

【研究紹介】

組織球肉腫罹患犬における免疫チェックポイント解析

田川 道人¹⁾ 高木 哲²⁾

1) 帯広畜産大学動物医療センター (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地)

2) 北海道大学大学院獣医学研究科 先端獣医療学教室 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9)

はじめに

犬の組織球肉腫はマクロファージおよび間質の樹状細胞を由来とする悪性腫瘍であり、極めて悪性度の高い腫瘍とされる。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、ゴールデンレトリバーが好発犬種とされ、我が国ではウェルシュコーギーペンブロークでの好発が知られている^[1]。治療は腫瘍が局所病変の場合は積極的な外科的切除が推奨されるが、多くは肺やリンパ節、腹腔内臓器への転移が急速に進行し、抗がん剤を用いた全身療法が必須となる。これまでいくつかの抗がん剤治療が本疾患に行われてきたが、いずれも十分な効果は得られておらず、ロムスチン (CCNU) を用いた場合の生存期間中央値は100~120日程度とされ、現時点で有効性の高い治療法は確立されていない^[2]。

免疫チェックポイントとは、主にリンパ球上に発現し免疫を正または負の方向に制御する分子であり、近年ヒト医療において極めて高い注目を集めている。CD28、CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) およびPD-1 (Programmed cell death 1) はリンパ球表面に発現するレセプターであり、抗原提示細胞側に発現するリガンドと結合することでT細胞の活性化を制御する免疫チェックポイント分子である。CD28はT細胞に恒常的に発現しており、抗原提示細胞が発現するCD80もしくはCD86と結合することで、T細胞に活性化のシグナルを伝達する。一方、CTLA-4はCD28と同じCD80/86をリガンドとし、T細胞を抑制する。CTLA-4はCD80/86に対しCD28の数十~数百倍高い結合性を有しており、CTLA-4が発現した場合T細胞は優先的に抑制されることとなる。またPD-1とそのリガンドであるPD-L1の経

路もCTLA-4同様T細胞を抑制する (図1)^[3]。

腫瘍が発生した場合、生体内の免疫機構は腫瘍抗原を認識して腫瘍を攻撃し、アポトーシスを誘導する。この過程の中で腫瘍細胞は様々な機構により免疫を回避し、増大していくとされ、近年の研究により免疫チェックポイント分子が腫瘍の免疫回避に重要な役割を果たすことが明らかとなった。つまり、腫瘍細胞がCTLA-4およびPD-1のリガンドであるCD80/86およびPD-L1を過剰に発現することで宿主の腫瘍免疫を抑制 (疲弊化) している^[3]。それらの結合をブロックすることで生体が本来有している腫瘍への免疫応答を賦活化させる点に着目した免疫チェックポイント阻害剤が開発され、根治切除不能な悪性黒色腫や非小細胞肺癌、尿路系の癌などで臨床試験が行われており、有望な結果が得られている^[4]。

このような背景から、免疫チェックポイント阻害剤は

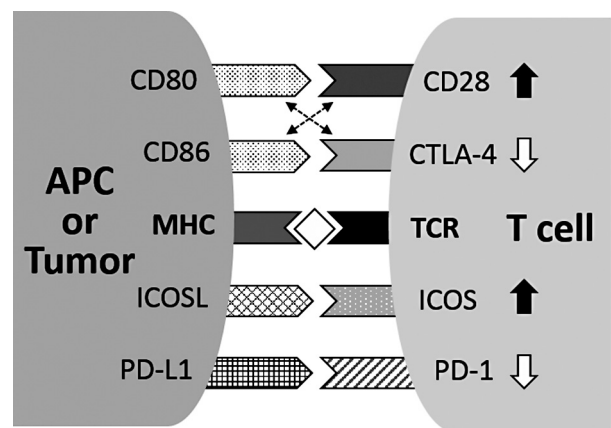


図1. 免疫チェックポイントによるT細胞の活性化制御機構。T cell側の上向き矢印は活性化、下向き矢印は抑制を示しており、どの分子が発現するかでT細胞の活性化は正または負に制御されている。(文献3より引用改変)

連絡責任者：田川 道人 帯広畜産大学動物医療センター
〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地
TEL : 0155-49-5682 E-mail : mtagawa@obihiro.ac.jp

獣医領域においても有効性の高い治療選択になり得る可能性を有しており、さらにマクロファージおよび樹状細胞という抗原提示細胞が由来である組織球肉腫においては宿主の腫瘍免疫に対し免疫チェックポイント分子が何らかの影響を与えている可能性がある。過去の報告^[5]で、CD28およびCTLA-4のリガンドであるCD86のmRNAが組織球肉腫の腫瘍組織中において高発現であることが明らかとなっていることから、組織球肉腫罹患犬における免疫状態を免疫チェックポイントに着目して評価する必要があると考えた。そこで本稿では、ヒトでの免疫チェックポイント研究を簡略に解説するとともに、筆者が北海道大学獣医学部先端獣医療学教室に所属していた時に行った研究について紹介する。

1. 免疫チェックポイント研究の動向

免疫チェックポイントの概要については前述のとおりであるが、CTLA-4とPD-1および宿主免疫との関係性について、ヒトで様々な研究が行われている。CTLA-4に関して、非小細胞肺癌や喉頭の扁平上皮癌患者の末梢血中CD4およびCD8陽性リンパ球においてCTLA-4の発現増加が認められている^[6,7]。また、乳癌および喉頭の扁平上皮癌患者では末梢血中のCTLA-4遺伝子発現が増加しており、とくに喉頭の扁平上皮癌では病期の進行と発現増加に関連がみられている^[8,9]。PD-1に関して、末梢血中CD4陽性PD-1陽性率の高い非小細胞肺癌や前立腺癌患者で生存期間の短縮がみられており^[10,11]、また、いくつかの血液腫瘍患者では病期とPD-1陽性率に関連がみられている^[12]。このように様々な固形癌や血液腫瘍において上記免疫チェックポイントは末梢血液中で発現が亢進しており、進行度、予後との関連が示唆されている。また、それら免疫チェックポイント経路を阻害する抗体薬はすでに臨床応用されており、抗CTLA-4抗体であるIpilimumab（ヤーボイ[®]、小野薬品）は悪性黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、前立腺癌に対して、抗PD-1抗体であるNivolumab（オプジーボ[®]、小野薬品）は悪性黒色腫、非小細胞性肺癌、腎細胞癌に対して適応もしくは臨床試験中である。両薬剤ともに悪性黒色腫に対する臨床研究が盛んであり、単剤投与、標準化学療法との併用等が検討され、いずれにおいても生存期間の延長をもたらす場合が多く、良好な結果が得られている^[13]。免疫チェックポイント阻害剤は腫瘍に対する免疫の疲弊化を解除するという特異的な作用機序から今後も様々な腫瘍性疾患に応用されるものと思われ、既存の治療では治癒の見込めない進行状態であってもそ

れを開示する可能性を有した画期的な治療薬といえる。

2. 犬組織球肉腫における研究について

犬組織球肉腫ではCRPやフィブリノーゲン等の炎症マーカーの上昇が知られており^[14]、腫瘍局所において強い炎症反応が誘起されているものと思われる。免疫チェックポイントであるCTLA-4やPD-1は腫瘍性疾患の他、炎症性疾患においても発現が増加することが知られている。つまり組織球肉腫が引き起こす炎症反応が免疫チェックポイントに影響し、宿主の抗腫瘍免疫の低下を引き起こしている可能性があり、とくに組織球肉腫自体がCD28およびCTLA-4の共通リガンドであるCD86を強く発現していることから免疫チェックポイントの解析はそれら阻害剤の使用の是非を決定する上で重要なファクターになるものと思われる。そこで著者らは組織球肉腫罹患犬の末梢血中免疫状態を評価することを目的とし、以下の検討を行った。

2.1. 材料と方法

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組織球肉腫罹患犬8頭（HS群）、組織球肉腫以外の腫瘍罹患犬10頭（other tumor群）、健常犬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（YKIX302.9/YCATE55.9, AbD Serotec）とともに抗CD28（5B8, Affymetrix）、CTLA-4（ANC152.2, Ansell Corporation）、PD-1（BAF1086, R&D Systems）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- γ 濃度をELISA法（Canine IFN- γ 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。

2.2. 結果

各群の年齢中央値はHS群9.5歳（7 - 12歳）、other tumor群12歳（9 - 15歳）、control群8.5歳（5 - 15歳）であり、群間に有意差は認められなかった。また性差も

群間で差はみられなかった。HS群は4頭が局所性、4頭が播種性であり、other tumor群には悪性黒色腫、扁平上皮癌、肺腺癌、血管肉腫、骨肉腫、移行上皮癌、軟部組織肉腫、肛門嚢腺癌が含まれた(表1)。なお、other tumor群において5頭が採材時に肺、リンパ節、腹腔内臓器などに転移がみられた。

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ともに群間で有意差は認められなかった。一方、HS群(3.20%±1.74%)のCD4陽性細胞におけるCTLA-4陽性率は、control群(1.27%±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%±1.37%)はother tumor群(1.32%±0.82%; P=0.003)、control群(0.62%±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%±12.59%)はcontrol群(69.96%±9.53%; P=0.036)と比較し有意に高いPD-1陽性率であった(図2)。

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±17.3%)は局所性(28.7±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2)。一方、other tumor群では転移のあるもの(2.0±0.4%)がないもの(1.0±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±1.1%vs0.8±0.5%; P=0.060)でCTLA-4陽性率が高い傾向にあった(表

3)。

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

表1. 各群の臨床情報

群 (n)	犬種(n)	年齢*(範囲)	性別(n)	診断 (n、部位)
HS (8)	WC (3)	9.5(7-12)	メス(3)	局所性HS (4)
	FCR (2)		オス(5)	(2、脳:1、肺:1、皮膚)
	その他(3)			播種性HS (4)
Other tumor (10)	BMD (2)	12(9-15)	メス(4)	移行上皮癌(2、膀胱)
	MD (2)		オス(6)	メラノーマ(2、下顎)
	その他(6)			扁平上皮癌(1、下顎) 肺腺癌 (1、肺) 血管肉腫 (1、脾臓) 骨肉腫 (1、下顎) 軟部組織肉腫(1、皮下) 肛門嚢腺癌(1、肛門嚢)
Control (8)	Beagle(2)	8.5(5-15)	メス(1)	
	BMD (2)		オス(7)	
	その他(4)			

HS; 組織球肉腫、WC; ウェルシュコーギーペンブローク、FCR; フラットコートドレトリバー、BMD; バーニーズマウンテンドッグ、MD; ミニチュアダックスフント、*; 中央値

表2. 局所性および播種性組織球肉腫 (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	局所性HS (n=4)	播種性HS (n=4)	P値
CD28	CD4+	97.8±3.0	95.5±4.4	0.471
	CD8+	45.7±8.2	46.5±30.7	0.471
CTLA-4	CD4+	3.1±2.4	3.4±1.0	0.665
	CD8+	4.1±1.1	4.6±1.7	0.665
PD-1	CD4+	28.7±10.2	63.6±17.3	0.061
	CD8+	87.2±7.3	80.5±17.0	0.312

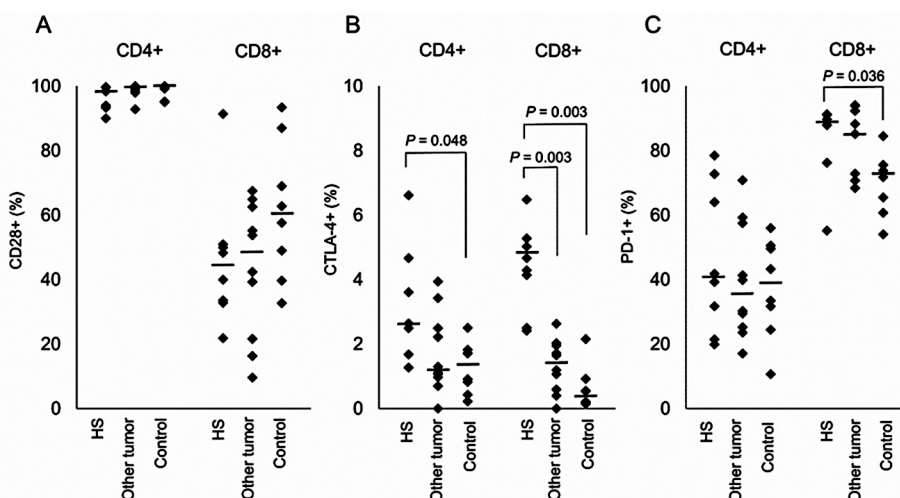


図2. CD4陽性およびCD8陽性細胞における免疫チェックポイント発現率
A: CD28、B: CTLA-4、C: PD-1、HS: 組織球肉腫

表3. 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

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±0.5	97.9±2.9	0.753
	CD8+	46.5±18.7	40.1±25.1	0.835
CTLA-4	CD4+	2.6±1.1	0.8±0.5	0.060
	CD8+	2.4±0.4	1.0±0.5	0.012
PD-1	CD4+	35.9±19.7	43.0±17.0	0.531
	CD8+	79.2±12.8	85.1±7.8	0.401

2.3. 考察

組織球肉腫罹患犬、組織球肉腫以外の腫瘍罹患犬、健康犬で末梢血中の免疫チェックポイント解析を行ったところ、組織球肉腫罹患犬においてCD4陽性細胞、CD8陽性細胞ともにCTLA-4陽性率の有意な上昇がみられた。CTLA-4は、CD28とCD80/86が結合しT細胞が活性化された後に発現が増強する。また、感染症や自己免疫疾患等の炎症反応によってその発現が上昇することが知られている。過去の報告^[14]において、組織球肉腫罹患犬では強い炎症反応が引き起こされていることが明らかとなっており、CTLA-4の発現率に影響を与えた可能性がある。CTLA-4は制御性T細胞 (Treg) において恒常的に発現、機能的に重要な役割を有している^[8]。組織球肉腫罹患犬におけるCTLA-4の増加はTregの増加と関連している可能性があり、今後さらなる検討が必要である。また、局所性および播種性組織球肉腫ではCTLA-4の発現に明らかな差は認められなかった。組織球肉腫は局所性、播種性に関わらず特異的にCTLA-4の発現を高めているとも考えられる。一方、組織球肉腫以外の腫瘍においては、CD8陽性細胞でのCTLA-4の発現は転移の有無と関連していた。これは転移症例における免疫の疲弊化と関連しているものと思われる、CTLA-4の発現は様々な腫瘍での予後因子となり得る可能性を有しており、症例数を増やした更なる検討が必要である。

PD-1について、組織球肉腫罹患犬ではCD8陽性細胞において健康犬と比較し有意に高いPD-1陽性率であった。CD8陽性細胞におけるPD-1の発現はIL-10やIL-6と関連しているとされる^[15]。しかしながら、犬の組織球肉腫を用いた検討ではそれらのサイトカインに有意な変化はみられていない^[14]。組織球肉腫罹患犬におけるPD-1発現の詳細な機序は不明であるが、組織球肉腫細胞株においてPD-1のリガンドであるPD-L1の高発現が認められており^[16]、PD-1/PD-L1経路の阻害は犬組織球肉腫における新たな治療戦略となる可能性を有している。

IFN- γ については、各群間で有意な差を認めなかった

ものの、組織球肉腫罹患犬はその他の腫瘍群と比較し低値であり健康犬と同等であった。*in vitro*において、CTLA-4の阻害はIFN- γ の産生を亢進し、またPD-1陽性細胞ではIFN- γ の産生が低下することが報告されている^[15]。組織球肉腫におけるCTLA-4、PD-1の高発現がIFN- γ の産生低下をもたらした可能性が考えられた。

3. まとめと今後の展望

本研究により、犬組織球肉腫の末梢血中リンパ球においてCTLA-4およびPD-1の発現上昇が明らかとなった。これは組織球肉腫罹患犬における抗腫瘍免疫の低下を示唆するものであり、今後それら免疫チェックポイントに対する阻害薬を用いた新規治療法開発の足掛かりになるものと思われる。ごく最近、抗炎症薬の使用が組織球肉腫の発生リスクの低下と関連がみられることが報告された^[17]。先に示したように、組織球肉腫では強い炎症が引き起こされることがわかっており、“炎症”をどのように制御していくかが今後の課題であると思われる。

疲弊化した腫瘍免疫の再活性化をコンセプトとしている免疫チェックポイント阻害療法は、多くの腫瘍で効果を発揮しているが、いくつかの問題点も抱えている。ひとつはその副作用であり、30%前後の患者で高い毒性を示したことが報告されている^[18]。多くは免疫抑制の解除による自己免疫反応と考えられ、大腸炎、皮膚炎、肝炎、甲状腺炎、下垂体炎、糖尿病などが発生する。他の問題点として薬剤自体の価格がある。抗体薬であることから開発、製造に多くの費用がかかり、現在のヒト医療における薬価設定で獣医療に応用することは現実的ではない。また、人体薬を犬猫に直接用いることは異種蛋白に対する抗体産生を誘起し、効果の減弱のみならず自らの免疫チェックポイント分子に対する自己抗体が産生される可能性がある。現在、獣医療においても免疫チェックポイント阻害剤の研究、開発が進められており、近い将来使用可能になるものと思われる。

今回紹介させていただいた研究内容は、筆者が北海道大学獣医学部先端獣医療学教室に所属していた際に行ったものです。多大なご指導を賜りました北海道大学獣医学部感染症学教室の今内覚准教授、前川直也先生に深謝を申し上げます。また、ここまで読んでくださった皆様にも感謝を申し上げます。

本研究はJSPS科研費 JP2645042004の助成を受けたものです。

引用文献

- [1] Tagawa M, Maekawa N, Konnai S, Takagi S: Evaluation of costimulatory molecules in peripheral blood lymphocytes of canine patients with histiocytic sarcoma, *PLoS One*, 11, e0150030 (2016)
- [2] Rassnick KM, Moore AS, Russell DS, Northrup NC, Kristal O, Bailey DB, Flory AB, Kiselow MA, Intile JL: Phase II, open-label trial of single-agent CCNU in dogs with previously untreated histiocytic sarcoma, *J Vet Intern Med*, 24, 1528-1531 (2010)
- [3] Leung J, Suh WK: The CD28-B7 family in anti-tumor immunity: Emerging concepts in cancer immunotherapy, *Immune Netw*, 14, 265-276 (2014)
- [4] Capece D, Verzella D, Fischietti M, Zazzeroni F, Alesse E: Targeting costimulatory molecules to improve antitumor immunity, *J Biomed Biotechnol*, 2012, Article ID 926321 (2012)
- [5] Yamazaki H, Takagi S, Oh N, Hoshino Y, Hosoya K, Okumura M: Comparative analysis of mRNA expression of surface antigens between histiocytic and nonhistiocytic sarcoma in dogs, *J Vet Intern Med*, 28, 204-210 (2014)
- [6] Erfani N, Mehrabadi SM, Ghayumi MA, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Ghaderi A, Amani D: Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), *Lung Cancer*, 77, 306-311 (2012)
- [7] Erfani N, Khademi B, Haghshenas MR, Mojtahedi Z, Khademi B, Ghaderi A: Intracellular CTLA4 and regulatory T cells in patients with laryngeal squamous cell carcinoma, *Immunol Invest*, 42, 81-90 (2013)
- [8] Jaberipour M, Habibagahi M, Hosseini A, Habibabad SR, Talei A, Ghaderi A: Increased CTLA-4 and FOXP3 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of patients with breast cancer, *Pathol Oncol Res*, 16, 547-551 (2010)
- [9] Starska K, Forma E, Lewy-Trenda I, Woś J, Papięż P, Mochocki M, Morawski P, Kopta R, Bryś M: Expression of CTLA-4 and Foxp3 in peripheral blood T cells of patients with squamous cell laryngeal carcinoma, *Contemp Oncol (Pozn)*, 17, 370-377 (2013)
- [10] Waki K, Yamada T, Yoshiyama K, Terazaki Y, Sakamoto S, Matsueda S, Komatsu N, Sugawara S, Takamori S, Itoh K, Yamada A: PD-1 expression on peripheral blood T-cell subsets correlates with prognosis in non-small cell lung cancer, *Cancer Sci*, 105, 1229-1235 (2014)
- [11] Kwek SS, Lewis J, Zhang L, Weinberg V, Greaney SK, Harzstark AL, Lin AM, Ryan CJ, Small EJ, Fong L: Preexisting levels of CD4 T cells expressing PD-1 are related to overall survival in prostate cancer patients treated with Ipilimumab, *Cancer Immunol Res*, 3, 1008-1016 (2015)
- [12] Rusak M, Eljaszewicz A, Bołkun L, Łuksza E, Łapuć I, Piszcz J, Singh P, Dąbrowska M, Bodzenta-Łukaszyk A, Kłoczko J, Moniuszko M: Prognostic significance of PD-1 expression on peripheral blood CD4+ T cells in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia, *Pol Arch Med Wewn*, 125, 553-559 (2015)
- [13] Tsai KK, Daud AI: Nivolumab plus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma, *J Hematol Oncol*, 8, 123 (2015)
- [14] Nikolic Nielsen L, Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT: Monocyte chemotactic protein-1 and other inflammatory parameters in Bernese Mountain dogs with disseminated histiocytic sarcoma, *Vet J*, 198, 424-428 (2013)
- [15] Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Osaki T, Ikeguchi M: Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer, *J Surg Oncol*, 107, 517-522 (2013)
- [16] Hartley G, Faulhaber E, Caldwell A, Coy J, Kurihara J, Guth A, Regan D, Dow S: Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression, *Vet Comp Oncol*. Feb 4 (2016) [Epub ahead of print]
- [17] Ruple A, Morley PS: Risk factors associated with development of histiocytic sarcoma in Bernese mountain dogs, *J Vet Intern Med*, May 10 (2016) [Epub ahead of print]
- [18] Villadolid J, Amin A: Immune checkpoint inhibitors in clinical practice: update on management of immune-related toxicities, *Transl Lung Cancer Res*, 4, 560-575 (2015)