

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14578

研究課題名(和文) 犬悪性リンパ腫の免疫チェックポイント分子発現に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study on immune checkpoint molecules expression in dogs with malignant lymphoma

研究代表者

田川 道人 (Tagawa, Michihito)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：00749468

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、リンパ節および末梢血由来PBMC分離しフローサイトメトリーにて解析したところ、犬の高悪性度B細胞性リンパ腫の症例のリンパ節中CD4陽性T細胞でPD-1が、PBMC中CD4陽性T細胞でPD-1とCTLA-4が健常犬と比較し有意に発現上昇していた。またCTLA-4が高発現であった症例は低発現であった症例と比較し生存期間が短縮する傾向がみられた。続いてリンパ腫症例のリンパ節から得られた腫瘍細胞と末梢血由来PBMCを共培養したところ、PD-L1抗体添加でPBMCの増殖傾向がみられIL-10の産生亢進、PD-L1高発現症例でIFN- $\gamma$ の産生亢進が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬B細胞性リンパ腫においても免疫チェックポイント分子、とくにPD-1およびCTLA-4の発現増加が示唆され、予後との関連性が見い出された。また抗体添加により細胞増殖が促され、PD-L1高発現症例ではIFN- $\gamma$ の産生亢進もみられた。獣医学領域において宿主免疫側の免疫チェックポイント発現はほとんど検討されておらず、本研究結果は免疫チェックポイント阻害療法の犬リンパ腫への適応を正当化する根拠になりえるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：Flow cytometric analysis revealed that the expression of PD-1 on CD4+ peripheral and tumor infiltrating lymphocytes and CTLA-4 on CD4+ peripheral lymphocytes was significantly higher in the B cell lymphoma group than in the control group. Dogs with CTLA-4 levels below the cutoff values on peripheral CD4+, CD8+, and tumor infiltrating CD4+ lymphocytes had significantly longer survival than dogs with values above the cutoff. Lymphoma cells and peripheral lymphocytes which were obtained from lymphoma case were co-cultured under PD-L1 antibodies. As a results, the increased PBMC and IL-10 production were observed. In addition, the increased IFN- $\gamma$  production was observed in PD-L1 overexpression case.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：免疫チェックポイント PD-1 PD-L1 CTLA-4 リンパ腫 犬 免疫療法 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

腫瘍免疫学において免疫チェックポイント阻害療法が大きな注目を集め、様々な腫瘍で優れた治療成績をあげている。悪性リンパ腫は犬に多発する血液腫瘍であり、治療選択の限られた難治性疾患である。本疾患は免疫担当細胞であるリンパ球が腫瘍化する特異な腫瘍であり、免疫チェックポイント分子の発現が腫瘍の免疫回避機構に重要な役割を担うことが予想される。これまで獣医学では免疫チェックポイント阻害療法の基礎研究はほとんど行われておらず、犬悪性リンパ腫における免疫チェックポイント分子の発現は不明であった。申請者はすでに犬悪性リンパ腫での免疫チェックポイント分子の発現上昇と予後への影響を捉えており、当該分子の阻害療法が犬悪性リンパ腫に対して著効を示す可能性がある。今回、犬悪性リンパ腫における免疫チェックポイント分子の発現状態を明らかにし、当該分子の阻害抗体による疲弊化解除を検討、免疫チェックポイント阻害療法の有効性を基礎的に研究する。

2. 研究の目的

犬悪性リンパ腫における免疫チェックポイント阻害療法確立を最終目標とし、免疫チェックポイント分子に着目した宿主免疫状態の評価と、当該分子の阻害抗体を使用した疲弊化解除試験により免疫チェックポイント阻害療法の有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

宿主リンパ球側の免疫チェックポイント分子発現

本学動物医療センターに来院する悪性リンパ腫罹患犬および健常犬より許可を得て末梢血液を採取し、比重遠心法により末梢血単核球を分離するとともに腫瘍化した体表リンパ節より細胞を採取する。それらの細胞を PD-1、CTLA-4 抗体を用いて染色し、末梢血中リンパ球および腫瘍浸潤リンパ球における免疫チェックポイント分子をフローサイトメーターにて解析する。各分子の発現は健常犬と比較すること評価する。さらに本学カルテシステムより各症例の臨床データを収集し、各分子の発現が生存期間に与える影響を明らかにする。

リガンド側の免疫チェックポイント分子発現

悪性リンパ腫罹患犬より腫瘍化した体表リンパ節から腫瘍細胞を採取し mRNA を抽出、免疫チェックポイント分子のリガンドである CD80/86、PD-L1/L2 等の遺伝子発現をリアルタイム PCR で評価する。

リンパ腫罹患犬より得た細胞を用いた *in vitro* での疲弊化解除試験

リンパ腫罹患犬より許可を得て末梢血液および腫瘍化リンパ節より腫瘍細胞を採取する。腫瘍細胞についてはマイトマイシン C 処理を行い、これを stimulator 細胞とし、末梢血単核球を responder 細胞とした混合培養を行う。培養液中に、の検討により有効性が期待される免疫チェックポイント分子を選択、それを標的とした抗体を添加し、一定時間培養後、responder 細胞の細胞増殖活性を MTT assay、IFN-、IL-10 の産生を培養上清の ELISA により測定し宿主免疫能の疲弊化解除を評価する。

4. 研究成果

犬 B 細胞性リンパ腫罹患犬における宿主免疫細胞の免疫チェックポイント発現動態を評価するため、フローサイトメトリーおよび定量 PCR を用いてその発現を解析した。各種検査にて高悪性度 B 細胞性リンパ腫と診断された犬 18 頭 (リンパ腫群) および健常犬 9 頭 (健常群) を用い、リンパ腫群では腫瘍化し腫大したリンパ節、健常群では主に膝窩リンパ節より針吸引生検にて細胞を採取した。得られた細胞は洗浄後、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体にて染色し、CD4 および CD8 陽性細胞中の各分子の発現を解析した。また、リンパ節から得られた細胞の一部から RNA を抽出後、逆転写を行い、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86 の発現量を qPCR にて定量解析した。さらに全例で末梢血液を採取、PBMC を分離後、リンパ節と同様に各抗体で染色しその発現を解析した。その結果、リンパ節ではリンパ腫群における CD4 陽性細胞中の PD-1 陽性率が、末梢血液ではリンパ腫群の CD4 陽性細胞中の PD-1 および CTLA-4 陽性率が有意に上昇していた (図 1)、realtime PCR ではリンパ腫群において CD80 の有意な発現低下が認められた。リンパ腫群を各分子の発現高値および低値で分け、生存期間を比較したところ、末梢血液中の CD4 および CD8 陽性細胞中 CTLA-4 発現率、リンパ節中の CD4 陽性細胞中 CTLA-4 発現率が高値であった

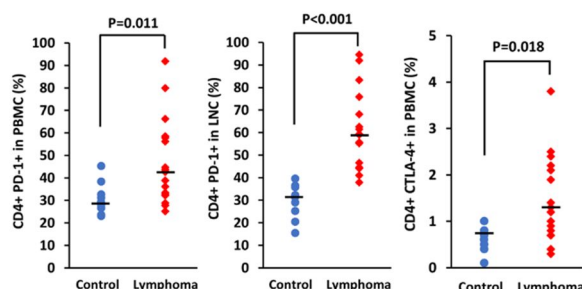


図1. リンパ腫症例における免疫チェックポイント発現

群は低値であった群と比較し有意な生存期間の短縮がみられた(図2)。以上の結果より、犬 B 細胞性リンパ腫においても免疫チェックポイント分子、とくに PD-1 および CTLA-4 の発現増加が示唆され、予後との関連性が見い出された。

続いて B 細胞性リンパ腫と診断された犬を用いて、in vitro での PD-1/PD-L1 抗体によるリンパ球活性化への影響を検討した。健常犬と B 細胞性リンパ腫罹患犬へのヘパリン加全血を用いて PBMC を分離後、健常犬では ConA 刺激、B 細胞性リンパ腫罹患犬では PBMC とリンパ節より採取した自家リンパ腫細胞との混合培養を行い、PD-1 抗体または PD-L1 抗体添加による影響について細胞増殖と IL-10 および IFN- $\gamma$  の測定により評価した。また、一部の B 細胞性リンパ腫罹患犬ではフローサイトメトリーにより PD-1 および PD-L1 の発現率を測定した。健常犬では、PD-1 抗体と isotype 抗体の間に PBMC 増殖の差は認められなかった。一方、PD-L1 抗体では PBMC の増加傾向が認められた。また、B 細胞性リンパ腫罹患犬では、PD-1 抗体による PBMC の増殖は認められなかったが、PD-L1 抗体添加によって PBMC の増加傾向が認められた。IL-10 について、健常犬では PD-1 抗体による IL-10 産生減少がみられたが、PD-L1 抗体と isotype 抗体の間に差は見られなかった。B 細胞性リンパ腫罹患犬では PD-1 抗体添加で IL-10 産生減少していたのに対し、PD-L1 抗体では IL-10 の産生が増加していた(図3)。また、IFN- $\gamma$  について、健常犬では測定上限に達したため詳細は不明であるが、B 細胞性リンパ腫罹患犬では PD-L1 の高発現を認めた症例でのみ PD-1、PD-L1 抗体による IFN- $\gamma$  の産生亢進を認めた(図4)。

獣医学領域において宿主免疫側の免疫チェックポイント発現と抗体添加による免疫抑制機構の解除はほとんど検討されておらず、本研究結果は免疫チェックポイント阻害療法の犬リンパ腫への適応を正当化する根拠になりえるものと思われた。

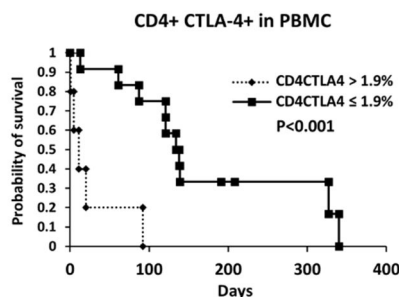


図2. リンパ腫症例におけるCTLA-4発現による生存曲線

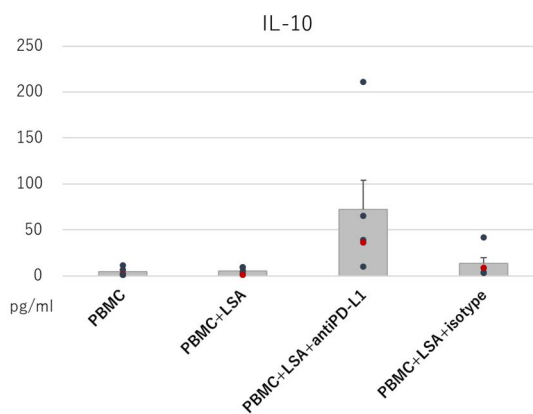


図3. リンパ腫罹患犬由来PBMCと抗PD-L1抗体の共培養によるIL-10産生量

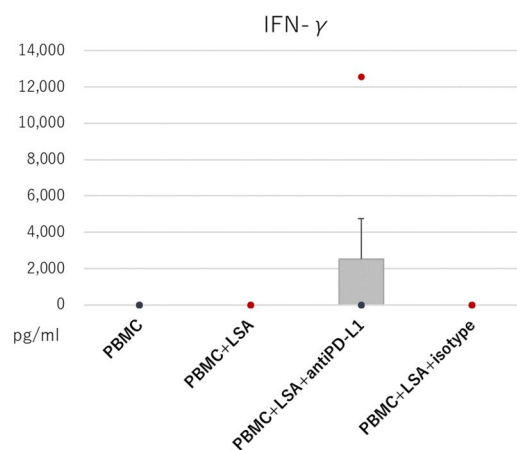


図4. リンパ腫罹患犬由来PBMCと抗PD-L1抗体の共培養によるIFN- $\gamma$ 産生量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tagawa Michihito, Kurashima Chihiro, Takagi Satoshi, Maekawa Naoya, Konnai Satoru, Shimbo Genya, Matsumoto Kotaro, Inokuma Hisashi, Kawamoto Keiko, Miyahara Kazuro	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of costimulatory molecules in dogs with B cell high grade lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0201222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0201222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------