

# 非小細胞肺癌に対する NKT 細胞免疫療法の開発

石井 絢菜, 高見真理子, 本橋新一郎

千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学

## NKT cell-based immunotherapy for non-small-cell lung cancer

Ayana Ishii, Mariko Takami, Shinichiro Motohashi

Department of Medical Immunology, Graduate School of Medicine, Chiba University

### Abstract

Invariant natural killer T (iNKT) cells are a unique lymphocyte subpopulation that possess an invariant T cell receptor (TCR) and recognize glycolipid antigens, such as  $\alpha$ -Galactosylceramide ( $\alpha$ GalCer), presenting on CD1d. Activated iNKT cells show a direct and indirect anti-tumor effect by producing effector molecules and cytokines that activate other immune cells, including NK cells and cytotoxic T cells. We are currently focusing on the development of immunotherapy targeting iNKT cells and have conducted early-phase clinical trials for non-small-cell lung cancer (NSCLC). Previous clinical studies have shown that the intravenous injection of  $\alpha$ GalCer-pulsed dendritic cells (DCs) induced the activation of endogenous iNKT cells and iNKT cell-dependent responses. Furthermore, an increase in the number of IFN- $\gamma$ -producing cells among peripheral blood mononuclear cells has been shown to be associated with a prolonged survival. A dramatic infiltration of iNKT cells in the tumor microenvironment was also observed after the injection of  $\alpha$ GalCer-pulsed DCs. Based on these results, a phase II clinical trials of  $\alpha$ GalCer-pulsed DCs for NSCLC were designed as an Advanced Medical Technology and approved by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare. Patients with advanced or recurrent NSCLC who had received first-line chemotherapy underwent intravenous injection of  $\alpha$ -GalCer-pulsed DCs.  $\alpha$ GalCer-pulsed DCs were found to be well-tolerated and prolonged the overall survival. We also discuss future potential combination therapies of iNKT cell-based immunotherapy to achieve enhanced anti-tumor activity and provide better treatment options for patients with advanced NSCLC.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 25~29, 2019

**Key words :** NKT 細胞, 免疫療法, 非小細胞肺癌, 樹状細胞

### はじめに

CD1d 拘束性のインバリアントナチュラルキラー T (invariant natural killer T : iNKT) 細胞は, 単一な T 細胞受容体 (ヒトでは Va24-J $\alpha$ 18 鎖と V $\beta$ 11 鎖, マウスでは Va14-J $\alpha$ 18 鎖と V $\beta$ 8.2 鎖) を発現し, MHC クラス I 様分子である CD1d 上に提示された糖脂質抗原を認識し活性化するリンパ球である。活性化した iNKT 細胞は, パーフォリンなどの細胞傷害分子の産生を介した直接的細胞傷害活性を示すと同時に, IFN- $\gamma$  などのサイトカインを大量に産生し, NK 細胞や CD8<sup>+</sup> T 細胞などの活性化を誘導することにより, 強力な抗腫瘍効果を発揮する<sup>1)</sup>。

ヒト iNKT 細胞は末梢血中に非常に少ない割合 (0.01~0.1% 程度) でしか存在しないため, その機能的な解析は

困難が伴うが, 1997 年に iNKT 細胞を活性化させるリガンドとして, スフィンゴ糖脂質である  $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -Galactosylceramide :  $\alpha$ GalCer) が発見されて以降, がん治療に iNKT 細胞の示す抗腫瘍効果を利用する研究が発展してきた<sup>2)</sup>。本稿では, その中で当研究室がこれまで行ってきた iNKT 細胞を標的とした免疫療法の開発研究として, 肺癌に対する  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を用いた臨床試験の結果を示すと同時に, 先進医療 B として実施した,  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を用いた第 II 相試験について概説する。

### 1. 肺癌に対する NKT 細胞免疫療法

2018 年に全世界で最も多く診断されたがんは肺癌であり, がん死亡数の第 1 位 (18.4%) を占めている<sup>3)</sup>。日本では, 肺癌は 2018 年のがん死亡数予測において, 男性

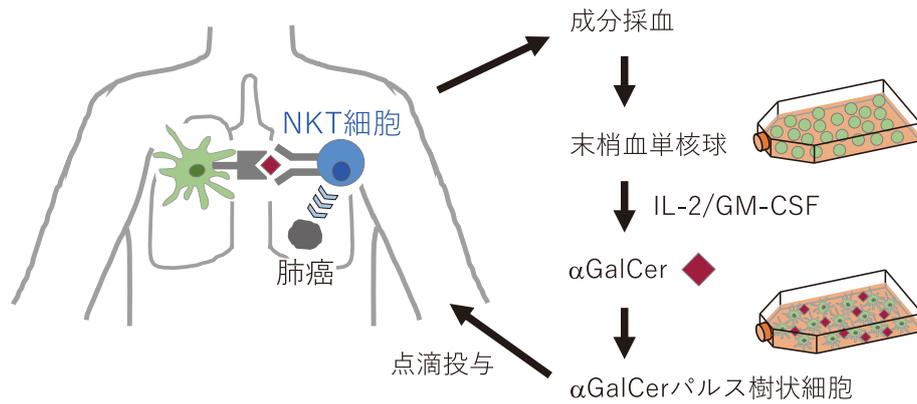


図 1 NKT 細胞を標的とした免疫療法の概要

肺癌患者から成分採血によって末梢血単核球を分離した後、IL-2 と GM-CSF 存在下で 6 日間もしくは 13 日間培養する。患者に投与する 1 日前に  $\alpha$ GalCer を添加し、樹状細胞を含むすべての培養細胞 ( $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞) を点滴静脈注射により患者に投与する。静脈内投与された  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞は血行性に肺に到達し、腫瘍局所にて NKT 細胞を活性化する。

の第 1 位 (25%)、女性の第 2 位 (14%) を占め、がん罹患数予測においても上位を占めている<sup>4)</sup>。また年齢別にみると、70 歳以上でがん死亡全体に占める肺癌の割合が大きくなっている。一般的に、肺癌は予後不良であるとされ、肺癌全体の 5 年生存率は 40% 前後となっている。

肺癌は大きく 2 つの組織型に分かれ、そのうち非小細胞肺癌 (腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌など) が大多数を占める。とくに、切除不能の進行非小細胞肺癌に対しては、標準治療として化学療法が用いられてきたが、根治は難しく極めて予後が不良である。近年は免疫チェックポイント阻害薬を用いた免疫療法の適応が拡大されつつあるが、いまだ単剤での効果は限定的で、さらなる治療効果が期待できる新規治療法が求められている。その中で、当研究室では幅広い免疫応答に関与する iNKT 細胞を標的とした治療法の確立を目指し、以下に述べる非小細胞肺癌を対象とした数々の臨床研究や、患者検体を用いたパイロットスタディを通して、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の投与がもたらす全生存期間の延長効果を始めとする有効性や安全性を明らかにしてきた。

## 2. $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の樹立

iNKT 細胞を *in vivo* にて活性化させるには、主に樹状細胞などの抗原提示細胞が大量に必要となる。しかし一般的な、末梢血中の CD14<sup>+</sup> 単球を IL-4 と GM-CSF 存在下で培養し樹状細胞を誘導する従来の手法では十分な細胞数が得られないため、代替方法が求められた。そこで、肺癌患者の全末梢血単核球を IL-2 と GM-CSF 存在下で培養し、抗原提示細胞を分化誘導させる新たな手法を見出した (図 1)<sup>5)</sup>。この手法では、樹状細胞だけではなく他の免疫細胞も含まれるため、とくに培養系の中の T 細胞による樹状細胞の成熟化が促進され、従来の手法より

も iNKT 細胞の活性化と増殖が増強されることが明らかとなった。以下、この手法により分化誘導した樹状細胞を含むすべての細胞を、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞と称している。

## 3. これまでに実施した臨床試験： $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の投与

### 3-1. 切除不能進行肺癌に対する $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞：第 I 相臨床試験

上述した手法で培養した細胞を用いて、第 I 相臨床試験を実施した<sup>6)</sup>。この臨床研究では、切除不能もしくは術後再発の非小細胞肺癌で標準治療を終了した方を対象とし、投与する  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞数を 3 条件 ( $5 \times 10^7$  cells,  $2.5 \times 10^8$  cells,  $1 \times 10^9$  cells/m<sup>2</sup>) とする用量漸増法にて安全性の検討を行った。3 カ月にわたって 1 コース 2 回の点滴静脈注射による投与を 2 コース計 4 回行い (図 2)、全登録患者 11 名のうち 9 名でプロトコル治療を完遂した。

その結果、明らかな腫瘍縮小効果は認められなかったものの、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞を  $1 \times 10^9$  cells/m<sup>2</sup> を投与した患者 3 名において、末梢血中の iNKT 細胞の増加と 1 年以上の長期生存を認めた。また全患者で Grade 2 以上の有害事象は認められなかったことから、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞投与の安全性が示唆された。

### 3-2. 切除不能進行肺癌に対する $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞：第 I / II 相臨床試験

次に、安全性に加え臨床上の効果を検証すべく、臨床病期 III B, IV 期の切除不能もしくは術後再発の非小細胞肺癌患者を対象とした第 I / II 相臨床試験を実施した<sup>7)</sup>。先述した第 I 相臨床試験の結果をふまえ、 $\alpha$ GalCer パル

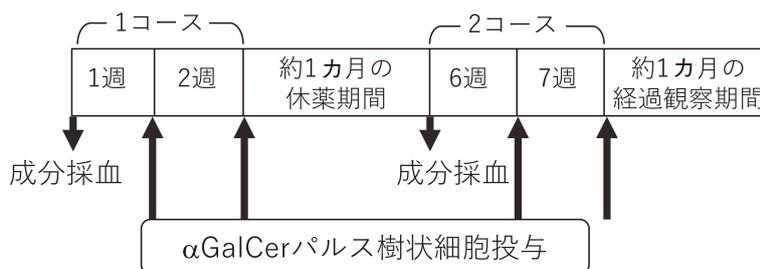


図 2 αGalCer パルス樹状細胞による治療プロトコール  
成分採血を行い、1 週間後および2 週間後に αGalCer パルス樹状細胞投与することを1 コースとし、1 カ月の休薬期間後に2 コース目を施行する。

ス樹状細胞  $1 \times 10^9$  cells/ $m^2$  を 2 コース計 4 回、点滴静脈注射により投与した。抗癌剤による化学療法施行後、最低 4 週間の休薬期間後に登録を行った。全登録患者 23 名のうち 17 名が完遂した。

その結果、17 名の生存期間中央値は 18.6 カ月、2 年生存率は 41.2% であった。既存の報告では、ドセタキセルを用いた二次治療の大規模な第 III 相臨床試験での生存期間中央値は 7.0~7.5 カ月<sup>8)</sup>、抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法のランダム化比較試験 (Randomized controlled trial) : 第 II/III 相臨床試験では 10.4~12.7 カ月<sup>9)</sup> であった。われわれが行ったのは第 I/II 相臨床試験であるため、一概に他の報告と比較はできないが、NKT 細胞免疫療法による生存期間延長効果を主要評価項目とした次の試験を計画するのにこの試験の結果は十分と考えられた。

また免疫応答に関しては、10 症例において、αGalCer 刺激により末梢血中の IFN- $\gamma$  産生細胞が 2 倍以上に増加しており (Good responder group)、一方で残りの 7 名の患者においては、若干の増加もしくは変動を認めなかった (Poor responder group)。両群の生存期間中央値および 2 年全生存率で比較すると、Poor responder group では 9.7 カ月・14.3% とどまるのに対し、Good responder group では 31.9 カ月・60.0% と非常に良好な値を示し、有意差を認めた。過去に、ここで示す IFN- $\gamma$  産生細胞は αGalCer 刺激により *in vivo* で活性化した NKT 細胞と NK 細胞であることを明らかにしている<sup>10,11)</sup>。以上より、IFN- $\gamma$  産生細胞数の増加は全生存期間の延長と関連があることが示唆された。

有害事象に関して、1 名の患者で Grade 3 の深部静脈血栓症の再発を認め、入院後にヘパリンの持続投与が行われた。この患者は試験登録の前に左大腿に深部静脈血栓症 (DVT) を発症しており、ワーファリンが処方されていた。効果安全性評価委員会によってワーファリンの投与量が不足したことで DVT 再発が起こったと判断され、プロトコール治療との因果関係は認められなかった。また他の全患者で Grade 2 以上の毒性や重篤な副作用は認められなかったことから、αGalCer パルス樹状細胞

投与の安全性が示された。

### 3-3. 切除可能進行肺癌に対する αGalCer パルス樹状細胞

先述した臨床研究で示された、非小細胞肺癌患者の全生存期間延長といった臨床効果発揮メカニズムを明らかにするために、αGalCer パルス樹状細胞の投与が腫瘍微小環境に及ぼす影響を検討することとした<sup>12)</sup>。この試験では、臨床病期 II B、III A 期で切除可能と判断された進行非小細胞肺癌症例を対象とし、手術の 7 日前に αGalCer パルス樹状細胞  $1 \times 10^9$  cells/ $m^2$  を 1 回点滴静脈注射により投与した。αGalCer パルス樹状細胞投与後に iNKT 細胞を中心とした免疫細胞がどのような免疫応答メカニズムを示すのかを検討するために、切除された腫瘍組織や非腫瘍部肺組織、リンパ節および末梢血を採取し、免疫学的解析を行った。また αGalCer パルス樹状細胞投与を実施していない進行非小細胞肺癌の切除検体をコントロール群として用いた。

その結果、αGalCer パルス樹状細胞投与群では、正常肺組織やリンパ節に含まれる単核球細胞よりも、腫瘍浸潤リンパ球中に高い割合で iNKT 細胞が存在していた (0.002~0.031% vs 0.15~1.86%)。また腫瘍浸潤リンパ球中の iNKT 細胞の割合を平均値と比較してみると、コントロール群よりも αGalCer パルス樹状細胞投与群で増加傾向にあった (0.165% vs 0.68%)。さらに αGalCer 刺激応答性の IFN- $\gamma$  産生細胞数を検討したところ、αGalCer パルス樹状細胞投与群で、腫瘍浸潤リンパ球中の IFN- $\gamma$  産生細胞数の顕著な増加を認めた。以上より、αGalCer パルス樹状細胞の投与によって、腫瘍微小環境において iNKT 細胞の局所的な集積が促進され、IFN- $\gamma$  の産生などの抗腫瘍免疫応答を惹起していることが示された。

### 4. 切除不能進行肺癌に対する αGalCer パルス樹状細胞：先進医療 B

これまで実施してきた臨床研究において、αGalCer パルス樹状細胞投与の安全性と臨床上の有用性を明らかに

してきたが、NKT細胞免疫療法として切除不能進行期もしくは再発の非小細胞肺癌に対する新規二次治療の確立を目指すべく、先進医療Bとして第Ⅱ相臨床試験を実施した（厚生労働省第74回先進医療技術審査部会、第67回先進医療会議で報告済）。本試験では、臨床病期ⅢB、Ⅳ期もしくは術後再発の非小細胞肺癌と診断され、抗癌剤による一次治療を受けた症例を対象とし、最終の化学療法から4週間の休薬期間後に登録を行った。プロトコル治療として、 $\alpha$ GalCerパルス樹状細胞を2コース計4回、点滴による静脈内投与を行った。これまでの結果から、本試験で期待する全生存期間中央値を17カ月、閾値を8カ月とし、必要症例数を35例と設計した。

2012年より開始された本先進医療は、2015年に予定症例数35例の登録が完了し、2017年に全症例の追跡期間を終了した。その結果、全登録患者35名の生存期間中央値は21.9カ月、2年生存率は37.1%であった。既報で報告した全生存期間と関連するIFN- $\gamma$ 産生細胞数に関しては、Good responder group（24名）とPoor responder group（8名）の生存期間中央値を比較すると24.7カ月と15.1カ月であり、Good responder groupで予後良好な傾向を認めた（Logrank test,  $p=0.06$ ）。

またプロトコル治療期間中に発生した有害事象に関しては、1名の患者で現病悪化に伴う腫瘍疼痛の発生を認め、症状を緩和させる治療のために入院したため重篤と判断されたものの、緩和治療により軽快し、本治療との因果関係は無いと判断された。また他の症例において重篤と判断される有害事象は認められなかった。

## 5. 今後の課題

先進医療Bとして実施した $\alpha$ GalCerパルス樹状細胞の第Ⅱ相臨床試験では、過去に実施した臨床研究と同等の結果が示唆された。今後の検証試験として、コントロール群を設定したランダム化比較試験の実施が必要であると考えている。その方法として、臨床病期ⅢB期に対する放射線療法併用化学療法に上乘せ+維持療法で有効性を示したDurvalumab<sup>13)</sup>や、臨床病期Ⅳ期に対するプラチナ製剤化学療法との併用にて有効性を示したPembrolizumab<sup>14,15)</sup>、切除可能な進行肺癌に対する術前Nivolumabの有効性<sup>16)</sup>など、既存の標準治療である抗癌剤・放射線・手術との併用で有効な治療となり得ることを考慮して、試験デザインを検討している。さらにわれわれは免疫チェックポイント阻害薬が非小細胞肺癌の一次治療や二次治療の標準治療となったことをふまえ、免疫チェックポイント阻害薬とNKT細胞免疫療法との併用療法の可能性についても検討している<sup>17)</sup>。免疫チェックポイント阻害薬の登場とその応用によって、現状の非小細胞肺癌に対する診療ガイドラインは頻繁に改訂を要する状況となっており、日々刻々と新たな治療オプションが報告されている。進行肺癌を根治できるようになる

までは、標準治療に対する改善の努力は続けられることから、その中でNKT細胞を用いた免疫療法が果たす役割を臨床試験にて明らかにすることで、非小細胞肺癌の治療成績向上に貢献していきたい。

## 文 献

- 1) Takami M, Ihara F, Motohashi S : Clinical Application of iNKT Cell-mediated Anti-tumor Activity Against Lung Cancer and Head and Neck Cancer. *Front Immunol* 9 : 2021, 2018
- 2) Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. : CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $V\alpha 14$  NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278 : 1626-1629, 1997
- 3) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. : Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68 : 394-424, 2018
- 4) がんの統計編集委員会編集 : “がんの統計 '18”. 公益財団法人がん研究振興財団, 2018
- 5) Ishikawa E, Motohashi S, Ishikawa A, et al. : Dendritic cell maturation by  $CD11c^-$  T cells and  $V\alpha 24^+$  natural killer T-cell activation by  $\alpha$ -galactosylceramide. *Int J Cancer* 117 : 265-273, 2005
- 6) Ishikawa A, Motohashi S, Ishikawa E, et al. : A phase I study of  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11 : 1910-1917, 2005
- 7) Motohashi S, Nagato K, Kunii N, et al. : A phase I-II study of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol* 182 : 2492-2501, 2009
- 8) Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, et al. : Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 18 : 2095-2103, 2000
- 9) Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. : Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010) : a randomised controlled trial. *Lancet* 387 : 1540-1550, 2016
- 10) Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, et al. : A phase I study of *in vitro* expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12 : 6079-6086, 2006
- 11) Motohashi S, Nakayama T : Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci* 99 : 638-645, 2008
- 12) Nagato K, Motohashi S, Ishibashi F, et al. : Accumula-

- tion of Activated Invariant Natural Killer T Cells in the Tumor Microenvironment after  $\alpha$ -Galactosylceramide-Pulsed Antigen Presenting Cells. *J Clin Immunol* 32 : 1071-1081, 2012
- 13) Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. : Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 377 : 1919-1929, 2017
- 14) Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, et al. : Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 379 : 2040-2051, 2018
- 15) Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, et al. : Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042) : a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet* 393 : 1819-1830, 2019
- 16) Forde PM, Chaft JE, Smith KN, et al. : Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med* 378 : 1976-1986, 2018
- 17) Kamata T, Suzuki A, Mise N, et al. : Blockade of programmed death-1/programmed death ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant natural killer T cells. *Cancer Immunol Immunother* 65 : 1477-1489, 2016