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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：　前　川　直　也

審査委員

主査　教授　大　橋　和　彦
副査　教授　鈴　木　定　彦
副査　准教授　高　木　哲
副査　准教授　今　内　覚

学位論文題名

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）

イヌの腫瘍に対しては外科療法、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で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) やそのリガンド 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、免疫療法が第四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 細胞上に発現する受容体であり、PD-L1 や PD-L2 と結合すると T 細胞の機能を抑制する。種々のヒト腫瘍では PD-L1 が高発現すること、また腫瘍浸潤リンパ球に PD-1 が高発現することが報告され、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。一方でこの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、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検討を行った。

第 1 章では、イヌ *PD-1* および *PD-L1* 遺伝子の同定を行った。そして当研究室で樹立した抗ウシ 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ので、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、イヌ悪性黒色腫などにおいて 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 経路阻害すると腫瘍浸潤単核球からの Interferon-γ 産生が亢進することが示された。そこで、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。その結果、口腔内悪性

黒色腫、骨肉腫、血管肉腫、グレードIII肥満細胞腫、乳腺腺癌、前立腺癌の症例においてPD-L1の発現が確認されたが、扁平上皮癌や組織球性肉腫などの腫瘍では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-イヌキメラ化抗 PD-L1 抗体を作製した。作製したイヌキメラ化抗体は、十分な結合阻害活性を保持しており、次に大量発現に向けて高発現細胞株の樹立を行った。その結果、14 日間の振盪培養で最大 700 mg/L のキメラ化抗体を培養上清中に産生することに成功した。この発現系により作製したイヌキメラ化抗 PD-L1 抗体は、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。そこで、第 4 章では、作製したイヌキメラ化抗 PD-L1 抗体を用いて腫瘍罹患犬に対する治療試験を行った。北海道大学附属動物病院に来院した口腔内悪性黒色腫罹患犬 (7頭) および未分化肉腫罹患犬 (2頭) に対し、キメラ化抗体を2週間隔で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)。また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。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、イヌ腫瘍でも 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、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示された。そしてイヌキメラ化抗PD-L1抗体を用いた臨床試験では悪性黒色腫や未分化肉腫で客観的奏効を認めたことより、本研究で作製したキメラ化抗体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。

本研究は、イヌの悪性腫瘍に対して、免疫チェックポイント阻害薬を用いた免疫療法の可能性を提示したものであり、腫瘍に対する新規治療法の確立に向けて、有用な知見を提供している。 よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者前川直也氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。