



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | CHP-MAGE-A4がんワクチン療法におけるIgGサブクラスおよびIgE抗体反応の重要性についての研究                                            |
| Author(s)           | 京極, 典憲                                                                                          |
| Description         | 配架番号 : 2247                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第12349号                                                                                        |
| Issue Date          | 2016-06-30                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k12349">https://doi.org/10.14943/doctoral.k12349</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/62539">https://hdl.handle.net/2115/62539</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Noriaki_Kyogoku.pdf                                                                             |



# 学 位 論 文

**CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法における IgG サブクラスおよび IgE 抗体反応の重要性についての研究**

**(Time-dependent transition of the immunoglobulin G subclass and immunoglobulin E response in cancer patients vaccinated with cholesteryl pullulan (CHP)-MAGE-A4)**

**2016 年 6 月**

**北 海 道 大 学  
京 極 典 憲**



# 学 位 論 文

**CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法における IgG サブクラスおよび IgE 抗体反応の重要性についての研究**

**(Time-dependent transition of the immunoglobulin G subclass and immunoglobulin E response in cancer patients vaccinated with cholesteryl pullulan (CHP)-MAGE-A4)**

**2016 年 6 月**

**北 海 道 大 学  
京 極 典 憲**

# 目 次

|                       |      |
|-----------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 ..... | 1 頁  |
| 緒言 .....              | 3 頁  |
| 略語表 .....             | 6 頁  |
| 実験方法 .....            | 8 頁  |
| 実験結果 .....            | 17 頁 |
| 考察 .....              | 26 頁 |
| 総括および結論 .....         | 29 頁 |
| 謝辞 .....              | 31 頁 |
| 引用文献 .....            | 32 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に発表した。

1. Noriaki Kyogoku, Hiroaki Ikeda, Takahiro Tsuchikawa, Takehiro Abiko, Aki Fujiwara, Takehiro Maki, Yoshiyuki Yamamura, Masaomi Ichinokawa, Kimitaka Tanaka, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Shinichi Kageyama, Hiroshi Shiku, Satoshi Hirano

Time-dependent transition of the immunoglobulin G subclass and immunoglobulin E response in cancer patients vaccinated with cholesteryl pullulan (CHP)-MAGE-A4

Oncology Reports, 28 • 705-710, 2015

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Noriaki Kyogoku, Masaki Miyamoto, Aki Kuroda, Masaomi Ichinokawa, Kimitaka Tanaka, Takahiro Tsuchikawa, Satoshi Hirano, Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Hiroshi Shiku, Satoshi Kondo

Antibody responses against MAGE-A4 in CHP-MAGE-A4 vaccinated patients

第 69 回日本癌学会学術総会，2010 年 9 月 24 日，大阪

2. Noriaki Kyogoku, Takahiro Tsuchikawa, Masaki Miyamoto, Takehiro Abiko, Aki Kuroda, Takehiro Maki, Yoshiyuki Yamamura, Satoshi Hirano, Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Hiroshi Shiku, Satoshi Kondo

The importance of IgG subclass and IgE response in CHP-MAGE-A4 cancer vaccination.

第 17 回日本遺伝子治療学会年次学術集会，2011 年 7 月 16 日，福岡

3. Noriaki Kyogoku, Takahiro Tsuchikawa, Masaki Miyamoto, Takehiro Abiko,  
Aki Kuroda, Takehiro Maki, Yoshiyuki Yamamura, Satoshi Hirano, Satoshi Kondo,  
Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Hiroshi Shiku

The importance of IgG subclass and IgE response in CHP-MAGE-A4 cancer  
vaccination

第 70 回日本癌学会学術総会，2011 年 10 月 5 日，名古屋

4. 京極 典憲，土川 貴裕，宮本 正樹，安孫子 剛大，黒田 晶，真木 健  
裕，山村 喜之，田中 公貴，市之川 正臣，平野 聡，池田 裕明，影山  
慎一，珠玖 洋，近藤 哲

CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法における IgG サブクラスおよび IgE 抗体反  
応の重要性についての検討

第 112 回日本外科学会定期学術集会，2012 年 4 月 12 日，千葉

## 緒言

難治性・再発性悪性腫瘍に対する集学的治療成績を改善するため、宿主の免疫反応を利用した治療法が注目され、1970年代より様々ながん免疫療法が開発されてきた。1991年に Boon T ら<sup>1</sup>により T リンパ球に認識される腫瘍抗原が同定されると、これらを抗原として投与する「がんワクチン療法」の開発が進み、これまでに多くの臨床試験が行われてきた。しかし、腫瘍抗原に特異的な免疫反応は高率に誘導されるものの、臨床的著効例はまれであり期待される効果は得られていない<sup>2,3</sup>。

がんワクチン療法の効果が乏しい原因として、Human leukocyte antigen (HLA) class I を介する抗原提示機構の抑制<sup>3</sup>や、投与された腫瘍抗原に対する免疫不応性<sup>5</sup>、腫瘍特異的 cytotoxic T lymphocytes (CTL) の分化障害<sup>6</sup>、制御性 T 細胞による CTL の不活性化<sup>7</sup>、Th1 / Th2 バランスの不均衡<sup>8</sup>など様々な要因が報告されているが未だ充分には解明されていない。したがって、がんワクチン療法の治療効果を改善させるためには、がんワクチン投与により誘導される免疫反応の詳細な機序を解明する必要がある。

抗腫瘍効果をもたらす CTL の活性化には T cell helper (Th) の活性化が必要であるが、Th の機能は多岐にわたりサイトカイン環境によっては腫瘍免疫を抑制することもある。Th には Th1 型と Th2 型が存在し、Th1 型は腫瘍免疫を含む細胞性免疫反応および B cell からの Immunoglobulin G (IgG) 1, IgG2, IgG 3 の産生に関与し腫瘍免疫を活性化する。一方、Th2 型はアレルギー反応を含む液性免疫反応、および IgG4, Immunoglobulin E (IgE) の産生に関与する<sup>9,10</sup>。2013年に Karagiannis P ら<sup>11</sup>は、悪性黒色腫患者における IgG4 の存在が腫瘍免疫を抑制し生存率を下げることを報告した。さらに、IgG4 産生を誘導する Th2 優位な環境が腫瘍免疫を抑制することを指摘しており、Th1 / Th2 バランスは抗腫瘍効果に関与する重要な因子として注目されている。Th1 / Th2 バランスは、間接的ではあるが IgG サブクラスおよび IgE 抗体を検出することで簡便に評価が可能であり、これら进行评估すること

は複雑な腫瘍免疫の解明への一助となると考える<sup>12-15</sup>.

本研究は、Melanoma antigen-A4 (MAGE-A4) とコレステリル置換基プルラン (Cholesteryl pullulan: CHP) の複合体 (CHP-MAGE-A4) を用いたがんワクチン療法により誘導される免疫反応と、臨床効果の関連について検証することを目的とし、第 I 相臨床試験に登録された 9 症例を対象に以下の 4 項目について検討した。(1) 今回のがんワクチン療法が成立するための必要条件である切除検体での MAGE-A4 と HLA class I の発現を確認し、その発現形式と臨床効果について検証すること。(2) がんワクチン療法による免疫反応誘導の有無を検証するために、ワクチン投与前後の血清における抗 MAGE-A4 特異的な抗体反応の推移を解析すること。(3) MAGE-A4 における CTL および helper エピトープに関する報告は散見されるものの抗体エピトープに関する報告はないため、MAGE-A4 の抗原性を解明の一助とするべく、抗 MAGE-A4 特異的な抗体反応が陽性であった血清を用いて抗体エピトープの検索を行うこと。(4) 解明すべき腫瘍免疫の機序の一つである CTL の活性化に関与する Th に着目し、がんワクチン投与を受けた患者の Th1 / Th2 バランスの変化と、それに伴う臨床的影響について解析すること。以上の解析を行うことによりがんワクチン投与により誘導される免疫反応の詳細な機序を検証し、以下の結果が得られた。①MAGE-A4・HLA class I の免疫染色態度と抗腫瘍効果に有意な相関は認めなかった。②抗 MAGE-A4 抗体価の上昇は 7/9 例と高率に認められたが、抗体反応の有無と抗腫瘍効果に有意な相関は認めなかった。③MAGE-A4 の抗体エピトープが含まれる 2 領域 (AA22-51, AA232-251) を同定した。④複数回のワクチン投与後に Th2 系抗体価が陽転化した症例が存在した。さらに、これらの症例中には Th2 系抗体価の上昇と同時期に、病勢の増悪や有害事象が出現するといった特徴的な臨床経過を認めた症例が含まれており、Th2 系反応の陽転化が腫瘍免疫の抑制に関与している可能性が示唆された。

以上より、頻回のワクチン投与は Th2 優位な環境を誘導し免疫状態を抑制する可能性があり注意が必要であると考え。また、IgG サブクラス・IgE 抗体反応は抗腫瘍効果のマーカーのみならず、腫瘍免疫の抑制状態を示す代

理マーカーとしても有用である可能性があり, これらを経時的に測定することは重要であると考えられた.

## 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.

|         |                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------|
| AA      | amino acids                                           |
| BSA     | bovine serum albumin                                  |
| CHP     | cholesteryl pullulan                                  |
| CTA     | cancer/testis antigens                                |
| CTCAE   | common terminology criteria for adverse events        |
| CTL     | cytotoxic T lymphocytes                               |
| DMSO    | dimethyl sulfoxide                                    |
| ELISA   | enzyme-linked immuno-sorbent assay                    |
| Fmoc    | N-(9-fluorenyl)- methoxycarbonyl                      |
| HIV     | human immunodeficiency virus                          |
| HLA     | human leukocyte antigen                               |
| IgE     | immunoglobulin E                                      |
| IgG     | immunoglobulin G                                      |
| IL      | interLeukin                                           |
| MAGE-A4 | melanoma antigen-A4                                   |
| MHC     | major histocompatibility complex                      |
| mRECIST | modified response evaluation criteria in solid tumors |
| NIH     | national institutes of health                         |

|     |                           |
|-----|---------------------------|
| OD  | optical density           |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PD  | progressive disease       |
| SD  | standard deviation        |
| SD  | stable disease            |
| Th  | T helper                  |

## 実験方法

### 【臨床研究デザインと治療プロトコール】

CHP-MAGE-A4 を用いたがんワクチン療法の安全性，免疫反応誘導，臨床効果を評価する目的で，「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（第 I + II 相試験）」（UMIN 登録番号：UMIN000001999）を行った．本研究は「北海道大学動物実験に関する規定（承認番号：08-0476）」に従って実施した．

#### 1. 患者選択基準

主な患者選択基準は，(1) 癌腫は問わず標準治療に不応性の局所進行または転移・再発例であること，(2) 腫瘍細胞が MAGE-A4 抗原を発現していること，(3) 前治療（手術，放射線治療，化学療法）終了後 4 週間以上経過していることとした．HIV 抗体陽性例，重複癌例，自己免疫疾患例は除外した．

#### 2. 投与スケジュール

CHP-MAGE-A4 ワクチンは 2 週間毎に計 6 回皮下注射にて投与した．第 I 相部では 3 名ずつを 3 つの group に登録し用量漸増試験を行った．各 group の臨床研究薬および投与量はそれぞれ group1: MAGE-A4 100  $\mu$ g + CHP 1.2 mg, group2: CHP-MAGE-A4 300  $\mu$ g + CHP 3.6 mg, group3: CHP-MAGE-A4 300  $\mu$ g + CHP 3.6 mg + OK-432（中外製薬）0.5 KE であり，OK-423 は toll-like receptor-4 を介し抗原提示細胞を活性化する免疫アジュバントとして投与した<sup>16, 17</sup>．

### 3. 評価項目

主要評価項目は安全性および投与推奨量の評価とし, 副次評価項目は免疫学的および臨床的反応の評価とした. 有害事象の評価は CTCAE v3.0 を用いて評価した<sup>18</sup>. 免疫学的モニタリングは患者血清を用いた ELISA 法にて行った. 臨床反応は mRECIST 分類に準じて評価した<sup>19</sup>.

## 【実験材料】

### 1. 腫瘍組織

ホルマリン固定した各登録症例の切除標本からパラフィン包埋組織切片を作成し, 使用した. 全組織切片は解析まで 4°C で保存した.

### 2. 血清

ワクチン投与前およびワクチン投与 2 週間後ごとに採取した患者血液から血清成分を分離し, 使用した. 全血清は解析まで -80°C で保存した.

## 【実験試薬】

### 1. CHP-MAGE-A4 ワクチン

MAGE-A4 抗原は癌精巣抗原 (CTA) に属する腫瘍抗原である<sup>20, 21</sup>. CTA とは各種癌細胞, および正常組織では生殖細胞にのみ発現しているタンパクである. 生殖細胞は HLA class I 分子を発現していないため, がんワクチン療法は正常細胞に影響を及ぼすことなく, CTA を発現する腫瘍細胞を特異的に認識し攻撃する. MAGE-A4 は様々な癌種に広く発現することから標的

抗原として有用であることが報告されている<sup>22-30</sup>.

CHP は MAGE-A4 などの腫瘍抗原と混和すると腫瘍抗原を包埋し, 50-100 nm 程度のナノ複合体を形成することで MHC class II 経路に加え, 外来性抗原投与では困難であるとされてきた MHC class I 経路への抗原提示も可能とした新規抗原蛋白デリバリーシステムである<sup>14, 15, 31, 32</sup>.

三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座より供与された MAGE-A4 リコンビナントタンパクと CHP の複合体 (CHP-MAGE-A4) をワクチンとして使用した. MAGE-A4 タンパクは解析まで -80℃ で保存した.

## 2. MAGE-A4 タンパクのオーバーラッピングペプチド

MAGE-A4 は 317 のアミノ酸からなるタンパク質である. MAGE-A4 における抗体エпитオプの検索を行うために, MAGE-A4 の全アミノ酸配列を含む 20 mer または 16 mer からなる 31 種類のオーバーラッピングペプチドを合成した (p2-21, p12-31, p22-41, p32-51, p42-61, p52-71, p62-81, p72-91, p82-101, p92-112, p102-121, p112-131, p122-141, p132-151, p142-161, p152-171, p162-181, p172-191, p182-201, p192-211, p202-221, p212-231, p222-241, p232-251, p242-261, p252-271, p262-281, p272-291, p282-301, p292-311, p302-317).

ペプチドの合成は Fmoc 法による標準的な固相法で合成し (Sigma-Aldrich japan). 全ペプチドは DMSO にて 10 mmol/l に希釈し -80℃ で保存した.

## 3. 抗体

腫瘍細胞における MAGE-A4 の発現を検出するために行った免疫組織化学染色の一次抗体として, MAGE-A4 リコンビナントタンパクにて免疫されたマウスより生成されたモノクローナル抗体である MCV-1 を使用した. 同

抗体は三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座より供与された。腫瘍細胞における HLA class I 分子の発現を検出するために行った免疫組織化学染色の一次抗体として、抗 HLA class I Heavy Chain (HLA-A, HLA-B, HLA-C) 抗体である EMR8-5 (Hokudo) を使用した。MAGE-A4 および HLA class I 分子の検出のために行った免疫組織化学染色の二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗マウス/ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Histfine Simple Stain MAXPO, Nichirei) を使用した。

血清中の抗 MAGE-A4 特異的抗体反応の検証および MAGE-A4 の抗体エпитオプの検索のために行った ELISA 法では、一次抗体として採取した患者血清を使用した。二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG (H+L chain) ヤギ・ポリクローナル抗体 (MBL) を使用した。

血清中の抗 MAGE-A4 特異的 IgG サブクラス抗体反応の検証のために行った ELISA 法では、一次抗体として採取した患者血清を使用した。二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG (H+L chain) ヒツジ・ポリクローナル抗体 (The Binding Site) をそれぞれ使用した。

血清中の抗 MAGE-A4 特異的 IgE 抗体反応の検証のためにおこなった ELISA 法では、一次抗体として採取した患者血清を使用した。二次抗体として抗ヒト IgE ウサギ・ポリクローナル抗体 (Dako) を、また、三次抗体として HRP 標識抗ウサギ免疫グロブリン ヤギ・ポリクローナル抗体 (Dako) をそれぞれ使用した。

## 【実験条件と判定基準】

### 1. 腫瘍細胞における MAGE-A4 の検出

腫瘍細胞中の MAGE-A4 発現形式と臨床効果の関連性を検証するために、組織切片を用い免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色はストレプト

アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法にて行った。予備実験として行った Western Blotting 法にて、ヒト肺癌細胞株である PC10 は MAGE-A4 発現が陽性であることを確認しており、ヒト精巣組織と PC10 を陽性対照として用いた。免疫染色手技および抗体の非特異的染色の有無を確認するために、陰性対照として Antibody Diluent および Protein Block Serum-Free (Dako) にて 20 倍に希釈した mouse isotype IgG1 and IgG2a (Dako) で染色したものを使用し染色がないことを確認した。

以下に実験条件を示す。まずパラフィン包埋した組織から作製した薄切切片を 70℃で 15 分間処理した後、キシレンにて脱パラフィン、エタノールにて親水化、純水にて洗浄した。その後 pH 6.0 のクエン酸緩衝液に浸し、圧力鍋を用いて最大圧力で 7 分間処理し抗原の賦活化を行った。さらに純水にて洗浄後、3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 入りメタノールにて内因性ペルオキシダーゼの不活性化をおこなった。次に純水にて洗浄後、High-wash-PBS-T (pH 7.7 のリン酸緩衝生理食塩水 (Wako) に、0.44 mol/l の NaCl および Tween20 (Wako) を添加した洗浄液) で洗浄し、一次抗体 (MCV-1 2.8 mg/ml) を抗体希釈用緩衝液 (Antibody Diluent) および非特異反応ブロッキング試薬 (Protein Block Serum-Free, Dako) にて 2000 倍希釈し 4℃で一晩反応させた。続いて High-wash-PBS-T にて洗浄後、二次抗体を 30 分室温で反応させた。さらに High-wash-PBS-T にて洗浄後、peroxidase substrate kit 3,3'-diaminobenzidine (Histofine SAB-PO kit; Nichirei) にて発色した。最後にヘマトキシリンを使用して核染色を施行したのち、カバーガラスで被覆した。

染色された細胞が確認できた場合は、陽性細胞の多寡に関わらず“陽性”と判定した。また、陽性細胞数の多い 5 視野の細胞数をカウントし陽性細胞の局在別 (核, 細胞質, 核と細胞質) の比率, および陰性細胞の比率を算出した。

## 2. 腫瘍細胞における HLA class I 分子の検出

HLA class I 分子の発現強度と臨床効果の関連性を検証するために、各症

例のパラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学染色を行った。予備実験として行った EMR8-5 (Hokudo) を用いた Western Blotting 法により、ヒト肺癌細胞株である PC10 は HLA class I の発現が陽性、LCD は弱陽性であることを確認した。よって、PC10 を陽性対照として、また、ヒト精巣組織を陰性対照として、また、弱発現の指標として LCD を用いた。一次抗体に EMR8-5 (Hokudo) を用い、Antibody Diluent (Dako), Protein Block Serum-Free (Dako) および 10 % ヤギ血清 (Histofine SAB-PO [R] kit, Nichirei) の 3 種等量混合液にて 2000 倍希釈し、使用した。その他の実験条件は前述の“腫瘍細胞における MAGE-A4 の検出”と同様の条件で行った。

正常上皮と腫瘍細胞を比較することで HLA class I の発現強度を以下のように分類した。染色強度が正常上皮に比し腫瘍細胞で強い場合：(+++), 染色強度が正常上皮と腫瘍細胞で同等の場合：(++), 染色強度が正常上皮に比し腫瘍細胞で弱い場合：(+), 腫瘍細胞で染色を認めない場合：(-)。組織切片中の正常上皮部分が含まれていない場合は内皮細胞で代用した。NIH により開発された画像処理ソフトである Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用い、切片中の面積を測定することで各発現強度別の比率を測定した。

### 3. MAGE-A4 タンパクに対する抗体反応の検出

血清中の抗 MAGE-A4 特異的抗体反応を ELISA 法にて検出した。MAGE-A4 リコンビナントタンパクを PBS にて 20 ng/50  $\mu$ l/well に希釈し、immunoplate (Nunc) に添加後 4°C で一晩固相化した。PBS-T (0.05 % Tween20 (Sigma-Aldrich Japan) 含有の PBS) にて洗浄後、1 % BSA 含有 PBS を 200  $\mu$ l/well 添加し室温で 2 時間反応させブロッキングした。PBS-T にて洗浄後、一次抗体である患者血清を 1 % BSA 含有 PBS にて 400-102400 倍に希釈して 100  $\mu$ l/well 添加し、4°C で一晩反応させた。次に PBS-T で洗浄後、1 % BSA 含有 PBS にて 4000 倍に希釈した二次抗体を 100  $\mu$ l/well 添加し、4°C で 5 時間反応させた。さらに、PBS-T にて洗浄後、TMB Substrate (Pierce) を 100  $\mu$ l/well 添加し、室温で 3 分間反応させ発色させた。次いで 0.18 mol/l の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を 100

μl/well 添加して発色を停止し，分光光度計（SPECTRA MAX 190, Molecular Devices）で OD（波長：450 nm）を測定した．後述の式から算出した OD のカットオフ値は 0.288 であった．全検査時に健常人血清を誤差補正のためのコントロールとして使用し，誤差率により OD 値を補正した．免疫反応誘導の陽性判定基準は以下のとおりである．ワクチン投与前の血清反応が陰性（以下，baseline negative と記載）の症例では，400 倍希釈血清での OD 値が前述のカットオフ値を超えて上昇した場合を陽性，一方，ワクチン投与前の血清反応が陽性（以下，baseline positive と記載）の症例では，400 倍希釈血清での OD 値がワクチン投与前に比し，明らかに上昇した場合をそれぞれ陽性と定義した．カットオフ値はサンプル集団が正規分布すると仮定した場合に 95 % の閾値を超える値を異常値と定義する片側 5 % 検定を用い，下記の式から算出した．

カットオフ値 = 健常人 24 人の血清 400 倍希釈での吸光度の平均値 + 1.645 × SD.

#### 4. MAGE-A4 の抗体エピトープの検出

MAGE-A4 全長タンパクのオーバーラッピングペプチド（20 AA，重複アミノ酸数 10 残基，計 31 本）を用いた ELISA 法にて MAGE-A4 中の抗体エピトープを検索した．MAGE-A4 リコンビナントタンパクを PBS にて 2 ng/50 μl/well に希釈し，immunoplate（Nunc）に添加後，4℃で一晩固相化した．それ以降は前述の“MAGE-A4 タンパクに対する抗体反応の検出”と同様の条件で ELISA 法を行った．

#### 5. MAGE-A4 タンパクに対する IgG サブクラス抗体反応の検出

抗 MAGE-A4 特異的 IgG サブクラス抗体反応を ELISA 法にて検出した．二次抗体に HRP 標識抗ヒト IgG（H+L chain）ヒツジ・ポリクローナル抗体（The Binding Site）を使用した点以外は，前述の“MAGE-A4 タンパクに対

する抗体反応の検出”と同様の条件で ELISA 法を行った．各サブクラス抗体の交差反応が生じないよう希釈倍率を調整した結果, IgG1 : 25600 倍希釈, IgG2 : 12800 倍希釈, IgG3 : 12800 倍希釈, IgG4 : 12800 倍希釈でそれぞれ使用することとした．片側 5%検定を用いて下記の式から算出した各サブクラスの OD のカットオフ値は IgG1 : 0.192, IgG2 : 0.140, IgG3 : 0.076, IgG4 : 0.004 であった．健常人血清中における IgG4 の比率は最も低く, さらに微量である抗 MAGE-A4 特異的 IgG4 抗体を ELISA で検出することは困難であったため, ワクチン投与後にわずかであっても IgG4 抗体反応が認められた場合は陽性と判定した．

カットオフ値 = 健常人 24 人の血清 100 倍希釈での吸光度の平均値 + 1.645 × SD.

## 6. MAGE-A4 タンパクに対する IgE 抗体反応の検出

抗 MAGE-A4 特異的 IgE 抗体反応を ELISA 法にて検出した．一次抗体として 1 %BSA 含有 PBS にて 40-640 倍に希釈した患者血清を使用した．二次抗体は 1 %BSA 含有 PBS にて 1000 倍希釈し, 4°C で 5 時間反応させた．次に PBS-T で洗浄後, 三次抗体を 1 %BSA 含有 PBS にて 100 倍希釈し 100  $\mu$ l/well 添加した．陰性対照には三次抗体として抗マウス免疫グロブリン ヤギ・ポリクローナル抗体を添加した．三次抗体は室温で 40 分間反応させた後, PBS-T で洗浄後に OD を測定した．その他の条件は前述の“MAGE-A4 タンパクに対する抗体反応の検出”と同様に行った．陰性対照において非特異的反応を認めた際は全測定値を破棄した．片側 5 %検定を用いて下記の式から算出した OD のカットオフ値は 0.033 であった．baseline positive の症例は認めず, OD 値が 0.033 以上の場合を陽性と判定した．

カットオフ値 = 健常人 24 人の血清 40 倍希釈での吸光度の平均値 + 1.645 × SD.

## 8. 統計解析

IgG 抗体反応の有無と臨床効果の相関については Fisher の直接確率計算法を行い検討した. 最も優位であった MAGE-A4 の染色部位と臨床効果の相関について, また, HLA class I 分子の発現強度と臨床効果の相関については カイ二乗検定を行い検討した. 全解析には統計ソフト StatMate V (アトムス) を使用し,  $P < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした.

## 実験結果

### 【腫瘍における MAGE-A4 および HLA class I の発現】

免疫組織化学染色結果の代表的切片を図 1 に示す．MAGE-A4 の染色陽性部位は患者ごとに様々であり，核 / 細胞質 / 核と細胞質の 3 つのパターンが認められた．最も優位であった部位の内訳は，細胞質：6 例（67%），核と細胞質：1 例（11%），染色陰性：2 例（22%）であり，細胞質が多く染色される傾向がみられた．HLA class I の染色強度は正常上皮と腫瘍細胞を比較することで 3 つの grade（+, ++, +++）に分類した．染色強度の内訳は，+++：1 例（11%），++：4 例（44%），+：4 例（44%）であった．HLA class I の発現が消失した症例は認めなかった．腫瘍細胞中の MAGE-A4 の発現形式を細胞質 / 核と細胞質 / 陰性の 3 群に，また，HLA class I の発現強度を+++ / ++ / +の 3 群にそれぞれ群分けし，また，臨床効果を SD と PD の 2 群に分けた．免疫染色態度と臨床効果の関連性についてカイ二乗検定を行ったが，いずれも有意な相関は認めなかった（MAGE-A4 の発現形式： $P = 0.63$ ，HLA class I の発現強度： $P = 0.29$ ）（表 1）．

図 1 MAGE-A4 および HLA class I の免疫組織化学染色の代表的切片

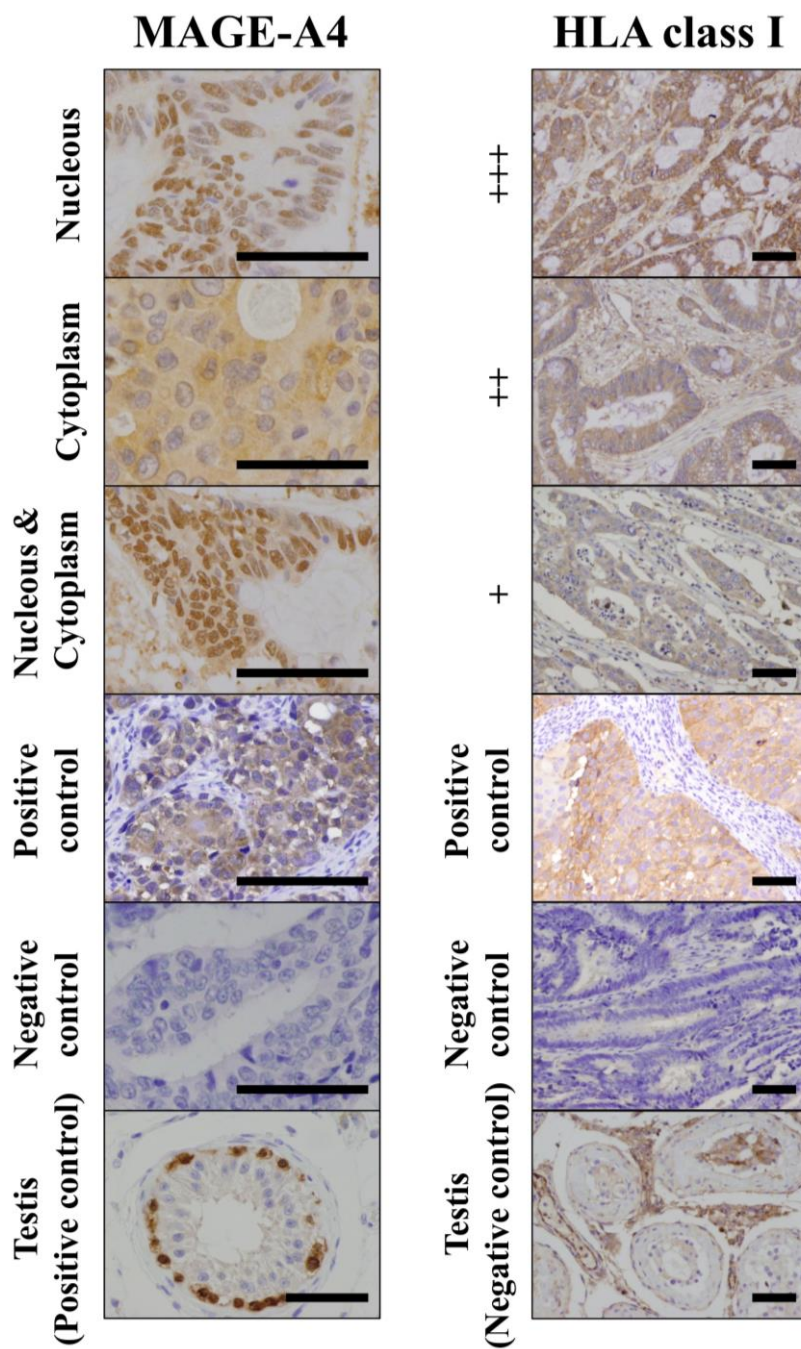


図 1) 腫瘍細胞およびコントロール組織における MAGE-A4, HLA class I の免疫組織化学染色の代表例を示す。陽性対照にはヒト肺癌細胞株である PC10 を使用した。陰性対照として 1 次抗体に mouse isotype IgG を用いた isotype control を示した。ヒト精巣組織は、MAGE-A4 の免疫組織化学染色時は陽性対照として、また、HLA class I の免疫組織化学染色時は陰性対照として使用した。

表 1 患者背景

| Pt No | Age / sex | Cancer type      | Target lesions                                | Immunohistochemical analysis of tumor specimens |                |       |          |                           |     |    |   | Tumor response  | Overall survival      |
|-------|-----------|------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------|-------|----------|---------------------------|-----|----|---|-----------------|-----------------------|
|       |           |                  |                                               | MAGE-A4                                         |                |       |          | HLA class I               |     |    |   |                 |                       |
|       |           |                  |                                               | % positive cells in each localization           |                |       |          | % cells of each intensity |     |    |   |                 |                       |
|       |           |                  |                                               | N <sup>a</sup>                                  | C <sup>b</sup> | N & C | Negative | +++                       | ++  | +  | - |                 |                       |
| 1     | 62 / F    | Colon            | lung nodule, para-aortic LN <sup>c</sup>      | 0                                               | 100            | 0     | 0        | 0                         | 37  | 63 | 0 | SD <sup>d</sup> | 8 m (D <sup>e</sup> ) |
| 2     | 68 / M    | Colon            | chest & abdominal wall nodule                 | 8                                               | 65             | 8     | 19       | 87                        | 13  | 0  | 0 | PD <sup>f</sup> | 5 m (D)               |
| 3     | 61 / M    | Esophageal       | lung nodule, liver nodule, supraclavicular LN | 1                                               | 45             | 0     | 54       | 0                         | 27  | 73 | 0 | PD              | 6 m (D)               |
| 4     | 63 / M    | Colon            | para-tracheal LN, tracheobronchial LN         | 3                                               | 24             | 0     | 73       | 0                         | 22  | 73 | 5 | SD              | 19 m (D)              |
| 5     | 68 / M    | Colon            | lung nodule, liver nodule                     | 0                                               | 100            | 0     | 0        | 12                        | 58  | 30 | 0 | PD              | 6 m (D)               |
| 6     | 65 / F    | Papilla of Vater | local recurrence                              | 1                                               | 89             | 1     | 9        | 0                         | 40  | 60 | 0 | SD              | 5 m (D)               |
| 7     | 62 / M    | Colon            | lung nodule, liver nodule, peritoneal nodule  | 12                                              | 31             | 46    | 11       | 9                         | 91  | 0  | 0 | PD              | 3 m (D)               |
| 8     | 63 / F    | Breast           | lung nodule, liver nodule, mediastinal LN     | 1                                               | 89             | 1     | 9        | 0                         | 93  | 7  | 0 | PD              | 3 m (D)               |
| 9     | 48 / F    | Pancreatic       | primary tumor                                 | 0                                               | 100            | 0     | 0        | 0                         | 100 | 0  | 0 | SD              | 5 m (D)               |

<sup>a</sup> N: Nucleus. <sup>b</sup> C: Cytoplasm. <sup>c</sup> LN: Lymph Node. <sup>d</sup> SD: Stable disease. <sup>e</sup> D: Dead. <sup>f</sup> PD: Progressive disease

<sup>a</sup>N: Nucleus, <sup>b</sup>C: Cytoplasm, <sup>c</sup>LN: Lymph Node, <sup>d</sup>SD: Stable disease, <sup>e</sup>D: Dead, <sup>f</sup>PD: Progressive disease

### 【MAGE-A4 タンパクに対する抗体反応】

MAGE-A4 タンパクに対する IgG 抗体反応を ELISA 法にて検出した。図 2 に示したように、症例 5 はワクチン投与前より抗 MAGE-A4 抗体を有する baseline positive の症例であった。他の 8 例はワクチン投与前には抗 MAGE-A4 抗体を有さない baseline negative の症例であった。これら 8 例中 6 例（症例 2, 3, 4, 6, 7, 9）では、ワクチン投与後に抗体価の上昇がみられた。baseline positive であった症例 5 においてもワクチン投与後に抗体価の上昇を認めた。以上より抗 MAGE-A4 抗体価の上昇は 9 例中 7 例に認められた（group1 : 2 例, group2 : 3 例, group3 : 2 例）。また, group1 の症例に比し CHP-MAGE-A4 の投与量が多かった group2, 3 の症例では, より早期から比較的高い抗体価の上昇がみられる傾向にあった。IgG 抗体価について上昇有りとしの 2 群に, また, 臨床効果を SD と PD の 2 群に分け, 抗体反応の有無と臨床効果の関連について Fisher の直接確率計算法を行ったが有意な相関は認めなかった ( $P = 0.17$ )。

図 2 MAGE-A4 タンパクに対する抗体反応の推移

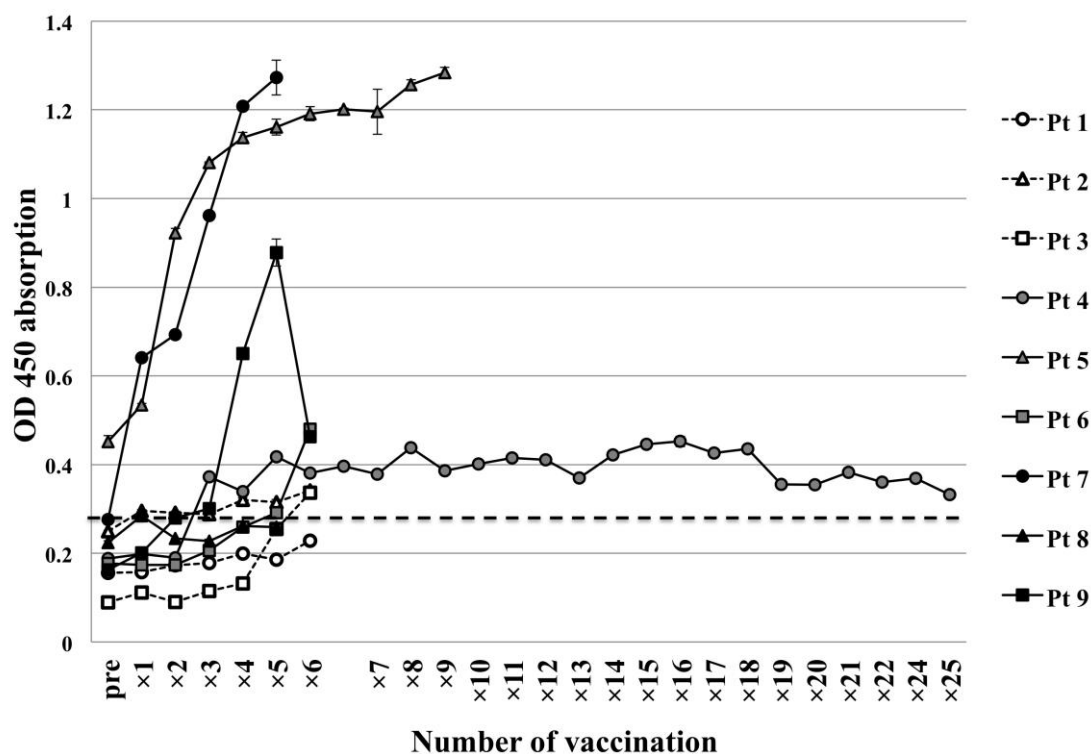


図 2) 各 group の内訳は group1 : Pt 1-3, group2 : Pt 4-6, group3 : Pt 7-9 である。また、カットオフ値 (OD = 0.288) を点線で示す。

### 【MAGE-A4 タンパクにおける抗体エピトープの検出】

MAGE-A4 タンパクにおける抗体エピトープを検索するために、比較的高い抗 MAGE-A4 抗体反応を認めた 5 症例 (症例 3, 4, 5, 7, 9) の血清とオーバーラッピングペプチドを用い ELISA 法を行った。症例 3, 4, 5 は p232-251 (YDGREHTVYGEPRKLLTQDW) に対しても最も強い抗体反応がみられた。一方で、症例 7, 9 はそれぞれ p32-51 (TTEEQEAAVSSSSPLVPGTL) および p22-41 (ALGLVGAQAPTTEEQEAAVS) に強い抗体反応がみられた。以上より複数の患者に共通する, MAGE-A4 の抗体エピトープが含まれる 2 領域 (AA22-51, AA232-251) が同定された (図 3)。



図 4-1 IgG サブクラス, IgE 抗体反応, 腫瘍マーカーの推移 (group1: Pt 1-3)

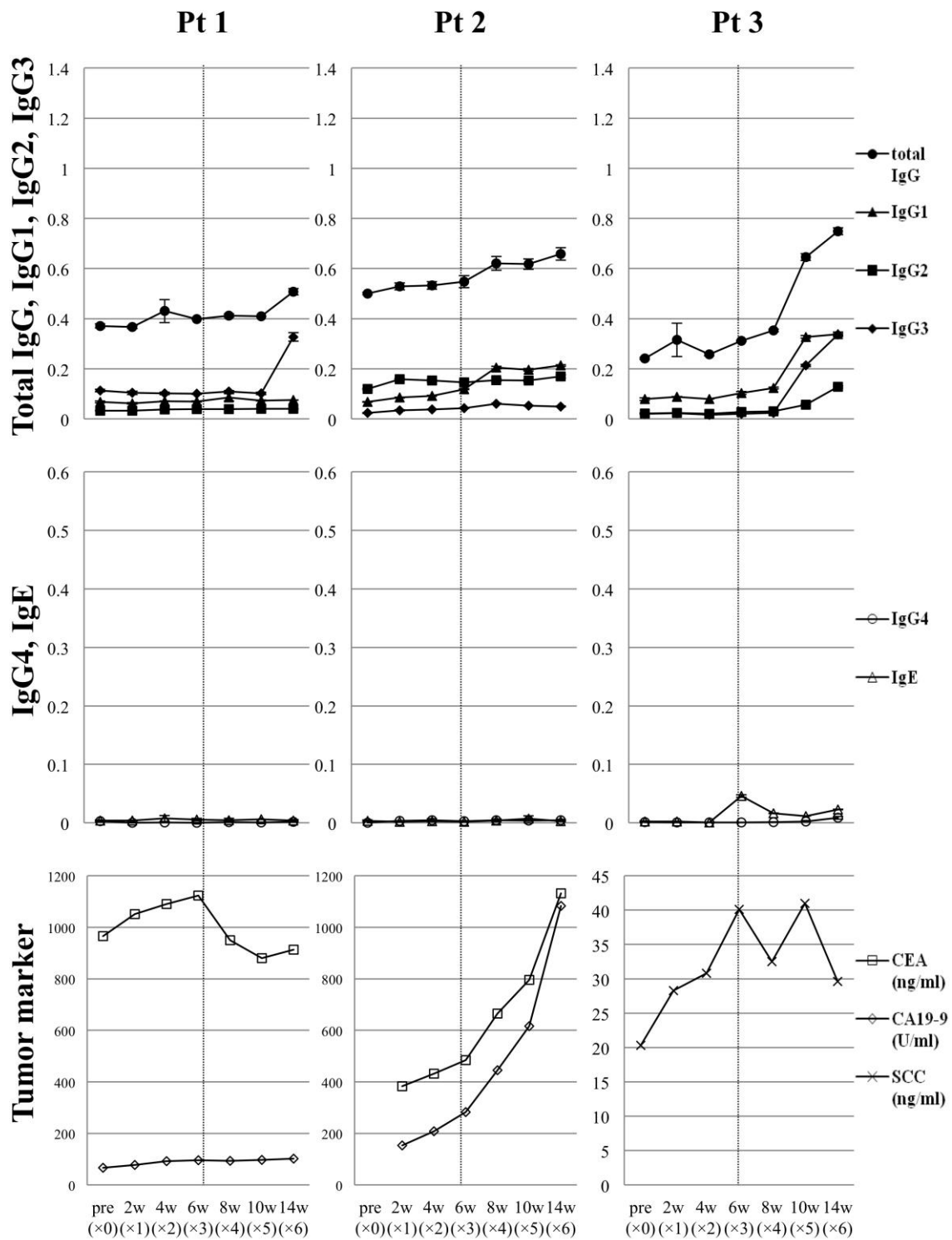


図 4-2 IgG サブクラス, IgE 抗体反応, 腫瘍マーカーの推移 (group2: Pt 4-6)

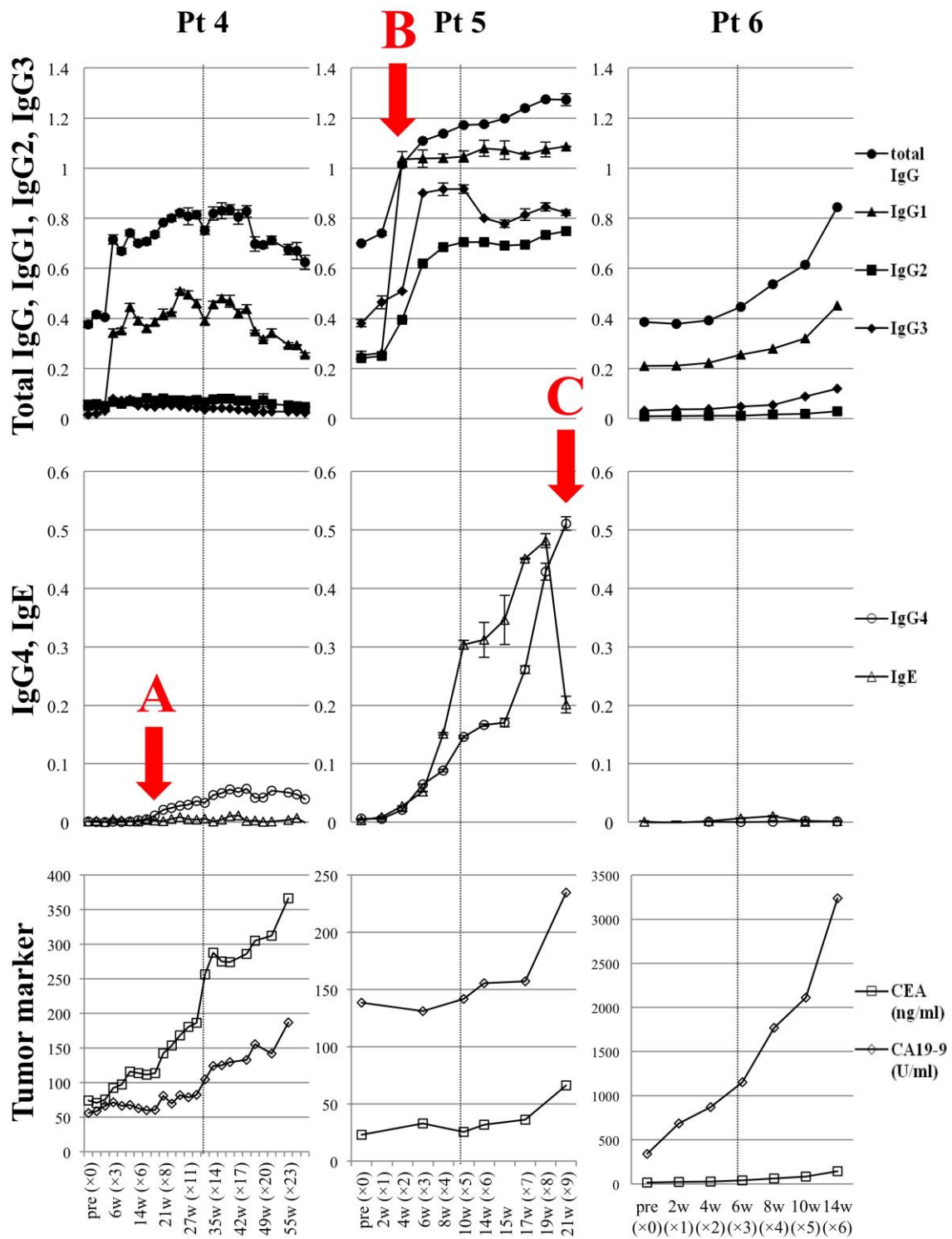


図 4-3 IgG サブクラス, IgE 抗体反応, 腫瘍マーカーの推移 (group3: Pt 7-9)

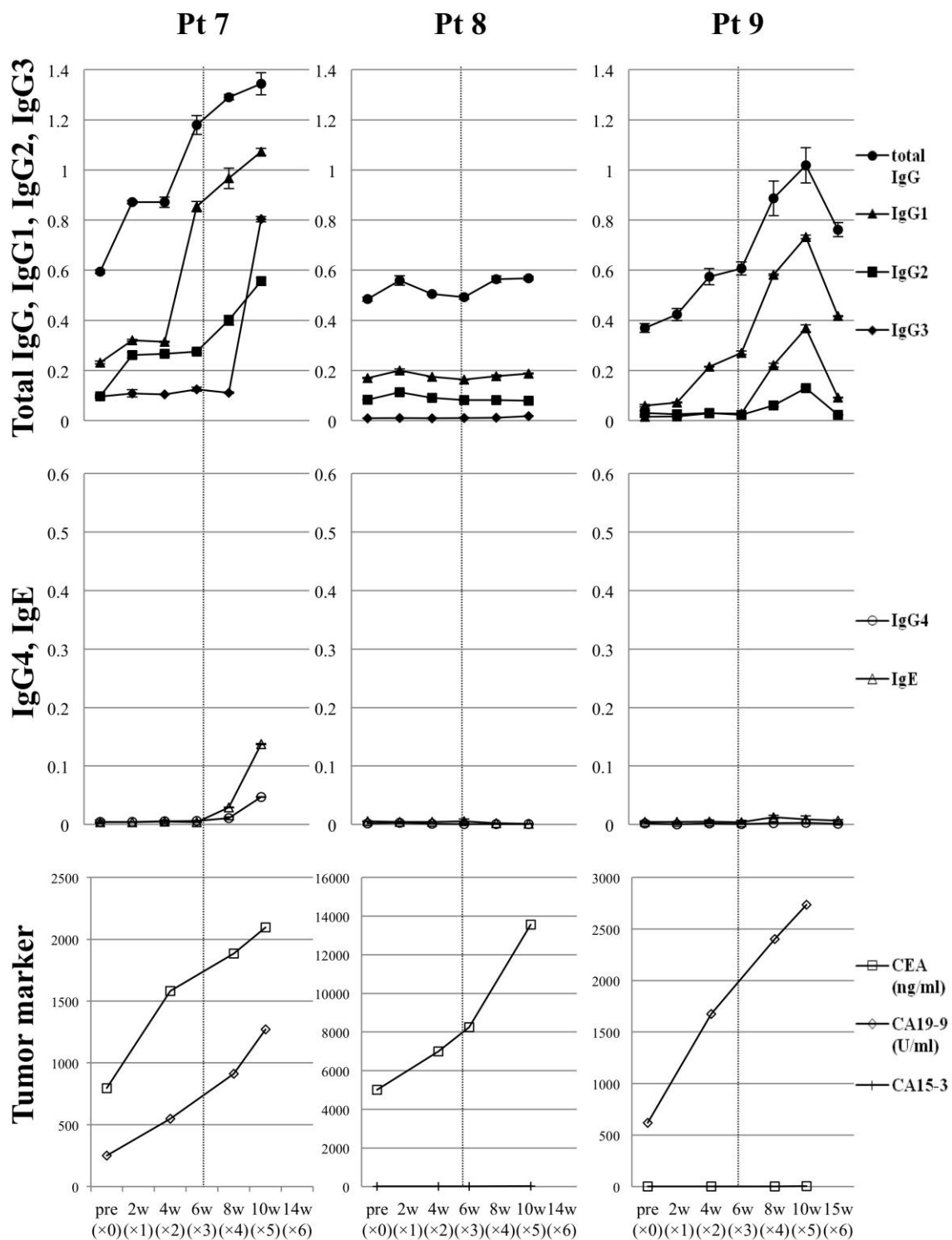


図 4) 各 group ごとに全 9 症例の IgG サブクラス, IgE 抗体反応および腫瘍マーカーの推移を示す. また, 特徴的な臨床経過を認めた時期を A, B, C で示す.

### 【結果のまとめ】

症例数が少ないため統計学的解析は困難であるものの, MAGE-A4 の発現形式や HLA class I の発現率, および免疫反応誘導の有無などの因子と, ワクチン投与前後の腫瘍径を mRECIST に基づき評価した場合の抗腫瘍効果には関連性は認められなかった. 個々の症例について検証すると, 最も長期間 SD を維持した症例 4 では, 腫瘍細胞における MAGE-A4 の発現率は 24% に過ぎず, 抗体反応も高くはなかった. 一方で, 症例 5, 7, 9 はより強い免疫反応を認めたにも関わらず長期生存は得られなかった. MAGE-A4 に特異的な IgG4 または IgE 抗体反応を認めた 4 例中の 2 例 (症例 4, 5) において特徴的な臨床経過 (病勢の増悪, 水疱形成, 即時型アレルギー反応) がみられた (図 4-2, 表 2) .

表 2 MAGE-A4 投与による免疫反応誘導と臨床効果のまとめ

| Pt No | Group & vaccination dose |                               | No. of vaccinations | Adverse events [Grade] | Anti-MAGE-A4 Antibody response |          |                                         |      |      |      |     | Tumor response  | Overall survival      |
|-------|--------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------------|----------|-----------------------------------------|------|------|------|-----|-----------------|-----------------------|
|       |                          |                               |                     |                        | total IgG titers               |          | Rise in titers of IgG subclass & IgE Ab |      |      |      |     |                 |                       |
|       | Group                    | Dose                          |                     |                        | pre                            | post     | IgG1                                    | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgE |                 |                       |
| 1     | 1                        | MAGE-A4 100 µg                | 6                   | ISR <sup>a</sup> [1]   | Negative                       | Negative | -                                       | -    | +    | -    | -   | SD <sup>c</sup> | 8 m (D <sup>d</sup> ) |
| 2     | 1                        | MAGE-A4 100 µg                | 6                   | ISR [1]                | Negative                       | >×400    | +                                       | +    | -    | -    | -   | PD <sup>e</sup> | 5 m (D)               |
| 3     | 1                        | MAGE-A4 100 µg                | 6                   | ISR [1]                | Negative                       | >×400    | +                                       | -    | +    | +    | -   | PD              | 6 m (D)               |
| 4     | 2                        | MAGE-A4 300 µg                | 25                  | ISR [1]                | Negative                       | >×400    | +                                       | -    | -    | +    | -   | SD              | 19 m (D)              |
| 5     | 2                        | MAGE-A4 300 µg                | 9                   | ISR [1], blister [2]   | >×400                          | >×25600  | +                                       | +    | +    | +    | +   | PD              | 6 m (D)               |
| 6     | 2                        | MAGE-A4 300 µg                | 6                   | ISR [1]                | Negative                       | >×400    | +                                       | -    | +    | -    | -   | SD              | 5 m (D)               |
| 7     | 3                        | MAGE-A4 300 µg + OK-432 0.5KE | 6                   | ISR [1]                | Negative                       | >×25600  | +                                       | +    | +    | +    | +   | PD              | 3 m (D)               |
| 8     | 3                        | MAGE-A4 300 µg + OK-432 0.5KE | 6                   | ISR [1]                | Negative                       | Negative | -                                       | -    | -    | -    | -   | PD              | 3 m (D)               |
| 9     | 3                        | MAGE-A4 300 µg + OK-432 0.5KE | 7                   | ISR [1]                | Negative                       | >×1600   | +                                       | -    | +    | -    | -   | SD              | 5 m (D)               |

<sup>a</sup> ISR: Injection site reaction, <sup>b</sup> N.T: Not tested, <sup>c</sup> SD: Stable disease, <sup>d</sup> D: Dead, <sup>e</sup> PD: Progressive disease

## 考察

MAGE-A4 タンパクは MAGE family の一つとして 1997 年に Boon T らによりクローニングされた癌精巢抗原で、多くの癌腫に発現しており免疫治療の標的抗原として有効であるとの報告が多数ある<sup>22-30</sup>が、詳細な機能や細胞内の局在に関しては不明な点が多い。今回の検討においても免疫組織化学染色では MAGE-A4 の染色部位は様々であったが、細胞質が優位に染色された症例が 9 例中 6 例と最も多かった。染色部位が異なることの原因として MAGE-A4 タンパクは特殊な条件下で核-細胞質間を移行する可能性もあり、局在と機能の関連性についてはさらなる解析を要する。

がんワクチン療法における治療反応性が良好であることを示す指標として、腫瘍細胞での HLA class I 分子の高発現<sup>33</sup>や、腫瘍抗原に特異的な抗体反応誘導<sup>31, 33, 34</sup>が報告されている。HLA class I は CTL が腫瘍抗原を認識する際に不可欠な分子であり、本検討の免疫組織化学染色では全例で HLA class I 分子の発現は保たれていた。発現強度は症例により様々であったが発現強度と抗腫瘍効果についての関連性は認めなかった。腫瘍抗原に特異的な抗体反応は 9 例中 7 例と高率に認められたが、抗体反応誘導の有無と抗腫瘍効果についても関連性は認めなかった。特異的な免疫反応は高率に誘導されたものの臨床効果が乏しかった原因として、がんワクチンに対する免疫不応性<sup>5</sup>、腫瘍特異的 CTL の誘導・分化障害<sup>6</sup>、制御性 T 細胞の存在<sup>7</sup>、Th1 / Th2 バランス<sup>8</sup>などの様々な腫瘍免疫回避機構が関与していると思われる。本研究ではその中の Th1 / Th2 バランスに着目し、さらに効率的な免疫治療を開発すべく液性免疫誘導のメカニズムを検証した。

CHP-MAGE-A4 投与により、主に Th1 系の抗体反応である IgG1, IgG2, IgG3 の産生が亢進したが、Th1 系抗体反応が陽性であった症例中には、複数回のワクチン投与後に Th2 系の反応である IgG4 および IgE 抗体価が陽転化した症例が存在した（図 4）。臨床効果は Th2 系反応を認めなかった 5 例の内訳が SD : 3 例, PD : 2 例であるのに対し、Th2 系反応の陽転化を認め

た 4 例では SD : 1 例, PD : 3 例であった (表 2) . 過去のがんワクチン療法に関する報告において, IgG4 抗体価の上昇は IgG1 抗体価の上昇後に遅れて認められること<sup>13</sup>や, 過度の免疫反応誘導がみられた症例で重篤な有害事象がみられること<sup>35</sup>が報告されている. 本研究においても IgG1, IgG2, IgG3 抗体価の上昇後に IgG4 抗体価が上昇し, また, 症例 5 でみられた水疱形成も急激な抗体価の上昇と同時期に認められた. さらに, IgG1, IgG2, IgG3 抗体価の上昇が著明であった症例 5, 7 では IgG4 と IgE の両方の抗体反応が確認され, 症例 4 では IgG4 抗体反応の出現と同時期に腫瘍マーカーが上昇し新規病変が出現するなど, 過去の報告と同様の傾向を呈した. 今回の探索的検討では症例数が少ないため, より厳密で大規模な臨床試験での詳細な確認が必要だが, これらの結果から Th2 系反応の陽転化が病勢進行に関与している可能性が示唆された.

一般的に, IgE は外来性抗原に対するアレルギー反応により誘導される抗体として知られている. また, IgG4 はアレルギー疾患の治療として, 外来性抗原であるアレルゲンを頻回に投与する減感作療法後に誘導される IgE の遮断抗体としての機能を有するとされている<sup>36,37</sup>. 本来はアレルギー反応を起こさない自己抗原を投与するがんワクチン療法によって, アレルギー反応が誘発されたとの報告もあるため<sup>38,39</sup>, がんワクチンの投与回数が増加するに連れアレルギー反応を惹起したり, 減感作療法と類似の免疫寛容状態を誘導し腫瘍免疫を抑制するという可能性は否定できない. したがって, IgG4 抗体反応は腫瘍抗原に対する免疫抑制や, がんワクチンに対するアレルギー反応を検出する鋭敏な代理マーカーである可能性がある.

最後に, MAGE-A4 の抗原性を解明すべくオーバーラッピングペプチドを用いた抗体反応の解析を行った. その結果, HLA type が異なる複数の患者に共通した, 抗体エピトープが含まれる 2 領域 (AA22-51, AA232-251) が同定された. これまでに報告された MAGE-A4 のエピトープには, AA143-151, AA156-163, AA169-177, AA223-231, AA230-239, AA280-299 がある<sup>40-45</sup>が, これらはすべて HLA 拘束性の CTL または helper エピトープである. 本研究で同定した抗体エピトープである AA232-251 は, 過去に報告された

HLA-A0201 拘束性の CTL エピトープである AA230-239<sup>44</sup>を含んでおり, MAGE-A4 タンパク中で抗原性が高い部位であるといえる. AA22-51 はこれまでにエピトープとしての報告はない新規の高抗原性の領域である. 他の CTA である NY-ESO-1 において, 抗体のみならず CTL および helper T cell にも認識される HLA 非拘束性の多重エピトープが同定されており, 実際にペプチドワクチンとして使用されている<sup>46, 47</sup>. 今回の検討で MAGE-A4 においても HLA type の異なる複数の患者血清が共通の部位に反応を示したことから, 今後より多くの症例で抗体, CTL, および helper エピトープを解析することで, 汎用性が高く効率的に免疫反応を誘導する MAGE-A4 ペプチドワクチンを作成できる可能性がある. また, 前述したがんワクチン療法によるアレルギーに関する報告では, アレルギー反応を惹起する特定のアミノ酸配列をペプチドワクチンから排除することでアレルギー反応が消失することが確認されている<sup>38, 39</sup>. 同様に MAGE-A4 タンパク中の IgG4, IgE の抗体エピトープを解明し, その配列を排除することができれば, より安全性の高い MAGE-A4 ペプチドワクチンの作成が可能になると思われる.

## 総括および結論

### ① 本研究から得られた新知見

- ・ CHP-MAGE-A4 ワクチン投与により，抗 MAGE-A4 特異的な抗体反応が高率に誘導された．
- ・ 複数回の CHP-MAGE-A4 ワクチン投与後に，Th2 系抗体反応（IgG4, IgE）が陽転化した症例が存在した．
- ・ MAGE-A4 タンパクにおける，抗体エピトープが含まれる 2 領域（AA22-51，AA232-251）を同定した．

### ② 新知見の意義

- ・ Th2 系抗体反応が陽転化した症例中には，Th2 系抗体価の上昇と同時期に病勢の増悪や，有害事象が出現するといった特徴的な臨床経過を認めた症例が含まれていることから，Th2 系反応の陽転化が腫瘍免疫の抑制に関与している可能性が示唆された．
- ・ 本研究で同定した 2 つの抗体エピトープ領域は HLA 非拘束性であり，さらに，AA232-251 は過去に報告された CTL エピトープと重複していた．したがって，MAGE-A4 タンパク中には抗体・CTL・helper の各エピトープに共通の高抗原性領域（多重エピトープ）が存在する可能性がある．

### ③ 新知見に基づき今後展開されうる研究

- ・ IgG サブクラスおよび IgE 抗体反応が Th2 優位な免疫状態への移行を示す代理マーカーとして使用できれば，今後のがんワクチン療法においてワクチン投与継続の可否の判断材料となりうる．また，IgG サブクラスおよび IgE 抗体反応を経時的な推移を検証することは，腫瘍免疫機序の解明の一助となりうるため有用であると考ええる．

- ・より多くの症例における多重エピトープの解析が進めば、汎用性の高い MAGE-A4 ペプチドワクチンが作成できる可能性がある。また、IgG4, IgE の抗体エピトープを解明し、これらをワクチンの配列から排除することでより安全性の高いワクチンが作成できる可能性がある。さらに、これらの知見は MAGE-A4 のみならず、他の CTA においても応用が可能であると考ええる。

#### ④ 今後の課題

- ・今回の探索的検討では症例数が少ないため、より厳密で大規模な臨床試験を実施し、腫瘍免疫における Th1 / Th2 バランスの意義を詳細に検証する必要がある。また、腫瘍免疫には Th1 / Th2 バランスの他にも、腫瘍特異的 CTL の誘導・分化障害や制御性 T 細胞の存在など、解明すべき腫瘍免疫回避機構が多数存在している。したがって、がんワクチン療法を含むがん免疫療法の治療成績の向上のためには、腫瘍免疫機序の包括的な解明が必要である。

## 謝辞

本研究を行うにあたり, 研究の機会を与えていただき御指導下さいました, 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 II 平野 聡教授に深く感謝いたします. また, 研究チームの指導者として研究方法に際してあらゆる御指導を下さいました, 当時北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 II 助教, 故 宮本 正樹先生に深く感謝いたします.

CHP-MAGE-A4 ワクチンと抗 MAGE-A4 特異的抗体を快く提供していただいた三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学教室の皆様には, 研究手法の御指導いただき感謝いたします.

免疫組織染色法の技術的な助言をいただいた志田 啓氏および実験試薬の準備に協力していただいた斉藤 直美氏に感謝の意を表します.

## 引用文献

1. Bruggen, P. et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647 (1991).
2. Rosenberg, S.A., Yang, J.C. & Restifo, N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909-915 (2004).
3. Itoh, K., Yamada, A., Mine, T. & Noguchi, M. Recent advances in cancer vaccines: an overview. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 39, 73-80 (2009).
4. Jäger, E. et al. Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 71, 142-147 (1997).
5. Dunn, G.P. et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat. Immunol.* 6, 722-729 (2005).
6. Speiser, D.E. et al. Rapid and strong human CD8<sup>+</sup> T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J. Clin. Invest.* 115, 739-746 (2005).
7. Nishikawa, H. et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201, 681-686 (2005).
8. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8, 223-246 (2003).
9. Romagnani, S. Short analytical review of TH1 and TH2 in human diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80, 225-235 (1996).
10. Shaw, D.R., Khazaeli, M.B. & LoBuglio, A.F. Mouse/human chimeric antibodies to a tumor-associated antigen: biologic activity of the four human IgG subclasses. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1553-1559 (1988).
11. Karagiannis, P. et al. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in

- melanoma. *J. clin. Invest.* 123, 1457-1474 (2013).
12. Mine, T. et al. Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccinated with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin. Cancer Res.* 10, 929-937 (2004).
  13. Ullenhag, G.J. et al. Induction of IgG subclass responses in colorectal carcinoma patients vaccinated with recombinant carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 62, 1364-1369 (2002).
  14. Aoki, M. et al. Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. *Vaccine* 27, 6854-6861 (2009).
  15. Kageyama, S. et al. Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan nanogel. *Cancer Sci.* 99, 601-607 (2008).
  16. Okamoto, M. et al. Expression of toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Res.* 64, 5461-5470 (2004).
  17. Nakahara, S. et al. Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. *Cancer Res.* 63, 4112-4118 (2003).
  18. Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE). JCOG (Japan Clinical Oncology Group). 2004 Oct.
  19. Wolchok, J.D. et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin. Can. Res.* 15, 7412-7420 (2009).
  20. Plaen, E.D. et al. Alternative promoters of gene MAGE4a. *Genomics* 40,

305-313 (1997).

21. Scanlan, M.J. et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immuno. Reviews* 188, 22-32 (2002).
22. Resnick, M.B. et al. Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J. Cancer* 101, 190-195 (2002).
23. Yakirevich, E. et al. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin. Can. Res.* 9, 6453-6460 (2003).
24. Tajima, K. et al. Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer* 42, 23-33 (2003).
25. Prasad, M.L. et al. Expression and significance of cancer/testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head & Neck* 28, 1053-1057 (2004).
26. Li, M. et al. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin. Can. Res.* 11, 1809-1814 (2005).
27. Gure, A.O. et al. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin. Can. Res.* 11, 8055-8062 (2005).
28. Peng, J.R. et al. Expression of cancer/testis antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Letters* 219, 223-232 (2005).
29. Barrow, C. et al. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin. Can. Res.* 12, 764-771 (2006).
30. Akcakanat, A. et al. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A, and SSX proteins in esophageal cancer: implications for immunotherapy. *Int. J. Cancer* 118, 123-128 (2006).

31. Kageyama, S. et al. 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, 246-255 (2013).
32. Gu, X.G. et al. A novel hydrophobized polysaccharide/oncoprotein complex vaccine induces in vitro and in vivo cellular and humoral immune responses against HER2-expressing murine sarcomas. *Cancer Res.* 58, 3385-3390 (1998).
33. Saito, T. et al. 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).
34. Matsueda, S. et al. Humoral immune responses to CTL epitope peptides from tumor-associated antigens are widely detectable in humans: a new biomarker for overall survival of patients with malignant diseases. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 68-76 (2013).
35. Yoshida, K. et al. Characteristics of severe adverse events after peptide vaccination for advanced cancer patients: Analysis of 500 cases. *Oncol. Rep.* 2, 57-62 (2011).
36. Jutel, M., & Akdis, C.A. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 66, 725-732 (2011).
37. Aalberse, R.C., Stapel, S.O., Schuurman, J. & Rispens, T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin. Exp. Allergy* 39, 469-477 (2009).
38. Yamada, A. et al. Nonmutated self-antigen-derived cancer vaccine peptides elicit an IgE-independent but mast cell-dependent immediate-type skin reaction without systemic anaphylaxis. *J. Immunol.* 176, 857-863 (2006).
39. Ohkouchi, S. et al. Non-mutated tumor-rejection antigen peptides elicit type-I allergy in the majority of healthy individuals. *Tissue Antigens* 59, 259-272 (2002).

40. Miyahara, Y. et al. Determination of Cellularly Processed HLA-A2402-Restricted Novel CTL Epitopes Derived from Two Cancer Germ Line Genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin. Can. Res.* 11, 5581-5589 (2005).
41. Zhang, Y. et al. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-B37 is recognized on human tumors by cytolytic T lymphocytes. *Tissue Antigens* 60, 365-371 (2002).
42. Kobayashi, T. et al. New MAGE-4 antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on HLA-A1 tumor cells. *Tissue Antigens* 62, 426-432 (2003).
43. Naota, H. et al. Generation of peptide-specific CD8<sup>+</sup> T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol. Methods* 314, 54-66 (2006).
44. Duffour, M.T. et al. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 3329-3337 (1999).
45. Ohkuri, T. et al. Identification of novel helper epitopes of MAGE-A4 tumour antigen: useful tool for the propagation of Th1 cells. *Br. J. Cancer* 100, 1135-1143 (2009).
46. Kawabata, R. et al. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int. J. Cancer* 120, 2178-2184 (2007).
47. Kakimi, K. et al. A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *Int. J. Cancer* 129, 2836-2846 (2011).