

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業
(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs

研究開発課題名 : (日本語) 肺がんに対する γ δ T 細胞治療
(英語) γ δ T cell therapy for lung cancer

研究開発担当者 (日本語) 東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻
臓器病態外科講座呼吸器外科学 教授 中島 淳

所属 役職 氏名 : (英語) Jun Nakajima, Professor
Department of Cardiac and Thoracic Surgery,
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 研究総括・東京大学医学部附属病院試験責任医師
開発課題名 : (英語) Study Director for the University of Tokyo Hospital
研究開発分担者 (日本語) 東京大学 医学部附属病院 呼吸器外科 教授 中島 淳
所属 役職 氏名 : (英語) Jun Nakajima, Professor
Department of Cardiac and Thoracic Surgery,
Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

分担研究 (日本語) 特定細胞加工物の製造と多施設共同試験の調整
開発課題名 : (英語) Production of cell therapy product and
the management of multicenter study
研究開発分担者 (日本語) 東京大学 医学部附属病院 免疫細胞治療学講座 特任教授 垣見和宏
所属 役職 氏名 : (英語) Kazuhiro Kakimi, Project Professor
Department of Immunotherapeutics, The University of Tokyo Hospital

分担研究 (日本語) GCTP 製剤化のための非臨床試験
開発課題名: (英 語) Preclinical studies for the GCTP product
研究開発分担者 (日本語) 東京大学 医学部附属病院 免疫細胞治療学講座 特任講師 松下博和
所属 役職 氏名: (英 語) Hirokazu Matsushita, Project lecturer
Department of Immunotherapeutics, The University of Tokyo Hospital

分担研究 (日本語) 先進医療Bの推進
開発課題名: (英 語) Promoting Clinical Trials
研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学病院 呼吸器内科 教授 別役智子
所属 役職 氏名: (英 語) Tomoko Betsuyaku, Professor
Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine,
Keio University School of Medicine

分担研究 (日本語) 先進医療Bの推進
開発課題名: (英 語) Promoting Clinical Trials
研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学病院 臨床研究推進センター 教授 副島研造
所属 役職 氏名: (英 語) Kenzo Soejima, Professor
Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine,
Keio University Hospital

II. 成果の概要（総括研究報告）

(1) 先進医療B標準治療抵抗性の非小細胞肺癌に対する γ δ T細胞治療の推進

本年度は、東京大学と慶應義塾大学の2施設で25例の症例登録を目標としていたが、2回にわたり試験へのエントリーを中断したため、新規症例のエントリーが得られなかった。中断までの期間で、試験参加への同意が得られた5例の患者において γ δ T細胞のテスト培養を実施した。いずれも γ δ T細胞の培養困難症例であり治療に至らなかった。加えて症例登録が遅れた原因に、肺癌患者の2次治療以降にニボルマブの投与が可能になり、本試験の対象となる患者（3次治療以降）がニボルマブの投与を選択した事が大きい。他の潜在的候補患者のうち6例が、 γ δ T細胞治療をつける前にニボルマブ（抗PD-1抗体）の投与或いは化学療法を選択した。しかしながら、ニボルマブの有効性は20%程度であり、多くの患者には更なる治療が必要であることから、本治療法のような作用機序が全く異なる治療法は重要である。

平成28年7月28日付、厚生労働省医政局研究開発振興課長事務連絡「免疫細胞療法と免疫チェックポイント阻害薬との併用について（注意喚起）」に関しても慎重に対応した。ニボルマブ3mg/kg投与時の血清中消失半減期が13±7日であることから、wash-out期間をその5倍の3ヶ月と設定し、ニボルマブ最終投与日から γ δ T細胞投与開始まで、3ヶ月間のwash-out期間をあけることとした。

平成28年10月11日、実験室で研究目的に培養した γ δ T細胞に染色体異常を認めた。今回、培養の原材料として、2年以上凍結保存していたリンパ球を用いたこと、治療用の培養細胞を培養する細胞培養加工施設（CPC）外の実験室で培養したことなど、本試験で用いる治療用 γ δ T細胞の培養とは異なる条件下ではあるが、共通の培地や培養法を用いている治療用投与細胞に於いて同様の異常を認めるリスクを否定出来ないため、本試験における γ δ T細胞の提供を中断し、安全性を検証することとした。再度CPC内で培養し核型分析、軟寒天コロニー形成試験、免疫不全マウスを用いた造腫瘍試験などを実施してその安全性を確認した。検証結果から投与細胞に核型異常が生じる可能性は0ではないが、投与細胞が体内において癌化する（白血病を発症する）可能性や健康被害を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、当施設で γ δ T細胞治療を受けた140例以上の患者の中で、血液系腫瘍を発症した症例はこれまでのところ認めていない。したがって、 γ δ T細胞治療は安全に行えると考え試験再開は可能と判断した。

2度の中断により、症例のエントリーが遅れたことから、平成29年度の実施体制を強化するため、協力医療機関として、新たに東京都健康長寿医療センター、JR東京総合病院、聖路加国際病院、社会福祉法人三井記念病院、北里大学北里研究所病院、東京都済生会中央病院、国立病院機構東京医療センター、国家公務員共済組合連合会立川病院を追加し、症例のリクルートを促進するための対策を講じた。

(2) 自己 γ δ T細胞のGCTP製剤化に向けた非臨床試験

PMDAの薬事戦略相談を活用して、自己 γ δ T細胞のGCTP製剤化に向けた非臨床試験を準備した。平成28年6月8日及び9月2日の2回の事前面談を受け、本治療法に関する非臨床安全性に係る事項と品質に係る事項に関する論点の整理を行い12月2日に対面助言を受けた。対面助言では、①in vitroにおける造腫瘍性試験（核型分析試験及び軟寒天コロニー増殖試験）の結果を以て動物モデルを用いたin vivo評価試験の省略が可能か、②単回投与毒性試験の試験デザインの適切性及び反復投与毒性試験省略の可否について、③単回投与毒性試験の一般状態観察及び剖検、病理組織学的検査の結果を以て安全性評価とすることの妥当性について助言を受けた。また、品質に係る事項では、①工程内管理試験及び規格試験の妥当性について、②原材料の生物由来原料基準への適合性確認、③製造工程由来不純物の安全性評価について、④最終製品の安定性評価試験の妥当性についての助言を受けた。対面助言後、再生医療等製品GLP試験基準で単回投与一般毒性評価試験の実施を計画した。しかしながら、対面助言の相談記録の確定が平成29年1月5日であったため、そこから試験を開始すると、年度内に試験を完了することが困難であることから、本年度中の試験開始は見送り試験計画の策定までとして、平成29年度に単回投与一般毒性評価試験を実施することとした。

(1) Promoting Clinical trial of $\gamma\delta$ T cell therapy for the treatment of lung cancer

We planned to enroll 25 lung cancer patients in $\gamma\delta$ T cell therapy trial at two institutions, the University of Tokyo Hospital and Keio University Hospital. Unfortunately, no patient was enrolled in the fiscal year 2016, because we suspended the study twice. Until the suspension of the study, $\gamma\delta$ T cell culture test was performed in 5 patients to evaluate the eligibility for the study. No expansion of $\gamma\delta$ T cells was obtained in these 5 patients; none of them were enrolled in the study. Another reason for the difficulty in recruiting the patient is the recent approval of nivolumab (anti-PD-1 mAb) for the treatment option for patients requiring second-line treatment for metastatic non-small cell lung cancer. $\gamma\delta$ T cell therapy is provided as a third line therapy or later for patients who are resistant to current standard therapy. Nivolumab is indeed a good indication for these patients. Six patients who had been proposed two treatment options, $\gamma\delta$ T cell therapy or nivolumab, chose nivolumab rather than $\gamma\delta$ T cell therapy. However, the efficacy of nivolumab is limited and the overall response rate was less than 20%. Therefore, other treatment option with different mechanism, such as $\gamma\delta$ T cell therapy, is still required for the treatment of lung cancer.

On July 28, 2016, MHLW has called for attention regarding the risk of combination immune cell therapy with immune checkpoint blockade. In response to this alert, we modified the protocol to avoid the unknown interaction of nivolumab and $\gamma\delta$ T cells. Because an approximate serum half-life ($t_{1/2}$) of nivolumab is 13 ± 7 days, it is necessary to wait 3 months that is equivalent to 5-times as long as its $t_{1/2}$ until nivolumab is cleared from the blood. New protocol allows patients to be enrolled and receive $\gamma\delta$ T cells 3 months after last administration of nivolumab.

On October 11, 2016, we detected chromosomally-aberrant cells in $\gamma\delta$ T cell culture. We cultured cryopreserved cells that were stored in liquid nitrogen tank more than 2 years. $\gamma\delta$ T cells were expanded in the laboratory, not in the qualified cell processing facility. Therefore, the status of cells might be different from those for the treatment use. However, it was impossible to rule out the similar risk of abnormality may exist in the $\gamma\delta$ T cells for the treatment use. Therefore, we suspended the study until we confirmed the safety of the cultured $\gamma\delta$ T cells. To examine the safety of $\gamma\delta$ T cells, $\gamma\delta$ T cells prepared in the qualified cell processing facility were examined for their tumorigenic potential by karyotypic analysis, soft agar colony formation assay and *in vivo* tumorigenicity test using NOG mice. Though it is impossible to completely exclude their tumorigenicity, our results demonstrated that the possibility of cultured $\gamma\delta$ T cells for their malignant transformation, or leukemic change, was quite low. Actually, we have no evidence so far that more than 140 patients who received the $\gamma\delta$ T cells therapy in our institution developed hematological malignancies. We consider that $\gamma\delta$ T cell therapy is safe and has no harmful effect on the patient. The end of March 2016, we resumed the study.

To overcome the delay of patient recruitment caused by the study suspension, we reinforced the study team by adding 8 new institutions, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, JR Tokyo General Hospital, St Luke's International Hospital, Mitsui Memorial Hospital, Kitasato University Kitasato Institute Hospital, Tokyo saiseikai General Hospital and Tachikawa Hospital. We are expecting to enhance patient recruitment in fiscal year 2017.

(2) Preclinical studies to make $\gamma\delta$ T cell GCTP product

Before conducting preclinical studies of autologous $\gamma\delta$ T cells to make them GCTP product, we visited PMDA and obtained Pharmaceutical Affairs Consultation on R&D Strategy. After two prior consultation on June 8 and September 2 to clear these issues, we received face-to-face advice on December 2, 2016. We discussed whether we can skip *in vivo* tumorigenicity test with model animals depending on the results of *in vitro* tumorigenicity test, such as karyotypic analysis and soft agar colony formation assay. We discussed the study design of single-dose toxicity test and whether we can skip the repeated-dose toxicity test. We received advices whether it is appropriate or not if we evaluate the safety of $\gamma\delta$ T cell product by the general observation, autopsy and pathological exams at the single-dose toxicity test. Regarding to the quality of $\gamma\delta$ T cell product, we discussed in-process testing and conformance test, standards for biological materials, process-related impurities and contaminants and stability evaluation test. Finally, we agreed with PMDA to conduct a single-dose toxicity test at GLP standard. Because it is difficult to accomplish the whole study within the fiscal year 2016, we just design the study and postponed initiating the single-dose toxicity test until fiscal year 2017.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌2件、国際誌12件）

1. Aoki T, Matsushita H, Hoshikawa M, Hasegawa K, Kokudo N, Kakimi K. Adjuvant combination therapy with gemcitabine and autologous $\gamma \delta$ T-cell transfer in patients with curatively resected pancreatic cancer. *Cytotherapy*. 2017 Apr;19(4):473-485. Epub 2017 Feb 7.
2. Miyawaki M, Naoki K, Yoda S, Nakayama S, Satomi R, Sato T, Ikemura S, Ohgino K, Ishioka K, Arai D, Namkoong H, Otsuka K, Miyazaki M, Tani T, Kuroda A, Nishino M, Yasuda H, Kawada I, Koh H, Nakamura M, Terashima T, Sakamaki F, Sayama K, Betsuyaku T, Soejima K. Erlotinib as second- or third-line treatment in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: Keio Lung Oncology Group Study 001 (KLOG001). *Mol Clin Oncol*. 2017 Mar;6(3):409-414.
3. Naoki K, Takeda Y, Soejima K, Arai D, Naka G, Nagase S, Arimura K, Kanemura T, Ohhira T and Ikeda N. A prospective cohort study of patients with non-squamous non-small cell lung cancer treated with bevacizumab. *Oncology Letters* 2017 Mar 2;13(5):3285-3290.
4. Nukaga S, Yasuda H, Tsuchihara K, Hamamoto J, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Matsumoto S, Mimaki S, Ikemura S, Goto K, Betsuyaku T, Soejima K. Amplification of EGFR wild type alleles in non-small cell lung cancer cells confers acquired resistance to mutation-selective EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2017 Feb 15. [Epub ahead of print]
5. Hino H, Nishimura T, Usuki C, Sazuka M, Ito T, Seki A, Nitadori JI, Yamada H, Arai T, Yamamoto H, Nakajima J. Salvage surgery for primary lung cancer after chemotherapy in octogenarians. *Thorac Cancer*. 2017 Feb 27. doi: 10.1111/1759-7714.12423. [Epub ahead of print]
6. Yoshida Y, Nitadori JI, Shinozaki-Ushiku A, Sato J, Miyaji T, Yamaguchi T, Fukayama M, Nakajima J. Micropapillary histological subtype in lung adenocarcinoma of 2 cm or less: impact on recurrence and clinical predictors. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2017 Feb 27. [Epub ahead of print]
7. Miyawaki M, Yasuda H, Tani T, Hamamoto J, Arai D, Ishioka K, Ohgino K, Nukaga S, Hirano T, Kawada I, Naoki K, Hayashi Y, Betsuyaku T, Soejima K. Overcoming EGFR bypass signal-induced acquired resistance to ALK tyrosine kinase inhibitors in ALK-translocated lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2017 Jan;15(1):106-114.
8. Ichinose J, Murakawa T, Kawashima M, Nagayama K, Nitadori JI, Anraku M, Nakajima J. Prognostic significance of red cell distribution width in elderly patients undergoing resection for non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2016 Dec;8(12):3658-3666.
9. Odaira K, Kimura SN, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Takahashi T, Izumi T, Matsushita H, Kakimi K. CD27(-)CD45(+) $\gamma \delta$ T cells can be divided into two populations,

- CD27(-)CD45(int) and CD27(-)CD45(hi) with little proliferation potential. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Sep 23;478(3):1298-303.
10. Hino H, Kamiya M, Kitano K, Mizuno K, Tanaka S, Nishiyama N, Kataoka K, Urano Y, Nakajima J. Rapid Cancer Fluorescence Imaging Using A γ -Glutamyltranspeptidase-Specific Probe For Primary Lung Cancer. Transl Oncol. 2016 Jun;9(3):203-10.
 11. Nukaga S, Naoki K, Kamo T, Masuzawa K, Yasuda H, Soejima K, Betsuyaku T. Alectinib as a treatment option following recovery from crizotinib-induced interstitial lung disease in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive advanced non-small-cell lung cancer. Mol Clin Oncol. 2016 Jun;4(6):1085-1087.
 12. Ichinose J, Shinozaki-Ushiku A, Takai D, Fukayama M, Nakajima J. Differential diagnosis between primary lung squamous cell carcinoma and pulmonary metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. Expert Rev Anticancer Ther. 2016 Apr;16(4):403-10
 13. 松下博和、垣見和宏、 γ δ T 細胞用いたがん免疫治療、日本臨床 第 75 巻・第 2 号 301-305 (2017.02)
 14. 小林 由香利、垣見 和宏、 γ δ T 細胞を用いたがん免疫治療(解説/特集)、実験医学 34 巻 12 号 2056-2060 (2016.08)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. γ δ T 細胞における培養細胞の凍結条件の検討、ポスター、高橋卓也、泉 謙道、木村真之介、松下博和、垣見和宏、第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会 (JRAI2017)、2017/2/11、国内
2. γ δ T 細胞を用いたがん免疫細胞治療における Galectin-9 の作用、ポスター、神原佳織、大平公亮、藤枝奈緒、小林由香利、泉 謙道、高橋卓也、松下博和、垣見和宏、第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会、2017/2/11、国内
3. 実臨床での進行非小細胞肺癌 140 例に対するニボルマブの効果 (多施設共同症例集積研究 KLOG005)、ポスター、小林慧悟、副島研造、猶木克彦、西野誠、増澤啓太、谷哲夫、扇野圭子、石岡宏太、里見良輔、安田浩之、川田一郎、仲地一郎、黄英文、館野博喜、井上卓、中村守男、小山田吉孝、佐山宏一、別役智子、日本免疫治療学研究会、2017/2/11、国内。
4. 2015 WHO 肺癌組織分類による臨床病理学的特徴および予後因子の検討、口頭、似鳥純一、中尾啓太、森田茂樹、桑野秀規、長山和弘、安樂真樹、牛久綾、佐藤雅昭、深山正久、中島淳、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016/12/20、国内
5. イムノグラムを用いた肺癌に対する個別化治療戦略、口頭、唐崎隆弘、長山和弘、垣見和宏、中島淳、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016/12/20、国内
6. 小型肺腺癌における Spread Through Alveolar Spaces (STAS) の検討、口頭、中尾啓太、似鳥純一、森田茂樹、桑野秀規、長山和弘、安樂真樹、牛久綾、佐藤雅昭、深山正久、中島淳、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016/12/19、国内
7. 濃度酸素が肺癌の増殖に与える影響とその分子メカニズム、ポスター、浜本純子、副島研造、安田浩之、仲地一郎、長谷川華子、増澤啓太、小林慧悟、眞鍋維志、川田一郎、猶木克彦、別役智子、日本肺癌学会学術集会、2016/12/19-21、国内。

8. Immunogram for Cancer-Immunity Cycle towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. ポスター、Karasaki T, Kakimi K, Nakajima J, et al. IASLC 17th World Conference on Lung Cancer、2016/12/7、国外
9. A retrospective analysis of patients with small lung adenocarcinoma (≤ 2 cm) by New World Health Organization Classification.、ポスター、Nakao K, Nakajima J, et al. IASLC 17th World Conference on Lung Cancer、2016/12/7、国外
10. 非小細胞肺癌術後フォローアップはいかに行うべきか? - 非小細胞肺癌術後再発ハザード値による、口頭、中尾啓太、安樂真樹、佐藤雅昭、似鳥純一、長山和弘、桑野秀規、中島淳、第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会、2016/10/1、国内
11. 高齢者肺癌手術症例の臨床的検討～80 歳以上と 80 歳未満の比較～、口頭、日野春秋、唐崎隆弘、桑野秀規、長山和弘、似鳥純一、安樂真樹、佐藤雅昭、西村隆、中島淳、第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会、2016/10/1、国内
12. 日本最先端の肺がんの診断・治療、口頭、中島淳、日中健康管理・医療シンポジウム、2016/9/25、国内
13. 非小細胞肺癌に対する治療の現況と将来展望、口頭、中島淳、第 13 回日本中性子捕捉療法学会学術大会、2016/8/7、国内
14. 肺癌における mutational/neoantigen burden と免疫チェックポイント、immune signature に関する検討、口頭、唐崎隆弘、長山和弘、垣見和宏、中島淳、第 33 回日本呼吸器外科学会学術集会、2016/5/12、国内
15. V γ 9V δ 2T 細胞を用いたがん免疫治療、口頭、垣見和宏、第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、2016/4/28、国内
16. Evaluation of multiple EGFR tyrosine kinase inhibitors against clinically relevant EGFR mutants using in vitro modeling、ポスター、Hanako Hasegawa, Hiroyuki Yasuda, Toshiyuki Hirano, Tetsuo Tani, Junko Yamamoto, Ayano Oashi, Ichiro Kawada, Katsuhiko Naoki, Daniel B. Costa, Susumu S. Kobayashi, Tomoko Betsuyaku, Kenzo Soejima. 106th AACR Annual Meeting, New Orleans. 2016/4/16-20. 国外
17. Visualizing the distribution of metabolites and the efficacy of BIBF1120 on metabolic status of lung cancer derived tumors by imaging mass-spectrometry (MS)、ポスター、Daisuke Arai, Hiroyuki Yasuda, Kenzo Soejima, Shizuko Kagawa, Junko Hamamoto, Shigenari Nukagal, Katsuhiko Naoki, Katsura Emoto, Yuki Sugiura, Makoto Suematsu, Tomoko Betsuyaku.、106th AACR Annual Meeting, New Orleans. 2016/4/16-20. 国外.
18. GFR exon 20 挿入遺伝子変異に対する afatinib と cetuximab の併用効果、口頭、長谷川華子、平野俊之、安田浩之、濱本純子、川田一郎、猶木克彦、副島研造、別役智子、日本呼吸器学会学術講演会、2016/4/8、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がん免疫療法、唐崎隆弘、垣見和宏、岡山県立岡山操山中学校「未来航路プロジェクト」、2016/11/9、国内