

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04598

研究課題名(和文) 犬の腫瘍に対する免疫調節作用を主体とした多面的・複合的治療アプローチ法の開発

研究課題名(英文) Development of the combined immune-modulatory therapies for canine cancer

研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO, TAKUYA)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90398826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：犬の悪性腫瘍に対する新しい治療法の基盤を確立するために、レオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法、DNAワクチン、PD-1キメラ抗体の担ガン犬を用いた臨床試験を行なった。腫瘍溶解性ウイルス療法については、19頭の様々な腫瘍をもった犬に投与し、その臨床的な効果について検討でき、一部の症例において効果が認められた。DNAワクチンについては、マウスを用いてDNAワクチン増強効果を誘導できる系は樹立できなかった一方、臨床試験においては2頭において長期生存が認められた。PD-1キメラ抗体については、抗体作製から実際の症例の投与まででき、犬で初めてのPD-1抗体医薬ができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, several clinical trials, such as oncolytic virotherapy using reovirus, DNA vaccine therapy, and PD-1 chimeric antibody therapy for canine cancer had been accomplished. Nineteen dogs with various tumors were enrolled for oncolytic virotherapy, which were evaluated. Several dogs showed clinical improvement. As for DNA vaccination therapy, novel adjuvant therapy had not established using mice model, but clinical trials had been done, and showed two dogs with malignant melanoma survived for more than 2 years. Regarding immunecheckpoint antibody therapy, PD-1 chimeric antibody therapy had been established based on monoclonal antibody against canine PD-1, which was developed in our laboratory and now has been evaluated for cancer-bearing dogs.

研究分野：Veterinary medicine

キーワード：dog cancer immune checkpoint oncolytic virotherapy DNA vaccine

## 1. 研究開始当初の背景

イヌの腫瘍は、3大療法(外科手術、放射線療法、化学療法)を中心に治療されているが、大幅な予後の改善はない。近年、人医療においては、3大療法を補完する多くの新規治療法(低分子化合物、抗体医薬、ガンワクチン、免疫細胞療法、腫瘍溶解性ウイルス療法など)が開発され、次々と臨床応用されている。

一方、小動物分野ではこれら新規治療法の開発の進歩が遅く、新しい治療法として確立したものはほとんどない。さらに多くは *in vitro* 試験、マウスを用いた *in vivo* 試験による評価であり、臨床試験まで実施されているものは少ない。これまで我々は、こうした新しい治療法を臨床応用することを目的に様々な治療法について開発してきた。それらは多岐にわたりそれぞれ *in vitro* およびマウス *in vivo* 研究における抗腫瘍効果などで一定の成果をおさめている。

## 2. 研究の目的

近年、腫瘍の治療法は3大療法に加えて、様々な治療を併用することを目的しており、さらに同時に①腫瘍細胞の直接の傷害、②宿主の抗腫瘍免疫の増強、③腫瘍細胞による抗腫瘍免疫抑制の解除の3つを複合的に調節することが肝要であると考えられるようになってきた。したがって、これまで我々が開発してきたイヌのガンに対する様々な治療法1つ1つをイヌにおいて確立し、さらにそれらを複合的に使用できる状況を作ることが最も大事であり、それによって複合的免疫療法が実施可能になるだろうと考えた。したがって、本研究の目的はこうした複合的免疫療法を実施可能な基盤的知見を得ること、またそれら単独での効果を判定することにある。具体的には、これまで長年にわたって研究してきたレオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法の担ガンイヌに対する治療効果の検討を行うこと、担ガンイヌに対するDNAワクチンの効果を検討するとともにより効率のよいDNAワクチンを考案すること、免疫チェックポイント分子に対する抗体医薬をイヌにおいて確立する、という3つのポイントが存在する。またさらに3つの組み合わせを行なったときの効果についてマウスを用いて検討することであった。

## 3. 研究の方法

**臨床試験全般** 本研究で用いた臨床試験に

組み入れられた動物は、山口大学附属動物医療センターに治療のために来院した担ガンイヌであり、すべての臨床試験は山口大学臨床試験倫理委員会承認されたものである。すべての臨床試験は飼主の同意のもと、臨床試験プロトコールに基づいて実施した。またすべての臨床試験の副作用の判定は、Veterinary Cooperative Oncology Group-Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) v1.1 guidelines によりおこなった。

**レオウイルスによる治療** レオウイルス血清型 III 型である Dearing 株の医療用臨床試験薬 (REOLYSIN<sup>®</sup>, registered USAN name: pelareorep) を Oncolytics Biotech 社より提供を受け、使用した。レオウイルスは、Table 3 に示すようにそれぞれの個体の状況に応じて、静脈内投与または腫瘍内投与を選択した。腫瘍内直接投与に関しては、1ml に薄め、静脈内投与については小型イヌまたは大型イヌに対して、それぞれ 50ml または 200ml に希釈し 2 時間または 1 時間かけて点滴投与した。

**ウイルスの測定** ウイルス投与前後の血清、唾液、尿、便を採取し、ISOGEN-LS (Nippon Gene) によりウイルス RNA を抽出後、One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> PLUS RT-PCR Kit を用いた RT-PCR によりウイルス RNA の検出を行なった。検出されたサンプルは、ウイルス感染性を確認するために L929 細胞に添加した。

**抗レオウイルス中和抗体 (NARA) の測定** 4 倍階段希釈した血清をウイルスと混和し L929 細胞に添加培養することで 48 時間後に MTT アッセイにより細胞増殖抑制阻害効果から計算した。

**DNA ワクチンに用いたプラスミド DNA および投与方法** DNA ワクチンに用いたプラスミドは、それぞれ pCAGGS ベクターを元にした腫瘍抗原と樹状細胞活性化のための GM-CSF を同時に発現可能なベクターであり、本研究室で改変したものである。また Ag85B 発現ベクターについても同様に準備した。また DNA プラスミドの調整は、NoEndo JETSTAR/JETFILTER Endotoxin-Free Plasmid で実施し、残留エンドトキシンのチェック (LAL assay, SEIKAGAKU SHIYAKU) も行なった。得られたプラスミド DNA は、*in vivo* 遺伝子導入

electroporation 法 (CUY21 EDIT, NEPAGENE) を用いてマウスおよびイヌに投与した。

**DNA ワクチンプロトコールおよび免疫活性の測定** マウスについては、C57BL6 マウスを準備し、プラスミド DNA 800 $\mu$ g を 1 週間に 1 回、計 3 回投与した。最終ワクチン 2 週間後のマウスより分離した脾臓より採取した単核球と標的細胞 (Human or mouse MelanA を導入した EL-4 株) を混ぜ合わせ、IFN- $\gamma$  産生を ELISPOT assay で測定した。また血清を用いて、EL-4-MelanA に対する反応性をウエスタンブロッティングを用いて検討した。

イヌへの DNA ワクチンについては、健常ビーグルおよび症例イヌに対して 250 $\mu$ g のプラスミド DNA を大腿筋肉に投与後 eletroporation を行い、導入した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1 レオウイルスによる腫瘍溶解性ウイルス療法を用いた担ガンイヌに対する治療効果の検討

本臨床試験に参加した 19 頭の担ガンイヌの品種、診断、腫瘍のステージ、組み入れ前の治療、レオウイルスの治療方法については、前臨床試験であることもあり、症例の品種、年齢、腫瘍の種類、ステージ、投与方法なども含めてすべて様々であった。

また本臨床試験においては、grade3 以上の重度な副作用が認められたイヌはいなかったため、最大耐用量は本試験からは明らかとならなかった。

またウイルス治療開始後の各イヌの血清中のウイルス中和抗体価を測定したところ、いずれも投与後の抗体価は、投与前と比較して上昇することがわかった。このことは臨床的にウイルスを使用する場合の減弱要因となる可能性を示唆している。

それぞれのイヌの排泄物 (尿、便、唾液) よりウイルスの検出を行った。RT-PCR による検出では、ウイルスの検出が認められる症例もいたが、それらの感染性について検討したところ、感染性ウイルスを排泄している症例イヌは 1 頭も認められなかった。以上より、本治療法は、環境に対する安全性についても十分確保されていると考えられる。

本臨床試験は安全性の確認およびウイルス排泄についての検討が主目的であったが、臨床的な効果についても検討を行なった。多くの症例は、すでに進行期の状況にあり、明ら

かな腫瘍退縮を認めないものがほとんどであったが、19 例中数例については腫瘍縮小効果が認められた。

##### 4-2 より効率のよい DNA ワクチンの検討

###### a) マウスを用いた DNA ワクチン効果増強法の検討

これまでに DNA ワクチンによる腫瘍免疫の誘導の報告は多数あり、本研究室でも実施してきているが、本研究ではより効果的な DNA ワクチンの方法を確立するために Ag85B 蛋白と Hemazoin とよばれるアジュバントによる DNA ワクチン増強効果をマウスを用いて検討した。

本研究においては、過去に報告のある人 MelanA をマウスに投与する xenogenic vaccine の系を用いた。C57BL6 マウス各群 5 匹ずつ用意し、PBS コントロール群、人 MelanA DNA 投与群、人 MelanA DNA + Ag85B 遺伝子投与群、人 MelanA DNA + Hemazoin 投与群を準備した。ワクチン投与後の脾臓より採取した単核球の抗原認識による IFN- $\gamma$  産生を ELISPOT assay で測定した。その結果、別途準備した ConA 刺激単核球においては十分な IFN- $\gamma$  産生が検出できたが、それ以外のどの組み合わせにおいても IFN- $\gamma$  は検出できなかった。これは過去の人 MelanA DNA によりマウスにおいて xenogenic に CTL 誘導ができるという過去の報告と矛盾するものであり、その原因については明らかとはならなかった。また Ag85B 遺伝子同時投与群、Hemazoin 同時投与群についても CTL 活性は認められず、DNA ワクチンについてその効果を増強する新たな系の構築はできなかった。

###### b) 担ガンイヌを用いた DNA ワクチンの効果の検討

前項の新しい DNA ワクチンの投与方法の確立ができなかったため、以前に本研究室で確立した tyrosinase DNA を用いた xenogenic DNA ワクチンを用いて実際の担ガンイヌに対して投与しその効果を検討することとした。

23 頭の口腔内悪性黒色腫の症例イヌに対して、手術によって原発巣を切除後、再発予防および生存期間延長の目的で、DNA ワクチンを 2 週に 1 回、計 5 回 (以降、3 ヶ月に 1 回ずつブースト) の投与を行った。その結果、多くのイヌ (stage II-III) は観察期間中

に再発または肺転移を認めた。しかし2頭のイヌのみ再発も転移もなく2年以上にわたり長期生存している。このうち1頭については、Stage IIであったものの手術により原発巣が不完全切除の状態であり、通常であれば、再発が認められるような状況であった。もう1頭は原発巣に対して根治的放射線治療を行っていたが、再発も転移もなく2年程度経過している。

全てのイヌについてワクチン投与前後の血清および末梢血を回収し、血清については抗 tyrosinase 抗体の検出、末梢血については ELISPOT を用いた IFN- $\gamma$  産生の検討を行った。しかし、それぞれ抗体価が検出できるイヌは存在したものの、CTL 活性について検出できたイヌはいなかった。コントロールとして用いた健常イヌに対して同ワクチンを投与した後の血清および PBMC を用いた免疫活性は検出ができていたことから、今回の検出が難しかったのは、担がん動物であるため、抗腫瘍免疫がもともと落ちており、そのため検出できなかった可能性を考えている。以上のことから、治療効果が認められた可能性のある2頭が他のイヌと比較して、免疫誘導ができていたからかどうかなどについては検討ができなかった。したがって、DNA ワクチンを用いた免疫療法については、本研究から確立することはできなかった。

#### 4-3 イヌにおける免疫チェックポイント分子阻害抗体療法の確立

##### a) 抗体による ConA 刺激 PBMC による IFN- $\gamma$ 産生増強効果の検討

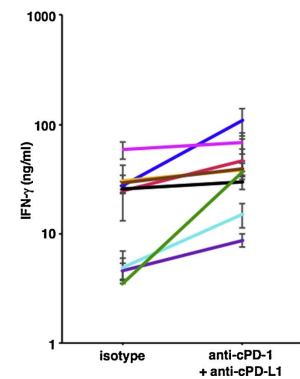
以前に本研究室で単離した抗イヌ PD-1 抗体 (4F12-E6) および抗イヌ PD-L1 抗体 (G11-6) は、両分子の結合を特異的に阻害することをすでに明らかとなっている。

はじめに ConA や PMA/ionomycin をはじめとした mitogen による PBMC の刺激により T 細胞上には PD-1 および PD-L1 分子が発現上昇することが明らかとなった。

このことから、mitogen 刺激された T 細胞では PD-1 および PD-L1 の自己 ligation が生じ、T 細胞の活性化がある程度負に制御されている可能性が考えられる。したがって、抗イヌ PD-1 抗体 (4F12-E6) および抗イヌ PD-L1 抗体 (G11-6) がこれら負に制御された T 細胞の状態を解放できるかどうかについて、多くのイヌ由来の PBMC を用いて検討

を行なった。

すなわち ConA により活性化した PBMC においては IFN- $\gamma$  の産生が認められることが知られているが、同時に PBMC は PD-1 および PD-L1 発現を増強する。そのため、その培養液中に抗イヌ PD-1 抗体 (4F12-6) または PD-L1 抗体 (G11-6)、さらにそれらの組み合わせを添加した場合に、PD-1 と PD-L1 結合阻害が生じることで IFN- $\gamma$  産生が増強するかについて検討を行なった。その結果、抗イヌ PD-1 抗体 (4F12-6) 単独、抗イヌ PD-L1 抗体 (G11-6) 単独でも、用いたイヌにより IFN- $\gamma$  産生の増強が認められたが、これらを組み合わせることにより、さらに IFN- $\gamma$  産生増強は強く認められることが明らかとなった。こ



このことから抗イヌ PD-1 抗体 (4F12-6) および PD-L1 抗体 (G11-6) は、両分子の結合を阻害することで、実際に活性化 T 細胞の機能を増強することができることが明らかとなった。

##### b) キメラ抗体の作製

次に、これら抗体産生ハイブリドーマより抗体分子の重鎖と軽鎖の遺伝子をクローニングし、それらをイヌ IgG-A の定常領域またはイヌ IgG kappa 鎖の定常領域とそれぞれ組換えを行った。さらにそれらベクターを HEK293T 細胞に遺伝子導入することで、その培養上清中に組換えラット-イヌ PD-1 キメラ抗体および組換えラット-イヌ PD-L1 キメラ抗体を得ることができた。またこれらを大量に精製することで以降のイヌの投与に必要な量を得ることができた。

得られたこれらキメラ抗体は、もとの 4F12-E6 抗体および G11-6 抗体と同様にイヌ PD-1 とイヌ PD-L1 分子の結合を阻害することができた (data not shown)。

##### c) キメラ抗体を用いた安全性試験

得られたキメラ抗体の健常イヌにおける安全性を確認するために、3mg/kg および 10mg/kg で健常ビーグルイヌ各2頭ずつに投与したところ、とくに大きな副作用を認める

ことはなかった。

#### d) キメラ抗体の担ガンイヌへの投与および治療効果の検討

次に、キメラ抗体の臨床的な効果について検討するために、山口大学動物医療センターに来院し、既存の治療法に抵抗性となった悪性黒色腫のイヌに対して、本治療法の安全性および効果判定のための前臨床試験を行った。その結果については現在経過観察中のものがほとんどであり、最終結論には至っていないが、臨床試験を始めるところまで本研究で至った。

#### 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 7 件)

①Hwang CCら(13人中13番目)、Oncolytic reovirus therapy: Pilot study in dogs with spontaneously occurring tumours. *Vet Comp Oncol.* 2018 査読あり

Jun;16(2):229-238. 10.1111/vco.12361

②Nemoto Y (5人中5番目)、Development and characterization of monoclonal antibodies against canine PD-1 and PD-L1. *Vet Immunol Immunopathol.* 2018 Apr;198:19-25. 査読あり 10.1016/j.vetimm.2018.02.007

③Sakai O (8人中8番目)、Molecular cloning of canine Wilms' tumor 1 for immunohistochemical analysis in canine tissues. *J Vet Med Sci.* 2017 Jul 28;79(7):1272-1277. 査読あり 10.1292/jvms.17-0229

④Hwang CC (7人中7番目)、The effects of oncolytic reovirus in canine lymphoma cell lines. *Vet Comp Oncol.* 2016 Aug;14 Suppl 1:61-73. 査読あり 10.1111/vco.12124

⑤Shosu K (9人中9番目)、Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Canine Cancer. *In Vivo.* 2016 May-Jun;30(3):195-204. 査読あり <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27107075>

⑥Igase M (10人中10番目)、Oncolytic reovirus synergizes with chemotherapeutic agents to promote cell death in canine mammary gland tumor. *Can J Vet Res.* 2016 Jan;80(1):21-31. 査読あり

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733729>

⑦Igase M (6人中6番目)、The oncolytic effects of reovirus in canine solid tumor cell lines. *J Vet Med Sci.* 2015 May;77(5):541-548. 査読あり 10.1292/jvms.14-0570

[学会発表] (計 16 件)

①Igase M ら、The combination of the ATM Inhibitor and reovirus enhances the viral replication and the oncolytic effects of reovirus in canine and human cell lines. The 9th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia, 2018 年

②Igase M ら、Pilot study of oncolytic reovirus therapy in dogs with spontaneously occurring tumors. *Asian Meeting of Animal Medicine Specialties* 2017, 2017 年

③Igase M ら、Oncolytic virotherapy for canine histiocytic sarcoma cells by reovirus. *Veterinary Cancer Society Annual Meeting*, 2017 年

④伊賀瀬雅也ら、ATM kinase の阻害は、犬の悪性黒色腫細胞株においてレオウイルスの細胞死を促進する 第76回日本癌学会学術総会, 2017 年

⑤伊賀瀬雅也ら、ATM kinase 阻害による犬メラノーマ細胞株に対する腫瘍溶解性ウイルスの細胞傷害増強効果の検討 第160回日本獣医学会学術集会、2017 年

⑥水野拓也ら、犬のCD20分子に対するモノクローナル抗体の作製 第160回日本獣医学会学術集会、2017 年

⑦長谷川友紀ら、犬のリンパ腫細胞に対する新規モノクローナル抗体の作製 第160回日本獣医学会学術集会、2017 年

⑧藤木範之ら、犬血管肉腫細胞株に対して抗腫瘍効果をもたらす新規薬剤の探索 第160回日本獣医学会学術集会、2017 年

⑨Igase M ら、The signaling pathway inhibitor enhanced the reovirus-induced virus replication and cell death in canine melanoma cell lines. The 8th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia, 2017 年

⑩Igase M ら、Safety and proof-of-concept evaluation of reovirus as oncolytic virotherapy in dogs with spontaneously occurring tumors. *Veterinary Cancer Society Annual Meeting*, 2016 年

⑪Hwang CC ら、Reovirus degrades c-kit and dysregulates the ras signaling pathway to induce apoptotic cell death in canine mast cell tumor (MCT). Veterinary Cancer Society Annual Meeting, 2016 年

⑫伊賀瀬雅也ら、犬の腫瘍症例に対するレオウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルス療法フェーズ I 試験 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年

⑬正司麗葉ら、レオウイルスによる犬の悪性組織球肉腫細胞株に対する細胞死の誘導 第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年

⑭伊賀瀬雅也ら、犬悪性黒色腫に対して腫瘍溶解性ウイルス療法の抗腫瘍効果を増強するシグナル阻害剤の探索 第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年

⑮伊賀瀬雅也ら、腫瘍溶解性ウイルス療を行った犬メラノーマの一例 第 15 回日本獣医がん学会 2016 年

⑯Hwang CC ら、Oncolytic reovirus in canine mast cell tumor and lymphoma. Asian Meeting of Animal Medicine Specialist 2015, 2015 年

[図書] (計 0 件)  
[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)  
名称: 抗イヌ pd-1 抗体又は抗イヌ pd-11 抗体  
発明者: 水野拓也、正司麗葉  
権利者: 日本全薬工業株式会社  
種類:  
番号: PCT/JP2015/003444  
出願年月日: 平成 27 年 1 月 14 日  
国内外の別: 国内外  
名称: 抗イヌ CD70 モノクローナル抗体  
発明者: 水野拓也、長谷川友紀  
権利者: 日本全薬工業株式会社  
種類:  
番号: 2016-022105  
出願年月日: 平成 28 年 2 月 8 日  
国内外の別: 国内  
名称: 腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果増強剤  
発明者: 水野拓也、伊賀瀬雅也  
権利者: 山口大学  
種類:  
番号: PCT/JP2017/145535  
出願年月日: 平成 29 年 7 月 27 日

国内外の別: 国内外  
名称: 抗イヌ CD20 モノクローナル抗体  
発明者: 水野拓也  
権利者: 日本全薬工業株式会社  
種類:  
番号: PCT/JP2017/151009  
出願年月日: 平成 29 年 8 月 3 日  
国内外の別: 国内外  
○取得状況 (計 1 件)  
名称: 犬リンパ腫の診断方法及び診断キット  
発明者: 水野拓也、柳瀬拓磨、梅城沙織  
権利者: 山口大学  
種類: 公開特許公報  
番号: 2012-44092  
取得年月日: 平成 26 年 3 月 13 日  
国内外の別: 国内  
[その他]  
ホームページ等  
<https://www.mizutakuvet.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水野 拓也 (MIZUNO, Takuya)  
山口大学・共同獣医学部・教授  
研究者番号: 90398826

### (2) 研究分担者

中川 貴之 (NAKAGAWA, Takayuki)  
東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 40447363

富張 瑞樹 (TOMIHARI, Mizuki)  
帯広畜産大学・畜産学部・講師  
研究者番号: 00552754

### (3) 連携研究者

( )

### (4) 研究協力者

( )