



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Research for elucidation of immune evasion mechanisms and development of a novel immunotherapy for cancer in dogs [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	竹内, 寛人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第15580号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90382
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroto_Takeuchi_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：竹内 寛人
Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

**Research for elucidation of immune evasion mechanisms and
development of a novel immunotherapy for cancer in dogs**

(イヌ腫瘍における免疫回避機構の解明と
新規治療法の開発に向けた臨床研究)

近年、飼養環境の改善や獣医療の向上などにより、イヌをはじめとした伴侶動物の寿命が延び、かつてその死因の多くを占めた感染症による死亡が減少する一方で、腫瘍疾患が主な死因となっている。そのため、獣医学領域においてイヌの腫瘍疾患に対する治療法の開発が強く求められている。また、イヌで自然発生する腫瘍疾患は治療に対する反応性など多くの特徴がヒトの腫瘍疾患と類似しているため、イヌは自然発生腫瘍のモデル動物としても注目されている。現在、イヌの腫瘍疾患に対しては、外科療法、放射線療法、化学療法の三大療法が主な治療法として用いられているが、腫瘍罹患犬の健康状態や腫瘍の発生部位などによっては、これらの治療法が適用できない場合がある。一方、医療分野ではヒトの腫瘍疾患に対する第四の治療戦略として、特異的かつ全身的な効果が得られる免疫療法が一般的になりつつある。特に、programmed cell death 1 (PD-1) および PD ligand 1 (PD-L1) などの免疫チェックポイント分子を標的とした抗体薬は、宿主の抗腫瘍免疫を活性化し、ヒトの様々な腫瘍疾患に対して、優れた抗腫瘍効果を示している。

先行研究において、口腔内悪性黒色腫罹患犬に対してイヌキメラ抗 PD-L1 抗体を投与したところ、腫瘍組織に PD-L1 の発現が認められているにも関わらず、抗 PD-L1 抗体による治療効果が認められない症例が報告された。抗 PD-L1 抗体治療に対して抵抗性のある腫瘍に対して、効果的な治療法を提供するためには、腫瘍微小環境における PD-L1 発現の制御機構の解明や、より強力な効果を有する治療用抗体の開発が必要となる。さらに、現在広く用いられている抗体精製法はヒト抗体に最適化された手法であるため、イヌ抗体の精製効率が低く、イヌ治療用抗体の生産コストが高いことが課題となっている。そこで本研究では、イヌ腫瘍における免疫回避機序の解明と新規治療法の開発を最終目標とし、PD-L1 発現制御機構の解明、2つの作用機序を有する多機能型抗 PD-L1 抗体の開発、およびイヌ治療用抗体に最適な精製用リガンドの探索を行った。

第1章では、ヒトやマウスの細胞において PD-L1 発現を制御するタンパク質として報告された CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein (CMTM) 6 および CMTM4 について、イヌにおける発現および機能を解析した。まず、イヌ CMTM6 および CMTM4 遺伝子の塩基配列を同定した。イヌ CMTM6 および CMTM4 の予想アミノ酸配列は、ヒトやマウスの CMTM6 および CMTM4 遺伝子と高い相同

性を示し、小胞輸送に関与する MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link ドメインも保存されていた。さらに、イヌの免疫細胞および腫瘍細胞において、*CMTM6* および *CMTM4* mRNA が発現していた。また、免疫組織化学染色により、イヌ悪性黒色腫および骨肉腫において、*CMTM6*、*CMTM4* および PD-L1 タンパク質が同一腫瘍組織内で発現していることが示された。そして、イヌ細胞株において *CMTM6* および *CMTM4* 遺伝子をノックダウンすると PD-L1 タンパク質の発現量が減少したことから、イヌにおいても *CMTM6* および *CMTM4* が PD-L1 発現を調整していることが示唆された。

第2章では、さらに強力な抗腫瘍効果を発揮する治療法を開発するために、腫瘍の免疫回避機構の一つとして知られる transforming growth factor (TGF)- β 1 経路に着目した。TGF- β 1 は、免疫細胞に対する直接的な抑制作用に加えて、制御性 T 細胞 (Treg) の分化誘導による間接的な免疫抑制作用により、腫瘍の免疫回避に関与している。ヒトやマウスの腫瘍においては、TGF- β 1 経路の阻害により腫瘍の増殖および転移が抑制されることが報告されている。そこで本研究ではまず、イヌ腫瘍における TGF- β 1 発現を検討した。イヌの悪性黒色腫由来細胞株は TGF- β 1 を産生しており、転移のある口腔内悪性黒色腫罹患犬では健康なイヌに比べて血清中 TGF- β 1 濃度が上昇していた。さらに、肺転移のある口腔内悪性黒色腫に対するイヌキメラ抗 PD-L1 抗体の治療において、TGF- β 1 が予後不良因子であることが明らかとなった。また TGF- β 1 はイヌ末梢血単核球 (PBMC) に対して免疫抑制効果を示したことから、イヌ腫瘍疾患の治療における有望な標的因子であると考えられた。そこで、イヌの 2 型 TGF- β 受容体 (*TGFB2*) 遺伝子を同定し、組換えデコイレセプターである TGF- β RII-Ig を作製して、イヌ PBMC における TGF- β 1 阻害による免疫活性化効果を検討した。さらに、イヌ化抗 PD-L1 抗体と TGF- β RII の細胞外領域をリンカーを用いて融合した二機能型抗体を開発した。二機能型抗体は、イヌ PBMC において TGF- β 1 による免疫抑制作用を解除したことから、イヌ腫瘍疾患に対して有効な治療薬となる可能性が示された。また、二機能型抗体の安全性試験として、健康なイヌに対して 10 mg/kg の二機能型抗体を2週間ごとに計4回静脈内投与したところ、有害事象は全く確認されず、二機能型抗体の安全性が示された。

第3章では、イヌ治療用抗体に適した精製法を開発するため、イヌから頻繁に分離されるコアクラーゼ陽性 *Staphylococcus* 属菌である *S. pseudintermedius* において同定された SpsQ の性状解析を行った。SpsQ は一般にヒト用抗体のアフィニティー精製に用いられるリガンドである *S. aureus* 由来 SpA の相同性分子である。まず、*spsQ* 遺伝子の塩基配列を同定し、予想アミノ酸配列をもとに組換えタンパク質を作製した。次に、4つのイヌ IgG サブクラスの定常領域をそれぞれ有するイヌキメラ抗体と、組換え SpsQ (r-SpsQ) または組換え SpA (r-SpA) との結合性を評価した。その結果、IgG-B はどちらに対しても高い結合性を示し、IgG-C はどちらに対しても結合性を示さなかった。一方、IgG-A および IgG-D において、r-SpA よりも r-SpsQ に対して高い結合性を示した。そこで、r-SpsQ または r-SpA を固相化させたレジンを作製し、抗体産生細胞の培養上清を用いて、イヌ IgG-A、IgG-B、IgG-D の精製効率を比較検討した。その結果、r-SpsQ を精製のリガンドとして用いた場合に、イヌ IgG-A、IgG-D の精製効率が上昇した。

本研究により、イヌ腫瘍における PD-L1 発現制御機構の一端ならびに TGF- β 1 を介した免疫抑制機序が明らかになった。さらに抗 PD-L1 抗体治療において明確な治療効果が認められなかった症例に対する新たな治療戦略として、PD-L1 と TGF- β 1 を同時に阻害する二機能型抗体が利用可能であることが強く示唆された。今後は、イヌ治療用抗体に対して効率の良い精製法を樹立した上で、実際の腫瘍罹患犬を対

象とした臨床研究を行うことで、その治療効果を検討していく必要がある。その治療効果に関するデータを集積、分析することでヒトの腫瘍疾患にも還元可能な科学的知見の蓄積が期待される。