

膵癌根治切除後のゲムシタビン・養子免疫併用補助療法

氏名 松井 洋人

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成 29 年 6 月

目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	7
6. 謝辞	9
7. 参考文献	9
8. 図表	13

1. 要旨

【背景】 教室では膵癌治癒切除例に対し術後補助療法として、膵癌細胞に高発現する糖鎖抗原 MUC1 を特異的に認識する自己リンパ球移入療法 (MUC1-CTL 療法) を先進医療として施行してきた。また、2007 年からは標準療法の Gemcitabine (GEM) に MUC1-CTL 療法を併用した。

【目的】 今回、GEM+ MUC1-CTL 療法の治療成績を後方視的に検討した。

【対象と方法】 2007 年 1 月～2013 年 12 月まで当科で施行した膵癌肉眼的治癒切除後、MUC1-CTL 療法を施行例のうち、GEM の relative dose intensity が 50%未満、CTL 投与回数 1 回以下の症例を除外した 21 例について無再発生存期間、肝再発率、生存率を検討した。また、進行度、腫瘍因子、術前の各種腫瘍マーカー、白血球数、好中球/リンパ球比、末梢血サブセット、生化学検査値、移入時のリンパ球サブセット、移入時のリンパ球個数を用いて単変量及び多変量解析を行い、予後因子を検討した。

【MUC1-CTL 細胞の誘導】 術前に Leukapheresis にて患者から採取した PBMC と不活化ヒト膵癌細胞株 YPK-1 (MUC1 強発現株) を 3 日間混合培養し、さらに低容量 IL-2 刺激下で 7 日間培養し MUC1-CTL を誘導した。これを術後 1 週間以内に経静脈投与し、術後のべ 3 回投与を基本とした。

【臨床的結果】 平均年齢は 61.7 歳、Stage3 : 13 例、Stage4a : 4 例、Stage4b : 4 例であり、R0 : 18 例、R1 : 3 例であった。無再発生存期間は中央値で 15.8 か月、肝再発率は 33%、生存率は 1 年 76.9%、2 年 49.0%、5 年 15.1%であり、MST は 24.7 カ月であった。また、投与 CTL 細胞数が平均 1.3×10^9 個以上の群で無再発生存期間の延長を認めた。【結語】 GEM+MUC1-CTL 療法は肝転移と局所再発を抑制する可能性が示唆された。また、本療法では十分な細胞投与量が本療法の予後マーカーとなる可能性が示唆された。

2. 背景

膵癌は早期診断が困難であり、また、早い段階から播種や遠隔転移能をもち、化学療法や放射線に対する感受性も低いため、非常に予後不良な疾患である。膵癌患者の死亡率は 98%にのぼり、少数の、局所に限局した病変の患者に対してのみ根治切除が施行されるが、病理学的に根治切除が得られた症例ですら、そのほとんどが 2 年以内に再発し、5 年生存率は 25%未満である。¹⁾

2005 年、膵癌術後補助化学療法の大規模第Ⅲ相試験、CONKO-001 が行われ、ゲムシタビン (GEM) と手術単独群で、術後補助療法群が有意に無再発生存期間の延長を認めた。しかし、全生存期間に関しては有意差を認めず、更なる治療が必要であると考えられた。²⁾

免疫療法は放射線治療や化学療法に正常組織への影響が少なく、腫瘍特異的に働く点において有利であると考えられる。ムチン 1 (MUC1) は多くの癌腫において不完全なグリコシル化形態で過剰発現している。³⁾ 当教室では免疫染色によってすべての浸潤性膵管癌の原

発巣及び肝転移巣において MUC1 が発現していることを確認した。一方、MUC1 は正常組織や慢性膵炎などでは発現を認めなかった。さらに当教室では MUC1 が癌関連抗原であり、MUC1 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が HLA 非拘束的に MUC1 を認識することも確認した。

4)

これらの結果をもとに、当教室では MUC1 抗原を標的とした養子免疫療法を開発した。そして当教室では、MUC1 高発現ヒト膵癌細胞株である、YPK-1 によって刺激された CTL を用いた養子免疫療法 (MUC1-CTL 療法) が、切除不能進行膵癌に対し、有意な予後改善は得られないものの、肝転移を減少させ特に大きな有害事象を認めなかったことを報告した。MUC1-CTL 療法は安全で肝転移の抑制 (5%) が示唆されたが、局所再発率は 65% と高く、3 年生存率は 19.4% に過ぎなかった。

膵癌の標準的化学療法薬である GEM は免疫抑制性に働かず、むしろ、特異的なワクチン効果や免疫療法の反応を増強させ、癌細胞に対する免疫反応の促進を直接的・間接的に活性化させる可能性が示唆されている。^{6, 7)}

今回、我々は膵癌切除後の術後補助療法として養子免疫療法併用 GEM 療法に関しての検討を行った。本療法を施行した症例に関して後方視的に無再発生存期間と全生存期間を評価し、他の術後補助療法のとの比較検討を行った。

3. 方法

【対象】2007 年から 2013 年の間、44 名の膵癌患者が本療法に参加し術前にフェレーシスを施行された。1 名の患者は術中に腹膜播種を認め、この度の検討から除外した。残る 43 名の患者に術後、標準的な化学療法である GEM と、MUC1-CTL の併用療法を行った (Table 1)。本療法は厚生労働省より先進医療として承認され (受領番号: 先 121-1)、治療費を受けて施行した。その為、本療法は臨床試験としての登録は行っていないが、施行にあたっては、山口大学の倫理委員会に承諾を受け、ヘルシンキ宣言に則り、治療前に十分なインフォームドコンセントのもと、施行した。

【適格基準】

下記適格規準を満たす症例を本試験の対象とした。

- ①術前、臨床病理学的に根治切除可能な浸潤性膵管癌と診断された患者。
- ②術前の CT 及び内視鏡超音波検査にて腹腔動脈、上腸間膜動脈に浸潤なく、左腎静脈レベルの大動脈周囲リンパ節転移を除く、所属外リンパ節転移、遠隔転移のない症例。
- ③20 歳以上。
- ④主要臓器機能について、以下の規準を満たしている。(クレアチニン $<$ 2.0mg/dl, ビリルビン $<$ 3.0g/dl, 血小板数 \geq 75,000/ml, 白血球数 \geq 3,000/ml もしくは \leq 15,000/ml)。
- ⑤ECOG PS 0-2。

【治療プロトコル】

術前にフェレーシスを行い、CTLを誘導し、術後1週間目に静脈内投与する。術後28日に初回GEM(1000mg/m²)の投与を行う。GEMはday1, 8, 15で4週1サイクルとし、計6サイクル行う(Figure 1)。化学療法中に白血球数:2000/mm³未満もしくは12000/mm³以上、血小板数:75000/mm³未満となった場合、ゲムシタピンの投与は回復するまで延期した。また、Grade4の白血球減少・好中球減少、発熱性好中球減少、Grade3の白血球・好中球減少に感染症を伴うもの、血小板数25000未満、Grade3以上の非血液毒性有害事象を認めた際にはGEMは1000mg/m²から700mg/m²に減量を行った。CTLの2回目、3回目の投与はGEMと並行して約1か月毎に行った。再発の評価は3か月毎にCT、MRIもしくは剖検にて行った。

【CTL誘導】

当科で樹立したHLA-A24、MUC1高発現ヒト膵癌細胞株であるYPK-1をCTL誘導に用いた。YPK-1は10%FBS(シグマ-アルドリッチ社)含有のDMEM培地(日水製薬)を用いて5%CO₂下に培養した。

末梢血単核球(PBMC)はCOBE Spectra Apheresis System(COBE BCT社)を用いて採取した後、Ficoll-Paque(アマシャム-ファルマシア-バイオテック社)を用いた遠心分離により濃縮した。続いて、PBMCは0.2mg/mlマイトマイシン(協和発酵)により不活化されたYPK-1とAIM-V培地(Gibco社)で3日間、共培養(PBMC:YPK-1比;1000:1)を行った。その後、培養3, 5, 7日目にIL-2(塩野義製薬)10JRU/mlを添加した。細菌混入の無いことを確認し10日目に誘導されたCTLを回収し生理食塩水にて3回洗浄を行なった後、生食100mlにて希釈して経静脈的に投与を行った(Figure 2)。

【研究対象と適格治療症例選択のフローチャート】

本研究は後方視的コホート研究であるため、GEMの減量、延期・中止が厳密には規定されていない。その為、本研究におけるGEMの平均の相対容量強度(relative dose intensity: RDI)が既存の報告に比べ低く、また、症例によっては十分なCTLが投与されていないものもあり、GEMとMUC1-CTL療法の相乗効果を検討することが難しい。その為、RDI \geq 50%、MUC1-CTLが少なくとも2回以上投与されている症例を適格治療症例とした(n=21, Figure 3)。適格治療症例をTable 2に示した。他の症例は非適格治療症例とした(n=22, Figure 3)。

【PBMCとCTLサブセットの分析】

表面抗原に対するモノクローナル抗体(mAbs)を用いてリンパ球サブセットの検討を行った。すべてのmAbsはCoulter Immunologyより購入した。抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD20抗体、抗CD25抗体、抗CD56抗体、抗HLA-DR抗体、抗CD11b抗体(いずれもFITC)及び抗CD8抗体(PE)、抗TQ1抗体(PE)を用いた。TQ1/CD4及びCD8/CD11bは2色染色を行った。サンプルの測定には、EPICSフローサイトメーター(Coulter Electronics社)を用い蛍光励起波長は488nm(200-500mW)に設定した。すべてのサンプルで測定細胞数は5000個とした。

【治療効果予測因子の分析】

臨床病理学的因子、生化学検査、リンパ球サブセット、腫瘍マーカー、ゲムシタピンの RDI、CTL の平均投与数から適格治療症例における治療効果予測因子を検討した。カットオフ値は ROC 曲線より求めた。カットオフ値を用いて単変量、多変量解析を行い、治療効果予測因子を決定した。

【統計学的分析】

表面マーカーの変化は Student の t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意とした。数値は平均±平均誤差で示した。生存は Kaplan-Meier 分析を用いて検討した。単変量は Log-rank test を用いた。単変量解析で有意差を認めた因子を用いて Cox ハザード比例分析によって多変量解析を行った。統計学的分析は JMP ver. 9.0 (SAS Institute Japan) を用いて行った。

4. 結果

【症例】

2007 年から 2013 年までの膵癌肉眼的根治切除を行った 43 症例に対し本症例を行った。患者背景と治療経過を Table 1 に示す。TNM 分類は UICC (26) を用いた。

【手術成績】

血行性転移、腹膜播種、massive な後方浸潤、主要動脈への浸潤の無い症例に対して根治切除を施行した。門脈浸潤、上腸間膜静脈浸潤症例に関しては門脈合併切除を行った。全ての患者が傍大動脈周囲リンパ節郭清を伴う膵頭十二指腸切除、幽門輪温存膵頭十二指腸切除、膵体尾部切除を行った。門脈合併切除を行った 11 症例のうち、5 例が病理学的にも門脈浸潤を認めた。37 例が病理学的根治切除 (R0) が得られ、6 例が病理学的断端陽性 (R1) であった。全ての患者で病理学的に浸潤性膵管癌が確認された。高分化型：4 例、中分化型：31 例、低分化型：6 例、腺扁平上皮癌：1 例、退形成癌：1 例であった。

【CTL 療法】

CTL 療法投与回数と症例数の内訳は 3 回：32 例、2 回：6 例、1 回：3 例であった。投与 CTL 数は $2.0 \times 10^8 \sim 1.7 \times 10^9$ 個であった。CTL 療法は 5 例で 2 か月以内に完遂し、10 例で 3 か月以内、22 例で 4 か月以内、7 例で 4~15 か月以内に完遂した。

【GEM 投与】

GEM 投与に関して、4 例 (10.3%) で 1 サイクル以内に投与中止となった。また、15 例 (38.5%) でプロトコル治療を完遂した。治療中止理由としては有害事象 (23 例)、術後合併症 (1 例)、患者希望 (4 例) であった。18 症例で血液毒性のため、GEM の減量投与が行われた。GEM の平均投与サイクルは 3 サイクル、平均投与回数は 8 回であった。GEM の平均容量強度は $377 \text{mg}/\text{m}^2/\text{週}$ であり、平均 RDI は 50.8% であった。手術から化学療法開始までの平均期間は 36 日 (22-183 日) であった。

【臨床結果】

適格治療症例の無再発生存期間と全生存期間は中央値で 15.8 か月と 24.7 か月であり、

非適格治療症例の無再発生存期間と全生存期間は5.1か月と14.7か月であった (Figure 4, 5)。

【安全性】

治療期間中、皮疹や発熱、自己免疫反応などの MUC1-CTL 療法に起因すると思われる有害事象は認めなかった。

【適格治療症例における検討】

GEM の RDI \geq 50%かつ MUC1-CTL 投与回数 2 回以上の症例を適格治療症例として (Figure 3) サブグループ解析を行った。適格治療症例の平均 RDI は 72%であり、MUC1-CTL の平均投与回数は 2.7 回であった。適格治療症例を Table 2 に示す。

適格治療症例における CTCAE に基づいた Grade 3, 4 の有害事象を Table 3 に示す。Grade 3, 4 の有害事象で最も多いものは白血球減少であった (35%)。Grade 3 以上の非血液毒性の有害事象は認めなかった。皮疹や発熱、悪寒、投与部位反応などの養子免疫療法関連有害事象は認めなかった。臨床的、画像的に自己免疫反応による有害事象を疑う所見はみとんなかった。

適格治療症例における 1 年、2 年、3 年、5 年生存率は 86.3%、54.6%、44.1%であった。肝転移は 7 例 (33%)、局所再発は 4 例 (19%) に認めた (Table 4)。

適格治療症例における R0 切除症例と R1 切除症例の全生存期間に有意差を認めなかった (中央生存期間 : 32.7 か月 vs. 19.8 か月)。

培養前後の PBMC のリンパ球サブセットを Table 5 に示す。CD3+, CD4+陽性細胞は培養後にそれぞれ有意に増加を認めた。また、CD20+, CD56+, CD4+/CD25+陽性細胞はそれぞれ有意に減少した。

また、治療開始前の患者リンパ球サブセットと 3 回目フェレーシス時の患者リンパ球サブセットの変化を Table 6 に示す。リンパ球サブセットに有意な変化を認めなかった。

また、検討しうる治療効果予測因子を Table 6 に示す。平均 CTL 投与個数 \geq 1.3 \times 10⁹個が単変量、多変量解析にて独立した予後改善因子であった。平均 CTL 投与個数 \geq 1.3 \times 10⁹個において、無再発生存期間は有意に改善を認めた (Figure 6)。

5. 考察

隣癌肉眼的根治切除症例における GEM 及び MUC1-CTL 併用療法に対する検討を行った。本療法は安全に施行可能であり、免疫療法特有の有害事象は認めなかった。GEM により術後補助療法の過去の臨床試験と比較し、^{2, 8)}骨髄抑制や自己免疫関連疾患などの有害事象の増加は認めなかった。

また、サブグループ解析として GEM の RDI \geq 50%かつ CTL 投与回数 2 回以上を治療適格症例として検討を行った。本研究の治療適格症例においてもなお、RDI は過去の臨床試験のものと比較し低い、これは本研究の症例に対する有害事象の管理に関して何らかの問題があった可能性がある。本研究における治療適格症例は非常に少数であり、正確な検討は困

難であるが、過去の臨床試験と比較し治療適格症例における予後は良好に思われる (Table 8)。²⁾ CONKO-001 試験においても GEM 投与 1 サイクル未満の症例を除外した qualified analysis group の検討を行っているが、これと比較しても本症例における治療適格症例の無再発生存期間は良好であった (13.7 か月 vs. 15.8 か月)。また、近年、ヨーロッパのグループより新規の膵癌術後補助療法の大規模試験 : ESPAC-4 の結果が報告された。9) この結果では GEM 単剤に比べ、GEM とカペシタビン併用による術後補助化学療法が有意に予後を改善することを示したが、この併用療法は Grade3, 4 の有害事象を多く認めた。本研究の適格治療症例群の無再発生存期間はこの ESPAC-4 による GEM/カペシタビン併用群に劣らず、かつ有害事象の増加を認めなかった。治療適格症例において平均 CTL 投与個数 ($\geq 1.3 \times 10^9$ 個) が独立した予後因子であり、無再発生存期間の改善を認めていることから、GEM による術後補助療法に対する MUC1-CTL 療法の影響の可能性が示唆された (Table 5)。以前、われわれが報告したように、MUC1-CTL 単独による術後補助療法の生存期間は手術単独群と比べ予後良好であったが、⁵⁾ 標準治療の GEM に対して MUC1-CTL 療法の上乗せ効果の可能性があると考えられた。

GEM の免疫に及ぼす影響に関しては、細胞傷害性リンパ球の活性化を抑制しない、¹⁰⁾ 制御性リンパ球 (Treg) の誘導を抑制する、⁷⁾ 骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) を直接的に抑制する、T 細胞の増殖を促進する ¹¹⁾ などの効果が報告されている。このように GEM は免疫抑制性には働かず、むしろ、特異的な免疫反応や養子免疫を増強し癌細胞に対する免疫反応を直接活性化する可能性がある。¹²⁾ そのため、われわれは GEM と免疫療法の相乗効果に期待した。

また、われわれは MUC1-CTL 単独療法で膵癌根治切除後の肝転移抑制効果が示唆されるが、局所再発が依然高率 (65.0%) であることを報告した。⁵⁾ 膵癌術後の肝転移再発は一般的に約 60% と報告されているが、^{13, 14)} 本研究において全生存を通して 33% であった。活性化リンパ球は投与から 2 時間後に肺に局在しその後、投与 24 時間後に肝臓と脾臓に再分布すると報告されている。^{15, 16)} 本研究においてリンパ球は同様の遊走を示すと考えられ、これが肝転移の抑制に関わっていると考えられる。

MUC1-CTL 単独療法と比べ⁵⁾ 本研究では局所再発率の低下を認める (19% vs. 65%)。GEM による局所再発抑制の機序は明らかでないが、CONKO-001 試験において、GEM 投与群での R0 切除群と R1 切除群の無再発生存期間は同等であり、GEM に何らかの局所コントロールの作用があると考えられている。²⁾ MUC1-CTL 療法は肝転移抑制の、GEM は局所再発抑制の可能性が示唆され、そのため、MUC1-CTL と GEM の併用は相乗効果があると考えた。

一方で、炎症、免疫疲弊、免疫抑制は CTL の効果の阻害につながっている可能性が考えられる。炎症は近年、膵癌の進展に強くかかわっていると報告されている。¹⁷⁾ また、膵癌患者において Treg の増加と免疫抑制が示されている。¹⁸⁾ MDSC は健常者の膵には認めないが膵癌患者では容易に癌間質に認めると報告されている。¹⁹⁾ また膵癌患者の血液、骨髄より MDSC が認められており、局所に局限している症例に比べ遠隔転移を有する症例で有意に増

加していると報告されている。¹⁹⁻²¹⁾また、MDSC の増加と病期が関連しているとも報告されている。²²⁾また、固形癌における CD8+細胞の疲弊が報告されている。²³⁾これらの免疫抑制機序や免疫疲弊により膵癌患者における免疫療法で十分な結果が出ていないことに関連していると考えられた。その為、免疫チェックポイントの探索が必要であるが、本研究は後方視的研究であるため、今後、同様の前向き試験などによりこれらの因子を検討することが必要であると考えられた。

膵癌術後の予後予測因子としては CA19-9, CEA, ²⁴⁾腫瘍径、腫瘍分化度,²⁵⁾リンパ節転移,²⁶⁾切除マージン, ²⁷⁾や免疫因子として好中球/リンパ球比,²⁸⁾癌組織への CD4+・CD8+細胞の浸潤,²⁹⁾循環メソテリン³⁰⁾などが報告されている。本研究においては平均投与 CTL 数が長期無再発症例の独立した関連因子であった。この結果は、十分な CTL の投与量により予後化改善する可能性が示唆されており、今後、iPS 細胞などを用いることにより本療法の効果の増強が期待できる可能性がある。³¹⁾

一方で、切除不能膵癌に対しての MUC1-CTL 単独療法では予後の改善は認めず、⁵⁾我々はペプチド刺激樹状細胞併用 MUC1-CTL 療法を行い、有害事象なく、予後の改善を認めた。更に、GEM 及び MUC1-mRNA 導入樹状細胞を併用した MUC1-CTL 療法により有害事象の増加なく更なる予後改善を認めたことを報告した。³³⁾そのため、今後、膵癌根治切除後の補助療法として GEM/MUC1-CTL 療法に MUC1 mRNA 導入樹状細胞を上乗せすることでさらなる予後の改善が期待されると考えられた。

GEM に MUC1-CTL を併用した膵癌術後補助免疫化学療法は安全に投与可能であり、GEM と CTL の十分な投与が得られた症例に関して予後の改善が示唆された。この予備的な結果は今後、大規模な前向き試験によって検証が必要であるが、本療法が膵癌の新たな治療戦略の一つになりうることを期待された。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導頂いた永野浩昭教授、裕 彰一先生、そして、多大な御協力を頂いた佐野昭子氏と兼安香織氏に感謝します。また、本研究は the Project for Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics (P-Direct)及びThe Japan Agency for Medical Research and Development (AMED)の研究プログラムとしてサポートされ行われました。

7. 参考文献

- [1] Sener SF, Fremgen A, Menck HR, et al. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. J Am Coll Surg. 1999;189:1-7.
- [2] Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic

- cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007;297:267-277.
- [3] Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem*. 1990;265:15286-15293.
- [4] Masaki Y, Oka M, Ogura Y, et al. Sialylated MUC1 mucin expression in normal pancreas, benign pancreatic lesions, and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatology*. 1999;46:2240-2245.
- [5] Kawaoka T, Oka M, Takashima M, et al. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer: cytotoxic T lymphocytes stimulated by the MUC1-expressing human pancreatic cancer cell line YPK-1. *Oncol Rep*. 2008;20:155-163.
- [6] Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 1997;15:2403-13.
- [7] Kan S, Hazama S, Maeda K, et al. Suppressive effects of cyclophosphamide and gemcitabine on regulatory T-cell induction in vitro. *Anticancer Res*. 2012;32:5363-5369.
- [8] Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer*. 2009;101:908-915.
- [9] Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017.
- [10] Alvino E, Fuggetta MP, Tricarico M, et al. 2'-2'-difluorodeoxycytidine: in vitro effects on cell-mediated immune response. *Anticancer Res*. 1998;18:3597-3602.
- [11] Le HK, Graham L, Cha E, Morales JK, Manjili MH, Bear HD. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol*. 2009;9:900-909.
- [12] Plate JM, Plate AE, Shott S, et al. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54:915-925.
- [13] Griffin JF, Smalley SR, Jewell W, et al. Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer*. 1990;66:56-61.
- [14] Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, et al. Recurrence after resection for

- ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J Surg.* 1997;21:195-200.
- [15] Maghazachi AA, Herberman RB, Vujanovic NL, et al. In vivo distribution and tissue localization of highly purified rat lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Cell Immunol.* 1988;115:179-194.
- [16] Felgar RE, Hiserodt JC. In vivo migration and tissue localization of highly purified lymphokine-activated killer cells (A-LAK cells) in tumor-bearing rats. *Cell Immunol.* 1990;129:288-298.
- [17] Evans A, Costello E. The role of inflammatory cells in fostering pancreatic cancer cell growth and invasion. *Front Physiol.* 2012;3:270.
- [18] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002;169:2756-2761.
- [19] Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, et al. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61:1373-1385.
- [20] Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1419-1430.
- [21] Basso D, Fogar P, Falconi M, et al. Pancreatic tumors and immature immunosuppressive myeloid cells in blood and spleen: role of inhibitory co-stimulatory molecules PDL1 and CTLA4. An in vivo and in vitro study. *PLoS One.* 2013;8:e54824.
- [22] Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:49-59.
- [23] Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* 2010;207:2187-2194.
- [24] Distler M, Pilarsky E, Kersting S, et al. Preoperative CEA and CA 19-9 are prognostic markers for survival after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas - a retrospective tumor marker prognostic study. *Int J Surg.* 2013;11:1067-1072.
- [25] Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J*

Gastrointest Surg. 2000;4:567-579.

[26] House MG, Gonen M, Jarnagin WR, et al. Prognostic significance of pathologic nodal status in patients with resected pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2007;11:1549-1555.

[27] Van den Broeck A, Sergeant G, Ectors N, et al. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2009;35:600-604.

[28] Wang DS, Luo HY, Qiu MZ, et al. Comparison of the prognostic values of various inflammation based factors in patients with pancreatic cancer. *Med Oncol.* 2012;29: 3092-3100.

[29] Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004;28:e26-31.

[30] Johnston FM, Tan MC, Tan BR, Jr., et al. Circulating mesothelin protein and cellular antimesothelin immunity in patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6511-6518.

[31] Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, et al. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. *Cell Stem Cell.* 2013;12:31-36.

[32] Kondo H, Hazama S, Kawaoka T, et al. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer using MUC1 peptide-pulsed dendritic cells and activated T lymphocytes. *Anticancer research.* 2008;28:379-387.

[33] Shindo Y, Hazama S, Maeda Y, et al. Adoptive immunotherapy with MUC1-mRNA transfected dendritic cells and cytotoxic lymphocytes plus gemcitabine for unresectable pancreatic cancer. *J Transl Med.* 2014;12:175.

8. 图表

Table 1. Patient characteristics and treatment adequacy

	All patients	Adequate treatment group	Inadequate treatment group
Number of patients	43	21	22
Age, mean(range), y			
Mean	66.7 (42-86)	61.7 (42-74)	71.6 (60-86)
Sex			
Male	20	11	9
Female	23	10	13
Type of surgery			
DP	12	6	6
PD or TP	31	15	16
Stage (UICC)			
IA	1	0	1
IB	1	0	1
IIA	15	8	7
IIB	20	9	11
IV	6	4	2
Resectability			
R0	37	18	19
R1	6	3	3
HLA			
HLA-A-24	25	13	12
Others	12	6	6
Unknown	6	2	4
Follow up time (months)			
Mean	26	36	16
Range	4-85	6-85	4-30

DP, distal pancreatectomy; PD, pancreatoduodenectomy; TP, total pancreatectomy

R0, no residual tumor; R1, microscopic residual tumor, UICC, Union for International Cancer Control

HLA, human leukocyte antigen

Table 2. Patient demographics and clinical outcomes of the adequate treatment group

No.	Age (years)	Sex	HLA-A status	TNM stage	Operation	Curability	Recurrence	DFS (months)	Survival	OS (months)
1	73	male	24/26	IIA	DP	0	+	30	dead	41
2	72	male	02/02	IIIB	DP	0	+	51	dead	71
3	42	male	02/33	IIIB	PD	0	+	60	alive	80
4	54	male	02/24	IIA	PD	0	-	87	alive	87
5	60	male	unknown	IIIB	PD	0	+	36	alive	87
6	57	male	unknown	IV	PD	1	+	15	dead	20
7	71	female	24/24	IIIB	PD	0	+	4	dead	10
8	53	female	02/02	IIIB	PD	0	+	17	alive	68
9	60	female	24/24	IIA	PD	0	+	28	alive	46
10	56	female	26/24	IIA	TP	0	+	7	dead	13
11	57	male	02/24	IV	PD	1	+	45	alive	45
12	67	female	11/24	IIA	PD	0	+	16	dead	20
13	46	female	02/26	IV	PD	0	+	7	dead	17
14	62	male	02/26	IIA	DP	0	+	16	alive	42
15	48	female	24/31	IIA	DP	1	+	7	dead	34
16	68	female	02/24	IIIB	DP	0	+	6	dead	10
17	71	male	24/26	IIIB	PD	0	+	8	dead	18
18	71	female	24/24	IIIB	PD	0	+	12	dead	20
19	74	female	02/24	IV	PD	0	+	2	dead	6
20	70	male	24/31	IIA	PD	0	-	43	alive	43
21	64	male	03/26	IIIB	PD	0	+	15	dead	25

DFS, disease-free survival; OS, overall survival; DP, distal pancreatectomy; PD, pancreatoduodenectomy; TP, total pancreatectomy

Table 3. Grade 3 and 4 adverse events in the adequate treatment group (n=21)

Adverse event	Adequate treatment group (n=21)	
	No.	%
Leukocytopenia	7	35
Neutrocytopenia	6	29
Thrombocytopenia	0	0
Anemia	0	0
AST	0	0
ALT	0	0
ALP	0	0
Fatigue	0	0
Anorexia	0	0
Diarrhea	0	0
Mucositis / stomatitis	0	0
Nausea	0	0
Vomiting	0	0

AST; aspartate aminotransferase
 ALT; alanine transaminase, ALP; alkaline phosphatase

Table 4. Recurrence sites in the adequate treatment group

Recurrence site	Adequate treatment group (n=21)	
	No.	%
Liver metastasis	7	33
Local recurrence	4	19
Others		
Peritoneum	6	29
Lung	10	48
Bone	1	4.8
Lymph node	3	14
Total	19	90

Table 5. Lymphocyte subset changes before and after the culture of MUC1-CTLs in the adequate treatment group

Subset	Before (%)	After (%)	P-values
CD3+	70.2 ± 4.9	84.0 ± 3.9	0.0001
CD4+	44.1 ± 4.5	56.6 ± 6.3	0.0016
CD8+	34.5 ± 4.7	33.1 ± 5.3	0.6863
CD20+	13.5 ± 1.9	7.3 ± 1.4	0.0001
CD4+/CD25+	10.5 ± 2.0	12.9 ± 2.4	0.0383
CD56+	21.1 ± 3.7	12.6 ± 2.7	0.004

PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; CD, cluster of differentiation
Data expressed as mean ± SE.

Table 6. Lymphocyte subset changes of PBMCs before and after treatment in adequate treatment group

Subset	Before treatment (%)	At the 3rd pheresis (%)	P-values
CD3+	70.2 ± 4.9	70.7 ± 4.1	0.387
CD4+	44.1 ± 4.5	44.7 ± 4.5	0.6828
CD8+	34.5 ± 4.7	33.4 ± 4.3	0.4059
CD20+	12.7 ± 1.7	10.2 ± 1.7	0.417
CD4+/CD25+	10.5 ± 2.0	11.0 ± 1.5	0.1997
CD56+	21.1 ± 3.7	18.8 ± 2.9	0.9321

PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; CD, cluster of differentiation
Data expressed as mean ± SE.

Table 7. Prognostic factors of long disease-free survival in the adequate treatment group

Factor		Number	Median DFS (month)	Univariate	Multivariate		
				P	HR	95% CI	P
UICC stage	IIa / IIb / IV	6/ 9/ 4	22/ 15/ 11	0.423			
Differentiation	well, moderate / poorly, adenosquamous	17/ 4	16/ 21	0.985			
Lymph node metastasis	N0 / N1	8/ 13	22/ 14	0.308			
Resection status	R0 / R1	18/ 3	16/ 15	0.685			
WBC (cells/uL)	<5000 / ≥5000	7/ 14	30/ 14	0.352			
NLR	<3 / ≥3	13/ 8	16/ 16	0.462			
Lymphocytes (%)	<30 / ≥30	10/ 11	16/ 30	0.29			
CD3+ of PBMCs (%)	<74 / ≥74	4/ 17	22/ 16	0.042*	1.07	0.32-3.63	0.9112
CD4+ of PBMCs (%)	<43 / ≥43	8/ 13	33/ 15	0.18			
CD8+ of PBMCs (%)	<33 / ≥33	9/ 12	15/ 17	0.394			
CA19-9 (U /mL)	<300 / ≥300	14/ 7	16/ 15	0.173			
Monocyte count (cells /uL)	<350 / ≥350	17/ 4	71/ 15	0.0043*	0.25	0.057-1.08	0.0622
RDI of GEM (%)	<70 / ≥70	12/ 7	8/ 41	0.0811			
Average number of administered CTLs (x 10 ⁹ cells)	<1.3 / ≥1.3	17/ 4	15/ 55	0.0072*	9.22	1.51-176.8	0.0133*

UICC, Union for International Cancer Control; WBC, white blood cell; NLR, neutrophil to lymphocyte ratio; CD, cluster of differentiation; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; RDI, relative dose intensity; CTLs, cytotoxic T lymphocytes; N0, no of metastasis of regional lymph node; N1, regional lymph node metastasis present; R0, no residual tumor; R1, microscopic residual tumor; (*); significant *p* values (*P* < 0.05)

Table 8. Comparison between the current study and previous report

	Current study	Our previous report ^a		CONKO-001 ^b		JSAP-02 ^c	
	GEM + MUC1-CTL (adequate treatment group)	MUC1-CTL	Surgery alone	GEM	Surgery alone	GEM	Surgery alone
Patient characteristics							
Number of patients	21	20	-	179	175	58	60
Median age (years)	62	66	-	62	61	65	64
Sex: males	52%	60%	-	59%	56%	69%	57%
Resection status: R0	86%	90%	-	81%	85%	81%	87%
Number of GEM cycles							
	6 cycles	-	-	6 cycles		3 cycles	
Results							
Median DFS (months)	15.8	-	-	13.4	6.9	11.4	5
1-year DFS rate (%)	67	-	-	58	31	49	27
2-year DFS rate (%)	38	-	-	31	15	27	17
Median OS (months)	24.7	17.8	14.0	22.1	20.1	22.3	18.4
1-year OS rate (%)	86	83	61	73	73	78	75
2-year OS rate (%)	52	32	21	48	42	48	40
5-year OS rate (%)	43	-	-	23	12	24	11

DFS, disease-free survival; OS, overall survival; GEM, gemcitabine
^a Previously reported by Kawazuka et al. (2008); ^b Previously reported by Oettle et al. (2007); ^c Previously reported by Ueno et al.

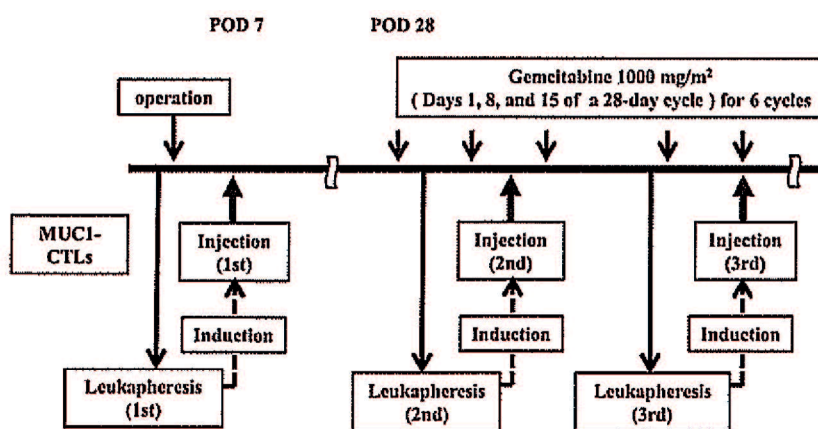


Figure 1. 膵癌術後ゲムシタピン/MUC1-CTL併用補助療法の治療レジメン

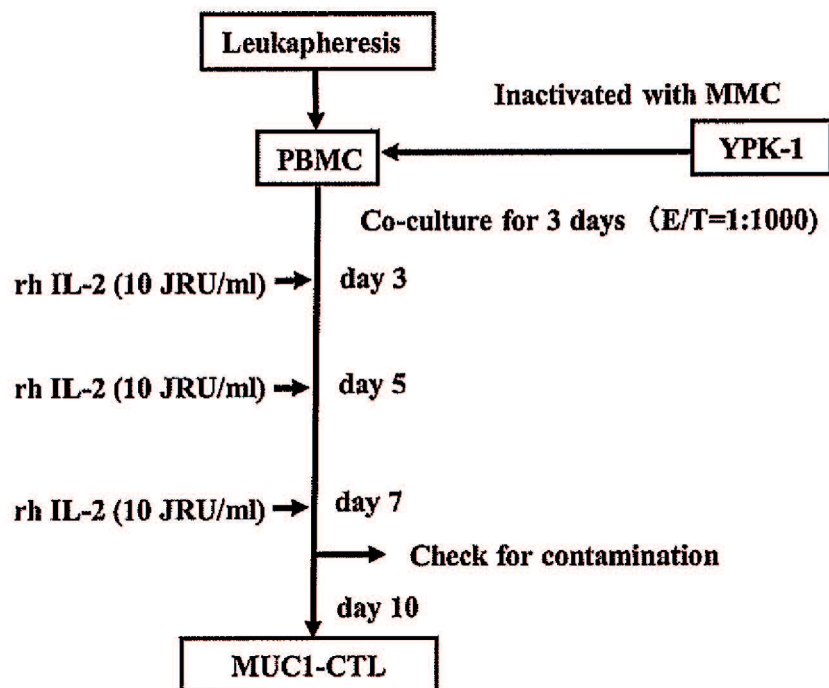


Figure 2. MUC1-CTLsの誘導方法

MUC1-CTLsはヒト肺癌細胞株：YPK-1及び IL-2添加下に培養し誘導される。

MMC, mitomycin C. PBMC, peripheral blood mononuclear cell. rhIL-2, recombinant human interleukin 2. JRU, Japan reference unit. CTL, cytotoxic T lymphocyte.

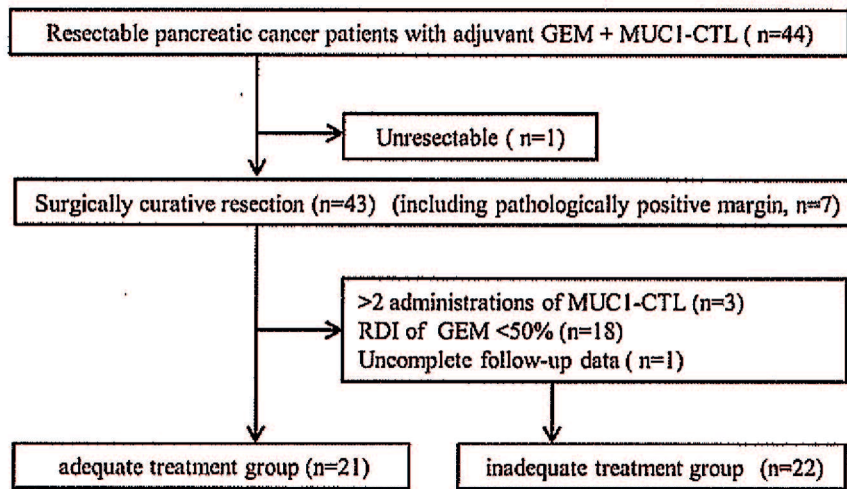


Figure 3. 研究対象と適格治療症例選択のフローチャート

GEM, gemcitabine. CTL, cytotoxic T lymphocyte. RDI, relative dose intensity.

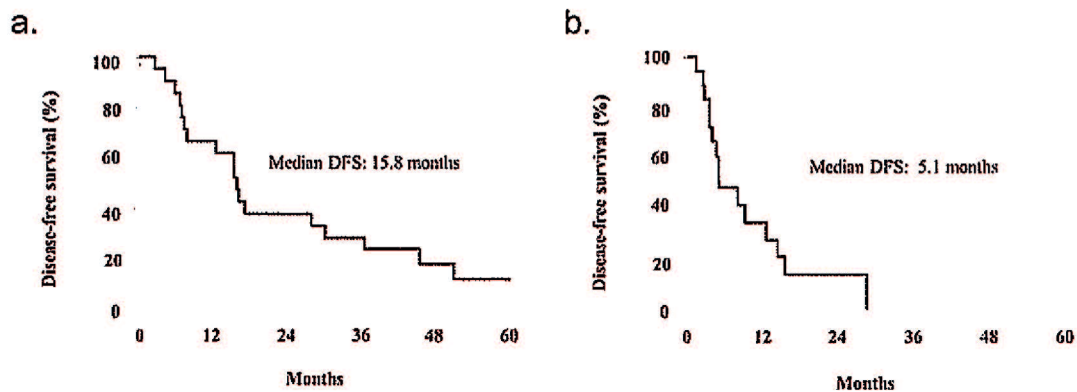


Figure 4. 無再発生存期間のKaplan-Meier曲線

(a)適格治療症例群 (b)非適格治療症例群

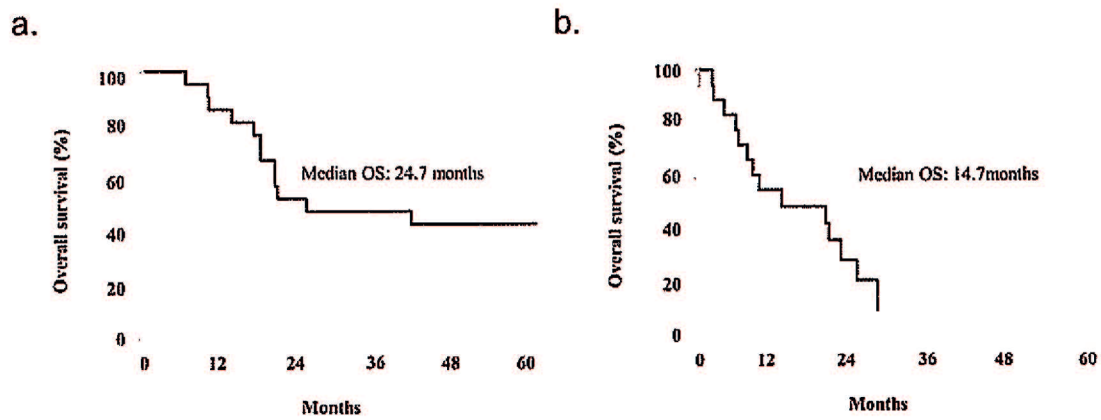


Figure 5. 全生存期間のKaplan-Meier曲線

(a) 適格治療症例群 (b) 非適格治療症例

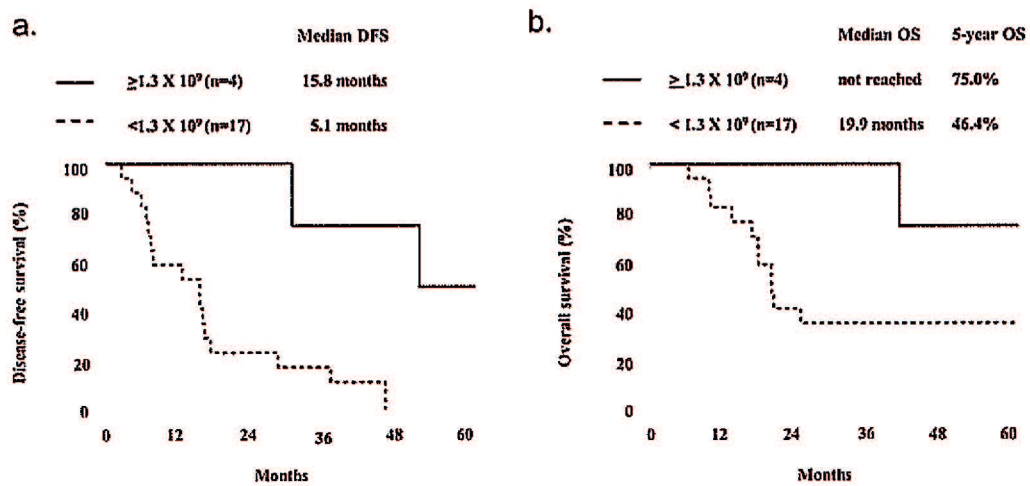


Figure 6. 平均CTL投与数によるKaplan-Meier曲線

(a) 無再発生存期間 (b) 全生存期間