

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野))
分担研究報告書(平成26年度)

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, XAGE1b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 症例 114 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

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、これらの製剤も臨床の現場で用いられ始めている。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巣抗原； cancer-testis antigen、以下 CTA)の

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 94 症例(男性 30 例、女性 54 例、年齢中央値 61 歳、最高年齢 86 歳、最少年齢 15 歳)の 114 検体(原発巣 75 検体、リンパ節転移巣 27 検体、皮膚転移巣 12 検体)のホルマリン固定パラフィン包埋標本である。これらに対し、CTA である NY ESO-1 と XAGE1b の発現の有無を免疫組織学的染色により確認し、患者の臨床情報との相関性を検討した。

解析の対象となった患者の背景、原発巣の発症部位、病理組織学的 stage 分類等のまとめを以下の表 1 に示す。

表1 本検討で解析の対象となった患者の背景

	N (%)
Sex	
Male	30 (35.7%)
Female	54 (64.3%)
Age (years)	
Mean ± SD (range)	59.54±14.64 (15-86)
Median	61
Survival time (months)	
Mean ± SD (range)	61.87±5.69 (2-225)
Median (mm)	43.5
Primary lesion	
Breslow thickness	
in situ/lentigo maligna	2
≤ 1.00 mm	17
1.01-2.00 mm	15
2.01-4.00 mm	12
> 4.01 mm	22
Unknown	7
Mean ± SD (range)	3.30±0.38(0.2-14)
Median (mm)	2.10
Tumor subtype	
ALM	23 (30.7%)
SSM	20 (26.7%)
NM	22 (29.3%)
LMM	1 (1.3%)
in situ	2 (2.7%)
mucosal	7 (9.3%)
Tumor site	
Extremity	37 (49.3%)
Trunk	16 (21.3%)
Head and neck	10 (13.3%)
Mucosal	7 (9.3%)
Genital	5 (6.7%)
Metastatic lesion	
Lymph node	27
Skin metastasis	12

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。

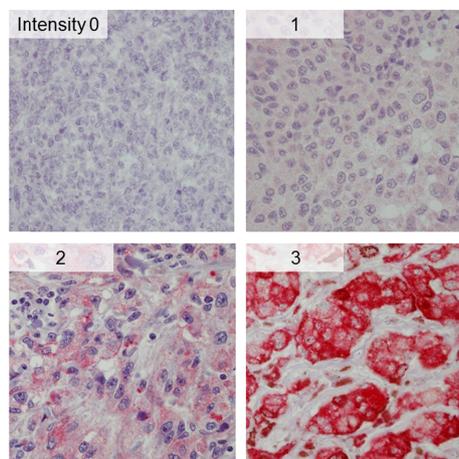
染色態度の評価は陽性細胞のパーセンテージ（Number）と陽性細胞の染色強度（Intensity）の2項目に対して行う。

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の評価は以下の図1に例示する染色強度の通りに行った。左上からスコア0、1、2、3の順である。

図1 各染色強度の代表例



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った。

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。

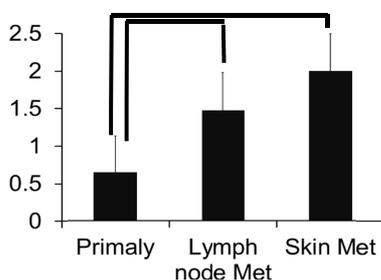
C. 研究結果

ヒト悪性黒色腫におけるこれらの蛋白質の発現を免疫組織染色において検討した。

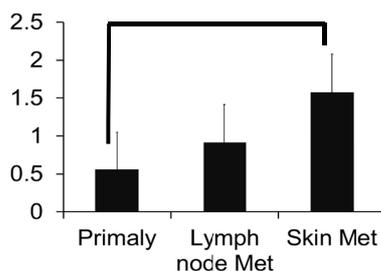
以下の図3の如く、XAGE1bとNY ESO-1のいずれにおいても、原発巣 リンパ節転移巣 皮膚転移巣と癌が進展に伴って発現する症例/発現の強度が増加するという傾向が認められた。

図2 悪性黒色腫検体における各 CTA の染色態度と腫瘍進展の関係

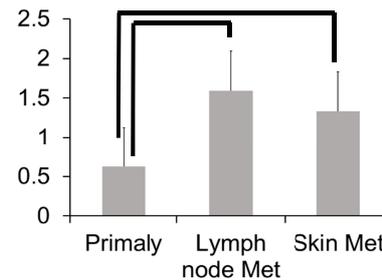
XAGE1b number



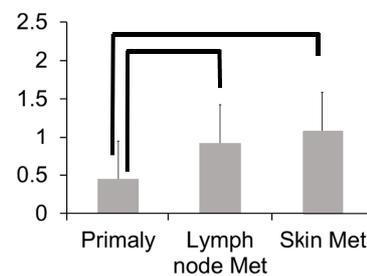
XAGE1b intensity



NY ESO-1 number



NY ESO-1 intensity

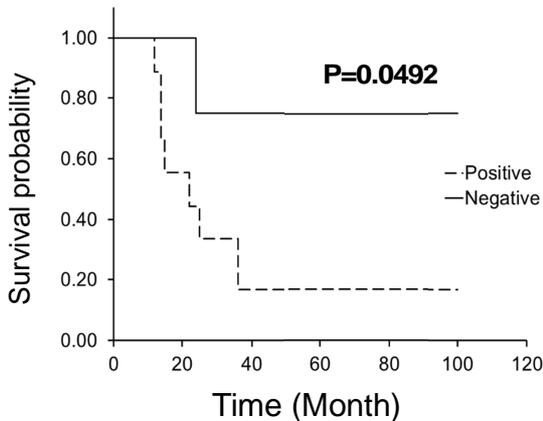


p < 0.05以下で有意差あり

続いて、解析可能であったリンパ節転移巣22症例22検体におけるXAGE1bとNY ESO-1の発現と予後の相関を検討した。以下図3にKaplan-Meier法により解析した結果を示す。有意差検定は一般化Wilcoxon検定を用いている。XAGE1bを発現している症例において予後が不良な傾向があることが示唆された。

図3 悪性黒色腫リンパ節転移症例におけるXAGE1bの染色態度と患者予後の関係

XAGE-1b



D. 考察

上述の知見よりXAGE1bと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ほか、XAGE1bが転移巣において発現している症例においては、不良な予後を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。これらの結果は本来抗腫瘍免疫において標的抗原となり、免疫を活性化させる機能を有している筈のCTAとしては一見逆の結果になっているように見える。しかし、腫瘍が進展してもなお発現している症例は既にこれらのCTAをターゲットとした抗腫瘍免疫を克服してより悪性度の高いphenotypeへと進化を遂げているとも解釈できる。また、

CTA自身に腫瘍の進展を促進する分子生物学的な機能が備わっている可能性も考えられ、今後の解析が必要である。

E. 結論

本研究から得られている知見より、XAGE1bおよびNY ESO-1が悪性黒色腫の進展を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆される。また、Stage3のリンパ節転移検体においては、XAGE1bの発現が不良な予後予測のバイオマーカーとなる可能性も示唆された。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