



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on Immunoinhibitory Receptor and Viral Antigen Expression in Bovine Leukemia Virus Infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	池淵, 良洋
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11157号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54641
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryoyo_Ikebuchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：池 渕 良 洋

学位論文題名

Studies on Immunoinhibitory Receptor and Viral Antigen Expression in Bovine Leukemia Virus Infection

（ウシ白血病ウイルス感染症における
免疫抑制受容体及びウイルス抗原の発現に関する研究）

ウシ白血病ウイルス（BLV）は、感染牛の一部に B 細胞性リンパ腫である牛白血病を引き起こす。また、一部の BLV 感染牛では B 細胞が異常に増殖するリンパ球増多症を呈し、免疫抑制状態に陥ることが示唆されており、このことが BLV 感染牛における生産効率の低下や病態進行の原因であると考えられている。本疾病による経済的損害が大きいことより、防御法や治療法の確立が待たれているが、現在有効なワクチンまたは治療法は存在しない。本研究では、BLV 感染牛における免疫抑制状態の原因が免疫担当細胞の疲弊化に關与する免疫抑制受容体 programmed death-1（PD-1）とそのリガンド PD-ligand 1（PD-L1）であると予測し、新規治療法の開発に向けて種々の解析を行った。また、未解明である BLV 抗原発現機構を解明するために、BLV 抗原発現 B 細胞と未発現 B 細胞の機能解析を行った。

第 1 章：様々なウイルス感染症や腫瘍疾患において、PD-L1 の発現増加が病原体の免疫回避機構の一つであることが明らかにされている。BLV 感染牛における PD-L1 発現をフローサイトメトリー法にて解析を行った結果、病態が進行した BLV 感染牛および牛白血病発症牛の末梢血において、PD-L1⁺ B 細胞の増加が認められ、その増加は病態進行と正の相関を、*Interferon-gamma*（*IFN-γ*） mRNA の発現量と負の相関を示した。

第 2 章：PD-1 と PD-L1 の結合を抗体や組換え体により阻害することで、疲弊化 T 細胞の再活性化を促すことが知られており、本抗体を難治性感染症や腫瘍疾患の治療法へ応用する研究が盛んに行われている。しかし、PD-L1 は抗体により架橋されることで抑制性シグナルを発生する可能性が示唆されているが、その詳細は不明である。そこで、PD-1 にウシ IgG の Fc 部位を融合させた PD-1-Ig および抗ウシ PD-L1 モノクローナル抗体を作製し、これらの存在下で PD-L1 発現細胞を培養した場合の細胞死誘導、サイトカイン産生能及び細胞増殖への影響を検討した。PD-1-Ig あるいは抗 PD-L1 抗体存在下で、PD-L1 過剰発現細胞株を培養した場合には、PD-L1 発現細胞に死細胞の増加が認められた。リンパ球を培養した場合では、抗 PD-L1 抗体の添加によりサイトカイン産生の増加が認められたが、一方

で PD-1-Ig の添加により PD-L1 陽性 B 細胞の細胞死が誘導され、さらにサイトカイン産生や細胞増殖能の低下が確認された。

第 3 章：PD-1 は T 細胞表面に発現しており、PD-L1 が結合することで T 細胞の疲弊化を引き起こす。慢性感染を引き起こす微生物や腫瘍の抗原に特異的な T 細胞において、PD-1 の発現が増加することが明らかにされている。そこで、抗ウシ PD-1 モノクローナル抗体を作製し、BLV 感染牛における PD-1 発現量を測定して、さらに抗ウシ PD-1 抗体存在下での免疫応答の変化を検討した。その結果、牛白血病発症牛の T 細胞において高い PD-1 発現が認められた。また、抗 PD-1 抗体添加により、リンパ球の IFN- γ の産生量や増殖能が増加し、B 細胞の活性やウイルス抗原の発現量が低下した。

第 4 章：BLV は B 細胞に感染すると宿主ゲノムにプロウイルスとして組み込まれるが、感染牛のリンパ球や血清中に BLV 粒子及び抗原はほとんど検出されない。一方、感染牛由来リンパ球を数時間培養すると、一部の B 細胞が BLV 抗原を発現するが、その詳細な分子機構は不明である。そこで、BLV 感染 B 細胞を用いて詳細に解析した結果、病態の進行に伴い増加する IgM^{high} B 細胞は、IgM^{low} B 細胞よりも BLV 抗原を発現しやすい細胞群であることが明らかとなった。これら両細胞群は同様のプロウイルス感染率を示した。次に、IgM^{high} B 細胞と IgM^{low} B 細胞の機能解析及びマイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、IgM^{low} B 細胞では、T 細胞性免疫を抑制する PD-L1、ウイルス由来癌遺伝子 *Tax/Rex* mRNA 及び数種類の前癌遺伝子の発現が高かった。また、14 頭の BLV 感染牛由来 B 細胞リンパ腫の主要な細胞群は、IgM^{low} または IgM⁺ B 細胞であり、IgM^{high} B 細胞はほとんど存在しなかった。

本研究により、IgM^{high} B 細胞は BLV 抗原をよく発現する細胞群、IgM^{low} B 細胞は抗原を発現しにくいと同時に腫瘍細胞を発生する可能性が高い細胞群であることが示された。今後、この結果を用いた BLV の体内伝播機構や牛白血病発症機構の解明が期待される。また、PD-1/PD-L1 が BLV 感染症に起因する免疫抑制及び病態進行に関与していることが示され、新たに作製した抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体が BLV 感染牛の免疫抑制を再活性化することが示唆された。今後、本抗体を基にした BLV 感染症に対する新規治療法やワクチンの開発が期待される。