

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03144

研究課題名（和文）犬膀胱癌の分子異常に着目した新規複合免疫療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a novel combination immunotherapy focusing on molecular abnormalities of canine bladder cancer

研究代表者

中川 貴之（Nakagawa, Takayuki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：40447363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：犬の悪性腫瘍は、これまでに外科・放射線・抗がん剤療法を中心に、その治療法の改善が取り組まれてきたが、依然として、犬の死亡原因の第1位の疾患である。とくに、犬膀胱癌は手術で取り除くことが困難であり、効果的な全身療法が重要となるが、抗がん剤の有効性は低い。

本研究では犬膀胱癌に対する新たな複合免疫療法の確立を目的とした研究に取り組み、犬膀胱癌に特有の腫瘍免疫病態の解明およびBRAF遺伝子変異により活性化するMAPK経路シグナルに付随した抗腫瘍免疫抑制機構の実証に成功した。さらに、それらを標的としたIDO阻害薬、BRAF阻害薬を用いた2つの臨床試験を実施し、新たな免疫療法としての有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬の膀胱癌はテリア系品種などで好発し、本邦において比較的発生頻度の高い悪性腫瘍である。非ステロイド性消炎剤や抗がん剤、外科療法などが適応されるが、生存期間は1-2年と短い。本研究では犬膀胱癌に特有の分子異常に着目し、犬膀胱癌に有効な新たな免疫療法の提案に成功するという臨床獣医学的に極めて価値の大きい成果が得られた。

また、犬の腫瘍における詳細な免疫学的解析は世界的にも先端的な研究成果であり、獣医学分野において価値の高い研究成果となった。さらに、犬膀胱癌は人間の筋層浸潤型膀胱癌に類似した特徴を有することから、本成果は医学分野への応用性も期待され、幅広い学術分野への還元性が高い。

研究成果の概要（英文）：Although surgical, radiation, and medical therapy have been improved, malignant tumor remains the leading cause of death in dogs. In particular, canine bladder tumor is difficult to remove by surgery, and effective systemic therapy is important, but the efficacy of medical therapy is low.

In this study, we aimed to establish novel combination immunotherapies for canine bladder tumor. As a result, we succeeded in elucidating the tumor immunomicroenvironment specific to canine bladder tumor and demonstrating the anti-tumor immune suppression mechanisms associated with MAPK pathway signaling activated by BRAF gene mutation. Furthermore, two clinical trials were performed using IDO inhibitors and BRAF inhibitors targeting these pathways, demonstrating their clinical efficacy as novel immunotherapies.

研究分野：獣医腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 免疫療法 複合免疫療法 獣医腫瘍免疫学 犬 膀胱癌 BRAF IDO

## 1. 研究開始当初の背景

犬の悪性腫瘍は、これまでに外科・放射線・抗がん剤療法を中心に、その治療法の改善が取り組まれてきたが、依然として、犬の死亡原因の第1位の疾患である。とくに、犬の膀胱癌は手術で取りきることが困難であり、効果的な全身療法が重要となるが、抗がん剤の有効性は低い。

近年、新たな全身療法として、PD-1/PD-L1 を標的とした免疫チェックポイント阻害薬など免疫療法がいくつかの腫瘍種で根治に至るほどの高い治療効果を示し注目されている。しかし、他の多くの腫瘍種では複雑な免疫抑制機構を制御できず、治療効果が得られていない。研究代表者らは、犬膀胱癌に対する新たな免疫療法の確立を目指した研究に取り組んできた。その結果、大部分の犬膀胱癌において Braf および HDAC の分子異常が共通して認められ、抗腫瘍免疫の抑制を担っている可能性を見出してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、犬膀胱癌における腫瘍免疫病態を明らかにし、さらに Braf, HDAC, PD-L1 など有望な標的分子の発現機構や抗腫瘍免疫抑制機構を明らかにし、それら標的分子の阻害による新規免疫療法を提案することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 犬膀胱癌臨床検体における各種免疫細胞マーカー (CD3, CD8, Foxp3, CD20, MPO, IBA1, CD204 など) の免疫染色により浸潤免疫細胞の解析を行った。さらに、mRNA シークエンス公共データ解析により免疫関連分子発現の検証を行った。

(2) 犬膀胱癌において BRAF V595E 遺伝子変異が約8割の症例で認められることから、BRAF 遺伝子変異陽性犬膀胱癌細胞株を用いて、BRAF 遺伝子変異シグナルの阻害による細胞機能や分子発現の変化を検証した。*In vitro* 検証では、FACS や IHC、WB、LC-MS/MS、ELISA 法など各種アッセイ系を用い、*in vivo* 検証では犬免疫細胞の免疫不全マウスへの移入により作成した犬化マウスを用いた。さらに、前臨床試験にて有効性を見出した薬剤について、臨床試験への参加の同意の得られた犬膀胱癌臨床症例を対象に、臨床試験を実施した。

(3) HDAC の検証を進める過程で、Proteasome 系の異常も見出し、HDAC と合わせて検証を進めた。犬膀胱癌細胞株に HDAC および Proteasome 阻害薬を添加し、増殖抑制効果とその機序を検証するとともに、免疫調節作用を検証した。

(4) 犬膀胱癌細胞株を用いて、PD-L1 発現の検証および PD-L1 発現を制御する機構の探索を行なった。また、RNA シークエンスなど、網羅的な遺伝子発現の検証を組み合わせて実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 犬膀胱癌における腫瘍微小環境の解析

抗腫瘍免疫における最終エフェクター細胞は CD3 陽性 CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) であることから、CTL 浸潤の程度を腫瘍細胞巢内およびその周囲に分けて解析した。その結果、腫瘍細胞巢内への浸潤度の高い inflamed-type、腫瘍細胞巢内への浸潤度が乏しく腫瘍周囲間質に CTL 浸潤の認められる excluded-type、腫瘍細胞巢内および腫瘍周囲間質内ともに CTL 浸潤の乏しい desert-type の 3 タイプに分けられることがわかった。人の腫瘍においても同様の 3 タイプに分類されることがわかっていることから、犬膀胱癌は人腫瘍と類似した腫瘍免疫微小環境の多様性を有する腫瘍であることがわかった。また、3 タイプの中では人において免疫療法の有効性が高いことが報告されている inflamed-type の割合が多く、犬膀胱癌は免疫療法の治療効果が期待できる腫瘍であると考えられた。

さらに、CTL の浸潤度と関連する免疫細胞群を検証したところ、B 細胞や制御性 T 細胞の浸潤との正の相関が見出された。現在これら CTL 浸潤と同様の挙動をとる細胞群の役割やその機序について検証を進めている。

また、CTL 浸潤と関連のある臨床パラメーターを検証したところ、非ステロイド系消炎剤の投与を受けている症例では CTL 浸潤が高いことがわかった。そこで、mRNA シークエンス解析データを用いて、非ステロイド系消炎剤の標的分子であるシクロオキシゲナーゼ経路の分子発現を検証したところ、これまでに報告のない新規分子と低い CTL 浸潤の関連が示唆された。本検証では、これまで詳細な機序が不明であった非ステロイド系消炎剤の腫瘍縮小効果に抗腫瘍免疫の増強作用が関連していることが示唆され、非ステロイド系消炎剤を他の免疫療法薬との組み合わせに用いることができる可能性を実証した。

### (2) 犬膀胱癌の BRAF 遺伝子変異、MAPK 経路活性化に付随する新規免疫抑制機構の検証

犬 BRAF<sup>V595E</sup> 遺伝子変異は、人悪性黒色腫などにおいて活性化変異として報告されている人 BRAF<sup>V600E</sup> 遺伝子変異と相同な部位におけるアミノ酸置換変異である。BRAF は MAPK 経路に属し、下流分子である MEK、ERK の活性化を担うことが報告されていたことから、それらを BRAF 遺伝子変異陽性犬膀胱癌細胞株において検証したところ、MEK、ERK の活性化が認められた。そこで、細胞株に BRAF 阻害剤を添加したところ MEK、ERK の活性化の抑制が認められたものの細胞増殖の変化は認められなかった。さらに、MAPK 経路活性化による細胞機能変化の検証を進めたところ、PGE2 および IDO と呼ばれる分子の発現制御に関わっていることを発見した。

つぎに、犬抗原提示細胞に PGE2 を作用させたところ、腫瘍細胞の細胞死に伴い放出される免疫活性化分子群(ダメージ関連分子パターン: DAMPs)に対する反応性を著しく低下させることがわかった。

また、犬膀胱癌細胞株における IDO の発現を検証したところ、全ての細胞株で恒常的な発現を認めた。IDO は必須アミノ酸であるトリプトファンをキヌレニンに変換する酵素であることから、細胞株培養上清中のトリプトファン・キヌレニン濃度を測定したところ、トリプトファン/キヌレニン比の低下を認め、IDO 阻害剤によりそれが是正されることを見出した。そこで、犬膀胱癌と犬免疫細胞の共培養系を作成し、IDO 阻害剤を添加したところ犬 CTL の増殖およびサイトカイン産生能の向上が認められた。つぎに、犬膀胱癌細胞株を移植した犬化

マウスに IDO 阻害剤を投与したところ抗腫瘍効果が得られた。前臨床試験の結果より、本学臨床試験委員会に犬膀胱癌症例に対する IDO 阻害薬の臨床試験計画を申請・承認され、臨床試験を実施した。その結果、臨床例において重度の副作用は認められず、部分奏功など腫瘍縮小効果が認められ、犬膀胱癌症例において IDO 阻害薬が新規免疫療法となることを実証した。

また、BRAF 遺伝子変異は上記の抗腫瘍免疫抑制機構を制御する、より上流の分子であることから、同様に、犬膀胱癌症例に対する BRAF 阻害薬の臨床試験を実施した。その結果、人における投与時も認められる中等度の副作用が認められたものの、部分奏功など腫瘍縮小効果が認められ、BRAF 阻害薬の臨床的有効性が示された。

以上、犬膀胱癌における BRAF 遺伝子変異に起因する MAPK 経路の活性化により過剰発現が誘導される PGE2 は、がん抗原の取り込みと提示を担い抗腫瘍免疫応答の起点となる抗原提示細胞の抑制を担っていること。また、IDO は抗腫瘍免疫応答の最終エフェクター細胞である CTL の抑制を担っていることといった機序により、抗腫瘍免疫応答の Key phase の抑制に関与していることを明らかにした。さらに、それらの阻害により臨床例において抗腫瘍効果が得られ、新たな免疫療法となることを実証した。

### (3) 犬膀胱癌の HDAC、Proteasome 系異常を標的とした薬剤の検証

HDAC および Proteasome 阻害剤は、犬膀胱癌細胞株に対して増殖抑制効果を示す薬剤として見出しており、細胞傷害による抗原放出などによる免疫惹起作用が期待される。そこで、HDAC 阻害剤について抗腫瘍機序を検証したところ、細胞増殖抑制が主体であることがわかった。また、HDAC により免疫刺激分子の発現が増強されることが報告されていたことから検証を行ったが、有意な変化を見出すことはできなかった。一方、Proteasome 阻害剤については、アポトーシスが抗腫瘍機序の主体であり、さらに、細胞死に伴い eat me signal が発現するなど抗原提示細胞活性化作用を有する可能性を見出した。したがって、Proteasome 阻害剤は、犬膀胱癌に対して直接的な細胞傷害作用のみでなく、免疫増強作用を有し、他の免疫療法薬との組み合わせに用いることができる可能性が示された。

### (4) 犬膀胱癌細胞における PD-L1 発現とその機序の検証

犬膀胱癌細胞における PD-L1 発現を検証したところ、定常状態において発現を認めた。さらに、CTL が放出する抗腫瘍サイトカインであるインターフェロン  $\gamma$  を添加したところ、PD-L1 の発現が増強した。したがって、犬膀胱癌細胞は浸潤 CTL による攻撃を受けた際に、耐性機構として PD-L1 発現の増加による CTL 抑制機構を有しており、抗 PD-1/PD-L1 阻害薬が有効である可能性があると考えられた。

### (5) まとめ

本研究では、犬膀胱癌の腫瘍微小環境解析により犬膀胱癌が免疫療法の感受性が高い腫瘍である可能性を明らかにするとともに、臨床例における腫瘍微小環境の多様性を見出し、症例選択など個別化獣医療の必要性を提唱した。また、Proteasome 系や PD-L1 など免疫療法の有望な標的とその機序を明らかにした。さらに、犬膀胱癌に高頻度で認められる BRAF 遺伝子変異に起因した MAPK 経路の活性化により、PGE2 や IDO の過剰産生が生じており、そ

これらの阻害により、新たな免疫療法となる可能性を実証した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 IKEDA Namiko, KATO Daiki, TSUBOI Masaya, YOSHITAKE Ryohei, ETO Shotaro, YOSHIMOTO Sho, SHINADA Masahiro, KAMOTO Satoshi, HASHIMOTO Yuko, TAKAHASHI Yousuke, CHAMBERS James, UCHIDA Kazuyuki, NISHIMURA Ryohei, NAKAGAWA Takayuki	4. 巻 83
2. 論文標題 Detection of indoleamine 2,3-dioxygenase 1-expressing cells in canine normal and tumor tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1885 ~ 1890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0217	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 -

1. 著者名 Eto Shotaro, Yanai Hideyuki, Hangai Sho, Kato Daiki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 The impact of damage-associated molecules released from canine tumor cells on gene expression in macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87979-1	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 -

1. 著者名 Yoshitake Ryohei, Saeki Kohei, Eto Shotaro, Shinada Masahiro, Nakano Rei, Sugiya Hiroshi, Endo Yoshifumi, Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Aberrant expression of the COX2/PGE2 axis is induced by activation of the RAF/MEK/ERK pathway in BRAFV595E canine urothelial carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64832-5	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 -

1. 著者名 Shinada M., Saeki K., Yoshitake R., Eto S., Tsuboi M., Chambers J.K., Uchida K., Kato D., Yoshimoto S., Kamoto S., Ikeda N., Kinoshita R., Fujita N., Nishimura R., Nakagawa T.	4. 巻 266
2. 論文標題 Evaluation of epithelial and mesenchymal cell markers in canine urinary bladder transitional cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Veterinary Journal	6. 最初と最後の頁 105571 ~ 105571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tvjl.2020.105571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川貴之, 加藤大貴
2. 発表標題 人腫瘍の個別化治療を見据えたBRAF変異犬膀胱癌モデルを用いたトランスレーショナル研究
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 大貴、池田凡子、西村亮平、中川貴之
2. 発表標題 犬膀胱癌に対する ID01 を標的とした新たな腫瘍免疫療法の開発
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小寺優佳、加藤大貴、曾我恭花、池田凡子、品田真央、李捷生、太田峻介、青木督、衛藤翔太郎、吉竹涼平、高橋洋介、橋本裕子、西村亮平、中川貴之
2. 発表標題 犬尿路上皮癌に対するプロテアソームを標的とした分子標的治療の検
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 督、加藤大貴、池田凡子、品田真央、小寺優佳、李 捷生、太田峻介、高橋洋介、橋本裕子、坪井誠也、チェンバースジェームズ、内田和幸、西村亮平、中川貴之
2. 発表標題 犬前立腺癌細胞株を用いた新たな分子標的薬の探索
3. 学会等名 第25回日本獣医がん学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋洋介、前田真吾、茂木朋貴、橋本裕子、藤田 淳、中川貴之、西村亮平
2. 発表標題 膀胱及び前立腺の腫瘍に対する膀胱尿道全摘出術の有効性と術後合併症の検討
3. 学会等名 第103回日本獣医麻酔外科学会オンライン学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田凡子、加藤大貴、衛藤翔太郎、吉竹涼平、吉本翔、品田真央、嘉本諭、曾我恭花、坪井誠也、チェンバース ジェームズ、内田和幸、藤田直己、西村亮平、中川貴之
2. 発表標題 犬膀胱移行上皮癌における indoleamine 2,3-dioxygenase 1の発現とその制御機構
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤大貴、池田凡子、西村亮平、中川貴之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ファームプレス	5. 総ページ数 6
3. 書名 JONCOL; Japanese Journal of Clinical Oncology (分担: 獣医複合免疫療法の未来)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医外科学研究室ホームページ  <a href="http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/geka/">http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/geka/</a>          東京大学大学院 農学生命科学研究科 附属動物医療センター(臨床試験案内)  <a href="http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/vmc/research/index.html#research9">http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/vmc/research/index.html#research9</a></p>
---



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
研究分担者	加藤 大貴  (KATO DAIKI)  (60843216)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教    (12601)	
研究分担者	前田 真吾  (MAEDA SHINGO)  (80755546)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授    (12601)	

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