

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18798

研究課題名(和文) 新規共抑制分子DC-HILを標的とした犬悪性黒色腫に対する新たな免疫療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new immunotherapy targeting novel co-inhibitory molecule DC-HIL against canine malignant melanoma

研究代表者

田村 恭一 (Tamura, Kyoichi)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：00722282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規共抑制分子であるDC-HILを標的とした犬悪性黒色腫に対する新たな免疫療法を確立することを目指した。悪性黒色腫細胞が発現するDC-HILは腫瘍免疫反応において抑制性に働き、腫瘍増殖を促進していることを示した。犬の悪性黒色腫症例において、腫瘍細胞が発現しているDC-HILが担癌個体の免疫抑制状態に関与しており、予後を悪くしている可能性を見いだした。さらに、抗犬DC-HIL抗体は犬悪性黒色腫細胞が発現するDC-HILによる免疫抑制機能を阻害することが可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our aim of this project is the establishment of new immunotherapy targeting novel co-inhibitory molecule DC-HIL against canine malignant melanoma. DC-HIL expressed by malignant melanoma cells acted in an inhibitory manner in the tumor immune reaction and showed that tumor growth was promoted. In a case of canine malignant melanoma, we found that DC-HIL in which tumor cells are expressed is involved in the immunosuppression of tumor-bearing individuals and that the prognosis may be poor. In addition, we revealed that anti-dog DC-HIL antibody can inhibit immunosuppressive function by DC-HIL expressed by canine malignant melanoma cells.

研究分野：獣医学

キーワード：犬 悪性黒色腫 免疫抑制 DC-HIL

1. 研究開始当初の背景

これまでに、悪性腫瘍に対し、自己の免疫を活性化する様々な免疫療法が試みられてきた。しかしながら、近年、ヒトの癌症例において、従来の免疫療法はある程度の治療効果はあるものの癌細胞を完全に破壊駆逐するだけの強力な免疫学的拒絶は起こらないと考えられている。この原因として、癌細胞が産生誘導する多様な免疫抑制分子や免疫抑制性の細胞が誘導されることにより、癌の免疫抑制性環境が成立することが大きな問題となっている。このため、これまで実施してきた単純な能動免疫療法だけでは抗腫瘍効果が不十分であり、免疫療法の障害となる抑制性の因子を制御することが求められている。

近年、医学領域において、抗 CTLA-4 抗体薬 (Ipilimumab) が進行性悪性黒色腫患者に対して従来の治療法と比較して非常に優れた治療効果を示した事が報告された (Hodi F.S. et al *N Engl J Med.* 2010)。CTLA-4 は T 細胞の表面に発現し、T 細胞の活性を抑制することで自己免疫機能を抑制する分子であり、抗 CTLA-4 抗体は、CTLA-4 の機能を抑制し、抗腫瘍免疫応答を増強すると考えられている。さらに、同様に T 細胞の表面に発現する PD-1 や腫瘍細胞が発現する PD-1 リガンド (PD-L1) などの抑制性分子を標的としたモノクローナル抗体薬が開発され、悪性黒色腫を始め様々な悪性腫瘍の治療成績を著しく改善している。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究において、犬の悪性黒色腫症例に対する DC ワクチン療法低反応性メカニズムとして、本来抗原提示細胞に発現している抑制因子である DC-associated heparin sulfate proteoglycans-dependent integrin ligand (DC-HIL) が犬の悪性黒色腫細胞に発現していることを明らかにした。DC-HIL は PD-L1 や PD-L2 と同様に抗原提示細胞が発現している共抑制分子のひとつである。そこで、本研究では悪性黒色腫が発現している DC-HIL を標的とした新たな免疫療法を確立するために、悪性黒色腫細胞が発現している DC-HIL による免疫抑制機構の分子基盤を明らかにし、この免疫抑制機構を阻害することにより犬の悪性黒色腫に対するより効果的な免疫療法を開発するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL による腫瘍増殖および免疫系への影響の検討
本来抗原提示細胞が発現している共抑制分子である DC-HIL が悪性黒色腫細胞に発現しており、これにより T 細胞を不活化することにより腫瘍免疫応答を抑制していると考えられる。そこで、はじめに野生型悪性黒色腫株化細胞および DC-HIL ノックダウン悪

性黒色腫株化細胞をマウスに皮下接種し、腫瘍体積を継時的に測定する。また同時に IL-2 や IFN- γ などの活性化サイトカインおよび IL-10 や TGF- β などの抑制性サイトカインの血清中濃度を ELISA 法で測定する。この実験により、悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL が腫瘍増殖および免疫系に与える影響が明らかとなる。

(2) 悪性黒色腫担癌状態における宿主側の DC-HIL の機能解析

悪性黒色腫担癌状態における宿主側の免疫系が発現する DC-HIL が腫瘍増殖や免疫抑制にどのような影響を与えているかを明らかにするために DC-HIL ノックアウトマウスを用いた実験を行う。実験は、野生型マウスおよび DC-HIL ノックアウトマウスに悪性黒色腫株化細胞を皮下接種し、腫瘍体積を継時的に測定し、研究計画(1)と同様に種々の血清サイトカイン濃度を ELISA 法で測定する。また、腫瘍接種 21 日目にリンパ節、脾臓および骨髄を採取し、それぞれに含まれる免疫抑制細胞として制御性 T 細胞 (Treg) および骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の割合について FACS を用いて評価する。同時にそれぞれの臓器から Treg および MDSC を精製し、抗 CD3 抗体で活性化させた同系統の健常マウス由来の T 細胞と共培養することにより免疫抑制機能を評価する。これにより、悪性黒色腫細胞だけでなく宿主免疫系細胞が発現する DC-HIL による腫瘍増殖および免疫系に与える影響が明らかとなる。

(3) 犬悪性黒色腫細胞の DC-HIL 発現と免疫抑制状態の相関の検証

申請者はこれまでに犬の悪性黒色腫細胞が DC-HIL を発現していることを明らかにしているが、犬の悪性黒色腫症例における DC-HIL 発現や免疫抑制状態については詳細な検討を行っていない。そこで、本学動物医療センターに来院する症例の中で、細胞診により悪性黒色腫が疑われた症例から血液およびバイオプシーあるいは外科切除により腫瘍組織を採取する。血液サンプルでは、血清サイトカイン濃度を ELISA 法で測定し、Treg の割合について FACS を用いて測定する。また、採取した腫瘍組織は一部からタンパク質を抽出しウエスタンブロッティングにより DC-HIL 発現量を評価する。さらに、残りの腫瘍組織から株化細胞を作製し、FACS を用いて腫瘍細胞表面の DC-HIL 発現を評価する。この実験により、犬の悪性黒色腫症例における DC-HIL 発現と担癌個体の免疫抑制状態の相関を明らかにすることができる。

(4) 抗犬 DC-HIL 抗体の犬悪性黒色腫細胞による免疫抑制作用の阻害効果の検討

犬の悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL を阻害する免疫療法を確立するために、犬悪性黒色腫細胞による免疫抑制作用に対する抗犬 DC-HIL 抗体の阻害効果を検討する。実験は、末梢血から精製した T 細胞を抗 CD3 抗

体で活性化させ、細胞染色蛍光色素 CFSE で標識した後、抗 DC-HIL 抗体存在下で犬悪性黒色腫株化細胞と共培養する。培養後、細胞は FACS を用いて T 細胞の増殖を評価し、さらに培養上清中の IL-2 や IFN- γ などの活性化サイトカイン濃度を ELISA 法により測定する。これにより、犬悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL による免疫抑制作用に対する抗犬 DC-HIL 抗体の有効性を明らかにすることができる。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL による腫瘍増殖および免疫系への影響を検討したところ、野生型悪性黒色腫株化細胞と比較して DC-HIL ノックダウン悪性黒色腫株化細胞を皮下接種したマウス群では腫瘍体積が有意に減少しており、IL-2 や IFN- γ などの活性化サイトカインの血中濃度は有意に高く、抑制性サイトカインである TGF- β の血清中濃度は有意に低かった。これらの結果から、悪性黒色腫が発現する DC-HIL は免疫抑制性に機能し、腫瘍の増殖を促進すると考えられた。

(2) 悪性黒色腫がん状態における宿主側の DC-HIL の機能解析のために、野生型マウスおよび DC-HIL ノックアウトマウスに野生型悪性黒色腫株化細胞を皮下接種したところ、野生型マウスに比べ DC-HIL ノックアウトマウス群では明らかに腫瘍体積が小さかった。同様に野生型悪性黒色腫株化細胞を尾静脈投与した肺転移モデルにおいても、DC-HIL ノックアウトマウス群では明らかに肺転移病変が少なかった。また、野生型悪性黒色腫株化細胞を皮下接種したマウスの移植腫瘍近傍リンパ節および脾臓中の MDSC を精製し、その機能を解析したところ、DC-HIL ノックアウトマウスに比べ野生型マウスの MDSC は非常に強力な T 細胞活性化抑制機能を有していた。以上の結果から、悪性黒色腫がん状態では腫瘍細胞が発現する DC-HIL だけでなく宿主側の免疫細胞が発現する DC-HIL も免疫抑制および腫瘍増殖に関与していると考えられた。

(3) 犬悪性黒色腫症例における DC-HIL 発現と免疫抑制状態の相関について検討したところ、一部の犬悪性黒色腫症例では腫瘍細胞が DC-HIL を発現しており、このような症例では血中 TGF- β 濃度が高く、末梢血中 Treg の割合も増加していた。さらに、DC-HIL を発現している犬悪性黒色腫症例は DC-HIL を発現していない症例に比べて生存期間が短く、予後が不良であった。このことから、犬の悪性黒色腫症例において、腫瘍細胞が発現している DC-HIL はがん個体の免疫抑制状態に関与しており、予後を悪くしている可能性が考えられた。

(4) 抗犬 DC-HIL 抗体を用いて犬悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL による免疫抑制作用の阻害効果について検討した。末梢血から

精製した T 細胞を抗 CD3 抗体で活性化させ、抗犬 DC-HIL 抗体存在下で DC-HIL を発現する犬悪性黒色腫株化細胞と共培養したところ、抗犬 DC-HIL 抗体を加えたものではコントロール抗体に比べ有意に T 細胞が増加していた。さらに、抗犬 DC-HIL 抗体の添加により、培養上清中の IL-2 および IFN- γ 濃度が有意に増加した。これらの結果から、抗犬 DC-HIL 抗体は犬悪性黒色腫細胞が発現する DC-HIL による免疫抑制機能を阻害することが可能であり、犬の悪性黒色腫に対する新たな治療法として有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Kuroki S, Kobayashi M, Tani H, Miyamoto R, Kurita S, Tamura K, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. Selective growth inhibition by suppression of F1Fo ATPase in canine malignant melanoma cell lines. **J. Vet. Pharmacol Ther.** 40(1):101-104. 2017. 査読有 doi: 10.1111/jvp.12336.
2. Omi T, Nakazawa S, Udagawa C, Tada N, Ochiai K, Chong YH, Kato Y, Mitsui H, Gin A, Oda H, Azakami D, Tamura K, Sako T, Inagaki T, Sakamoto A, Tsutsui T, Bonkobara M, Tsuchida S, Ikemoto S. Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System. **PLoS One.** 11(10):e0165000. 2016. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0165000.
3. Kobayashi M, Kuroki S, Tanaka Y, Moriya Y, Kozutumi Y, Uehara Y, Ono K, Tamura K, Washizu T, Bonkobara M. Molecular changes associated with the development of resistance to imatinib in an imatinib-sensitive canine neoplastic mast cell line carrying a KIT c.1523A>T mutation. **Eur. J. Haematol.** 95(6):524-31. 2015. 査読有 doi: 10.1111/ejh.12526.

[学会発表](計 7 件)

1. 田村恭一 犬の骨髄由来抑制細胞と悪性腫瘍との関連 第 13 回日本獣医内科学アカデミー学術大会(招待講演) 2017 年 2 月 18 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2. 田村恭一 犬の骨髄由来抑制細胞と悪性腫瘍との関連 日本獣医臨床病理学会 2016 年大会(招待講演) 2016 年 5 月 29 日 日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野

- 市)
3. 宮本拓弥、藤原万里子、山本華以、山下諒、田村恭一、盆子原誠 担がん犬における末梢血中骨髓由来免疫抑制細胞の量的解析 日本獣医臨床病理学会 2016 年大会 2016 年 5 月 29 日 日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市)
 4. M. Kobayashi, S. Kuroki, Y. Uehara, Y. Kozutsumi, Y. Tanaka, Y. Moriya, K. Tamura, T. Washizu, M. Bonkobara Molecular changes associated with the development of resistance to Imatinib in an Imatinib-sensitive canine neoplastic mast cell line carrying a KIT c.1523A>T mutation. American college of internal veterinary medicine forum. 2015 年 6 月 3 日-6 日 Indianapolis, USA
 5. 田村恭一 伴侶動物における担がん個体の免疫抑制細胞 日本獣医臨床病理学会 2015 年大会 (招待講演) 2015 年 5 月 30 日 日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市)
 6. 守口昌悟、佐野文郁、林麻央、池田紘子、今井貴昌、小林正人、山下傑夫、小野憲一郎、田村恭一、盆子原誠、鷺巣月美 犬の肥満細胞腫のイマチニブ耐性化に関する臨床的および細胞生物学的解析 日本獣医臨床病理学会 2015 年大会 2015 年 5 月 30 日 日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市)
 7. 林麻央、佐野文郁、守口昌悟、池田紘子、今井貴昌、小林正人、安田暁子、田村恭一、盆子原誠、鷺巣月美 原発腫瘍と転移腫瘍で KIT 変異のヘテロ不均一性が認められた肥満細胞腫の犬の一例 日本獣医臨床病理学会 2015 年大会 2015 年 5 月 30 日 日本獣医生命科学大学 (東京都武蔵野市)

〔図書〕(計 1 件)

田村恭一 犬と猫の診療ガイド 2015 私はこうしている 編集：辻本元、小山秀一、大草潔、兼島孝 interzoo 2015 年発行 総ページ数 7 (pp. 917-919, 953-956)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 恭一 (TAMURA, Kyoichi)
 日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教
 研究者番号：00722282

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()