HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on immune checkpoint molecules in canine cancers and development of a novel immunotherapy targeting these molecules [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	前川, 直也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12940号
Issue Date	2017-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68172
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_MAEKAWA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：前川　直也
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

Studies on immune checkpoint molecules in canine cancers and development of a novel immunotherapy targeting these molecules

（イヌ腫瘍における免疫チェックポイント分子の解析と
それらを標的とした新規免疫療法の検討）

腫瘍はイヌの死因の約 3 割を占め、特に高齢のイヌにおいて臨床上の大きな問題となっている。イヌの腫瘍に対しては主に外科療法、放射線療法、および化学療法が適用されるが、侵襲や副作用、がん種による感受性の違い等の理由により制限を受ける場合も多く、これらの治療法に加えて新たな治療戦略の開発が望まれている。近年ヒトの医療では、免疫抑制受容体 Programmed cell death 1 (PD-1) およびそのリガンド PD-ligand 1 (PD-L1) を標的とした抗体医薬に代表される免疫チェックポイント阻害薬が、種々の悪性腫瘍に対し著効を示し、免疫療法が第 4 の治療法としての地位を確立しつつある。

PD-1 は主に活性化 T 細胞上に発現する共刺激受容体であり、リガンド PD-L1 または PD-L2 と結合するとサイトカイン産生や細胞増殖等の T 細胞の機能を抑制する。種々のヒト腫瘍では腫瘍細胞上に PD-L1 が高発現していること、また腫瘍浸潤リンパ球において PD-1 が高発現していることが報告され、PD-1/PD-L1 経路は腫瘍の免疫回避機構の一つとして認識されている。一方で PD-1/PD-L1 経路による免疫抑制は可逆的であり、抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体を用いてこれらの因子の結合を阻害すると T 細胞応答が再活性化し、さらには抗腫瘍効果が得られることも明らかになっている。特に抗 PD-1 抗体は、悪性黒色腫、非小細胞性肺癌、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部癌において臨床試験によりその抗腫瘍効果が実証され、国内での製造販売が承認されている。しかし、イヌ腫瘍においては PD-1/PD-L1 経路に関する報告はなく、経路阻害が腫瘍治療に応用可能であるかは不明である。そこで本研究では、イヌ腫瘍に対する新規免疫療法を樹立することを最終目的として、イヌ PD-1 および PD-L1 の発現解析・機能解析と腫瘍治療への応用について *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。

第 1 章では、まずイヌ *PD-1* および *PD-L1* 遺伝子の同定を行い、得られた遺伝子情報をもとにこれら因子の組み換えタンパク質を作製した。次に当研究室にて樹立された抗ウシ PD-L1 抗体がイヌ PD-L1 と交差反応し、PD-1 との結合を阻害することが明らかとなったため、この抗体を用いてイヌ腫瘍における PD-L1 の発現解析および結合阻害による機能解析を行った。その結果、イヌ悪性黒色腫、肥満細胞腫、腎細胞癌において PD-L1 が高発現していることが免疫組織化学染色により示され、また PD-1/PD-L1 経路阻害試験で腫瘍浸潤単核球からの Interferon-γ の産生が亢進した。

第 2 章では、どのようながん種で PD-L1 阻害による治療効果を得られるかを明らかにするため、免疫組織化学染色法により、種々のイヌ悪性腫瘍における PD-L1 の発現解析を行った。全 110 検体を検査した結果、口腔内悪性黒色腫で 90% (36/40)、骨肉腫で 70% (7/10)、血管肉腫で 60% (6/10)、グレード III 肥満細胞腫で 60% (3/5)、乳腺腺癌で 80% (4/5)、前立腺癌で 60% (3/5)の症例において PD-L1 が発現していた。一方で扁平上皮癌や組織球性肉腫を含む他 7 種の腫瘍においては、5 例ずつの検討で PD-L1 の発現は認められなかった。

第 3 章では、臨床研究で複数回イヌに投与可能な抗体を作出するため、ラット抗 PD-L1 抗体の定常領域をイヌ抗体の定常領域に入れ替えたラット-イヌキメラ抗 PD-L1 抗体を作製した。イヌ PD-1/PD-L1 結合に対し十分な結合阻害効果を示したラット抗 PD-L1 モノクローナル抗体 2 クローン (4G12、6G7) のうち、6G7 は IgM クラスの抗体であったため、イヌキメラ IgG 型への変換で結合阻害活性が減弱する可能性があった。そこで 4G12、6G7 両方をイヌキメラ IgG 化し、結合阻害活性を評価したところ、イヌキメラ化 4G12 (c4G12) は十分な結合阻害活性を保持していたのに対し、イヌキメラ化 6G7 (c6G7) では明らかな活性の低下が認められた。したがって c4G12 を治療用抗体の候補として選定し、大量発現に向けて高発現細胞株の樹立を行った。メトトレキサートを用いた遺伝子増幅により、c4G12 を高発現する CHO-DG44 細胞株を作製・選別して、14 日間の振盪培養を行ったところ最大 700 mg/L のキメラ抗体を培養上清中に産生した。この発現系により作製した c4G12 は、イヌ末梢血単核球からのサイトカイン産生を増大させ、リンパ球の増殖能を亢進した。

第 4 章では、イヌキメラ抗 PD-L1 抗体 c4G12 を用いて腫瘍罹患犬に対する治療試験を行った。北海道大学動物医療センターに来院した口腔内悪性黒色腫罹患犬 ($n = 7$) および未分化肉腫罹患犬 ($n = 2$) に対し、c4G12 を 2 mg/kg あるいは 5 mg/kg にて 2 週間隔で静脈内投与して腫瘍サイズの変化を記録した。治療の結果、悪性黒色腫罹患犬 1 頭および未分化肉腫罹患犬 1 頭において明らかな腫瘍の退縮が認められた（部分奏功）。さらに悪性黒色腫罹患犬のうち肺転移を認めた 4 頭においては、標準治療を受けた対照群と比較して、生存期間延長の可能性が示された (中央生存期間　治療群 93.5 日；　対照群 54 日、$p = 0.10$)。さらに肺転移のある別の悪性黒色腫罹患犬において、18 週の抗体治療により肺転移巣がほぼ完全に消失した。なお臨床研究の観察期間内（2016 年 3 月－2017 年 1 月）において、治療に関連すると思われる副作用はほとんど認められなかった。

以上の結果より、イヌ腫瘍においても PD-1/PD-L1 経路は免疫応答を抑制する機構として機能していること、またイヌ腫瘍は PD-1/PD-L1 経路を免疫回避機構として利用している可能性が示された。特に口腔内悪性黒色腫、骨肉腫、血管肉腫、肥満細胞腫等では PD-L1 の発現が高率に認められたことから、PD-1/PD-L1 を標的とした免疫療法により治療効果を得られる可能性がある。さらにイヌキメラ抗 PD-L1 抗体 c4G12 を用いた臨床試験では悪性黒色腫の 14.3% (1/7)、未分化肉腫の 50.0% (1/2) で客観的奏効を認めたことより、c4G12 はこれらの腫瘍に対する新たな治療薬となりうることが明らかとなった。

本研究により、PD-1/PD-L1 経路を標的とした免疫チェックポイント阻害薬がイヌの種々の悪性腫瘍に対する新たな免疫療法として利用可能であることが強く示唆された。そこでさらなる臨床研究を行い、その治療効果をさらに詳細に検討していく必要がある。今後 c4G12 を含む PD-1/PD-L1 阻害薬が単剤、さらには放射線療法や他の治療法との併用としてイヌの悪性腫瘍の治療に応用されることが期待される。