



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_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： 竹内 寛人

審査委員	主査	教授	鈴木	定彦
	副査	教授	今内	覚
	副査	特任准教授	高田	健介
	副査	特任教授	大橋	和彦

学位論文題名

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、イヌでは腫瘍疾患が主な死因となっており、腫瘍疾患に対する治療法の開発が強く求められている。現在、イヌの腫瘍疾患に対して、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り、これらの治療法が適用できない場合がある。ヒト医療分野では腫瘍疾患に対する第四の治療戦略として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、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。先行研究により、腫瘍組織で **PD-L1** の発現が認められている口腔内悪性黒色腫罹患犬に、イヌキメラ抗 **PD-L1** 抗体を投与しても治療効果が認められない症例が報告された。このような抗 **PD-L1** 抗体治療に抵抗性の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て、**PD-L1** 発現制御機構の解明、二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、ヒトやマウスにおいて **PD-L1** 発現を制御する分子として報告された **CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein (CMTM) 6** や **CMTM4** について、イヌでの発現や機能を解析した。同定したイヌ **CMTM6** や **CMTM4** 遺伝子から予想されるアミノ酸配列は、ヒトやマウスのものと高い相同性を示し、イヌの免疫細胞や腫瘍細胞において発現していた。またイヌ悪性黒色腫や骨肉腫において、**CMTM6**、**CMTM4** および **PD-L1** 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** 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、より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腫瘍増殖因子(TGF)- β 1 経路について検討した。ヒトやマウスでは TGF- β 1 経路の阻害により、腫瘍の増殖や転移が抑制されることが報告されている。本研究により、イヌの悪性黒色腫由来細胞株が 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も健康なイヌに比べて血清中 TGF- β 1 濃度が上昇していることが示された。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、イヌ化抗 PD-L1 抗体とイヌ 2 型 TGF- β 受容体(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。この二機能型抗体は、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、健康なイヌを用いた投与試験でもそ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、イヌの常在菌である *Staphylococcus pseudintermedius* において同定された SpsQ の性状解析を行った。SpsQ はヒト用抗体の精製に用いられる *S. aureus* 由来 SpA の相同性分子であり、組換え SpsQ (r-SpsQ)および組換え SpA (r-SpA)を調製して、4 つのイヌ IgG サブクラス(IgG-A~D)の抗体との結合性を評価した。その結果、IgG-A や IgG-D は、r-SpA よりも r-SpsQ に対して高い結合性を示した。さらに抗体産生細胞の培養上清を用いた精製試験でも、r-SpsQ を精製リガンドとして用いた場合、IgG-A や 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 抗体治療で明確な治療効果が認められない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の可能性を示し、イヌ治療用抗体の臨床応用に向けた新たな抗体精製手法の可能性も提示した。このことは獣医療において、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竹内寛人氏の学位論文は、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。