

- |           |        |
|-----------|--------|
| 1. 特許取得   | なし     |
| なし        | 3. その他 |
| 2. 実用新案登録 | なし     |

厚生労働科学研究費補助金  
[がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）]  
分担研究報告書

CHP/NY-ESO-1ポリペプチドがんワクチンの術後食道癌症例を対象とした  
多施設共同前期第Ⅱ相臨床試験に関する研究

研究分担者 山上 裕機 和歌山県立医科大学外科学第2講座 教授

**研究要旨：**術前化学療法後に根治切除された食道癌を対象に、治療用がんワクチンを投与する前期第Ⅱ相試験、医師主導治験を実施している。

#### A. 研究目的

食道癌は手術治療後再発が多く、再発後に有効な治療法に乏しい予後不良癌であり、新規治療法の開発が望まれる。術前補助化学療法と根治手術を行った食道癌患者を対象に、術後の再発予防薬として治療用がんワクチンを開発する目的で再発予防効果を探索する前期第Ⅱ相試験を行う。

#### B. 研究方法

多施設共同医師主導治験として前期第Ⅱ相試験を実施し、安全性と、無再発生存期間および全生存期間の延長効果を確認する。

(倫理面への配慮)

各施設の治験審査委員会で倫理的観点からも審議されている。

#### C. 研究結果

和歌山県立医科大学は平成26年1月よ

り本治験に新規参画した。医師主導治験を当施設で実施するための手順書SOPを作成し、治験審査委員会で審議され、承認を得た。その後当施設における治験実施を届け出て、実施許可を得た。

現在までに7名の患者より一次同意を取得し、術前補助化学療法と食道癌手術を施行した。そのうち1名は術後病理検査にてがん抗原発現を確認し、治験二次同意を取得して治験治療を施行中である。残り6名は、二次登録に至らなかった。2名は食道手術の術中所見にて根治手術を施行しえず、ワクチン投与の適格基準から逸脱したため除外した。さらに3名は術後の病理検査結果にてがん抗原の発現が陰性であり、ワクチン投与の適格基準から逸脱したため除外した。また、1名は、手術後の結果説明後に本人の希望としてワクチン治療ではなく抗がん剤治療を希望されたため治験対象外となった。

各症例より化学療法後で採血し、後に抗

体免疫反応解析、プロテインアレイ解析に用いるため、血清を分離保存した。

二次登録された患者については、治験で既定された検査を遂行し、モニター担当者により業務が手順通り遂行していることを確認していただいた。

#### D. 考察

当院では2014年に年間50例の食道癌手術を施行した。そのうち、本治験の適格基準を満たす症例は9例であったが、その全例に本治験についての説明と同意（IC）が行われた。その内2例は遠方にて通院不可との理由で一次登録されなかったが、それ以外の7例は登録され、術前化学療法および手術が施行された。2次登録に至らなかった理由として、根治切除を施行し得なかったものがあり、進行食道癌の治療の難しさを反映していると考えられた。一方で、本治験治療のICを施行した症例は、治療可能な場合は全例治験治療を希望されたことから、食道癌に対する治療薬、特にがんワクチンによる再発予防薬の開発は、患者も強く望んでいるものと考えられた。本治験の遂行により早期創薬化を目指すことが期待される。

#### E. 結論

医師主導治験が実施承認され、患者登録と治験遂行を継続中である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Matsuyama M, Ishii H, Furuse J,

Ohkawa S, Maguchi H, Mizuno N, Yamaguchi T, Ioka T, Ajiki T, Ikeda M, Hakamada K, Yamamoto M, Yamaue H, Eguchi K., Ichikawa W, Miyazaki M, Ohashi Y, Sasaki Y: Phase II trial of combination therapy of gemcitabine plus anti-angiogenic vaccination of elpamotide in patients with advanced or recurrent biliary tract cancer. Invest New Drugs DOI 10.1007/s10637-014-0197-z

2) Yamaguchi Y, Yamaue H, Okusaka T, Okuno K, Suzuki H, Fujioka T, Otsu A, Ohashi Y, Shimazawa R, Nishio K, Furuse J, Minami H, Tsunoda T, Hayashi Y, Nakamura Y, Committee of Guidance for Peptide Vaccines for the Treatment of Cancer, The Japanese Society for Biological Therapy: Guidance for peptide vaccines for the treatment of cancer. Cancer Sci 105(7):924-31, 2014

3) Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H: Identification of an HLA-A2-Restricted Epitope Peptide Derived from Hypoxia-Inducible Protein 2 (HIG2). PLoS One 9(1):e85267, 2014

4) Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Ueda K, Hayata K, Yasuoka H,

- Yamaue H: Prognostic significance of IL-17 mRNA expression in peritoneal lavage in gastric cancer patients who underwent curative resection. *Oncol Rep*31:605-12, 2014
- 5) Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Ojima T, Katsuda M, Iida T, Hayata K, Yamaue H: Clinical benefits of thoracoscopic esophagectomy in the prone position for esophageal cancer. *Surg Today* 44(9):1708-15, 2014
- 6) Iwamoto H, Ojima T, Hayata K, Katsuda M, Miyazawa M, Iida T, Nakamura M, Nakamori M, Iwahashi M, Yamaue H: Antitumor immune response of dendritic cells (DCs) expressing tumor-associated antigens derived from induced pluripotent stem cells: In comparison to bone marrow-derived DCs. *Int J Cancer* 134(2):332-341, 2014
- 7) Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ojima T, Katsuda M, Iida T, Hayata K, Kato T, Yamaue H: A new prognostic score for the survival of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surg Today*44:875-83, 2014
- 8) Ojima T, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Katsuda M, Iida T, Hayata K, Yamaue H: Atrial fibrillation after esophageal cancer surgery: an analysis of 207 consecutive patients. *Surg Today* 44:839-47, 2014
- 9) 谷 眞至, 山上裕機: ペプチドワクチンを用いた膵癌治療 特集 見直される膵癌診療の新展開 治療における新展開 一切除不能例への治療戦略 臨床外科 69(1):64-69, 2014
2. 学会発表
- 1) 山上裕機: 「膵癌ペプチドワクチン療法将来展望」 グランソール奈良免疫研究会 2014～がん免疫療法のこれから～ 2014. 6. 奈良
- 2) 山上裕機: 「腫瘍免疫、サイトカイン」 がんプロフェッショナル要請基盤推進プラン講義<平成 27 年度大学院生講義>共通特論 (大阪市立大学大学院医学研究科)
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金

[がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）]

分担研究報告書

根治切除術後食道癌のNY-ESO-1抗原発現陽性例に対するIMF-001の  
多施設共同無作為化比較試験（第Ⅱ相臨床試験）に関する研究

研究分担者 永田康浩 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：食道癌根治術後の患者に対してIMF-001の反復皮下投与を行い、無病生存期間及び安全性を探索的に検討することを主要評価項目として、NY-ESO-1抗原特異的免疫反応誘導効果及び全生存期間を副次評価項目として多施設共同無作為化比較試験を実施する。

A. 研究目的

根治術後の食道癌患者に対して IMF-001 の反復皮下投与を行い、無病生存期間及び安全性を探索的に検討することを主要評価項目として、NY-ESO-1 抗原特異的免疫反応誘導効果及び全生存期間を副次評価項目とする。

B. 研究方法

食道癌根治術後の NY-ESO-1 抗原発現陽性症例に対して IMF-001 の反復皮下投与を行い、IMF-001 非投与群を対照として、無病生存期間（DFS）及び安全性、さらに NY-ESO-1 抗原特異的免疫反応誘導効果及び全生存期間を多施設共同無作為化比較試験として実施する。

（倫理面への配慮）

本試験はヘルシンキ宣言の精神を遵守し、かつ本試験実施計画書、薬事法第14条第3

項及び第80条の2に規定する基準及び「医薬品の臨床試験実施の基準に関する省令（GCP）」を遵守し実施する。

C. 研究結果

全国 17 施設の治験施設において、本試験を遂行した。治験調整医師として治験全体の運営、有害事象への対応などを担当した。

D. 考察

本試験を遂行する上でプロトコール上の支障は認められなかった。有害事象に対する対応も的確に行われた。今後、免疫応答、プロテインアレイ、遺伝子発現検査等について解析を進めていく。

E. 結論

本試験を予定の実施計画に従い推進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 鏡視下食道癌手術における側臥位手術  
と腹臥位手術の比較検討

永田康浩、永吉茂樹、平山昂仙、濱田聖  
暁、野中 隆、渡海由貴子、徳永隆幸、  
森野茂行、蒲原行雄、前田茂人、田川  
努、藤岡ひかる

第114回日本外科学会定期学術集会、  
2014. 4. 3-5、京都

2) 肝細胞癌におけるMAGE family抗原発現

は治癒切除後早期再発の危険因子である  
永吉茂樹、永田康浩、蒲原行雄、平山昂  
仙、濱田聖暁、野中 隆、渡海由貴子、  
徳永隆幸、森野茂行、前田茂人、田川  
努、伊東正博、西川博嘉、藤岡ひかる

第114回日本外科学会定期学術集会、  
2014. 4. 3-5、京都

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

[がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）]

分担研究報告書

根治切除後食道癌のNY-ESO-1抗原発現陽性例に対するIMF-001の多施設共同無作為化比較試験（第Ⅱ相臨床試験）

研究分担者 長崎大学移植・消化器外科 講師 金高賢悟

**研究要旨：** IMF-001は非臨床試験の成績より安全性に特に問題点は認められず、また臨床第1相試験の成績より食道癌症例に安全で免疫反応が誘導され臨床上有効である可能性が示唆された。今回再発のリスクが非常に高い一方で標的腫瘍細胞量が最少であり癌ワクチン免疫療法による抗腫瘍免疫が特に期待できると考えられる根治術後の食道癌症例を対象としたIMF-001反復投与による安全性を検討するための第Ⅱ相臨床試験である。

A. 研究目的

根治術後の食道癌に対して IMF-001 の反復皮下投与を行い無病生存期間及び安全性を探索的に検討することを主要評価項目として NY-ESO-1 抗原特異的免疫反応誘導及び全生存期間を副次評価項目として多施設共同無作為化比較試験を実施する。

B. 研究方法

(1) IMF-001 投与群

IMF-001 200  $\mu$ g を 2 週毎の皮下投与を 6 回行い、その後 4 週毎の皮下投与を 9 回行う。最終症例が二次登録されてから 2 年間までを追跡期間とし、所定の項目について観察・検査する。

(2) IMF-001 非投与群

治験薬の投与は行わない。IMF-001 投与群

の最終症例の 107 週時点までを追跡期間とし、所定の項目について観察・検査する。

（倫理面への配慮）

対象となる被験者本人に治験審査委員会承認を得た内容について記載された説明文書を手渡し、十分に説明し、被験者が内容をよく理解したことを確認した上で、本治験への参加について被験者本人の自由意思による同意を文書にて得る。

C. 研究結果

適応症例に関してはすべて 1 次登録への登録を行っており現在まで 7 症例の登録を行い、うち 2 例において 2 次登録への登録に至った。2 次登録に至らなかった症例は NY-ESO-1 陰性例であった。

D. 考察

1次登録に関しては適格症例はすべてご協力いただいている状況である。ブロック提出を3ブロックにすることでより陽性例の拾い上げができていると考えられる。

E. 結論

引き続き1次登録の適格症例を増加させて2次登録数増加を図る。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金

[がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）]

分担研究報告書

根治切除術後食道癌のNY-ESO-1抗原発現陽性例に対するIMF-001の  
多施設共同無作為化比較試験（第Ⅱ相臨床試験）に関する研究

研究分担者 蒲原 行雄 国立病院機構長崎医療センター 外科治療研究部長

**研究要旨：**食道癌根治術後の患者に対してIMF-001の反復皮下投与を行い、無病生存期間及び安全性を探索的に検討することを主要評価項目として、NY-ESO-1抗原特異的免疫反応誘導効果及び全生存期間を副次評価項目として多施設共同無作為化比較試験を実施する。

A. 研究目的

根治術後の食道癌患者に対して IMF-001 の反復皮下投与を行い、無病生存期間及び安全性を探索的に検討することを主要評価項目として、NY-ESO-1 抗原特異的免疫反応誘導効果及び全生存期間を副次評価項目とする。

B. 研究方法

食道癌根治術後の NY-ESO-1 抗原発現陽性症例に対して IMF-001 の反復皮下投与を行い、IMF-001 非投与群を対照として、無病生存期間（DFS）及び安全性、さらに NY-ESO-1 抗原特異的免疫反応誘導効果及び全生存期間を多施設共同無作為化比較試験として実施する。

（倫理面への配慮）

本治験はヘルシンキ宣言の精神を遵守し、かつ本治験実施計画書、薬事法第14条第3

項及び第80条の2に規定する基準及び「医薬品の臨床試験実施の基準に関する省令（GCP）」を遵守し実施する。

C. 研究結果

試験の適格基準に基づき1次登録を10名に行った。そのうち2次登録の適格基準を満たした2名について、本試験を行っている。この2名についてはこれまでのところ有害事象は認められず試験継続中である。NY-ESO-1 抗原特異的免疫反応誘導効果については検討中である。

D. 考察

本試験を遂行する上でプロトコール上の支障は認められなかった。

E. 結論

次年度以降の症例の集積が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) The detection of gastric cancer cells in intraoperative peritoneal lavage using reverse transcription--loop-mediated isothermal amplification method.

Yoneda A, Taniguchi K, Torashima Y, Susumu S, Kanetaka K, Kuroki T, Eguchi S.  
J Surg Res. 2014 Mar; 187(1):e1-6.

### 2. 学会発表

1) 鏡視下食道癌手術における側臥位手術と腹臥位手術の比較検討  
永田康浩、永吉茂樹、平山昂仙、濱田聖暁、野中 隆、渡海由貴子、徳永隆幸、

森野茂行、蒲原行雄、前田茂人、田川努、藤岡ひかる

第114回日本外科学会定期学術集会、

2014. 4. 3-5、京都

2) 肝細胞癌におけるMAGE family抗原発現は治癒切除後早期再発の危険因子である  
永吉茂樹、永田康浩、蒲原行雄、平山昂仙、濱田聖暁、野中 隆、渡海由貴子、徳永隆幸、森野茂行、前田茂人、田川努、伊東正博、西川博嘉、藤岡ひかる  
第114回日本外科学会定期学術集会、  
2014. 4. 3-5、京都

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金

[がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）]

分担研究報告書

根治切除術後食道癌のNY-ESO-1抗原発現陽性例に対する  
IMF-001の多施設共同無作為化比較試験

9. 統計解析

9-4-7. プロテインアレイ

研究分担者 五島直樹 独立行政法人産業技術総合研究所 チーム長

**研究要旨：** 転移・再発固形腫瘍例に対する化学療法を始めとする薬物治療の限界を改善するため、宿主の免疫反応を利用する免疫的治療が注目されている。近年、Tリンパ球に認識される腫瘍抗原が多数同定されてきているが、これら同定抗原を免疫源とする「がんワクチン」が有望な特異的がん免疫療法の一つとして期待されている。これまでにがんワクチン投与後に抗原特異的免疫反応が患者体内で誘導され、また低頻度ながら腫瘍縮小反応がみられることが挙げられる。癌ワクチン投与後の免疫反応として、免疫源に対する抗体産生だけでなく種々の抗体産生が誘導されることが報告されている。本研究では、がんワクチン投与後に生じる体内での免疫反応を独自開発のプロテインアレイを用いてプロファイリングし、対象群と比較することによって治験研究の補助的データとする。

A. 研究目的

根治切除術後食道癌患者に対するがんワクチン（NY-ESO-1）投与前、投与後の免疫応答の変化を、血清中の抗体の変化として捉え、経時的に抗体プロファイリングを行う。がんワクチンが直接的に誘導する抗体および細胞破壊による抗原拡散によって2次的に誘導される抗体をプロテインアレイを用いてプロファイリングし、がんワクチ

ンの治療効果と関連付けることによって治験研究の補助的データとする。

B. 研究方法

我々がヒト完全長 cDNA ライブラリーから開発した世界最大のヒトタンパク質発現リソース（HuPEX）より CTDatabase (<http://www.cta.lncc.br/>) に登録されている cancer /testis antigen (CTA: 癌

と精巢のみに発現する遺伝子群) の 203 種、がん関係の抗原の 50 種、血管新生関連遺伝子産物 3 種、ワクチン抗原タンパク質 8 種、パスウェイ解析用タンパク質 344 種の合計 608 種のタンパク質 (図 1) を選択し、コムギ無細胞タンパク質合成系で N 末 FLAG - GST タグ融合タンパク質の合成する (N. Goshima et al., Nature methods, 2008)。タンパク質のアレイ化は、新規開発のアモルファスカーボン (aC) 基板方式によって行った (図 2)。

図 1

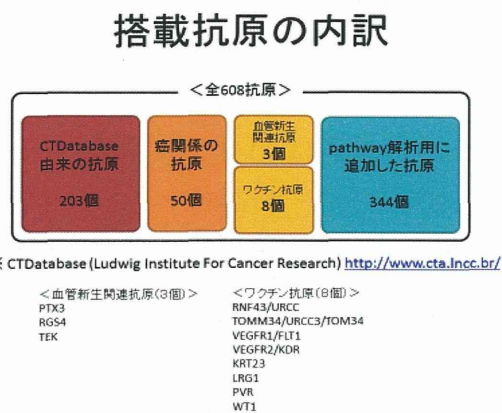
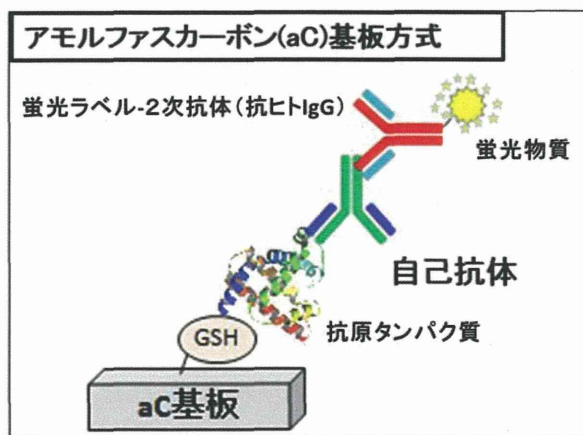


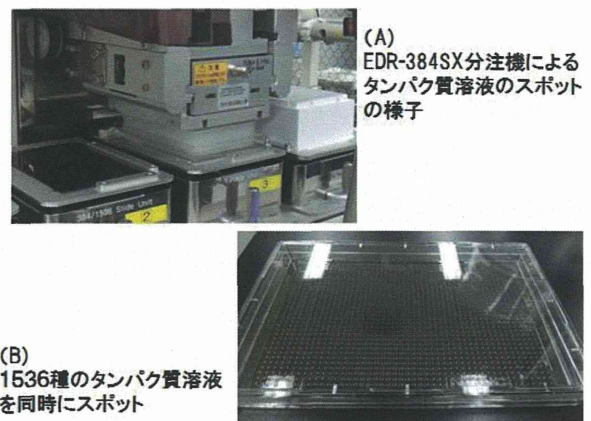
図 2



本アレイ化方法は、タンパク質の高次構造を維持し、ネイティブなタンパク質を基板上に整列化する我々オリジナルのものであ

る。新規開発の aC 基板方式は自己抗体検出の再現性が高く、スポットの高密度化も行いやすい特徴を有する。バイオテック社の EDR-384SX 分注機を利用し、独自開発のプロトコールにより aC 基板上に 1536 スポットを 1 ショットで迅速に打つことが出来る (図 3)。

図 3



プロテインアレイの検出は、図 2 に示すようにアレイ上の抗原タンパク質に結合する自己抗体 (ヒト IgG 抗体) に対して蛍光ラベル - 抗ヒト IgG 抗体を 2 次抗体として結合させ、蛍光スキャナーによって蛍光シグナルの数値化を行う。

アレイ測定を行う血清サンプルは、表 1 に示す。食道がん患者で術前化学療法、根治術、NY-ESO-1 ワクチン投与を経時的に行ったワクチン投与群の血清サンプル (41 サンプル) と対象サンプルであるワクチン非投与群の血清サンプル (24 サンプル) の合計 65 サンプルを測定する。

表 1

採血ポイント		各採血ポイントの詳細	
P1		術前化学療法前	
P2		術前化学療法後・根治術前	
1	✓	ワクチン投与後 第1週	
5	✓	ワクチン投与後 第5週	
9	✓	ワクチン投与後 第9週	
11	✓	ワクチン投与後 第11週	
15	✓	ワクチン投与後 第15週	
23	✓	ワクチン投与後 第23週	
35	✓	ワクチン投与後 第35週	

検体リスト		ワクチン投与群						ワクチン非投与群												
患者ID	AC-07	DU-01	NM-01	AC-08	KF-11	KF-09	KN-03	TU-03	KF-12	AC-17	AC-18	NM-06								
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

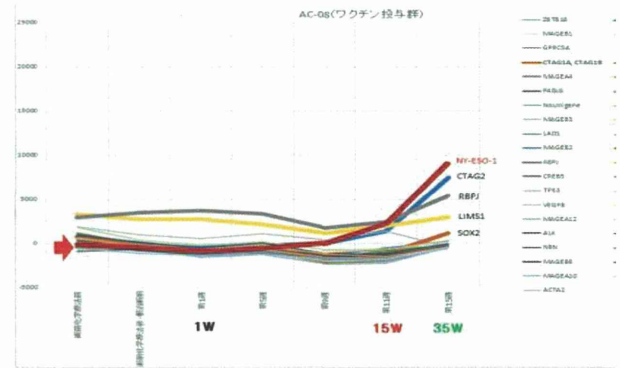
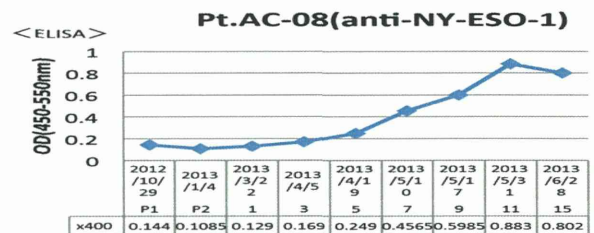


図 4 b



(倫理面への配慮)

(独) 産業技術総合研究所のヒト由来試料実験申請書を提出し、倫理委員会で承認を得ている。また、医師主導治験におけるプロテインアレイ測定機関に対する治験前監査を実施した。治験における検査実施に必要な組織や手順書等は整備されていることを確認した。

### C. 研究結果

食道がん患者で術前化学療法、根治術、NY-ESO-1 ワクチン投与を経時的に行ったワクチン投与群の血清サンプル (41 サンプル) と対象サンプルであるワクチン非投与群の血清サンプル (24 サンプル) の合計 65 サンプルを測定した。代表例として AC-08 (ワクチン投与群) 血清についてプロテインアレイによって自己抗体プロファイリングを行った結果を示す (図 4 a)。

図 4 a

元来、本患者は NY-ESO-1 に対する抗体は持っておらず、がんワクチンの NY-ESO-1 を投与したの 9 週目から 35 週目にかけて NY-ESO-1 に対する抗体が上昇した (図 4

a、

赤のライン)。プロテインアレイによる抗体検出の正確性を、ELISA 法と比較をした。

ELISA 法の結果 (図 4 b) は三重大学医学部・宮原慶裕先生から提供して頂いた。NY-ESO-1 に対する抗体のプロテインアレイの測定結果と ELISA 法の測定結果は、非常に高い一致性を示した。

NY-ESO-1 に追従する形で CTAG2 に対する抗体も上昇するのが検出された (図 4 a、青のライン)。その他に Sox2 に対する抗体が 15 週以降で僅かに上昇が検出された。

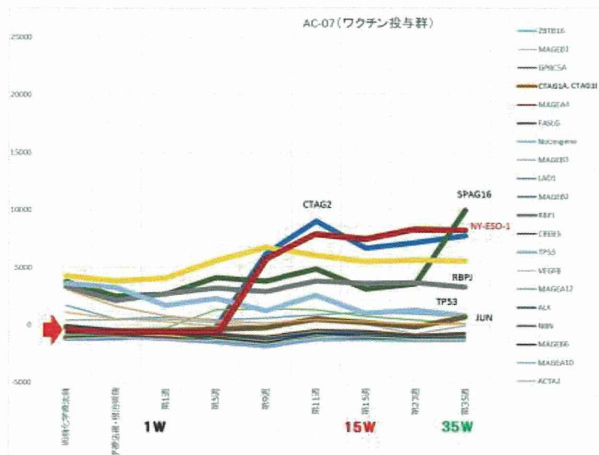
LIMS1 や RBPJ に対する自己抗体は健常者



を含めてほとんどの血清中に含まれている。

AC-07（ワクチン投与群）血清についてプロテインアレイによって自己抗体プロファイリングを行った結果を示す（図5）。

図5



本患者は治療前から p53 や幾つかの自己抗体を有しており、NY-ESO-1 に対する抗体は保持していなかったが、ワクチン投与後7週目から上昇し、11週目でプラトーに達した（図5、赤ライン）。CTAG2 に対する抗体も NY-ESO-1 と同様に上昇した（図5、青ライン）。NY-ESO-1 に対する抗体が上昇した後、18週ほど遅れて SPAG16 に対する抗体が上昇した。

AC-17 および AC-08（ワクチン非投与）の血清中の自己抗体プロファイリング結果が図6および図7である。NY-ESO-1 に対する抗体および他の抗体は、ワクチン投与に関係なくほぼ一定の値を示した。

図6

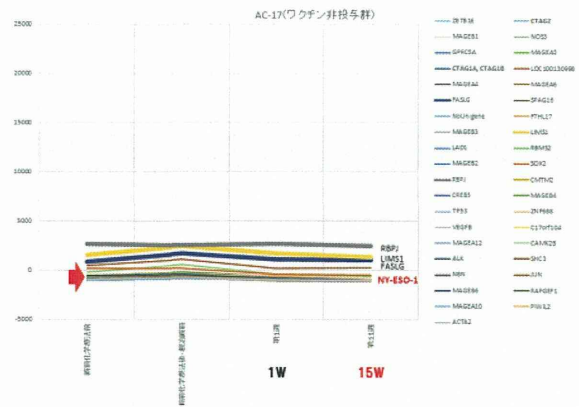
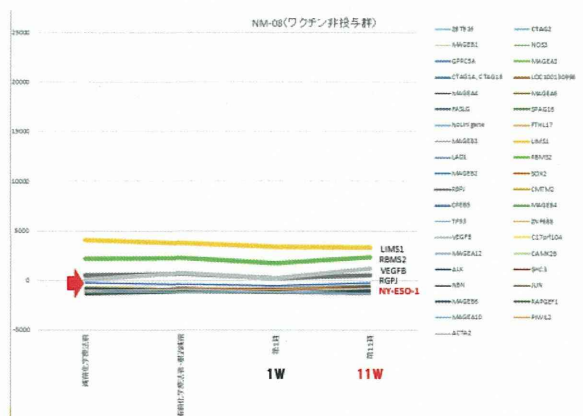


図7



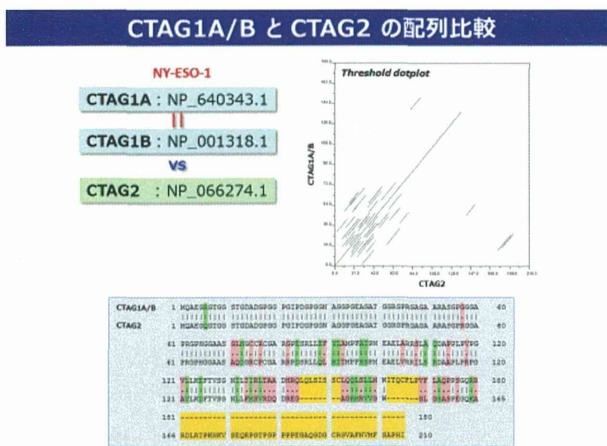
#### D. 考察

NY-ESO-1 ワクチンの投与によってそのワクチンに対する抗体産生が確認された。本プロテインアレイと ELISA 法を NY-ESO-1 を抗原とする血清中の自己抗体に関して比較したが、両者は同等の抗体検出結果を示した。プロテインアレイは、ELISA 法と同等の抗体解析を、同時に 600 種以上のタンパク質に対して同時に測定できる点、抗体プロファイリングには最適であると考えられる。

NY-ESO-1 と CTAG2 に対する血清中の自己抗体は、全てのサンプルで全く同じ挙動を示していた。NY-ESO-1 と CTAG2 のアミ

ノ酸配列の比較を行った（図8）。

図8



NY-ESO-1 と CTAG2 のアミノ酸配列は非常に共通部位があり、共通の自己抗体を検出していると考えられる。この結果は、プロテインアレイの測定結果が正確であることを示している。

ワクチンに対する抗体生産のみではなく、別の抗体の上昇が観察された。この現象が「抗原拡散」と言われる現象であるかは、もう少し多くのサンプルを詳細に調べる必要がある。また、プロテインアレイによる抗体プロファイリングとワクチンの治療効果について臨床データとも合わせて解析する必要がある。

#### E. 結論

- 1) NY-ESO-1 をワクチンとして投与した結果、抗 NY-ESO-1 抗体が誘導された。
- 2) NY-ESO-1 と CTAG2 に対する自己抗体の解析結果は同じ挙動を示した。同じ抗体のクロスリアクションを検出していると考えられる。
- 3) ワクチン投与後、抗 NY-ESO-1 抗体と同様に上昇する抗体と 2 か月以上あとから

上昇する抗体が検出された。「抗原拡散」を示している可能性もある。

4) ワクチン投与後、経時的に変化した自己抗体とワクチン療法の治療効果との関連を明らかにし、マーカーとなる抗体があるかを今後解析する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshitaka Kawakami, Naoki Goshima. Development of a protein array for autoantibody profiling of blood. *Synthesiology*, 7(3), 149–157 (2014)
- 2) Sho MINAMI, Ryo NAGASHIO, Junpei UEDA, Kazumasa MATSUMO, Naoki GOSHIMA, Manabu HATTORI, Kazuo HACHIMURA, Masatsugu IWAMURA, and Yuichi SATO: Detection of tumor-associated antigens in culture supernatants using autoantibodies in sera from patients with bladder cancer. *Biomedical Research (Tokyo)* 35 (1) 25–35, (2014)
- 3) Naritaka Tamaoki, Kazutoshi Takahashi, Hitomi Aoki, Kazuki Iida, Tomoko Kawaguchi, Masatoshi Inden, Naoyuki Chosa, Akira Ishisaki, Takahiro Kunisada, Toshiyuki Shibata, Naoki Goshima, and Ken-ichi Tezuka: The homeobox gene *DLX4* promotes generation of human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, Dec 4;4:7283. doi: 10.1038/srep07283. (2014)

- 4) Kousuke Kasahara, Yoshitaka Kawakami, Tohru Kiyono, Shigenobu Yonemura, Yoshifumi Kawamura, Saho Era, Fumio Matsuzaki, Naoki Goshima, Masaki Inagaki: Ubiquitin-proteasome system controls ciliogenesis at the initial step of axoneme extension. *Nature communications* 5, Article number:5081 doi:10.1038/ncomms6081 (2014)
- 5) Naoto Muraoka, Hiroyuki Yamakawa, Kazutaka Miyamoto, Taketaro Sadahiro, Tomohiko Umei, Mari Isomi, Hanae Nakashima, Mizuha Akiyama, Rie Wada, Kohei Inagawa, Takahiko Nishiyama, Ruri Kaneda, Toru Fukuda, Shu Takeda, Shugo Tohyama, Hisayuki Hashimoto, Yoshifumi Kawamura, Naoki Goshima, Ryo Aeba, Hiroyuki Yamagishi, Keiichi Fukuda, Masaki Ieda: MiR-133 Promotes Cardiac Reprogramming by Directly Repressing Snail and Silencing Fibroblast Signatures. *EMBO J.* 33(14), 1565-1581. (2014)
- 6) Tetsuro Hirose and Naoki Goshima: Genome-wide co-localization screening of nuclear body components using a fluorescently tagged FLJ cDNA clone library. *Methods in Molecular Biology*, 1262, 46-70, (2015)
- 7) Doi A, Ishikawa K, Shibata N, Ito E, Fujimoto J, Yamamoto M, Shiga H, Mochizuki H, Kawamura Y, Goshima N, Semba K, Watanabe S. Enhanced expression of retinoic acid receptor alpha (RARA) induces epithelial-to-mesenchymal transition and disruption of mammary acinar structures. *Mol Oncol.* 9, 355-364. (2015)
2. 学会発表
- 1) 五島直樹、福田枝里子：ヒト・インビトロプロテオームを搭載したプロテインアレイの開発と利用、シンポジウム：アレイ技術を基盤としたプロテオミクス解析 (array-based proteomics)の現状、日本プロテオーム学会、筑波、2014-07-18
- 2)
- 3) 五島直樹：ヒトタンパク質発現リソースが切り開く未来、バイオジャパン、横浜、2014-10-16
- 4) 松島隆英、五島直樹、浅原弘嗣：新規DAMPsタンパク質のスクリーニングと機能解析、第87回日本生化学会大会、京都、2014-10-18
- 5) Kousuke Kasahara, Yoshitaka Kawakami, Tohru Kiyono, Shigenobu Yonemura, Yoshifumi Kawamura, Hiromasa Aoki, Naoki Goshima, Masaki Inagaki: Ubiquitin-proteasome machinery controls primary ciliogenesis at the initial step of axoneme assembly. 第73回癌学会、横浜、2014-9-25
- 6) 五島直樹：新規プロテインアレイを用いた抗体プロファイリング、フォーラ



ム：今、なぜ抗体マーカー？、第37回  
日本分子生物学会年会、2014-11-26

義史、黒田裕  
登録日：2014年4月4日

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1)

出願番号：PCT/JP2014/072564

出願国：W I P O

出願日：2014/08/28

発明の名称：人工多能性幹細胞の作製方法

共同出願人：産総研、国立大学法人岐阜大

2)

登録番号：特許第5509421号

(特願2009-290519)

出願国：日本

発明の名称：可溶性予測装置および可溶性  
予測予測方法

発明者：五島直樹、廣瀬修一、野口保、河村

3)

登録番号：特許第5553289号

(特願2011-536662)

出願国：日本 他

発明の名称：新規核初期化物質

発明者：五島直樹、山中伸弥、前川桃子、河  
村義史、望月宏美

登録日：2014年6月6日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金

[がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）]

分担研究報告書

食道癌組織でのNY-ESO-1発現様式の解析と新規検出技術の検討

研究分担者 佐藤 永一 東京医科大学 医学総合研究所 病理・画像部門 准教授

**研究要旨：**前年度までの事業に引き続き「CHP/NY-ESO-1 ポリペプチドがんワクチンの術後食道癌症例を対象とした多施設共同前期第 II 相臨床試験」で NY-ESO-1 の発現解析を行った。症例が集積されることで、参加施設間での NY-ESO-1 検出率に明らかな差が見いだされるようになった。解析標本を再検討した結果、NY-ESO-1 の発現には著しい不均等性があることがあり、陽性細胞を検出するためにはより多数の観察面を得る必要があることが明らかになった。そのため手術検体を用いてその発現を解析するには、複数個所のブロックを用いることが有用であることが判明した。複数ブロックを用いた場合、NY-ESO-1 の陽性率はおおむね 50% 程度で、施設間の明らかな差異はなかった。また免疫組織化学の相補的な手法として有望視されている RNA in situ hybridization 法の有用性を検討したが、NY-ESO-1 のがん組織での検出にあたっては、現時点では免疫組織化学に代わり得るものとは言えなかった。

A. 研究目的

平成23年より開始された本臨床試験では、候補患者が試験に参加するためには、切除検体を用いた免疫組織化学的な検査で癌細胞にNY-ESO-1が発現していることが必須条件となっている。本試験で、多施設に由来する標本の免疫組織化学と結果判定を担当する中で、特定の施設にNY-ESO-1 陽性例が集中する傾向があることが確認された。

試験候補となりうる患者の術前化学療法の手法や対象患者の進行度に、施設間で大きな差異はない。また検体処理の手法は本

邦の標準的な診療施設では、ほぼ統一されていると考えられ、免疫組織化学の結果に影響を与えるとは考え難い。

一方でNY-ESO-1 の発現は、癌組織内ではしばしば不均等に分布していることが知られており、このようなNY-ESO-1 の不均等な発現様式が施設間での陽性率の差の要因となる可能性があると考え、本分担研究での検討課題とした。

同時に免疫組織化学が技術的に不安定なため、発現率に差が生じた可能性もあり、オリゴDNAプローブを用いたRNA in situ hybridization (ISH) 法による組織中での

mRNA発現検出法の実用可能性についても検証することとした。

## B. 研究方法

### 【免疫組織化学】

治験候補患者のNY-ESO-1 発現判定のために提出された組織標本について、1症例あたりの提出ブロック数別での陽性率を検証した。検証にあたり判定した標本の再顕鏡も行った。

### 【ISH法】

東京医科大学にて保管されているホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いて、RNA scope システム (Advanced Cell Diagnostic 社) を用いて、NY-ESO-1 の RNA in situ hybridization を施行した。

(倫理面への配慮)

臨床試験候補患者の組織標本、ISH法の検証に用いた組織標本は、本分担研究者が受領した時点で匿名化されている。

## C. 研究結果

### 【免疫組織化学】

149 例の標本のうち、NY-ESO-1 陽性例は50例 (34%) であった。提出ブロック数が1ブロックのみであった群は、105例中34例が陽性 (陽性率32%) であったのに対し、2ブロック以上の標本が提出された12例では陽性症例が6例 (陽性率50%) であった。

以上のように2ブロック以上の組織標本が提出された群で陽性率が高い傾向があることから、発現判定にあたって複数のブロックを提出することが治験調整委員会により推奨された。

推奨後に提出された症例では1ブロックのみが提出された13 例はいずれも陰性 (陽性率0%) で、2ブロック以上が提出された19 例では10例が陽性 (陽性率53%) であった。なお複数ブロックを提出した群では、施設間での陽性率に明らかな差は確認されなかった。

複数ブロックが提出された例での陽性細胞の分布を検討したところ、隣接した領域から切り出されたブロックでも陽性細胞の分布が著しく異なる場合があることが確認された。

### 【ISH法】

陽性臓器である精巣ではNY-ESO-1 の陽性シグナルが精細胞に確認され、免疫組織化学での陽性細胞の分布と一致した。ただし免疫組織化学でNY-ESO-1 陽性を示した食道癌の標本ではシグナルがほとんど検出されなかった。

## D. 考察

食道癌 (重層扁平上皮癌) では、NY-ESO-1 陽性例であっても、陽性細胞の分布が著しく不均等であることが再確認された。また臨床試験標本を検証した結果、免疫組織化学で陽性細胞を検出するためにはより癌組織の観察領域を増やすため、複数の箇所から切り出したブロックを用いることが有用であることが明らかにされた。

カットオフ値の設定も考慮する必要があるが、本研究では複数ブロックで検索した場合おおむね50% 前後の陽性率であり、食道癌のNY-ESO-1 陽性率は先行論文で報告されているよりも、実際には高い可能性が

ある。NY-ESO-1を標的とした免疫治療の適応となる患者数が増える可能性があり、さらに厳格に検証する必要がある。

ISH法については、癌組織でのmRNA 発現を的確に検出できる方法とは言えない。精巢ではシグナルが比較的良好に検出されていることと合わせると、組織標本の処理過程に要因があるように見受けられる。現時点では臨床試験で利用できるような、汎用性のある技術とはいえない。

#### E. 結論

NY-ESO-1 の発現細胞の分布には著しい不均等性があり、手術による切除検体で陽性細胞を検索するためには多数のブロック

を検索することが望ましい。

ISH 法は、現段階では免疫組織化学を相補する手法とは言えない。

#### G. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし