



Title	CHP-MAGE-A4がんワクチン患者における免疫応答拡大の意義に関する研究
Author(s)	宮谷内, 健吾
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13698号
Issue Date	2019-06-28
DOI	10.14943/doctoral.k13698
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74976
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2489
File Information	Kengo_Miyauchi.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

CHP-MAGE-A4 がんワクチン患者における

免疫応答拡大の意義に関する研究

(Significance of antibody spreading
in patients vaccinated with CHP-MAGE-A4)

2019年6月

北 海 道 大 学

宮 谷 内 健 吾

学 位 論 文

CHP-MAGE-A4 がんワクチン患者における

免疫応答拡大の意義に関する研究

(Significance of antibody spreading
in patients vaccinated with CHP-MAGE-A4)

2019年6月

北 海 道 大 学

宮 谷 内 健 吾

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
諸言	6 頁
実験方法	8 頁
実験結果	12 頁
考察	27 頁
結論	31 頁
謝辞	32 頁
利益相反	33 頁
文献リスト	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として受理された。

Kengo Miyauchi , Takahiro Tsuchikawa , Masataka Wada , Takehiro Abiko ,
Noriaki Kyogoku , Toshiaki Shichinohe , Yoshihiro Miyahara , Shinichi
Kageyama , Hiroaki Ikeda , Hiroshi Shiku , Satoshi Hirano

Clinical relevance of antigen spreading pattern induced by CHP-MAGE-A4
cancer vaccination

Immunotherapy (2016), 527-40, doi: 10.2217/imt-2016-0007. Epub 2016 Feb
18.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 宮谷内 健吾, 土川 貴裕, 桑谷 俊彦, 武内 慎太郎, 和田 雅孝, 七
戸 俊明, 平野 聡

遺伝子発現診断の標準化と4種固形癌におけるNY-ESO-1の発現の検討

第113回日本外科学会定期学術集会, 2013年4月11-13日, 福岡

2. Kengo Miyauchi , Takahiro Tsuchikawa , Masataka Wada , Takehiro Abiko ,
Noriaki Kyogoku , Toru Nakamura , Hiroaki Ikeda , Shinichi Kageyama , Hiroshi
Shiku , Satoshi Hirano

Clinical significance of antigen spreading pattern induced by cholesteryl
pullulan (CHP)-MAGE-A4 cancer vaccination

第72回日本癌学会総会, 2013年10月3-5日, 横浜

要旨

【背景と目的】 進行再発性難治腫瘍に対しては外科的治療・化学療法・放射線治療といった集学的治療が行われているが、依然として予後不良である。1990年代に免疫原性を有する腫瘍抗原が発見されたことを契機に、自身の免疫反応を利用した腫瘍特異的免疫療法が開発され、多数の臨床試験が行われてきたが臨床効果は不十分である。その原因として、癌細胞による免疫抑制細胞の誘導や、MHC class I 発現の減弱といった様々な免疫逃避機構が指摘されている。そこで、癌免疫療法により誘導される免疫反応をモニタリングすることで、治療効果や予後の予測、あるいは治療効果の改善につながると考えられる。癌免疫療法における免疫モニタリングとしては主に抗原特異的細胞性免疫反応あるいは抗原特異的液性免疫反応が用いられている。これまで腫瘍抗原に対する癌免疫療法の免疫反応の評価は標的抗原に対するものが中心であった。しかし近年、癌免疫療法において非標的抗原に対する免疫反応が惹起される現象である免疫応答拡大に関する報告が散見され、癌の自然経過あるいは抗癌治療に伴う免疫反応の一つとして考えられており、癌の存在診断、特異的免疫反応誘導、および臨床的治療効果や予後に関する免疫バイオマーカーになり得る現象として期待されている。

北海道大学消化器外科学教室 II では 2009 年から腫瘍抗原の一つである MAGE-A4 を発現した癌患者を対象に、MAGE-A4 を標的としたがんワクチン臨床試験を行い、その免疫反応を解析してきた。これまで MAGE-A4 を標的抗原とする癌免疫療法において免疫応答拡大を評価した報告はなく、本評価の免疫モニタリングとしての可能性を探索することは、癌免疫療法の効果判定や、治療の恩恵を受けられる患者の選択に寄与できる可能性があると考えられる。

そこで、本研究において、MAGE-A4 に対する免疫反応を評価するとともに、免疫療法の標的抗原として広く用いられている NY-ESO-1、MAGE-A3 に対しての免疫反応も解析することで、免疫応答拡大の有無とその意義について検討を行うこととした。

【材料と方法】 材料は、CHP-MAGE-A4 がんワクチン登録患者 12 名の腫瘍組織切片と血漿、癌細胞株である PC10、LK2、HEC46、KP1N、およびヒト胎児腎細胞株である HEK293FT を用いた。マウスは BALB/c を用いた。HEK293FT 細胞にヒト精巢 cDNA より抽出した MAGE-A4 cDNA、NY-ESO-1 cDNA、MAGE-A3 cDNA をトランスフェクション法により組み込んだ、HEK293FT-MAGE-A4 細胞、HEK293FT-NY-ESO-1 細胞、HEK293FT-MAGE-A3 細胞を作製した。これらの細胞に各腫瘍抗原遺伝子・蛋白が発現していることを逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、ウェスタンブロット、

免疫組織化学染色を行って確認し、各検査における陽性対照・陰性対照として使用可能であることを確認した。これらの細胞と、癌細胞株の xenograft 切片、およびヒト精巣の組織切片を用いて NY-ESO-1、MAGE-A3 の発現を免疫組織化学的に検出する条件を決定し、がんワクチン患者の腫瘍組織切片における NY-ESO-1、MAGE-A3 の発現を検討した。続いて、健常人血漿における NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する吸光度を測定し、CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験プロトコールに従ってそれぞれの抗原に対する吸光度の cut off 値を決定したのちに、ワクチン患者の血漿を用いて各抗原に対する吸光度を測定した。CHP-MAGE-A4 がんワクチンを 5 回投与後の血漿において、cut off 値を超えたものを陽性と定義し、ワクチン投与前にすでに陽性であった症例においては、ワクチン 5 回投与後の吸光度が投与前の 2 倍以上であった場合に陽性と定義した。がんワクチン 5 回投与後、非標的抗原である NY-ESO-1 および MAGE-A3 に対する吸光度が陽性である場合を免疫応答拡大ありと定義した。さらに、免疫応答拡大の有無が臨床効果、予後へ及ぼす影響を検討した。

【結果】 CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者の腫瘍組織切片において、NY-ESO-1 の発現を確認した症例は認めず、MAGE-A3 の発現は 1 例のみ認められた。NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する吸光度の cut off 値は、それぞれ 0.223、0.284 であった。ワクチン投与前において MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する抗体反応を有する (Sero-positive) 症例は、12 例中それぞれ 5 例 (41.7%)、2 例 (17.7%)、2 例 (17.7%) であった。NY-ESO-1、MAGE-A3 の sero-positive 症例は同一症例であったが、2 例とも免疫組織化学的染色においては NY-ESO-1、MAGE-A3 の発現を認めなかった。ワクチン 5 回投与後における MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する抗体反応陽性例は、それぞれ 8 例 (66.7%)、6 例 (50%)、5 例 (41.7%) で、ワクチン投与前と比較し高頻度であった。患者全体の OD 値の比較においても、ワクチン投与後は全ての抗原において投与前に比べて有意に上昇していたことから、ワクチン投与により非標的抗原である NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する免疫反応が誘導された可能性が示唆された。ワクチン投与後における MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 陽性例、およびすべての抗原に対して陽性を示した 4 例に対して検討を行ったが、いずれの群においても臨床効果や予後との相関は認められなかった。

【考察】 癌免疫療法における免疫モニタリングとしては、直接的に抗腫瘍効果をもたらす CTL を評価する抗原特異的細胞性免疫反応を用いることがより望ましいが、標準化が難しい方法であるため ELISA 法を用いた。本研究において CHP-MAGE-A4 がんワクチンの投与により MAGE-A4 (8 例, 66.7%) のみならず、NY-ESO-1 (6 例, 50%) および MAGE-A3 (5 例, 41.7%) に対する免疫反応が認め

られ、免疫応答拡大が惹起されたと考えられた。既知の報告によると、がんワクチンにより免疫応答拡大が引き起こされた症例は、ほぼ全ての症例で非標的抗原遺伝子あるいはタンパクの発現が確認されているが、本研究では確認されなかった。その原因として、同一腫瘍内における腫瘍抗原の発現は不均一であると考えられるため、本研究において検討した腫瘍切片内には当該タンパクが含まれていなかった可能性がある。また近年、腫瘍抗原である Mesothelin 特異的 CAR-T 療法を施行した膵癌患者において、治療後に他の腫瘍抗原や免疫関連タンパクに対する抗体反応が上昇した患者で腫瘍の活動性が低下したと報告されており、免疫応答拡大は癌免疫療法における有力なバイオマーカーとなる可能性を秘めている。

抗原特異的免疫反応の誘導が臨床効果や予後と関連しなかった原因として、腫瘍特異的CTLの分化障害や制御性T細胞によるCTLの不活性化といった腫瘍免疫逃避機構の存在が考えられる。制御性T細胞は自己に対するリンパ球の活性化、および増殖を抑制する免疫寛容に関するT細胞であり、抗腫瘍免疫を抑制し腫瘍の増殖に有利な状態を作るとされる。このため、がんワクチンによる腫瘍特異的免疫反応だけでは臨床的に有効な治療効果を得るには不十分であり、制御性T細胞などの腫瘍免疫逃避機構の調整が必要であることを示唆している。さらに、本研究の対象患者はいずれも切除不能進行再発癌症例であり、免疫治療単独で抗腫瘍効果は不十分であった可能性もある。また、sero-positive症例が予後不良とする報告があるが、本研究では登録前に受けた治療やその期間などの背景が様々であるため、その意義に関しては不明である。

【結果】 本研究において、CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与により NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する免疫応答拡大が惹起されることを確認した。臨床効果および予後への影響は認められなかったものの、免疫応答拡大は癌免疫療法における免疫誘導のモニタリングや癌の存在診断に利用できる可能性があり、有力なバイオマーカーとなる可能性を秘めている。また、がんワクチン単独では臨床的に有効な治療効果を得るには不十分である可能性が高く、癌の免疫逃避機構を含めた包括的な腫瘍免疫を考慮する必要がある。今後、癌種や前治療の有無などの背景因子を揃え、多数例での再検討が必要である。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

BSA	Bovine serum albumin
CAR-T	Chimeric antigen receptor T cell
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CHP	Cholesteryl pullulan
CTA	Cancer testis antigen
CTL	Cytotoxic T lymphocytes
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBV	Epstein-Barr virus
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal bovine serum
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunohistochemistry
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleic acid
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SD	Standard deviation
WB	Western blot

緒言

1990年代、Boonら (van der Bruggen et al., 1991) により最初の腫瘍抗原である MAGE-1 (melanoma-associated antigen 1) が発見された。その後、癌細胞由来の cDNA 発現ライブラリーの中から患者血清中の IgG 抗体が認識する抗原遺伝子を同定する方法である SEREX 法 (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) が開発されたことにより、腫瘍抗原の同定数は飛躍的に増え、現在 200 以上を数える (Sahin U et al., 1995; Chen et al., 1997, 1998; De Baker et al., 1999; Park et al., 2003; Almeida et al., 2009)。

癌精巣抗原 (Cancer testis antigen; CTA) は腫瘍抗原の一つであり、精巣、胎盤、胎児期の卵巣 (Simpson et al., 2005; Nelson et al., 2007; Caballero et al., 2009) および様々な腫瘍組織にその発現が確認されている (Scanlan et al., 2000, 2002, 2004; Calabro et al., 2005; van der et al., 2002; Vaughan et al., 2004; Kurashige et al., 2001; Gure et al., 2005; Li et al., 2005; Mashino et al., 2001; Sigalotti et al., 2002a, 2002b; Melloni et al., 2004)。

1990年代後半、CTA には HLA class I あるいは HLA class II を介して細胞障害性 T リンパ球や液性免疫反応を誘導する抗原ペプチドが含まれていることが確認された (Traversari, 1999; Jäger et al., 1998)。実際、CTA の一つである NY-ESO-1 を発現した腫瘍を有する患者血清中に抗 NY-ESO-1 抗体が産生されていることが確認され (Maio et al., 2003; Scanlan et al., 2001; Stockert et al., 1998; Kurashige et al., 2001)、NY-ESO-1 に対する抗体反応が認められた患者の 90%以上で NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されていることが示された (Jäger et al., 2000b)。一方で、精巣には血液精巣関門が形成され、かつ生殖細胞表面には HLA-class I の発現が欠如していることから、生殖細胞に発現している CTA は免疫の影響を受けないことが判明している (Bart et al., 2002; Fiszler et al., 1998; Kalejs et al., 2005)。

以上のことから、CTA などの腫瘍抗原は特異的免疫療法における理想的な抗原として考えられ、これまでに様々な癌特異的免疫療法が行われてきた。その中でも、NY-ESO-1 および MAGE-A family は様々な癌腫で発現し、その免疫原性の高さから標的抗原として頻用されているが、実際の臨床効果は満足のいくものではない (Rosenberg et al., 2001, 2004; van Baren et al., 2005; Jäger et al., 2006; Slingluff et al., 2007; Brichard et al., 2007; Odunsi et al., 2007; Bender et al., 2007; Valmori et al., 2007; Atanackovic et

al., 2008)。

また、癌免疫療法によって引き起こされる免疫反応をモニタリングする方法として、標的抗原に対する抗原特異的 T リンパ球の誘導の有無や抗原特異的 IgG の上昇の有無、あるいは抗特異的 IgE の測定が利用されているが、いずれも確立したバイオマーカーとはいえず、(Mine et al., 2004 ; Rosato et al., 2006 ; Kyogoku et al., 2016 ; Abiko et al., 2018)、現状では癌免疫療法に伴う免疫モニタリングの方法は定まっていない。

こうした中、近年、癌免疫療法における免疫応答拡大 (Antigen spreading, Spreading immune response) に関する報告が散見される (Rosato et al., 2006 ; Kawabata et al., 2007 ; Corbière et al., 2011 ; Kawada et al., 2012)。免疫応答拡大は、標的抗原以外に対する免疫反応が惹起される現象を指すが、癌の自然経過、あるいは化学療法や免疫治療をはじめとする抗癌治療に伴う癌の増大あるいは縮小過程における免疫反応の一つとして考えられており、癌の存在診断、特異的免疫反応誘導、および臨床的治療効果や予後に関する免疫モニタリングとして期待されている。

所属教室では 2009 年から腫瘍抗原の一つである MAGE-A4 を発現した癌患者を対象に、MAGE-A4 を標的としたがんワクチン臨床試験を行い、その免疫抗体反応を解析してきた (Kyogoku et al., 2016 ; Abiko et al., 2018)。これまで、MAGE-A4 を標的抗原とする癌免疫療法において免疫応答拡大を評価した報告はなく、この現象の免疫モニタリングとしての可能性を探索することは、癌免疫療法の効果判定や、治療の恩恵を受けられる患者の選択に寄与できる可能性があると考えられる。

本研究の目的は、CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者において、腫瘍抗原の一つである NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する免疫応答拡大が惹起されるかどうかを解析し、その意義を明らかにすることである。

実験方法

1) 臨床試験

北海道大学消化器外科学教室 II にて施行された MAGE-A4 抗原を発現する難治性悪性腫瘍に対する CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験 (Clinical trial number : UMIN000001999) の概要は以下のとおりである。

A) 対象：癌腫を問わず腫瘍細胞で MAGE-A4 抗原を発現している再発/切除不能癌患者

B) 使用薬：

①MAGE-A4 蛋白；腫瘍抗原 MAGE family に属する 317 アミノ酸からなる蛋白であり、様々な癌種に広く発現するとされる。

②コレステリル基置換プルラン(Cholesteryl Pullulan: CHP)；分子量約 5-10 万のプルランの 100 グルコース・ユニットにつき 1 前後の比率でコレステリル基と結合した化合物である。CHP は MAGE-A4 と混和すると CHP-MAGE-A4 複合体を形成し、MHC class I および class II の両抗原提示経路への効率的なデリバリーが可能になるとされている。

③OK-432；ストレプトコッカス・ピオゲネスのペニシリン処理凍結乾燥粉末である。樹状細胞などの抗原提示細胞を活性化するとされ、今回の臨床試験では免疫アジュバントとして使用した。

C) 投与スケジュール：CHP-MAGE-A4 300 μ g + OK-432 0.5KE を 2 週毎に皮下投与した。

D) 安全性の評価：CTCAE v3.0 に準じて有害事象を評価した。

E) 抗体免疫反応の評価：患者より採取した血清を 1 次抗体とし、ELISA 法にて評価した。健常人血清を用いた ELISA の結果と、以下の式*から血清 400 倍希釈時の Cut off 値を算出し陽性判定の基準とした。

$$* \text{Cut off 値} = \text{平均値} + 1.645 \times \text{SD}$$

F) 有効性の評価：CHP-MAGE-A4 ワクチンを 5 回投与後の CT 画像所見を RECIST 変法に準じて評価した。

本検討は、上記臨床試験に登録された患者のうち、5 回以上ワクチンを接種した 12 名を対象とした。癌種、前治療歴、ワクチン投与回数などを含めた患者背景を表 1 に示す。

本臨床試験は北海道大学倫理委員会より承認を受けた。

表 1 患者背景

患者	年齢	性別	癌種	過去に行った治療の有無					ワクチン接種回数
				手術	化学療法	分子標的薬	内分泌療法	放射線照射	
1	62	M	大腸癌	+	+	+	-	-	6
2	63	F	乳癌	+	+	-	+	-	6
3	48	F	膵癌	-	+	-	-	-	7
4	79	M	胆管癌	+	+	-	-	+	21
5	63	M	直腸癌	+	+	+	-	+	15
6	58	M	悪性胸膜中皮腫	-	+	-	-	-	15
7	78	M	胆嚢癌	+	+	-	-	-	7
8	34	M	直腸癌	+	+	+	-	+	11
9	63	F	大腸癌	+	+	+	-	-	12
10	60	M	大腸癌	+	+	+	-	-	6
11	71	M	大腸癌	+	+	+	-	-	6
12	71	M	大腸癌	+	+	+	-	-	6

2) 細胞株

本研究においては、肺癌細胞株の PC10 と LK2、食道癌細胞株である HEC46、膵癌細胞株の KP1N、およびヒト胎児腎細胞株の HEK293FT の 5 種類を用いた。また、HEK293FT に MAGE-A4 cDNA、NY-ESO-1 cDNA、MAGE-A3 cDNA をトランスフェクション法により組み込んだ HEK293FT-MAGE-A4 細胞、HEK293FT-NY-ESO-1 細胞、HEK293FT-MAGE-A3 細胞を作製し、各実験系における陽性対照・陰性対照として用いた。

細胞培地としては D-MEM (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) あるいは RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を使用した。いずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) とペニシリン/ストレプトマイシンの抗生剤を添加し、それぞれ終濃度を 10%、1% とした。いずれの細胞株も 5%CO₂ 下で 37°C のもとインキュベーター内で培養を行った。

3) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて各細胞株より total RNA の抽出を行い、その後 Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いて逆転写反応により cDNA を作製した。RT-PCR に使用したプライマー配列を表 2 にまとめた。

表 2 プライマー配列

	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
MAGE-A4	ATGTCTTCTGAGCAGAAGAGTCAGC	TCAGACTCCCTCTTCCTCCTCT
NY-ESO-1	CAGGGCTGAATGGATGCTGCAGA	GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGG
MAGE-A3	ATGCCTCTTGAGCAGAGGAGTCA	TCACTCTTCTCCCTCTCTAAAGC
GFP	TCAAGTCCGCCATGCCCGAA	GACCATGTGATCGCGCTTCTC
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTC	AGGGGTCTTACTCCTTGGAGGC

PCR の反応条件としては、denature ; 94°C を 30 秒、annealing ; 60.4°C (GAPDH のみ 62.3°C) を 30 秒、extention ; 72°C を 45 秒 に設定し、計 35 サイクルで行った。

4) ウェスタンブロット (Western Blot)

各細胞株より whole protein を抽出し、SDS-PAGE サンプルバッファーを加えて 5 分間煮沸した。15%ランニングゲルおよび 15%スタッキングゲルを用いて抽出した蛋白 20 μ g ずつを電気泳動した。その後、ニトロセルロースメンブレン (Hybond-ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, England, UK) に電氣的に転写し、各 1 次抗体および 2 次抗体と反応させた。その後、ECL prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて化学発光させて発現解析した。WB で使用した抗体を表 3 にまとめた。

表 3 蛋白検出に用いた抗体

	source	Clone / Type	Dilution
MAGE-A4	Mie univ.	mAb (mouse)	1:2000 (1.4 μ g/ml)
NY-ESO-1	Invitrogen	E978 / mAb(mouse)	1:200 (2.5 μ g/ml)
MAGE-A3	Sigma-Aldrich	6D10 / mAb(mouse)	1.200 (2.0 μ g/ml)
GFP	Clontech	whole / mAb(mouse)	1:1000
β -actin	Millipore	C4 / mAb(mouse)	1:1000

5) 免疫組織化学的染色 (Immunohistochemistry)

免疫組織化学的検討用のセルブロックは、細胞株を 1 ml チューブに回収し、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline ; PBS) で洗浄後に遠心し、上清を除去後、10%緩衝ホルマリンを入れ固定した。その後パラフィン包埋し、免疫組織化学的検討用ブロックを作製した。また、各癌細胞株の免疫組織化学的検討は、BALB/c マウスに各癌細胞株を接種してできた腫瘍 (Xenograft) を用

いて行った。

細胞株および Xenograft のセルブロックは $5\mu\text{m}$ に薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン化し、水洗後、 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) 中で、圧力鍋にかけ抗原を賦活化した。その後、過酸化水素水でブロッキングを行い、各抗体と反応させた。Histfine Simple Stain MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Tokyo, Japan) と反応させたのち、Histfine SAB-PO (M) kit (Nichirei) を用いて免疫組織化学染色を施した。各抗体の使用濃度は、WB と同様である。

6) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

先に記載した、CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者 12 名および健康成人 26 名の血漿を用いた。

96well のイムノプレート (Nunk, Rochester, NY, USA) に、MAGE-A4 蛋白 (Mie University)、NY-ESO-1 蛋白 (Ludwig Institute for Cancer Research, NY, USA)、MAGE-A3 蛋白 (Abcam, Cambridge, UK) をそれぞれ 20 ng/well をなるように添加し、 37°C のインキュベーター内に 2 時間静置し目的の蛋白を固相化した。洗浄後、BSA-PBS によるブロッキングを行い、血漿 $100\mu\text{l}$ を各 well に添加して 4°C で一晩反応させた。洗浄後、4000 倍に希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (MBL, Nagoya, Japan) を添加し、遮光下に 4°C で 5 時間反応させた。TMB substrate Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて発色させ、 0.18M 硫酸にて反応を停止した後、分光光度計を用いて 450nm における吸光度を測定した。Cut off 値は、CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験プロトコールに従い、400 倍希釈した健常成人の血漿における optical density (OD) value + $1.645 \times$ standard deviation (SD) に設定した。

CHP-MAGE-A4 がんワクチンを 5 回投与後の血漿において cut off 値を超えたものを陽性と定義した。また、ワクチン投与前にすでに陽性であった症例においては、ワクチン 5 回投与後の OD value が投与前の 2 倍以上であった場合に陽性と定義した。

また、抗原抗体反応のコントロールとして、ワクチン投与前後での Epstein-Barr virus (EBV) 抗体価を測定した (Denka Seiken, Tokyo, Japan)。

7) 統計解析法

統計解析は、Fisher の正確率検定と Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。生存分析は、全生存率 (Overall survival ; OS) にて検討を行い、Kaplan-Meier 法を用いた Log-rank 検定により行った。有意水準を p 値 < 0.05 とした。以上の統計解析は、StatFlex (Artech Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した。

実験結果

MAGE-A4 発現の評価

CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験において使用されたヒト精巣、PC10に加え、HEK293FT-MAGE-A4 細胞を陽性対照として用いた。また、陰性対照は臨床試験と同様に LK2 を用いた。それぞれに IHC を行い、再現性があることを確認した (図 1a)。また、RT-PCR および WB にて、各細胞株において遺伝子レベル、蛋白レベルで MAGE-A4 が発現していることを確認した (図 1b)。

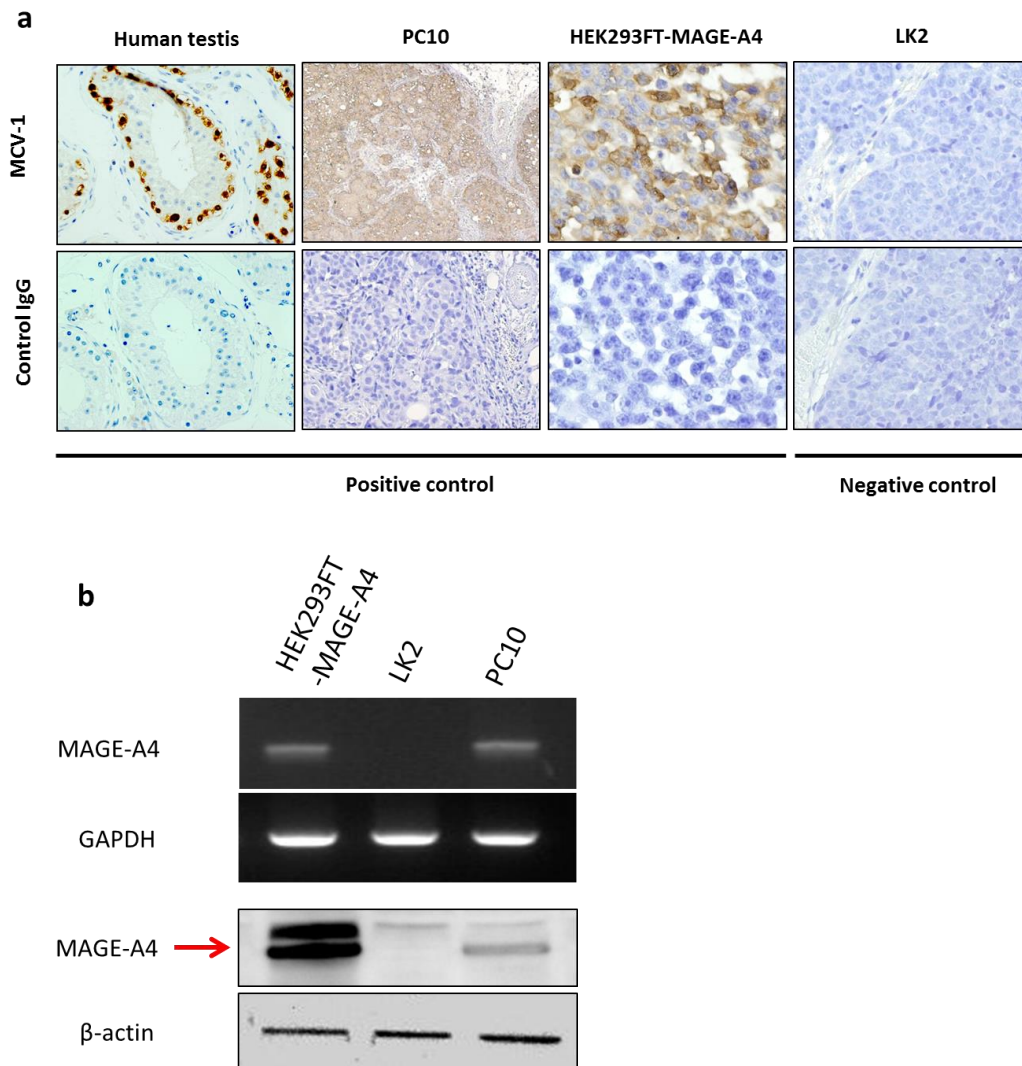


図 1 各細胞株における MAGE-A4 の発現

a : MAGE-A4 染色条件での再現性が得られた。

b : 各細胞株において遺伝子レベル、蛋白レベルで MAGE-A4 が発現していることを確認した。

免疫組織化学染色における腫瘍抗原の特異的検出条件の確立

1) NY-ESO-1

まず NY-ESO-1 の陽性対照を作製すべく、pcDNA3.1_IRES_GFP に NY-ESO-1 遺伝子をクローニングし、NY-ESO-1 陰性株である HEK293FT 細胞へ遺伝子導入した。完成した HEK293FT-NY-ESO-1 細胞の total RNA、whole protein を抽出、また、セルブロックをホルマリン固定ののちパラフィン包埋し、IHC の検討に使用した。Total RNA を用いて RT-PCR を行い、HEK293FT-NY-ESO-1 細胞に NY-ESO-1 遺伝子が導入されていることを確認した (図 2a)。続いて、whole protein を用いて WB を行い、HEK293FT-NY-ESO-1 細胞中に NY-ESO-1 蛋白が発現していることを確認した (図 2b)。

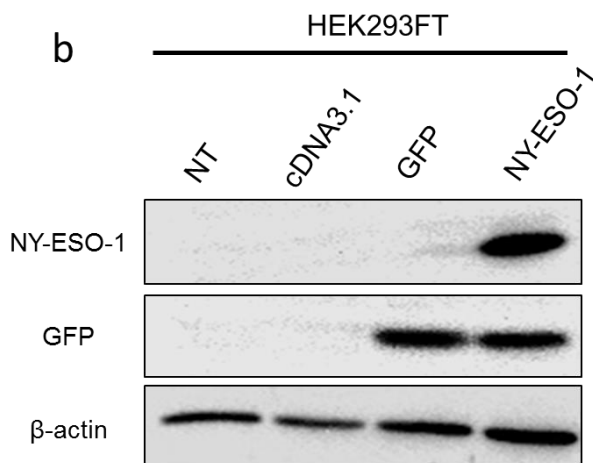
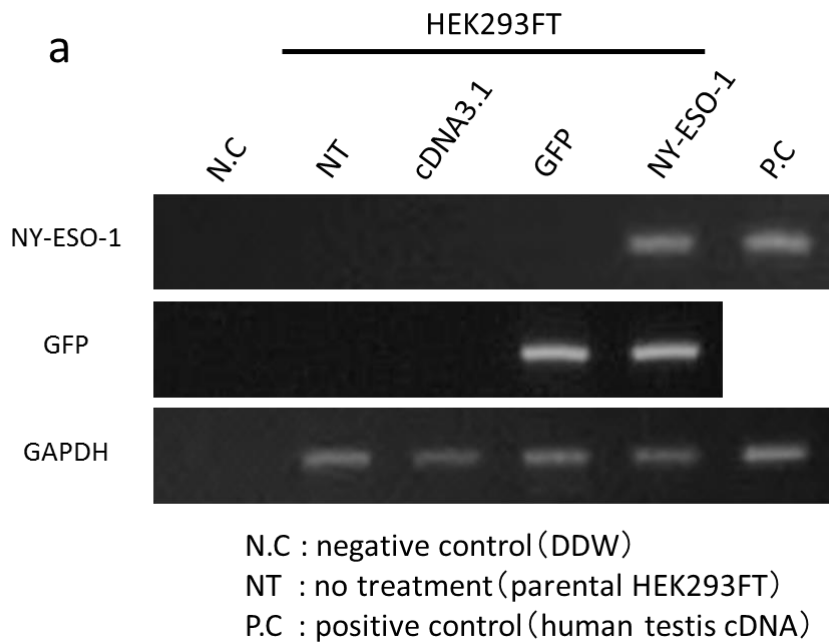


図 2 HEK293FT-NY-ESO-1 細胞における NY-ESO-1 の発現

a : NY-ESO-1 遺伝子が導入されたことを確認した。

b : HEK293FT-NY-ESO-1 細胞中に NY-ESO-1 蛋白が発現している。

続いて、パラフィン包埋されたセルブロックを用いて免疫組織化学的染色の検討を行った。抗原賦活化で使用するバッファーと加熱時間、内因性ペルオキシダーゼ処理に用いる過酸化水素水の濃度と反応時間、1次抗体の濃度を比較検討した。抗原賦活化は圧力鍋を用いた加熱賦活法で行った。バッファーは 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) と 1mM EDTA (pH 8.0)、加熱時間を 5-10 分で検

討した。1mM EDTA (pH 8.0) では、短時間でより良好な染色性がみられたが、非特異的の反応も増加し、かつ切片のダメージが大きいため、0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) 中で7分に設定した。内因性ペルオキシダーゼ除去に用いた過酸化水素水濃度は3%と0.3%、反応時間は5分と15分で検討した。0.3%で5分反応させた場合にのみ非特異的の反応がやや増加したが、そのほかの条件においては違いがなかったため、3%および5分に設定した。1次抗体の濃度は1:100、1:200、1:500の3段階で検討した。1:100では非特異的の反応が多く、1:500では染色が弱かったため、1:200に設定した。決定した条件を以下に記載する。この条件における染色結果を図3に示す。

抗原賦活化：圧力鍋、0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)、7分
 内因性ペルオキシダーゼ処理：3% 過酸化水素水、5分
 1次抗体：Invitrogen (E978) 1:200 (2.5 μ g/ml)

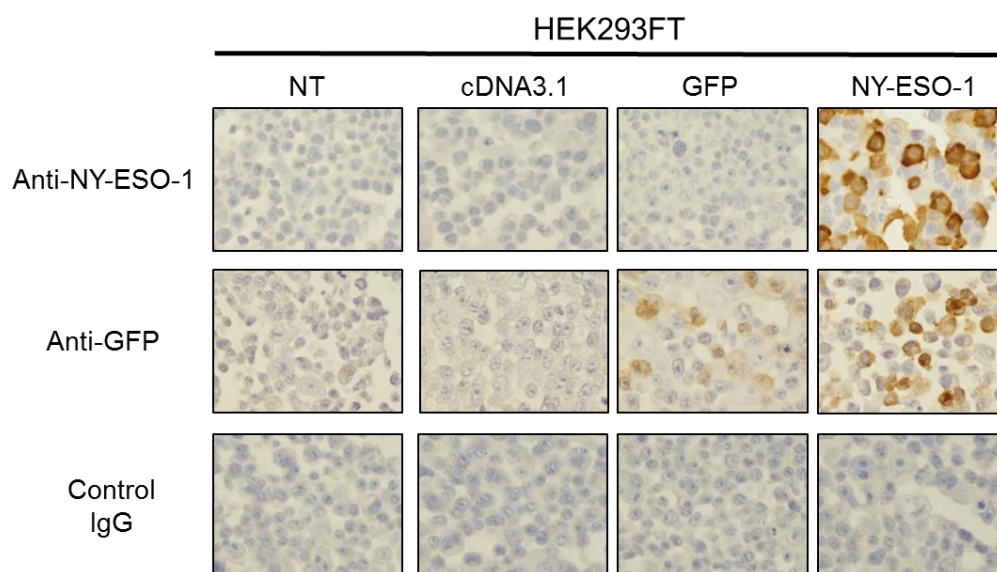


図3 HEK293FT-NY-ESO-1 細胞の免疫組織化学的染色

NY-ESO-1 を特異的に検出する条件を決定した。

2) MAGE-A3

NY-ESO-1 と同様に、pcDNA3.1_IRES_GFP に MAGE-A3 遺伝子をクローニングした HEK293FT-MAGE-A3 細胞の total RNA、whole protein を抽出し、セルブロットを作製した。

Total RNA を用いた RT-PCR、および whole protein を用いた WB を行い、

HEK293FT-MAGE-A3 細胞中に MAGE-A3 蛋白が発現していることを確認した(図 4)。

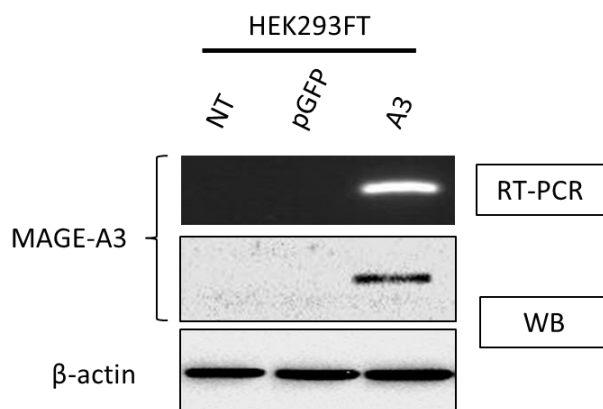


図 4 HEK293FT-NY-ESO-1 細胞の RT-PCR および WB

HEK293FT-MAGE-A3 細胞に MAGE-A3 遺伝子が導入され、MAGE-A3 蛋白を発現していることを確認した。

次に、セルブロックを用いて免疫組織化学的染色の検討を行った。染色条件の比較検討は NY-ESO-1 と同様の手順で行った。抗原賦活化は圧力鍋を用いた加熱賦活法で行い、バッファーは 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) と 1mM EDTA (pH 8.0)、加熱時間を 5-10 分で検討した。バッファーによる染色強度の違いは認めなかったが 1mM EDTA (pH 8.0) では切片が剥がれることがあったため、0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) を選択した。加熱時間による染色強度や非特異的反応の違いはなかったため、10 分に設定した。過酸化水素水濃度と反応時間による違いを認めなかったため、3% および 5 分に設定した。1 次抗体の濃度も 1:100、1:200、1:500 の 3 段階で検討し、結果は NY-ESO-1 と同様に、1:100 では非特異的反応が多く、1:500 では染色が弱かったため、1:200 に設定した。決定した条件を以下に記載する。この条件における染色結果を図 5 に示す。

抗原賦活化：圧力鍋、0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0)、10 分

内因性ペルオキシダーゼ処理：3% 過酸化水素水、5 分

1 次抗体：Sigma-Aldrich (6D10) 1:200 (2.0 μ g/ml)

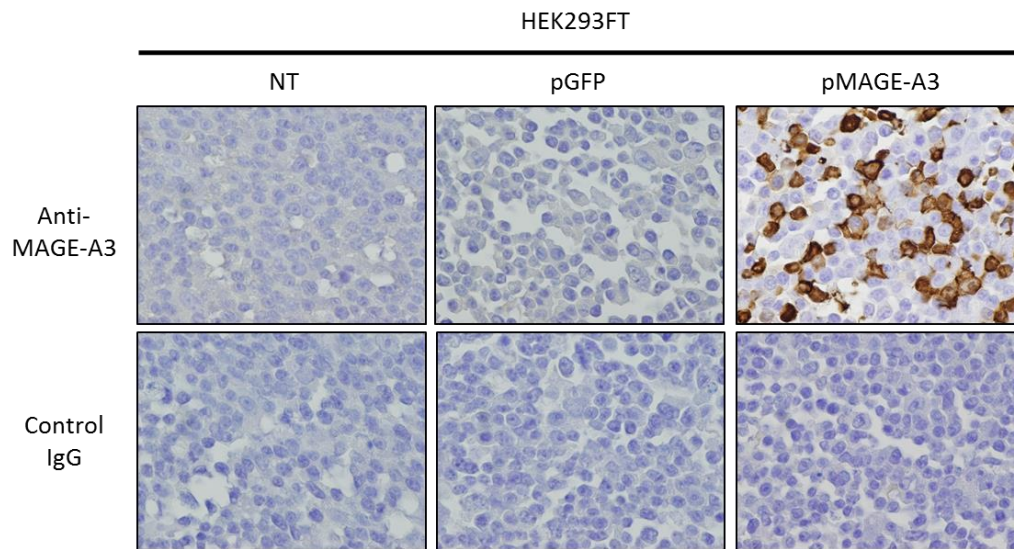


図5 HEK293FT-MAGE-A3 細胞の免疫組織化学的染色

MAGE-A3 蛋白を特異的に検出できることを確認した。

以上より、HEK293FT-NY-ESO-1 細胞および HEK293FT-MAGE-A3 細胞において、それぞれの導入蛋白を免疫組織化学的に検出する条件を決定した。

癌細胞株における NY-ESO-1、MAGE-A3 の発現の検討

先の検討で決定した条件に用いて、ヒト癌細胞株 Xenograft においても NY-ESO-1 および MAGE-A3 を免疫組織化学的に検出可能かどうかを検討した。まず、各癌細胞株に対して網羅的に RT-PCR を行い、食道癌細胞株である HEC46 に NY-ESO-1 遺伝子が、膀胱癌細胞株である KP1N に MAGE-A3 遺伝子が含まれることを確認した。また、HEC46 と KP1N はそれぞれ MAGE-A3 遺伝子、NY-ESO-1 遺伝子を有さなかった。

次に、NY-ESO-1 および MAGE-A3 の免疫組織化学染色を行い、RT-PCR の結果と一致することを確認した (図6)。

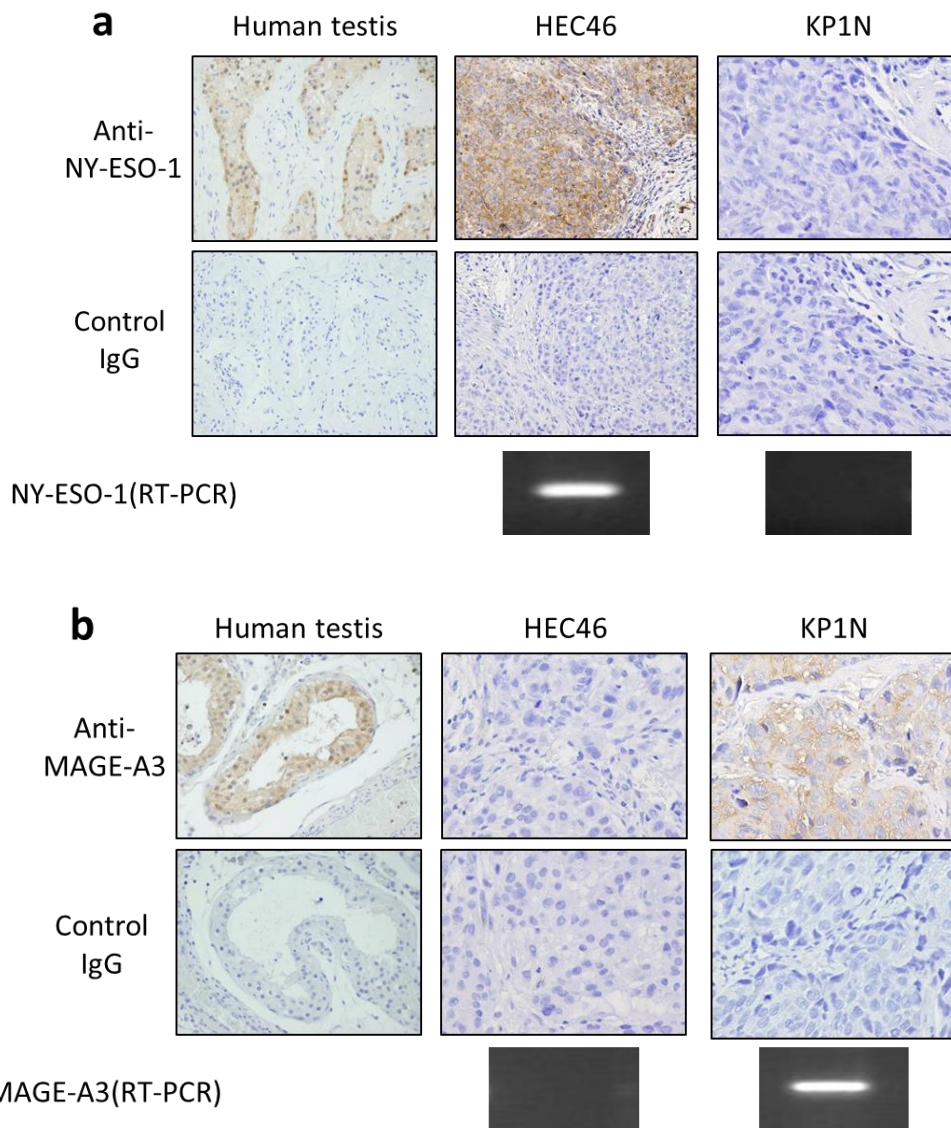


図6 HEC46 および KP1N における NY-ESO-1、MAGE-A3 の検出

HEC46 において NY-ESO-1 が、KP1N において MAGE-A3 が発現することを確認した。

臨床試験患者の癌組織における NY-ESO-1、MAGE-A3 発現の検索

臨床試験患者のパラフィン切片における NY-ESO-1、MAGE-A3 の発現を検索するため、決定した条件のもと免疫組織化学的染色を行った。NY-ESO-1 の発現を確認した症例はなく、MAGE-A3 は 1 例のみ発現していた (表 4)。MAGE-A3 を発現していた症例 2 を図 7 に示す。

なお、1 例 (症例 3) は生検による微小切片のため、染色に必要な量が残っていなかったため検討できなかった。

表 4 MAGE-A4 がんワクチン患者における免疫組織化学的染色

MAGE-A4は全例に発現し、MAGE-A3は症例2のみが発現することを確認した。NY-ESO-1発現は確認できなかった。

患者	MAGE-A4	NY-ESO-1	MAGE-A3
1	+	-	-
2	+	-	+
3	+	ND	ND
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	+	-	-
11	+	-	-
12	+	-	-

ND : No data

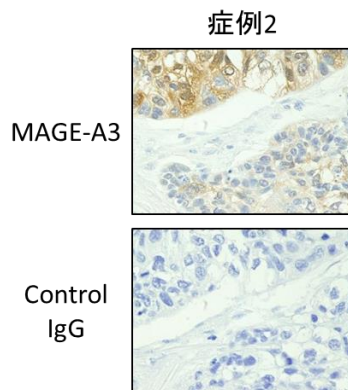


図 7 症例 2 における MAGE-A3 の検出

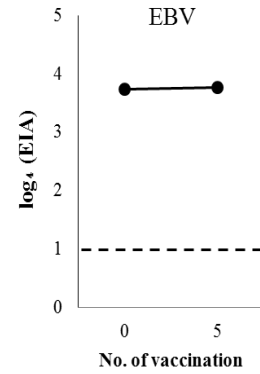
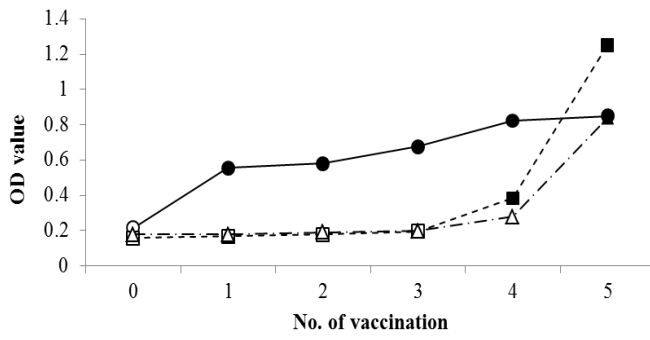
症例 2 において MAGE-A3 が発現することを確認した。

ELISA による cut off 値の設定と、臨床試験患者血漿における各癌精巣抗原に対する抗体反応の測定

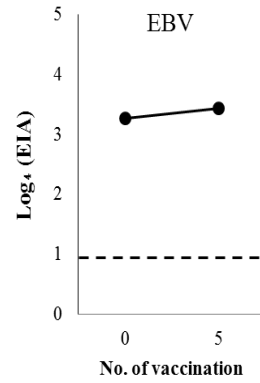
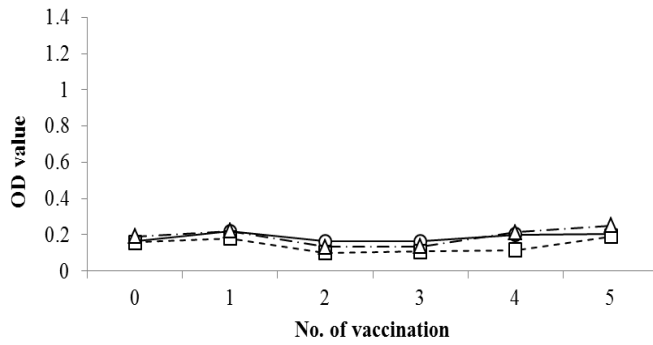
健康成人における MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する吸光度を測定し、前述の計算式をもとに cut off 値を算出した。それぞれ、0.288、0.223、0.284 であった。

続いて、患者血漿における各腫瘍抗原に対する抗体反応を評価するため、各抗原に対する ELISA を行い吸光度を測定した。各患者におけるワクチン投与回数ごとの吸光度の推移を図 8 に示す。

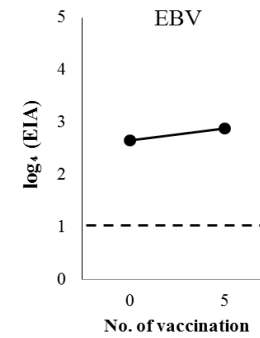
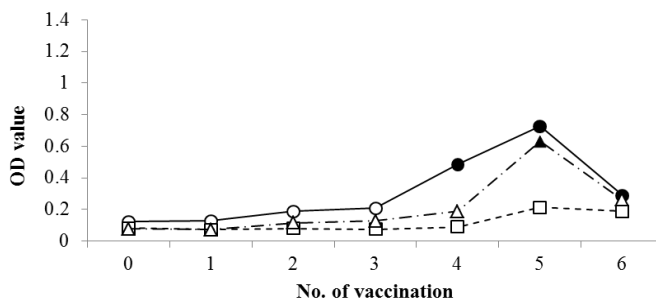
Pt 1



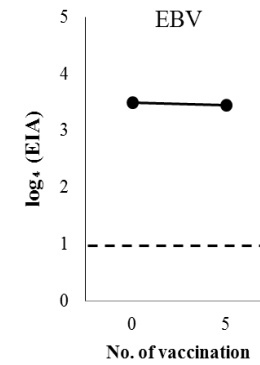
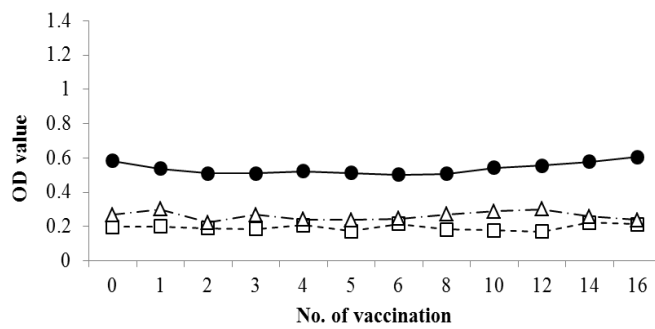
Pt 2



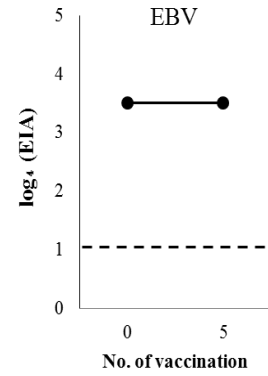
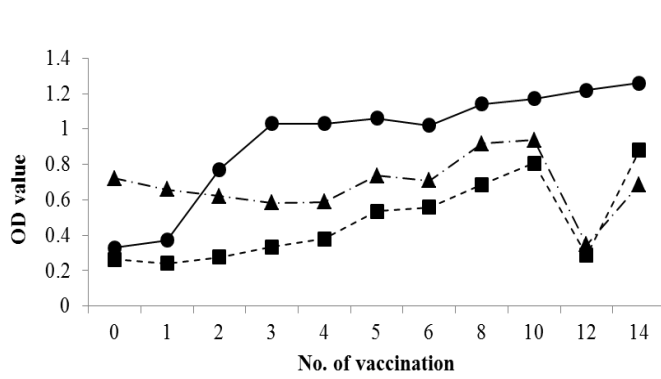
Pt 3



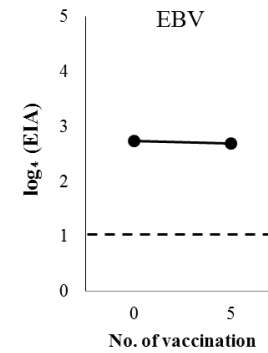
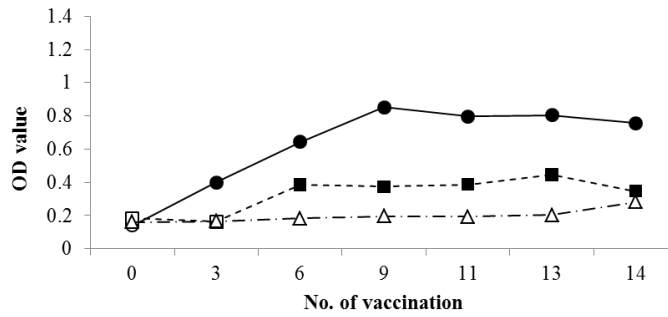
Pt 4



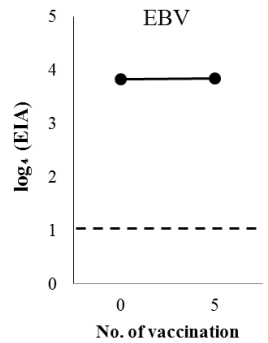
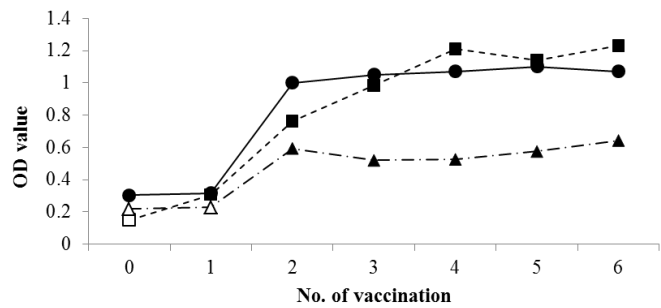
Pt 5



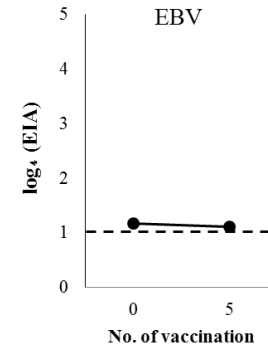
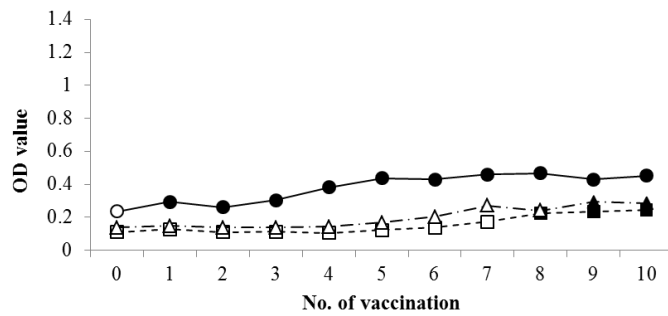
Pt 6



Pt 7



Pt 8



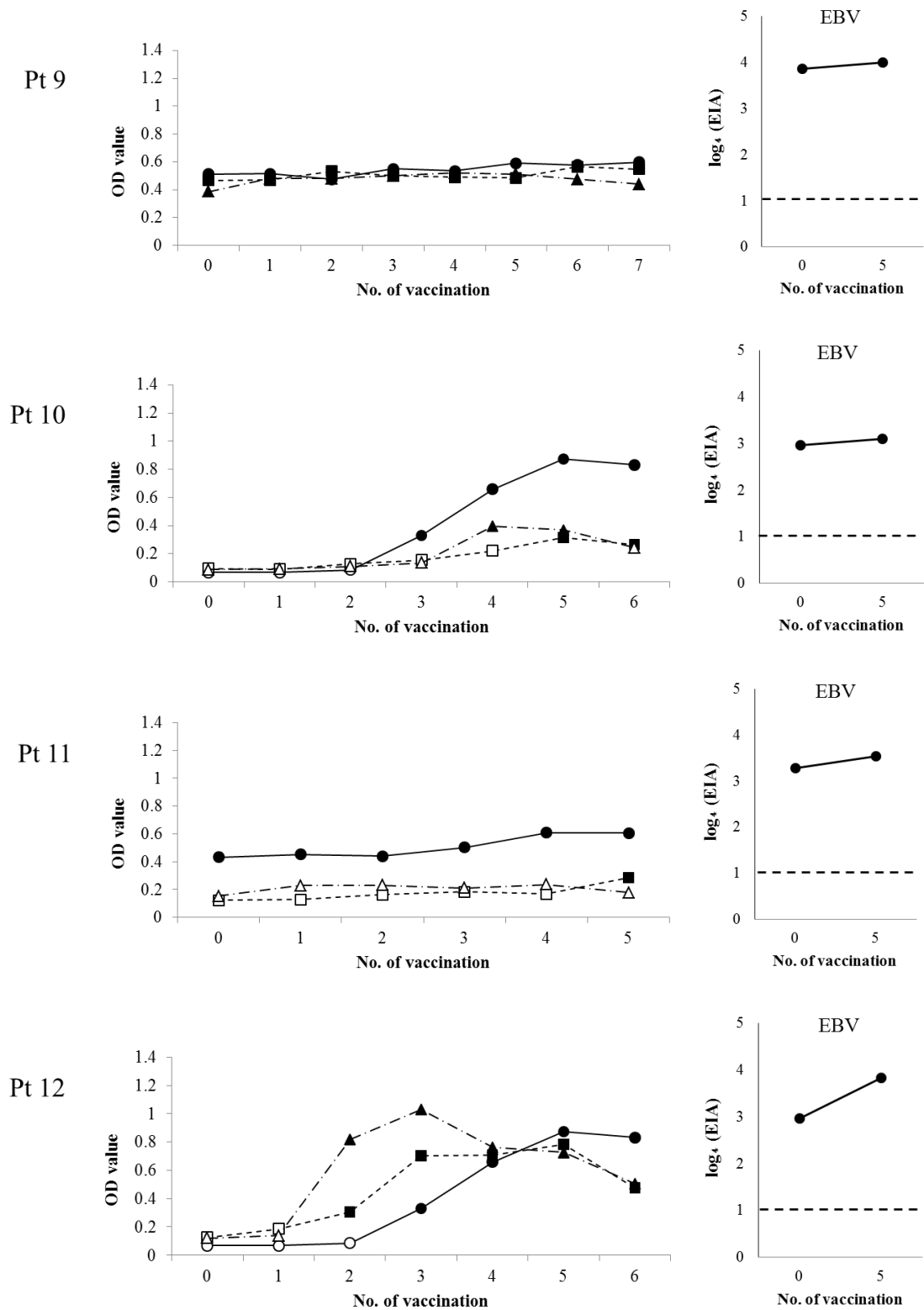


図8 MAGE-A4がんワクチン患者における各癌精巢抗原に対する抗体反応の推移
 ○がMAGE-A4、△がNY-ESO-1、□がMAGE-A3を表し、中塗りはcut off値以上であることを示す。

CHP-MAGE-A4 ワクチン投与前における抗体反応の有無と免疫組織化学的染色との相違

がんワクチン投与前において、MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する抗体反応を有する (Sero-positive) 症例は、12 例中それぞれ 5 例 (41.7%)、2 例 (17.7%)、2 例 (17.7%) であった。NY-ESO-1、MAGE-A3 の sero-positive 症例は同一症例であったが、2 例とも免疫組織化学的染色においては NY-ESO-1 と MAGE-A3 の発現を認めなかった (表 5)。

表 5 がんワクチン患者における IHC の結果とワクチン投与前の抗体反応の比較

MAGE-A4 では 5 例に抗体反応を認めた。NY-ESO-1、MAGE-A3 においても 2 例ずつ陽性であったが、免疫組織化学的染色の結果とは一致しなかった。

Pt	Immunohistochemistry			Antibody response before vaccination		
	MAGE-A4	NY-ESO-1	MAGE-A3	MAGE-A4	NY-ESO-1	MAGE-A3
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-
3	+	ND	ND	-	-	-
4	+	-	-	+	-	-
5	+	-	-	+	+	+
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	+	-	-
8	+	-	-	-	-	-
9	+	-	-	+	+	+
10	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	+	-	-
12	+	-	-	-	-	-
	12 / 12 (100%)	0 / 11 (0%)	1 / 11 (9.1%)	5 / 12 (41.7%)	2 / 12 (17.7%)	2 / 12 (17.7%)

ND: no data

CHP-MAGE-A4 ワクチン投与後における各抗原に対する抗体反応の有無

ワクチン 5 回投与後における MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する抗体反応陽性例は、12 例中それぞれ 8 例 (66.7%)、6 例 (50%)、5 例 (41.7%) で、ワクチン投与前に比べ高頻度であった。CHP-MAGE-A4 ワクチン投与により標的抗原である MAGE-A4 のみならず NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する免疫反応が惹起された可能性が示唆された (表 6)。

表 6 がんワクチン投与後における各抗原に対する抗体反応

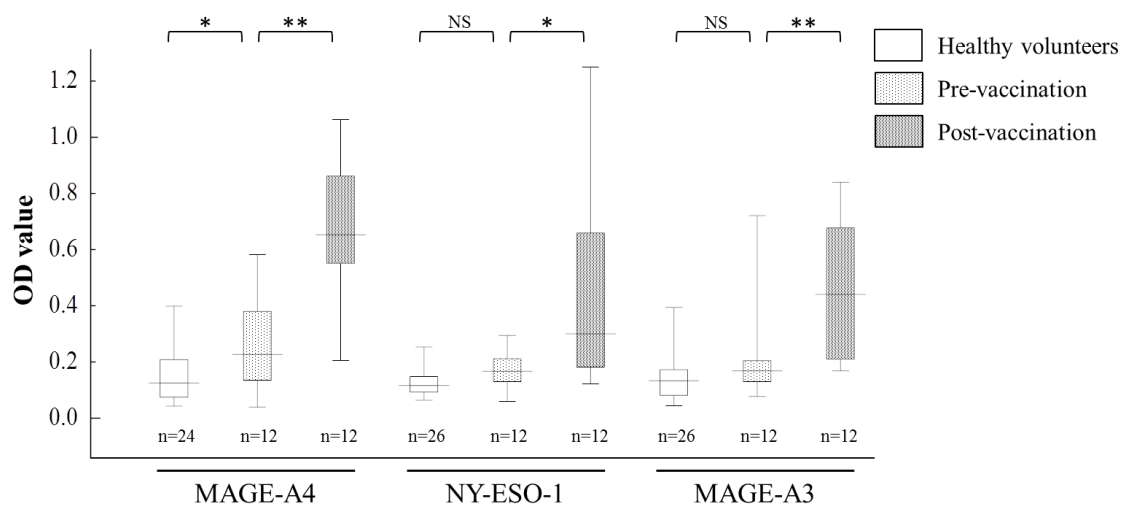
各抗原に対する抗体反応陽性例が増加した。CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与により、MAGE-A4 のみならず NY-ESO-1、MAGE-A3 においても免疫反応が惹起された可能性が示唆された。

Antibody response after vaccinations			
Pt	MAGE-A4	NY-ESO-1	MAGE-A3
1	+	+	+
2	-	-	-
3	+	-	+
4	-	-	-
5	+	+	-
6	+	-	-
7	+	+	+
8	+	-	-
9	-	-	-
10	+	+	+
11	-	+	-
12	+	+	+
	8 / 12 (66.7%)	6 / 12 (50%)	5 / 12 (41.7%)

CHP-MAGE-A4 ワクチン投与例全体における各抗原に対する抗体反応の比較

CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与により、MAGE-A4 に加え NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する免疫反応も惹起された可能性が示唆されたため、健常人およびワクチン投与前後における OD 値を比較した。

ワクチン投与前に健常人と有意差を認めたのは MAGE-A4 のみであり、NY-ESO-1 および MAGE-A3 に対する OD 値は健常人と同等であった。一方、ワクチン投与後の OD 値は、すべての抗原において投与前に比べて有意に上昇していた (図 9)。



NS : not significant * : p < 0.05 ** : p < 0.01

図9 がんワクチン投与による各抗原に対する抗体反応の比較

CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与により、MAGE-A4 のみならず NY-ESO-1、MAGE-A3 においても抗体反応が認められた。

各抗原に対する抗体反応の有無と臨床効果および予後への影響

CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与によって惹起された各抗原に対する抗体反応の臨床的意義について検討するため、ワクチン投与後における MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 陽性例、およびすべての抗原に対して陽性を示した 4 例を比較した。その結果、いずれの群においても臨床効果および予後への影響は認められなかった (表 7、図 10)。

表 7 がんワクチン投与による抗体反応の上昇と臨床効果

	Antibody response	Clinical response (SD / PD)	P value
MAGE-A4	+	5 / 3	NS
	-	2 / 2	
NY-ESO-1	+	2 / 4	NS
	-	5 / 1	
MAGE-A3	+	2 / 3	NS
	-	5 / 2	
All CTAs	+	1 / 3	NS
	-	2 / 1	

NS : not significant

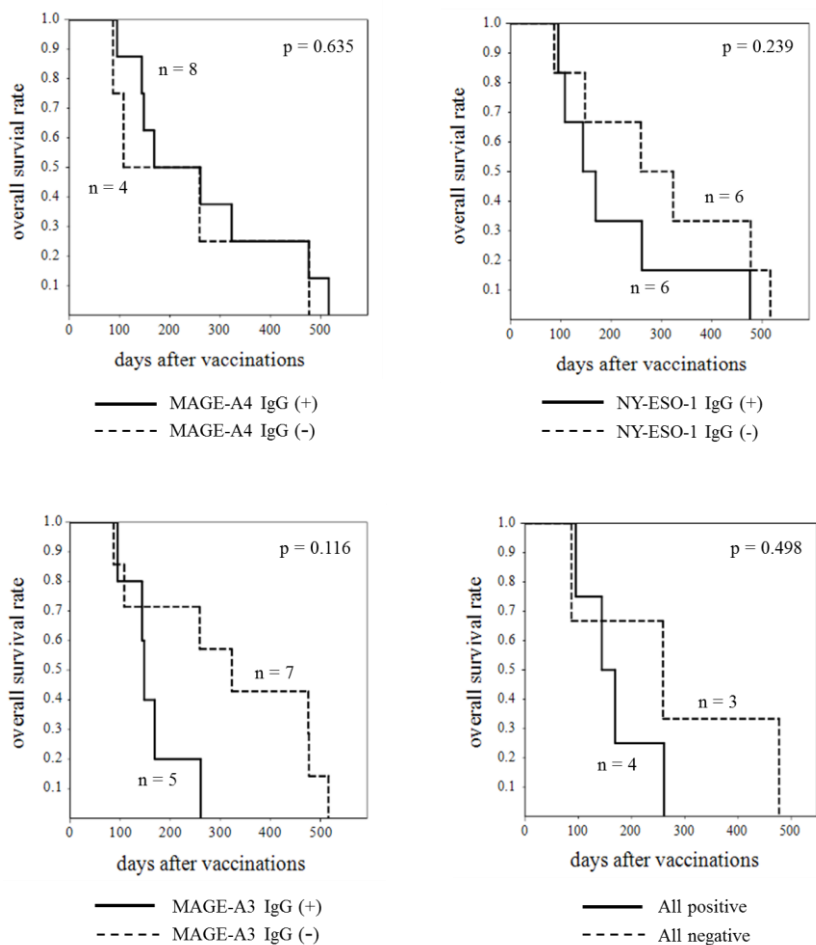


図 10 がんワクチン投与による抗体反応の上昇と予後

ワクチン投与後における MAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3 陽性例、およびすべての抗原に対して陽性を示した 4 例を比較した結果、いずれの群においても臨床効果および予後への影響は認められなかった

考 察

進行再発性難治腫瘍に対して、手術治療・化学療法・放射線療法を中心とした集学的治療が行われてきた。第4の抗癌治療としてBRM (Biological Response Modifiers) 製剤やサイトカイン製剤、モノクローナル抗体製剤といった外的に投与する免疫療法が臨床の場で使用され、治療成績は改善してきているものの依然として長期生存を得ることは困難である。こうした状況の中、1990年代に免疫原性を有する腫瘍抗原が発見されたことを契機に、自身の免疫反応を利用した腫瘍特異的免疫療法が開発され、多数の臨床試験が行われてきた (van der Bruggen et al., 1991 ; Tagliamonte et al., 2014)。しかしながら、腫瘍抗原特異的免疫反応が誘導されることが確認されているのにも関わらず、臨床効果は満足できるものではない (Roseberg et al., 2004 ; Itoh et al., 2009)。その原因として、癌細胞による免疫抑制細胞の誘導やMHC class I発現の減弱といった癌による様々な免疫逃避機構が指摘されている (Nishikawa et al., 2014 ; Itoh et al., 2009)。また、がんワクチン投与により抗腫瘍免疫が過剰に誘導された場合、これを抑制する方向にサイトカイン環境が傾く可能性が示されている (Kyogoku et al., 2016)。

したがって、癌免疫療法により誘導される免疫反応をモニタリングすることで、治療効果や予後の予測、あるいは治療効果の改善に寄与できる可能性がある。

癌免疫療法における免疫モニタリングとしては、抗原に対する特異的細胞障害性T細胞 (cytotoxic T lymphocytes ; CTL) の誘導 (抗原特異的細胞性免疫反応) あるいは抗原特異的抗体産生 (抗原特異的液性免疫反応) を用いて治療効果を予測し、治療に対する好反応症例を選択することがふさわしい。特に、直接的に抗腫瘍効果をもたらすCTLを評価する抗原特異的細胞性免疫反応を用いることがより望ましいと考えられるが、ELISPOT 法や細胞内サイトカイン染色法、MHCマルチマー法などの抗原特異的細胞性免疫反応の評価方法は、検体の状態や測定に用いる試薬によって誤差が生じやすく、また、測定実施者の熟練が必要であり施設間の較差も大きいため、標準化が難しい (Janetzki et al., 2009)。一方で、抗原特異的液性免疫反応を測定するELISA法は一般的に確立された手法で、再現性や感度においての問題は少ないため頻用されている。

これまで、腫瘍抗原に対する癌免疫療法の免疫反応の評価は標的抗原に対するものが中心であった。しかし近年、癌免疫療法において非標的抗原に対する免疫反応が惹起される現象である免疫応答拡大に関する報告が散見される。この現象は癌の自然経過あるいは抗癌治療に伴う免疫反応の一つとして考えられ

ており、癌の存在診断、特異的免疫反応誘導、および臨床的治療効果や予後に
関する免疫モニタリングとして期待されている (Rosato et al., 2006 ; Kawabata
et al., 2007 ; Corbière et al., 2011 ; Kawada et al., 2012)。

本研究では、所属教室で行われた CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法臨床試験検
体を用いて免疫応答拡大が観察され得るか、またその意義に関して検討した。
今回、CHP-MAGE-A4 がんワクチンによる免疫応答拡大の有無を検討するにあたり、
その対象抗原としては、より一般化された抗原、すなわち癌免疫療法の対象抗
原となっていることが望ましいと考えられたため、いずれも癌免疫療法の標的
抗原として頻用されている NY-ESO-1 および MAGE-A3 を選択した。NY-ESO-1 は脂
肪肉腫や神経芽腫、悪性黒色腫、卵巣腫瘍の 40-100%、膀胱癌、肺癌の 20-40%、
大腸癌の 2-10%など、様々な悪性腫瘍に発現していることが確認されている

(Jungbluth et al., 2001a, 2001b ; Odunsi et al., 2003 ; Hemminger et al.,
2013 ; Pollack et al., 2012 ; Rodolfo et al., 2003 ; Barrow et al., 2006 ;
Scanlan et al., 2004 ; Kurashige et al., 2001 ; Gure et al., 2005 ; Li et
al., 2005 ; Mashino et al., 2001) 。同様に、MAGE-A3 も悪性黒色腫や膀胱癌、
前立腺癌、乳癌、肺癌、卵巣癌などに広く発現している (Scanlan et al., 2004 ;
Zhang et al., 2010 ; Wölfl et al., 2005) 。これらの抗原の免疫原性に関し
ては、1990 年代後半、食道癌患者において NY-ESO-1 に対する自然免疫が誘導さ
れていることが Chen ら (Chen et al., 1997) により報告されたことが最初で
ある。その後、NY-ESO-1 および MAGE-A family により、HLA class I あるいは
HLA class II を介して細胞障害性 T リンパ球や液性免疫反応を誘導されること
が確認された (Traversari, 1999 ; Jäger et al., 1998 ; Chaux et al., 1999 ;
Thurner et al., 1999) 。実際に、NY-ESO-1 においては患者血清中に抗 NY-ESO-1
抗体が産生されていることが確認され (Maio et al., 2003 ; Scanlan et al.,
2001 ; Stockert et al., 1998 ; Kurashige et al., 2001) 、NY-ESO-1 に対す
る抗体反応が認められた患者の 90%以上で NY-ESO-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘
導されていることが示された (Jäger et al., 2000b) 。MAGE-A3 においても悪
性黒色腫や急性骨髄性白血病、T 細胞性白血病/リンパ腫患者で抗原特異的 CD8
陽性細胞が誘導されることが報告されている (Connerotte et al., 2008 ;
Goodyear et al., 2010 ; Nishikawa et al., 2012) ことから、NY-ESO-1 と
ならび癌免疫療法の標的抗原として頻用されている (Scanlan et al., 2002 ;
Thomas et al., 2018 ; Wang et al., 2018) 。

本研究において、CHP-MAGE-A4 がんワクチンの投与により、MAGE-A4 (8 例,
66.7%)、NY-ESO-1 (6 例, 50%)、および MAGE-A3 (5 例, 41.7%) に対する免疫
反応が認められ、患者全体の比較においてもワクチン投与により各抗原に対す

る OD 値が有意に上昇することが確認された。しかし、NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する抗体反応が認められた症例において、IHC ではその発現は確認されなかった。Kawada ら (Kawada et al., 2012) は、食道癌および前立腺癌患者 13 例に対して CHP-NY-ESO-1 がんワクチンを投与し、LAGE-1、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、CT7、CT10 など多数の腫瘍抗原に対する抗原抗体反応を解析し、同一患者において複数の抗原に対する IgG が上昇することを報告している。その中で、MAGE-A3 および MAGE-A4 に対する抗体反応が上昇した 6 例のうち、MAGE-A3 は 5 例、MAGE-A4 は全例でその遺伝子あるいはタンパクの発現を確認している。また、Ueda ら (Ueda et al., 2018) は、食道扁平上皮癌および頭頸部扁平上皮癌患者 22 例に対して、CHP-MAGE-A4 がんワクチンを用いた検討を行い、3 例で非標的抗原である NY-ESO-1 に対する抗体反応を認め、そのうち 2 例で NY-ESO-1 タンパクの発現を確認している。上記の研究においては、がんワクチン後に免疫応答拡大が認められた症例のほぼ全例で非標的抗原の遺伝子およびタンパクが確認されており、本検討の結果とは相反するものである。しかしこれは、同一腫瘍内においても単一細胞クローンによって腫瘍抗原の発現が異なるという癌の不均一性 (Sigalotti et al., 2004) を考慮すると矛盾しない結果だと考えられる。このことから、免疫応答拡大はがんワクチン投与により崩壊した腫瘍から放出された腫瘍抗原を認識していることが示唆され、がんワクチン療法の免疫誘導や癌の存在をモニターする有益な手段となる可能性がある。また近年、腫瘍抗原である Mesothelin 特異的 CAR-T 療法を施行した膵癌患者において、治療後に他の腫瘍抗原や免疫関連タンパクに対する抗体反応が上昇した患者で腫瘍の活動性が低下したと報告 (Beatty GL et al., 2018) されており、免疫応答拡大は癌免疫療法における有力なバイオマーカーとなる可能性を秘めている。

標的抗原に対する抗原特異的免疫反応が誘導された症例で予後良好であったとする報告 (Kageyama et al., 2013 ; Saito et al., 2014) および非標的抗原に対する細胞障害性 T 細胞の反応が腫瘍縮小に影響したとする報告 (Corbière et al., 2011) がある。しかし、本検討においては標的抗原である MAGE-A4、非標的抗原である NY-ESO-1、MAGE-A3、および上記すべての抗原に対する免疫反応の有無に関して臨床効果と予後との検討を行ったが、いずれの群においても有意な差は認められなかった。その原因として、抗原特異的免疫反応は誘導されたものの、腫瘍特異的 CTL の分化障害 (Speiser et al., 2005) や制御性 T 細胞による CTL の不活性化 (Nishikawa et al., 2005) といった腫瘍免疫逃避機構により抗原特異的 CTL が誘導されず、有効な抗腫瘍効果を得るには至らなかった可能性がある。制御性 T 細胞は自己に対するリンパ球の活性化および増殖を抑制する免疫寛容に関する T 細胞であり、腫瘍抗原の多くは自己抗原であるため、

制御性T細胞は抗腫瘍免疫を抑制し腫瘍の増殖に有利な状態を作るとされる。このため、がんワクチンによる腫瘍特異的免疫反応だけでは臨床的に有効な治療効果を得るには不十分であり、制御性T細胞などの腫瘍免疫逃避機構の調整が必要であることを示唆している。さらに、本研究の対象患者はいずれも切除不能進行再発癌症例であり、免疫治療単独では抗腫瘍効果が不十分であった可能性もある。

また本検討では、がんワクチン投与前においてMAGE-A4、NY-ESO-1、MAGE-A3に対する抗体反応を有する (Sero-positive) 症例は、12例中それぞれ5例 (41.7%)、2例 (17.7%)、2例 (17.7%) であった。がんワクチン患者における非標的抗原に対するsero-positive症例が予後不良とする報告があるが (Jäger et al., 2000a ; Ueda et al., 2018)、本研究では登録前に受けた治療やその期間などの背景がさまざまであるため、その意義に関しては不明である。今後、前治療の有無や、その程度といった背景因子を揃え、より多数の症例で再検討を行う必要がある。

本研究において、CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与により NY-ESO-1、MAGE-A3 に対する免疫応答拡大が惹起されることを確認した。臨床効果および予後への影響は認められなかったものの、免疫応答拡大は癌免疫療法における免疫誘導のモニタリングや癌の存在診断に利用できる可能性があり、有力なバイオマーカーとなる可能性を秘めている。また、がんワクチン単独では臨床的に有効な治療効果を得るには不十分である可能性が高く、癌の免疫逃避機構を含めた包括的な腫瘍免疫を考慮する必要がある。

結論

1. 本研究から得られた新知見

- CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法により、非標的抗原である NY-ESO-1 および MAGE-A3 に対する免疫応答拡大が認められた。
- CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与により生じた免疫応答拡大と臨床効果および予後との相関は認められなかった。

2. 新知見の意義

- 免疫応答拡大は癌免疫療法における免疫誘導のモニタリングや癌の存在診断に利用できる可能性があり、有力なバイオマーカーとなる可能性を秘めている。
- がんワクチン単独では臨床的に有効な治療効果を得るには不十分である可能性が高く、癌の免疫逃避機構を含めた包括的な腫瘍免疫を考慮する必要がある。

3. 新知見からどのような研究が展開され得るか

- 背景因子を揃えた上で、より多数例のがんワクチン療法患者における特異的免疫反応の有無を検討する。
- 抗原特異的細胞性免疫や抑制性 T 細胞などの免疫抑制性細胞に関する評価項目を加えた検討を行う。
- 他の腫瘍抗原を標的とするがん免疫療法においても免疫応答拡大が起こり得るかを検討する

4. 今後の課題

- 本研究は 12 例と少数であるため、より大規模で癌種や治療歴などの背景を揃えた上での検討が必要である。また、特異的細胞性免疫や免疫逃避機構に関する評価を含め、腫瘍免疫の包括的検討を行うべきである。

謝 辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授、土川 貴裕 講師、故 宮本 正樹 助教に深く感謝致します。

また、今回の研究において多大なご協力を賜りました三重大学大学院医学系研究科遺伝子・免疫細胞治療学 珠玖 洋 教授、影山 慎一 教授、宮原 慶裕 准教授、長崎大学大学院医歯薬総合研究科医療科学専攻腫瘍医学分野 池田 裕明 教授に心から感謝致します。

最後に、本研究を支えてくださった消化器外科学教室Ⅱの全ての皆様と、臨床試験にご協力下さいました患者様に心よりお礼申し上げます。

利益相反

本研究で使用した、CHP-MAGE-A4 がんワクチン、MAGE-A4 蛋白および抗 MAGE-A4 抗体は三重大学より提供を受けたものである。

また、本研究にあたり助成金や寄付金の支援はありません。

文献リスト

Abiko T, Tsuchikawa T, Miyauchi K, Wada M, Kyogoku N, Shichinohe T, Miyahara Y, Kageyama S, Ikeda H, Shiku H, et al. (2018). Serum immunoglobulin E response as a marker of for unfavorable prognosis following cholesteryl pullulan-MAGE A4 vaccination. *Oncol. Lett.* 15, 3703-3711.

Akcakanat A, Kanda T, Tanabe T, Komukai S, Yajima K, Nakagawa S, Ohashi M, Hatakeyama K. (2006). Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: Implications for immunotherapy. *Int. J. Cancer.* 118, 123-128.

Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, Silva MC, Mundstein AS, Cohen T, Chen YT, Chua R, Gurung S, Gnjjatic S et al. (2009). CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res.* 37(Database issue):D816-819.

Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y, Ritter E, Ferrara CA, Ritter G, Hoffman EW, Bokemeyer C, Old LJ, Gnjjatic S et al. (2008). Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 1650-1655.

Barrow C, Browning J, MacGregor D, Davis ID, Sturrock S, Jungbluth AA, Cebon J et al. (2006). Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin. Cancer Res.* 12, 764-771.

Bart J, Groen HJ, van der Graaf WT, Hollema H, Hendrikse NH, Vaalburg W, Sleijfer DT, de Vries EG. (2002). An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol.* 3, 357-363.

Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, Kulikovskaya IM, Soulen MC, McGarvey M, Nelson AM et al. (2018). Activity of Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Against

Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology*. 155, 29-32.

Bender A, Karbach J, Neumann A, Jäger D, Al-Batran SE, Atmaca A, Weidmann E, Biskamp M, Gnjatic S, Pan L et al. (2007). LUD 00-009: phase 1 study of intensive course immunization with NY-ESO-1 peptides in HLA-A2 positive patients with NY-ESO-1-expressing cancer. *Cancer Immun*. 7, 16.

Brichard VG, Lejeune D. (2007). GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine* 25, B61-71.

Caballero OL, Chen YT. (2009). Cancer/testis (CT) antigens : potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 100, 2014-2021.

Calabro L, Fonsatti E, Altomonte M, Pezzani L, Colizzi F, Nanni P, Gattei V, Sigalotti L, Maio M. (2005). Methylationregulated expression of cancer testis antigens in primary effusion lymphoma: immunotherapeutic implications. *J. Cell Physiol*. 202, 474-477.

Chaux P, Luiten R, Demotte N, Vantomme V, Stroobant V, Traversari C, Russo V, Schultz E, Cornelis GR, Boon T et al. (1999). Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J. Immunol*. 163, 2928-2936.

Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. (1997). A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94, 1914-1918.

Chen YT, Güre AO, Tsang S, Stockert E, Jäger E, Knuth A, Old LJ. (1998). Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 95, 6919-6923.

Connerotte T, Van Pel A, Godelaine D, Tartour E, Schuler-Thurner B, Lucas S, Thielemans K, Schuler G, Coulie PG. (2008). Functions of Anti-MAGE T-cells induced in melanoma patients under different vaccination modalities. *Cancer Res.* 68, 3931-3940.

Corbière V, Chapiro J, Stroobant V, Ma W, Lurquin C, Lethé B, van Baren N, Van den Eynde BJ, Boon T, Coulie PG. (2011). Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases. *Cancer Res.* 15, 1253-1262.

De Backer O, Arden KC, Boretta M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P et al. (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* 59, 3157-3165.

Fiszer D, Kurpisz M. (1998). Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am. J. Reprod. Immunol.* 40, 172-176.

Goodyear O, Agathangelou A, Novitzky-Basso I, Siddique S, McSkeane T, Ryan G, Vyas P, Cavenagh J, Stankovic T, Moss P et al. (2010). Induction of a CD8+ T-cell response to the MAGE cancer testis antigen by combined treatment with azacitidine and sodium valproate in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Blood.* 116, 1908-1918.

Gure AO, Chua R, Williamson B, Gonen M, Ferrera CA, Gnjatic S, Ritter G, Simpson AJ, Chen YT, Old LJ. (2005). Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 8055-8062.

Hemminger JA, Ewart Toland A, Scharschmidt TJ, Mayerson JL, Kraybill WG, Guttridge DC, Iwenofu OH. (2013). The cancer-testis antigen NY-ESO-1 is highly expressed in myxoid and round cell subset of liposarcomas. *Mod. Pathol.* 26, 282-288.

Itoh K, Yamada A, Mine T, Noguchi M. (2009). Recent advances in cancer vaccines: an overview. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 39, 73-80.

Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E et al. (1998). Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med.* 187, 265-270.

Jäger E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jäger D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G et al., (2000a). Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 12198-12203.

Jäger E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D et al. (2000b). Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 4760-4765.

Jäger E, Karbach J, Gnjatic S, Neumann A, Bender A, Valmori D, Ayyoub M, Ritter E, Ritter G, Jäger D et al. (2006). Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 14453-14458.

Janetzki S, Britten CM, Kalos M, Levitsky HI, Maecker HT, Melief CJ, Old LJ, Romero P, Hoos A, Davis MM. (2009). "MIATA"-minimal information about T cell assays. *Immunity.* 31, 527-528.

Jungbluth AA, Chen YT, Stockert E, Busam KJ, Kolb D, Iversen K, Coplan K, Williamson B, Altorki N, Old LJ. (2001a). Immunohistochemical analysis of NY-ESO-1 antigen expression in normal and malignant human tissues. *Int. J. Cancer.* 92, 856-860.

Jungbluth AA, Antonescu CR, Busam KJ, Iversen K, Kolb D, Coplan K, Chen YT, Stockert E, Ladanyi M, Old LJ. (2001b). Monophasic and biphasic synovial sarcomas abundantly express cancer/testis antigen NY-ESO-1 but not MAGE-A1 or CT7. *Int. J. Cancer.* 94, 252-256.

Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y, Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino SH, Miyahara Y, Ikeda H et al., (2013). 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.

Kalejs M, Erenpreisa J. (2005). Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and “brain-storming” session. *Cancer Cell Int.* 5, 4.

Kawabata R, Wada H, Isobe M, Saika T, Sato S, Uenaka A, Miyata H, Yasuda T, Doki Y, Noguchi Y et al. (2007). Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int. J. Cancer.* 15, 2178-2184.

Kawada J, Wada H, Isobe M, Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Okazaki N, Uenaka A, Nakamura Y, Fujiwara S et al. (2012). Heteroclitic serological response in esophageal and prostate cancer patients after NY-ESO-1 protein vaccination. *Int. J. Cancer.* 130, 584-592.

Kurashige T, Noguchi Y, Saika T, Ono T, Nagata Y, Jungbluth A, Ritter G, Chen YT, Stockert E, Tsushima T et al. (2001). NY-ESO-1 expression and immunogenicity associated with transitional cell carcinoma: correlation with tumor grade. *Cancer Res.* 61, 4671-4674.

Kyogoku N, Ikeda H, Tsuchikawa T, Abiko T, Fujiwara A, Maki T, Yamamura Y, Ichinokawa M, Tanaka K, Imai N, Miyahara Y, Kageyama S, Shiku H, Hirano S. (2016). Time-dependent transition of the immunoglobulin G subclass and immunoglobulin E response in cancer patients vaccinated with cholesteryl pullulan-melanoma antigen gene-A4 nanogel. *Oncol. Lett.* 12, 4493-4504.

Li M, Yuan YH, Han Y, Liu YX, Yan L, Wang Y, Gu J. (2005). Expression profile

of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin. Cancer Res.* 11, 1809–1814.

Maio M, Coral S, Sigalotti L, Elisei R, Romei C, Rossi G, Cortini E, Colizzi F, Fenzi G, Altomonte M et al. (2003). Analysis of cancer/testis antigens in sporadic medullary thyroid carcinoma: expression and humoral response to NY-ESO-1. *J. Biol. Chem.* 88, 748–754.

Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Yamaguchi H, Nagashima H, Inoue H, Sugimachi K, Mori M. (2001). Expression of multiple cancer-testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. *Br. J. Cancer* 85, 713–720.

Melloni G, Ferreri AJ, Russo V, Gattinoni L, Arrigoni G, Ceresoli GL, Zannini P, Traversari C. (2004). Prognostic significance of cancer-testis gene expression in resected nonsmall cell lung cancer patients. *Oncol. Rep.* 12, 145–151.

Mine T, Sato Y, Noguchi M, Sasatomi T, Gouhara R, Tsuda N, Tanaka S, Shomura H, Katagiri K, Rikimaru T et al., (2004). Humoral responses to peptides correlate with overall survival advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin. Cancer. Res.* 10, 929–937

Nelson PT, Zhang PJ, Spagnoli GC, Tomaszewski JE, Pasha TL, Frosina D, Caballero OL, Simpson AJ, Old LJ, Jungbluth AA. (2007). Cancer/testis (CT) antigens are expressed in fetal ovary. *Cancer Immun.* 7, 1.

Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi K, Allen PM, Schreiber RD, Sakaguchi S, Old LJ et al. (2005). Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201, 681–686.

Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A et al. (2012). Cancer/testis antigens are novel

targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 119, 3097-3104.

Nishikawa H, Sakaguchi S. (2014). Regulator T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 27, 1-7.

Odunsi K, Jungbluth AA, Stockert E, Qian F, Gnjjatic S, Tammela J, Intengan M, Beck A, Keitz B, Santiago D et al. (2003). NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 63, 6076-6083.

Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, Mhawech-Fauceglia P, Andrews C, Hoffman EW, Pan L, Ritter G, Villella J, Thomas B et al. (2007). Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 12837-12842.

Park S, Lim Y, Lee D, Cho B, Bang YJ, Sung S, Kim HY, Kim DK, Lee YS, Song Y, Jeoung DI. (2003). Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE-1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1625, 173-182.

Pollack SM, Jungbluth AA, Hoch BL, Farrar EA, Bleakley M, Schneider DJ, Loggers ET, Rodler E, Eary JF, Conrad EU 3rd et al. (2012). NY-ESO-1 is a ubiquitous immunotherapeutic target antigen for patients with myxoid/round cell liposarcoma. *Cancer.* 118, 4564-4570.

Rodolfo M, Luksch R, Stockert E, Chen YT, Collini P, Ranzani T, Lombardo C, Dalerba P, Rivoltini L, Arienti F et al. (2003). Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen. *Cancer Res.* 63, 6948-6955.

Rosato A, Zoso A, Dalla Santa S et al. (2006). Predicting tumor outcome following cancer vaccination by monitoring quantitative and qualitative CD8+ T cell parameters. *J. Immunol.* 176, 1999-2006.

Roseberg SA. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. 411, 380–384.

Roseberg SA, Yang JC, Restifo NP. (2004). Cancer immunotherapy : Moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909–915.

Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92, 11810–11813.

Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y. (2014). 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.

Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. (2000). Expression of cancer testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett.* 150, 155–164.

Scanlan MJ, Gout I, Gordon CM, Williamson B, Stockert E, Gure AO, Jäger D, Chen YT, Mackay A, O' Hare MJ. (2001). Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* 1, 4.

Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. (2002). Cancer/testis antigens : an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188, 22–32.

Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. (2004). The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4, 1.

Sigalotti L, Coral S, Altomonte M, Natali L, Gaudino G, Cacciotti P, Libener R, Colizzi F, Vianale G, Martini F. (2002a). Cancer testis antigens

expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br. J. Cancer* 86, 979–982.

Sigalotti L, Coral S, Nardi G, Spessotto A, Cortini E, Cattarossi I, Colizzi F, Altomonte M, Maio M. (2002b). Promoter methylation controls the expression of MAGE2, 3 and 4 genes in human cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 25, 16–26.

Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Tanzarella S, Danielli R, Colizzi F, Fonsatti E, Traversari C, Altomonte M, Maio M. (2004). Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 64, 9167–9171.

Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 5, 615–625.

Slingluff Jr CL, Petroni GR, Chianese-Bullock KA, Smolkin ME, Hibbitts S, Murphy C, Johansen N, Grosh WW, Yamshchikov GV, Neese PY et al. (2007). Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multipeptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting. *Clin. Cancer Res.* 13, 6386–6395.

Speiser DE, Liénard D, Rufer N, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Lejeune F, Krieg AM, Cerottini JC, Romero P. (2005). Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J. Clin. Invest.* 115, 739–746.

Stockert E, Jäger E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, Arand M, Knuth A, Old LJ. (1998). A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J. Exp. Med.* 187, 1349–1354.

Tagliamonte M, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. (2014). Antigen-specific vaccines for cancer treatment. *Hum. Vaccin Immunother.* 10, 3332-3346.

Thomas R, Al-Khadairi G, Roelands J, Hendrickx W, Dermime S, Bedognetti D, Decock J. (2018). NY-ESO-1 Based Immunotherapy of Cancer : Current Perspectives. *Front. Immunol.* 9, 947.

Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P et al. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190, 1669-1678.

Traversari C. (1999). Tumor-antigens recognised by T lymphocytes. *Minerva Biotechnol.* 11, 243-253.

Ueda S, Miyahara Y, Nagata Y, Sato E, Shiraishi T, Harada N, Ikeda H, Shiku H, Kageyama S. (2018). NY-ESO-1 antigen expression and immune response are associated with poor prognosis in MAGE-A4-vaccinated patients with esophageal or head/neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 9, 35997-36011.

Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, Bhardwaj N, Adams S, O' Neill D, Pavlick A, Escalon JB, Cruz CM, Angiulli A et al. (2007). Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 8947-8952.

van Baren N, Bonnet MC, Dreno B, Khammari A, Dorval T, Piperno-Neumann S, Lienard D, Speiser D, Marchand M, Brichard VG et al. (2005). Tumoral and immunologic response after vaccination of melanoma patients with an ALVAC virus encoding MAGE antigens recognized by T cells. *J. Clin. Oncol.* 23, 9008-9021.

van der BP, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 13, 1643-1647.

van der BP, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. (2002). Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol. Rev.* 188, 51-64.

Vaughan HA, Svobodova S, MacGregor D, Sturrock S, Jungbluth AA, Browning J, Davis ID, Parente P, Chen YT, Stockert E et al. (2004).

Immunohistochemical and molecular analysis of human melanomas for expression of the human cancer-testis antigens NY-ESO-1 and LAGE-1. *Clin. Cancer Res.* 10, 8396-8404.

Wang Y, Song X, Zheng Y, Liu Z, Li Y, Qian X, Pang X, Zhang Y, Yin Y. (2018). Cancer/testis Antigen MAGEA3 Interacts with STAT1 and Remodels the Tumor Microenvironment. *Int. J. Med. Sci.* 22, 1702-1712.

Wölfl M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F. (2005). Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 400-406.

Zhang S, Zhou X, Yu H, Yu Y. (2010). Expression of tumor-specific antigen MAGE, GAGE and BAGE in ovarian cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer.* 10, 163.