

論文の内容の要旨

論文題目 進行再発非小細胞肺癌に対する $\gamma\delta$ T 細胞移入療法

指導教員 中島 淳 准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 坂本 未紀

研究の背景と目的

非小細胞肺癌の主な治療法は手術、化学療法、放射線療法だが現時点において未だ難治性の疾患であり、さらなる治療法の開発が求められている。

近年悪性腫瘍に対する免疫療法は新たな治療選択として注目を集めている。細胞移入療法の一つである $\gamma\delta$ T 細胞治療は、末梢血より分離した $\gamma\delta$ T 細胞を体外で増殖させた後に点滴投与する治療である。

$\gamma\delta$ T 細胞は MHC class I 非拘束性に抗原認識を行い、自然免疫として感染や腫瘍に対する免疫監視機能を担っている。 $\gamma\delta$ T 細胞は $V\gamma 9\delta 2$ T 細胞受容体を介して腫瘍細胞で蓄積しているホスホアンチゲンと呼ばれる非ペプチドリン酸化合物を認識する。また腫瘍細胞が発現する MHC class I-chain-related antigens (MIC) A を NKG2D 受容体で認識する。

近年末梢血中の $V\gamma 9\delta 2$ T 細胞を合成ホスホアンチゲンやアミノビスホスホネートを用いて体外で培養することが可能になった。培養 $\gamma\delta$ T 細胞は非小細胞肺癌を含めたさまざまな癌腫の細胞系に対し細胞傷害活性を示し、これまでに腎細胞癌、多発性骨髄腫に対する $\gamma\delta$ T 細胞移入療法が行われてきた。

われわれはゾレドロネートと IL-2 を用いて $\gamma\delta$ T 細胞を効率的に培養する方法を確立し、2006 年に進行再発非小細胞肺癌患者に対する $\gamma\delta$ T 細胞移入療法を開始した。非小細胞肺癌に対する $\gamma\delta$ T 細胞移入療法は本臨床試験が初めてで

ある。本研究においては、自己 γ δ T 細胞の特性と肺癌細胞株に対する細胞傷害活性を検討し、また臨床試験における投与後の血中動態、臨床的効果を解析し、 γ δ T 細胞投与が生体に与える影響を解明することが目的である。

方法と結果

1. 培養 γ δ T 細胞の特徴

末梢血単核球細胞をゾレドロネートと IL-2 を用いて 14 日間培養すると γ δ T 細胞が選択的に増殖した。末梢血中では CD45RA⁻ CD27⁺ central memory type (T_{CM}) 優位だが、培養後は CD45RA⁻ CD27⁻ effector memory type (T_{EM}) の割合が増加し、他のフェノタイプはほとんど見られなかった。

γ δ T 細胞はゾレドロネート処理した肺癌細胞株 (NCI-H1299 細胞、A549 細胞、NCI-H460 細胞) に対し細胞傷害活性を示したが、NCI-H1299 細胞が最も感受性が高かった。表面抗原発現を測定すると NCI-H1299 細胞では MICA、CD54、CD166 の発現が認められた。肺癌細胞株の抗癌剤感受性と γ δ T 細胞に対する感受性には関連を認めず、 γ δ T 細胞は抗癌剤抵抗性の肺癌細胞株に対しても細胞傷害活性を発揮した。

培養 γ δ T 細胞の細胞傷害活性には、FasL などの膜表面上の分子よりもグランザイムやパーフォリンなどの細胞傷害顆粒の分泌が関わっていた。培養 γ δ T 細胞の血中での維持に関与する因子を調べるために培養 14 日目の γ δ T 細胞を IL-2、IL-7、または IL-15 を添加し追加培養を行うと、IL-15 は低濃度でも γ δ T 細胞の生存を改善した。

2. 臨床試験の解析

単群オープン第 1 相臨床試験であり、培養 14 日目の γ δ T 細胞を経静脈的に 2 週間ごと 6 回投与した。15 症例に投与を開始し、2 症例が有害事象で、1 症例が病状進行で中断となり、終了後の評価で 1 症例が不適格となった。有害事象は 5 症例にみられたが γ δ T 細胞投与と直接の関係を認めなかった。

培養細胞中の γ δ T 細胞数、比率は各症例、各投与で異なり、事前検査時の末梢血中 γ δ T 細胞率が 0.5% 以下の症例では得られる γ δ T 細胞数と比率が低かった。 γ δ T 細胞率の低い培養細胞には γ δ T 細胞以外の細胞が含まれていたが、抑制性 T 細胞が多く含まれていたのは症例 15 のみであった。当初は十分な γ δ T 細胞数が得られた症例においても回数を重ねるにつれて得られる γ δ T 細胞数が低下した。しかし、投与回数による変化をみるために投与 1 回目と 4 回目の培養細胞の細胞傷害活性を比較したが差を認めず機能は保たれていた。培養 γ δ T 細胞の細胞傷害顆粒分泌能を調べるために CD107a/b の発現を測定すると、症例ごとに発現レベルに差を認めるものの全症例で発現を確認した。しかし、症例 6、8、9、10、15 のように低い発現を示す症例も存在した。すべての症例

で培養細胞による TNF- α 、IL-8、IFN- γ の産生がみられたが、症例 9 は IL-5、および症例 15 は IL-5、TNF- β 、IL-10、IL-17 の産生も確認された。

血中動態を調べると末梢血中 γ δ T 細胞は投与回数を重ねるにつれて増加し、T_{EM} 優位へと変化した。末梢血中 γ δ T 細胞の増加の程度は症例により異なり、症例 10、15 は増加の程度が低かった。

14 症例の中央生存期間は 589 日、中央無増悪生存期間は 126 日であった。臨床的効果は RECIST 基準にて 6 回投与終了 4 週間後の時点で 6 症例が SD、6 症例が PD であった。経過中 7 例で IFN- γ が検出されたが臨床的効果との間に有意差を認めなかった。3 症例において事前検査時に血漿中 MICA が検出されともに PD であった。

FACT-BRM スコアによる QOL は経過中安定しており改善を認めた症例も存在したが、肺炎をきたした症例 6 と肺臓炎をきたした症例 8 では低下傾向にあった。経過中すべての時点において SD の症例と PD の症例に有意な差は認めなかった。

考察

γ δ T 細胞の非小細胞肺癌細胞株に対する細胞傷害活性を検討すると抗癌剤に最も抵抗性の NCI-H1299 細胞が γ δ T 細胞に最も感受性が高かった。NKG2D リガンドの MICA や γ δ T 細胞が γ δ 型 T 細胞受容体で腫瘍細胞を認識する際の安定化に関与する CD54、CD166 を発現していることが関係していると考えられた。遺伝子変異や抗癌剤抵抗性がある腫瘍細胞もこれらの分子を発現しているため、 γ δ T 細胞は抗癌剤抵抗性の肺癌に対しても抗腫瘍効果を発揮すると考えられる。

われわれの培養方法では進行再発症例を対象にしているにも関わらず 19 例中 16 例で十分な γ δ T 細胞を培養可能であり、そのうち 15 例に投与を行うことができた。しかし、培養で得られた γ δ T 細胞数、比率は各症例、培養で差を認め、また症例 15 では抑制性 T 細胞を認めた。抑制性 T 細胞は γ δ T 細胞の増殖も制御しているため培養細胞中に存在するのは望ましくない。細胞傷害性試験においては症例ごとの差を認めなかったが、 γ δ T 細胞数や比率の悪い培養となった症例では 107a/b 発現が低く、また症例 9 と症例 15 は他の培養細胞とは異なるサイトカイン分泌パターンを示した。培養細胞中に CD4 細胞、CD8 細胞、NK 細胞が一定数含まれていても CD107a/b 発現やサイトカイン分泌に影響しない症例もあり、培養細胞の検討には機能面での評価が必要と考えられた。

本臨床試験においては IL-2 同時投与を施行していないが、末梢血中 γ δ T 細胞は投与回数を重ねるにつれて増加し T_{EM} 優位となった。培養 γ δ T 細胞はほとんどが T_{EM} フェノタイプを示すことより、投与した γ δ T 細胞が一定期間末梢血中に蓄積したと考えられた。In vitro の検討では低濃度 IL-15 を添加すること

で γ δ T 細胞の生存が著しく改善し、培養 γ δ T 細胞は IL-2 よりも IL-15 依存的事であることを示唆している。IL-2 は発熱などの有害事象を引き起こすため、非小細胞肺癌のように IL-2 投与が直接の抗腫瘍効果を発揮しない癌腫に対する治療としては本プロトコールが適している。

投与前半の培養で十分な γ δ T 細胞数を得られていた症例においても投与後半では得られる γ δ T 細胞数が低下するが、これは投与後半の培養では培養開始時に前回投与した細胞が含まれるためと考えられる。この問題を解決するために現在進行中の臨床試験ではすべての培養に必要な γ δ T 細胞を初回投与前に一括して採取するアフエレーシスを導入している。

臨床的効果と投与 γ δ T 細胞数、末梢血 γ δ T 細胞数の間に直接的な関係を認めなかったが、血漿中に MICA が検出された症例は予後不良であった。腫瘍細胞は免疫機構を逃れるために MICA を分泌し、血漿中 MICA は γ δ T 細胞の NKG2D 発現を抑制する作用を持つ。血漿中 MICA の検出は γ δ T 細胞治療に対する抵抗性を示す指標となりうる。

本臨床試験の中央無増悪生存期間、中央生存期間は同様な症例を対象とした他治療と比較しても劣らず治療中の QOL も保たれていたため、 γ δ T 細胞治療の臨床的効果を示唆する根拠となる。

今後 γ δ T 細胞移入療法をさらに発展させるためには、アフエレーシス導入による安定した培養、ゾレドロネート投与による腫瘍細胞の感受性の改善が有効と考えられる。また、血漿中 MICA のように個々の症例の γ δ T 細胞移入療法の有効性の予測因子を探ることが必要である。自己腫瘍細胞が採取可能であれば自己腫瘍細胞を用いた細胞傷害性試験や自己腫瘍細胞の MICA、CD54、CD166 発現の測定が治療効果の予測につながるであろう。

本研究においては γ δ T 細胞の肺癌細胞株に対する細胞傷害活性、臨床試験における γ δ T 細胞の患者体内での血中動態、臨床的効果を検討し、進行再発非小細胞肺癌に対する γ δ T 細胞移入療法の安全性と妥当性を示すことができた。