



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：池 渕 良 洋

審査委員	主査 教授	大 橋 和 彦
	副査 教授	堀 内 基 広
	副査 教授	鈴 木 定 彦
	副査 准教授	今 内 覚

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や治療法は存在しない。そこで、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関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解析を行った。また、未解明である BLV 抗原の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。

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知られている。また PD-L1 と PD-1 の結合を抗体などで阻害することで、疲弊化 T 細胞の再活性化を促すことが知られており、難治性感染症や腫瘍疾患の治療法へ応用する研究が行われている。そこで最初に、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した。その結果、病態が進行した BLV 感染牛や牛白血病発症牛の末梢血では、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。次に 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サイトカイン産生能や細胞増殖への影響を検討した。PD-1-Ig または抗 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。またリンパ球を培養した場合には、抗 PD-L1 抗体の添加により、サイトカイン産生の増加が観られたが、

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

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。そこで本研究では、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、また抗 PD-1 抗体の添加により、リンパ球の IFN- γ の産生量や増殖能が増加し、細胞の活性やウイルス抗原の発現量が低下した。

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。しかしこれらのリンパ球を数時間培養すると、一部の B 細胞が BLV 抗原を発現するようになるが、その詳細な分子機構は不明である。そこで、BLV 感染 B 細胞のより詳細な性状を解析した。その結果、病態の進行に伴い増加する IgM^{high} B 細胞は、プロウイルス量では差が観られなかったが、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示された。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 及びいくつかの前癌遺伝子の発現が高いことが判明した。また、野外で採取した 14 頭の BLV 感染牛由来 B 細胞リンパ腫での主要な細胞群は、IgM^{low} または IgM^{high} 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、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、さらに BLV の体内伝播機構や牛白血病発症機構における IgM^{high} B 細胞群や IgM^{low} B 細胞群の役割が明らかとなった。また、新たに作製した抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体が免疫抑制を解除して、BLV に対する免疫応答を再活性化することが明らかとなり、BLV 感染症の治療法やワクチン開発へ応用可能であることを示した。以上の研究業績は、BLV 感染症の病態の分子機序の解明および新規防除法の開発に大きく貢献するものとして高く評価される。よって、審査員一同は、上記学位提出者池渕良洋氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。