HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on T-cell exhaustion mediated by immunoinhibitory receptors in chronic infections in cattle [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	岡川, 朋弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12173号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62081
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Okagawa_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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：岡　川　朋　弘

審査委員

主査　教授　大　橋　和　彦
副査　教授　鈴　木　定　彦
副査　教授　迫　田　義　博
副査　准教授　今　内　覚

学位論文題名

Studies on T-cell exhaustion mediated by immunoinhibitory receptors in chronic infections in cattle

（牛の慢性感染症における免疫抑制受容体を介したT細胞の疲弊化に関する研究）

慢性感染症では，多くの病原体が細胞性免疫の中心を担うT細胞を機能的に疲弊化させることで，宿主の免疫応答を回避している。T細胞の疲弊化は，免疫抑制受容体であるprogrammed death 1 (PD-1)，lymphocyte activation gene 3 (LAG-3)，T-cell immunoglobulin and mucin domain 3 (TIM-3)などが過剰発現することで引き起こされ，T細胞の機能が抑制される。一方で，免疫抑制受容体とそのリガンドとの結合を特異的抗体により阻害すると，疲弊化T細胞が再活性化され，エフェクター機能を回復できることも知られている。そのため免疫抑制因子に対する特異抗体の慢性感染症治療への応用が試みられている。そこで本研究では，ウシの慢性感染症を対象として，各感染症の病態進行に及ぼす免疫抑制受容体の役割を解析し，さらにPD-1とLAG-3に特異的な治療用抗体を樹立し，ウシの慢性感染症に対する臨床応用を目指して，その治療効果を検討した。

第1章では，ヨーネ菌(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)の持続感染牛モデルを用いて，PD-1やLAG-3の発現および機能解析を行った。PD-1は腸間膜リンパ節の$CD8^+$T細胞で，LAG-3は末梢血中の$CD4^+$および$CD8^+$T細胞で発現量が上昇していることを示した。また主な感染細胞であるマクロファージで，PD-1やLAG-3のリガンドであるPD-ligand 1（PD-L1）やMHCクラスII分子の発現が認められた。さらに，リンパ球に抗LAG-3抗体を添加してリガンドとの結合を阻害すると，ヨーネ菌特異的$CD4^+$および$CD8^+$T細胞が活性化され，インターフェロン-γ（IFN-γ）産生量が増強された。これらの結果は，LAG-3がヨーネ菌特異的T細胞の疲弊化に関与しており，ヨーネ病の発症を予防する新たな治療標的となりうることを示した。

第2章では，急性感染期での抗原特異的$CD4^+$T細胞の疲弊化が知られている*Anaplasma marginale*感染におけるPD-1およびLAG-3の発現動態に着目し，抗原特異的T細胞の疲弊化を引き起こす分子機序の解明を試みた。*A. marginale*外膜タンパク質を免疫して抗原特異的なT細胞応答を誘導した後に，同菌株を接種したウシでは，アナプラズマ特異的T細胞応答が感染後5週以降に著しく抑制された。感染後

CD4$^+$またはCD8$^+$T細胞中のPD-1$^+$LAG-3$^+$T細胞（重度に疲弊化）が増加し，感染5週目でピークに達した。また抗PD-1抗体，抗PD-L1抗体，および抗LAG-3抗体の添加によりアナプラズマ特異的なT細胞応答が再活性化された。以上より，*A. marginale*の急性感染期ではCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞にPD-1とLAG-3が共発現することで，急激な特異的T細胞応答の疲弊化を引き起こすことが明らかとなった。

第3章では，牛白血病ウイルス(BLV)感染症において，免疫抑制受容体PD-1, LAG-3, およびTIM-3の発現解析を行い，それらの病態進行に及ぼす影響を調べた。牛白血病発症牛のCD4$^+$およびCD8$^+$T細胞中にはPD-1$^+$LAG-3$^+$疲弊化T細胞が多く認められ，また*Tim-3* mRNAはBLV感染に伴い，CD4$^+$およびCD8$^+$T細胞での発現が上昇していた。さらにリンパ球におけるPD-1およびLAG-3の結合阻害を行うと，T細胞からのIFN-γ産生量が増強された。以上より，牛白血病発症牛では PD-1$^+$LAG-3$^+$T細胞が増加することで，T細胞応答が疲弊化することが示され，BLV感染症の病態進行の過程には別の免疫抑制受容体TIM-3も関与することが示唆された。

第1〜3章より，種々の免疫抑制受容体がヨーネ病，アナプラズマ病，および牛白血病の病態進行に関与することが示されたので第4章では，ウシの慢性感染症に対する新規制御法を開発することを目的として，治療用抗PD-1抗体および治療用抗LAG-3抗体を新たに樹立した。樹立した治療用抗PD-1抗体は，抗PD-1ラット抗体と同程度の結合親和性と結合阻害活性を有していた。また，治療用抗LAG-3抗体も抗LAG-3ラット抗体と同程度の結合性を示した。BLV感染牛における治療用抗PD-1抗体の臨床試験を実施したところ，抗体投与後にBLV特異的CD4$^+$T細胞を中心としたT細胞機能の活性化が認められ，リンパ球中のBLVプロウイルス量が顕著に低下した。以上より，治療用抗PD-1抗体は，BLV感染症の病態進行を遅らせる新規制御法となりうる可能性が示された。

本研究は，T細胞の疲弊化がウシの慢性感染症に共通して認められる特徴であり，主にPD-1やLAG-3の発現上昇により引き起こされることや，PD-1やLAG-3とそのリガンドとの結合を抗体によって阻害することで抗原特異的T細胞応答を再活性化できることを明らかにしたものであり，免疫抑制受容体に対する抗体医薬を用いたウシ慢性感染症の新規制御法の確立に向けて有用な知見を提供している。

よって，審査委員一同は，上記学位論文提出者岡川朋弘氏の学位論文は，北海道大学大学院獣医学研究科規程第６条の規定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。