



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---------------------|--|
| Title | Studies on the immunotherapy targeting immune checkpoint molecule CTLA-4 in veterinary medicine [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | 渡, 慧 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(獣医学) |
| Dissertation Number | 甲第15052号 |
| Issue Date | 2022-03-24 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/86005 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | WATARI_Kei_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |



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：渡 慧
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

**Studies on the immunotherapy targeting immune checkpoint
molecule CTLA-4 in veterinary medicine**

(獣医療における CTLA-4 を標的とした免疫療法に関する研究)

免疫応答は、ウイルスや細菌などの微生物を排除することや、腫瘍などの非自己を攻撃することで生体にとって危険とされる異物を取り除き、生体内の恒常性を維持する反応である。しかし、免疫反応が活性化した状態で維持されると、正常な細胞や組織が攻撃の対象となるなど生体にとって悪影響を及ぼすことになる。このような状態に陥らないために重要な役割を果たしているのが、**Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)** である。CTLA-4 は、制御性 T 細胞や活性化したエフェクター T 細胞に発現しており、**CD80/CD86** をリガンドとする免疫チェックポイント因子であり、T 細胞の活性化に必要な共刺激シグナルを伝達する **CD28** と **CD80/CD86** の結合を阻害することが知られている。慢性疾患では CTLA-4 の発現が上昇し、宿主の免疫反応を抑制することがヒトやマウスの研究で明らかとなっている。また他の免疫チェックポイント因子である **programmed death-1 (PD-1)** や **PD-ligand 1 (PD-L1)** などの発現も慢性疾患で上昇することが知られている。PD-1 は T 細胞に発現し、そのリガンドである **PD-L1** と結合することで T 細胞の免疫応答を抑制する。獣医領域においては、ウシの慢性感染症である **bovine leukemia virus (BLV)** 感染症で PD-1 および PD-L1 の発現が上昇し、病態進行に関与することが報告されている。また、イヌの腫瘍疾患である悪性黒色腫においては、がん細胞上の **PD-L1** の発現が上昇していることも明らかになっている。このように免疫チェックポイント因子は動物の慢性疾患の病態進行にも深く関与している。

この免疫チェックポイント因子とそのリガンドの結合は、特異的な抗体により阻害することが可能である。ヒトでは免疫チェックポイント因子を標的とした抗体が臨床応用されており、有意な治療効果が認められている。獣医療では、**PD-L1** を標的とした抗体療法が報告されており、**BLV** 感染症およびイヌ悪性黒色腫に対して有意な治療効果が認められている。しかし一方で、治療効果が認められない場合も報告されており、これは慢性疾患において、病態進行とともに複数種類の免疫チェッ

クポイント因子の発現が上昇することに起因する。BLV 感染症では病態進行とともに制御性 T 細胞数が上昇し、CTLA-4 が高発現していることが明らかとなっている。ヒトにおいて、悪性黒色腫に対する抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体を併用した抗体併用療法は単剤よりも高い治療効果を示すことが報告されている。しかし、ウシやイヌでは CTLA-4 に関する研究は乏しく、治療に応用可能な抗体が存在しない。そこで本研究では、ウシおよびイヌ CTLA-4 に対する特異的な治療用抗体を樹立して、その抗体の詳細な機能解析を行った。

第 1 章：ウシの CTLA-4 の免疫抑制機能を明らかにするためにウシ CTLA-4 組換えタンパク質 (CTLA-4-Ig) を作製した。CTLA-4-Ig は健康なウシから分離した末梢血単核球 (PBMCs) からの IFN- γ 産生を有意に低下させ、ウシ CTLA-4 がヒトやマウス同様に免疫抑制機能を有していることが明らかとなった。次に CTLA-4-Ig をマウスに免疫して、抗ウシ CTLA-4 モノクローナル抗体 4G2-A3 及び 4C2-D9 を樹立した。4G2-A3 は CTLA-4 と CD80/CD86 との結合を阻害し、PBMCs を用いた実験では IFN- γ の産生量を有意に上昇させた。しかし、抗 PD-L1 抗体との併用では、単剤よりも有意な免疫活性化能が認められなかったため、より強い結合阻害能を有するクローン 4C2-D9 を別のスクリーニング法を用いて樹立した。4C2-D9 と抗 PD-L1 抗体との併用は、単剤群と比較して、有意に PBMC からの interleukin-2 (IL-2) 産生を上昇させ、BLV 抗原特異的な Th1 応答を誘導して抗ウイルス効果も認められた。4C2-D9 はマウス抗体であるため、臨床への応用には、アナフィラキシーショックなどの副作用を誘発することや抗体の血中半減期が短くなるなどの問題点がある。そこで 4C2-D9 可変領域とウシ由来の定常領域を組合わせたキメラ抗体 (4C2-D9 chAb) を樹立した。4C2-D9 chAb はもとの 4C2-D9 と同様の結合阻害能を有しており、抗 PD-L1 キメラ抗体との併用では、単剤群と比較して、健康なウシ由来 PBMC からの IL-2 産生を有意に上昇させた。以上より、4C2-D9 chAb と抗 PD-L1 抗体の併用は、単剤よりも免疫応答を活性化させることで、免疫チェックポイント因子が関与しているウシの慢性感染症の新規治療法となりうることが示唆された。

第 2 章：第 1 章で用いたスクリーニング法により、抗イヌ CTLA-4 モノクローナル抗体 1C5-E5 及び 2G2-G8 を樹立した。樹立した抗体を用いて悪性黒色腫罹患犬における CTLA-4 の発現解析を行った結果、罹患犬では CTLA-4⁺ CD4⁺/CD8⁺ 細胞の割合が上昇しているが明らかになった。次に高い結合阻害能を示した 1C5-E5 を用いて抗イヌ CTLA-4 イヌ化抗体 (ca1C5) を樹立した。樹立した ca1C5 は 1C5-E5 と同様の結合阻害能を有しており、イヌ PBMC からの Th1 サイトカインの産生を有意に上昇させた。次に ca1C5 安定発現細胞を樹立して大量培養を行った結果、ca1C5-c50 を得た。ca1C5-c50 は 1C5-E5 と同程度の結合能や結合阻害能を有しており、単剤ではイヌの PBMC からの Th1 サイトカインの産生量を有意に上昇させた。また ca1C5-c50 は抗イヌ PD-L1 キメラ抗体との併用により、抗イヌ PD-L1 キメラ抗体の単剤と比較して、IL-2 および tumor necrosis factor- α の産生を有意に上昇させた。さらに ca1C5-c50 は Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity 活性を示し、標的細胞の生存率を有意に低下させた。最後に ca1C5-c50 をビーグルに投与して、抗体の安全性を検討した。血中抗体濃度はヒトの臨床研究と同程度の濃度が維持されており、抗体による副作用は認められなかった。以上よ

り、ca1C5-c50 は抗イヌ PD-L1 キメラ抗体との併用はイヌの腫瘍疾患の新規治療法となりうることが示唆された。

本研究では、獣医領域の慢性疾患における CTLA-4 の関与を明らかにし、結合阻害能を有する特異的な抗体を樹立して、免疫応答を活性化させることを示した。このことから獣医療において、CTLA-4 経路と PD-1/PD-L1 経路を標的にした抗体併用療法は、新規治療法となりうることを示した。今後はウシやイヌの慢性疾患における CTLA-4 の発現解析を行うとともに、慢性疾患に罹患しているウシやイヌに抗体併用療法を行うことで治療効果を検討することが必要である。