

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-82413

(P2019-82413A)

(43) 公開日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	A 4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	H
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2017-210225 (P2017-210225)	(71) 出願人	517381854
(22) 出願日	平成29年10月31日 (2017.10.31)		村垣 善浩
			東京都新宿区河田町8-1 学校法人東京女子医科大学先端生命医科学研究so先端工学外科学分野内
		(71) 出願人	504171134
			国立大学法人 筑波大学
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1
		(71) 出願人	502233964
			セルメディシン株式会社
			茨城県つくば市千現二丁目1番地6
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腫瘍ワクチンの有効性の予測方法

(57) 【要約】

【課題】 悪性腫瘍の患者に対する腫瘍ワクチンの有効性を予測する方法を提供する。

【解決手段】 悪性腫瘍患者の治療における腫瘍ワクチンの有効性を予測する方法であって、以下の工程：(1)悪性腫瘍患者から腫瘍組織を分離する工程；(2)上記の腫瘍組織に対してp53に結合する抗体により免疫染色を行う工程；及び(3)腫瘍組織中の腫瘍細胞のうち、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定する工程を含む方法。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

悪性腫瘍患者の治療における腫瘍ワクチンの有効性を予測する方法であって、以下の工程

：

- (1) 悪性腫瘍患者から腫瘍組織を分離する工程；
- (2) 上記の腫瘍組織に対してp53に結合する抗体により免疫染色を行う工程；
- (3) 腫瘍組織中の腫瘍細胞のうち、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定する工程

を含む方法。

10

**【請求項 2】**

免疫染色にクローン番号D0-7由来のモノクローナル抗体を用いる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

腫瘍組織の組織標本を作製して免疫染色を行う請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

腫瘍ワクチンが、自家腫瘍ワクチン、ペプチドワクチン、樹状細胞ワクチン、又はそれらの機能的同等品のいずれかである請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 5】**

悪性腫瘍が膠芽腫であり、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が10%未満である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

悪性腫瘍患者の治療において腫瘍ワクチンの有効性が期待できる患者を選別する方法であって、以下の工程：

- (1) 悪性腫瘍患者から腫瘍組織を分離する工程；
- (2) 上記の腫瘍組織に対してp53に結合する抗体により免疫染色を行う工程；
- (3) 腫瘍組織中の腫瘍細胞のうち、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定する工程；及び

- (4) 該患者を腫瘍ワクチンの有効性が期待できる患者として選別する工程

を含む方法。

30

**【請求項 7】**

請求項 1 ないし 5 に記載の方法により有効性を確認した悪性腫瘍患者に投与するための腫瘍ワクチン。

**【請求項 8】**

請求項 6 に記載の方法により選別された悪性腫瘍患者に投与するための腫瘍ワクチン。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、悪性腫瘍の患者に対して腫瘍ワクチンによる治療を行うに際して、腫瘍ワクチンの有効性が期待できる患者をあらかじめ選別することを可能にする有効性の予測方法に関する。

40

**【背景技術】****【0002】**

悪性腫瘍の治療法としては、大別して、外科手術、放射線治療、化学療法他に、体内の免疫反応系を利用する免疫療法が知られている。既に多種多様ながん免疫療法が開発されているが、腫瘍細胞にある特有の抗原(がん抗原)に対する免疫反応を強化して腫瘍細胞を排除する方法ががん免疫療法である。強化法には、基本的に、免疫担当細胞を刺激して免疫反応を積極的に惹起し拡大させる方法と、免疫担当細胞の反応性を負に制御している分子群の作用を阻害して、結果的に免疫反応を推進させる方法がある。特に前者において、腫瘍抗原を何らかの方法で体外から投与し、該抗原に対する体内の免疫反応を強化して

50

、該抗原を有する腫瘍細胞を排除しようとするものを腫瘍ワクチン(がんワクチン)あるいは抗腫瘍ワクチンと称している。なお、「悪性腫瘍」は一般には「がん」と呼ばれることが多いことから、本明細書では「悪性腫瘍」と「がん」を同義語として用いる。

#### 【0003】

腫瘍ワクチンによる治療方法としては、大別して、(1)腫瘍組織そのものの溶解液を抗原として用いる方法、(2)化学的に固定した腫瘍組織の断片をそのまままるごと抗原として用いる方法、(3)腫瘍抗原タンパクや腫瘍抗原タンパクの一部で抗原性を発揮するペプチド部分を抽出/合成して用いる方法、(4)いずれかの腫瘍抗原を免疫担当細胞に体外で搭載して体内に戻す方法、(5)腫瘍抗原遺伝子を含むDNA又はその発現を担うRNAをウイルスに搭載して、免疫担当細胞又は腫瘍細胞に感染させる方法、及び(6)前項のDNA又はRNAを非ウイルス性微粒子に搭載して細胞内に送り込む方法がある。いずれの方法も、腫瘍抗原を特異的に認識する免疫担当細胞を活性化させるという共通原理によっている。

10

#### 【0004】

特に、腫瘍抗原が精製された(もしくは合成された)抗原分子ではなく、治療対象であるがん患者本人の腫瘍組織に直接由来する上記(1)又は(2)のような粗製品である場合は、自家腫瘍ワクチン(自家がんワクチン、自己がんワクチン、又は自家ワクチンなどと呼ばれることもある)として、他の精製(合成品、又は場合によっては単一の遺伝子由来の)抗原分子による腫瘍ワクチンとは区別される。自家腫瘍ワクチンの抗原が粗製品であるが故に、当該患者の腫瘍組織中の腫瘍抗原の大部分が含まれており、また、他のがん患者の同種がん・異種がんと共通の腫瘍抗原ペプチドも、少なくともその一部として含まれているのは自明である。

20

#### 【0005】

しかしながら、このような粗製抗原である腫瘍ワクチンによる治療効果を期待できる患者を治療開始前にあらかじめ選別するための方法はほとんど提供されておらず、特に、がん治療の臨床において応用可能であり、かつ治療効果の予測性が十分に高い選別方法は知られていない。自家腫瘍ワクチンの治療効果を期待できる患者を高い精度であらかじめ選別するための方法が開発されれば、免疫反応のメカニズムが腫瘍ワクチンの種類によらず基本的に同じであるという共通原理により、上記(3)~(6)のいずれかの方法により製造された腫瘍ワクチン一般にも適用できる方法となり、汎用性がある方法となることが期待される。

30

#### 【0006】

腫瘍細胞は、正常細胞の一部の遺伝子に変異し、自律的で他細胞からは制御されない増殖を行うようになった細胞であり、この遺伝子変異の検出方法が種々開発されている。例えば、増殖制御にかかわる遺伝子のDNA塩基配列、またはその転写産物であるRNA塩基配列を解読する方法が利用されている。また、遺伝子の塩基配列を解読することなく、変異型・野生型を含めて遺伝子産物であるタンパクを、当該タンパクに対する抗体を用いて免疫組織化学染色(以下、「免疫染色」と略す場合がある)する簡便な方法も広く用いられている。

#### 【0007】

免疫染色は検出感度が鋭敏であるものの、染色対象となる組織が常に均一に染色されるとは限らない。用いる抗体の標的分子が発現されている細胞と発現されていない細胞が混在している場合も多く、免疫染色により染まった(陽性)か、染まらなかった(陰性)かの境界は必ずしも明確ではない場合がある。そのような場合には、染色対象とした細胞全体の何%が染まったかという特定の境界線を決め、それ以上の場合を免疫染色陽性の組織、未満の場合を陰性の組織として分類し、陽性症例数や陰性症例数の解析をするのが一般的である。また、抗体の結合量を組織化学的に分析し、数値化する場合もある。

40

#### 【0008】

例えば、特許文献1(樹状細胞腫瘍ワクチンの適性評価方法及び生存率の予測方法)では、多形性膠芽腫患者由来の検体サンプル中のPD-L1、PD-1、及びCD8の発現細胞数の割合を測定し、プリセット閾値(上記の境界線と同様の意味である)以上を高発現、プリセット閾

50

値未満を低発現として分類し、患者の予後との相関性を検討している。もっとも、この特許文献1では、以下に述べるp53分子の発現に関しては一切言及されていない。

【0009】

正常細胞の諸種の機能を制御している重要分子であり、いわゆるがん抑制遺伝子の産物であるp53については、p53分子に特異的に結合する抗体が開発されている。単純な免疫染色によってp53が過剰発現している腫瘍細胞を容易に検出できることから、多様な観点からの研究がなされている。

【0010】

例えば、非特許文献1には、

- ・ p53は393アミノ酸からなる核内タンパク質で、主な分子機能は転写活性因子であること；
- ・ これまでに多くのヒトがんにおいてp53変異が報告され、腫瘍の種類によるがヒトがん全体の約50% にp53変異があること；
- ・ p53は細胞周期のG1期/S期境界での停止、アポトーシス誘導、DNA修復促進や血管新生抑制などの重要な細胞機能に関わっていること；
- ・ それぞれの機能を担うと考えられる下流遺伝子がこれまでに複数同定されていること；及び

・ p53変異によるがん抑制経路の破綻ががんの進展に重要な役割を担っていることなどが詳細に述べられている。今日までに、多数のp53関連文献が発表されており、p53と腫瘍の発生、病理、治療等に関する知見は拡大している状況にある。

【0011】

p53に係る知識が集積するにつれ、がん抑制という基本機能を失った変異型p53分子を排除するか、あるいは、変異型p53分子を正常な野生型p53分子に置換して腫瘍治療を行う方法が開発された。そのような方法においては、p53は腫瘍抗原として認識されており、p53を高発現する悪性腫瘍細胞をがん免疫療法の標的細胞としている。一例をあげれば、非特許文献2には、p53特異的細胞傷害性Tリンパ球の投与によってマウスのp53高発現腫瘍が根治することが記載されている。

【0012】

しかしながら、腫瘍組織におけるp53発現の程度に応じて腫瘍治療を行うために、悪性腫瘍組織におけるp53の発現の程度を調べて治療に利用する方法の開発は未だに不十分である。例えば、特許文献1にはp53についての言及が全くない。また、例えば、Feldserらは、肺がんモデル実験において、変異したp53の機能回復により、変異型p53の発現が多くなっている進行した悪性度の高いがん組織では効果が得られ、がんが縮小するものの、変異型p53の発現がまだないか、発現の程度が少ない場合(悪性度は低い、発がんの観点からは十分に悪性である)場合には、p53の機能回復によっても有効性が達成できず、がん組織の一部が残ってしまうことを示し、腫瘍治療において、p53の機能回復だけでは限界があることを提示している(非特許文献3)。このように、従来の研究はもっぱら腫瘍組織におけるp53の過剰発現に焦点を当てたものであり、p53発現レベルが低い、又は観察されない場合については腫瘍治療の観点からの注目度は極めて低い。なお、p53は正常組織細胞にも広汎に発現されている分子であるが、その発現レベルは、例えばヒト組織のp53免疫染色で汎用されるモノクローナル抗体DO-7(Dako社製)を用いても染色できないことがあり、この場合にはしばしば「p53発現がない」と表現されるが、これは病理診断における慣用表現であり、p53分子が全く発現されていない状態を意味するものではなく、p53分子が検出されない/観察できないと解釈すべき表現である。

【0013】

脳腫瘍の一種である膠芽腫は、各種のがんの中でも膵臓がんと共に最も治療困難な腫瘍であり、膠芽腫治療に有効な薬物ならば、他のすべてのがん種に有効性が期待できると考えられているほどである。それに伴って膠芽腫におけるp53の検出とその意味するところの研究も盛んに行われている。しかし、脳腫瘍中で最悪性(グレード4)の膠芽腫では、これまでに、p53発現の程度と予後あるいは適用した治療法の有効性との間で一貫した関

係性が見られず、当業者の間で議論が分かれている(非特許文献4)。

【0014】

例えば、本発明者らが実施した臨床研究でも、膠芽腫の治療成績向上を目指し、手術と放射線治療に加え、自家腫瘍ワクチン(特許文献2及び3に記載されたものを使用)を投与した場合、

1)再発膠芽腫において、自家腫瘍ワクチンの効果があったとされた5例と効果がなかった7例との間で比較すると、p53発現レベルが低い症例で自家腫瘍ワクチンの効果が認められ( $p=0.021$ )(非特許文献5)；

2)初発膠芽腫において、初期治療後の無増悪期間を指標として自家腫瘍ワクチンの効果を調べると、p53発現レベルが低い症例で自家腫瘍ワクチンの無増悪期間増加効果が認められるが( $p<0.05$ )(非特許文献6)、

一方で、

3)初発膠芽腫において、手術と放射線治療に化学療法も加えた膠芽腫の標準治療にさらに自家腫瘍ワクチンを投与した場合、初期治療後の無増悪期間を指標に自家腫瘍ワクチンの効果を調べると、p53発現レベルと治療効果との間には有意な相関関係がない( $p=0.92$ )(非特許文献7)

という結果が得られている。このように、p53発現レベルと自家腫瘍ワクチンの治療効果の相間に関する評価として相反する結果が提示されており、何ゆえ異なる結果が得られているのかについての分析もなされていないことから、相間に関して評価が確立している状態とはほど遠い。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】特開2017-37059号公報

【特許文献2】特許第4688254号公報

【特許文献3】特許第5579586号公報

【特許文献4】特許第3492671号

【非特許文献】

【0016】

【非特許文献1】加齢医学研究所雑誌, 56:1-34, 2004.

【非特許文献2】Ann. N. Y. Acad. Sci., 910:223-233, 2000.

【非特許文献3】Nature, 468:572-575, 2010.

【非特許文献4】Neurochem. Res., 41:1723-1731, 2016; Erratum, Neurochem. Res., 41:3418, 2016.

【非特許文献5】Cancer Sci., 98:1226-1233, 2007.

【非特許文献6】J. Neurosurg., 115:248-255, 2011; Erratum, J. Neurosurg., 2013.

【非特許文献7】J. Neurosurg., 121:543-553, 2014.

【非特許文献8】Handbook, Immunochemical Staining Methods, 3rd edition, [http://www.ihcworld.com/\\_books/Dako\\_Handbook.pdf](http://www.ihcworld.com/_books/Dako_Handbook.pdf)

【非特許文献9】N. Engl. J. Med., 352:987-996, 2005.

【非特許文献10】World J. Surg. Oncol., 11:127, 2013.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

本発明の課題は、腫瘍ワクチンを悪性腫瘍の治療に適用するにあたり、患者に対する腫瘍ワクチンの治療効果を予測する方法を提供することにある。また、上記の予測手段により、腫瘍ワクチンによる治療効果を期待できる患者をあらかじめ選別する方法を提供することも本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0018】

10

20

30

40

50

本発明者らは、膠芽腫に対する自家腫瘍ワクチンの治療効果を探索するために臨床試験「自家腫瘍ワクチンによる初発膠芽腫治療効果無作為比較対照試験」(UMIN000010602)を実施した。この臨床試験に登録された脳腫瘍症例63例のうち、詳細な病理診断により膠芽腫ではないと判定された症例及び登録後に参加同意を撤回した症例の計6例を除く57例を純粋な膠芽腫症例とし、無作為に選ばれた自家腫瘍ワクチンを投与した試験群と対照薬を投与した対照群との間で有効性の判定を行ったが、自家腫瘍ワクチンの効果については統計学的有意差が認められなかった。

【0019】

しかしながら、その臨床試験に際してp53分子の発現程度を詳しく調査したところ、腫瘍細胞中にp53分子が検出されないか、又は検出される腫瘍細胞の割合が腫瘍組織中で非常に低い(p53陰性と分類される)症例群において、自家腫瘍ワクチンに高い有効性が認められる傾向があり、膠芽腫組織におけるp53発現の程度を指標として、腫瘍ワクチンによる治療の有効性を予測できることを見いだした。従来は、膠芽腫組織におけるp53の発現程度を規定する方法が明確には設定されておらず、もっぱらp53発現が明瞭である場合(p53陽性)の腫瘍組織に注目が集まっていたため、p53陰性の場合に自家腫瘍ワクチンに有効性が認められる傾向があっても5例対7例というごく少数例の間の比較であり(非特許文献5)、14例対9例の比較では再現性がなく(非特許文献7)、p53陰性は指標にならないと結論付けられていたものである。

【0020】

しかしながら、さらに症例数を増やした16例対11例による上記の解析により、統計学的にみてもこの傾向が実は正しいことを本発明者らは初めて認識することができた。また、膠芽腫以外の腫瘍においても、p53の細胞内作用原理及び免疫反応系を介する腫瘍ワクチンの腫瘍細胞に対する作用原理が膠芽腫の場合と同一であることから、p53の発現程度により同様に腫瘍ワクチンの有効性を予測できること、すなわちp53陰性が効果予測バイオマーカー(predictive biomarker)となり得ることも見出した。本発明はこれらの知見により完成されたものである。

【0021】

すなわち、本発明により、悪性腫瘍患者の治療における腫瘍ワクチンの有効性を予測する方法であって、以下の工程：

- (1)悪性腫瘍患者から腫瘍組織を分離する工程；
  - (2)上記の腫瘍組織に対してp53に結合する抗体により免疫染色を行う工程；及び
  - (3)腫瘍組織中の腫瘍細胞のうち、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定する工程
- を含む方法が提供される。

【0022】

本発明の好ましい態様によれば、免疫染色にクローン番号D0-7由来のモノクローナル抗体を用いる上記の方法；腫瘍組織の組織標本を作製して免疫染色を行う上記の方法；顕微鏡下においてp53分子が検出されない腫瘍細胞の割合を判定する上記の方法；腫瘍ワクチンが、自家腫瘍ワクチン、ペプチドワクチン、樹状細胞ワクチン、又はそれらの機能的同等品のいずれかである上記の方法；及び、悪性腫瘍が膠芽腫であり、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が10%未満である上記の方法が提供される。

【0023】

別の観点からは、本発明により、悪性腫瘍患者の治療において腫瘍ワクチンの有効性が期待できる患者を選別する方法であって、以下の工程：

- (1)悪性腫瘍患者から腫瘍組織を分離する工程；
- (2)上記の腫瘍組織に対してp53に結合する抗体により免疫染色を行う工程；
- (3)腫瘍組織中の腫瘍細胞のうち、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定する工程；及び

(4) 該患者を腫瘍ワクチンの有効性が期待できる患者として選別する工程を含む方法が提供される。

【0024】

本発明のさらに別の観点からは、上記の方法により有効性を確認した悪性腫瘍患者に投与するための腫瘍ワクチン、及び上記の方法により選別された悪性腫瘍患者に投与するための腫瘍ワクチンが提供される。これらの発明の好ましい態様によれば、腫瘍の再発予防、転移防止、及び/又は体内残存腫瘍の根絶のために投与する上記の腫瘍ワクチンが提供される。

【発明の効果】

【0025】

本発明により提供される腫瘍ワクチンの有効性の予測方法により、腫瘍ワクチンの有効性を期待できる腫瘍患者を精度よく選別することができるので、選別された腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンを投与することにより、腫瘍の縮小又は消失、腫瘍の再発予防、転移防止、及び体内残存腫瘍の消失など、極めて効率的な悪性腫瘍治療が可能になる。特に、悪性度の極めて高い膠芽腫の患者において腫瘍ワクチンの有効性を期待できる患者を選別して腫瘍ワクチンを投与することにより、無増悪生存期間の延長及び全生存期間の延長などを期待できることから、膠芽腫の患者の治療において非常に有用性が高い。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】実施例1の臨床試験における試験薬及び対照薬の投与スケジュールを示した図である。

【図2】実施例1の臨床試験におけるp53陰性/陽性が判明した膠芽腫症例50例の予後について解析した図である。試験群(11例)と対照群(8例)の間に差が見出された。

【図3】実施例1の臨床試験における試験群において、p53陰性群16例とp53陽性群11例とを比較した図である。両群の間には統計学的有意差が認められた。

【図4】p53免疫染色における陰性の判定基準を10%未満と設定したとき、過去の臨床試験においてレトロスペクティブに解析した結果、p53陰性群7例とp53陽性群4例との間において統計学的有意差が認めれたことを示す Kaplan-Meier 図である。

【図5】実施例3のp53免疫染色の対象になった乳がん症例の原発巣がトリプルネガティブであったことを示す診療情報提供書の画像である。

【図6】実施例3の乳がん症例の原発巣のp53免疫染色顕微鏡像(倍率は400倍)である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本明細書中に引用した特許文献及び非特許文献中の記載の全てを参照により本明細書の開示として含める。

本発明の方法は、悪性腫瘍患者の治療における腫瘍ワクチンの有効性を予測する方法であって、以下の工程：

(1) 悪性腫瘍患者から腫瘍組織を分離する工程；

(2) 上記の腫瘍組織に対してp53に結合する抗体により免疫染色を行う工程；及び

(3) 腫瘍組織中の腫瘍細胞のうち、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定する工程

を含むことを特徴としている。

【0028】

本発明の方法において対象となる悪性腫瘍の種類は特に限定されず、例えば、肺癌、胃癌、食道癌、肝癌、大腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮体癌、子宮頸癌、膀胱癌、膵臓癌、腎臓癌、前立腺癌、頭頸部癌、悪性脳腫瘍、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、又は骨肉種などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。本発明の方法は腫瘍ワクチンによる治療を行うことを前提としていることから、通常の抗癌剤治療や外科治療などで十分な治療を行うことができない難治性かつ悪性度の高い膠芽腫などは本発明の方法

10

20

30

40

50

の好ましい対象である。もっとも、本発明の方法における悪性腫瘍は膠芽腫に限定されることはない。

【0029】

本発明の方法は、悪性腫瘍患者から体外に分離された腫瘍組織を用いる。腫瘍組織の用語は、固形癌における悪性腫瘍細胞を含む組織のほか、血液、リンパ液、脳脊髄液、骨髓、胸水、又は腹水などを包含する。患者からの腫瘍組織の分離手段は特に限定されず、手術下における通常の切除・摘出などの外科的処置のほか、穿刺による組織採取、シリンジを用いた血液やリンパ液の採取などの手段であってもよい。もっとも、分離手段はこれらの例に限定されることはなく、分離すべき腫瘍組織の状態が保存されるように患者の生体内から生体外に取り出すことができる手段であれば、いかなる手段を採用してもよい。

10

【0030】

悪性腫瘍患者から分離された腫瘍組織は、通常は病理標本として調製した後に工程(2)の免疫染色を行うことが好ましい。病理標本は、通常の方法に従って病理切片を調製した後に、切片をスライドガラスに貼付して固定化することにより作製することができるが、免疫染色後に染色された悪性腫瘍細胞をカウントすることができる標本の形態であれば、特に切片を調製することなく任意の形態の標本として病理標本を作製することができる。例えば、腫瘍組織を切片とすることなく生理食塩水などに懸濁した液をスライドガラス上に滴下して乾燥させる方法などを採用してもよい。血液やリンパ液などの場合にはこの方法が好適である。

【0031】

20

免疫染色の手段は特に限定されず、腫瘍組織中の腫瘍細胞においてp53分子が発現しているか否か、発現している場合にはその程度がどのぐらいかを観察することができる手段である限り、当業者に通常利用可能な手段を適宜採用して行うことができる。例えば、患者の生体外に分離された腫瘍組織に対してp53に結合する抗体を1次抗体として作用させ、続いて該1次抗体に特異的に結合する2次抗体を作用させることにより免疫染色を行うことが好ましい。免疫染色に用いる抗体はp53分子に対して特異的に結合する抗体であれば特にその種類は限定されないが、好ましくはクローン番号D0-7由来のモノクローナル抗体を用いることができる。免疫染色の方法は通常の方法に従って行うことができ、例えば非特許文献8に記載されている方法に従って行うことが好ましい場合がある。腫瘍組織において免疫染色された悪性腫瘍細胞は、一般的には顕微鏡下での観察又は顕微鏡写真の確認などにより容易に特定することができる。

30

【0032】

腫瘍細胞は、一般的には顕微鏡下において病理学的な形態の判定により容易に特定することができるが、例えば、顕微鏡下又は顕微鏡写真における全視野中又は視野中の一部の特定領域において、腫瘍組織に存在する腫瘍細胞のうち、p53に結合する抗体により染色される腫瘍細胞を特定し、腫瘍細胞のなかでp53に結合する抗体により染色される腫瘍細胞の割合を算出することができる。本発明の方法では、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が全腫瘍細胞に対して20%以下である場合に、その悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定することができる。なお、p53分子が検出されない腫瘍細胞の割合が全腫瘍細胞に対して20%を超える場合においても、腫瘍ワクチンの有効性が全く期待できないわけではなく、腫瘍ワクチンによる治療を行うことも可能である。

40

【0033】

例えば、悪性腫瘍が膠芽腫の場合は、上記の割合を10%未満として腫瘍ワクチンが有効であると判定することが好ましい。一般的には、使用する腫瘍ワクチンの種類及び悪性腫瘍の種類などに応じて、あらかじめ小規模な臨床試験を実施することにより、全腫瘍細胞に対するp53分子が検出されない腫瘍細胞の割合を20%以下の範囲から適宜選択し、選択されたその割合を指標とすることにより、実際の臨床に応用において高い精度で腫瘍ワクチンの有効性の判定を行うことができる。

【0034】

また、例えば、抗体の結合量を組織化学的に分析して数値化する方法により、p53分子

50



が検出されない腫瘍細胞の割合が全腫瘍細胞に対して20%以下であるか否かを調べることができる。例えば、一定の腫瘍組織量に対する1次抗体の結合量を、常法により、例えばペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素や蛍光色素等の標識を結合させた2次抗体を使用して定量することも可能であり、このような手法は当業者に広く用いられている。

#### 【0035】

別の観点により提供される本発明の方法によれば、複数の悪性腫瘍患者を含む患者群のなかから、腫瘍ワクチンの有効性が期待できる患者を選別することができる。この方法に従えば、上記の工程(1)ないし(3)により各悪性腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンによる治療が有効であるか否かを判定し、腫瘍ワクチンによる治療が有効であると判定された患者のみに対して腫瘍ワクチンによる治療を行うことができるので、極めて効率的な悪性腫瘍治療が可能になる。

#### 【実施例】

#### 【0036】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

本実施例において使用される用語の意味は、当分野において慣用的に使用される用語の意味と同義であり、実施例において採用された各手法は、特にその出典を明示した技術を含めて、いずれも公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。各種の分析などは、使用した分析機器、及び試薬、キットの取り扱い説明書、又はカタログなどに記載の方法を用いて行うことができる。

#### 【0037】

#### 【表1】

略語表

略 語	意 味
HAMP	変性凝固固体化ヘモグロビン・アルブミン微粒子
ワクチン	試験薬または対照薬(総称として用いる略語である)
PFS	無増悪生存期間
OS	全生存期間

#### 【0038】

例1：臨床試験「自家腫瘍ワクチンによる初発膠芽腫治療効果無作為比較対照試験」(UMIN000010602)におけるp53陰性/p53陽性症例の予後の比較

この試験(UMIN000010602)は、がんワクチン療法研究会(〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 筑波大学陽子線医学利用研究センター内)によって主催された多施設共同臨床研究で、腫瘍ワクチンの初発膠芽腫治療における二重盲検無作為比較対照試験である。概要は[https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr\\_view.cgi?recptno=R000012389](https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000012389)に公開されている。詳細は東京女子医科大学病院倫理委員会により承認された研究実施計画書(2013年5月7日付第3版から試験に供されたが、途中で改訂があり、最終版は2015年9月24日付第5.1版、研究責任者：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 教授 村垣善浩)によっているが、本試験への各参加施設はそれぞれの倫理委員会の承認を受けてから本試験を実施している。

#### 【0039】

1) 試験薬 AFTV(コード名)

一般名：自家腫瘍ワクチン

成分名：ホルマリン固定パラフィン包埋自家腫瘍組織断片\*

剤形：注射剤

含量：ホルマリン固定パラフィン包埋自家腫瘍組織断片の遠心後容量(packed volume)の

割合として、8-24% (v/v) を含む。

本試験薬の製造法は非特許文献5に記載されている。

#### 【0040】

#### 2) 対照薬 AFTV-p (コード名)

一般名：対照薬

成分名：ホルマリン固定熱変性ヒト血清アルブミン・ヒトヘモグロビン

剤型：注射剤

含量：ホルマリン固定熱変性ヒト血清アルブミン・ヒトヘモグロビン沈殿の混合物の遠心後容量 (packed volume) の割合として、8-24% (v/v) を含む。

#### 【0041】

対照薬の製造法は以下のとおりである。市販の生物学的製剤基準ヒト血清アルブミン (化学及血清療法研究所製、献血アルブミン25 “化血研”、以後「25%HSA」という) 2.4mL に対し、ヒトヘモグロビン (SIGMA社製、H7379-5G、生理食塩液に溶解・懸濁し100mg/mLとした) を0.6mLの割合で混合した液を作製し、110℃、5分間熱処理し凝固させた後、大まかに破碎し、ここに10%中性緩衝ホルマリン液を20mL加え、3日間室温で放置した。この固定破碎物を生理食塩液で洗浄後、マイクロチューブをセットできる汎用の組織破碎機 (Tissue Lyser II, Qiagen社製) にて破碎処理した。破碎断片を70μmの孔径のメッシュを通過させ、さらに十分量のホルマリン液に漬けて滅菌し、生理食塩液で繰り返し遠心洗浄した。卓上遠心機で3000rpm (最大加速度1580G)、15分間遠心沈殿させたときの沈殿容量を計測し、生理食塩液に懸濁したときの沈殿容量割合が20.95v/v%になるように調整した。この1.05mLに対し、固体化担体であるヘパリン-アルブミンコアセルベート沈殿 (微粒子状になっている) (特許文献4、ただし、この文献では精製ツベルクリンを含むヘパリン-アルブミンコアセルベート沈殿について記載されているが、本例では、精製ツベルクリンを含まないヘパリン-アルブミンコアセルベート沈殿を作製し、濃度を精製ツベルクリンを含む場合と同じになるように合わせてから使用した) の懸濁液0.1mLを添加し対照薬とした。

#### 【0042】

#### 3) 投与対象症例と投与スケジュール

脳腫瘍を疑われ、初めての手術後の病理検査で膠芽腫と診断された症例 (初発膠芽腫という) を被験者とした。計63例が登録されたが、2例が同意撤回したため試験薬もしくは対照薬を投与されたのは61例である。後日、中央病理診断で膠芽腫ではないとの確定診断を受けた4症例は解析対象から除外され、57例が統計解析対象となった。

#### 【0043】

投与スケジュールの全体像を図1に示す。摘出術後、初期治療開始前のタイミングで、試験薬または対照薬 (以下、両者を総称してワクチンと略す) を2回投与し、その後放射線化学療法 (非特許文献9記載のStuppレジメンによる初期治療) (放射線治療とテモゾロミドを同時併用する (concomitant) 治療) を開始した。3回目のワクチン投与は放射線化学療法中の早期に投与した。初期治療終了後、Stuppレジメンによるテモゾロミド維持 (adjuvant) 療法に入る前の休薬期間に4, 5, 6回目のワクチンを投与し、さらに維持療法1クール目終了後の休薬期間に7, 8, 9回目のワクチンを投与した。

#### 【0044】

なお、本臨床試験では、脳腫瘍が再発した場合、再発診断の時点で秘匿されているワクチンの割り付けキー (試験薬か対照薬か) を当該患者とその治療施設に開示し、もし、対照薬であった場合は、被験者の希望に応じて試験薬9回投与分を追加提供した。従って、試験薬の追加投与を受けた対照群症例は、再発後は試験群症例と同様の試験薬による治療を受けることとなり、本試験はクロスオーバー型試験デザインとなっている。そのため試験薬が有効である場合、対照群でもクロスオーバー型デザインの影響を受ける分、成績が向上してしまう可能性がある。

#### 【0045】

#### 4) 免疫染色

初回手術後の病理検査時に作成した病理切片を用いて、非特許文献8に記載の常法に従

10

20

30

40

50

ってp53免疫染色を実施した。1次抗体としてはDO-7(Dako社製)を50～100倍希釈して用いた。

【0046】

#### 5) 結果

本試験における最終登録症例の登録18ヶ月後に試験終了が宣言され、若干のフォローアップ調査期間を経て被験者全体の割り付けキーが開示された。その結果、上記の除外例を除き、解析対象となった57例のうち、試験群が30例、対照群が27例であった。本試験では、クロスオーバー型となった対照群の症例は14例であったが、全症例の割り付けキーが開示された後の発明者による解析では、対照群ではクロスオーバー型症例も、非クロスオーバー型症例も区別せず、まとめて対照群症例として取り扱った。

10

【0047】

各群の無増悪生存期間(PFS)及び全生存期間(OS)についてカプランマイヤーカーブを描き解析したところ、どちらについても試験群と対照群の間に統計学的有意差は見られなかった。しかしながら、各症例の病理切片についてp53免疫染色を施し(p53染色未実施4例、p53染色性が不明瞭で陰性/陽性が判別できない3例を除き)、p53陰性/陽性が判明した膠芽腫症例50例の予後について解析したところ、p53陰性症例においては、試験群(11例)と対照群(8例)の間に差が見出された(図2)。ログランク検定では、PFSについては $p=0.228$ 、OSについては $p=0.112$ となった。特に後者では統計学的な有意差はないものの、両群間に差がある強い傾向が出ていた。一方、p53陽性症例(試験群16例、対照群15例)においては、このような差は認められなかった。なお、顕微鏡下において染色が確認できないか、又はp53が検出される腫瘍細胞の割合が非常に少ない場合をp53陰性とし、それ以外の染色性が確認される場合をp53陽性と判定した。

20

【0048】

さらに、試験群30例のなかで、p53染色未実施2例、p53染色性が不明瞭で陰性/陽性が判別できない1例を除き、p53陰性群16例とp53陽性群11例を比較した(図3)。ログランク検定では、PFSについては $p=0.040$ 、OSについては $p=0.006$ で、いずれも統計学的な有意差を認めた。特に、図3のOSにおいて、p53陰性群では、24ヶ月以降で観察しえた42か月まで1例も死亡者が発生しておらず、3年生存率が79%もあり、この時点では全生存期間中央値は未達であった。これは、例えば、非特許文献6中のFig. 4においてDTH-2反応の大小で分類した2群におけるような単なる生存期間中央値の延長(しかし30か月以上では2群の差がなくなり生存率が30%以下となる)とは異なり、従来の報告に比べて36ヶ月時点の生存者数が非常に多いという画期的な結果である。

30

【0049】

これらの結果より、試験群の中におけるp53陰性症例には試験薬は有効であるが、p53陽性症例には無効であると結論した。試験群及び対照群全体の比較解析においては統計学的な有意差が認められなかったのは、試験群にp53陽性症例が含まれていたからと解釈できる。図2に示した結果では、各群の症例数が少ないために統計学的有意差は認められないものの、両群の間には十分な差がある傾向が強く認められ、特に、OSについては、各群の症例数を2倍にすれば $p=0.022$ となると算出されている。従って、膠芽腫を腫瘍ワクチンで治療するに際して、p53陰性を指標とし、試験登録時の症例をp53陰性例に限定することにより有効性の高い治療が可能になる。

40

【0050】

例2：臨床試験「自家腫瘍ワクチン」(テモゾロミド併用版)(UMIN000001426)におけるp53陰性/p53陽性症例の予後の比較

例1では、p53免疫染色における陰性/陽性の判定基準が、参加施設間で必ずしも厳密に規定されているものではなかったため、最終解析データの解釈に若干の懸念が残されていた。そこで、例1の臨床試験の前に実施され既に結果が発表されている初発膠芽腫を対象にした臨床試験「自家腫瘍ワクチン」(テモゾロミド併用版)試験(UMIN000001426)(臨床試験phase I/IIaに相当するシングルアームの試験で、臨床プロトコールは非特許文献7に記載されており、自家腫瘍ワクチンの投与は3回のみである)におけるp53免疫染色例を調査

50

したところ、1施設(筑波大学)では11例があった。ここでp53免疫染色における陰性/陽性の判定基準を以下のように定め、レトロスペクティブに解析した結果が、図4である。

#### 【0051】

##### 1) 判定基準

初回手術後の病理検査時に作成した病理切片を用いて、非特許文献8に記載の常法に従って、p53免疫染色を実施した病理切片を顕微鏡で検査するとき、

a) 視野を400倍に設定する。

b) 視野内の一定区画(接眼レンズにセットされている区画、または、顕微鏡用カメラで撮影される区画を用いる)内のすべての腫瘍細胞をカウントする。

c) 当該区画内で、明らかにp53が染色されている腫瘍細胞(p53は細胞核で染まることが多いが、細胞質で染まる場合もある)数を数える。

d) c項の細胞数がb項の細胞数の10%未満である場合、検査対象とした腫瘍組織はp53陰性と判定する。

#### 【0052】

##### 2) 結果

図4に示すように、p53陰性群7例とp53陽性群4例のOSのカプランマイヤーカーブの間では大きな差があり、ログランク検定では $p=0.013$ であった。極めて少数の症例群間の比較にもかかわらず両群間で大きな差が認められ、統計学的有意差もあるという点においては、図3のOSの場合と同様であり、例1の試験(UMIN000010602)と本例の試験(UMIN000001426)の臨床試験プロトコルが大きく異なるにも係わらず、再現性のある結果となっている。この結果は、ここで設定したp53陰性の判定基準が、自家腫瘍ワクチンの有効性を予測するためには有用であることを示している。

#### 【0053】

例3: 乳がん骨転移症例において自家腫瘍ワクチンが有効であった症例におけるp53陰性の確認

乳がんが骨に転移した場合、手術を除きいかなる従来型治療を加えても(放射線治療、化学療法、ホルモン療法等の既存療法全部を併用しても)治療が困難であるというのが当業者間では現在の常識とされている。まして、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、及び受容体型チロシンキナーゼHER2の3種とも発現していないトリプルネガティブの乳がんが骨転移した場合、姑息的放射線線量(36Gy)照射では、化学療法を併用したとしても絶対的に治療抵抗性であるとされている。それにもかかわらず、脊椎に骨転移があったトリプルネガティブ乳がん症例に対し自家腫瘍ワクチンを上乗せして治療した結果、術後5年目で骨転移が根治したと診断され、自家腫瘍ワクチンの上乗せ治療効果があったとの症例が報告されている(非特許文献10、症例番号CMI0406)。

#### 【0054】

この症例(症例番号CMI0406)の残存病理切片(骨転移巣ではなく、原発巣の乳がん組織である)に対してp53免疫染色を施した。このとき、p53免疫染色における陽性対照(例1においてp53陽性であると判定された症例062の膠芽腫組織で、よく染色される)、及び陰性対照(p53免疫染色用モノクローナル抗体DO-7に対応する非特異的アイソタイプ抗体(Becton Dickinson Co.製purified IgG kappa)で染色した検査対象症例の乳がん組織で、染色されない)を用意して、常法で用いる方法の免疫染色能力を確認した上で、検査対象症例の腫瘍組織切片を免疫染色した。

#### 【0055】

##### 1) 検査対象となった症例の腫瘍組織について

非特許文献10には、対象症例の乳がん組織がトリプルネガティブであったとは明記されていないが、原発巣を摘出した病院から自家腫瘍ワクチンを投与した病院への診療情報報告書により、トリプルネガティブであったことが判明している(図5: ○で囲んだ部分から、ER-、PgR-、及びHER2-であることがわかる)。

##### 2) p53免疫染色

非特許文献8に記載された情報に従って免疫染色した。1次抗体としてDO-7(Dako社製)を

50倍希釈して用いた。

### 3) 結果

検査対象となった乳がん骨転移症例の原発巣における乳がん組織切片では、膠芽腫の場合と同じp53陰性の定義を適用したところ、p53陽性細胞は6%と判定され、p53陰性と判明した(図6)。

#### 【0056】

例3で示したのは、単一症例についてのp53免疫染色の結果であるため、例1及び例2に示した膠芽腫の場合のように、統計学的解析を根拠にp53陰性という免疫染色結果が腫瘍ワクチンによる治療効果を予測させるとは結論づけられないものの、トリプルネガティブの乳がんが骨転移した場合には(免疫療法が登場する以前の)姑息的放射線照射及び化学療法

10

に対しては絶対的に治療抵抗性であると当業者に知られていることを考慮すると、本症例では自家腫瘍ワクチンがp53陰性の乳がんに対し有効性を発揮したものと考えられるしかない。

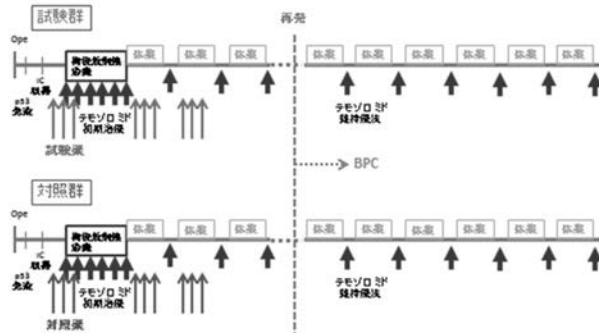
この結果からみて、膠芽腫以外の腫瘍でも、p53陰性と腫瘍ワクチンによる治療効果との相関性は十分に予測可能であると言える。

#### 【産業上の利用可能性】

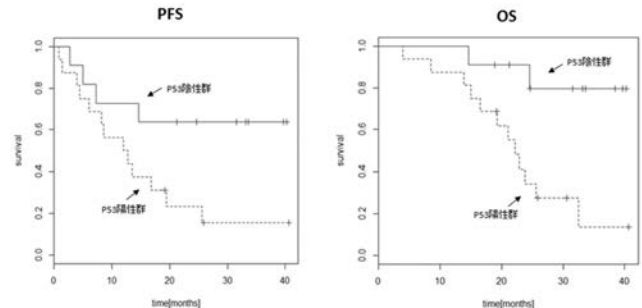
#### 【0057】

本発明により提供される腫瘍ワクチンの有効性の予測方法により、腫瘍ワクチンの有効性を期待できる腫瘍患者を精度よく選別することができるので、選別された腫瘍患者に対して腫瘍ワクチンを投与することにより、極めて効率的な悪性腫瘍治療が可能になる。

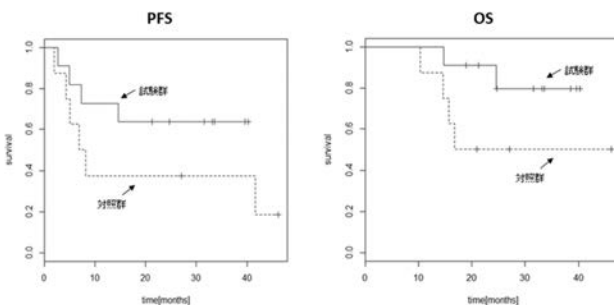
【図1】



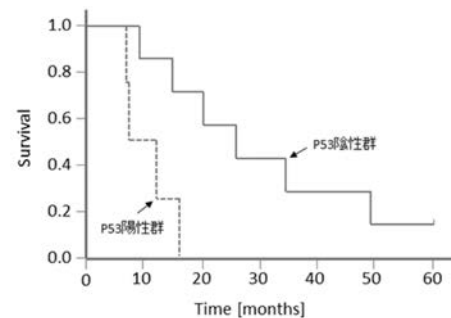
【図3】



【図2】



【図4】





---

フロントページの続き

(72)発明者 村垣 善浩

東京都新宿区河田町 8 - 1 学校法人東京女子医科大学先端生命医科学研究所先端工学外科学分野  
内

(72)発明者 石川 栄一

茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1 国立大学法人筑波大学内

(72)発明者 大野 忠夫

茨城県つくば市千現二丁目 1 番地 6 セルメディシン株式会社内

F ターム(参考) 4C085 AA03 AA08 BB01 CC03 EE01

专利名称(译)	预测肿瘤疫苗功效的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019082413A</a>	公开(公告)日	2019-05-30
申请号	JP2017210225	申请日	2017-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人筑波 细胞医药股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Murakaki弘 国立大学法人筑波 Serumedishin有限公司		
[标]发明人	村垣善浩 石川栄一 大野忠夫		
发明人	村垣 善浩 石川 栄一 大野 忠夫		
IPC分类号	G01N33/574 A61K39/00 A61P35/00 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/574.A A61K39/00.H A61P35/00 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/EE01		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种预测肿瘤疫苗对恶性肿瘤患者疗效的方法。一种预测肿瘤疫苗治疗恶性肿瘤患者疗效的方法，该方法包括以下步骤：（1）将肿瘤组织与恶性肿瘤患者分离；（2）上述肿瘤组织用结合p53的抗体进行免疫染色；和（3）当肿瘤组织中肿瘤细胞中未检测到p53分子的肿瘤细胞百分比为20%或更低时，恶性肿瘤患者的方法并确定用肿瘤疫苗治疗是有效的。[所选图]无

(19) 日本国特許庁 (JP)		(12) 公開特許公報 (A)		(11) 特許出願公開番号 特開2019-82413 (P2019-82413A)	
		(43) 公開日		令和1年5月30日 (2019. 5. 30)	
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考) 4 C 0 8 5	
G 0 1 N 33/574 (2006. 01)		G 0 1 N 33/574		A	
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)		A 6 1 K 39/00		H	
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)		A 6 1 P 35/00			
G 0 1 N 33/53 (2006. 01)		G 0 1 N 33/53		Y	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁)					
(21) 出願番号		特願2017-210225 (P2017-210225)		(71) 出願人 517381854	
(22) 出願日		平成29年10月31日 (2017. 10. 31)		村垣 善浩 東京都新宿区河田町8-1 学校法人東京 女子医科大学先端生命医科学研究所先端工 学外科学分野内	
				(71) 出願人 504171134 国立大学法人 筑波大学 茨城県つくば市天王台一丁目1番1	
				(71) 出願人 502233964 セルメディン株式会社 茨城県つくば市千現二丁目1番地6	
				(74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス	
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 腫瘍ワクチンの有効性の予測方法					