.0%、約 3 ヶ月後(後観察)に 30.0%の病勢コントロール率が得られた。

以上より、非小細胞肺癌患者(再発例または標準治療抵抗例)に対し、T 細胞治療は安全に施行できることがわかった。今後、非小細胞肺癌に対して研究を継続し、投与量・投与回数等をさらに検討する。また、呼吸器外科領域における難治性悪性疾患である転移性肺腫瘍や悪性縦隔腫瘍性疾患にたいする治療効果についてもさらに研究発展を試みたい。

## 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 5 件)

Kakimi K, Nakajima J, Wada H. Active specific immunotherapy and cell-transfer therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. Lung Cancer 64: 2009 ;65:1-8. (査読あり)

Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Sato K, Sato S, Sato K, Hosoi A, Nakajima J, Yoshida Y, Shiraiishi K, Nakagawa K, Kakimi K. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. Cytotherapy 2008, 10: 842-856 (査読あり)

中島 淳, 垣見和宏, 村川知弘, 深見武史, 吉田幸弘, 日下部将史, 杉浦末紀, 桑野秀規, 木村公則, 高本眞一. 生体防御と肺癌 自己活性化 T 細胞  $\gamma\delta$  による非小細胞肺癌免疫療法肺癌 2008, 48(5): 407 (査読あり)

倉知 慎, 垣見和宏, 松島綱治 エフェクター CD8+T 細胞とメモリー CD8+T 細胞のバランス決定要因。臨床免疫・アレルギー科 2008, 49(5):533 - 539 (査読あり)

中島 淳【セカンドオピニオン実践ガイド 実地診療にも役立つ病期・病態別治療指針】主要疾患の病期・病態別治療法 肺癌 Medical Practice 2007,24(suppl): 118-124 (査読なし)

(学会発表) (計 3 件)

中島 淳, 垣見和宏, 村川知弘, 深見武史, 吉田幸弘, 日下部将史, 杉浦末紀, 桑野秀規, 木村公則, 高本眞一 自己活性化 T 細胞  $\gamma\delta$  による非小細胞肺癌免疫療法 第 49 回日本肺癌学会総会 2008 年 11 月 14 日 北九州市

近藤 真, 作田和子, 野口敦崇, 有吉直子, 佐藤和聡, 佐藤志保, 佐藤啓介, 細井亮宏, 中野由貴子, 木村公則, 垣見和宏 ソレドロン酸を用いて培養した V $\gamma$ 9V $\delta$ 2T 細胞による免疫細胞治療。第 12 回基盤的癌免疫研究会総会 2008 年 7 月 さいたま市

垣見 和宏 細胞治療の基盤と臨床応用  $\gamma\delta$ T 細胞を用いた免疫細胞治療の取り組み 第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会 2007 年 6 月 1 日 名古屋市

(図書) (計 3 件)

垣見和宏 がんと免疫 免疫細胞治療について PTM: 再診の疾患別治療マニュアル 2008 年 総 2 頁

中島 淳 [セカンドオピニオン実践ガイド 実地診療にも役立つ病期・病態別治療指針] 肺癌 (共著) 2007 総 7 頁

中島 淳 MOOK 肺癌の臨床 2007-2008 治療(非小細胞肺癌)肺線維症を合併する肺癌に対する治療方針(共著) 2007 221 - 228 総 8 頁 篠原出版新社, 東京

(産業財産権) ○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

(その他) 研究成果に関する WEB ページ

<http://ctstokyo.umin.ne.jp/thoracic/ts.htm>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 淳 (NAKAJIMA JUN)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 90188954

(2) 研究分担者

垣見 和宏 (KAKIMI KAZUHIRO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 80273358

村川 知弘 (MURAKAWA TOMOHIRO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 50359626

深見 武史 (FUKAMI TAKESHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40396742

倉知 慎 (KURACHI MAKOTO)

東京大学・医学部・助教

研究者番号: 00396722

(3) 連携研究者 (なし)