

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題:

日本人の悪性黒色腫患者におけるNY-ESO-1, XAGEなど腫瘍抗原の発現と免疫に関する解析

研究分担者 船越 建 慶應義塾大学医学部皮膚科学 助教

研究要旨

近年、悪性黒色腫は分子学的にも疫学的にも異なる個性を有した疾患の集合体と考えられるようになってきている。今回我々は、抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子と、それに関連して患者の予後を予測し得るマーカーの探索を行うことを目的として研究を進めている。当院で集積した悪性黒色腫94検体を用いて候補となるバイオマーカーの免疫染色をし、その発現強度と患者の予後および治療反応性を統計学的解析により比較検討している。

研究協力者

森 真理子 助教

種瀬 啓士 助教

と予後予測が可能なバイオマーカーの確立を目指している。

A. 研究目的

近年、悪性黒色腫の病態に対する理解は長足の進歩を遂げた。BRAF, NRAS, c-KIT 等の ERK1/2MAPK シグナル伝達経路を構成する因子の遺伝子変異が頻回に認められることが明らかとなり、BRAF の V600E 変異を有する症例に対しては分子標的薬がある一定の成果をあげている。また、抗腫瘍免疫を増強する治療においても進歩が見られている。T細胞の抗腫瘍活性を負に制御する CTLA-4 や PD-1 に対する抗体製剤が患者の予後を有意に改善することが明らかとなり、これらの製剤は近く本邦においても臨床の現場に用いられる見通しとなっている。しかし、半数以上の症例がこれらの治療に対しても抵抗性であり、悪性黒色腫の更なる病態の解明が望まれている。そのような中で我々は、抗 PD-1 および抗 CTLA-4 阻害薬等の抗腫瘍免疫を増強する治療が有効と予測できる因子(NY ESO-1 をはじめとした癌精巢抗原; cancer-testis antigen)の確認と探索を行うことで、悪性黒色腫患者における治療反応性

B. 研究方法

本研究を行うにあたり、院内倫理委員会より承認された患者説明文書・同意書を用いて悪性黒色腫患者より研究のための同意を得た。対象は2000年から2013年の間に当院皮膚科を受診し悪性黒色腫と診断された107症例で、これまでに72症例(男性25例、女性47例、年齢中央値60歳、最高年齢86歳、最少年齢13歳)、94検体(原発巣61例、リンパ節転移巣22例、その他の転移巣11例)に対しNY-ESO-1の発現の有無を確認した。

原発巣の発症部位、病理組織学的 stage は以下の表のとおりである。

臨床病型		病理組織学的病期	
Nodular	28	pT1a	16
Superficial spreading	22	pT2a	8
Acral	20	pT2b	5
Lentigo maligna	2	pT3a	6
		pT3b	2
		pT4a	7
		pT4b	13

染色方法

染色を行うにあたり、組織内にメラニンの沈着を多く認める検体は脱メラニン処理を要した。また、すべての検体について赤発色を施行した。

1. 脱メラニン処理（過マンガン酸カリウム・シュウ酸法）

- 0.25%過マンガン酸カリウム水溶液に1時間浸す
- 水洗い
- 5%シュウ酸水に切片が脱色するまで2~5分間浸す。
- 静かに水洗い、10分間。
- 蒸留水洗浄

2. 染色

脱メラニン後の標本を、5%スキムミルク水（EZprepで溶解）に10分間浸す
EZバッファーにより脱パラフィン、親水化を行う。

イムノブロックにより撥水防止処理を行う

CC1バッファーによる抗原不活化を行う。

（～は自動組織免疫染色装置（Ventana:Roche）を用いて行う。）

一次抗体（100倍希釈）を100μl添加。2時間反応させる。（抗体はanti NY-ESO-1 clone(Aigma Aldrichi)を使用）

PBSで洗浄。

二次抗体（ヒストファインAPシンプルステインAP(M))を3滴添加し40分反応させる。

PBSで洗浄。

ファーストレッド 基質キットを添加、12分反応させる。

miliQ洗浄

HE染色を行う。

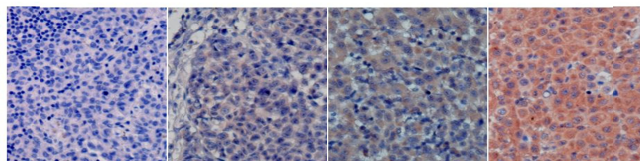
染色態度の評価は陽性細胞のパーセンテージ（Number）と陽性細胞の染色強度（Intensity）の2項目に対して行う。

Numberの評価は以下の通りを行う。

陽性細胞	5%以下	スコア	0
陽性細胞	5-25%	スコア	1

陽性細胞	26-75%	スコア	2
陽性細胞	75%以上	スコア	3

Intensityの評価は以下に例示する染色強度の通りを行う。左からスコア0、1、2、3の順である。



スコアリングは皮膚病理と免疫染色の原理に習熟した二人の皮膚病理医により独立に行われ、スコアの結果が異なる場合には二人でスコアリングにつき検討を行い、合意が得られたものを採用する。合意が得られない場合は第三者のスコアリングを参照するという手法をとる。

各染色態度の評価がそろった段階で、腫瘍のステージ、患者の予後等の臨床情報と対比することで、統計解析を行う。

（倫理面への配慮）

インフォームドコンセントを取るに当たり、臨床研究指針に準拠した同意書を作成し、これに患者の同意を得た。また、臨床検体を用いるにあたり、情報公開し、オプトアウトの機会提供をしている。本研究は慶應義塾大学・倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。

C. 研究結果

これまでに72症例94検体につき、NY ESO-1の発現を検討している。その結果を以下の表に示す。

Intensity

	0	1	2	3	
Primary	40	14	3	4	61
Lymph node	7	11	3	1	22
Metastatic lesion	3	2	2	4	11
	50	27	8	9	94

72症例 94検体中

Number

	0	1	2	3	
Primary	40	4	7	10	61
Lymph node	7	3	2	10	22
Metastatic lesion	3	0	3	5	11
	50	7	12	25	94

72症例 94検体中

以上より、原発巣においては61例中21例(34.4%)、リンパ節転移巣では22例中15例(68.2%)、他臓器転移巣では11例中8例(72.7%)で発現が認められ、癌の進展に伴って発現する症例が増加するという傾向が認められている。

続いて、原発巣および節転移巣の両方の検体が解析可能であった18症例22検体を検討した。以下に結果を示す。

Intensity

	Metastatic lesion					
	0	1	2	3		
Primary lesion	0	4	6	0	1	11
	1	2	2	3	0	7
	2	0	1	0	1	2
	3	1	1	0	0	2
		7	10	3	2	22

18症例 22検体中

Number

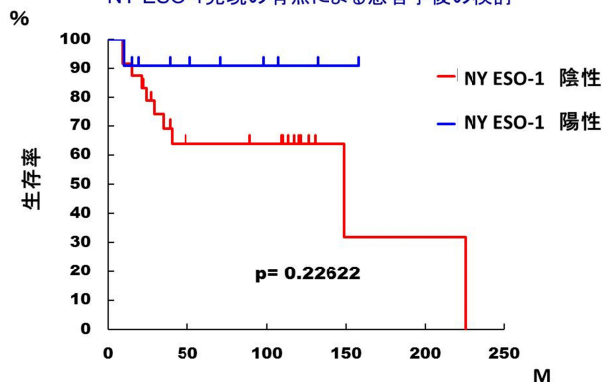
	Metastatic lesion					
	0	1	2	3		
Primary lesion	0	4	1	0	6	11
	1	1	0	2	2	5
	2	2	0	0	0	2
	3	0	0	1	3	4
	7	1	3	11	22	

18症例 22検体中

原発巣においてNY ESO-1の発現が陰性であった11症例中、7例(63.6%)において転移巣に発現が認められることが明らかとなり、個別の症例においても、本因子が腫瘍進展のマーカーとなりうることを示唆された。

最後に原発巣における本因子の発現と予後の相関を検討した。原発巣において腫瘍深達度が2mm以上(TNM分類でpT2a以上)の症例27例のNY ESO-1の発現と予後の相関を検討した。発現は27例中16例が陰性、11例が陽性であった。以下にKaplan-Meier法により解析した結果を示す。

Tumor thickness 2mm ≤ の悪性黒色腫原発巣におけるNY ESO-1発現の有無による患者予後の検討



有意差検定は一般化Wilcoxon検定を用いている。現時点では症例数が少ないため有意差は認められていないものの、NY ESO-1を発現している症例において予後が良い傾向があることが示唆されている。

D. 考察

上述の知見よりNY ESO-1は悪性黒色腫において腫瘍の進展に伴って発現が増強する傾向がある一方で、発生初期の原発巣の段階から発現して

いる症例においては、良好な予後を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。

E. 結論

本研究から得られている知見より、NY ESO-1 が悪性黒色腫の進展や予後を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆される。今後より有意な結果が得られることが予想され、更なる症例の蓄積と検討を重ねるべく研究継続を行っていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし