



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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/86005">https://hdl.handle.net/2115/86005</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	WATARI_Kei_review.pdf, 審査の要旨



## 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：渡 慧

審査委員	主査 教授	鈴木 定彦
	副査 教授	大橋 和彦
	副査 教授	滝口 満喜（獣医学院）
	副査 准教授	今内 覚

### 学位論文題名

**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、非自己を攻撃・排除することで、生体内の恒常性を維持するが、免疫反応の活性化が持続すると、正常組織も攻撃されるなど生体にとって悪影響を及ぼすことになる。このような状態を防ぐ役割を果たしている分子として、**Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)** がある。CTLA-4 は、制御性 T 細胞などに発現しており、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。ヒトやマウスの慢性疾患では **CTLA-4** の発現が上昇し、宿主の免疫反応を抑制することが報告されている。また慢性疾患では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)** などの発現も上昇し、**PD-1** は **PD-L1** と結合することで T 細胞の免疫応答を抑制する。獣医領域では、ウシの慢性感染症である **Bovine leukemia virus (BLV)** 感染症で **PD-1** や **PD-L1** の発現が上昇して病態進行に関与することや、イヌの腫瘍疾患である悪性黒色腫で **PD-L1** の発現上昇が報告され、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。一方、これらの因子とリガンドの結合は、特異的な抗体での阻害が可能である。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、獣医療でも、**PD-L1** を標的とした抗体療法が報告されており、**BLV** 感染症やイヌ悪性黒色腫に対して治療効果を示した。近年、慢性疾患の病態進行に伴う複数種の免疫チェックポイント因子の発現に起因する治療効果の低下も報告されている一方、ヒト悪性黒色腫では抗体併用療法が単剤よりも高い治療効果を示すことも報告されている。しかし、ウシやイヌでは **CTLA-4** に関する知見は乏しく、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作出して、その抗体の詳細な機能解析を行った。

第 1 章 では、最初にウシの **CTLA-4** の免疫抑制機能を解析した。ウシ **CTLA-4** 組換えタンパク質 (**CTLA-4-Ig**) は健常ウシの末梢血単核球 (**PBMCs**) のインターフェロン  $\gamma$  (**IFN- $\gamma$** ) 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することが示された。次に抗ウシ **CTLA-4** マウスモノクローナル抗体 **4G2-A3** 及び **4C2-D9**

を作出した。4G2-A3 は CTLA-4 と CD80/CD86 との結合を阻害し、PBMCs の IFN- $\gamma$  産生を有意に上昇させた。さらに、より強い結合阻害能を有する 4C2-D9 と抗 PD-L1 抗体との併用は、単剤群に比べて、PBMC のインターロイキン 2 (IL-2) 産生を有意に上昇させ、BLV 抗原特異的な Th1 応答を誘導して抗ウイルス効果を示した。次にウシへの臨床応用を目指して、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)を作出した。4C2-D9 chAb は元の 4C2-D9 と同様の結合阻害能を示し、抗 PD-L1 キメラ抗体との併用では、単剤群に比べて、健常ウシ由来 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、ウシ慢性感染症の新規治療法に応用可能であることが示唆された。

第 2 章では、抗イヌ CTLA-4 マウスモノクローナル抗体 1C5-E5 や 2G2-G8 を作出した。作出した抗体を用いた解析の結果、悪性黒色腫罹患犬では CTLA-4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 細胞の割合が上昇していることが示された。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)を作出した。ca1C5 は 1C5-E5 と同様の結合阻害能を有し、イヌ PBMC からの Th1 サイトカイン産生を有意に上昇させた。さらに ca1C5 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 の Th1 サイトカイン産生量を有意に上昇させた。また ca1C5 は抗イヌ PD-L1 キメラ抗体との併用により、単剤と比較して、IL-2 や腫瘍壊死因子  $\alpha$  の産生を有意に上昇させた。さらに ca1C5 は抗体依存性細胞傷害活性を示し、標的細胞の生存率を有意に低下させた。また ca1C5 をビーグル犬に投与すると、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、抗体による副作用は認められなかった。以上より、ca1C5 と抗イヌ 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。

本研究は、動物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作出して、免疫応答を活性化させることを示した。このことは獣医療において、CTLA-4 経路と PD-1/PD-L1 経路を標的にした抗体併用療法が治療法となりうることを示しており、動物の免疫チェックポイント因子を標的とした新規治療法の開発に向けて多くの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渡慧氏の学位論文は、北海道大学大学院国際感染症学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。