

文 献

- 1) DeFronzo RA: Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009; 58: 773-795.
- 2) DeFronzo RA, Eldor R, Abdul-Ghani M: Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2013; 36 (Suppl 2): S127-S138.
- 3) Gerich JE: Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med* 2010; 27: 136-142.
- 4) Stumvoll M, Chintalapudi U, Perriello G, et al: Uptake and release of glucose by the human kidney. Post-absorptive rates and responses to epinephrine. *J Clin Invest* 1995; 96: 2528-2533.
- 5) Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ, et al: Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 2001; 24: 382-391.
- 6) Bays H: From victim to ally: the kidney as an emerging target for the treatment of diabetes mellitus. *Curr Med Res Opin* 2009; 25: 671-681.
- 7) Wilding JP: The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose cotransporter 2 inhibitors. *Metabolism* 2014; 63: 1228-1237.
- 8) Abdul-Ghani MA, Norton L, DeFronzo RA: Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2011; 32: 515-531.
- 9) Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ: SGLT inhibitors in management of diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013; 1: 140-151.
- 10) van den Heuvel LP, Assink K, Willemsen M, et al: Autosomal recessive renal glucosuria attributable to a mutation in the sodium glucose cotransporter (SGLT2). *Hum Genet* 2002; 111: 544-547.
- 11) Lam JT, Martin MG, Turk E, et al: Missense mutations in SGLT1 cause glucose-galactose malabsorption by trafficking defects. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 297-303.
- 12) 金井好克: 糖尿病の新たな治療戦略 SGLT2阻害薬の適正使用を目指して(柏木厚典編), pp. 14-22, フジメディカル出版, 大阪, 2014.
- 13) SGLT2阻害薬の適正使用に関するRecommendation, 2014年6月13日策定 8月29日改訂(日本糖尿病学会ホームページより)
- 14) 金井好克: SGLT2阻害薬の有効性を薬理学的観点から考える. *医学と薬学* 2014; 71: 867-876.
- 15) 興和製薬株式会社, サノフィ株式会社: トボグリフロジン医薬品インタビューフォームより
- 16) Cefalu WT, Leiter LA, Yoon KH, et al: Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2013; 382: 941-950.
- 17) Lavallo-González FJ, Januszewicz A, Davidson J, et al: Efficacy and safety of canagliflozin compared with placebo and sitagliptin in patients with type 2 diabetes on background metformin monotherapy: a randomised trial. *Diabetologia* 2013; 56: 2582-2592.
- 18) Ptaszynska A, Chalamandaris AG, Sugg JE, et al: Effect of dapagliflozin on renal function. *Diabetes* 2012; 61 (Suppl 1): Abstract I098-P.
- 19) INVOKANA™ (canagliflozin) tablets, for oral use [package insert], Titusville, NJ: Janssen Pharmaceuticals; 2013.
- 20) Summary of Product Characteristics. Forxiga 5 mg and 10 mg film-coated tablets. Middlesex, United Kingdom: Bristol-Myers Squibb/AstraZeneca EEIG; 2012.
- 21) Bristol-Myers Squibb-AstraZeneca EEIG [homepage on the Internet]. Summary of Product Characteristics: Forxiga 5 mg film coated tablets 2012. Available from: http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2012/20121112124487/anx_124487_en.pdf. Accessed March 31, 2014.
- 22) Ptaszynska A, Johnsson KM, Apanovitch A-M, et al: Safety of dapagliflozin in clinical trials for T2DM. *Diabetes* 2012; 61 (Suppl 1): Abstract I011-P.
- 23) Rosenstock J, Cefalu WT, Lapuerta P, et al: Greater Dose-Ranging Effects on A1C Levels Than on Glucosuria With LX4211, a Dual Inhibitor of Sodium Glucose Transporters SGLT1 and SGLT2, in Type 2 Diabetes on Metformin Monotherapy. *Diabetes Care* 2014; 37: 1-8.
- 24) Vlotides G, Mertens PR: Sodium-glucose cotransport inhibitors: mechanisms, metabolic effects and implications for the treatment of diabetic patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014 Sep 17.
- 25) Neal B, Perkovic V, de Zeeuw D, et al: Rationale, design, and baseline characteristics of the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study (CANVAS)—a randomized placebo-controlled trial. *Am Heart J* 2013; 166: 217-223.
- 26) <http://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/endocrinologyandmetabolicdrugsadvisorycommittee/ucm336236.pdf>
- 27) Whelton PK, Barzilay J, Cushman WC, et al: ALL-HAT Collaborative Research Group: Clinical outcomes in antihypertensive treatment of type 2 diabetes, impaired fasting glucose concentration, and normoglycemia: Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALL-HAT). *Arch Intern Med* 2005; 165: 1401-1409.

原 著

BAK(生物製剤活性化キラー細胞)療法の新たな展開

一癌発症・再発・転移予防効果—

Ebina Takasaburo Sato Toshihiko
海老名卓三郎¹⁾ 佐藤 俊彦²⁾

要 約

癌治療の標準治療である手術療法, 抗癌剤療法, 放射線療法は癌の縮小効果をねらった“がんを治そう”という発想のもとに行われてきたが, 癌細胞も殺すが正常の増殖細胞も殺すため副作用が多発する。また, 抗癌剤, 放射線は使用し続けると耐性ができ, 延命効果には全く結びついていない。そこでわれわれは, 発想を転換しQOLを良好に維持しながら“がんと共に生しよう”という発想のもと, CD56陽性細胞を中心としたBAK(生物製剤活性化キラー細胞)療法を考案し, 癌治療のパラダイムシフト“分化から統合へ”を提唱した。

今回は, テロメラーゼ活性依存的に癌細胞で増殖し, GFP(Green Fluorescent Protein)を発現する改変型アデノウイルスを利用したテロメスキャンにより, 血中に存在する末梢循環腫瘍細胞(CTC)を検出する方法で, BAK療法が見えない癌を叩くことを見出したので報告する。BAK療法は患者から20 mL末梢血を採血し, 固相化CD3抗体とIL-2で処理し, E培地を用い培養を開始する。2週間かけてALys無血清培地で4Lまで培養する。活性化したリンパ球(100億個)を200 mLのリンゲル液に入れ, 患者に点滴静注で1時間かけて戻す療法である。その結果, 高度進行癌患者(stage IV, 手術不能stage III)のうち血清α酸性糖蛋白値が96 mg/dL未満の免疫反応性患者307例は52.9カ月の延命(BAK療法を開始してからの月数), 96 mg/dL以上となった免疫抑制患者132例は8.7カ月だけの延命となった。

次に, 血管中に流れているCTC, さらに, より転移を起こしやすい上皮間葉転移(EMT)細胞や抗癌剤に抵抗性の循環幹細胞(CSC)を検出することができるテロメスキャンにより見えない癌を検出し, BAK療法の効果を調べた。その結果, 甲状腺癌でGFP陽性細胞が15個から0個に減少, 再発がみられなかった。また, stage IV食道癌, 肺転移患者で, 治療前GFP細胞が2個あったものが治療後0個になり, 4年間再発転移がない。これにより癌の再発転移予防効果を確認したところ, 術後転移のない進行癌(stage II)患者28例全例, 癌発症予防効果を試した健康人6例全例が生存していることがわかった。すなわち, BAK療法は副作用がなく, 癌の予防効果にも優れた方法であることを見出した。

はじめに

癌治療のパラダイムシフトが必要と考え, BAK(生物製剤活性化キラー細胞)療法を考案した¹⁾のでその経過を述べる。1982年に, 試験管内で免疫細胞であるマクロファージやNK細胞が実際に癌細胞を殺している

ことを位相差顕微鏡下の映画撮影で確認した²⁾。1997年, NK細胞とγδT細胞を含むCD56陽性細胞を活性化増殖させることに成功した^{3,4)}。そこで, CD56陽性細胞を利用したBAK療法を考案し, 1998年より臨床パイロット研究を開始した⁵⁾。2001年, BAK療法の中心であるCD56陽性細胞が動物の生存に必須の神経・免疫・内分泌の3機能をもった多機能・統合細胞であること, BAK細胞の投与によりQOLが良好に維持されることを見出した⁶⁾。特に, 肺癌患者では化学療

1) 公益財団法人仙台商生微生物研究所 2) 宇都宮セントラルクリニック

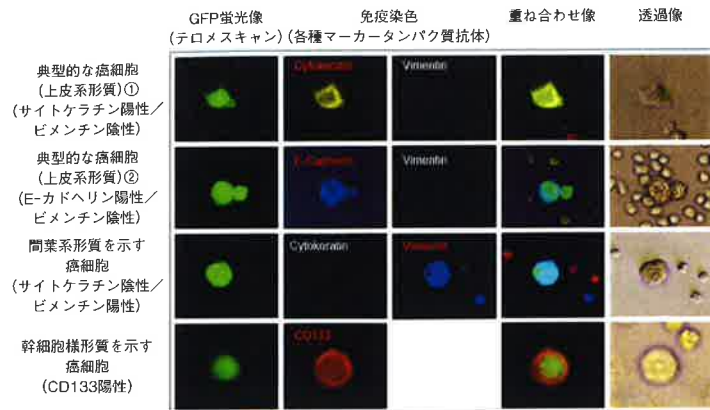


図1 多重免疫染色によるCTC形質判定

法に比してBAK療法のQOLは明らかに良好であることを見出した⁷⁾。さらに、患者の満足度調査を行ったところ70%の患者がBAK療法に満足しており、抗癌剤など標準治療による満足度の30%と比較にならないことがわかった⁸⁾。2008年、100億個のBAK細胞を点滴静注することによって、肺動脈を介して100%肺に到達することがわかり、特に肺癌の特効治療法となることが示唆された⁹⁾。さらにBAK療法は、100億個のBAK細胞を投与するため、10億個の癌細胞からなる径1 cmの癌であれば完全に消失させることができ、進行癌(stage II)の癌組織を手術して摘出した後BAK療法を行った28例の患者は全員生存で10年を経過し始め、特にBAK療法は癌の再発・転移の予防に優れた効果をもたらすことがわかった¹⁰⁾。そこで、そのメカニズムを解明するために、末梢循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cells: CTC)を検出するテロメスキャン(オンコリスファーマ、東京)によりBAK療法の効果を調べたので報告する。

染色体DNA末梢の短い塩基配列(TTAGGG)の繰り返しで構成されるテロメアは、細胞増殖に伴い次第に短縮し、細胞に老化を引き起こす。逆に、無制限の増殖能を有する癌細胞はテロメアを維持する分子機構を獲得しており、代表的なものがテロメラーゼの活性化である。テロメラーゼは、テロメアの反復配列を合成する酵素で生殖細胞と癌細胞で活性が高く、体細胞では抑制されている。

一方、ヒトのアデノウイルスは幼児期に「かぜ」症状を起こす原因ウイルスの1つで二重鎖DNAを有し、よ

く遺伝子構造が研究されているウイルスである。そこで、アデノウイルスDNAにテロメラーゼ遺伝子とGFP(緑色蛍光蛋白質: Green Fluorescent Protein)を組み込んだ改変型アデノウイルスを作り、癌細胞特異的に蛍光発光させるテロメスキャンが開発された¹¹⁾。今回、CTCにテロメスキャンを感染させ、蛍光発光したものを測定した。

方 法

1. BAK療法

患者から末梢血20 mLを採取し、リンパ球(3~5×10⁷)を分画し、固相化CD3抗体とIL-2(700 U/mL)の生物製剤を処理し、E(bina)培地で培養を開始する。2週間かけてALys無血清培地とIL-2(175 U/mL)で4 Lまで培養する。無菌テストに合格したリンパ球にIFN- γ (1,000 U/mL)を15分間だけ処理してリンパ球を活性化し、活性化したリンパ球(100億個)を200 mLのリンゲル液に入れ、患者に点滴静注で1時間かけて戻した。

2. テロメスキャン・CTCの検出

画像上CT, MRIでは直径10 mm以上の癌が検出可能、PET, PET/CTでは直径5 mm以上の癌が検出可能である。しかし、癌が5 mm以下の場合でも、既に血液中に癌細胞が浮遊していることがある。そこで、5 mm以下は見えない癌を検出するテロメスキャン(オンコリスファーマ、東京)が開発された。GFP陽性のCTCの中でも、多重免疫染色により3種の形質を判

表1 バイオマーカー α_1 AGによる高度進行癌のBAK療法における延命月の比較(2014. 1. 1現在)

1. 免疫抑制末期癌患者(α_1 AG \geq 96 mg/dL))			
全固形癌	8.7 \pm 6.2月 (n=132)		
肺 癌	6.5 \pm 4.1月 (n=36)		
2. 高度進行癌(stage IVならびに手術不能stage III)患者(α_1 AG<96 mg/dL)			
全固形癌	52.9 \pm 38.1月 (n=307)	卵巣癌	48.8 \pm 33.8月 (n=15)
肺 癌	51.3 \pm 43.4月 (n=62)	子宮癌	72.4 \pm 33.4月 (n=14)
大腸・直腸癌	43.1 \pm 30.5月 (n=49)	膝 癌	20.7 \pm 18.2月 (n=11)
乳 癌	69.5 \pm 35.6月 (n=45)	腎細胞癌	74.7 \pm 36.7月 (n=9)
胃 癌	32.0 \pm 25.7月 (n=30)	食道癌	77.1 \pm 30.9月 (n=9)
頭頸部癌	51.8 \pm 34.6月 (n=23)	膀胱癌	54.0 \pm 42.7月 (n=7)
前立腺癌	64.7 \pm 37.8月 (n=16)	胆管癌	35.0 \pm 30.8月 (n=3)

臨床経過	2010.3	甲状腺癌にて手術。
	2013.1	PET・US・MMG・テロメスキャン施行。 USにて右乳管内乳頭腫疑い。 GFP陽性細胞(サイトケラチン陽性)2個、GFP陽性細胞(サイトケラチン陰性)13個。 免疫療法施行(隔週法 計6回)。
	2013.6	テロメスキャン施行。 結果GFP陽性細胞(サイトケラチン陽性)0個、GFP陽性細胞(サイトケラチン陰性)0個。 現在まで再発は認められない。

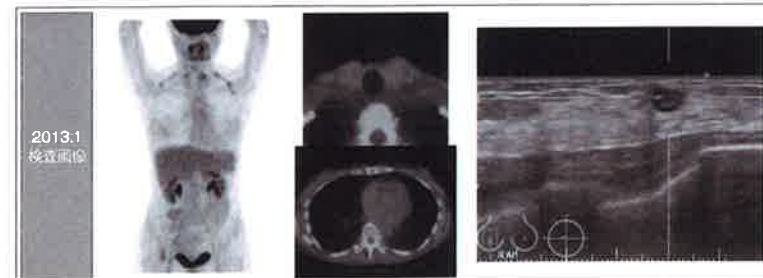


図2 甲状腺癌術後患者の検査画像とGFP陽性細胞経過

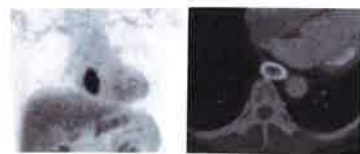
定できる(図1)。上皮系形質癌細胞は、サイトケラチン陽性またはビメンチン陰性である。転移を起しやすい上皮間葉転移(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)細胞はサイトケラチン陰性、ビメンチン陽性である。さらに、抗癌剤、放射線に抵抗性を示す循環幹細胞(CSC: Circulating Stem Cell)はCD133陽性細胞である。具体的検査方法は、患者から末梢血7.5 mLを採取し、白血球分画を採取し、テロメスキャンのウイルスを24時間感染し、各種マーカー蛋白質を免疫染色し、蛍光顕微鏡にてGFP陽性細胞を検出、カウントする。

結果ならびに考察

1. 高度進行癌(stage III, stage IV)に対するBAK療法の延命効果

患者の一般状態を知る指標としてバイオマーカーの血清 α_1 AG(酸性糖蛋白)を利用した¹²⁾。すなわち、 α_1 AGは組織の損傷や感染、炎症により誘起され、免疫機能の低下、栄養状態の悪化により増加し、肺癌、肝細胞癌など細胞増殖を伴う病態で増加が著しいので患者の一般状態を知るバイオマーカーとして最も優れていると考えた。そこで、高度進行癌患者のうち、 α_1 AGが96 mg/dL以上の免疫抑制患者132例と α_1 AGが96 mg/dL未満のまだ免疫能力が残っている307例でBAK

2011.7画像
食道に集積を認める。



2012.6画像
画像上再発所見なし。テロメスキャン実施。
GFP陽性細胞が2個。BAK療法実施。



2012.11画像
再発所見なし。テロメスキャン実施。GFP陽性細胞が
0個になる。



2013.5画像
フォローアップPET/CT検査にて再発所見なし。



図3 食道癌術後患者の検査画像とGFP陽性細胞経過

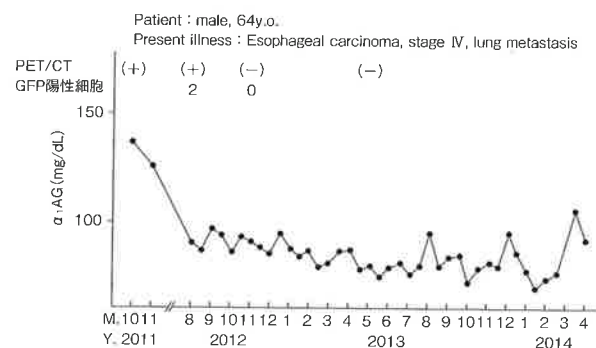


図4 食道癌術後患者のBAK療法による血清 α_1 AG値の経過

療法の延命月(BAK療法を開始してからの月数)を比較したところ、表1のように同じ高度進行癌でも免疫能力が残っていれば延命効果が著しいことがわかった。

2. テロメスキャンによるBAK療法の効果

1) 甲状腺癌術後患者(図2)

甲状腺癌術後乳管内乳頭腫疑いの患者のGFP陽性細胞数を測定したところ、サイトケラチン陽性2個、サイトケラチン陰性13個が検出された。そこで、BAK療法を行ったところ、GFP陽性細胞は検出されなかった。現在まで、再発は認められていない。

2) 食道癌患者(図3)

食道癌術後PET/CTで肺転移が認められ、2012年6月GFP陽性細胞が2個検出された。そこで、BAK療法

を行ったところ、2012年11月にはGFP陽性細胞が0個になり、図4に示すように現在まで再発所見がない。

3) 卵巣癌術後患者

2011年9月、卵巣癌の診断にて手術を施行し、術後GFP細胞を調べたところサイトケラチン陽性CD45陰性のGFP陽性細胞が6個(図5)、抗癌剤治療にてサイトケラチン陰性CD45陰性のGFP陽性細胞が3個検出されたが(図6)、BAK療法半年後にはGFP陽性細胞は0個になり、画像診断で転移再発を認めない。

4) 大腸癌術後患者

2012年10月、大腸癌の診断にて切除術後再発予防目的でBAK療法を施行し、以後PET検査で再発所見なく、2013年に施行されたテロメスキャンにてGFP陽性

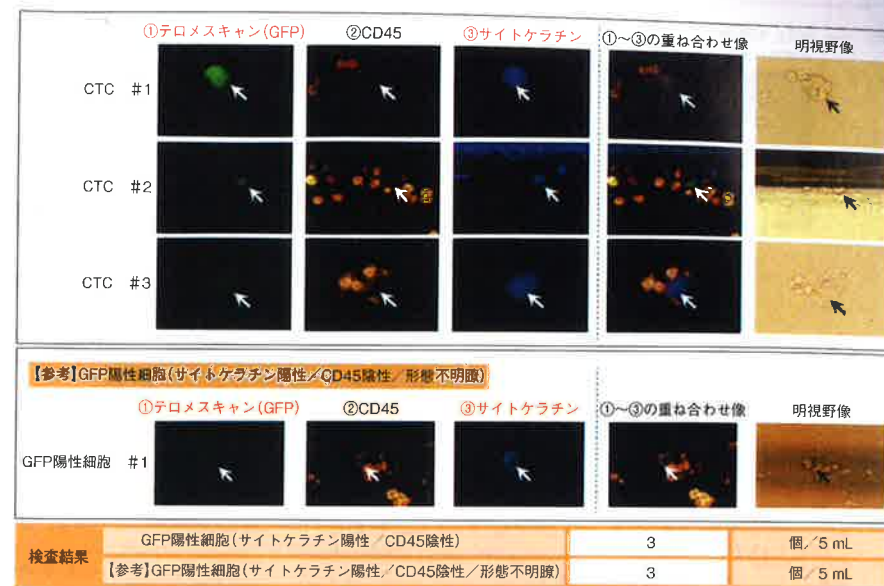


図5 卵巣癌術後患者のGFP陽性細胞

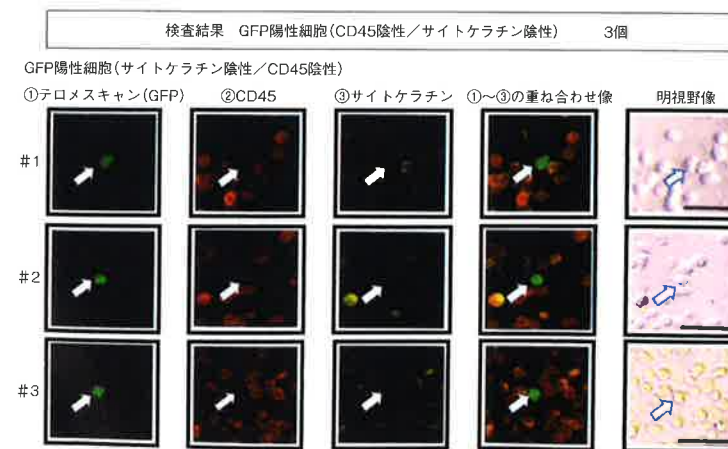


図6 卵巣癌術後患者で抗癌剤治療後のGFP陽性細胞

細胞は0個であった(図7)。

3. BAK療法による癌の発症・再発・転移予防効果

2. で示したように、BAK療法は血中に流れるわずかな癌細胞を殺すことがわかった。そこで、術後転移なしの進行癌患者(stage II)の再発・転移予防効果が

期待されたのでBAK療法を行ったところ、28例全員生存しており、さらに健康人の癌発症予防効果を調べたところ、まだ6例と症例が少ないが全例発症なしとなっている(表2)。

以上の結果から、BAK療法は高度進行癌に対する延

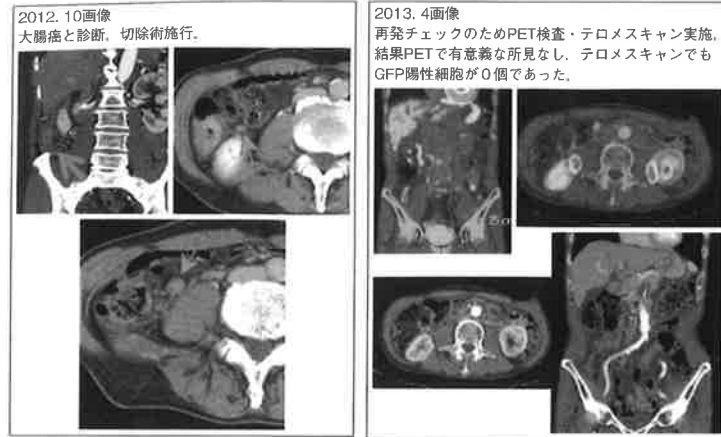


図7 大腸癌術後患者の検査画像とGFP陽性細胞

表2 BAK療法による癌の発症・再発・転移予防効果 (2014.1.1現在)

1. 癌再発・転移予防効果・術後転移なし進行癌患者 (stage II)
BAK療法を開始してからの月数
120.8 ± 47.7月 (n = 28)
全例生存
2. 癌発症予防効果・健康人
BAK療法を開始してからの月数
38.5 ± 26.1月 (n = 6)
全例癌発症なし

命効果とともに、癌発症ならびに再発・転移予防効果に優れた方法であることを見出した。

COI

本研究に当たり開示すべきCOIはない。

文 献

- 1) Ebina T : Biological response modifier activated killer immune-cell therapy leads to paradigm shift in cancer therapy : From "differentiation" to "integration". Prog Med 2013 ; 33 : 2715-2720.
- 2) Ebina T, Yamaguchi T, Saito M, et al : Time-lapse microcinematographic analysis of the natural cytotoxicity of murine lymphocytes : Morphology of living natural killer (NK) cells, Microbiol Immunol 1982 ; 26 : 1095-1099.
- 3) Fujimiya Y, Suzuki Y, Ebina T, et al : *In vitro* interleukin 12 activation of peripheral blood CD3⁺CD56⁺ and CD3⁺CD56⁺ γ δ T cells from glioblastoma patients. Clin Cancer Res 1997 ; 3 : 633-643.
- 4) Yamaguchi T, Fujimiya Y, Ebina T, et al : A simple method for the propagation and purification of γ δ T cells from the peripheral blood of glioblastoma patients using solid-phase anti-CD3 antibody and soluble IL-2. J Immunol Methods 1997 ; 205 : 19-28.
- 5) Ebina T, Fujimiya Y, Yamaguchi T, et al : The use of BRM-activated killer cells in adoptive immunotherapy : a pilot study with nine advanced cancer patients. Biotherapy 1998 ; 11 : 241-253.
- 6) Ebina T, Ogama N, Shimanuki H, et al : Effector mechanism and clinical response of BAK (BRM-activated killer) immuno-cell therapy for maintaining satisfactory QOL of advanced cancer patients utilizing CD56-positive NIE (Neuro-immune-endocrine) cells. Microbiol Immunol 2001 ; 45 : 403-411.
- 7) 久保典子, 真所弘一, 鹿野英生ほか : 高度進行癌に対する免疫細胞BAK療法のQOL調査. Prog Med 2011 ; 31 : 929-934.
- 8) 海老名卓三郎 : 高度進行癌に対する免疫細胞BAK療法の患者満足度調査. Prog Med 2008 ; 28 : 187-191.
- 9) Ebina T, Fujimiya Y : Cell transfer regimens in patients with highly advanced surgically unresectable non-small cell lung cancer : Significantly improved overall survival in patients with lower levels of serum immunosuppressive acidic protein. Lung cancer 2008 ; 60 : 246-251.
- 10) 海老名卓三郎 : 免疫細胞BAKリンパ球の腹壁腫瘍への局注療法. Jpn J Cancer Chemother 2013 ; 40 : 1507-1509.
- 11) 藤原俊義, 田中紀章 : テロメラーゼ活性を標的とした悪性腫瘍に対するウイルス療法の開発. ウイルス 2008 ; 58 : 11-18.

- 12) Ebina T : Interventional study of immune cell BAK (BRM-activated killer) therapy based on serum α_1 acid glycoprotein (α_1 AG) levels in patients with

highly advanced cancer, Prog Med 2011 ; 31 : 2007-2012.

A New Approach to BAK Immune Cell Therapy Prevents Cancer Occurrence, Recurrence, and Metastasis

Takusaburo Ebina¹⁾ and Toshihiko Sato²⁾

1) Sendai Research Institute for Microbiology

2) Utsunomiya Central Clinic

Surgery, anticancer agent therapy, and radiation therapy, all standard cancer treatments, seek to treat cancer by reducing tumor size. While all these treatments kill cancer cells, they also kill normal proliferating cells, generating numerous adverse effects. In addition, prolonged use of anticancer agents and radiation builds resistance, ultimately ending in failure to prolong patient life. We took an entirely different tack in devising a new BRM activated killer (BAK) immune cell therapy based primarily on CD56⁺ lymphocytes, working from a "coexisting with cancer" outlook and a focus on maintaining high QOL.

As discussed in this paper, we discovered that BAK immune cell therapy will attack invisible cancers in cases in which TelomeScan is used to detect circulating tumor cells (CTCs) in the blood. TelomeScan uses a modified adenovirus that proliferates in cancer cells in a manner dependent on telomerase activity and expresses GFP (green fluorescent protein). Of patients with highly advanced cancer (stage IV or inoperable stage III), 307 immunoreactive patients whose serum α_1 -acid glycoprotein levels were less than 96 mg/dL survived for 52.9 months from the start of BAK immune cell therapy, while 132 immunosuppressive patients whose serum α_1 -acid glycoprotein levels were 96 mg/dL or greater due to anticancer agent administration survived just 8.7 months.

TelomeScan is capable of detecting circulating tumor cells (CTCs) circulating in blood vessels, cells in epithelial-mesenchymal transition (EMT) (more prone to cause metastasis), and circulating stem cells (CSCs) resistant to anticancer agents to detect invisible cancer and evaluate the effects of BAK immune cell therapy. We found that counts of GFP positive cells in a patient with thyroid cancer fell from 15 to 0 : the patient experienced no recurrences. Additionally, counts of GFP cells in a patient with stage IV esophageal cancer and liver metastasis fell from 2 before treatment to 0 after treatment. The patient has lived free of recurrence and metastasis in the 4 years since. Encouraged by these results, we investigated this therapy's effectiveness in preventing cancer recurrence and metastasis. We found all 28 patients with advanced cancer (stage II) and no postoperative metastasis and all 6 healthy subjects in whom we had tested the therapy's cancer preventive effect remained alive. We conclude that BAK immune cell therapy has potent cancer prevention activity free of adverse effects.

Key words : Immunocyte therapy, BAK therapy, Circulating tumor cells