

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791269

研究課題名（和文） 肝細胞癌肝外転移に対する免疫細胞治療の有効性と安全性の評価

研究課題名（英文） Efficacy and safety of the immunotherapy using auto $\gamma\delta$ T lymphocyte for extrahepatic metastasis from hepatocellular carcinoma

研究代表者

有田 淳一（ARITA JUNICHI）

公益財団法人がん研究会・有明病院消化器外科・医員

研究者番号：20463838

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌肝外転移症例を対象として、自己活性化 $\gamma\delta$ T細胞を用いた免疫細胞治療を施行した。さらに対象を拡大し、同じ原発性肝癌である肝内胆管癌切除後症例に対して Gemcitabine を用いた全身化学療法に $\gamma\delta$ T細胞免疫療法を併用して施行した。研究期間中に前者3例、後者8例のエントリーがあった。安全性は確認されたが、無増悪期間については従来の治療法と比較して優越性は認められなかった。評価対象数が少ないため、さらなる症例蓄積が必要と思われた。

研究成果の概要（英文）：An immunotherapy using auto $\gamma\delta$ T lymphocyte was conducted in patients with extrahepatic metises from hepatocellular carcinoma. In addition, an adjuvant therapy using combination of Gemcitabine and auto $\gamma\delta$ T lymphocyte immunotherapy was conducted for postoperative patients with intrahepatic cholangiocarcinoma, as a primary liver cancer like hepatocellular carcinoma. Three patients were enrolled in the former setting and 8 patients were enrolled in the latter setting. The safety of the therapy was confirmed, but the benefit in terms of progression-free survival was unclear. Because of the scarcity of the included patients, further enrollment of patients and follow-up will be necessary.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝細胞癌、遠隔転移、免疫細胞療法、 $\gamma\delta$ T細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌肝外転移の疫学

厚生労働省の人口動態総覧によると、平成17年度は、男23,203人、女11,065人が肝癌（肝細胞癌及び肝内胆管癌）により死亡しており、悪性新生物による死亡率としては、男

では肺癌、胃癌に次いで第3位、女では大腸癌、胃癌、肺癌に次いで第4位となっている。通常肝細胞癌の転移様式は、門脈を経由しての肝内転移が主であるが、肝内病巣が進展すると種々の肝外転移を来すことは稀ではない。「第17回全国原発性肝癌追跡調査報告」

によると、転移巣は全 16236 患者中、肺 1.6%、骨 1.3%、リンパ節 1.2%、副腎 0.4%、腹膜 0.3%、脳 0.1%の順であった。術後の再発様式としては肝内が 80%であり最も頻度が高いが、肝外転移再発の様式をとる頻度も全体で 5.3%であり、決して稀とはいえない（順位は、肺 1.8%、骨 1.7%、リンパ節 0.6%、副腎 0.3%、腹膜 0.3%、脳 0.2%であった）

(2) 肝細胞癌肝外転移患者に対する治療

肝細胞癌の根治的治療法には肝移植、肝切除、局所療法（ラジオ波焼灼療法など）がある。しかしながら、根治的治療後も肝内再発を高頻度に起こす性質を有しており、肝切除後に限局すると 5 年間で 60-80%もの患者が肝内再発を起こす。肝内再発を起こしても根治的治療の再施行あるいは経カテーテル的肝動脈塞栓療法が可能であり、十分制御し得るが、治療を繰り返している間に肺・副腎・骨・脳などの肝外に転移を起こすことを稀ならず経験する。肝外転移のうち肺転移は数が 2-3 個以内であれば外科的切除による根治が期待できるとの報告もあるが、まだ世界的なコンセンサスは得られていない。その他の肝外転移に対する治療としても、5-FU 系抗癌剤を中心とした全身化学療法が軸となり、これに姑息的治療として外科的切除やラジオ波焼灼（肺など）、あるいは放射線治療を加えているが、肝内再発病変に比べて明らかに治療効果が乏しく、現時点では肝外転移を有した時点で患者の生命予後は格段に悪くなる。肝細胞癌肝外転移に対する標準治療は存在せず、科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン 2005 年版においても、肝細胞癌に対する化学療法に関して「化学療法の適応について科学的根拠がある推奨はない。（グレード C1: 行うことを考慮してもよいが、十分な科学的根拠がない）」と結論している。

(3) 活性化自己 $\gamma\delta$ T 細胞療法

T 細胞は、T 細胞受容体の発現の仕方により 2 種のサブセットに分類される。大半は $\alpha\beta$ T 細胞受容体ヘテロ二量体を発現する $\alpha\beta$ T 細胞であり、癌免疫においても、MHC クラス I (CD8 陽性 T 細胞) もしくは MHC クラス II (CD4 陽性 T 細胞) に提示される抗原ペプチドを認識する MHC 拘束性 $\alpha\beta$ T 細胞が、抗腫瘍効果を示していると考えられてきた。しかし、最近、CD3 関連 $\gamma\delta$ ヘテロ二量体からなる T 細胞受容体発現 T 細胞 ($\gamma\delta$ T 細胞) が、癌治療において注目を浴びている。

$\gamma\delta$ T 細胞は、自らサイトカインを産生し、また抗腫瘍効果を有するサイトカインを産生する細胞を活性化するなど、 $\alpha\beta$ T 細胞と似た機能を有しているが、抗原提示細胞のプロセッシングを受けない抗原を MHC 非拘束的に認識するなど、 $\alpha\beta$ T 細胞と異なる性質も有している。さらに、 $\gamma\delta$ T 細胞は、サイ

トカインの産生を通して、 $\alpha\beta$ T 細胞の反応を直接的或いは間接的にコントロールするものと考えられている。

ヒト成人の末梢血中の主要な $\gamma\delta$ T 細胞である $V\gamma 9\delta 2$ T 細胞は、T 細胞受容体可変領域に特有の $V\gamma 9$ と $V\delta 2$ の組み合わせを持ち、末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞の 50~95%を占める。 $V\gamma 9\delta 2$ T 細胞の表面分子である NKG2D は、発癌或いは感染時に誘導される癌細胞表面分子 MICA/B 或いは ULBPs に結合し、標的癌細胞の認識及び殺傷に寄与しており、MHC 発現を低下もしくは消失して $\alpha\beta$ T 細胞による免疫監視機構を回避できた腫瘍に対しても、 $V\gamma 9\delta 2$ T 細胞は抗腫瘍活性を発揮することが期待される。

(4) これまでの活性化自己 $\gamma\delta$ T 細胞療法の成績

ゾレドロン酸などのビスホスホネート製剤が、*in vitro* において $V\gamma 9\delta 2$ T 細胞の増殖を誘導する。 $\gamma\delta$ T 細胞は多発性骨髄腫に対する細胞傷害活性を示し、抗腫瘍効果を有するサイトカインである $IFN\gamma$ を産生することが知られている。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ビスホスホネート製剤（パミドロネート）及び IL-2 を投与し、 $\gamma\delta$ 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、前治療耐性固形癌患者 13 例に $\gamma\delta$ T 細胞療法 [総投与回数 3~26 回/例 (中央値: 8 回/例); 投与 $\gamma\delta$ T 細胞数の最大数 0.35~10 × 10⁸ 個/回 (中央値: 4.1 × 10⁸ 個/回)] を施行したところ、主な有害事象は発熱であり、重篤な有害事象は発生しなかったとの海外報告がある。

さらに、国内においては、本学でも非小細胞肺癌を対象とした臨床研究が進行中であり、安全性で問題は見られておらず、骨転移を対象とした臨床研究も本学倫理委員会の承認を得て患者登録を開始している。また、日本赤十字社医療センターにて多発性骨髄腫を対象とした本療法の pilot study が終了し、安全性に問題はなく、有効性を示唆する所見が観察されている。

2. 研究の目的

肝細胞癌の肝外転移に対しては 5-FU 系抗癌剤を中心とした全身化学療法を軸として、様々な治療が試みられているものの、肝内再発病変に比べて明らかに治療効果が乏しい。自己 $\gamma\delta$ T 細胞療法は既述の通り、化学療法・放射線療法とは異なる作用機序により、抗腫瘍効果を期待できる新しい療法であり、有効な治療方法のない肝細胞癌からの肝外転移を有する患者に対する治療効果が期待できるものと考え、その有効性と安全性を評価し、自己 $\gamma\delta$ T 細胞治療の臨床応用を検討

するため本研究を計画した。本研究により、肝外転移を有する患者の標準治療の確立の第一歩となりことが期待される。

3. 研究の方法

単群オープン臨床研究。事前 $\gamma\delta T$ 細胞検査で培養が可能と判断されるなど適格性が確認された被験者を登録する。被験者から成分採血または全血採血により単核球を採取し、ゾメタを用いて $\gamma\delta T$ 細胞を増殖・活性化させる。培養後、1週間間隔で4回、その後2週間間隔で4回 $\gamma\delta T$ 細胞の投与を行う。投与終了後4週間の後観察を行う。

研究全体のアウトライン

同意説明



同意取得



適格性確認／事前検査



登録



細胞採取[治療前観察期間 2-4 週間]

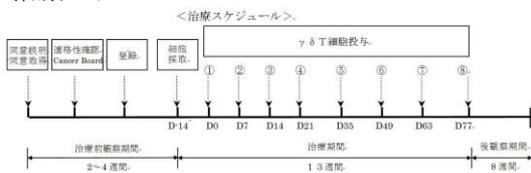


$\gamma\delta T$ 細胞投与[治療期間 13 週間]



後観察[後観察期間 22 ヶ月]

治療スケジュール



評価項目

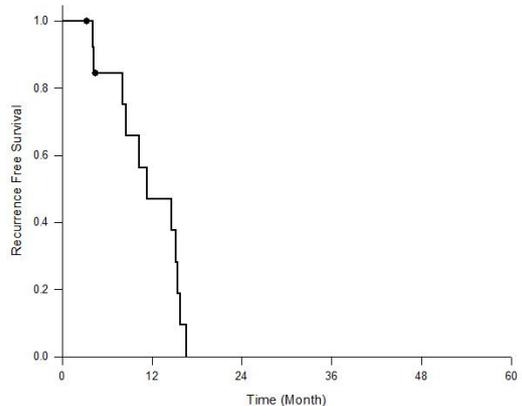
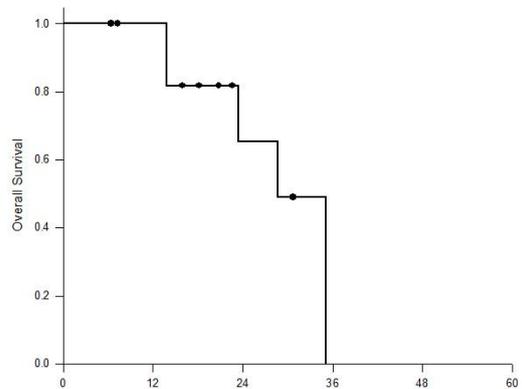
主要評価項目は無増悪生存期間とする。副次的評価項目として、安全性（有害事象の種類と程度、発生時期、発生頻度、発生期間、発現率、活性化自己 $\gamma\delta T$ 細胞治療との因果関係）に加え、全生存期間、腫瘍縮小効果、生存率（1年及び2年）、腫瘍マーカーの推移、免疫学的反応性とする。なお、腫瘍縮小効果の評価については、RECISTを用いることとする。

4. 研究成果

肝細胞癌肝外転移に対しては3人のエントリーがあり、うち1人のみ試験治療が実施された。2人の非実施群はともに $\gamma\delta T$ 細胞培養不良のため不適格となった。実施1人は最大12回の培養 $\gamma\delta T$ 細胞の投与のうち4回まで実施されたがその後病変の進行に伴い全身状態が悪化し、初回投与後43日でご逝去された。その後、大規模臨床試験が終了し肝細胞癌肝外転移に対して有効性が示された分子標的薬 Sorafenib が認可され、実地臨床

では標準治療として行われるようになり、等臨床試験治療はセカンドラインとしての位置づけとなり、患者登録がされなかった。治療実施患者が少なく、有効性、安全性ともに評価不能であるが、少なくとも有効性が示される結果とは言えなかった。

肝内胆管癌に対する Gemcitabine と $\gamma\delta T$ 細胞免疫療法を併用した術後補助療法に関しては16人がエントリーし、うち3人が非実施群となった。内訳は HTLV 抗体陽性、同意撤回、 $\gamma\delta T$ 細胞培養結果不良が各々1人ずつであった。13人の実施群では最大投与回数8回を完遂したのが11人で、その他2回が1人、6回が1人であった。生命予後についての結果は、全生存期間中央値は20.2ヶ月、無再発生存期間中央値は7.5ヶ月であった。第18回全国原発性肝癌追跡調査報告では肝内胆管癌患者の切除後生存期間中央値は、リンパ節転移陽性で13.1ヶ月、断端陽性で16.8ヶ月、腫瘍多発で14.2ヶ月であり、統計学的有意差は出ないものの、同条件の患者と比較して良好な生命予後が出る可能性が示唆された。一方、安全性に関しては実施全11人の患者で治療に伴う有害事象はなかった。以上より、進行肝内胆管癌患者に対する Gemcitabine と $\gamma\delta T$ 細胞免疫療法を併用した切除後補助療法は、安全かつ有用である可能性が示唆された。ただし、実施症例数が十分でないため、今後の症例の蓄積に期待したい。



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9件)

- ① Sakamoto M, Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, Yoshida Y, Murayama T, Takamoto S, Matsushita H, Kakimi K. Adoptive immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer using zoledronate-expanded $\gamma\delta$ T cells: a phase I clinical study. *J Immunother*, 査読有, 34(2) 2011, 202-211.
- ② Nakajima J, Murakawa T, Fukami T, Goto S, Kaneko T, Yoshida Y, Takamoto S, Kakimi K. A phase I study of adoptive immunotherapy for recurrent non-small cell lung cancer patients with autologous gammadelta T cells. *Eur j cardiothorac Surg*, 査読有, 37(5) 2010, 1191-1197.
- ③ Yoshida Y, Nakajima J, Wada H, Kakimi K. $\gamma\delta$ T-cell immunotherapy for lung cancer. *Surg Today*, 査読有, 41(1) 2011, 606-611.
- ④ 國土典宏. がん特異的免疫療法の将来像. *Cancer Review (日経メディカル)*, 査読無, 8月号 2009, pp.35.
- ⑤ Sato K, Kondo M, Sakuta K, Hosoi A, Noji S, Sugiura M, Yoshida Y, Kakimi K. Impact of culture medium on the expansion of T cells for immunotherapy. *Cytotherapy*, 査読有, Aug 31 2009, 1-11.
- ⑥ Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, Ariyoshi N, Sato K, Hosoi A, Nakajima J, Yoshida Y, Shiraishi K, Nakagawa K, Kakimi K. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*, 査読有, 10(8) 2008, 842-856.
- ⑦ 青木琢、垣見和宏、國土典宏. 【膵癌診療と研究の最先端】 術後補助療法としての自己 $\gamma\delta$ T細胞免疫治療. *胆と膵*, 査読無, 32 2011, 893-898.
- ⑧ 野地秀一、瀬戸泰之、垣見和宏. 【外科医のための最新癌薬物療法】(III章)薬物療法 あらたな展開 免疫細胞治療. *臨床外科*, 査読無, 66 2011, 276-284.
- ⑨ Kondo M, Izumi T, Fujieda N, Kondo A, Morishita T, Matsushita H, Kakimi K. Expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells using zoledronate. *J Vis Exp*, 査読有, pii, 2011, 3182.

[学会発表] (計7件)

- ① Kakimi K, Izumi T, Kondo M, Fujieda N, Kondo A, Morishita T, R. Maekawa, Matsushita H. Requirement for common g chain family cytokines for adoptive transferred $\gamma\delta$ T cell function and homeostasis in vivo. *Immunology 2011: 98th Annual Meeting The American Association of Immunologist 2011*. 2011年5月, San Francisco.
- ② Kakimi K, Izumi T, Kondo M, Fujieda N, Kondo A, Tamura N, Maekawa R. Requirement for comon γ chain cytokines for adoptive transferred $\gamma\delta$ T cell function and homeostasis in vivo. *The 2nd Meeting of Asian Cellular Therapy Organizaition 2011*, 2011年10月, Miyazaki.
- ③ 近藤篤、藤枝奈緒、森下岳晴、近藤真、泉謙道、前川隆司、松下博和、垣見和宏. 細胞移入治療により末梢血中に蓄積された $\gamma\delta$ T細胞の機能評価. 第49回日本癌治療学会総会/学術集会. 2011年10, 愛知県.
- ④ 青木 琢、垣見和宏、國土典宏. 膵癌術後補助療法としての全身化学療法・自己 $\gamma\delta$ T細胞免疫治療併用療法. 第97回日本消化器病学会総会, 2011年5月, 東京.
- ⑤ Kakimi K, et al. Adoptive $\gamma\delta$ T cell transfer for non-small cell lung cancer. *AACR 101st Annual Meeting 2010*, April 2010, Washington DC, USA.
- ⑥ 垣見和宏, 他. がんに対する免疫細胞治療～がんワクチンと細胞移入療法～. 第19回日本癌病態治療研究会, 2010年6月, 東京.
- ⑦ 垣見和宏, 他. Cell therapy(細胞療法)の新たなアプローチ:ゾレドロン酸を用いて培養した $V\gamma9V\delta2$ T細胞による免疫細胞治療. 第13回日本がん免疫学会総会, 2009年6月, 北九州市.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 淳一 (ARITA JUNICHI)
公益財団法人がん研究会・有明病院消化器
外科・医員
研究者番号：20463838

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし