

学 位 論 文 要 旨

氏名 酒井 治

題 目 : Fundamental Studies on the Novel Cancer Immunotherapy
for Canine Lymphoid Malignancies
(犬のリンパ系腫瘍に対する新規免疫療法の基礎的検討)

論文要旨 :

犬における腫瘍性疾患は、臨床上重要な疾患であり、さらに近年では人の腫瘍モデルとしての有用性についても注目されている。犬のリンパ腫は、発生頻度の高い造血器系腫瘍であり、標準的な治療法である多剤併用化学療法に対する反応性は比較的良いとされるものの、多くの症例では再発がみられ、また薬剤耐性を発現するため、効果的な新規治療法が必要とされている。

腫瘍に対しては三大療法と呼ばれる外科手術、放射線療法、化学療法が用いられてきた。しかしそれらの治療効果は十分ではなく、医療においては新規の治療法として免疫療法が検討されており、その一部は臨床応用され、高い有効性を示している。獣医療においても、これら新規治療法の研究が進められているが、未だ十分な知見は得られていない。そこで私は、犬の免疫療法への応用を目的とした腫瘍抗原の発現の検討と、養子免疫療法の一つであるキメラ抗原受容体 (CAR) -T 細胞の作成方法の確立を目的とした研究を行った。

第 1 章では、犬の腫瘍における WT1 (Wilms' tumor 1) の発現について検討した。WT1 は人の腫瘍における代表的な腫瘍抗原の一つで、白血病をはじめとして多くの固形がんにおいても過剰に発現していることが示されている。WT1 は小児がんであるウィルムス腫瘍の原因因子として同定されたが、さらに WT1 は人における代表的な腫瘍抗原の中でも最も汎用性が高いと考えられており、腫瘍のモニタリングのためのマーカーや、免疫療法における標的抗原として臨床応用されている。しかし犬の腫瘍における WT1 の発現については明らかになっていないため、免疫組織化学染色を用いて WT1 の発現を検討した。まず、犬の WT1 遺伝子のクローニングおよび塩基配列解析を行い、人およびマウスの WT1 と高い相同性を持つことを確認した。続いて犬の WT1 を過剰発現させた細胞を用いて、抗人 WT1 モノクローナル抗体が犬 WT1 を認識することを確認し、その抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、正常組織では多くの臓器において発現が見られなかったのに対し、リンパ腫組織においては使用した 22 症例全てにおいて WT1 の発現が確認された。このことから、犬の腫瘍においても WT1 が過剰発現しており、有用な腫瘍抗原となる可能性があることが示唆された。

以降の章では、犬の B 細胞性リンパ腫の治療を目的とした、CD20 を標的とする CAR-T 細胞の作製方法の確立を行った。CAR-T 細胞療法は、患者血液から回収した T 細胞を体外で培養し、腫瘍に対する特異性を付加する遺伝子改変を行い、細胞治療として用いる方法である。CAR は、細胞外領域として抗体の抗原認識部位およびスペーサーとして CD8 の一部をもち、細胞

内領域に T 細胞受容体のシグナル伝達部位をもっている。遺伝子改変により CAR を発現させた T 細胞は、特定の抗原を認識し、腫瘍細胞に対する傷害活性を示すことができる。医療においては、CD19 や CD20 を標的とする CAR-T 細胞が、B 細胞性の造血器系腫瘍に非常に高い有効性を示すことが確認されている。CAR-T 細胞の作成は、体外での刺激、培養、遺伝子導入などを含む長期かつ複雑なプロセスであるため、最終的な細胞の性質に大きな影響を与える培養方法について、様々な検討がなされている。しかし、犬における CAR-T 療法についてはまだ報告が少なく、最適な作成条件の検討はなされていない。第 4、5 章では、犬の B 細胞性腫瘍のターゲットとなる分子である CD20 に対する CAR-T 細胞の作製条件の検討と、作製した細胞の評価を行った。レトロウイルスを用いた遺伝子導入方法の検討により、高い効率で遺伝子導入が可能なプロトコルを確立した。作製した CAR-T 細胞の表現型の解析を行い、実際の治療効果に関与するとされているメモリー T 細胞の表現型に特に着目して、各種の培養条件の影響を評価した。その結果、T 細胞の刺激方法として広く用いられている CD3/CD28 および人工抗原提示細胞による刺激では、メモリー T 細胞への影響は見られなかったが、マイトジェンの一つである Concanavalin A (ConA) による刺激や、Akt 阻害剤の添加により、メモリー T 細胞の増加が見られることが明らかとなった。さらに、作成した CAR-T 細胞が犬の B 細胞性リンパ腫細胞株に対して傷害活性を示すことを確認した。

また、今回作成した CAR-T 細胞を検出できる抗体を作成する目的で、マウスおよびラットに CAR 発現細胞を免疫することで、CAR 遺伝子コンストラクトに存在する抗 CD20 抗体の抗原認識部位および犬 CD8 を認識する 2 種類のモノクローナル抗体を樹立した (第 2、3 章)。第 2 章では、抗 CD20-CAR 抗体が CAR 発現細胞の検出用抗体として使用できることを明らかにするとともに、当研究室で別途実施している抗犬 CD20 抗体医薬の検出にも使用可能であることを示した。また第 3 章では、作製した抗犬 CD8 モノクローナル抗体が犬の CD8 だけではなく、猫の CD8 も認識することを明らかにした。さらに本抗体がホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた免疫組織化学染色においても使用可能であることを示した。CD8 の検出は、T 細胞性リンパ腫の表現型解析や固形腫瘍に浸潤する細胞傷害性 T 細胞の検出に非常に重要であるが、これまでホルマリン固定パラフィン包埋組織に用いることができるモノクローナル抗体が存在しなかったことから非常に有用な実験ツールとなることが示唆された。

以上の研究結果から、犬の腫瘍抗原を用いた治療の基礎となる WT1 の有用性について明らかになり、また細胞療法として、犬においても強い細胞傷害活性をもつ CAR-T 細胞の作成が可能であることが示された。今後、実際の犬に対する投与も含めたさらなる検討が進み、犬の腫瘍治療においても CAR-T 療法が一つの有効な選択肢となることが期待される。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	酒井 治
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 水野 拓也
	副 査：山口大学 教授 奥田 優
	副 査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副 査：山口大学 教授 森本 将弘
	副 査：山口大学 准教授 馬場 健司
題 目	Fundamental Studies on the Novel Cancer Immunotherapy for Canine Lymphoid Malignancies (犬のリンパ系腫瘍に対する新規免疫療法の基礎的検討)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>犬における腫瘍性疾患は、臨床上重要な疾患であり、さらに近年では人の腫瘍の自然発症モデルとしての有用性についても注目されている。なかでも犬のリンパ腫は、発生頻度の高い造血器系腫瘍であり、標準的な治療法である多剤併用化学療法に対する反応性は比較的良いとされるものの、多くの症例では再発や薬剤耐性が問題となるため、効果的な新規治療法が必要とされている。腫瘍に対しては、外科手術、放射線療法、化学療法などの三大療法が用いられてきたが、医療においてはさらなる効果を求めて免疫療法が検討されており、その一部は臨床応用され、高い有効性を示している。獣医療においても、これら新規治療法の研究が進められているが、未だ十分な知見は得られていない。そこで申請者は、犬の免疫療法への応用を目的とした腫瘍抗原の発現の検討と、養子免疫療法の一つであるキメラ抗原受容体 (CAR) -T 細胞の作製方法の確立を目的とした研究を行った。</p> <p>第 1 章では、犬の腫瘍における WT1 (Wilms' tumor 1) の発現について検討した。WT1 は人の代表的な腫瘍抗原の一つで、その中でも最も汎用性が高いと考えられていることから、腫瘍のモニタリングのためのマーカーや、免疫療法における標的抗原として臨床応用されている。しかし犬の腫瘍における WT1 の発現については明らかになっていないため、免疫組織化学染色を用いて WT1 の発現を検討した。まず、犬の WT1 遺伝子のクローニング、抗人 WT1 モノクローナル抗体と犬 WT1 との交差反応性の確認を行い、その抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、正常組織では多くの臓器において発現が見られなかったのに対し、リンパ腫組織においては使用した 22 症例全てにおいて WT1 の発現が確認された。このことから、犬の腫瘍においても WT1 が過剰発現しており、有用な腫瘍抗原となる可能性があることが示唆された。</p>	

2,000 字以内

第 4 および 5 章では、犬の B 細胞性リンパ腫の治療を目的とした、CD20 を標的とする CAR-T 細胞の作製条件の検討と、作製した細胞の評価を行った。CAR-T 細胞療法は、患者血液から回収した T 細胞を体外で培養、遺伝子改変を行い、細胞治療として用いる方法である。CAR は、先端に抗原認識部位を持つ人工の受容体であり、遺伝子改変により CAR を発現させた T 細胞は、特定の抗原を認識し、腫瘍細胞に対する傷害活性を示すことができる。医療においては、CD19 や CD20 を標的とする CAR-T 細胞が、B 細胞性の造血器系腫瘍に非常に高い有効性を示すことが確認されている。人の CAR-T 細胞については、有効な細胞製剤を作成するための培養方法について、様々な検討がなされている。しかし、犬における CAR-T 療法についてはまだ報告が少なく、最適な作製条件の検討はなされていない。レトロウイルスを用いた遺伝子導入方法の検討により、高い効率で遺伝子導入が可能なプロトコルを確立した。作製した CAR-T 細胞の表現型の解析を行い、実際の治療効果に関与するとされているメモリー T 細胞の表現型に特に着目して、各種の培養条件の影響を評価した。その結果、T 細胞の刺激方法として広く用いられている CD3/CD28 および人工抗原提示細胞による刺激では、メモリー T 細胞への影響は見られなかったが、マイトジェンの一つである Concanavalin A (ConA) による刺激や、Akt 阻害剤の添加により、メモリー T 細胞の増加が見られることが明らかとなった。さらに、作製した CAR-T 細胞が犬の B 細胞性リンパ腫細胞株に対して傷害活性を示すことを確認した。

また、マウスおよびラットに CAR 発現細胞を免疫することで、第 2 章では CAR 遺伝子コンストラクトに存在する抗 CD20 抗体の抗原認識部位を認識するモノクローナル抗体を、第 3 章では犬 CD8 を認識するモノクローナル抗体を樹立した。第 2 章では、抗 CD20-CAR 抗体が CAR 発現細胞の検出用抗体として使用できることを明らかにするとともに、申請者の研究室で別途実施している抗犬 CD20 抗体医薬の検出にも使用可能であることを示した。また第 3 章では、作製した抗犬 CD8 モノクローナル抗体が犬の CD8 だけではなく、猫の CD8 も認識することを明らかにした。さらに本抗体がホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた免疫組織化学染色においても使用可能であることを示した。CD8 の検出は、T 細胞性リンパ腫の表現型解析や固形腫瘍に浸潤する細胞傷害性 T 細胞の検出に非常に重要であるが、これまでホルマリン固定パラフィン包埋組織に用いることができるモノクローナル抗体が存在しなかったことから非常に有用な実験ツールとなることが示唆された。

以上の研究結果から、犬の腫瘍抗原としての WT1 の有用性について明らかになり、また細胞療法として、犬においても強い細胞傷害活性をもつ CAR-T 細胞の作成が可能であることが示された。今後、実際の犬に対する投与も含めたさらなる検討が進み、犬の腫瘍治療においても CAR-T 療法が一つの有効な選択肢となることが期待される。以上により、審査員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。