

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591939

研究課題名(和文) 食道癌に同時発現している癌抗原分子間でのがんワクチン前後の免疫拡大とその意義

研究課題名(英文) Spreading immune-reactions in esophageal cancer patients who were given cancer vaccine and whose tumors co-express additional antigens

研究代表者

影山 慎一 (Kageyama, Shinichi)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80194695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌例対象として、がんワクチン「CHP-MAGE-A4蛋白ワクチン」及び「CHP-NY-ESO-1蛋白ワクチン」の臨床試験を行い、採取された血液検体(血清、リンパ球成分)、腫瘍組織を用いて、腫瘍組織での抗原発現、血清を用いた抗原蛋白パネルでの網羅的マイクロアレイ反応解析、MAGE-A4、NY-ESO-1抗原蛋白に対するELISA解析で抗体反応を行い、投与ワクチン抗原以外への免疫反応拡散現象を評価した。

研究成果の概要(英文)：Clinical trials of cancer vaccine, including CHP-MAGE-A4 protein vaccine and CHP-NY-ESO-1 protein vaccine, were conducted for esophageal cancer patients. Tumor samples were analyzed for tumor antigen expressions. Serum samples of pre-vaccine and post-vaccine time points were analyzed for protein microarray reactions and ELISA of MAGE-A4 and NY-ESO-1 antigens. We assessed immune-spreading phenomenon across other antigens that were not immunized.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：がんワクチン 食道癌

### 1. 研究開始当初の背景

CHP-抗原蛋白ワクチンは、多価性ワクチンとして CD8+T リンパ球だけでなく、CD4+T リンパ球、IgG 抗体の複合的な免疫反応を引き起こすことを確認してきた。また、この CHP がんワクチンによってワクチン抗原以外への免疫拡大現象を起していることも限定的ではあるが、観察している。すなわち、がんワクチンの新たな作用機序として、ワクチン抗原への特異的な反応に引き続き、複数抗原への免疫拡大現象を誘導される可能性を強く示唆するものである。がん細胞が持つ腫瘍抗原は、多数有することが知られていることより、複数の抗原に対する免疫反応を網羅的に解析することが必要である。

### 2. 研究の目的

(1)食道癌患者で CHP-MAGE-A4 蛋白ワクチン、CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチン早期臨床試験、および術後食道癌早期第 相試験 (医師主導治験) にて、ワクチン投与前後の血清、細胞の凍結検体を対象にして、網羅的タンパク質マイクロアレイによる抗体反応 (セロミックス法) 性解析を行い、多数の腫瘍抗原、MAGE-A4 遺伝子ファミリー間の反応性データを評価する。また、セロミックスにて絞り込まれた抗原については ELISA 法にて経時的变化、定量評価を行う。T リンパ球の反応解析については、血清反応確認後に標的抗原を絞り込んで、テトラマー法、ELISPOT 法などで検討する。

(2)これら特異的な抗体および T 細胞反応解析により、ワクチン抗原以外への反応性拡大現象を観察し、がんワクチンの体内での新たな作用メカニズムを検討するものである。

### 3. 研究の方法

(1)三重大学を中心に抗原デリバリーシステムである「疎水化多糖類 (Choleteryl Pullulan, CHP) とがん抗原 MAGE-A4 組換え蛋白複合体 (CHP-MAGE-A4) 蛋白ワクチン臨床試験」が実施され、食道癌が 18 例登録された。また、「CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチン (術後早期第 相試験)」が医師主導治験として実施されることが決定され、平成 24 年度に開始される。術後再発リスク食道癌を対象に 30 例の予定である。これらの CHP ワクチンは三重大学オリジナルの蛋白ワクチンである。

#### (2)実施された臨床試験

H23 年までに三重大学などにおいて、CHP-MAGE-A4 蛋白ワクチンが実施され、主に再発食道癌が登録された。本試験は、MAGE-A4 抗原を発現陽性例を対象に CHP-MAGE-4 を 100 $\mu$ g、300 $\mu$ g の用量をコホート別に反復 6 回皮下投与するものである。安全性、臨床経過のデータは既に収集されている。本試験登録例では、関連する探索的な免疫反応解析を実施するための同意が全例で取得され、ワクチン前から、各ワクチン

ン投与の時点での、血清、リンパ球が保存されている。

H22 年までに三重大学などにおいて、CHP-NY-ESO-1 と CHP-HER2 の二種の蛋白ワクチンを投与する臨床試験が実施されている。主に再発食道癌が登録された。NY-ESO-1 抗原を発現陽性例を対象に CHP-NY-ESO-1 100 $\mu$ g を反復 6 回皮下投与するものである。安全性、臨床経過のデータは既に収集されている。本試験登録例でも、探索的免疫反応解析の同意が全例で取得され、ワクチン前から、各ワクチン投与の時点での、血清、リンパ球が保存されている。これら臨床試験は、既に三重大学医学部倫理審査委員会での承認されている。

#### (3)実施予定の臨床試験

H24 年度から、術後食道癌の再発リスク例を対象に CHP - NY-ESO-1 ワクチンの臨床試験が開始される。本試験は NY-ESO-1 抗原陽性例が登録されるが、NY-ESO-1 発現確認時に MAGE-A4 抗原検索がされ、付随研究として MAGE-A4 発現例での本研究への参加を可能にするものである。NY-ESO-1 と MAGE-A4 は重複発現する例が多いため、この臨床試験の約半数が本研究での解析が可能である。医師主導治験として開始された。(H24 年度)

#### (4)解析用検体

##### ワクチン投与前

- ・腫瘍組織 (手術時検体または生検検体を凍結保存・パラフィン固定保存)

- ・末梢血液 (リンパ球保存、血清保存)

##### ワクチン投与中と終了時

- ・末梢血液 (リンパ球保存、血清保存)

以下の方法で、抗原特異的な抗体反応をタンパク質マイクロアレイ (セロミックス法) にて網羅的に解析し、腫瘍抗原ファミリー間への拡大現象を評価する。

##### 腫瘍抗原発現解析

組織検体 (生検あるいは手術検体、入手可能例) から、RNA を抽出し、以下の抗原発現を定量的 PCR 法にて解析する。

- ・MAGE ファミリー抗原 MAGE-A1, A2, A3, A4, A10, A12, B2

- ・NY-ESO-1 抗原、SAGE 抗原、WT1 抗原

タンパク質マイクロアレイ解析 (セロミックス)

ワクチン前、後の患者末梢血から分離された血清を 500 倍希釈し、「Protoarray<sup>TM</sup> System」、または関係施設より供与されるパネルを使用し、網羅的に反応抗体を解析する。このシステムは 8,000 種の既知あるいは人工配列のタンパク分子が配置され、網羅的反應プロファイリング解析が可能である。

##### ELISA 解析

このアレイにて陽性反応が確認された抗原タンパク分子は、組換え蛋白あるいはペプチドに対する反応性を、ワクチン前、中、後血

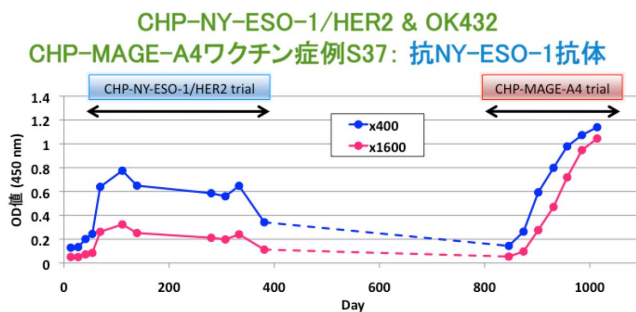
清の ELISA 解析を行い、絞り込んだ抗原の反応の定量化、動態解析を行う。

#### T リンパ球免疫反応解析

ワクチン前、中、後の患者末梢血と組織検体（生検あるいは手術検体、入手可能例に限る）より CD8+T 細胞と CD4+T 細胞を分離する。抗原ペプチドパルスまたは蛋白取込みした抗原提示細胞を *in vitro* 刺激として用いる。*in vitro* 刺激した CD8+T 細胞と CD4+T 細胞を ELISPOT 法、テトラマー法、CTL アッセイにて、抗原（MAGE-A4、NY-ESO-1）特異的免疫反応性を解析する。

#### 4. 研究成果

これまで「CHP-MAGE-A4 蛋白ワクチン」及び「CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチン」臨床試験に食道癌 18 例が登録された。また、「CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチン」早期第相医師主導治験も実施中である。「CHP-MAGE-A4 蛋白ワクチン」においては登録全例から検体使用の同意を得て、探索的な免疫反応解析用検体が取得され、ワクチン投与から各時点の血液検体が保存された。「CHP-NY-ESO-1 蛋白ワクチン」臨床試験においても解析用検体が集積された。組織検体の免疫組織染色法又は PCR 法により標的抗原検査を実施、また新鮮検体入手例から RNA を抽出し、MAGE ファミリー抗原などの発現を定量 PCR 法にて解析した。

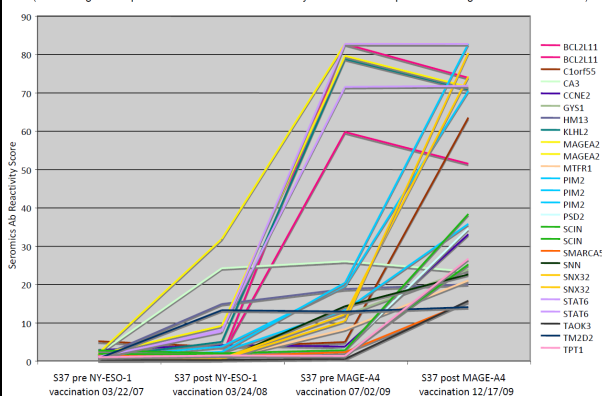


図のように CHP-NY-ESO-1 ワクチンを実施した例に、CHP-MAGE-A4 ワクチンを投与したところ、NY-ESO-1 抗原に対する抗体反応の上昇を得た。本例の腫瘍組織での抗原発現は、NY-ESO-1、MAGE-A4 抗原を共に発現していることが判明した。本例ではワクチン抗原以外への反応性拡大現象が引き起こされ、がんワクチンが体内で免疫反応を起こすことで、腫瘍細胞から抗原放出が起こる現象を推察するデータと考えられる。また、ワクチン前、後の血清を用いて網羅的マイクロアレイ反応解析を実施した。同時にアレイ解析で陽性の血清については、さらに抗原組換え蛋白とペプチドに対する反応性を ELISA 解析して定量的、経時的評価を行った。血清を 500 倍希釈し、「ProtoarrayTM System」で解析した結果を図に示す。CHP-NY-ESO-1 ワクチン前後、CHO-NY-ESO-1 ワクチン前後の 4 点での抗

体反応を時系列で解析した。図で示すように、NY-ESO-1 免疫で MAGE ファミリー抗原への反応は上昇し、MAGE-A4 免疫で他の MAGE ファミリー抗原への反応が上昇する結果が得られた。抗原拡散現象が他抗原、ファミリー抗原への広範囲に起こっていることが確認された。

Increase in antibody reactivity in patient S37 during treatment

(Some antigens are present more than once on the array and show similar profiles of recognition with various sera)



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

Kageyama S, Ikeda H, Miyahara Y, Imai N, Ishihara M, Saito K, Sugino S, Ueda S, Ishikawa T, Kokura S, Naota H, Ohishi K, Shiraishi T, Inoue N, Tanabe M, Kidokoro T, Yoshioka H, Tomura D, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Katayama N, Shiku H. Adoptive transfer of MAGE-A4 T-cell receptor gene-transduced lymphocytes in patients with recurrent esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 21:2268-2277, 2015. (査読あり)

doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1559  
Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y. High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine*. 32:5901-5907, 2014. (査読あり)

doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.002.  
Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y. Limited expression of cancer-testis antigens in renal cell carcinoma patients. *Mol Clin Oncol* 1:326-330, 2013. (査読あり)

doi:10.3892/mco.2012.40

Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, Doki Y, Shiku H. Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. *J Transl Med* 11:246, 2013. (査読あり) doi:10.1186/1479-5876-11-246.

Hirayama M, Nishikawa H, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnjatich S, Shiku H. Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of *Streptococcus pyogenes*. *Eur J Immunol* 43:989-1000, 2013. (査読あり) doi:10.1002/eji.201242800.

〔学会発表〕(計2件)

食道癌に対する免疫療法—がんワクチンと免疫細胞療法—(ワークショップ、招待講演) 影山慎一, 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2014. 福岡国際会議場(福岡市)

TCR-gene engineered T cell transfer as a treatment for refractory esophageal cancer (international session、招待講演), 影山慎一, 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2014. 福岡国際会議場(福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shikuken.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

影山 慎一 (KAGEYAMA, Shinichi)  
三重大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 80194695