HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CHP-MAGE-A4がんワクチン臨床試験患者における末梢血CD4+CD25+FOXP3+制御性T細胞比率の臨床的意義に関する研究
Author(s)	和田, 雅孝
Description	配架番号：2491
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13700号
Issue Date	2019-06-28
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13700
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74978
Type	doctoral thesis
File Information	Masataka_Wada.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者における末梢血

$CD4^+CD25^+FOXP3^+$制御性 T 細胞比率の臨床的意義に関する研究

(Studies on clinical implications of circulating

$CD4^+CD25^+FOXP3^+$regulatory T cell ratio in CHP-MAGE-A4

cancer vaccine clinical trial patients)

2019 年 6 月

北海道大学

和田　雅孝

Masataka Wada

学 位 論 文

CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者における末梢血

$CD4^+CD25^+FOXP3^+$制御性 T 細胞比率の臨床的意義に関する研究

(Studies on clinical implications of circulating

$CD4^+CD25^+FOXP3^+$regulatory T cell ratio in CHP-MAGE-A4

cancer vaccine clinical trial patients)

2019 年 6 月

北海道大学

和田　雅孝

Masataka Wada

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

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7 頁

方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11 頁

結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18 頁

考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31 頁

総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35 頁

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36 頁

利益相反 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37 頁

引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38 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。

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

Clinical Implications of $CD4^+CD25^+Foxp3^+$Regulatory T Cell Frequencies After CHP-MAGE-A4 Cancer Vaccination

Anticancer Research, 38・1435-1444, 2018

本研究の一部は以下の学会に発表した。

和田雅孝, 宮本正樹, 土川貴裕, 安孫子剛大, 宮谷内健吾, 桑谷俊彦, 武内慎太郎, 七戸俊明, 平野聡

MAGE-A4 を標的としたがんワクチン投与下における制御性 T 細胞比の推移

第 113 回　日本外科学会定期学術集会, 2013 年 4 月 11 日～13 日, 福岡

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

Clinical implication of CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cell frequencies after CHP-MAGE-A4 cancer vaccination

第 72 回　日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日～5 日, 横浜

要旨

【背景と目的】手術療法、化学療法、放射線療法に続く、難治性悪性腫瘍に対する第 4 の治療としてがん免疫療法が注目されてきている。北海道大学消化器外科学教室Ⅱでも、癌精巣抗原の一種である MAGE-A4 を免疫源としたがんワクチン療法の臨床試験を展開してきた。しかしながら、他のがんワクチン療法と同様、腫瘍縮小効果は限定的であった。近年、免疫チェックポイント阻害剤の顕著な臨床効果が示される中で、改めて抗腫瘍免疫における免疫抑制機構の存在に注目が集まっている。がんワクチン療法の今後の課題として、免疫抑制機構の克服が重要であり、そのためには抑制的に機能する免疫担当細胞の詳細な理解、解明が必要である。本研究はその一つである制御性 T 細胞（Regulatory T cells：Treg）に着目し検討した。

【対象と方法】CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者のうち投与量が一定で、4 回以上治療が可能であった 16 名を対象とした。患者血清を一次抗体とし、ELISA 法で MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇の有無を評価した。対象患者の末梢血から採取した Peripheral Blood Mononuclear Cell（PBMC）を細胞調整し、CD4、CD25、FOXP3 で抗体処理した上で、フローサイトメトリーにて解析した。末梢循環型 Treg 比率を CD4 陽性リンパ球中の $CD4^{+}CD25^{+}FOXP3^{+}$ Treg の割合と定義し（Treg ratio と呼称）、ベースライン、治療開始後 7 週時点、11 週時点、15 週時点の PBMC から測定した。

【結果】MAGE-A4 特異的 IgG は 16 名中、10 名に上昇がみられた。臨床試験患者 16 名のベースライン Treg ratio の中央値は、健常人（中央値：6.60%）と比較し有意に高値であった。ベースライン Treg ratio 中央値である 10.28%をカットオフ値として群分けし、低値群と高値群で比較したが、腫瘍縮小効果、MAGE-A4 特異的 IgG 上昇の有無、生存期間のいずれとも相関を認めなかった。ワクチン投与開始後 7 週時点での Treg ratio 解析では、Treg ratio 低値群で有意に予後が良好であった。ワクチン投与開始後 7 週時点の Treg ratio 低値群はベースラインから Treg ratio が低値である症例が 8 名中 7 名であり、治療前後で Treg ratio が低値を維持し続けている症例の予後が良いことが示唆された。11 週時点、15 週時点で同様の検討を行ったが、腫瘍縮小効果、MAGE-A4 特異的 IgG 上昇の有無、生存期間との関連を認めなかった。

【考察】これまで、CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法の治療効果の判定方法としては、標的抗原に特異的な抗体産生能を評価する ELISA 法や、抗原刺激により誘導された細胞障害性 T 細胞を定量的に直接評価する ELISPOT が主に使用されてきたが、末梢循環型 Treg 比率測定の有用性が明確に示された報告はない。Treg の解析には、末梢循環型の他に腫瘍微小環境における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）中の Treg を免疫

組織化学法で評価する方法がある。腫瘍局所の TIL において、Treg が相対的に増加していることと予後不良とに関連があることが多くの固形癌で示されており、直接的な抗腫瘍環境の評価や治療効果予測の上で有用な方法とされるが、頻回なサンプルの採取が難しいという欠点がある。その点では、本研究で用いた血液サンプルは比較的簡便に採取が可能であり、最小限の侵襲で包括的な情報を得られる利点がある。本研究では、PBMC 中に存在する Treg を古典的な分類である CD4 陽性、CD25 陽性、FOXP3 陽性リンパ球と定義し、フローサイトメトリーにて CD4 陽性リンパ球中の Treg 比率を Treg ratio として扱い、がんワクチン療法におけるバイオマーカーとしての意義について検証した。

Treg ratio は、治療前の癌の進行度が高いほど高値であることが種々固形癌で示されており、測定時点での癌の病勢、およびその後の自然経過を予測する指標となる可能性が示唆されている。従って、ベースライン Treg ratio 高値群は予後不良となることが予測されるが、本研究では異なる結果であった。その要因として、対象患者が 16 名と少数であり、背景因子も異なるため、Treg ratio が単純に癌の病勢を反映していない可能性と、ベースライン Treg ratio 高値群の中に CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法の治療効果により予後が改善された症例が含まれている可能性が挙げられた。治療開始後の検討では、7 週時点での Treg ratio 低値の方が予後良好であることが判明し、さらにベースラインから低値を維持し続けることが 7 週時点 Treg 低値にとって重要であることが示唆された。末梢血 CD4 陽性 T リンパ球のサブセットは、細胞性免疫の誘導を担う Th1 と、アレルギー反応に関わる Th2、液性免疫の誘導に関わる Tfh、炎症の誘導・維持を担う Th17 細胞と、免疫抑制を担う Treg が含まれ、それぞれがサイトカイン環境に基づいて分化し、免疫環境のバランスを維持している。CD4 陽性リンパ球における Treg の比率を評価した指標である Treg ratio が高値である状態は、前述のバランスが相対的に Treg 優位な環境にあるといえる。そのため、Treg ratio が低く維持された状況は、逆に Treg の Th1 や CTL に対する抑制機能が低く抑えられている状態であり、抗腫瘍免疫が惹起されやすかったのではないかと考えられた。

がんワクチン療法の治療効果向上のため、腫瘍逃避機構を解除する戦略が重要視されている中、末梢循環性 Treg 比率のバイオマーカーとしての意義が高まる可能性があり、本研究の結果はその一助になり得ると考えられた。

【結論】CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法患者では、PBMC 中の末梢循環型 Treg 比率（Treg ratio）が健常人と比較し高値であった。がんワクチン治療前の Treg ratio は腫瘍縮小効果、抗原特異的抗体反応、予後を予測する指標とはならなかった。一方、治療開始後 7 週時点の Treg ratio では、低値である方が予後良好であり、それ

は治療前から Treg ratio が低値であることと関連があった。治療前後の Treg ratio の測定が予後予測のバイオマーカーとなり得ると考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CAR-T	Chimeric Antigen Receptor-T
CD	Cluster of Differentiation
CHP	Cholesteryl Pullulan
CR	Complete Response
CT	Computed Tomography
CTA	Cancer Testis Antigen
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritic Cells
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked Immunospot
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FOXP3	Forkhead box P3
FSC	Forward Scattered Light
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN	Interferon
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
MAGE	Melanoma-Associated Antigen
MDSC	Myeloid Derived Suppressor Cells
mRECIST	modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD	Progressive Disease
PD-1	Programmed Cell Death-1
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand-1
PE	Phycoerythrin

PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PFS	Progression Free Survival
PR	Partial Response
PS	Performance status
RPM	Rotation Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Stable Disease
SSC	Side Scattered Light
TAA	Tumor–Associated Antigens
TCR	T Cell Receptor
TGF-ß	Transforming Growth Factor-ß
Tfh	T follicular helper
Th	T helper
TIM-3	T-Cell Immunoglobulin and mucin domain-3
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte
Treg	Regulatory T Cells
UMIN-CTR	University Hospital Medical Information Network-Clinical Trials Registry

緒言

癌治療における標準的なアプローチは、手術療法・化学療法・放射線療法であるが、様々に改良が加えられたこれらの治療法によっても、癌の完全な制御は困難である。あるいは過大な副作用により、理想的な治療法の確立には至っていない現状がある。近年、少ない毒性と高い有効性が期待される新たなアプローチとして、免疫療法が注目されており、研究・開発が進んでいる(Mellman et al., 2011)。

がん免疫療法の歴史の始まりは 100 年以上前に報告された Coley’s ワクチンであり、非特異的免疫療法であった(Coley, 1891)。1980 年代、Boon らや van der Bruggen ら (Boon et al., 2006; van der Bruggen et al., 1991)による腫瘍関連抗原（Tumor Associated Antigens：TAA）の発見以降は、特異的免疫反応を利用する新しい形の免疫療法が注目された(Rosenberg et al., 2004)。腫瘍関連抗原をターゲットとした免疫療法は、昨今、能動的療法と受動的療法に分けて議論され、前者の代表格はがんワクチン療法や樹状細胞ワクチン療法であり、後者は主に遺伝子導入され抗原特異的な免疫反応を獲得したリンパ球を養子免疫する方法である。現在、効果が期待されている方法として悪性黒色腫や食道癌に対する NY-ESO1 (Robbins et al., 2015)や、Melanoma Associated Antigen-A4（MAGE-A4）(Kageyama et al., 2015)をターゲットとした遺伝子改変 T Cell Receptor（TCR）療法(Davis et al., 2010)や急性白血病における Cluster of Differentiation（CD）19 (Liu et al., 2017)、神経膠芽腫での糖脂質 GD2 に特異的な抗体を利用した Chimeric Antigen Receptor-T（CAR-T）療法(Pule et al., 2008)等が挙げられる。

また、これらの治療法に続き、免疫療法の大きな転換点ともいうべき新たな治療法が 2010 年代から開発、臨床応用され始めた。すなわち、末梢性の免疫寛容に重要な役割を持つ免疫チェックポイント分子に対する抗体療法であり、現在抗 Cytotoxic T- Lymphocyte Antigen-4（CTLA-4）、抗 Programmed Cell Death-1（PD-1）抗体、抗 Programmed Cell Death-Ligand1（PD-L1）抗体が臨床応用されている(Ishida et al., 1992; Iwai et al., 2002; Ribas, 2012)。特に、抗 PD-1 抗体は 2006 年に米国で臨床試験が開始され、日本での臨床試験を経て現在、一般名 Nivolumab としてメラノーマや腎癌などに対して臨床使用されている。

このような中、北海道大学消化器外科学教室Ⅱ（以下、所属教室）では特にがんワクチン療法に着目し、臨床試験を展開してきた。癌精巣抗原（Cancer Testis Antigen：CTA）の一種である MAGE-A4 の全長蛋白と Cholesteryl Pullulan（CHP）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」（以下、本臨床試験）を、2009 年から 2012 年に第 I + II 相試験として実施した。この臨床試験の主目的は安全性と有効性の評

価であった。第 I 相試験では 3 名ずつを 3 つの group に登録し、用量漸増試験として行い、第 II 相試験では、至適量と判断した CHP-MAGE-A4 300μg + CHP 3.6mg + OK-432 0.5KE を全例に投与し、安全性を評価した。全登録症例において Common Terminology Criteria for Adverse Events（CTCAE）で規定されるグレード 3 以上の有害事象は認めず、安全性が確認された。有効性に関しては、抗原特異的免疫反応、すなわち MAGE-A4 特異的 IgG 抗体反応を解析し、がんワクチンを投与された患者では一定の割合で特異的免疫反応が誘導されていることを明らかにした。しかしその一方で、modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors（mRECIST）分類に則った症例ごとの治療効果判定では、Complete Response（CR）や Partial Response（PR）は認めず、臨床的効果は限定的という結果であった。

がんワクチン療法は、腫瘍関連抗原の一種である癌精巣抗原を免疫源として投与することで抗原特異的免疫反応を誘導し、抗腫瘍効果を期待する免疫療法である。癌精巣抗原とは、広範囲の悪性腫瘍に発現が確認されているが、正常組織では精巣以外に発現を認めない性質をもったタンパクである(Caballero and Chen, 2009)。MAGE ファミリーは悪性黒色腫から同定された抗原で、癌精巣抗原の代表例の一つである。その中でも MAGE-A4 は食道癌、頭頚部癌、肺癌など種々の固形癌において発現が認められている(Caballero and Chen, 2009)。発現が認められている癌腫において、抗原特異的な免疫反応が誘導されることがわかっており、がんワクチン療法の有望な標的抗原と考えられている。しかしながら、本臨床試験のように、基礎実験レベルでみられる効果が臨床試験では十分に再現されないことがしばしば指摘されている(Rosenberg et al., 2004)。その理由として、第一に感染症に対する予防ワクチンとは異なり、がんワクチン療法では多くの場合自己抗原を標的とするため、患者自身が治療前からすでに抗原に対して長期に暴露された状態であり、標的抗原に反応性の T 細胞が不応答状態になっている可能性が指摘されている(Mohammed et al., 2016; Schreiber et al., 2011)。これを克服するため、さまざまな免疫アジュバントや薬剤デリバリーシステムの開発、ネオアンチゲンの探索が試みられており、それぞれ治療効果の改善が報告されている(Le et al., 2013; Le et al., 2015; Reed et al., 2013; Ribas et al., 2009; Schumacher and Schreiber, 2015)。第二に、患者側の要因として、免疫抑制機構の存在があげられる。制御性 T 細胞：Regulatory T Cells（Treg）や骨髄由来抑制細胞：Myeloid Derived Suppressor Cells（MDSC）といった免疫抑制細胞や、Interleukin（IL）-6、IL-10、Transforming Growth Factor-β（TGF-β）などの抑制性サイトカインが抗腫瘍免疫反応の障害となっていることが指摘されている(Vergati et al., 2011)。今後、がんワクチン療法の治療効果向上のため、このような免疫抑制機構の制御が必要と考えられている。そこで本研究では、

癌の免疫逃避機構の中でも、特に抑制系免疫担当細胞の代表格である Treg に着目し検討を行った。

Treg は自己免疫疾患の発症機構の研究から同定された Forkhead box P3（Foxp3）をマスター遺伝子とする免疫自己寛容の維持に必須の細胞群である(Sakaguchi et al., 2008)。がん免疫における Treg の役割は、過去のマウスモデルでの Treg 除去実験により解明され、腫瘍反応性の T 細胞を抑制して抗腫瘍免疫を抑制することが広く知られている(Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999; Yamaguchi and Sakaguchi, 2006)。一方、ヒト臨床における研究でも多くの癌腫で末梢血および腫瘍浸潤リンパ球（Tumor Infiltrating Lymphocyte : TIL）中の $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg が増加していることが示されており(Beyer and Schultze, 2006; Curiel et al., 2004; Decker et al., 2012; Ormandy et al., 2005)、CD4 や CD8 陽性 T 細胞に対して、$FOXP3^+$ Treg の比率が高い方が進行癌患者における予後不良や腫瘍の進行と関連があることが示されている(Du Four et al., 2016; Hansen et al., 2015; Sayour et al., 2015)。ヒトにおいても Treg が抗腫瘍免疫を抑制する機序が徐々に明らかになってきているが、がんワクチン療法における抗腫瘍効果にどのような影響があるのかは十分に解明されていない。本研究では CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法を受けた患者を対象に、治療中の免疫状態の中で Treg がどのように関わるかを末梢循環型 Treg 比率を探索的に解析し、治療効果および予後との関連を調べることで検証した。

所属教室がこれまでに行った CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者の Peripheral Blood Mononuclear Cells（PBMC）を用い、CD4 陽性リンパ球に対する $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Regulatory T cells の割合を末梢循環型 Treg 比率（Treg raito）として測定し、バイオマーカーとしての意義を検証した。求められるバイオマーカーの要件は目的によって、治療前の効果予測、治療中の免疫モニタリング、予後予測、毒性予測などが挙げられるが、本研究ではがんワクチン治療前に効果・予後予測が可能かどうか、治療後の予後予測が可能かを検討項目とした。まず、PBMC 中のリンパ球をフローサイトメトリーで解析し、$CD4^+$、$CD25^+$、$FOXP3^+$ で定義される Treg の分画を検出する条件を設定した。次に、評価方法として Treg 分画の割合を測定する手法を採用し、CD4 陽性リンパ球中の Treg 比率 : Treg ratio を算出した。健常人サンプルを用いて Treg ratio を測定し、解析間、サンプル間のばらつきを評価した。臨床試験患者 16 名の治療前（ベースライン）、および治療開始後 7 週、11 週、15 週時点の PBMC を解析し、Treg ratio を測定した。その結果、臨床試験患者においては健常人と比較し Treg ratio が高値であることを明らかにした。また、がんワクチン投与により経時的に Treg ratio は低下する傾向にあり、臨床試験から脱落せず比較的長期に生存できている症例で Treg ratio が低値を維持で

きていることが判明した。さらに、ベースラインの中央値をカットオフ値としてワクチン投与後 7 週時点の Treg ratio で群分けし生存解析を行ったところ、Treg ratio 低値群で有意に生存期間が長かった。がんワクチン療法による治療開始後の予後を予測するバイオマーカーとして、有用である可能性が示唆されたとともに、今後、患者選択、治療効果予測、新薬開発などにつながる知見であると考えられた。

方法

Ⅰ.「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」に関する臨床研究デザインと治療プロトコール

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。Human Immunodeficiency Virus（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 がんワクチンを 2 週間毎に皮下注射にて投与した。6 回投与で完遂とした。(6 回投与後、患者の意思に基づきワクチンの追加投与を行った。) 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：MAGE-A4 100μg + CHP 1.2mg、group 2：CHP-MAGE-A4 300μg + CHP 3.6mg、group 3：CHP-MAGE-A4 300μg + CHP 3.6mg + 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 (Nakahara et al., 2003; Okamoto et al., 2004)。第 II 相では投与量を固定し、全症例に MAGE-A4 300μg + CHP 3.6mg + OK-432 0.5KE を投与した。

3. CHP-MAGE-A4 がんワクチン

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 は、癌精巣抗原である MAGE ファミリーの一種で、各種癌組織での発現が確認されている一方、正常組織では生殖細胞にのみ発現が認められる抗原で、がんワクチンの標的抗原として有用であることが報告されている (Barrow et al., 2006; De Plaen et al., 1997; Gure et al., 2005; Li et al., 2005; Prasad et al., 2004; Resnick et al., 2002; Scanlan et al., 2002; Tajima et al., 2003; Yakirevich et al., 2003)。また、CHP はがんワクチン蛋白を包埋し、ナノ複合体を形成することで、より効率的な抗原提示を可能とする抗原蛋白デリバリーシステムである(Aoki et al., 2009; Gu et al., 1998; Kageyama et al., 2008; Kageyama et al., 2013)。

4. 倫理的配慮

本臨床試験を行うに当たり、北海道大学医療倫理委員会（2009 年 3 月）の承認を受けており、治療前に全患者から書面でのインフォームドコンセントを取得している。すべての患者は、2009 年から 2012 年の間に北海道大学病院で CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法を受けた。本臨床試験は University Hospital Medical Information Network-Clinical Trials Registry （UMIN-CTR）に登録されている（UMIN ID：000001999)。また、本研究は「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。

5. 安全性と有効性の評価

有害事象の判定は CTCAE v3.0 を用いて評価した（CTCAE. JCOG, 2004)。有効性を評価するための免疫学的解析は、患者血清を用いた Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）法および PBMC を用いたフローサイトメトリーにて行った。臨床効果判定として、ワクチン投与前後に Computed Tomography（CT）検査を行い評価した。その際、Cancer Vaccine Clinical Trial Working Group の提言等に基づき RECIST 分類を変更した modified RECIST（mRECIST）分類を用いた(Hoos et al., 2007; Wolchok et al., 2009)（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：Partial 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	治療開始以降に記録された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

Ⅱ.患者末梢血を用いた免疫反応評価に関する実験手法

1. 実験材料

CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験患者のワクチン投与前（以下、ベースラインと記載）およびワクチン投与開始後 7 週、11 週、15 週で採取された患者末梢血を用いた。末梢血から血清成分を分離回収し、解析まで-80℃で保存した。PBMC は Ficoll-Paque Plus（GE ヘルスケア、ウプサラ、スウェーデン）を用いて採取し、グルタミン酸、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640 培地（和光純薬、大阪府、日本）で 2 回洗浄した後、回収した細胞を CELL BANKER（Serum containing cryopreservation medium、日本製薬工業（株））に入れ、解析に使用するまで-130℃で保存した。

2. MAGE-A4 特異的抗体反応検出（ELISA 法）

患者血清を一次抗体とし、二次抗体として Horseradish Peroxidase（HRP）標識抗ヒト IgG（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。免疫反応誘導の陽性判定基準は以下のように決定した。がんワクチン投与前の血清反応が陰性の症例では、ワクチン接種後にカットオフ値を超えた場合を陽性、ワクチン投与前に血清反応が陽性（以下、ベースライン陽性と記載）の症例ではワクチン接種後に投与前と比較し 2 倍以上に上昇した場合を陽性と定義した。

3. PBMC 中の制御性 T 細胞検出

3-1 細胞調整

凍結された PBMC を 37℃で 1 分間解凍した後、直ちに 10ml の Stain Buffer（2%牛胎児血清（Fetal Bovine Serum : FBS）+リン酸緩衝食塩水（Phosphate-Buffered Saline : PBS）に移し、20℃、1500 Rotation Per Minute（RPM）で 5 分間遠心分離して Dimethyl Sulfoxide（DMSO）を除去した。細胞ペレットを 10ml の Stain Buffer で再懸濁し、0.4%トリパンブルー染色溶液および光学顕微鏡を用いて計数した後、試料を同じ設定を用いて遠心分離し、1ml あたり 500 万個の細胞となるように Stain Buffer に再懸濁した。

3-2 抗体染色

試料は 1 試験管（12×75mm、5ml ポリスチレン丸底試験管）当たり 50 万個の細胞とし、細胞表面マーカーである CD4- Fluorescein Isothiocyanate（FITC）、CD25-Phycoerythrin-Cyanin 5（PE-Cy5）（BD Biosciences Pharmingen、San Diego、CA、USA：以下 BD と記載）、および各アイソタイプ抗体を試料に添加し、暗所で

20 分間インキュベートした。試料を Stain Buffer で洗浄した後、遠心分離し（20℃、10 分、1500 RPM）、上清を除去した。次に、細胞固定のため Human FoxP3 Buffer A（BD）1mL を細胞懸濁液に添加し、暗所で 10 分間インキュベートし、洗浄、遠心分離（20℃、5 分、3000 RPM）の後、膜透過処理のため上記 Human FoxP3 Buffer A で希釈した 0.5mL の Human FoxP3 Buffer B（BD）で再懸濁し、暗所で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、1mL の Stain Buffer を添加し、遠心分離（20℃、5 分、3000 RPM）、上清を除去した後、細胞を Stain Buffer で洗浄した。次いで、Phycoerythrin（PE） mouse anti-Human FoxP3（クローン：259D / C7、BD）、または PE マウス IgG1κアイソタイプコントロールを添加し、細胞懸濁液を暗所で 30 分間インキュベートした。洗浄後、細胞を 0.6mL の Stain Buffer に再懸濁し、フローサイトメトリーで分析した。以上の行程はすべて室温で行った。

3-3　フローサイトメトリー

CellQuest ソフトウェア（Becton Dickinson、USA）を使用して、全てのサンプルを FACS calibur フローサイトメーター（Becton Dickinson、San Jose、CA、USA）で解析した。本研究では Treg を古典的な定義である CD4 陽性、CD25 陽性、FOXP3 陽性の細胞集団として解析した。陰性対象をプロットし、Forward Scattered Light（FSC）および Side Scattered Light（SSC）電圧を、リンパ球集団が分離されるように調整した。リンパ球集団を定義するために、CD3-PE single stain control（eBioscience 、San Diego、CA、USA）を使用した。CD4 陽性リンパ球の集団を CD4-FITC 単染色サンプルによって決定し、四分割線を CD4-FITC、FoxP3-PE、CD25-PE-Cy5 を用いて、二重染色サンプルをプロットすることによって定義した。color voltage とコンペンセーション（蛍光補正）設定は単染色サンプルによって設定し、設定条件は全ての患者において同様に扱った。解析には PBMC 中のリンパ球集団にゲーティングした中の（図 1a）、CD4 陽性細胞 10,000 event を用いた（図 1b）。CD4 陽性細胞のゲーティング上の、CD25 陽性かつ FOXP3 陽性細胞の数を計測し（図 1c）、末梢循環型 Treg 比率（以下、Treg ratio と記載）を全 CD4 陽性リンパ球細胞中の百分率で表した。FACScalibur フローサイトメーターを用いてデータを解析し、その結果を CellQuest ソフトウェアによって分析した。

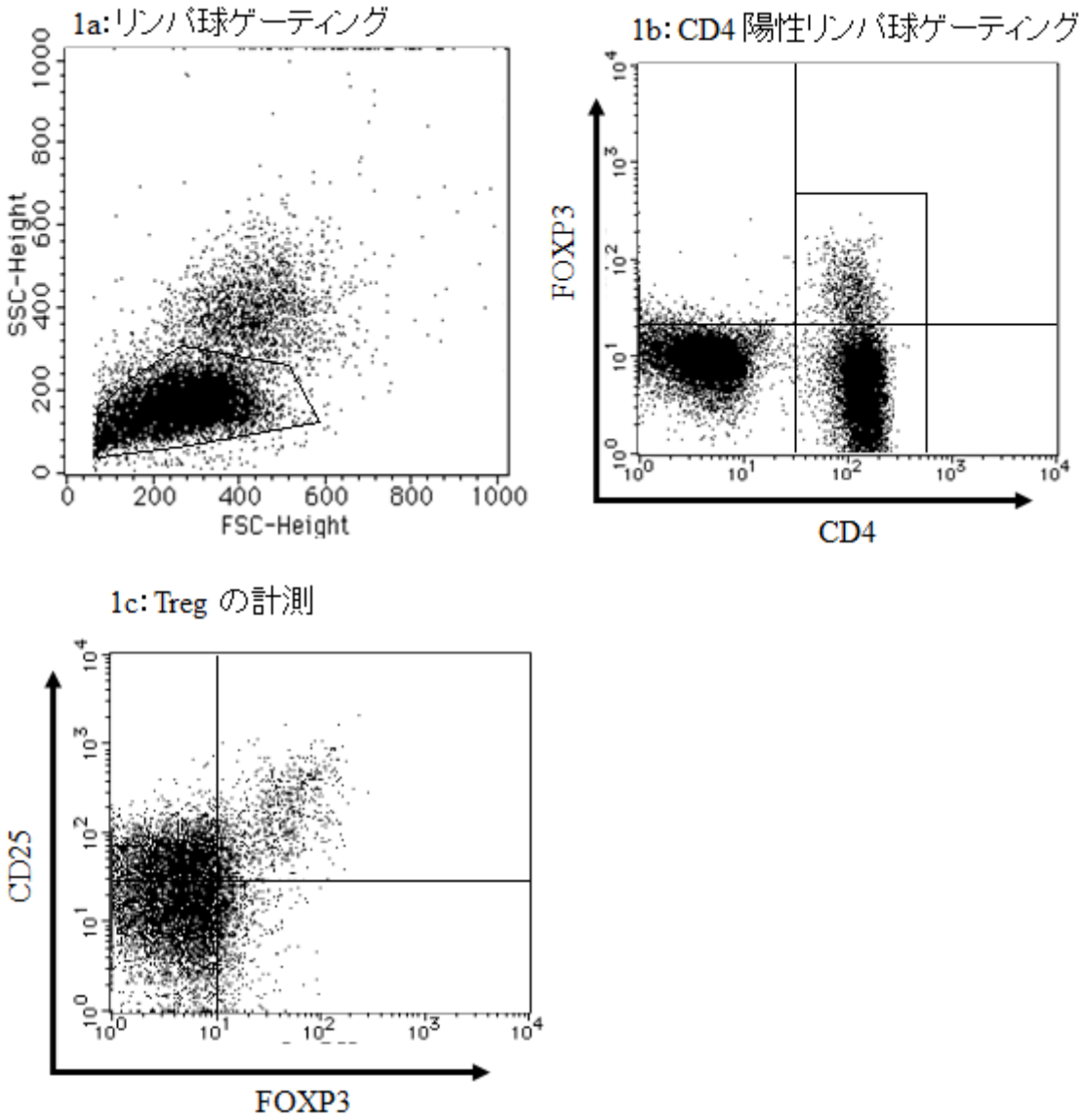

図 1　フローサイトメトリー

1a：PBMC をプロットし、リンパ球集団をゲーティングした。

1b：1a でゲーティングした集団をプロットした。その中で、CD4 陽性集団にゲーティングした（10,000 event を解析）。

1c：1b でゲーティングした集団（CD4 陽性リンパ球）をプロットした。その中で、CD25 陽性かつ FOXP3 陽性の細胞をカウントし、CD4 陽性リンパ球中の比率を Treg ratio と定義した。

Ⅲ.末梢血中制御性 T 細胞比率測定の意義に関する研究

1. 研究対象患者および材料

CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験に登録された 24 名の患者のうち、投与量が一定（CHP-MAGE-A4 がんワクチン 300μg と OK432 を 0.5KE）に固定され、かつワクチン投与が 4 回以上可能であった 16 名の患者を対象とした。対象患者のがんワクチン投与前（ベースライン）、初回ワクチン投与後 7 週、11 週、15 週の血清および PBMC サンプルを実験材料として用いた（図 2）。対照群として、健常人 9 名の PBMC を使用した。

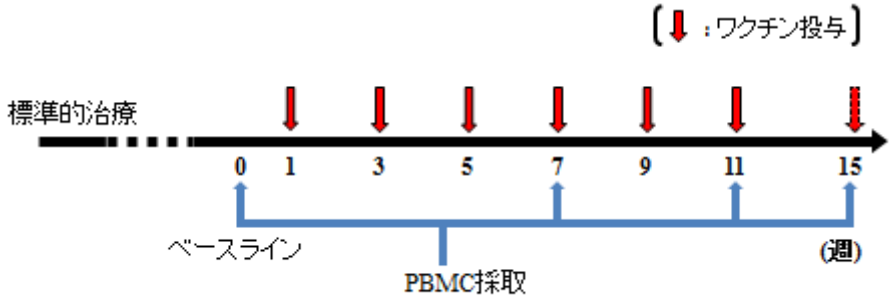

図 2　がんワクチン接種プロトコールと患者 PBMC 採血スケジュール

2. 末梢血中制御性 T 細胞比率（Treg ratio）測定

細胞調整および抗体処理を施した患者 PBMC を FACScalibur フローサイトメーターを用いて解析し、その結果を CellQuest ソフトウェアによって分析し、CD4 陽性リンパ球 10000 個中の $CD4^+CD25^+FOXP3^+$細胞数を算出した。その比率を百分率で表記し、Treg ratio と定義した。各サンプルから 3 回解析を行い、その平均値を測定値とした。

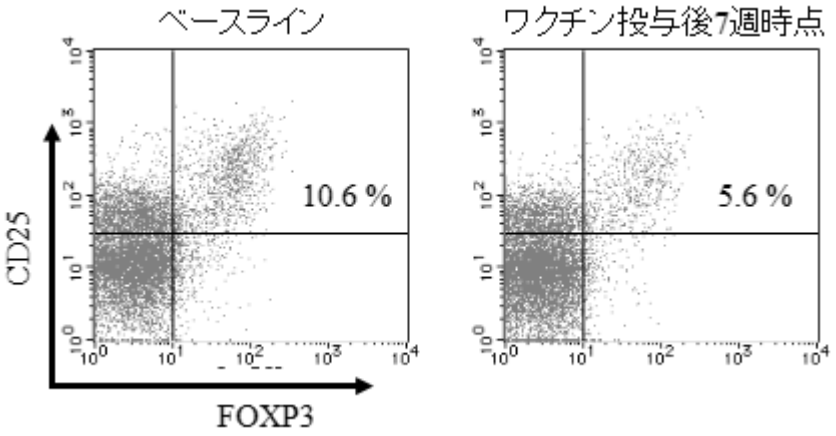

図 3　代表例の Treg ratio

図には代表例の Treg ratio を表示している。左側の図がベースラインのプロットで、右図がワクチン投与開始後 7 週時点のプロットを示している。CD25 陽性かつ FOXP3 陽性の範囲を $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Regulatory T cell：Treg と定義し、CD4 陽性リンパ球中の Treg の割合を計測し、Treg ratio（%）とした。

3. 統計手法

得られたデータは、中央値と範囲をもって提示し、p 値<0.05 を統計学的に有意であると判定した。全患者の生存期間は、最初のワクチン投与日から患者が死亡した日までの期間とした。群分けによる検討では、Fisher 正確確率検定および Mann-Whitney U 検定で統計分析し、生存解析には Logrank test を用いた。Treg ratio の比較検討では、ベースラインおよびワクチン投与後 7 週、11 週、15 週時点での患者 Treg ratio と健常人（HD）の Treg ratio を箱ひげ図で表し、Mann-Whitney U 検定によって統計分析した。全ての分析は、StatView 統計ソフトウェア（バージョン 5.0; SAS Institute Inc.、Cary、NC）を用いて行った。

結果

1. 患者背景

本臨床試験には第 1 相段階と第 2 相段階、合わせて 24 名の患者が登録された。そのうち本研究では、投与量が一定（CHP-MAGE-A4 がんワクチン 300μg と OK432 を 0.5KE）に固定され、かつワクチン投与が 4 回以上可能であった患者 16 名に焦点を絞り、研究を行った。16 名の患者は 9 名が結腸直腸癌、3 名が乳癌、4 名が他の癌（胆管癌、胆嚢癌、膵臓癌、中皮腫）であった。9 名が男性で、7 名が女性、年齢の中央値は 61.5 歳（34 歳から 79 歳）であった。16 名すべての患者が 4 回以上ワクチン投与を受け、12 名の患者が 6 回完遂していた。ワクチン投与は患者からの希望があれば、病状の悪化があるまで続けられた。ワクチン投与回数の中央値は 6 回であった（最少 4 回から最多 21 回）。CTCAE のグレード 3 以上の有害事象は認めなかった。最も頻度が高かった副作用は、すべての患者で注射部位に起きたグレード 1 の皮膚発赤で、自然軽快し特別な治療は必要としなかった。4 回ワクチン投与後、mRECIST criteria に従って評価した臨床効果では、7 名が Stable Disease（SD）となり、9 名が Progressive Disease（PD）であった。CR と PR は認めなかった（表 2）。患者 16 名は観察期間中に全例が死亡しており、生存期間の中央値は 4.8 か月（1.9 から 17.0 か月）であった（図 4）。

表 2　患者背景

性別	男／女	9／7
年齢（歳）	中央値（範囲）	61.5（34-79）
癌腫	大腸癌／乳癌／その他	9／3／4
PS*	1／0	14／2
臨床効果	CR / PR / SD /PD	0／0／7／9
有害事象	Grade Ⅰ／Ⅱ以上	16／0

＊PS: Performance Status

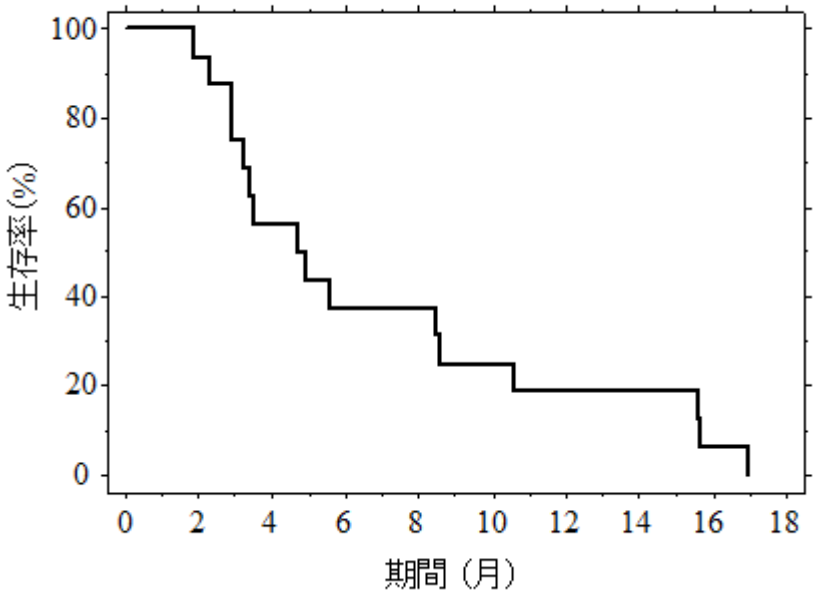

図 4　全症例の生存曲線

観察期間中に全症例が死亡しており、生存期間の中央値は 4.8 か月であった。

2. MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価の上昇

研究対象患者 16 名の内、MAGE-A4 特異的免疫反応（IgG）が誘導された患者は 10 名であった。その内訳は、ワクチン投与前の抗体価上昇がなく、投与により上昇した症例が 8 名（症例 1, 3, 7, 10, 11, 12, 14, 16）で、ワクチン接種後にベースラインと比較し、2 倍以上に上昇した症例が 2 名（症例 6, 9）であった（表 3)。

表 3　MAGE-A4 特異的抗体価の評価

個々の症例の CHP-MAGE-A4 がんワクチン投与後の MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇の有無について表示した。（＋）は抗体価がカットオフ値以上であったことを示し、（－）はカットオフ値以下であったことを示している。＊症例 6 と 9 はベースラインから抗体価が陽性で、ワクチン投与により、2 倍以上に上昇し、抗体価上昇ありと判定した。

	MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価		
症例	ベースライン	ワクチン接種後	抗体価上昇の判定
1	－	＋	上昇あり
2	－	－	－
3	－	＋	上昇あり
4	－	－	－
5	＋	＋	－
6	＋	＋	上昇あり＊
7	－	＋	上昇あり
8	＋	＋	－
9	＋	＋	上昇あり＊
10	－	＋	上昇あり
11	－	＋	上昇あり
12	－	＋	上昇あり
13	＋	＋	－
14	－	＋	上昇あり
15	＋	＋	－
16	－	＋	上昇あり

3. Treg ratio の解析：健常人サンプルを用いた解析精度の検証

解析精度の検証として、健常人 A の PBMC を 2 度解析し、データのばらつきを評価したところ、平均値は 7.97 と 7.71%で、標準偏差は 0.57 と 0.44 であった（表 4)。健常人 B の PBMC を凍結前と凍結後で 2 度解析したところ、平均値は 8.01 と 7.81%で、標準偏差は 0.55 と 0.19 であった（表 5)。健常人 9 名の Treg ratio を測定し（図 5)、対照群として扱った。各健常人（A～I）の 3 回の解析における標準偏差は 0.18 から 0.77 であった（図 5)。

表 4　健常人 A の Treg ratio 解析

健常人 A の PBMC を 3 サンプルずつ、2 度解析した結果を示している。

	サンプル①	サンプル②	サンプル③	平均値	標準偏差
1 回目	7.94%	8.69%	7.29%	7.97%	0.57
2 回目	7.91%	8.13%	7.09%	7.71%	0.44

表 5　健常人 B の Treg ratio 解析

健常人 B の PBMC を 3 サンプルずつ、凍結前と凍結後の 2 度解析した結果を示している。

	サンプル①	サンプル②	サンプル③	平均値	標準偏差
未凍結	7.33%	8.22%	8.67%	8.01%	0.55
凍結	7.75%	8.07%	7.62%	7.81%	0.19

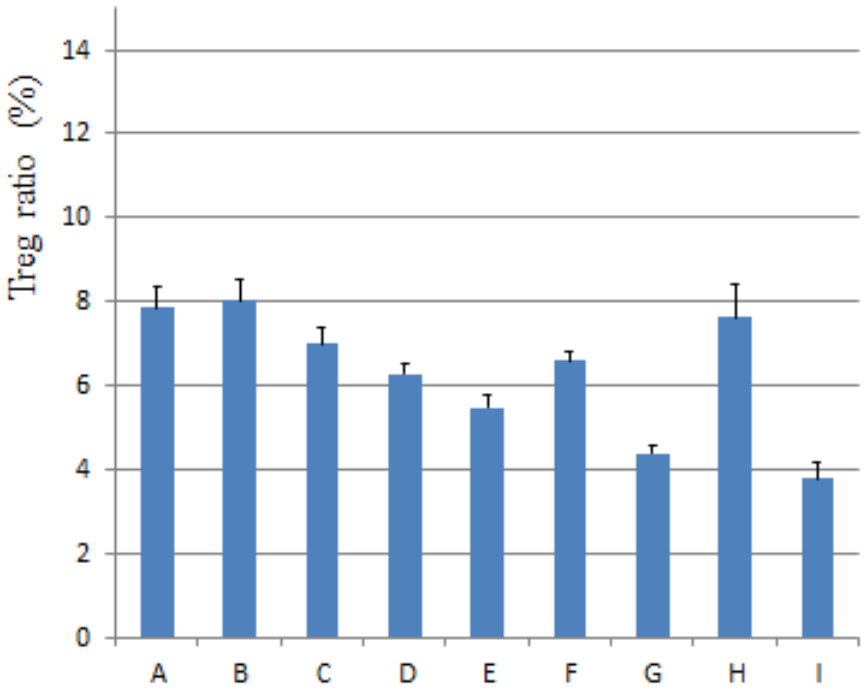

図 5　健常人 9 名の Treg ratio

健常人 A から I まで 9 名の Treg ratio を示した。棒グラフの値は 3 回の解析の平均値を表示し、エラーバーは標準偏差を表している。

4．臨床試験患者 16 名の Treg ratio 解析

4-1．ベースライン Treg ratio

全 16 名のベースライン Treg ratio の中央値は 10.28 %で、健常人 9 名の中央値（6.60 %）よりも有意に高値であった（p 値=0.001）。ベースライン Treg ratio が治療後の効果予測、予後予測に利用可能かを検証するため、中央値である 10.28 %をカットオフ値として 2 群に分け、背景因子および、治療後の臨床経過について検討した。表 6 のように 2 群間の背景因子に差は認められなかった。臨床経過については MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇の有無、mRECIST による腫瘍縮小効果判定、生存期間に有意差を認めなかった（表 7）。Treg ratio を 2 群に分けた生存曲線を示す。（図 6）

表 6　ベースライン Treg ratio による群分け：患者背景

	ベースライン Treg ratio		有意差
	低値群	高値群	
性別（男／女）	5／3	4／4	なし
年齢（範囲：中央値）	48-78：61	34-79：62	なし
癌腫（大腸／乳腺／その他）	5／0／3	4／3／1	なし
MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価ベースライン陽性（＋／－）	3／5	3／5	なし

表 7　ベースライン Treg ratio による群分け：臨床経過

	ベースライン Treg ratio		有意差
	低値群	高値群	
ワクチン投与回数（範囲：中央値）	5-16：7	4-21：6	なし
mRECIST（SD／PD）	5／3	2／6	なし
ワクチン投与後 MAGE-A4 特異的 IgG 上昇（＋／－）	6／2	4／4	なし
生存（生／死）	0／8	0／8	なし
生存期間（範囲：中央値）	96-509：201.5	56-470：96.5	なし

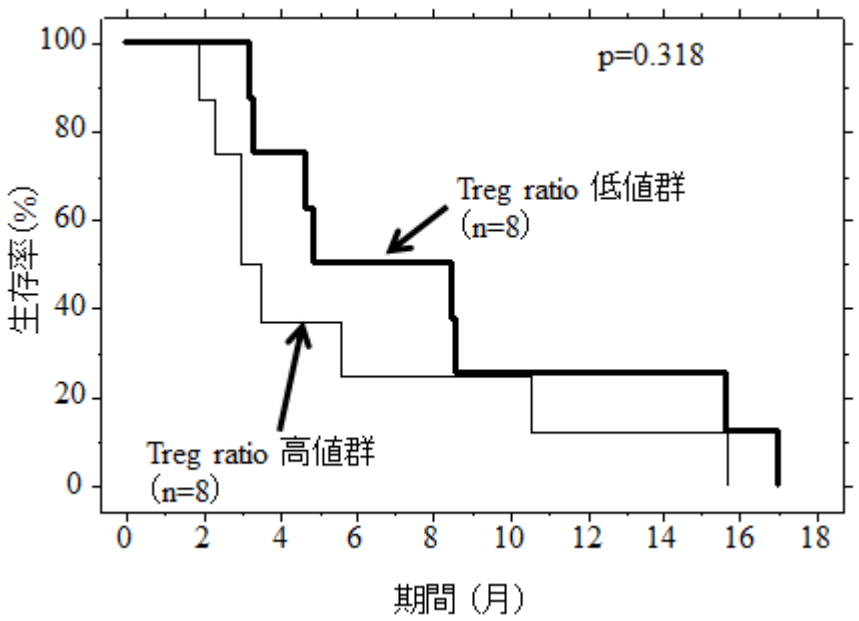

図 6　ベースライン Treg ratio で群分けした生存曲線

臨床試験患者 16 名の生存曲線を示す。16 名をベースライン Treg ratio が低値群と高値群に分け（カットオフ値 10.28 %）、生存率を解析した。両群間に有意差は認めなかった（Logrank test p=0.318）。

4-2. 臨床試験患者のワクチン投与後 Treg ratio

4-2-1. Treg ratio の経時的推移

臨床試験患者のワクチン投与開始後、7 週後、11 週後、15 週後における Treg ratio の中央値は 10.21 %、8.43 %、7.74 %であり、これらすべての時点で健常人と比較すると有意に高値であった（図 6）。Treg ratio の推移をみると、Treg ratio はベースラインに対して治療経過の中で低下する傾向にあり、初回投与から 15 週時点の Treg ratio は治療前に比べ有意に低値であった（p=0.027 図 7）。しかしながら、個々の症例の推移を詳細にみると、必ずしも全症例の Treg ratio が時間経過の中で低下を示すわけではなく、上昇するものや、一旦低下した後に再上昇するような症例もあり、一定の傾向はみられなかった。全症例の推移と 15 週時点までデータ収集が可能であった代表例 9 名の推移を示す（図 8）。

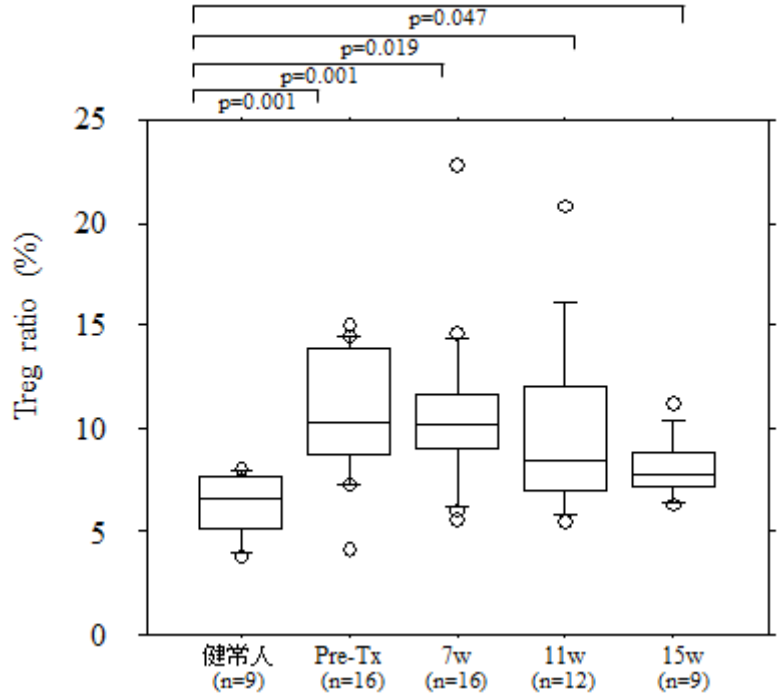

図 6　Treg ratio の経時的推移

ベースライン、およびワクチン投与開始後各時点での Treg ratio と健常人との比較を示す。健常人と比較し、すべての時点で有意に Treg ratio は高値であった（Pre-Tx：ベースライン値、7W/11W/15W：ワクチン投与開始後 7 週、11 週、15 週時点での値）。

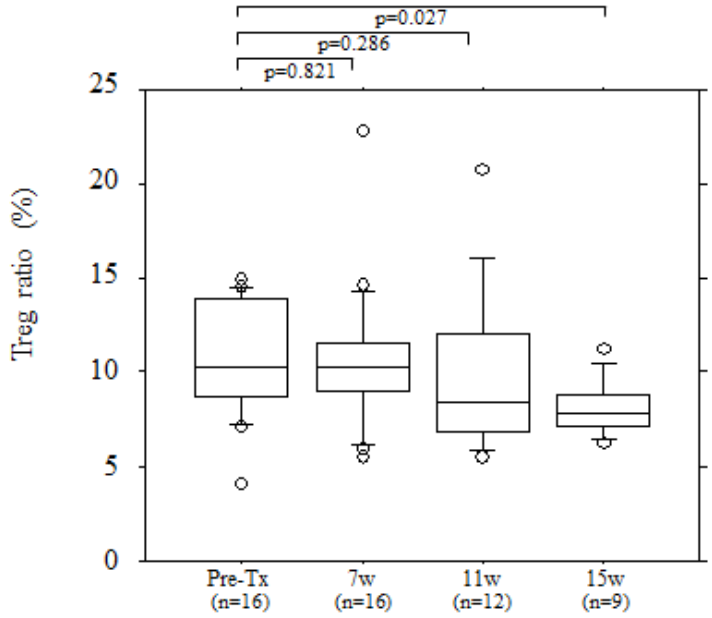

図 7　ベースラインとワクチン投与後 Treg ratio の比較

ベースライン、およびワクチン投与開始後各時点での Treg raio の推移を示す。Treg raio は低下する傾向にあり、15 週時点では、ベースラインに比べ、有意に低値であった（p=0.027、Pre-Tx：ベースライン値、7W/11W/15W：ワクチン投与開始後 7 週、11 週、15 週時点での値）。

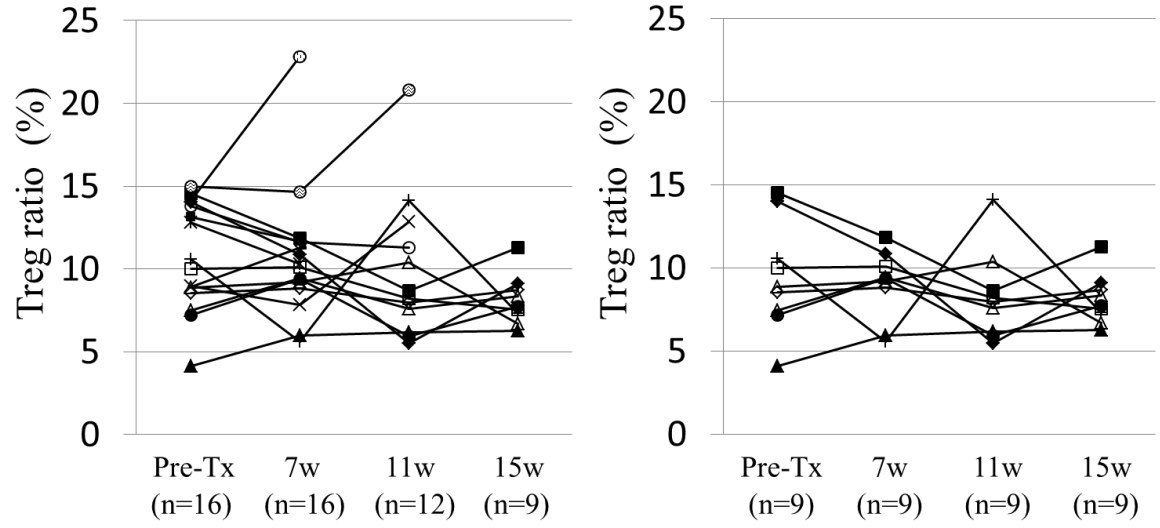

図 8　Treg ratio 経時的推移：全症例と代表例 9 例

全症例（左図）と 15 週時点までサンプル収集が可能であった 9 例（右図）の経時的変化を示す。一定の傾向はみられなかった（Pre-Tx：ベースライン値、7W/11W/15W：ワクチン投与開始後 7 週、11 週、15 週時点での値）。

4-2-2. ワクチン投与後 7 週時点の Treg ratio

ワクチン投与開始後 7 週時点の Treg ratio が治療経過を予測しうるか検討した。前述のベースライン Treg ratio 中央値 10.28 %をカットオフ値として、2 群に分け、背景因子および臨床経過ついて解析した。表の如く、患者背景では性別、年齢、癌腫、ベースラインでの MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇の有無に差はなかったが、ベースライン Treg ratio は低値群で有意に低く、高値群で有意に高かった。臨床経過においては、治療後の生存期間、SD／PD の割合、ワクチン投与回数に有意差がみられた。一方で、MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇の有無とは関連がみられなかった。2 群に分けた生存曲線を示す（図 9)。Treg ratio 低値群の生存期間が有意に長かった（Logrank test p=0.0198)。

表 8　ワクチン投与後 7 週時点 Treg ratio による群分け：患者背景

	ワクチン投与後 7 週 Treg ratio		p 値
	低値群	高値群	
性別（男／女）	6／2	3／5	N.S
年齢（範囲：中央値）	48-79：62.5	34-71：59	N.S
癌種（大腸／乳腺／その他）	4／0／4	5／3／0	N.S
MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価 ベースライン陽性（＋／－）	3／5	3／5	N.S
ベースライン Treg ratio （低値群／高値群）	7／1	1／7	p=0.01

N.S：Not Significant

表 9　ワクチン投与後 7 週時点 Treg ratio による群分け：臨床経過

	ワクチン投与後 7 週 Treg ratio		p 値
	低値群	高値群	
ワクチン投与回数 （範囲：中央値）	6-21：8	4-10：5.5	p=0.01
mRECIST（SD／PD）	6／2	1／7	p=0.04
ワクチン投与後 MAGE-A4 特異的 IgG 上昇（＋／－）	6／2	4／4	N.S
生存（生／死）	0／8	0／8	N.S
生存期間（範囲：中央値）	96-509：256	56-317：94.5	p=0.02

N.S：Not Significant

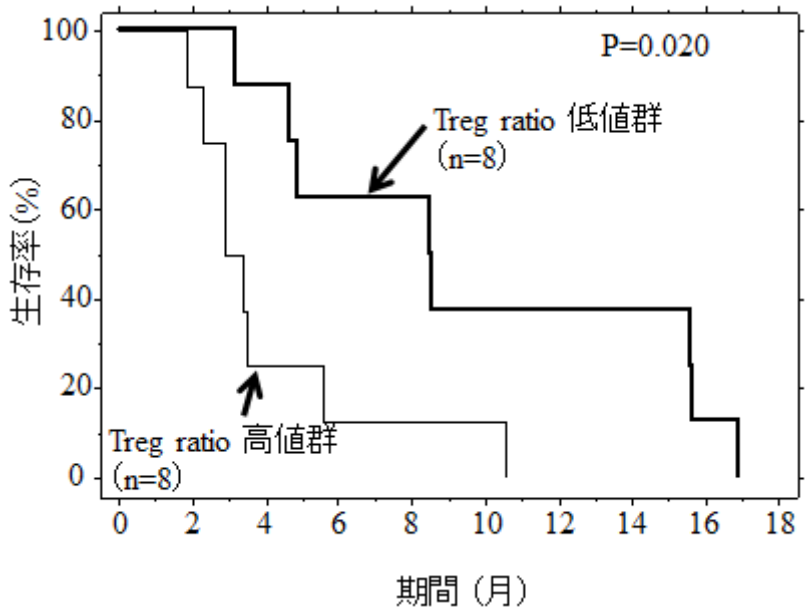

図 9　ワクチン投与後 7 週時点 Treg ratio によって群分けした生存曲線

ベースライン Treg ratio 中央値（10.28 %）をカットオフ値とし、Treg 低値群と Treg 高値群に分け、生存解析を行った。Treg 低値群が有意差をもって生存期間が長かった（Logrank test p=0.020）。

4-2-3　ベースラインと投与開始後 7 週時点の Treg ratio 比較

個々の患者においてベースラインとワクチン投与後 7 週の Treg ratio を比較検討した（表 10）。ベースラインで高値群であったが、ワクチン投与後 7 週時点で低値群に移行した症例が 1 名（症例 5）、逆にベースラインで低値群、ワクチン投与後 7 週で高値群へ移行した症例が 1 名（症例 8）であった。これらの症例以外はベースライン、ワクチン投与後 7 週時点、ともに低値群が 7 名（症例 1, 3, 6, 10, 11, 13, 14）、高値群のままの症例が 7 名（症例 2, 4, 7, 9, 12, 15, 16）であった。高値群から低値群へ移行した症例 5 の生存期間は 470 日間、低値群から高値群へ移行した症例 8 の生存期間は 101 日間であった（全症例の生存期間の中央値は 144.5 日）。ベースラインからワクチン投与後 7 週時点に低値群のまま維持された症例は症例 1, 3, 6, 10, 11, 13, 14 で、それぞれ生存期間は 96, 148, 469, 509, 141, 255, 257 日間、高値群のままだったのは症例 2, 4, 7, 9, 12, 15, 16 で生存期間はそれぞれ 88, 88, 56, 69, 317, 105, 167 日間であった。前者の方が有意差を持って生存期間が長かった（Mann-Whitney U test: p=0.047 ）。

表 10　ベースラインからワクチン投与後 7 週時点への Treg ratio の変化

全 16 症例の詳細を表示している。（低）、（高）はカットオフ値（10.28 %）に対して低値群か高値群かを示している。

症例	年齢	性別	ワクチン投与回数	Treg ratio		生存期間（日）
				ベースライン	7週	
1	62	M	6	低	低	96
3	48	F	7	低	低	148
6	63	M	15	低	低	469
10	58	M	15	低	低	509
11	78	M	7	低	低	141
14	60	M	6	低	低	257
13	63	F	11	低	低	255
2	63	F	6	高	高	88
4	55	F	4	高	高	88
7	61	F	4	高	高	56
9	37	F	5	高	高	69
12	34	M	10	高	高	317
15	71	M	6	高	高	105
16	71	M	6	高	高	167
5	79	M	21	高	低	470
8	57	F	5	低	高	101

4-2-4. ワクチン投与後 11 週時点、15 週時点 Treg ratio

ワクチン投与後 11 週時点と 15 週時点での Treg ratio によって、臨床経過および予後を予測しうるかをワクチン投与後 7 週時点の Treg ratio と同様の検討を行ったが、いずれの項目も有意差を認めなかった。

表 11　ワクチン投与後 11 週、15 週時点 Treg ratio 解析のまとめ

	11週 Treg ratio 低値群／高値群		p値	15週 Treg ratio 低値群／高値群		p値
背景因子						
症例数	7	5		8	1	
性別(男／女)	5/2	4/1	N.S	6/2	1/0	N.S
年齢	34-71:63	58-79:63	N.S	48-79:63	34	N.S
癌種(大腸／乳腺／その他)	4/0/3	2/1/2	N.S	4/0/4	1/0/0	N.S
ベースラインIgG陽性(＋／－)	2/5	2/3	N.S	3/5	0/1	N.S
ベースラインTreg ratio(高/低)	2/5	3/2	N.S	6/2	0/1	N.S
臨床経過						
ワクチン投与回数(範囲)中央値	(6-16) 7	(6-21) 6	N.S	(6-21) 8	10	N.S
mRECIST(SD／PD)	5/2	2/3	N.S	6/2	1/0	N.S
ワクチン投与後IgG上昇(＋／－)	6/1	2/3	N.S	6/2	1/0	N.S
生存(生／死)	0/7	0/5	N.S	0/8	0/1	N.S
生存期間 (範囲)中央値	(141-469) 255	(88-509) 105	N.S	(148-509) 256	317	N.S

N.S: Not Significant

4-2-5. Treg ratio と MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇との関連

がんワクチンの特異的免疫誘導能と Treg ratio の相関を検討するため、MAGE-A4 特異的 IgG の上昇の有無によって群分けし、Treg ratio を比較した。ワクチン投与前、7 週時点、11 週時点、15 週時点のいずれの時点においても両群間の Treg ratio に統計学的な有意差は認められなかった（図 10 ; Mann-Whitney U 検定、p=0.52、0.39、0.089、0.77）。

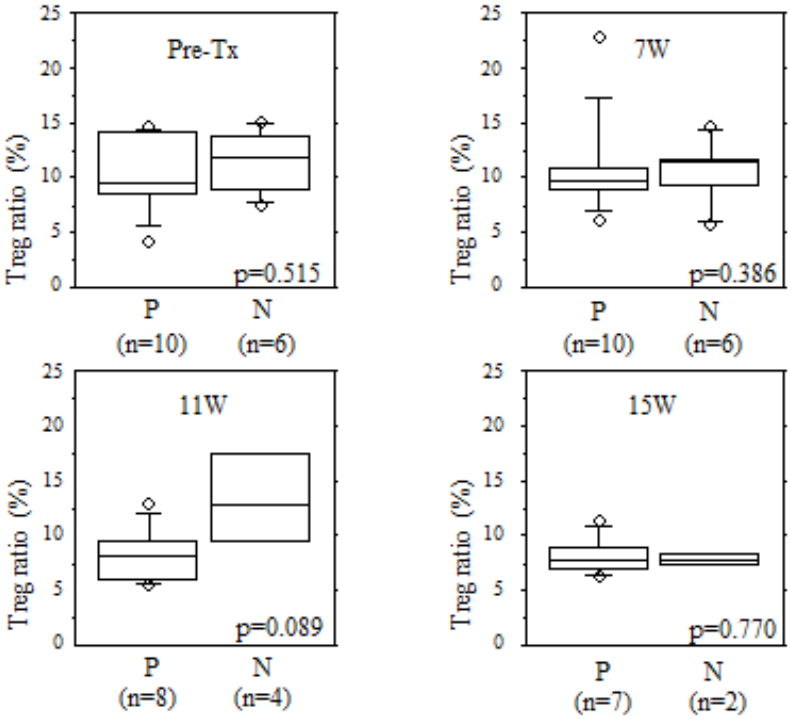

図 10　Treg ratio と MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇との関連

MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価の上昇の有無により群分けし、両群間でベースライン、およびワクチン投与開始後各時点での Treg ratio に差があるか比較した。どの時点においても両群間に有意差は認めなかった。（P : MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇有、N : 抗体価上昇無、Pre-Tx : ベースライン、7W/11W/15W : ワクチン投与開始後 7 週、11 週、15 週時点）。

考察

がんワクチン療法は、「腫瘍関連抗原」を外部から投与し、生体内の免疫細胞を介して能動的に抗原特異的細胞障害性 T 細胞を誘導しようとする治療法である。化学療法や分子標的療法と比較して特異的免疫反応誘導には時間を要するため、遅発性に抗腫瘍効果が現れる場合がある。治療効果判定に従来の RECIST を用いて無増悪生存期間（Progression Free Survival：PFS）を評価すると、SD や PD と判定される症例でも治療を継続することで腫瘍が縮小する可能性があり、本来の治療効果よりも過小評価される点が問題として指摘されている(Small et al., 2006)。このような背景から、治療によって期待される抗腫瘍効果が生体内に誘導されているかどうかを知る方法として、免疫反応を評価する手法を確立することが期待されている。

過去の CHP-MAGE-A4 がんワクチン臨床試験で採用されている免疫学的評価方法は、標的抗原に特異的な抗体産生能を評価する ELISA 法や、抗原刺激により誘導された細胞障害性 T 細胞（Cytotoxic T-Lymphocyte：CTL）を定量的に直接評価する Enzyme-Linked Immunospot（ELISPOT）が主に使用されている(Saito et al., 2014; Ueda et al., 2018)。末梢循環型 Treg 比率測定の有用性が明確に示された報告はなく、Saito ら(Saito et al., 2014)のグループからの報告では、がんワクチン接種後の末梢循環型 Treg 比率が低値である方が、より生存期間が長い傾向にあることが指摘されているのみである。

Treg を解析する際は、末梢循環型の他に腫瘍微小環境における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）中の Treg を腫瘍検体を用いた免疫組織化学法（Immunohistochemistry：IHC）で解析する方法がある。腫瘍局所の Treg 浸潤が多いことが予後不良と関連があることは多くの固形癌で示されており(Curiel et al., 2004; Sasada et al., 2003; Wolf et al., 2005)、腫瘍組織検体を用いた解析は直接的な抗腫瘍環境の評価や治療効果予測の上で有用な方法である(Fujii et al., 2018)。一方で、実臨床では腫瘍検体を頻回に採取することは難しいという欠点がある。その点で、本研究で用いた血液サンプルは頻回な採取が可能であり、最小限の侵襲的で包括的な情報を得られるメリットがあり(Lim et al., 2018)、主に治療反応性をみるような免疫モニタリングには有用と考えられる。PBMC 中に存在する Treg、すなわち末梢循環型の Treg を解析する際はフローサイトメトリーで細胞数を測定する手法が用いられる。本検討では古典的な Treg の分類である CD4 陽性、CD25 陽性、FOXP3 陽性リンパ球を Treg と定義し、フローサイトメトリーにて CD4 陽性リンパ球中の Treg 比率を測定し、これを Treg ratio として扱うことで、がんワクチン療法におけるバイオマーカーとしての意義について探索した。得られた結果をもとに治療前（ベースライン）に治療効果および予後を予測しうるか、治療開始後のモニタリングおよび予後予測が可

能かについて考察した。

一般的に末梢循環型 Treg 比率は治療前の癌の進行度が高いほど高値であることが他の固形癌で示されており(Shen et al., 2010; Wei et al., 2015; Zhang and Huang, 2016)、測定時点での癌の病勢、およびその後の自然経過を予測する指標となる可能性が示唆されている。本研究のベースラインの解析では、Treg ratio が低値である群と高値である群の間に臨床経過および治療後の生存率に差がなかった(表 7、図 6)。従来の知見によれば Treg ratio 高値群は予後不良となることが予測されるが(Boucek et al., 2010)、本研究では異なる結果であった。その要因として、対象患者が 16 名と少数であり、さらに各患者の背景因子が異なるため、Treg ratio が単純に癌の病勢を反映していない可能性と、ベースライン Treg ratio 高値群の中に CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法の治療効果により予後が改善された症例が含まれている可能性が挙げられる。後者の可能性を検証するため、がんワクチンによる特異的免疫誘導の指標である MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価上昇との関連を検証した。しかしながら、ベースライン Treg ratio 高値とベースライン MAGE-A4 特異的 IgG 抗体価陽性、および治療開始後の抗体価上昇の有無の、いずれとも関連は見いだせず（表 7、図 10)、前者の影響が強いものと考えられた。以上のように、本研究のベースラインの解析では、末梢循環型 Treg 比率を表す Treg ratio は MAGE-A4 がんワクチンの治療反応性を予測する指標とは言えない結果であった。

がんワクチン治療後の解析では、ベースラインに比べ患者 Treg ratio の中央値は低下する傾向にあり、投与開始後 15 週時点では有意に低値であった(図 7 p=0.027)。これは、脱落せずに投与を継続し、データ収集が可能であった症例群の Treg ratio が比較的低値で維持されていたためと考えられた。具体的には 11 週時点での症例数は 12 例であり、対象症例 16 名から 4 名が病勢の進行や死亡によりデータ収集の対象から脱落し、15 週時点では、さらに 3 名が同様に脱落していたことが、データに影響を与えたと考えられる。

また、治療後予後予測に関する解析では、ワクチン投与後 7 週時点で Treg ratio が低値である方が有意に予後良好であった（図 9、p=0.020)。予後良好であった 7 週時点での Treg ratio 低値群ではベースラインから低値を維持されていた症例が 8 例中 7 例であり、高値群へ移行した症例は 1 例のみであった（表 10)。Treg ratio がベースラインから治療開始後 7 週時点まで低値で維持し続けた群の予後が良いことが示唆された。ベースラインの Treg ratio 単独では予後予測の指標にはならなかったが、ワクチン投与後 7 週時点の Treg ratio との組み合わせで予後を予測する指標となり得ると考えられた。

がんワクチンにおける末梢循環型 Treg 比率の治療効果や予後に関する知見は、肺癌に対するペプチドワクチン(Hansen et al., 2015)や、各種固形癌に対する

Dendritic Cells（DC）ワクチン(Wada et al., 2008)、神経膠芽腫に対する DC ワクチン(Fong et al., 2012)で報告があり、治療後高レベルの Treg 比ががんワクチンの治療効果を低下させ、予後が不良であることが示されているが、いずれも少規模での検討が少数あるのみである。さらにその機序に関しても、末梢循環型 Treg 比率の低下と Interferon（INF）γ/IL10 比の増加が関連していること(Hansen et al., 2015)や、腫瘍反応性の T 細胞の増加と関連していること(Scurr et al., 2017)が示唆されているが、詳細についてはいまだ明らかになっていない。

末梢血 CD4 陽性 T リンパ球のサブセットは細胞性免疫の誘導を担う T helper（Th）1 とアレルギー反応に関わる Th2、液性免疫の誘導に関わる T follicular helper（Tfh）、炎症の誘導・維持を担う Th17 細胞、免疫抑制を担う Treg が含まれる。それぞれ可塑性を有しており、サイトカイン環境に基づいて分化し、免疫環境のバランスを維持している(Abbas et al., 1996; Nakayamada et al., 2012)。CD4 陽性リンパ球における Treg の比率を評価した指標である Treg ratio が高値である状態は、前述のバランスが相対的に Treg 優位な環境にあるといえる。そのため、Treg ratio が低く維持された状況は逆に Treg の Th1 や CTL に対する抑制機能が低く抑えられている状態であり、抗腫瘍免疫が惹起されやすかったのではないかと推測される。近年の研究では、PBMC 中のバイオマーカーとして Treg 比率以外にも CD4 リンパ球に対する CD8 の比率や、ケモカインレセプターCCR7(Czystowska et al., 2013; Farsaci et al., 2016)、免疫抑制分子である PD-1 の発現頻度が効果予測のバイオマーカーになりえるという報告もある(Arrieta et al., 2017; MacFarlane et al., 2014)。さらに MDSC が Treg に対して補完的に関与するといった知見もあり(Mahnke and Roederer, 2007)、PBMC における他の CD4 陽性 T リンパ球サブセット、および免疫抑制機能を持つMDSCなどの免疫細胞についての包括的な解析が必要であることが示されており(Dang and Disis, 2009)、本検討においては、これらに対する検討が不足していると考えられた。

本検討のもう一つの問題点として、末梢血に循環する Treg の不均一性が挙げられる。Treg は末梢血中の CD4 リンパ球中の約 10%程度存在するとされるが、それらは単一な細胞集団ではなく、その機能により 3 つの集団にわけられることが近年の研究において示されている(Miyara et al., 2009)。すなわち FOXP3 の発現が低く、CD45RA が陽性である、naïve Treg、FOXP3 を高発現し、CD45RA が陰性の effecter Treg（e Treg）、TCR 刺激を受け一時的に FOXP3 を発現している non Treg の 3 タイプが挙げられ、抑制機能を持つのはこの中の e Treg であり、腫瘍局所ではこのエフェクター型が多く浸潤していることが明らかとなった(Nishikawa and Sakaguchi, 2014)。この腫瘍浸潤 e Treg は CTLA4、PD-1、T-Cell Immunogloblin and mucin domain-3（TIM-3）、ケモカインレセプターCCR4 を高発現し、これら

の分子を介して抗腫瘍免疫を抑制していると考えられている(Nishikawa and Sakaguchi, 2014)。このため、本検討で用いた PBMC 中の $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg による分類だけでは直接的に Treg の免疫抑制機能を評価していない(Tanaka and Sakaguchi, 2017)ことや、末梢血と腫瘍局所では Treg の分布に相関がみられないという可能性も示唆されている(Pircher et al., 2014)。今後、末梢循環型 Treg 比率低値が、がんワクチンによる CTL 誘導に有利な環境を反映しているかを明確にするために、上記のような他の免疫担当細胞の解析、e Treg の解析を検討するべきと考えられる。そのためには、末梢血において Th17 や Tfh に特異的な IL17 や IL21 のサイトカインの産生パターン解析や、本研究で用いた Treg の分類（CD4、CD25、Foxp3）に加え、CD45RA を加えた Treg の詳細な分類と e Treg の動向を解析することが必要である。

これまでに様々な抗原に対するがんワクチンの臨床試験が行われてきたが、がんワクチン療法単独での治療では、治療効果が限定的である場合が多いことがわかってきており(Melero et al., 2014)、近年の免疫チェックポイント分子の解明、およびその阻害剤が劇的な成果を上げていることを受け、がんワクチン療法の今後の戦略としてエフェクター細胞を増強するだけでなく、Treg を含む腫瘍免疫逃避機構を解除する戦略が重要視されている(Berzofsky et al., 2018)。その中で、ベースライン末梢循環型 Treg 比率がメラノーマに対する抗 CTLA4 治療薬（Ipilimumab）の効果予測になること(Simeone et al., 2014)や、治療後の末梢循環型 Treg 比率の低下が良好な治療効果と関連があること(Weber et al., 2013)が示されており、今後、末梢循環型 Treg 比率のバイオマーカーとしての意義もさらに高まる可能性があり、本研究の結果はその一助になり得ると考えられた。

総括および結論

① 本研究から得られた新知見

1. CHP-MAGE-A4 がんワクチン療法において、治療開始後 7 週時点での PBMC 中の CD4 陽性リンパ球に占める $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 比率が低い群は、高い群に比べ治療後の生存期間が有意に長い。

2. CHP-MAGE-A4 がんワクチン接種患者において、治療前から治療後 7 週時点まで PBMC 中の CD4 陽性リンパ球に占める $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 比率が低く維持された症例は生存期間が有意に長い。

② 新知見の意義

CHP-MAGE-A4 がんワクチン接種患者において、治療前後の血液サンプルを採取して、PBMC 中の CD4 陽性リンパ球に占める $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 比率をモニタリングすることで治療後の予後予測が可能である。

③ 新知見に基づき今後展開されうる研究

今後、がんワクチン療法、および他の免疫療法においても治療前後で PBMC 中の CD4 陽性リンパ球に占める $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 比率に関する研究を行い、普遍的な予後予測のバイオマーカーとして利用可能かを検証する研究が考えられる。

④ 今後の課題

臨床試験のデザインとして本研究は母数が少なく、背景因子が不揃いであった点が問題である。そのため、患者母数の多い、背景因子を揃えた研究での検証が必要である。また、本研究において PBMC 中の CD4 陽性リンパ球に占める $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 比率を Treg ratio として解析したが、他のリンパ球サブセットに関する情報や免疫担当細胞の情報が不足していた。今後、これらを同定するマーカーを用いた包括的な PBMC 解析を行う必要があると考えられる。

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 平野聡教授に深謝の意を表します。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 土川貴裕講師に深く感謝いたします。また、2012 年 9 月に急逝される直前まで研究チームの指導者としてご指導を下さいました、故宮本正樹先生に深く感謝いたします。

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珠玖洋教授、影山愼一教授、宮原慶裕准教授ならびに長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻腫瘍医学分野池田裕明教授には、研究手法および論文作成に関する御指導を頂きまして誠に有難うございました。また、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、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く感謝いたします。最後に、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 II の研究グループで共に研究を行った、京極典憲先生、安孫子剛大先生、宮谷内健吾先生、武内慎太郎先生、桑谷俊彦先生、ならびにご協力を頂いた教室員の皆様に心より感謝いたします。

利益相反

本研究には開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 383, 787-793.

Aoki, M., Ueda, S., Nishikawa, H., Kitano, S., Hirayama, M., Ikeda, H., Toyoda, H., Tanaka, K., Kanai, M., Takabayashi, A., et al. (2009). 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.

Arrieta, O., Montes-Servin, E., Hernandez-Martinez, J.M., Cardona, A.F., Casas-Ruiz, E., Crispin, J.C., Motola, D., Flores-Estrada, D., and Barrera, L. (2017). Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients. Oncotarget 8, 101994-102005.

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

Berzofsky, J.A., Terabe, M., Trepel, J.B., Pastan, I., Stroncek, D.F., Morris, J.C., and Wood, L.V. (2018). Cancer vaccine strategies: translation from mice to human clinical trials. Cancer Immunol. Immunother. 67, 1863-1869.

Beyer, M., and Schultze, J.L. (2006). Regulatory T cells in cancer. Blood 108, 804-811.

Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (2006). Human T cell responses against melanoma. Annu. Rev. Immunol. 24, 175-208.

Boucek, J., Mrkvan, T., Chovanec, M., Kuchar, M., Betka, J., Boucek, V., Hladikova, M., Betka, J., Eckschlager, T., and Rihova, B. (2010). Regulatory T cells and their prognostic value for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. J. Cell. Mol. Med. 14, 426-433.

Caballero, O.L., and Chen, Y.T. (2009). Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. Cancer Sci. 100, 2014-2021.

Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. Ann. Surg. 14, 199-220.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat. Med. 10, 942-949.

Czystowska, M., Gooding, W., Szczepanski, M.J., Lopez-Abaitero, A., Ferris, R.L., Johnson, J.T., and Whiteside, T.L. (2013). The immune signature of CD8(+)CCR7(+) T cells in the peripheral circulation associates with disease recurrence in patients with HNSCC. Clin. Cancer Res. 19, 889-899.

Dang, Y., and Disis, M.L. (2009). Identification of immunologic biomarkers associated with clinical response after immune-based therapy for cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1174, 81-87.

Davis, J.L., Theoret, M.R., Zheng, Z., Lamers, C.H., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2010). Development of human anti-murine T-cell receptor antibodies in both responding and nonresponding patients enrolled in TCR gene therapy trials. Clin. Cancer Res. 16, 5852-5861.

De Plaen, E., Naerhuyzen, B., De Smet, C., Szikora, J.P., and Boon, T. (1997). Alternative promoters of gene MAGE4a. Genomics 40, 305-313.

Decker, T., Fischer, G., Bucke, W., Bucke, P., Stotz, F., Gruneberger, A., Gropp-Meier, M., Wiedemann, G., Pfeiffer, C., Peschel, C., et al. (2012). Increased number of regulatory T cells (T-regs) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 138, 1945-1950.

Du Four, S., Maenhout, S.K., Benteyn, D., De Keersmaecker, B., Duerinck, J., Thielemans, K., Neyns, B., and Aerts, J.L. (2016). Disease progression in recurrent glioblastoma patients treated with the VEGFR inhibitor axitinib is associated with increased regulatory T cell numbers and T cell exhaustion. Cancer Immunol. Immunother. 65, 727-740.

Farsaci, B., Donahue, R.N., Grenga, I., Lepone, L.M., Kim, P.S., Dempsey, B., Siebert, J.C., Ibrahim, N.K., Madan, R.A., Heery, C.R., et al. (2016). Analyses of Pretherapy Peripheral Immunoscore and Response to Vaccine Therapy. Cancer immunology research 4, 755-765.

Fong, B., Jin, R., Wang, X., Safaee, M., Lisiero, D.N., Yang, I., Li, G., Liau, L.M., and Prins, R.M. (2012). Monitoring of regulatory T cell frequencies and expression of CTLA-4 on T cells, before and after DC vaccination, can predict survival in GBM patients. PLoS One 7, e32614.

Fujii, T., Naing, A., Rolfo, C., and Hajjar, J. (2018). Biomarkers of response to immune checkpoint blockade in cancer treatment. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 130, 108-120.

Gu, X.G., Schmitt, M., Hiasa, A., Nagata, Y., Ikeda, H., Sasaki, Y., Akiyoshi, K., Sunamoto, J., Nakamura, H., Kuribayashi, K., et al. (1998). 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.

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., et al. (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.

Hansen, G.L., Gaudernack, G., Brunsvig, P.F., Cvancarova, M., and Kyte, J.A. (2015). Immunological factors influencing clinical outcome in lung cancer patients after telomerase peptide vaccination. Cancer Immunol. Immunother. 64, 1609-1621.

Hoos, A., Parmiani, G., Hege, K., Sznol, M., Loibner, H., Eggermont, A., Urba, W., Blumenstein, B., Sacks, N., Keilholz, U., et al. (2007). A clinical development paradigm for cancer vaccines and related biologics. J. Immunother. 30, 1-15.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 11, 3887-3895.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). 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. U. S. A. 99, 12293-12297.

Kageyama, S., Kitano, S., Hirayama, M., Nagata, Y., Imai, H., Shiraishi, T., Akiyoshi, K., Scott, A.M., Murphy, R., Hoffman, E.W., et al. (2008). Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan

nanogel. Cancer Sci. 99, 601-607.

Kageyama, S., Wada, H., Muro, K., Niwa, Y., Ueda, S., Miyata, H., Takiguchi, S., Sugino, S.H., 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.

Kageyama, S., Ikeda, H., Miyahara, Y., Imai, N., Ishihara, M., Saito, K., Sugino, S., Ueda, S., Ishikawa, T., Kokura, S., et al. (2015). Adoptive Transfer of MAGE-A4 T-cell Receptor Gene-Transduced Lymphocytes in Patients with Recurrent Esophageal Cancer. Clin. Cancer Res. 21, 2268-2277.

Le, D.T., Lutz, E., Uram, J.N., Sugar, E.A., Onners, B., Solt, S., Zheng, L., Diaz, L.A., Jr., Donehower, R.C., Jaffee, E.M., et al. (2013). Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. J. Immunother. 36, 382-389.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. N. Engl. J. Med. 372, 2509-2520.

Li, M., Yuan, Y.H., Han, Y., Liu, Y.X., Yan, L., Wang, Y., and 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.

Lim, S.Y., Lee, J.H., Diefenbach, R.J., Kefford, R.F., and Rizos, H. (2018). Liquid biomarkers in melanoma: detection and discovery. Mol. Cancer 17, 8.

Liu, J., Zhang, X., Zhong, J.F., and Zhang, C. (2017). CAR-T cells and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. Immunotherapy 9, 1115-1125.

MacFarlane, A.W.t., Jillab, M., Plimack, E.R., Hudes, G.R., Uzzo, R.G., Litwin, S., Dulaimi, E., Al-Saleem, T., and Campbell, K.S. (2014). PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection. Cancer immunology research 2, 320-331.

Mahnke, Y.D., and Roederer, M. (2007). Optimizing a multicolor immunophenotyping

assay. Clin. Lab. Med. 27, 469-485, v.

Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., et al. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. Nat. Rev. Clin. Oncol. 11, 509-524.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. Nature 480, 480-489.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity 30, 899-911.

Mohammed, S., Bakshi, N., Chaudri, N., Akhter, J., and Akhtar, M. (2016). Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. Adv. Anat. Pathol. 23, 180-191.

Nakahara, S., Tsunoda, T., Baba, T., Asabe, S., and Tahara, H. (2003). Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. Cancer Res. 63, 4112-4118.

Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. Curr. Opin. Immunol. 24, 297-302.

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

Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S.U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., et al. (2004). 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.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. Cancer Res. 59, 3128-3133.

Ormandy, L.A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy,

F. (2005). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res. 65, 2457-2464.

Pircher, A., Gamerith, G., Amann, A., Reinold, S., Popper, H., Gachter, A., Pall, G., Woll, E., Jamnig, H., Gastl, G., et al. (2014). Neoadjuvant chemo-immunotherapy modifies CD4(+)CD25(+) regulatory T cells (Treg) in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Lung Cancer 85, 81-87.

Prasad, M.L., Jungbluth, A.A., Patel, S.G., Iversen, K., Hoshaw-Woodard, S., and Busam, K.J. (2004). Expression and significance of cancer testis antigens in primary mucosal melanoma of the head and neck. Head Neck 26, 1053-1057.

Pule, M.A., Savoldo, B., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Dotti, G., Huls, M.H., Liu, E., Gee, A.P., Mei, Z., et al. (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. Nat. Med. 14, 1264-1270.

Reed, S.G., Orr, M.T., and Fox, C.B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. Nat. Med. 19, 1597-1608.

Resnick, M.B., Sabo, E., Kondratev, S., Kerner, H., Spagnoli, G.C., and Yakirevich, E. (2002). Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. Int. J. Cancer 101, 190-195.

Ribas, A., Comin-Anduix, B., Chmielowski, B., Jalil, J., de la Rocha, P., McCannel, T.A., Ochoa, M.T., Seja, E., Villanueva, A., Oseguera, D.K., et al. (2009). Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. Clin. Cancer Res. 15, 6267-6276.

Ribas, A. (2012). Tumor immunotherapy directed at PD-1. N. Engl. J. Med. 366, 2517-2519.

Robbins, P.F., Kassim, S.H., Tran, T.L., Crystal, J.S., Morgan, R.A., Feldman, S.A., Yang, J.C., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Sherry, R.M., et al. (2015). A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. Clin. Cancer Res. 21, 1019-1027.

Rosenberg, S.A., Yang, J.C., and Restifo, N.P. (2004). Cancer immunotherapy: moving

beyond current vaccines. Nat. Med. 10, 909-915.

Saito, T., Wada, H., Yamasaki, M., Miyata, H., Nishikawa, H., Sato, E., Kageyama, S., Shiku, H., Mori, M., and 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.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. Cell 133, 775-787.

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

Sayour, E.J., McLendon, P., McLendon, R., De Leon, G., Reynolds, R., Kresak, J., Sampson, J.H., and Mitchell, D.A. (2015). Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. Cancer Immunol. Immunother. 64, 419-427.

Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J., and Chen, Y.T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. Immunol. Rev. 188, 22-32.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science 331, 1565-1570.

Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. Science 348, 69-74.

Scurr, M., Pembroke, T., Bloom, A., Roberts, D., Thomson, A., Smart, K., Bridgeman, H., Adams, R., Brewster, A., Jones, R., et al. (2017). Low-Dose Cyclophosphamide Induces Antitumor T-Cell Responses, which Associate with Survival in Metastatic Colorectal Cancer. Clin. Cancer Res. 23, 6771-6780.

Shen, X., Li, N., Li, H., Zhang, T., Wang, F., and Li, Q. (2010). Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 136, 1745-1754.

Shimizu, J., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. J. Immunol. 163, 5211-5218.

Simeone, E., Gentilcore, G., Giannarelli, D., Grimaldi, A.M., Caraco, C., Curvietto, M., Esposito, A., Paone, M., Palla, M., Cavalcanti, E., et al. (2014). Immunological and biological changes during ipilimumab treatment and their potential correlation with clinical response and survival in patients with advanced melanoma. Cancer Immunol. Immunother. 63, 675-683.

Small, E.J., Schellhammer, P.F., Higano, C.S., Redfern, C.H., Nemunaitis, J.J., Valone, F.H., Verjee, S.S., Jones, L.A., and Hershberg, R.M. (2006). Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. J. Clin. Oncol. 24, 3089-3094.

Tajima, K., Obata, Y., Tamaki, H., Yoshida, M., Chen, Y.T., Scanlan, M.J., Old, L.J., Kuwano, H., Takahashi, T., Takahashi, T., et al. (2003). Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. Lung Cancer 42, 23-33.

Tanaka, A., and Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. Cell Res. 27, 109-118.

Ueda, S., Miyahara, Y., Nagata, Y., Sato, E., Shiraishi, T., Harada, N., Ikeda, H., Shiku, H., and 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.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254, 1643-1647.

Vergati, M., Schlom, J., and Tsang, K.Y. (2011). The consequence of immune suppressive cells in the use of therapeutic cancer vaccines and their importance in immune monitoring. J Biomed Biotechnol 2011, 182413.

Wada, J., Yamasaki, A., Nagai, S., Yanai, K., Fuchino, K., Kameda, C., Tanaka, H., Koga, K., Nakashima, H., Nakamura, M., et al. (2008). Regulatory T-cells are possible effect prediction markers of immunotherapy for cancer patients. Anticancer Res. 28,

2401-2408.

Weber, J.S., Kudchadkar, R.R., Yu, B., Gallenstein, D., Horak, C.E., Inzunza, H.D., Zhao, X., Martinez, A.J., Wang, W., Gibney, G., et al. (2013). Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. J. Clin. Oncol. 31, 4311-4318.

Wei, T., Zhang, J., Qin, Y., Wu, Y., Zhu, L., Lu, L., Tang, G., and Shen, Q. (2015). Increased expression of immunosuppressive molecules on intratumoral and circulating regulatory T cells in non-small-cell lung cancer patients. Am. J. Cancer Res. 5, 2190-2201.

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

Wolf, D., Wolf, A.M., Rumpold, H., Fiegl, H., Zeimet, A.G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Marth, C. (2005). The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. Clin. Cancer Res. 11, 8326-8331.

Yakirevich, E., Sabo, E., Lavie, O., Mazareb, S., Spagnoli, G.C., and Resnick, M.B. (2003). Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. Clin. Cancer Res. 9, 6453-6460.

Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S. (2006). Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. Semin. Cancer Biol. 16, 115-123.

Zhang, C.H., and Huang, Y. (2016). Effect of Peripheral Blood CD4 + CD25 + Regulatory T Cell on Postoperative Immunotherapy for Patients with Renal Carcinoma. Asian Pac. J. Cancer Prev. 17, 2027-2030.