

平成30年 5月21日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15042

研究課題名(和文) 伴侶動物の腫瘍疾患を横断的に治療可能な新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapies for various cancers in companion animals

研究代表者

今内 覚 (KONNAI, SATORU)

北海道大学・獣医学研究科・准教授

研究者番号：40396304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1やPD-L1などの免疫チェックポイントを標的とした抗体による免疫療法はヒトの悪性腫瘍疾患に対する治療法として広く使用されて始めている。しかし、イヌにおいては免疫チェックポイントを標的とした抗体による免疫療法の報告はない。そこで本研究では、キメラ抗PD-L1抗体を開発し、難治性の悪性腫瘍に罹ったイヌに対する臨床応用研究を行った結果、悪性黒色腫と未分化肉腫において腫瘍の退縮効果が確認された。本開発技術は、悪性黒色腫をはじめとしたイヌの難治性腫瘍の新規治療薬として期待できる成果と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Immunotherapy targeting immune checkpoint molecules, programmed cell death 1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1), using therapeutic antibodies has been widely used for some human malignancies. In dogs, no such clinical studies have been performed to date because of the lack of therapeutic antibodies that can be used in dogs. In this study, we established a canine-chimerised anti-PD-L1 monoclonal antibody, and a pilot clinical study was performed on dogs with oral malignant melanoma (OMM) and with undifferentiated sarcoma. Objective antitumour responses were observed in dogs with OMM and undifferentiated sarcoma. The canine-chimerised anti-PD-L1 monoclonal antibody could be a safe and novel effective treatment option for canine cancers.

研究分野：腫瘍免疫、臨床免疫、感染免疫

キーワード：伴侶動物 腫瘍疾患 横断的治療法 免疫療法 イヌ腫瘍 PD-1 PD-L1 黒色腫

### 1. 研究開始当初の背景

伴侶動物の高齢化に伴い、悪性腫瘍は最も多い死因の一つとなっている。高度医療化が求められている小動物医療領域において、腫瘍治療の重要性は、今後さらに増大していくものと考えられるが、現行の外科療法、化学療法、放射線療法は、侵襲および副作用に対する懸念や治療への感受性の有無など、状況により既存の治療法だけでは対処できない場合が多くあり、新たな戦略が求められている。

### 2. 研究の目的

悪性腫瘍は、伴侶動物における最も多い死亡原因の一つであり、10歳以上のイヌでは死因の約45%が腫瘍であるとされている。現在、悪性腫瘍に対して外科手術、放射線療法および化学療法が単独あるいは併用して行われている。しかし、腫瘍転移病巣の成長を助長する可能性や、非特異的治療による重篤な副作用が原因で治療法の選択が制限される場合も多く、腫瘍に特異的に効果を発揮し、副作用の少ない新たな治療戦略が求められている。本研究は、免疫チェックポイントに係る免疫抑制因子を標的とした、腫瘍を特異的に排除する抗体医薬品の開発を行う。

### 3. 研究の方法

腫瘍疾患では、生体内で免疫抑制が誘導され腫瘍細胞の排除が妨げられている。これは免疫活性化が免疫沈静化を判断する『免疫チェックポイント』に係る Programmed death 1(PD-1)レセプター/Programmed death ligand 1(PD-L1)経路などの免疫抑制因子が暴走し、抗腫瘍T細胞を疲弊させて、腫瘍排除機構が抑制されるためである。そこで、PD-L1に対するモノクローナル抗体を樹立し、腫瘍罹患犬由来のバイオプシーを用いてPD-L1の発現を免疫組織化学染色法にて確認する。一方、同モノクローナル抗体を改変したキメラ抗体医薬品を開発し、予後不良なイヌの腫瘍疾患に対する臨床応用研究を実施した。

### 4. 研究成果

H28年度は、北海道大学大学院獣医学研究科および北海道大学動物医療センターに来院したイヌの悪性腫瘍、すなわち口腔内黒色腫、骨肉腫、血管肉腫、肥満細胞腫、乳腺腫および前立腺がん上のPD-L1の発現解析を行った。その結果、これらの悪性腫瘍において高率でPD-L1が発現していることが明らかとなった。一方、口腔内黒色腫内に浸潤していたリンパ球上のPD-1の発現をフローサイトメトリー法で解析した結果、腫瘍浸潤細胞上に高率でPD-1が発現し、抗腫瘍効果が低下していることも明らかとなった。このことは、イヌの悪性腫瘍においてPD-1およびPD-L1の発現上昇が、腫瘍疾患の病態進行に関わる一方、同機構を標的とした腫瘍横断的な治療法が可能であることが示唆された。そ

こでH29年度は、イヌの腫瘍治療に応用可能なラット-イヌキメラ抗PD-L1抗体を開発し、同抗体が*in vitro*下で、腫瘍免疫を活性化させることを確認した。さらに同抗体を用いて、難治性の悪性腫瘍を発症したイヌに対する臨床応用研究を行った。その結果、悪性黒色腫と未分化肉腫を呈したイヌの一部で、明らかな腫瘍の退縮効果が確認された。また、悪性黒色腫では肺に転移した後でも生存期間を延長させる効果も得た。本研究による萌芽的知見は、本抗体医薬が悪性黒色腫をはじめとしたイヌの難治性腫瘍の治療薬として応用可能であることを示した成果と考えられた。

### 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13件)

Maekawa N, Konnai S, Balbin MM, Mingala CN, Gicana KRB, Bernardo FAEM, Murata S, Ohashi K. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in a Philippine dog. *Ticks Tick Borne Dis*(査読有). 2018. 9(2):266-269. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.09.012.

今内 覚, 村田史郎, 大橋和彦. 獣医療における抗体医薬の現状(招待論文). 家畜診療(査読無). 2018. 65(4). 227-234.

Maekawa N, Konnai S, Takagi S, Kagawa Y, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Deguchi T, Nakajima C, Kato Y, Yamamoto K, Uemura H, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci Rep*(査読有). 2017. 7(1):8951. doi:10.1038/s41598-017-09444-2.

Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Harada H, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. Expression of Cat Podoplanin in Feline Squamous Cell Carcinomas. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2017. 36(6):243-250. doi: 10.1089/mab.2017.0046.

Yamada S, Itai S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Chang YW, Handa S, Harada H, Kagawa Y, Ichii O, Konnai S, Kaneko MK, Kato Y. PMab-52: Specific and Sensitive Monoclonal Antibody Against Cat Podoplanin for Immunohistochemistry. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2017. 36(5):224-230. doi: 10.1089/mab.2017.0027.

Yamada S, Kaneko MK, Nakamura T, Ichii O, Konnai S, Kato Y. Development of mPMab-1, a Mouse-Rat Chimeric Antibody Against Mouse Podoplanin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2017. 36(2):77-79. doi:10.1089/mab.2017.0002.

Konnai S, Murata S, Ohashi K. Immune exhaustion during chronic infections in cattle. *J Vet Med Sci*(査読有). 2017. 79(1):1-5. doi: 10.1292/jvms.16-0354.

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*(査読有). 2016. 11(6):e0157176. doi: 10.1371/journal.pone.0157176.

Ogasawara S, Honma R, Kaneko MK, Fujii Y, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. Podoplanin Expression in Canine Melanoma.

*Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2016. 35(6):304-306. doi: 10.1089/mab.2016.0040.

Kaneko MK, Honma R, Ogasawara S, Fujii Y, Nakamura T, Saidoh N, Takagi M, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. PMab-38 Recognizes Canine Podoplanin of Squamous Cell Carcinomas. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2016 Oct;35(5):263-266. doi:10.1089/mab.2016.0036.

Honma R, Kaneko MK, Ogasawara S, Fujii Y, Konnai S, Takagi M, Kato Y. Specific Detection of Dog Podoplanin Expressed in Renal Glomerulus by a Novel Monoclonal Antibody PMab-38 in Immunohistochemistry. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2016. 35(4):212-6. doi: 10.1089/mab.2016.0022.

Honma R, Fujii Y, Ogasawara S, Oki H, Konnai S, Kagawa Y, Takagi M, Kaneko MK, Kato Y. Critical Epitope of Anti-Rabbit Podoplanin Monoclonal Antibodies for Immunohistochemical Analysis. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*(査読有). 2016. 35(2):65-72. doi: 10.1089/mab.2015.0078.

今内 覚. Programmed death-1 (PD-1) (招待論文). *Veterinary Oncology*(査読有). 2016. 3:12-14.

[学会発表](計16件)

Konnai S. Immune exhaustion during chronic diseases in animals (招待講演), The 20th Joint Symposium Between Seoul National University and Hokkaido University ~ Advanced Veterinary Sciences: From Bench to Clinic~ (Seoul National University, Seoul, Korea), 2017年11月16日.

今内 覚. 動物用バイオ医薬品の開発 (招待講演). 東北大学大学院医学系研究科抗体創薬研究分野 第二回抗体創薬研究セミナー(東北大学, 仙台市). 2017年11

月2日.

Maekawa N, Konnai S, Takagi S, Kagawa Y, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Deguchi T, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. A canine chimeric antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine malignant cancers. The 5th Sapporo Summer Seminar for One Health (Hokkaido University, Sapporo, Japan). 2017年9月20日.

浅野裕美恵, 今内 覚, 岡川朋弘, 前川直也, 西森朝美, 後藤伸也, 高木 哲, 村田史郎, 大橋和彦. COX-2 阻害薬と抗PD-L1 抗体の併用によるイヌ腫瘍疾患の制御法の検討. 第160回日本獣医学会学術集会 (鹿児島大学, 鹿児島市). 2017年9月13日.

前川直也, 今内 覚, 高木 哲, 賀川由美子, 岡川朋弘, 西森朝美, 池淵良洋, 和泉雄介, 出口辰弥, 加藤幸成, 鈴木定彦, 村田史郎, 大橋和彦. PD-L1 を標的としたイヌ用キメラ抗体医薬の作製と悪性黒色腫および未分化肉腫罹患犬における抗腫瘍効果の検討. 第160回日本獣医学会学術集会 (鹿児島大学, 鹿児島市). 2017年9月13日.

今内 覚. Role of Inhibitory Molecules in Animal Chronic Infectious Diseases and as Target for Therapy (招待講演). 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 特別セミナー(宮崎大学, 宮崎市). 2017年9月11日.

Konnai S. Therapeutic intervention in cancer and chronic infections in animals: Antibody mediated manipulation of PD-1/PD-L1 interaction (招待講演). Hokkaido University & Colorado State University Kick-off Symposium 2017 (Hokkaido University, Sapporo, Japan). 2017年7月25日.

今内 覚. 動物における免疫チェックポイント標的抗体による治療戦略 (招待講演). 化学及血清療法研究所 三風会 (化学及血清療法研究所, 熊本市). 2017年6月20日.

今内 覚. 動物難治性疾病における免疫回避機序の解明 ~免疫チェックポイントを標的とした動物用医薬品開発~ (招待講演). 第2回北海道大学・部局横断シンポジウム『免疫・癌・感染』(北海道大学, 札幌市). 2017年3月14日.

今内 覚. 獣医療における抗体医薬の開発と現状 (招待講演). 徳島大学先端酵素学研究所免疫制御学セミナー (徳島大学, 徳島市). 2016年12月21日.

Konnai S. Immunotherapy for canine malignant cancers (招待講演). The 19th Joint Symposium Between Seoul National University and Hokkaido University ~ Advanced Veterinary Sciences: From Bench to Clinic~ (Hokkaido University, Sapporo,

Japan). 2016年11月25日.

今内 覚. 免疫チェックポイントを標的とする免疫療法とは (招待講演). 平成28年宮崎大学テニユアトラック推進機構主催セミナー (宮崎大学, 宮崎市). 2016年11月1日.

Konnai S. Development of novel strategy for disease control in animal-engineering animal antibodies for development of novel therapeutics (招待講演). Texas A&M University, College of Veterinary Medicine, Veterinary Pathology Seminar Series (Texas A&M University, College station, USA). 2016年9月22日.

Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Takagi S, Kagawa Y, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Expression of canine PD-1/PD-L1 and the therapeutic potential of anti-PD-L1 antibody in canine malignant cancers. The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (Hokkaido University, Sapporo, Japan). 2016年9月20日.

Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Takagi S, Kagawa Y, Murata S, Ohashi K. Expression of canine immune checkpoint molecules PD-1/PD-L1 and the therapeutic potential of anti-PD-L1 antibody in canine malignant cancers. The 11th International Veterinary Immunology Symposium (Gold Coast Convention & Exhibition Centre, Gold Coast, Australia). 2016年8月19日.

Konnai S. Research on immune checkpoint in veterinary medicine (招待講演). Joint Workshop on Livestock Disease Research in University of Sydney (University of Sydney, Camden, Australia). 2016年8月15日.

〔図書〕(計1件)

岡川朋弘, 今内 覚ほか, 抗体医薬: 免疫チェックポイント阻害薬等, 動物用ワクチンとバイオ医薬品 -新たな潮流-. 文永堂出版, 42-47, 2017年.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計5件)

名称: PD-L1 検出用抗 PD-L1 抗体  
発明者: 今内 覚ほか  
権利者: 今内 覚ほか  
種類: 特許権  
番号: PCT/JP2018/ 11895  
出願年月日: 2018年3月23日  
国内外の別: 国外  
名称: 抗 PD-L1 抗体  
発明者: 今内 覚ほか  
権利者: 今内 覚ほか  
種類: 特許権  
番号: PCT/JP2017/029055  
出願年月日: 2017年8月10日

国内外の別: 国外

名称: PD-1/PD-L1 を標的とする阻害薬と COX-2 阻害薬との併用 .

発明者: 今内 覚ほか

権利者: 今内 覚ほか

種類: 特許権

番号: 特願 2017-140891

出願年月日: 2017年7月20日

国内外の別: 国内

名称: PD-L1 検出用抗 PD-L1 抗体

発明者: 今内 覚ほか

権利者: 今内 覚ほか

種類: 特許権

番号: 特願 2017-61389

出願年月日: 2017年3月27日

国内外の別: 国内

名称: 抗 PD-L1 抗体

発明者: 今内 覚ほか

権利者: 今内 覚ほか

種類: 特許権

番号: 特願 2016-159088

出願年月日: 2016年8月15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

<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/>

プレスリリース

イヌのがん治療に有効な免疫チェックポイント阻害薬(抗 PD-L1 抗体)の開発に はじめて成功 ~北海道大学動物医療センターにおける臨床研究成果~ 2017年8月25日

日本語:

[https://www.hokudai.ac.jp/news/20170825\\_jyu.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/20170825_jyu.pdf)

英語:

<https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/new-therapeutic-antibody-for-dog-cancers/>  
報道

- (1) 日経バイオテク, 北大など、動物用の免疫チェックポイント阻害薬を開発 目指すは病気の違いを越えた汎用免疫療法, 2017年10月23日.
- (2) 日経バイオテク, 北海道大、イヌの癌免疫療法に有効な免疫チェックポイント阻害薬を開発 抗 PD-L1 抗体のラット-イヌキメラ化で実用可能, 2017年8月30日.
- (3) 日本経済新聞, 北大と東北大と扶桑薬品など、イヌのがん治療に有効な

免疫チェックポイント阻害薬（抗  
PD-L1 抗体）の開発に成功, 2017 年 8  
月 25 日.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今内 覚(KONNAI, Satoru)

北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授

研究者番号：40396304