HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CHP-MAGE-A4がんワクチン投与患者における治療効果予測のためのバイオマーカーの探索 ： 血清中の抗原特異的IgGサブクラスとIgE値推移の臨床的意義についての検討
Author(s)	安孫子, 剛大
Description	配架番号：2357
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12978号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12978
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70256
Type	doctoral thesis
File Information	Takehiro_Abiko.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与患者における治療効果予測のためのバイオマーカーの探索

-血清中の抗原特異的 IgG サブクラスと IgE 値推移の臨床的意義についての検討-

(Research for Biomarker as prediction of the effect in patients receiving CHP-MAGE-A4 Cancer Vaccine

-Examination of clinical significance about the transition of antigen specific IgG subclass and IgE- ）

2018 年 3 月

北海道大学

安孫子 剛大

Takehiro Abiko

学位論文

CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与患者における治療効果予測のためのバイオマーカーの探索

-血清中の抗原特異的 IgG サブクラスと IgE 値推移の臨床的意義についての検討-

(Research for Biomarker as prediction of the effect in patients receiving CHP-MAGE-A4 Cancer Vaccine

-Examination of clinical significance about the transition of antigen specific IgG subclass and IgE- ）

2018 年 3 月

北海道大学

安孫子 剛大

Takehiro Abiko

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・9 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27 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. Takehiro Abiko, Takahiro Tsuchikawa, Kengo Miyauchi, Masataka Wada, Noriaki Kyogoku, Toshiaki Shichinohe, Yoshihiro Miyahara, Shinichi Kageyama, Hiroaki Ikeda, Hiroshi Shiku, Satoshi Hirano

Serum Immunoglobulin E response as a marker for unfavorable prognosis after cholesteryl pullulan(CHP)-MAGE A4 vaccination

Oncology Letters in press

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Takehiro Abiko, Takahiro Tsuchikawa, Masaki Miyamoto, Noriaki Kyogoku, Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Hiroshi Shiku, Satoshi Hirano

The influence of cancer vaccination on the balance of Th1 / Th2 / T reg

第 71 回　日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日-21 日. 札幌

緒言

進行再発性の難治性固形癌に対しては、標準的には外科的治療・化学療法・放射線療法を基軸とした集学的治療が行われているが、依然として根治を得ることは困難であり予後不良である。このような現状の中、癌に対する宿主の免疫反応を利用した癌免疫療法が新しい治療法として研究・開発されてきた。かつて、丹毒に感染した癌患者の腫瘍が縮小したことに発想を得たColeyワクチン[1]や、結核患者に癌の罹患率が低いことに着目した丸山ワクチン[2]のように非特異的免疫反応により腫瘍縮小を目指した報告も見られたが、その効果については現在では疑問が呈されている。

その後、1980年代後半から1990年代前半にRosenberg, S.A.ら[3]による腫瘍浸潤T細胞が癌細胞を排除する働きの解明や、Boon, T.ら[4,5]による細胞傷害性CD8陽性T細胞が認識する癌抗原であるMAGE-1の発見などが契機となり、がんワクチン療法・免疫細胞療法・抗体療法など癌に特異的な免疫を活性化させる腫瘍抗原特異的免疫治療法の開発が進んでいる[6]。これまで、免疫療法は動物実験の領域では腫瘍抗原特異的免疫誘導や抗腫瘍効果が報告されているものの、Rosenberg, S.A.ら[7]の報告によるとヒトを対象にした臨床試験領域では数%の奏効率しか期待できないとされてきた。このような背景から、ヒトを対象とした免疫療法の効果判定は、RECIST法による腫瘍の縮小率の評価だけではなく、ELISA法などによる腫瘍抗原特異的な液性免疫反応の評価や、ELISPOT法などによる腫瘍抗原特異的な細胞性免疫反応の評価も含めて行われるようになってきた。

ヒトにおいて免疫療法の効果が低い原因としては免疫抑制細胞の存在[8]やHLA class I発現レベルの減弱[9]などさまざまな免疫逃避機構の存在が考えられているが、Honjo, T.ら[10]によって免疫機構を負に制御する免疫チェックポイント分子であるPD-1が同定されたことで癌の免疫療法は大きな転換点を迎えている。2000年代に入り、免疫チェックポイント分子を阻害する抗体を投与することで、腫瘍の縮小や転移を抑制する効果がマウスにおいて報告された[11]。抗PD-1抗体は2006年にはアメリカで臨床試験が開始され、その後、日本でも同様の臨床試験が行われた。その効果は、過去30年間の免疫療法のなかで最も高い抗腫瘍活性を示した[12]とされており、臨床で使用され始めている。2017 Gastrointestinal Cancer Sympoium（ACSO-GI 2017）では、切除不能な進行・再発胃癌患者を対象とした、抗ヒトPD-1モノクローナル抗体（一般名：ニボルマブ、商品名：オプシーボ®）の第Ⅲ相臨床試験（ONO-4538-12試験）の結果が報告され、プラセボ群と比較して全生存期間を有意に延長し、死亡リスクを37%減少させたとしている。免疫療法の歴史と分類と図1と図2に示す。

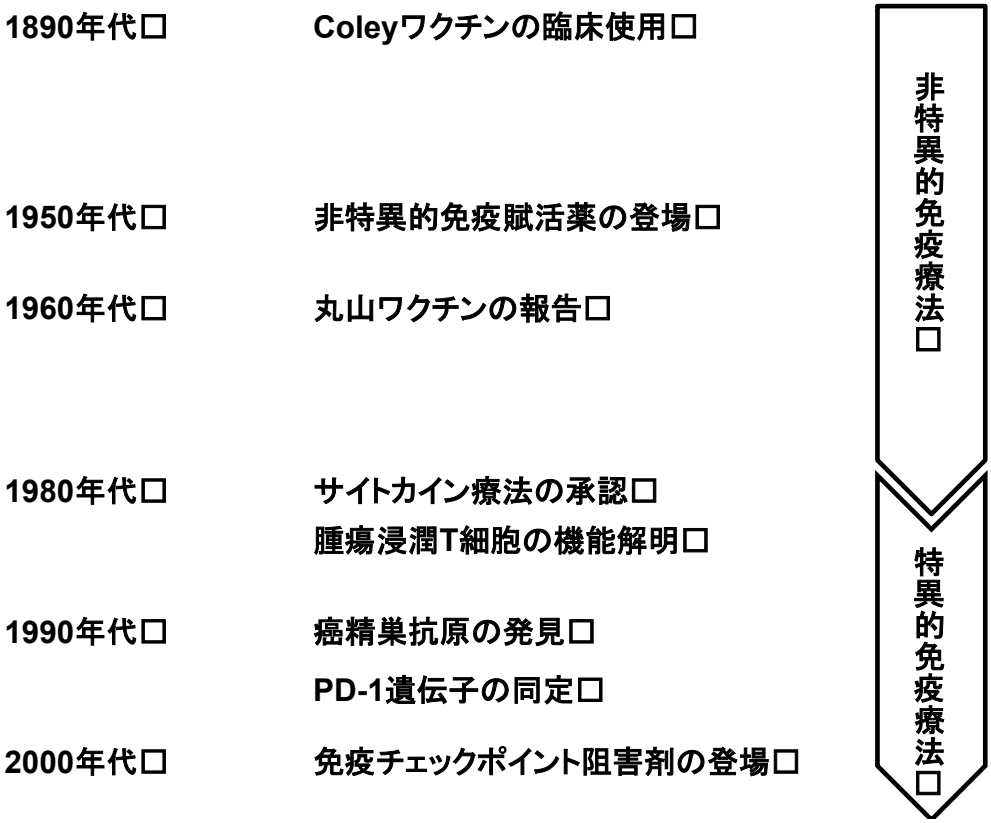

図１　免疫療法の歴史

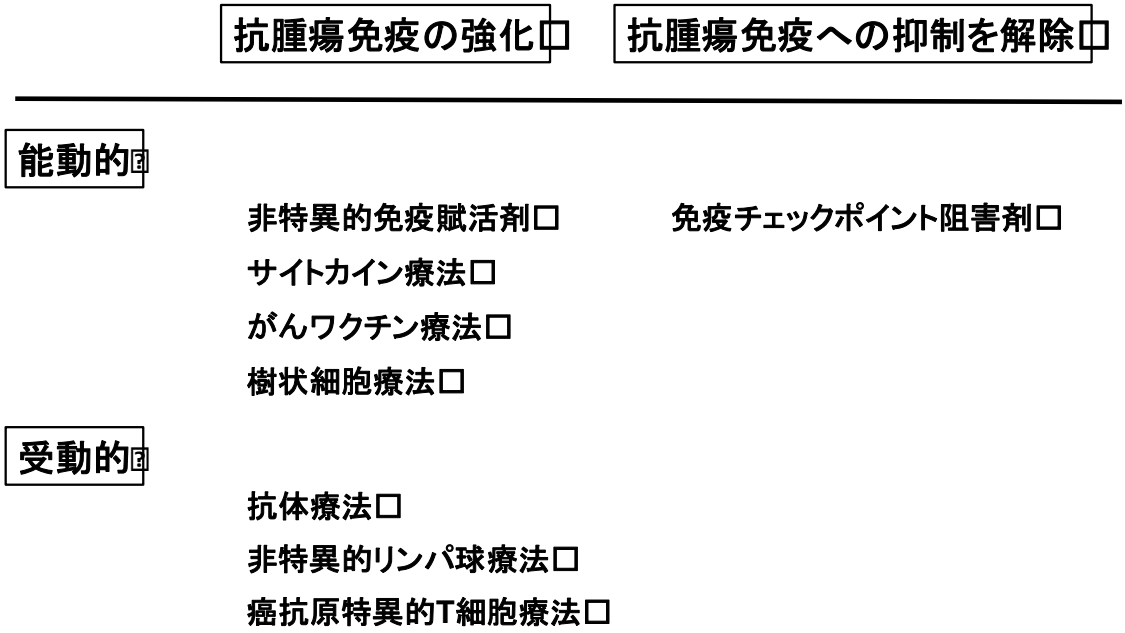

図２　免疫療法の分類

このような現状の中、北海道大学消化器外科学教室 II では 2009 年から癌抗原の一種である MAGE-A4 の全長蛋白を免疫源とした「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」を展開してきた。この臨床試験は第 I + II 相試験であり、がんワクチンの安全性と至適投与量を推定することが主要目的であった。この試験中に、がんワクチン投与前の皮内テストで即時型のアレルギー反応を示した症例を経験したが、この症例では、がんワクチンの投与を重ねる毎に抗原特異的な IgG4 や IgE が上昇していたことが後の血清学的検査で判明した[13]。

同教室では、臨床試験の当初からがんワクチンの治療効果を予測するバイオマーカーを検索してきたが、がんワクチンのバイオマーカーとしては、抗原特異的液性免疫反応を用いている報告は数多く存在するものの、その大部分は免疫源に対する IgG 抗体反応のみの評価であった。前述のように試験中に即時型アレルギー反応を示した症例を経験したことから、IgG4 を含めた IgG サブクラスや IgE 抗体に着目し、治療効果を予測するバイオマーカーとしての有用性について検証を行ってきた[13]。これまで、IgG1、IgG2、IgG3 は腫瘍免疫を含む細胞性免疫反応を司る Th1 が優位な際に B 細胞から産生され、一方で IgG4 と IgE はアレルギー反応を含む液性免疫反応が優位な際に B 細胞から産生されることが知られている[14,15]。本研究では、がんワクチン接種患者における抗原特異的液性免疫反応の経時的変化を ELISA 法を用いて測定し、がんワクチン接種が、Th1 に関連する抗体である IgG1、IgG2、IgG3、及び Th2 に関連する抗体である IgG4、IgE に与える影響を評価することを目的とした。

本研究の結果から、全ての MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスと MAGE-A4 特異的 IgE の誘導が確認できた。また、がんワクチン接種後に ELISA の OD 値が統計学的に有意に上昇したものは、IgG1 のみであった。抗原特異的な IgG サブクラス同士の相関関係については、Th1 に関連する抗体である IgG2 と、Th2 に関連する抗体である IgG4 の間に強い正の相関を認め、その相関係数は R=0.808 （$p<0.0001$）であった。すなわち、Th2 に関連する抗体である IgG4 は、Th1 に関連する抗体である IgG2 の誘導の程度に正比例して誘導される可能性が示唆された。また、抗原特異的な液性免疫反応の誘導が確認されたものの、modified RECIST 分類に則った症例ごとの治療効果の評価では、CR や PR は認めず、MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスおよび MAGE-A4 特異的 IgE の陽転化の有無と、治療効果との間には統計学的に有意な相関は認めなかった。さらに、MAGE-A4 特異的抗体の誘導の有無とがんワクチン接種後の生存期間との関係では、IgE が陽転化した 2 例は陽転化しなかった 10 例と比較して有意に生存期間が短かった。抗原特異的な免疫反応が惹起されたにも関わらず治療効果の評価や生存期間に影響を与えなかった原因には、症例数が少数であったことに加えて、抗原特異的液性免疫反応は誘導されたものの、抗原特異的 CTL が誘導されず治療効果を得るには至らなかっ

た可能性や、対象患者が切除不能進行再発癌症例であり、免疫治療単独では病状をコントロールする事がそもそも困難であった可能性がある。今回の CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験において IgE が誘導された結果、生存期間が短くなったのか、もしくは生命予後が短い場合に IgE が誘導されるのかは、現段階では不明である。今回の結果からは、がんワクチン療法中に抗原特異的な IgE の上昇を認めた場合には、癌の病勢進行による全身状態の悪化が示唆され、注意が必要であると言える。

本研究から得られた新知見の一つは、Th1 に関連する抗体である MAGE-A4 特異的 IgG2 と Th2 に関連する抗体である MAGE-A4 特異的 IgG4 が強い正の相関関係を示すことである。この点からは、血清中の MAGE-A4 特異的 IgG2 をモニタリングすることで、今後の MAGE-A4 特異的 IgG4 の誘導の有無を推測する事が可能となると言える。すなわち、血清中の MAGE-A4 特異的 IgG2 の値は、Th1 と Th2 のバランスを見きわめるバイオマーカーとなる可能性がある。もう一つの新知見は、CHP-MAGE-A4 がんワクチン接種患者において、MAGE-A4 特異的 IgE が誘導される症例は、誘導されない症例と比較して接種後の生存期間が有意に短いことである。このことからは、MAGE-A4 特異的 IgE の誘導が、予後予測のバイオマーカーとなる可能性がある。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである

ADCC	antibody dependent cellular phagocytosis
ADCP	antibody dependent cell mediated cytotoxicity
BSA	albumin, from bovine serum
CEA	carcinoembryonic antigen
CD	cluster of differentiation
CHP	cholesteryl pullulan
CR	complete response
CRP	C reactive protein
CT	computed tomography
CTA	cancer testis antigen
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DAB	diaminobenzidine
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
HLA	human histocompatibility leukocyte antigens
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon
IgE	immunoglobulin E
IgG	immunoglobulin G
IHC	immunohistochemistry
IL	interleukin
MAGE	melanoma-associated antigen
MHC	major histocompatibility complex
mRECIST	modified response evaluation criteria in solid tumors
MRI	magnetic resonance imaging
NK	natural killer
OD	optical density
PBS	phosphate-buffered saline
PD	progressive disease

PD-1	Programmed Cell Death-1
PR	partial response
RECIST	response evaluation criteria in solid tumors
SD	stable disease
TCR	T cell receptor
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第 I + II 相試験を行った。

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 がんワクチンは 2 週間毎に計 6 回皮下注射にて投与した。第 I 相試験では 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 group 1 : CHP-MAGE-A4 100μg、group 2 : CHP-MAGE-A4 300μg、group 3 : CHP-MAGE-A4 300μg + OK-432 0.5KE であり、OK-432（中外製薬、東京、日本）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 [16,17]。第 II 相では 9 名全員に CHP-MAGE-A4 300μg + OK-432 0.5KE を投与した。

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 National Cancer Institute (NCI)が主導し世界共通で使用されることを意図して作成された有害事象に関しての評価基準である Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0 を用いて評価した（www.jcog.jp/doctor/tool/CTCAEv4J_20130409.pdf）。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 Cancer Vaccine Clinical Trial Working Group の提言等 [18] に基づき RECIST 分類を変更した modified RECIST 分類で評価した(表 1)。

表 1　modified RECIST 分類

評価□	定義□
CR : Complete response□	**全ての標的病変の消失□**
PR : Pertial response□	**ベースラインの最長径和と比較して標的病変、新規病変、10mm以上に増大した非標的病変の最長径和が30%以上減少□**
SD : Stable disease□	**PRとするには腫瘍の縮小が不十分で、かつPDとするには治療開始以降の最小の最長径和と比較して腫瘍の増大が不十分□**
PD : Progressive disease□	**治療開始以降の最小の最長径和と比較して、標的病変、新規病変、10mm以上に増大した非標的病変の最長径和が20%以上増加**

＊modified RECIST分類では新規病変の出現だけではPDとしない□

[実験対象]

本研究の対象は、「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」に登録された患者のうち、がんワクチンの投与量が CHP-MAGE-A4 300μg で OK-423 0.5E を免疫アジュバントとして投与した 12 例。

[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℃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℃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[19,20]。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障害する。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[21-29]。

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[30-33]。

今回、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 度で保存した。

2. 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。

血清中の MAGE-A4 特異的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、二次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG1, IgG2, IgG3, IgG4（H+L chain）ヤギ・ポリクローナル抗体（MBL、名古屋、日本）を使用した。

血清中の 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、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, Birmingham, England）を使用した。

血清中の MAGE-A4 特異的 IgE 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。二次抗体として抗ヒト IgE ウサギ・ポリクローナル抗体（Dako, Santa Clara, United States）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, Santa Clara, United States）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, Santa Clara, United States）にて 20 倍に希釈した mouse isotype IgG1 and IgG2a（Dako, Santa Clara, United States）で染色したものを使用し染色がないことを確認した。

実験条件を示す。パラフィン包埋した組織から作製した薄切切片を 70 度で 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。純水にて洗浄後、3% H_2O_2 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。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（和光、大阪、日本）に、0.44 mol/l の NaCl および Tween20（和光、大阪、日本）を添加した洗浄液）で洗浄し、一次抗体（MCV-1 2.8mg/ml）を抗体希釈用緩衝液（Antibody Diluent™ Dako, Santa Clara, United States）および非特異反応ブロッキング試薬（Protein Block Serum-Free™ Dako, Santa Clara, United States）にて 2000 倍希釈し 4℃で一晩反応させた。High-wash-PBS-T にて洗浄後、二次抗体を 30 分室温で反応させた。High-wash-PBS-T にて洗浄後、peroxidase substrate kit 3,3’-diaminobenzidine（Histofine SAB-PO kit™ ニチレイバイオサイエンス、東京、日本）にて発色した。ヘマトキシリンを使用して核染色を施行したのち、カバーグラスで被覆した。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。

2. MAGE-A4 タンパクに対する抗体反応の検出

血清中の 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 20ng/50μl/well に希釈し、F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE™（サーモフィッシャーサイエンティフィック、横浜、日本）に添加後 4℃で一晩固相化した。PBS-T（0.05% Tween20（Sigma-Aldrich Japan、東京、日本）含有の PBS）にて洗浄後、1%BSA 含有 PBS を 200μl/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 100-1600 倍に希釈後 100μl/well 添加し 4℃で一晩反応させた。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100μl/well添加し4℃で5時間反応させた。PBS-Tにて洗浄後、Pierce™ TMB Substrate Kit（サーモフィッシャーサイエンティフィック、横浜、日本)）を100μl/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_2SO_4を100μl/well添加し発色を停止し、分光光度計(SPECTRA MAX 190, Molecular Devices®）でOD（波長：450nm）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次のように決定した。がん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、がんワクチン接種6回終了までに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と定義した。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、がんワクチン接種6回終了までに400倍希釈血清のOD値が、がんワクチン投与前と比較して2倍以上に上昇した場合を陽性と定義した。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

3. MAGE-A4タンパクに対するIgGサブクラス抗体反応の検出

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IgG1, IgG2, IgG3, IgG4（H+L chain）ヒツジ・ポリクローナル抗体（The Binding Site, Birmingham, England）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。

前述のIgGの場合と同様に、baseline negative症例の場合は、がんワクチン接種6回終了までにOD値が前述のカットオフ値を越えた場合に陽性と定義し、baseline positive症例の場合は、がんワクチン接種6回終了までにOD値が２倍以上に上昇した場合に陽性と定義した。患者血清の希釈濃度が同じであれば、IgG サブクラスのOD値はIgGのOD値と比較して低値であるので、IgGサブクラスのカットオフ値の算出とがんワクチン接種後の評価にあたっては、100倍希釈血清のOD値で行った。

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

4. MAGE-A4 タンパクに対する IgE 抗体反応の検出

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℃で 5 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、三次抗体を 1%BSA 含有 PBS にて 100 倍希釈し 100μl/well 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。

三次抗体まで使用した影響で無視できないバックグラウンド値が生じたため、IgE の評価には定量よりも定性がふさわしいと判断した。がんワクチン接種 6 回終了までに、がんワクチン接種後の血清の OD 値が、接種前の血清の OD 値と比較して 1.5 倍以上に上昇した場合に陽性と定義した。血清中に存在する IgE は微量であり ELISA で検出することが困難であったため、40 倍希釈血清で評価した。

5. 臨床効果の評価

臨床効果を評価するために、がんワクチン接種前と 4 回目接種終了後に CT 検査を施行した。全ての計測可能な病変は、前述の modified RECIST 分類で評価した。

6. 統計解析

散布図については、Pearson の積率相関係数を使用し、相関係数 R の絶対値が 0≦R＜0.2 の場合は無相関、0.2≦R＜0.4 の場合は弱い相関、0.4≦R＜0.7 の場合は中程度の相関、0.7≦R＜1.0 の場合は強い相関があると判断した。ELISA の結果の各群間の有意差検定については、Kruskal-Wallis test を用いて多群の検定を行い、有意差を認めた場合に post hoc test(Games-Howel)を用いて多重比較検定を行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて描出し、Log-rank 法にて有意差検定を行った。いずれの有意差検定も $p<0.05$ の場合に有意差ありと判定した。IgG 抗体反応や IgE 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。全ての統計解析は、StatView J version 5.0（SAS Institute Inc, NC, USA）と Microsoft Excel 2011（Microsoft, USA）を用いて行った。

実験結果

1. 患者背景

患者背景を表 2 に示す。12 名の対象患者のうち 9 名が男性で 3 名が女性であった。7 名が結腸直腸癌で、乳癌、膵癌、胆管癌、悪性胸膜種、胆嚢癌が 1 名ずつであった。年齢の中央値は 63（34-79）歳であった。

表 2　患者背景

Case	Sex	Age	Tumor type	Anti MAGE-A4 antibody response						Clinical response (mRECIST)	Time after vaccination (days)
				IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE		
Case1	M	62	Colon Ca	+	+	+	+	+	+	PD	96
Case2	F	63	Breast Ca					+		PD	88
Case3	F	48	Pancreas ca	+	+		+			SD	148
Case4	M	79	Bile duct Ca	b		b				SD	470
Case5	M	63	Rectal Ca	+b	+b	+	+b	+		SD	469
Case6	M	58	Mesothelioma	+	+		+	+		SD	509
Case7	M	78	Gallbladder Ca	+	+	+	+b	+		SD	141
Case8	M	34	Rectal Ca	+	b			+		SD	317
Case9	F	63	Colon Ca	b	+		b			SD	255
Case10	M	60	Colon Ca	+	+	+	+	+		PD	257
Case11	M	71	Colon ca	b	+b		b	+	+	PD	105
Case12	M	71	Colon Ca	+	+	+	+	+		PD	167
Positive conversion ratio				66.7% (8/12)	75.0% (9/12)	41.7% (5/12)	58.3% (7/12)	66.7% (8/12)	16.7% (2/12)		

M : Male　F : Female　Ca : Cancer　PD : Progressive disease　SD : Stable disease　+ : Positive reaction　b : Baseline positive

2. MAGE-A4 タンパクに対する IgG サブクラスおよび IgE 抗体反応

がんワクチン接種 6 回を終了した時点での患者血清中の MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスと MAGE-A4 特異的 IgE の陽転化率を図 3 に示す。Th1 に関連する抗体である IgG1、IgG2、IgG3 の陽転化率はそれぞれ、75% （9/12）、41.7%（5/12）、58.3% （7/12）であった。一方で、Th2 に関連する抗体である IgG4 と IgE の陽転化率はそれぞれ、66.7%（8/12）と 16.7% （2/12）であった。Th1 に関連する抗体と Th2 に関連する抗体の両者が共に陽転化したのは 2 症例であった。7 症例で Th1 に関連する抗体のみ陽転化していた。3 症例は Th1 に関連する抗体と Th2 に関連する抗体のどちらも陽転化しなかった。Th2 に関連する抗体のみが陽転化した症例は認めなかった。

また、各 IgG サブクラスについて接種前後の経時的な ELISA の OD 値を

Kruskal-Wallis test を用いて多群の検定を行い、有意差を認めた場合に post hoc test(Games-Howel)を用いて多重比較検定を行ったところ、IgG1 でのみ有意な上昇を認めた。（図 3）。

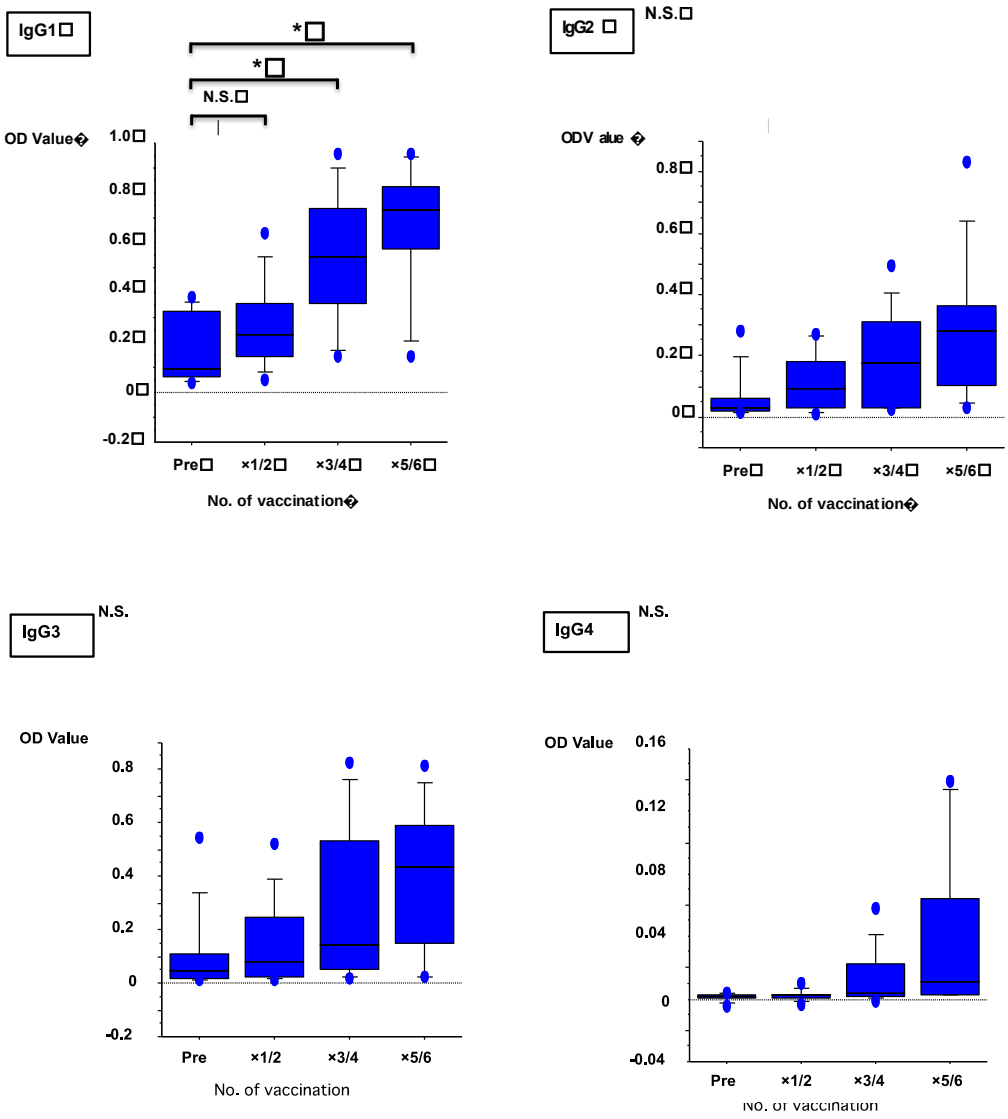

図 3　MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスの経時的変化

MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスの経時的変化を示す。IgG1 でのみ有意に OD 値の上昇を認めた（Pre：がんワクチン接種前の OD 値、×1/2：がんワクチン 1 回接種後および 2 回接種後の OD 値、 ×3/4：がんワクチン 3 回接種後および 4 回接種後の OD 値、×5/6：がんワクチン 5 回接種後および 6 回接種後の OD 値、*：有意差あり、N.S.：有意差なし）。

3. MAGE-A4 タンパクに対する IgG サブクラス間の関係性

次に、患者血清中の各々の抗体の関係性を ELISA 結果の OD 値から相関図を作成し

検討した（図 4, 5）。Th1 に関連する抗体同士で OD 値が最もよく相関したのは IgG1 と IgG3 であり、相関係数が 0.686 と中程度の正の相関を認めた。

（p<0.0001）。Th1 に関連する抗体の OD 値と Th2 に関連する IgG4 の OD 値との関係性では、IgG1, IgG3 と IgG4 との間には中程度の正の相関を認めた。IgG1 と IgG4 の相関係数は 0.506、IgG3 と IgG4 の相関係数は 0.570 であった（いずれも p<0.0001）。Th1 に関連する抗体と Th2 に関連する抗体との組み合わせで最もよく相関したのは IgG2 と IgG4 であり、相関係数が 0.808 と強い正の相関を認めた（p<0.0001）。

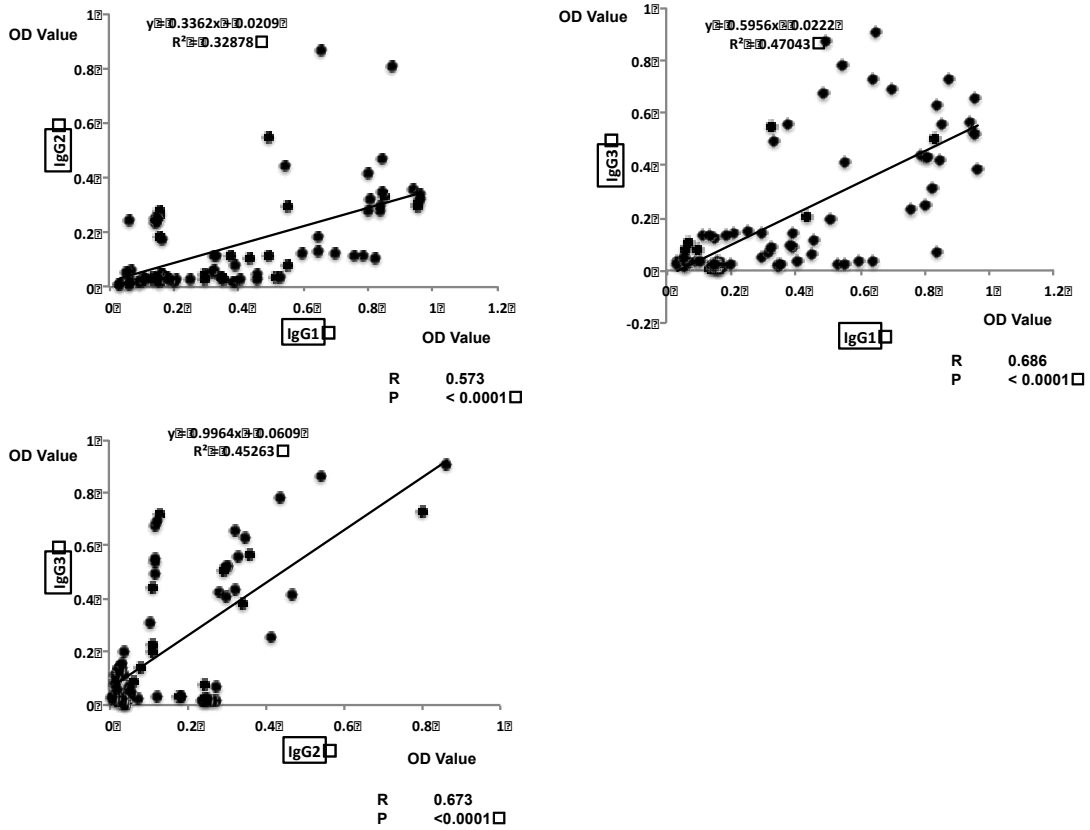

図 4　Th1 に関連する抗体同士の相関関係

Th1 に関連する抗体同士の相関関係を示す。Th1 に関連する抗体同士で最も良く相関したのは、IgG1 と IgG3 であり、その相関係数は 0.686 であった。

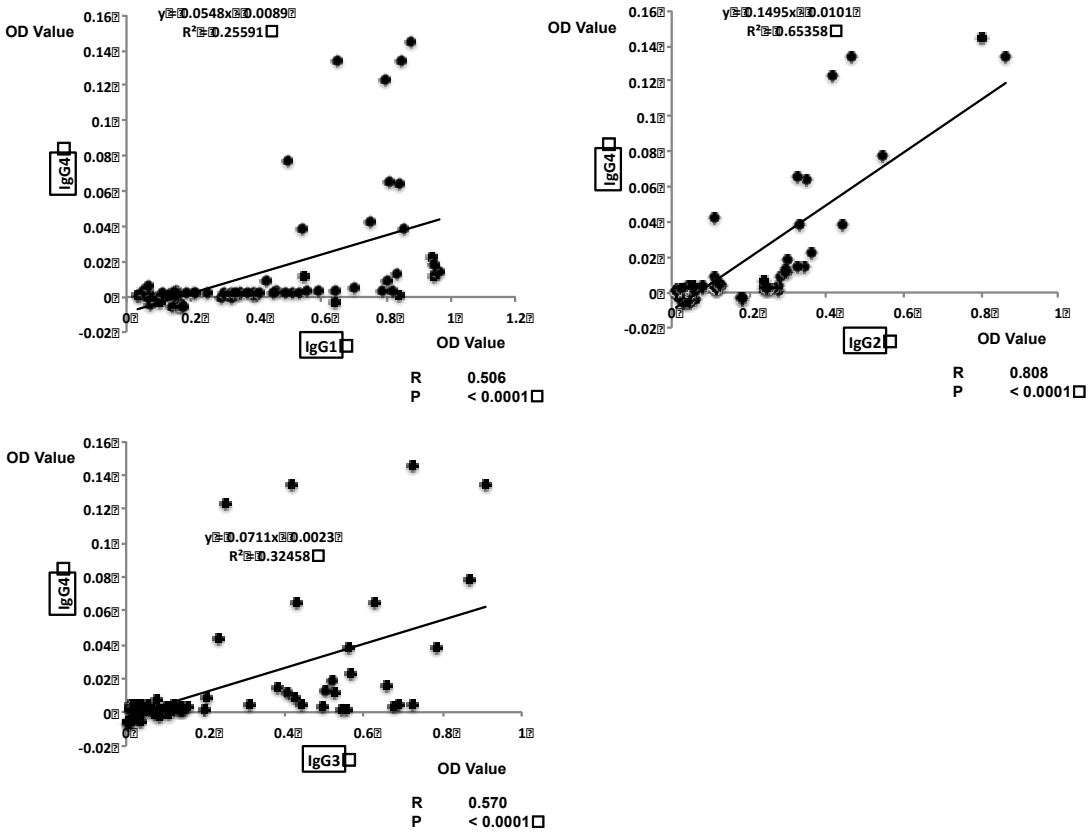

図 5　Th1 に関連する抗体と Th2 に関連する抗体である Ig4 との相関関係

Th1 に関連する抗体と Th2 に関連する抗体である IgG4 との相関関係を示す。IgG4 と最も良く相関したのは IgG2 であり、その相関係数は 0.808 であった。

4. 生存解析

がんワクチン接種後の生存期間の中央値は 211（88-509）日であった。12 例、全例が原病死した。

Kaplan-Meier 法により累積生存曲線を描出し、MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスや MAGE-A4 特異的 IgE の誘導の有無が生存期間に与える影響について解析した（図 6）。Th1 に関連する抗体である IgG1、IgG2、IgG3 においては、陽転化の有無（IgG1 陽性：n=9、IgG2 陽性：n=5、IgG3 陽性：n=7）は患者の生存期間に影響を与えなかった。一方で、Th2 に関連する抗体である IgG4 と IgE においては、IgG4 の陽転化の有無（IgG4 陽性：8 例）は患者の生存期間に影響を与えなかったが、IgE が陽転化した 2 例は陽転化しなかった 10 例と比較して有意に生存期間が短かった（P=0.0116）。

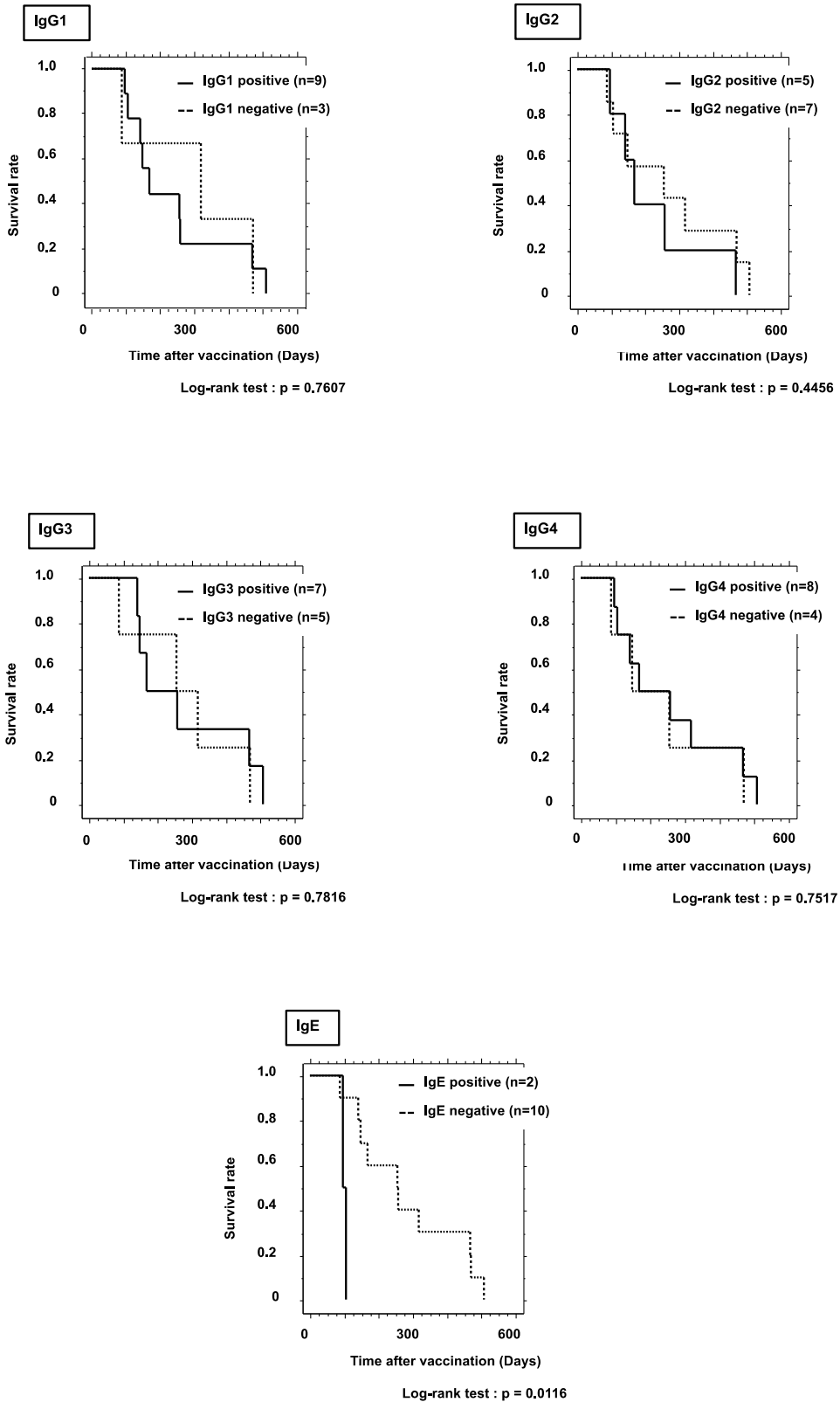
IgG1
IgG1 positive (n=9)
IgG1 negative (n=3)
Survival rate
Time after vaccination (Days)
Log-rank test : p = 0.7607
IgG2
IgG2 positive (n=5)
IgG2 negative (n=7)
Survival rate
Time after vaccination (Days)
Log-rank test : p = 0.4456
IgG3
IgG3 positive (n=7)
IgG3 negative (n=5)
Survival rate
Time after vaccination (Days)
Log-rank test : p = 0.7816
IgG4
IgG4 positive (n=8)
IgG4 negative (n=4)
Survival rate
Time after vaccination (Days)
Log-rank test : p = 0.7517
IgE
IgE positive (n=2)
IgE negative (n=10)
Survival rate
Time after vaccination (Days)
Log-rank test : p = 0.0116

図６　生存曲線

5.治療効果の評価

modified RECIST 分類に則った症例毎の治療効果の評価では CR や PR は認めず、PD が 5 例、SD が 7 例であった。

MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスおよび MAGE-A4 特異的 IgE の陽転化の有無と、治療効果との間に統計学的に有意な相関は認めなかった。また、baseline positive であるか否かと、治療効果との間にも相関は認めなかった。

6. 結果のまとめ

陽転化率にばらつきがあるものの、MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスと MAGE-A4 特異的 IgE の誘導が確認できた。また、がんワクチンの接種後 IgG1 のみ OD 値が統計学的に有意に上昇した。

Th1 に関連する抗体同士で OD 値がもっともよく相関したのは IgG1 と IgG3 で中程度の正の相関を認めた。Th1 に関連する抗体と Th2 に関連する抗体との組み合わせで最もよく相関したのは、IgG2 と IgG4 で強い正の相関を認めた。

MAGE-A4 特異的抗体の誘導の有無と、がんワクチン接種後の生存期間との関係では、IgE が陽転化した 2 例は陽転化しなかった 10 例と比較して有意に生存期間が短かった。

modified RECIST 分類に則った症例毎の治療効果の評価では、CR や PR は認めなかった。MAGE-A4 特異的 IgG サブクラスおよび MAGE-A4 特異的 IgE の陽転化の有無と、治療効果との間には統計学的に有意な相関は認めなかった。

考察

がんワクチン療法の臨床効果はいまだ不十分であり[34-36]、治療前後の腫瘍縮小効果を評価するRECIST法では大半の症例がSDやPDに区分される。その一方で、免疫治療においては従来の抗腫瘍効果の指標が必ずしも適しているとは言えない事がわかってきている。免疫治療においては新規病変が出現した場合であっても治療を継続した際に、病変の縮小を認める症例が存在するからである。従って、新規病変の出現のみではPDとせず、評価可能病変の長径の和で評価するImmune-related response criteriaといった指標も報告されている[37]。本検討では、Cancer Vaccine Clinical Trial Working Groupの提言[18]等に基づき、RECIST分類を変更したmodified RECIST分類で評価した。治療効果が画像上で評価予測不能な現状では、がんワクチンのバイオマーカーとして投与された免疫源に対する抗原特異的CTLの誘導（抗原特異的細胞性免疫反応）もしくは抗原特異的抗体の産生（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、腫瘍細胞を直接的に障害するのはCTLであり、抗体の役割は補助的であることから、抗原特異的細胞性免疫反応を評価することがより望ましいと考えられる。しかしながら、ELISPOT法や細胞内サイトカイン染色法、HLA-multimer法といった抗原特異的細胞性免疫反応の評価方法は、いまだ世界的に標準とされているものが存在せず、再現性や感度が低く、施設間のvariationが大きいという問題がある[38]。その一方で、ELISA法やLUMINEX法といった抗原特異的液性免疫反応の測定方法は確立されており、再現性や感度の問題は解決できる。がんワクチンのバイオマーカーとしては、抗原特異的細胞性免疫反応も抗原特異的液性免疫反応もそれぞれ利点と欠点を有しているが、今回の検討では再現性と感度を優先し、抗原特異的液性免疫反応を用いて評価した。

がんワクチン投与後の液性免疫誘導に関して、今回の研究ではMAGE-A4蛋白300μg、OK-432 0.5KEを投与された群のTh1に関連する抗体であるIgG1の陽転化率は75%（9/12）、IgG2の陽転化率は41.7%（5/12）、IgG3の陽転化率は58.3%（7/12）と高率に誘導された。一方、Th2に関連する抗体であるIgG4の陽転化率は66.7%（8/12）、IgEの陽転化率は16.7%（2/12）であった。

これまでの所属教室の研究において、がんワクチン接種により抗原特異的な免疫が過剰に誘導された場合に、III型アレルギー反応が引き起こされることを報告している[13]。また、過剰にTh1に関連する抗体が誘導される場合に、サイトカイン環境がTh1-based cytokineからTh2-based cytokineへと移行する可能性を指摘している[13]。今回の検討でTh1に関連する抗体とTh2に関連する抗体の比較をしたところ、Th1に関連する抗体間ではIgG1とIgG3が最も良く相関を示し、相関係数は$R=0.686$（$p<0.0001$）であった。Th1細胞とTh2細胞は分泌するサイトカインを介して互いに抑制し合い均

衡を保っていることが知られている[39]が、今回の検討ではTh1に関連する抗体であるIgG2と、Th2に関連する抗体であるIgG4との間に強い正の相関を認め、相関係数はR=0.808（p<0.0001）であった。このことにより。Th2に関連する抗体であるIgG4は、Th1に関連する抗体であるIgG2の誘導の程度に正比例して誘導される可能性が示唆された。

抗体価上昇と生存期間の関係については、今回のワクチン接種でTh1に関連する抗体のいずれかが誘導された群の生存期間と、されなかった群の生存期間には有意な差は認めなかった。抗原特異的な免疫反応が惹起されたにも関わらず生存期間に影響を与えなかったことの原因として、抗原特異的液性免疫反応は誘導されたものの、抗原特異的CTLが誘導されず治療効果を得るには至らなかった可能性がある。また、近年、制御性T細胞と癌免疫との関連が話題となっている。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、癌抗原の多くは自己抗原であるので、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。2001年、Woo, E.Y.ら[40]により健康成人と比較して非小細胞肺癌や卵巣癌患者の末梢血中で制御性T細胞の増加が報告され、その後、乳癌や大腸癌、食道癌、胃癌などの癌種でも同様の事実が報告されている[41-43]。このことから、癌ワクチンで癌抗原に特異的な免疫を惹起する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細胞を調節するなど関連する他の因子の調整が必要であることを示唆している。加えて、今回の対象患者は切除不能進行再発癌症例であり、免疫治療単独では病状をコントロールする事がそもそも困難であった可能性もある。

一方で、Th2に関連する抗体であるIgEが誘導された群の生存期間は、誘導されなかった群の生存期間と比較して有意に短かった。過去のIgEと腫瘍に関する報告では、アレルギー疾患の既往があると様々な癌腫の予後が良好であることが指摘されている[44-46]。また、分子生物学的にも抗原特異的なIgEは、*in vivo*でも*in vitro*においても抗腫瘍効果を認めており、その効果はIgGと比較して強力で長期間に及ぶとされている。このことから、IgE免疫療法は癌治療の新たなコンセプトと位置づけられている[47-54]。これらの知見は、今回の結果とは相反しており、その要因を今後検索していく予定である。ヒトを対象とした癌免疫療法における抗原特異的IgEの誘導と生存率に関する報告は少ないが、Recombinant CEA proteinで免疫した結腸直腸癌患者の検討では、IgEの誘導の有無は生存率に影響を与えなかったものの、IgAが誘導された群で生存率が有意に良好であったと報告している[55]。今後、IgA分画についての追加の検討を考慮したい。今回の結果からは、がんワクチン療法中に抗原特異的なIgEの上昇を認めた場合、その後の全身状態の悪化が示唆されるため注意が必要であると言える。

もう一方のTh2に関連する抗体であるIgG4が誘導された群の生存期間と、されなかった群の生存期間には有意な差は認めなかった。IgG4は健常成人の血清中では最も

少ない IgG サブクラスであり、IgG サブクラスに占めるその割合は約 3%と言われている[56,57]。同抗体は主に慢性的な抗原刺激や炎症に反応して誘導されるが、アレルギー疾患に対する減感作療法など、慢性的な抗原刺激下における免疫寛容にも関与している[58,59]。抗腫瘍免疫の観点からは、IgG4 は IgG1 の抗腫瘍効果を阻害するとされており[60]、実際に胆管癌や悪性黒色腫の予後不良と血清中の IgG4 上昇は関係するという報告も認められる[61-63]。今回の検討からは、IgG4 が抗腫瘍免疫に与える悪影響は確認できなかった。

液性免疫応答の誘導と臨床的抗腫瘍効果との関係性については、今回の実験結果からは IgG サブクラスおよび IgE に関して統計学的に有意な関係性は認めなかった。また、各々baseline positive 症例であるか否かも臨床的反応との間に有意な関係性は認めなかったが、Jäger, E.ら[64]は NY-ESO1 を対象とした臨床試験で baseline positive 症例であることが患者の生存に影響を与えたと報告している。実際、baseline 抗体の有無は、本臨床研究登録前に受けた化学放射線療法の有無や期間などの背景によっても異なる可能性がある。また、進行癌患者においては免疫環境が予後に影響を与える可能性もあり、今回の検討ではこれらの様々な背景因子の影響により baseline 抗体の有無が予後を反映しなかった可能性がある。baseline 抗体の有無が予後に与える影響に関しては、今後、症例を蓄積して前治療の有無やその程度、および本研究では検討しなかった抗原特異的細胞性免疫反応や免疫抑制細胞を加味して再検討を行う必要がある。

総括および結論

1. 本研究から得られた新知見

① Th1 に関連する抗体である MAGE-A4 特異的 IgG2 と Th2 に関連する抗体である MAGE-A4 特異的 IgG4 は強い正の相関関係を示す。

② CHP-MAGE-A4 がんワクチン接種患者において、MAGE-A4 特異的 IgE が誘導される症例は、誘導されない症例と比較して接種後の生存期間が有意に短い。

2. 新知見の意義

① CHP-MAGE-A4 がんワクチン接種患者において、血清中の MAGE-A4 特異的 IgG2 をモニタリングすることで、今後の MAGE-A4 特異的 IgG4 の誘導の有無を推測する事が可能である。

② CHP-MAGE-A4 がんワクチン接種患者における MAGE-A4 特異的 IgE の誘導の有無が、その後の患者の生存期間を予測する手段となる可能性がある。

3. 新知見に基づき今後展開されうる研究

① IgG4 は免疫寛容に関連した抗体である。がんワクチン療法中に IgG4 の誘導が示唆された場合に、がんワクチン接種を継続するのかどうかの検討が必要である。

② MAGE-A4 特異的 IgE が誘導される患者背景の検討として、癌種や全身状態やサイトカイン環境などについての研究が行われるべきである。

4. 今後の課題

試験のデザインとしては患者母数を増やし、癌種を限定した上での再検討が必要である。

実験方法としては、MAGE-A4 特異的 IgE の定量化のための手段の検討が必要である。また、今回は検討しなかった、MAGE-A4 特異的 IgA や IgM について、その誘導の有無や相関関係、生存期間との関係性など検討すべきである。

最終的には、その他の癌抗原を標的としたがんワクチン接種患者においても同様の検討を行い、標的とする癌抗原の違いが結果に与える影響を検討すべきである。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて頂き御指導下さいました、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 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、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II 土川 貴裕診療准教授に深く感謝いたします。

次に、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、研究手法の御指導をいただき、また、CHP-MAGE-A4 ワクチンと MAGE-A4 特異的抗体を快く提供して頂いたことに深謝いたします。

研究期間を通して、志田啓氏には免疫組織染色法の技術的な助言を、斉藤直美氏には実験試薬の準備に協力をいただきましたことに感謝の意を表します。

本研究を実行するにあたり助成金や寄付金の支援はありません。

引用文献

1. Coley, W.B. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.* 14, 199-220 (1891).
2. 丸山千里, 宗像醇, 長堀篤二. 結核菌体抽出物質および腫瘤組織抽出物質による悪性腫瘍の治療について. 日本皮膚科学会誌 76, 399-404 (1966).
3. Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei, J.P. & White, D.E..Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 319, 1676-1680 (1988).
4. Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J. & van der Bruggen, P. Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 175-208 (2006).
5. van der Bruggen P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647 (1991).
6. Rosenberg, S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384 (2001).
7. Rosenberg, S.A., Yang, J.C. & Restifo, N.P. Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 909-915 (2004) .
8. Nishikawa, H., Kato, T., Tawara, I., Saito, K., Ikeda, H., Kuribayashi, K., Allen, P.M., Schreiber, R.D., Sakaguchi, S., Old, L.J. & Shiku, H. Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201, 681-686 (2005).
9. Jäger, E., Ringhoffer, M., Altmannsberger, M., Arand, M., Karbach, J., Jäger, D., Oesch, F. & Knuth, A. Immunoselection in vivo : independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 71, 142-147 (1997).
10. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *ENVO. J.* 11, 3887-3895 (1992).
11. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T. & Minato, M. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 12293-12297 (2002).

12. Ribas, A. Tumor immunotherapy directed at PD-1. *N. Engl. J. Med.* 366, 2517-2519 (2012).
13. 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. Time-dependent transition of the immunoglobulin G subclass and immunoglobulin E response in cancer patients vaccinated with cholesteryl pullulan(CHP)-MAGE-A4. *Oncology Letters* 12, 4493-4504 (2016).
14. Romagnani, S. TH1 and TH2 in human diseases. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80, 225-235 (1996).
15. 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).
16. Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S.U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S. & Sato, M. 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 streptococcl preparation. *Cancer Res.* 64, 5461-5470 (2004).
17. Nakahara, S., Tsunoda, T., Baba, T., Asabe, S. & Tahara, H. Dendritic cells stimulated with a bacterial poduct, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. *Cancer Res.* 63, 4112-4118 (2003).
18. Hoos, A., Parmiani, G., Hege, K., Sznol, M., Loibner, H., Eggermont, A., Urba, W., Blumenstein, B., Sacks, N., Keilholz, U. & Nichol, G. A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. *J Immunother.* 30, 1-15 (2007).
19. Plaen, E.D., Naerhuyzen, B., Smet, C.D., Szikora, J.P. & Boon, T. Alternative promoters of gene MAGE4a. *Genomics* 40, 305-313 (1997).
20. Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J. & Chen, Y.T. Cancer/testis antigens : an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immuno. Reviews* 188, 22-32 (2002).
21. Resnick, M.B., Sabo, E., Kondratev, S., Kerner, H., Spagnoli, G.C. & Yakirevich, E. Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int. J. Cancer* 101, 190-195 (2002).
22. Yakirevich, E., Sabo, E., Lavie, O., Mazareb, S., Spagnoli, G.C. & Resnick, M.B. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin. Cancer Res.* 9, 6453-6460 (2003).

23. Tajima, K., Obata, Y., Tamaki, H., Yoshida, M., Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Old, L.J., Kuwano, H., Takahashi, T., Takahashi, T. & Mitsudomi, T. Expression of cancer/testis(CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer* 42, 23-33 (2003).
24. Prasad, M.L., Jungbluth, A.A., Petal, S.G., Iversen, K., Hoshaw-Woodard, S. & Busam, K.J. Expression and significance of cancer/testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. *Head & Neck* 28, 1053-1057 (2004).
25. Li, M., Yuan, Y.H., Han, Y., Liu, Y.X., Yan, L., Wang, Y. & Gu, j. Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue. *Clin. Cancer Res.* 11, 1809-1814 (2005).
26. Gure, A.O., Chua, R., Williamson, B., Gonen, M., Ferrera, C.A., Gnjatic, S., Ritter, G., Simpson, A.J., Chen, Y.T., Old, L.J. & Altorki, N.K. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 8055-8062 (2005).
27. Peng, J.R., Chen, H.S., Mou, D.C., Cao, J., Cong, X., Qin, L.L., Wei, L., Leng, X.S., Wang, Y. & Chen W.F. Expression of cancer/testis antigens in Chinese hepatocellular carcinoma and its correlation with clinical parameters. *Cancer Letters* 219, 223-232 (2005).
28. Barrow, C., Browning, J., MacGregor, D., Davis, I.D., Sturrock, S., Jungbluth, AA. & Cebon, J. Tumor antigen expression in melanoma varies according to antigen and stage. *Clin. Cancer Res.* 12, 764-771 (2006).
29. Akcakanat, A., Kanda, T., Tanabe, T., Komukai, S., Yajima, K., Nakagawa, S., Ohashi, M. & Hatakeyama, K. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX protein in esophageal cancer. Implications for immunotherapy. *Int. J. Cancer* 118, 123-128 (2006).
30. Aoki, M., Ueda, S., Nishikawa, H., Kitano, S., Hirayama, M., Ikeda, H., Toyoda, H., Tanaka, K., Kanai, M., Takabayashi, A., Imai, H., Shiraishi, T., Sato, E., Wada, H., Nakayama, E., Takei, Y., Katayama, N., Shiku, H. & Kageyama, S. 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).
31. Kageyama, S., Kitano, S., Hirayama, M., Nagata, Y., Imai, H., Shiraishi, T., Akiyoshi, K., Scott, A.M., Murphy, R., Hoffman, E.W., Old, L.J., Katayama, N. & Shiku, H. Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan nanogel. *Cancer Sci.* 99, 601-607 (2008).
32. Kageyama, S., Wada, H., Muro, K., Niwa, Y., Ueda, S., Miyata, H., Takiguchi, S.,

Sugino, S.H., 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, 246-255 (2013).

33. Gu, X.G., Schmitt, M., Hiasa, A., Nagata, Y., Ikeda, H., Sasaki, Y., Akiyoshi, K., Sunamoto, J., Nakamura, H., Kuribayashi, K. & Shiku, H. 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).

34. Goydos, J.S., Elder, E., Whiteside, T.L., Finn, O.J. & Lotze, M.T. A Phase I Trial of a Synthetic Mucin Peptide Vaccine Induction of Specific Immune Reactivity in Patients with Adenocarcinoma. *J. Syrg. Res.* 63, 298-304 (1996).

35. Miyagi, Y., Imai, N., Sasatomi, T., Yamada, A., Mine, T., Katagiri, K., Nakagawa, M., Muto, A., Okouchi, S., Isomoto, H., Shirouzu, K., Yamana, H. & Itoh, K. Induction of cellular immune responses to tumor cells and peptides in colorectal cancer patients by vaccination with SART3 peptides. *Clin. Cancer Res.* 7, 3950-3962 (2001).

36. Tsuruma, T., Hata, F., Torigoe, T., Furuhata, T., Idenoue, S., Kurotaki, T., Yamamoto, M., Yagihashi, A., Ohmura, T., Yamaguchi, K., Katsuramaki, T., Yasoshima, T., Sasaki, K., Mizushima, Y., Minamida, H., Kimura, H., Akiyama, M., Hirohashi, Y., Asanuma, H., Tamura, Y., Shimozawa, K., Sato, N. & Hirata, K. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J. Transl. Med.* 2, 19 (2004).

37. Wolchok, J.D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J.S., Hamid, O., Lebbe, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., Humphrey, R. & Hodi, F.S. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin. Cancer Res.* 15, 7412-7420 (2009).

38. Janetzki, S., Britten, C.M., Kalos, M., Levitsky, H.I., Maecker, H.T., Melief, CJ., Old, L.J., Romero, P., Hoos, A. & Davis, M.M. "MIATA" – minimal information about T cell assays. *Immunity* 31, 527-528 (2009).

39. Kidd, P. Th1/Th2 Balance : The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Altern. Med. Rev.* 8, 223-246 (2003).

40. Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R. & June, C.H. Regulatory $CD4^+CD25^+$ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.*

61, 4766-4772 (2001).

41. Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S. & Linehan, D.C. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.* 169, 2756-2761 (2002).

42. Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E. & Grubeck-Loebenstein, B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 9, 606-612 (2003).

43. Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M. & Takabayashi, A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastro-intestinal malignancies : possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98, 1089-1099 (2003).

44. Turner, M.C., Chen, Y., Krewski, D., Ghadirian, P., Thun, M.J. & Calle, E.E. Cancer mortality among US men and women with asthma and hay fever. *Am. J. Epidemiol.* 162, 212-221 (2005).

45. Wang, H. & Diepgen, T.L.. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy* 60, 1098-1111 (2005).

46. Turner, M.C., Chen, Y., Krewski, D. & Ghadirian, P. An overview of the association between allergy and cancer. *Int. J. Cancer* 118, 3124-3132 (2006).

47. Nagy, E., Berczi, I. & Sehon, A.H. Growth inhibition of murine mammary carcinoma by monoclonal IgE antibodies specific for the mammary tumor virus. *Cancer Immunol. Immunother.* 34, 63-69 (1991).

48. Kershaw, M.H., Darcy, P.K., Trapani, J.A., MacGregor, D. & Smyth, M.J. Tumor-specific IgE-mediated inhibition of human colorectal carcinoma xenograft growth. *Oncol. Res.*10, 133-142 (1998).

49. Gould, H.J., Mackay, G.A., Karagiannis, S.N., O'Toole, C.M., Marsh, P.J., Daniel, B.E., Coney, L.R., Zurawski, V.R. Jr., Joseph, M., Capron, M., Gilbert, M., Murphy, G.F. & Korngold, R. Comparison of IgE and IgG antibody-dependent cytotoxicity in vitro and in a SCID mouse xenograft model of ovarian carcinoma. *Eur. J. Immunol.* 29, 3527-3537 (1999).

50. Reali, E., Greiner, J.W., Corti, A., Gould, H.J., Bottazzoli, F., Paganelli, G., Schlom, J. & Siccardi, A.G. IgEs targeted on tumor cells:therapeutic activity and potential in the design of tumor vaccines. *Cancer Res.* 61, 5517-5522 (2001).

51. Riemer, A.B., Untersmayr, E., Knittelfelder, R., Duschl, A., Pehamberger, H.,

Zielinski, C.C., Scheiner, O. & Jensen-Jarolim, E. Active induction of tumor-specific IgE antibodies by oral mimotope vaccination. *Cancer Res.* 67, 3406-3411 (2007).

52. Jensen-Jarolim, E., Achatz, G., Turner, M.C., Karagiannis, S., Legrand, F., Capron, M., Penichet, M.L., Rodríguez, J.A., Siccardi, A.G., Vangelista, L., Riemer, A.B. & Gould, H AllergoOncology : the role of IgE-mediated allergy in cancer. *Allergy* 63, 1255-1266 (2008).
53. Singer, J. & Jensen-Jarolim, E. IgE-based immunotherapy of cancer : challenges and chances. *Allergy* 69, 137-149 (2014).
54. Josephs, D.H., Spicer, J.F., Karagiannis, P., Gould, H.J. & Karagiannis, S.N. IgE immunotherapy : A novel concept with promise for the treatment of cancer. *mAbs.* 6, 54-72 (2014).
55. Staff, C., Magnusson, C.G., Hojjat-Farsangi, M., Mosolits, S., Liljefors, M., Frodin, J.E., Wahrén, B., Mellstedt, H. & Ullenhag, G.J. Induction of IgM, IgA and IgE antibodies in colorectal cancer patients vaccinated with a recombinant CEA protein. *J. Clin. Lmmunol.* 32, 855-865 (2012).
56. Schur, P.H. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr. Allergy* 23, 1-11 (1988).
57. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes:from structure to effector function. *Front. Immunol.* 5, 520 (2014).
58. Varga, E.M., Kausar, F., Aberer, W., Zach, M., Eber, E. & Durham, S.R. & Shamji, M.H. Tolerant beekeepers display venom-specific functional IgG4 antibodies in the absence of specific IgE. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 1419-1421 (2013).
59. Shamji, M.H., Ljorring, C., Francis, J.N., Calderon, M.A., Larche, M., Kimber, I., Frew, A.J., Ipsen, H., Lund, K., Würtzen, P.A. & Durham, S.R. Functional rather than immunoreactive levels of IgG4 correlate closely with clinical response to grass pollen immunotherapy. *Allergy* 67, 217-226 (2012).
60. Crescioli, S., Correa, I., Karagiannis, P., Davies, A.M., Sutton, B.J., Nestle, F.O. & Karagiannis, S.N. IgG4 Characteristics and Functions in Cancer Immunity. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 16, 7 (2016).
61. Karagiannis, P., Gilbert, A.E., Josephs, D.H., Ali, N., Dodev, T., Saul, L., Correa, I., Roberts, L., Beddowes, E., Koers, A., Hobbs, C., Ferreira, S., Geh, J.L., Healy, C., Harries, M., Acland, K.M., Blower, P.J., Mitchell, T., Fear, D.J., Spicer, J.F., Lacy, K.E., Nestle, F.O. & Karagiannis, S.N. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. *J. Clin. Invest.* 123, 1457-1474 (2013).
62. Karagiannis, P., Villanova, F., Josephs, D.H., Correa, I., Van Hemelrijck, M., Hobbs, C., Saul, L., Egbuniwe, I.U., Tosi, I., Ilieva, K.M., Kent, E., Calonje, E., Harries, M.,

Fentiman, I., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Spicer, J.F., Lacy, K.E., Nestle, F.O. & Karagiannis, S.N. Elevated IgG4 in patient circulation is associated with the risk of disease progression in melanoma. *Oncoimmunology* 4, e1032492 (2015).

63. Harada, K., Shimoda, S., Kimura, Y., Sato, Y., Ikeda, H., Igarashi, S., Ren, X.S., Sato H. & Nakanuma Y. Significance of immunoglobulin G4(IgG4)-positive cells in extrahepatic cholangiocarcinoma : molecular mechanism of IgG4 reaction in cancer tissue. *Hepatology* 56, 157-164 (2012).

64. Jäger, E., Gnjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jäger, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y.T., Ritter, G., Hoffman, E., Arand, M., Old, L.J. & Knuth, A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *P.N.A.S.* 97, 12198-12203 (2000).