

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450420

研究課題名(和文) 犬組織球性肉腫の悪性挙動に関する免疫状態および炎症の影響

研究課題名(英文) Influence of the immune status on the malignancy of canine histiocytic sarcoma

研究代表者

高木 哲 (Takagi, Satoshi)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：50396305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：犬組織球性肉腫は局所では強い炎症を伴うことが知られているものの、これまでの研究で抗腫瘍免疫の抑制を引き起こす蛋白のリガンドを強く発現することが明らかとなった。そこで末梢血中リンパ球を解析したところ、免疫抑制に作用する主要な蛋白であるCTLA-4およびPD-1の発現上昇が明らかとなった。一方、局所における炎症を惹起する原因として腫瘍組織中に存在する腫瘍関連線維芽細胞およびマクロファージの解析を行ったが、炎症を誘発する原因の特定には至らず、別の機序が存在することが予想された。以上より、本腫瘍における免疫チェックポイント作動薬はその臨床的効果が期待されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Histiocytic sarcoma (HS) is a progressive neoplastic disease in dogs. It is unclear whether costimulatory molecules, including CD28, CTLA-4, PD-1 are expressed on peripheral blood lymphocytes (PBLs) of canine patients with HS. The expression of CTLA-4 on CD8+ lymphocytes was significantly higher and the expression of PD-1 on CD8+ lymphocytes was significantly higher in the HS group than in the control group. On the other hand, we investigated the presence of tumor associated macrophages (TAMs) and fibroblasts (CAFs) in HS and other tumors. CAFs are rarely observed in HS tissues whereas relatively higher expressions were shown in epithelial tumors such as anal sac tumor and mammary gland tumor. CD204 positive TAMs were frequently observed in HS tissues which showed this tumor suppress host CTLs in situ. In conclusion, HS in dogs may have strong immunosuppressive ability and therapeutic agents such as anti-immune check point molecules can effective for the treatment of this tumor.

研究分野：獣医臨床腫瘍学

キーワード：腫瘍 免疫 犬 組織球性肉腫 炎症 腫瘍微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

抗原提示細胞である樹状細胞 (DC: Dendritic Cell) 由来の腫瘍である犬の組織球性肉腫 (HS: Histiocytic Sarcoma) は極めて強い悪性挙動を示し、しばしば転移を生じるため、その治療は抗がん剤による化学療法が一般的であるが、早期に薬剤耐性が生じ、非常に予後が悪いことが問題である。海外の報告ではこの腫瘍はバーニーズマウンテンドッグやフラットコートドレトリバーなどの特性の犬種に多いとされているが、本邦では我々の報告でも示した通り、ウェルシュコーギーにも多発する。

また、HS は確定診断を得ることが困難な症例が存在することが問題となっている。これは、広範囲な壊死領域を含んでいたり、原発部位が肺の深部にあったりすることが原因である。この問題を解決するため申請者は以前の研究でリアルタイム PCR を用いた簡便かつ微量検体でも実施できる迅速な補助的診断法を開発し、実際の臨床例に応用し良好な成績を収め、その成果を国内外で発表した。さらにこの診断法を模索する過程で将来的に HS の新規治療や病態解明のヒントとなる二つの事実を確認することができた。

すなわち、HS は比較的高率に症例間に共通の膜蛋白が発現しており、未分化(悪性)な HS ほど抗腫瘍免疫のいわばアクセル (CD28) およびブレーキ (CTLA-4) を調整する CD86 を高発現していることが過去の研究で明らかとなった。

また、一部の長期生存例において Survivin の発現量が少ないことは既に報告しているが、同様に CD86 の発現量も低値を示すことから、HS が CD28 ではなく、CTLA-4 を活性化することで免疫抑制状態を引き起こしている可能性が考えられた。CTLA-4 は抗腫瘍活性を有するリンパ球の活動を抑制する。これまで報告されてきた抗腫瘍ペプチドワクチン療法や樹状細胞ワクチン療法はこの蛋白の働きにより無効化されるため、すでに抗体薬が爆発的な臨床効果を発揮している PD-1 と並んで免疫チェックポイントと称され、抗腫瘍免疫療法における中核として大きな注目を浴びている。

また、一方でこの腫瘍では炎症マーカーである C 反応性蛋白が病態の進行に伴って上昇することが知られており、全身的な免疫抑制が予想される反面で、局所では炎症が腫瘍を活性化している可能性が推察される。特に HS は免疫担当細胞自身が腫瘍化したものであり、腫瘍細胞と炎症の相互作用を検証することなしに本腫瘍の病態の解明および新規治療法の開発は困難と考えられる。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から本研究においては、まず HS の症例における免疫状態と予後の相

関関係を評価することとした。そのため、臨床例より採取したリンパ球における免疫チェックポイント分子の発現状況を調べた。

さらに腫瘍細胞と炎症が HS の悪性挙動とどのように関連しているかを明らかにすることを目的とした。そこで、腫瘍局所での炎症とのかかわりを明らかにするため、腫瘍組織での炎症など微小環境にかかわる腫瘍関連マクロファージ (TAM) のタイプおよび腫瘍関連線維芽細胞 (CAFs) の分布等の状況についても確認を行った。

以上の状況を確認することにより、最終的に HS に対する抗腫瘍免疫療法の将来的な足掛かりとすることを目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) HS 罹患犬および正常犬の末梢血免疫状態の比較

平成 26 年 6 月～27 年 3 月に北海道大学動物医療センターに来院した HS 罹患犬 8 頭 (HS 群) 組織球肉腫以外の腫瘍罹患犬 10 頭 (other tumor 群) 健康犬 8 頭 (control 群) を対象とした。HS 群および other tumor 群については全症例で外科的切除もしくは生検により組織学的に確定された。また、control 群については健康診断等で来院し臨床的に異常のみられない犬より許可を得て採材を行った。その他の腫瘍群は全て治療前に採材を行っているが、HS 群については 2 例ですでにロムスチンによる治療が行われていた。

全症例より末梢血液を採取し、末梢血単核球 (PBMC) を比重遠心法にて分離した。分離した PBMC は抗 CD4 / CD8 抗体とともに抗 CD28、CTLA-4、PD-1 抗体にて染色、フローサイトメトリーにて各免疫チェックポイント分子の発現率を解析した。また、全血から血清を分離し、血清中 IFN- $\gamma$  濃度を ELISA 法 (Canine IFN- $\gamma$  immunoassay kit, R&D Systems) にて測定した。

統計解析には 2 群間には Mann-Whitney U 検定、3 群間には Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 検定を用いた。

### (2) HS 組織における炎症関連腫瘍微小環境細胞の免疫染色

TAM の染色のため、腫瘍内の組織標本は、常法に基づきホルマリン固定およびパラフィン包埋後、ミクロトームで 3  $\mu$ m 厚に薄切した。一次抗体にはウサギ抗 Iba1 ポリクローナル抗体およびマウス抗ヒト CD163 および CD204 モノクローナル抗体をそれぞれ用いた。免疫染色プロトコルは賦活化処理を Proteinase K で行い、染色については一般的なアビジンビオチン複合体法 (ABC 法: avidin-biotin methods) を利用した。

CAFs でも同様に腫瘍組織は酵素抗体法に

て免疫組織化学染色した。抗体はマウス抗  $\alpha$ -SMA 抗体を用い、4 で一晩反応させた。

### (3) 炎症関連腫瘍微小環境関連細胞の単離

細胞分離による *in vitro* 試験の基礎データとして TAM については実験犬より末梢血を採取し、接着法、MACS および FACS にてそれぞれの回収効率を評価した。

CAFs は臨床例より採取された腫瘍細胞塊を破碎してコラゲナーゼ処理後、細胞の接着時間の差を利用して分離を行い、回収された細胞についてマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現状況について確認した。

## 4. 研究成果

CD4 および CD8 陽性細胞中の CD28、CTLA-4、PD-1 発現率を各群間で比較したところ、CD28 については CD4、CD8 とともに群間で有意差は認められなかった。一方、HS 群 (3.20%  $\pm$  1.74%) の CD4 陽性細胞における CTLA-4 陽性率は、control 群 (1.27%  $\pm$  0.79%;  $P=0.048$ ) と比較し有意に増加していた。さらに CD8 陽性細胞においても HS 群 (4.35%  $\pm$  1.37%) は other tumor 群 (1.32%  $\pm$  0.82%;  $P=0.003$ )、control 群 (0.62%  $\pm$  0.68%;  $P=0.003$ ) と比較し有意に高い CTLA-4 陽性率であった。

PD-1 については、CD8 陽性細胞において HS 群 (83.83%  $\pm$  12.59%) は control 群 (69.96%  $\pm$  9.53%;  $P=0.036$ ) と比較し有意に高い PD-1 陽性率であった (図 1)。

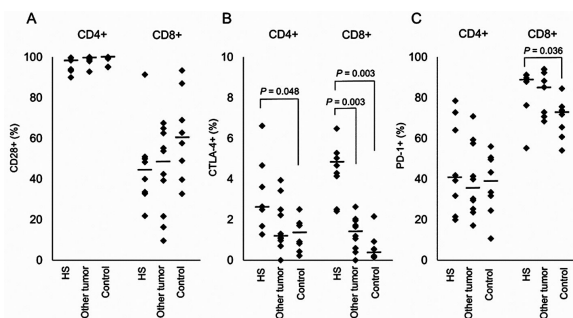


図 1 CD4 陽性および CD8 陽性細胞における免疫チェックポイント発現率  
A ; CD28、B ; CTLA-4、C ; PD-1、HS ; 組織球肉腫

少数例ずつではあるが、HS 群を局所性と播種性、other tumor 群を転移の有無で分け、それぞれ各発現率を比較したところ、有意差は認められないものの播種性 (63.6  $\pm$  17.3%) は局所性 (28.7  $\pm$  10.2%;  $P=0.061$ ) と比較し CD4 陽性 PD-1 陽性率が高い傾向にあった (表 1)。

一方、other tumor 群では転移のあるもの (2.0  $\pm$  0.4%) がないもの (1.0  $\pm$  0.5%;  $P=0.012$ ) と比較し、有意に高い CD8 陽性 CTLA-4 陽性率であり、CD4 陽性細胞におい

ても転移のあるもの (2.6  $\pm$  1.1% vs 0.8  $\pm$  0.5%;  $P=0.060$ ) で CTLA-4 陽性率が高い傾向にあった (表 2)。

免疫チェックポイント	リンパ球サブセット	局所性 HS (n=4)	播種性 HS (n=4)	P 値
CD28	CD4+	97.8 $\pm$ 3.0	95.5 $\pm$ 4.4	0.471
	CD8+	45.7 $\pm$ 8.2	46.5 $\pm$ 30.7	0.471
CTLA-4	CD4+	3.1 $\pm$ 2.4	3.4 $\pm$ 1.0	0.665
	CD8+	4.1 $\pm$ 1.1	4.6 $\pm$ 1.7	0.665
PD-1	CD4+	28.7 $\pm$ 10.2	63.6 $\pm$ 17.3	0.061
	CD8+	87.2 $\pm$ 7.3	80.5 $\pm$ 17.0	0.312

表 1 局所性および播種性 HS における免疫チェックポイント発現率の比較

免疫チェックポイント	リンパ球サブセット	転移あり (n=5)	転移なし (n=5)	P 値
CD28	CD4+	99.4 $\pm$ 0.5	97.9 $\pm$ 2.9	0.753
	CD8+	46.5 $\pm$ 18.7	40.1 $\pm$ 25.1	0.835
CTLA-4	CD4+	2.6 $\pm$ 1.1	0.8 $\pm$ 0.5	0.060
	CD8+	2.4 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.5	0.012
PD-1	CD4+	35.9 $\pm$ 19.7	43.0 $\pm$ 17.0	0.531
	CD8+	79.2 $\pm$ 12.8	85.1 $\pm$ 7.8	0.401

表 2 Other tumor 群における転移の有無による免疫チェックポイント発現率の比較

IFN- $\gamma$  については、HS 群 (30.82  $\pm$  16.35pg/ml)、othertumor 群 (73.41  $\pm$  61.91pg/ml)、control 群 (30.63  $\pm$  25.65pg/ml) 間で有意な差は認められなかった。

症例から分離した線維芽細胞はいずれも正常な線維芽細胞よりも細胞質が大きく、CAF のマーカーとされる  $\alpha$ -SMA に陽性を示すことを病理組織、蛋白、細胞レベルで確認した。様々な腫瘍で網羅的に CAF の染色を行ったところ、上皮系腫瘍では肛門嚢腺癌や乳腺腫瘍で比較的強い発現が認められたが、組織球性肉腫での CAF の発現はほぼ認められなかった (図 2)。

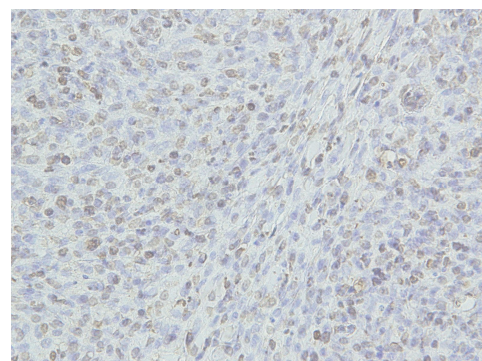


図 2 HS における  $\alpha$ -SMA 免疫染色

一方、腫瘍に浸潤するマクロファージは CD163 陽性および CD204 陽性を示し、局所

の炎症反応を増強するような作用ではなく、どちらかという免疫を抑制する M2 マクロファージが存在することが明らかとなった。また、判別は困難であるが組織球性肉腫自体が上記マーカーに陽性を示し、M2 マクロファージ様細胞様の特徴を有していることが分かった(図 3)。また、細胞の染色性は CD204 が最も鮮明なデータが得られた。

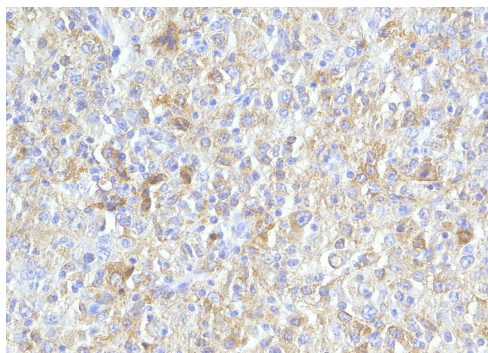


図 3 HS における CD204 陽性細胞

細胞間相互作用の検討のための培養分離あるいは電気磁気分離法により腫瘍組織や末梢血からの線維芽細胞やマクロファージの分離には成功したが、臨床例からは腫瘍細胞との共培養を実現できるだけの細胞数が確保できなかった。参考までにマクロファージは接着法、MACS とともに  $1.0\text{-}2.0 \times 10^6$  個、FACS では  $5.0 \times 10^5$  個の CD14+細胞が末梢血 10 mL から純度は 5-10%, 80-90% および 93% であった。したがって、収量と純度を総合的に判断すると MACS が有意に効率的に細胞を回収できることが明らかとなった。CAFs 臨床例からの材料採取については今後さらに効率の良い細胞の回収方法を検討する必要がある。

以上より、組織球性肉腫は全身および局所において宿主免疫を抑制することが明らかとなった。局所での炎症誘導にはこれ以外の生物学的因子、特に液性因子の関与が疑われ、腫瘍培養上清を用いた検討などが必要と思われる。いずれにせよ HS が宿主免疫抑制に強くかかわっていることが局所および全身性に示されたことにより、現在人医療でその有効性が大きく注目を集めている免疫チェックポイント阻害薬などの治療薬が本腫瘍に対して有効である可能性が示された。

##### 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 2 件)

田川道人、高木 哲、組織球肉腫罹患犬における免疫チェックポイント解析、北獣学会誌、査読無、60 巻、2016、10-14.

[http://www.hokkaido-juishikai.jp/wp/wp-content/uploads/2016/07/1607\\_03.pdf](http://www.hokkaido-juishikai.jp/wp/wp-content/uploads/2016/07/1607_03.pdf)

Tagawa M, Maekawa N, Konnai S, Takagi S. Evaluation of Costimulatory Molecules in Peripheral Blood Lymphocytes of Canine Patients with Histiocytic Sarcoma. PLoS One. 2016 22:11(2):e0150030. doi:10.1371/journal.pone.0150030. eCollection 2016

Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Kato Y, Murata S, Ohashi K. Immunohistochemical Analysis of PD-L1 Expression in Canine Malignant Cancers and PD-1 Expression on Lymphocytes in Canine Oral Melanoma. PLoS One. 2016 8:11(6):e0157176. doi: 10.1371/journal.pone.0157176. eCollection 2016.

[学会発表](計 4 件)

Yoshida Y, Hoshino Y, Izumi S, Yoshimoto S, Takagi S. Evaluation of methods to isolate canine monocytes from peripheral blood and induction of their differentiation into macrophages. The 6<sup>th</sup> Annual Congress of AiSVS Meeting, 2016.12.1-2, Fukuoka convention center, Fukuoka, JAPAN

Yoshimoto S, Hoshino Y, Aoshima K, Izumi S, Yoshida Y, Takagi S. Isolation of cancer associated fibroblasts from canine anal sac adenocarcinoma. The 6<sup>th</sup> Annual Congress of AiSVS Meeting, 2016.12.1-2, Fukuoka convention center, Fukuoka, JAPAN

Tagawa M, Kurashima S, Takagi S. et al. Evaluation of co-stimulatory molecules in dogs with B-cell lymphoma. Veterinary Cancer Society, 2016.10.25-28, Orlando, FL, USA.

吉本 翔、星野有希、和泉雄介、青島圭介、高木 哲。イヌのがん関連線維芽細胞の分離と性状解析、第 159 回日本獣医学術集会、2016.9.6-8、日本大学生物資源科学部、神奈川県藤沢市

田川道人、前川直也、今内 覚、高木 哲。組織球性肉腫罹患犬における末梢血中免疫状態の解析、第 158 回日本獣医学術集会、2015.9.7-9、北里大学獣医学部、青森県十和田市

〔図書〕(計1件)

高木 哲 他、インターズー、ここまで来た！最前線、Veterinary Oncology No9、2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：PD-L1 検出用抗 PD-L1 抗体  
発明者：今内覚、大橋和彦、村田史郎、岡川朋弘、西森朝美、前川直也、高木哲、賀川由美子、鈴木定彦、中島千絵  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2017-61389  
出願年月日：平成29年3月27日  
国内外の別：国内

○取得状況(計0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

高木 哲 (TAKAGI, Satoshi)  
北海道大学大学院・獣医学研究科・准教授  
研究者番号：50396305

(2)研究分担者

(3)連携研究者

今内 覚 (KONNAI, Satoru)  
北海道大学大学院・獣医学研究科・准教授  
研究者番号：40396304

(4)研究協力者

田川 道人 (TAGAWA, Michihito)  
北海道大学大学院・獣医学研究科  
・客員研究員

吉田 大実 (YOSHIDA, Hiromitsu)  
北海道大学・獣医学部・学部学生

吉本 翔 (YOSHIMOTO, Sho)  
北海道大学・獣医学部・学部学生