HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	宮谷内, 健吾
Description	配架番号：2489
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13698号
Issue Date	2019-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74974
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kengo_Miyauchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　宮谷内　健吾

学 位 論 文 題 名

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 ）

【背景と目的】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が、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な細胞性、あるいは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が、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、この評価による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。

本研究では、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 にヒト精巣 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。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、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。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】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 例のみであった。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、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。患者全体の比較では、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、標準化の観点から 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ていた。既知の報告では、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、ほぼすべ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、同一腫瘍内においては腫瘍抗原の発現が不均一であることや、腫瘍抗原の発現および抗原特異的な抗体反応が癌の進行度や腫瘍生存、腫瘍形成、転移能、化学療法耐性と関連していることが挙げられる。以上から、免疫応答拡大が抗原特異的免疫反応の指標となり、癌の存在診断や病勢進行あるいは治療変更のタイミングをはかるバイオマーカーとなる可能性が示唆される。

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、免疫治療単独では効果が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さまざまであるため、その意義に関しては不明である。

【結果】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との相関は認められなかったが、癌免疫療法における免疫誘導の有無のモニタリングとして利用できる可能性があり、また、癌の存在診断や病勢進行、あるいは治療変更のタイミングをはかるバイオマーカーとしての可能性も有していると考えられた。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。