

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03132

研究課題名(和文) 犬の個別化がん特異的免疫療法の実用化に向けた研究開発

研究課題名(英文) Research and development for practical use of individualized canine cancer immunotherapy

研究代表者

塚田 晃三 (Ohkusu-Tsukada, Kozo)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90304930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬個別化癌ワクチンのアジュバント選別にマウス腫瘍株肺転移モデルを用いて6種類のS化CpG-ODNを検証した。多くは若干の生存延長を示したが、6種中1種のみ生存率37.5%で完全寛解を示し、それを本ワクチンのアジュバントとして選択した。犬を用いた安全性試験結果を臨床研究申請書にまとめ、大学付属動物医療セ倫理委員会の承認を得て臨床研究を開始した。しかし、一般治療(手術、放射線、化学療法)を優先するため症例数が集まらず、本研究は末期癌患犬が中心で迅速な対応が求められた。臨床現場の現状を踏まえ、腫瘍の針生検で癌関連抗原を数時間以内に検出できるフローサイトメトリーを開発し、現在臨床研究に取り入れている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんワクチンの有識者の見解では、短鎖ペプチドを用いたワクチンの有効性は低く、長鎖ペプチド又はネオアンチゲンにその有効性を示している。本研究は短鎖ペプチドを用いて有効な細胞傷害性T細胞を導くアジュバントを開発した。ネオアンチゲンに置換えて実施した場合にさらなる効果が期待される。また、現代医療では、がんの一部採材後に病理検査で1週間を要し、治療方針の検討から予約状況を含め治療開始に至るまでに3週間かかり、がん進行の治療に早期対応が求められている。本研究のフローサイトメトリーがん抗原検出法は、数時間で結果が得られ、その日のうちにがんワクチンの治療を開始できる画期的方法として社会貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：To select adjuvant for an individualized canine cancer vaccine, 6 types of phosphorothioate CpG-ODN were tested using a mouse tumor line lung metastasis model. Most of them showed slight survival prolongation, but 1 type only in 6 types that was complete remission with a survival rate 37.5% was selected as the adjuvant for this vaccine. An application for clinical research was prepared with the results of a safety test using dogs, and after approval by ethics committee of veterinary medical teaching hospital, clinical research was started. But, since general treatment (surgery, radiation, chemotherapy) is prioritized, the number of cases is not collected, and most of this study was conducted on terminal cancer clients, and rapid response was required. In light of this reality, an intracellular staining flow cytometry was developed that can detect within a few hrs the expression of cancer-related antigen in tumor needle biopsy, and is currently being incorporated into clinical research.

研究分野：免疫学、獣医病理学、腫瘍免疫学、腸内細菌学、皮膚科学

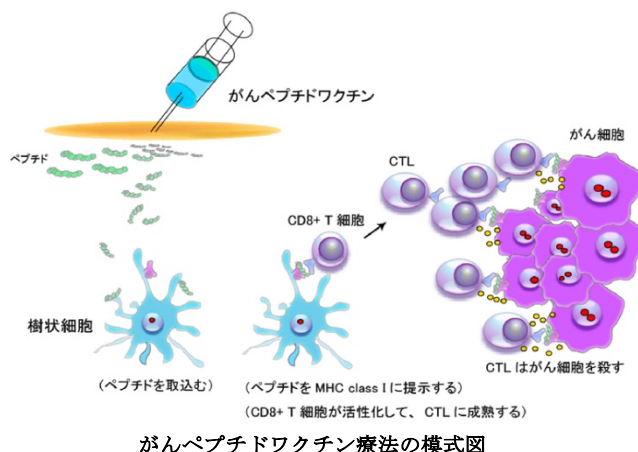
キーワード：犬ペプチドワクチン 犬MHC class I型 DLA-88型 がん抗原検出法 アジュバント survivin 臨床研究

1. 研究開始当初の背景

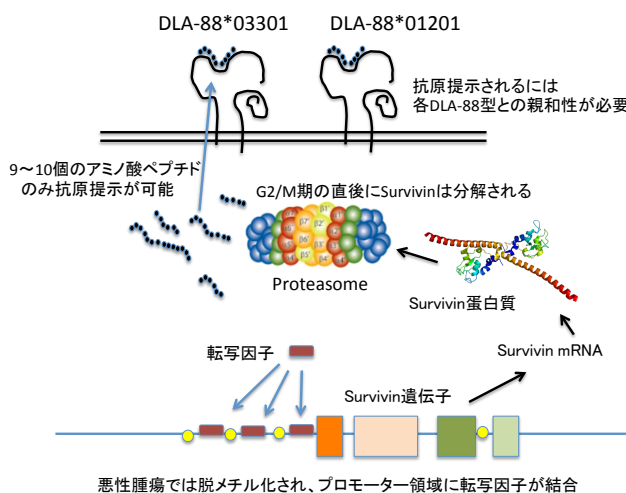
***何故犬を用いた研究が必要なのか** 犬の腫瘍は多様性に富み、ヒトの稀な腫瘍（精巣腫瘍、消化管間質腫瘍、耳下腺癌、唾液腺癌、褐色細胞腫、横紋筋肉腫等）も犬では珍しくなく、また犬特有の腫瘍（犬血管周皮腫、犬肛門周囲腺腫、犬脊髄腎芽腫、犬エナメル上皮腫等）も頻繁にみられる。また、犬種別に発生しやすい癌種（がんの種類）が示唆されており、例えば、ゴールデンレトリバーではリンパ腫、ロットワイラーでは骨肉腫、チャウチャウでは胃癌、ボクサーではグリオーマ、スコティッシュテリアでは尿路上皮癌、イングリッシュスプリングスパニエルでは乳癌、シュナウザー、プードルでは悪性黒色腫、ジャーマンシェパードでは血管肉腫といったように報告されている(Watersら2006)。これには、多彩な犬種(現在のFCI登録で343品種)という遺伝的背景の違いや各犬種に偏ったMHC class I型(DLA-88型)との関連性が示唆されている。犬の悪性腫瘍はヒトと同様の難治性を示し、再発ないし転移後は数ヶ月で死亡する例も少なくない。また、1) ヒトと同じ癌種名の腫瘍が類似の性質(増殖性および浸潤性等)を有する点、2) ヒトと同様の先端医療機器を用いた治療指針が立てられる点、3) 臨床への新しい治療法導入が比較的難しい点から、がん罹患犬の症例はヒト医療モデルとして有効であり、犬種という遺伝的重要な情報から新たな見解も期待される。最近のNatureでのNEWS IN FOCUS(534:303-304, 2016)では、大手企業が需要予測して犬用の先端医療商品の開発を進めているという国際情勢が紹介された。また、犬は2005年に全ゲノム解読されたが、不明点も多く、比較医学的見地から重要視されている。

***何故がん特異的細胞傷害性 T リンパ球(CTL)誘導法は必要なのか** 近年、がん免疫療法の一つ、抗PD-1抗体(オプジーボ)を用いたチェックポイント阻害療法がヒト医療で開発され、多くの患者に絶大な治療効果をもたらした。獣医療においても注目され、北海道大学獣医学部(感染症学教室)を中心とした研究グループで開発が行われている。しかし、この治療で深刻な自己免疫疾患等の副作用が生じることや腫瘍退縮の効果がみられない症例(そもそも個体の持つがん特異的CTL活性の低い症例)があることから、その対策の一つにがん特異的CTL誘導法と合わせた治療法が考案されている。

がん特異的CTL誘導法の一つにペプチドワクチン療法があり、これまでにヒト医療で実施され奏効率が低いとされてきたが、近年のadjuvant研究の進歩によって見直されつつある。また、マウスの研究では、新しいadjuvant(CpG-ODN等)を用いたペプチドワクチン療法が、がん転移・再発防止に効力を発揮することから、免疫系を抑制しない外科手術療法又は放射線療法と合わせた治療にも期待が寄せられている。



***どんな抗原がCTL誘導に効果的か** 犬のがんは多様性のため特定のがんに限定する方法は得策ではなく、様々ながんに共通するがん関連抗原が望まれる。注目される抗原の一つにInhibition of apoptosis protein (IAP) familyのclass IIIに分類される“Survivin”がある。Survivinは、例えば、悪性組織球腫、リンパ腫、肥満細胞腫、線維肉腫、骨肉腫、血管肉腫、滑膜肉腫、扁平上皮癌、悪性黒色腫、乳癌、下顎腺癌、大腸癌、鼻腔腺癌、尿路上皮癌、腎細胞癌、肺癌等の犬の多彩ながんに発現することが確認されている。この分子は、monomerないしdimer形成により細胞のapoptosis、微小管の安定性、STAT3転写抑制等を制御する役割があり、splicingの違いにより共通するBIR domain (Caspase群と結合する部位)と幾つかの異なるdomainとの発現パターンを示して、核と細胞質間の細胞内局在を制御し、脱メチル化の進んだ極めて悪性度の高いがん細胞のG2/M期のみに高発現する。また、G2/M期の直後にProteasomeで急速に分解されるため、一見発現のないがん細胞にも、Survivin断片は細胞膜上の多くの



DLA-88 型分子に大量に提示されている可能性がある。がん特異的 CTL は、DLA-88 型に提示されている Survivin 断片を認識してがん細胞を殺すことができる。

2. 研究の目的

犬のがん特異的ペプチドワクチン療法を本学の付属動物医療センターで第4のがん治療法として確立させることを目指す。そのため、本研究では、1) ワクチン製剤用として有効な adjuvant の選別、2) 犬の MHC class I (DLA-88)型タイピングに代わる簡便な適合型検査の確立、3) 各種検査依頼書の作成を含めた書類による運営システム構築後、実用的運営を進めて動物医療センターでの臨床研究を実施する。

3. 研究の方法

本研究では、各 DLA-88 型に適合したペプチドワクチン療法を実施するため、以下の課題について、4年以内に確立し実用化することを目指す。1) がんに対する有効な adjuvant 成分を、マウスがん肺転移モデルを用いてがん拒絶と生存率で選別し、決定する。2) DLA-88 型タイピングに代わる簡便化検査法を確立させる(リアルタイム PCR 法を用いた簡便化)。3) がんペプチドワクチン療法に向けた本学動物医療センターにおける、DLA-88 適合型検査および腫瘍の病理組織検査(がん種特定と免疫による Survivin の発現チェック)の検査依頼書による運営システムの構築を行う。その後、本学倫理委員会での審査・承認後、飼い主の同意に基づき本治療を実施する。治療経過中の腫瘍サイズを CT 検査又は MRI 検査にて経時的にモニタリングし、個体の寛解及び生存の期間で本治療の有効性を検討する。

4. 研究成果

1) 犬がんに対するペプチドワクチン療法の有効な adjuvant 成分の検証 マウス腫瘍株 CT26 肺転移モデルを用いてがん拒絶と生存率で評価する。様々な Toll 様受容体 (TLR) を刺激する adjuvant 成分を検証した結果、リポ多糖、リポペプチド、Pam3CSK4、flagellin、丸山ワクチン成分アラビノマンナン (SSM)、プロポリスでは、延命効果を示すもの、全く示さないものを含め全ての個体は肺転移を起こして死亡したのに対し、CpG-ODN では一部の個体 (20%) にエンドポイントまで延命効果を示した。

次に、各種 CpG-ODN を準備し、

- 1) 市販商品 D35 (GCTGCATCGATGCAGGGGG) --- 全塩基 S 化
- 2) ODN1760 (ATAATCGACGTTCAAGCAAG) --- 全塩基 S 化
- 3) ODN1826 (TCCATGACGTTCCCTGACGTT) --- 全塩基 S 化
- 4) ODN2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT) --- 全塩基 S 化
- 5) ODN2395 (TCGTCGTTTTCGGGCGCGCGCCG) --- 全塩基 S 化
- 6) HSVgD ODN (CTAACCGGAACGCACCACACA) --- 全塩基 S 化

について検証した結果、ODN2006 で、完全寛解した個体は、8 匹中 3 匹 (37.5%) で約 1 年間生存後、エンドポイントを迎えた。一方、D35、ODN1826、ODN2395、HSVgD ODN では延命効果はみられなかったものの、最終的に肺転移で全滅した。ODN2006 を本ワクチン用 adjuvant として決定した。

2) DLA-88 型タイピングに代わる簡便化検査法の確立 (リアルタイム PCR 法を用いた簡便化) Survivin ペプチドの 2 番目と 8 番目のアミノ酸が DLA-88 型のポケット B と F に収まるため、このポケットを構成するアミノ酸配列が DLA-88 型を決める重要な要素となる。ポケット B は 6 アミノ酸 (7-9-24-26-45-67; アミノ酸配列の順番で表記)、ポケット F は 5 アミノ酸 (74-77-95-116-118) で構成されており、事前に準備している 6 種の survivin ペプチドのうち、全てのペプチドが結合できない DLA-88 型が 14 種 (00101、04001、0160、03901、04601、nov07、nov10、nov11、nov23、nov24、nov28、nov34、nov59、nov72) あり、これらについて検出し、除外できれば良いことが判明した。しかし、リアルタイム PCR 法で検出する組み合わせが多く煩雑になり、まだ簡便化に至っていない。

3) 犬がんペプチドワクチン療法に向けた大学付属動物医療センターにおける臨床研究の準備と実施 実験用ビーグル犬 6 匹を用いた安全性試験結果 (ワクチン部位の状態、血球検査、血液生化学検査、全身症状) を添えて臨床研究の申請書を作成し、大学付属動物医療センター倫理委員会の承認を経て、臨床研究を開始した。しかし、がんの一般的な治療が優先されるため本症例数は少なく、外科療法、放射線療法、化学療法の適応外で、ほとんどが末期がんの犬を対象に実施した。がん進行に伴い早期対応が求められ、かつ麻酔リスクの回避も考慮に、腫瘍の針生検から数時間でがん関連抗原「survivin」を検出できる細胞内染色法を用いたフローサイトメトリーを開発し、現在、臨床研究に取り入れている。午前中にお預かりした愛犬を身体検査後に腫瘍の一部を採材し、がん抗原の発現を数時間後に確認でき、その日のうちにワクチン接種可能で夕方にお返しできるため、飼主様の利便性が高い。一連の手技に無麻酔下で処置できる点も麻酔リスク回避の適合となり、新しい第 4 の治療法として期待されつつある。治療成績の統計学的評価は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12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 Konnai M, Takahashi K, Machida Y, Michishita M, Ohkusu-Tsukada K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Intrahepatic eosinophilic proliferative phlebitis in Japanese black cattle indicate allergies involving mast cell tryptase-dependent activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Vet Sci.	6. 最初と最後の頁 972180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fvets.2022.972180. eCollection 2022.	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 Minami Fuuka, Sasaki Norihiko, Shichi Yuuki, Gomi Fujiya, Michishita Masaki, Ohkusu-Tsukada Kozo, Toyoda Masashi, Takahashi Kimimasa, Ishiwata Toshiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Morphofunctional analysis of human pancreatic cancer cell lines in 2- and 3-dimensional cultures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-86028-1	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 Yamamoto Ichiro, Kawasumi Koh, Ohkusu Tsukada Kozo, Arai Toshiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Molecular characterization of free fatty acid receptors FFAR2 and FFAR3 in the domestic cat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 77～85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.356	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 Ohkusu-Tsukada Kozo, Yamashita Tadashi, Tsukada Teruyo, Takahashi Kimimasa	4. 巻 20
2. 論文標題 Low expression of a Ddm7/Ldm7-hybrid mutant (D/Ldm7) in the novel haplotype H-2nc identified in atopic dermatitis model NC/Nga mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Immunity	6. 最初と最後の頁 74～81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41435-017-0003-y	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 -

1. 著者名 Michishita M., Fujiwara-Igarashi A., Suzuki S., Hatakeyama H., Machida Y., Yoshimura H., Yamamoto M., Azakami D., Ochiai K., Ishiwata T., Fujita M.	4. 巻 171
2. 論文標題 Diffuse Pulmonary Meningotheliomatosis with Sarcomatous Transformation in a Shiba Dog	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcpa.2019.06.005	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 -

1. 著者名 FUJIWARA-IGARASHI Aki, YU Yoshihiko, HAMAMOTO Yuji, HASEGAWA Daisuke, FUJITA Michio	4. 巻 81
2. 論文標題 Dynamic pharyngeal collapse in three cats with different pharyngeal pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1012~1016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0192	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 -

1. 著者名 Tani Hiroyuki, Kurita Sena, Miyamoto Ryo, Ochiai Kazuhiko, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 18
2. 論文標題 Canine histiocytic sarcoma cell lines with SHP2 p.Glu76Gln or p.Glu76Ala mutations are sensitive to allosteric SHP2 inhibitor SHP099	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 161~168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12524	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 -

1. 著者名 Kurita Sena, Miyamoto Ryo, Tani Hiroyuki, Kobayashi Masato, Sasaki Takashi, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Genetic alterations of KIT during clonal expansion and subsequent acquisition of resistance to toceranib in a canine mast cell tumor cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 673~681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvp.12816	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 -

1. 著者名 Noguchi Syunya, Kubo Yoshiaki, Araki Mami, Koh Miki, Hamamoto Yuji, Tamura Kyoichi, Otsuka Hirota, Yasuda Akiko, Azakami Daigo, Michishita Masaki, Soeta Satoshi	4. 巻 57
2. 論文標題 Big Insulin-like Growth Factor 2?Producing Tumor in a Hypoglycemic Dog	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 432 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985820906897	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 -

1. 著者名 Tani Hiroyuki, Kurita Sena, Miyamoto Ryo, Sawada Harumi, Fujiwara-Igarashi Aki, Michishita Masaki, Azakami Daigo, Hasegawa Daisuke, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 56
2. 論文標題 Nimustine Treatment of 11 Cases of Canine Histiocytic Sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Animal Hospital Association	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5326/JAAHA-MS-6959	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 -

1. 著者名 Katakura Fumihiko, Nishiya Kohei, Wentzel Annelieke S., Hino Erika, Miyamae Jiro, Okano Masaharu, Wiegertjes Geert F., Moritomo Tadaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Paralogs of Common Carp Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Have Different Functions Regarding Development, Trafficking and Activation of Neutrophils	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00255	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 -

1. 著者名 Miyamae J, Yagi H, Sato K, Okano M, Nishiya K, Katakura F, Sakai M, Nakayama T, Moritomo T, Shiina T.	4. 巻 71
2. 論文標題 Evaluation of alloreactive T cells based on the degree of MHC incompatibility using flow cytometric mixed lymphocyte reaction assay in dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunogenetics	6. 最初と最後の頁 635 ~ 645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00251-019-01147-4	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
研究分担者	藤田 道郎 (Michio Fujita) (00238586)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	
研究分担者	山本 一郎 (Ichiro Yamamoto) (00424763)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授 (32669)	
研究分担者	田村 恭一 (Kyoichi Tamura) (00722282)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師 (32669)	
研究分担者	宮前 二郎 (Jiro Miyamae) (40846143)	岡山理科大学・獣医学部・助教 (35302)	

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
---------	---------