

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380176

研究課題名(和文) マレック病ウイルスによる免疫抑制機構の解明とその免疫増強アジュバントへの応用

研究課題名(英文) Studies on the immunoinhibitory mechanisms of Marek's disease virus and its application for adjuvant

研究代表者

大橋 和彦(OHASHI, KAZUHIKO)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：90250498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：Programmed death 1 (PD-1)レセプターとProgrammed death ligands (PD-L1およびPD-L2)は、難治性感染症や腫瘍において、病原体や腫瘍細胞の免疫抑制機構に役割を果たすことが知られている。本研究により、鶏においても、他の動物と同様に、PD-1およびPD-L1およびPD-L2が免疫抑制能を有することが示された。そしてマレック病ウイルス感染鶏では、PD-1およびPD-L1およびPD-L2が発現しており、特に腫瘍病変部でPD-1およびPD-L2が腫瘍の免疫回避に関与して、マレック病の病態進行に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The programmed death 1 (PD-1) receptor and its ligands, programmed death ligand 1 (PD-L1) and 2 (PD-L2) are known to have an immunoinhibitory function which contribute to the pathogenesis of chronic infections and neoplastic diseases via the PD-1/PD-L pathway. In this study, it has been shown that chicken PD-1 and PD-L1/PD-L2 also have an immunoinhibitory function, such as inhibition of cytokine production. The expressions of PD-1 and PD-L2 were significantly higher in the spleens of infected chickens in the latent phase and in tumor lesions caused by Marek's disease virus (MDV). These results suggest that chicken PD-1/PD-L2 pathway is involved in the establishment of latency and tumor formation by MDV.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：マレック病 マレック病ウイルス 免疫抑制 PD-1

1. 研究開始当初の背景

マレック病ウイルス(MDV)は鶏に悪性リンパ腫を引き起こし、養鶏業界に甚大な被害をもたらしてきたが、非病原性 MDV をワクチンとして用いることで、現在ではほぼ制圧されている。しかし依然 MDV の病態形成機構・ワクチンの防御機構については解明されていない。また近年、世界各地でワクチン接種鶏でもワクチンブレイクが発生し、野外における MDV の強毒化が報告されている。以上から今後、現行のワクチンが効力を失う可能性があり、新規防除法を樹立することが急務となっている。さらに強毒型 MDV の致死率は 30~40% 程度であるが、MDV はワクチン接種の有無に関わらず、生涯宿主に持続感染し、感染鶏に重度の免疫抑制を引き起こす。MDV 感染による免疫抑制は、細菌感染症やコクシジウム症など種々の疾病を増悪する因子として、またワクチンによる疾病制御効果の抑制など間接的な被害も大きく、マレック病(MD)の予防は、他の疾病の制御にも重要である。鶏に免疫抑制を引き起こす感染症は、MD の他にも、伝染性ファブリシウス嚢病による液性免疫の抑制や、鶏貧血ウイルス病による T 細胞機能の抑制などがあり、いずれも不顕性持続感染の場合でも宿主を免疫抑制状態にするが、その免疫抑制誘導機序には不明な点も多い。

近年、難治性持続感染症において、ウイルス感染細胞が兼ね備える免疫回避機構が免疫抑制を引き起こしていることが明らかとなってきた。即ち、病原体に対して本来防御作用を担う免疫担当細胞が、生体内に多く存在するにもかかわらず、防御効果を発揮しない状態(疲弊化)にあることが判明した。そしてその機序に関わる因子として、Programmed death 1 (PD-1) レセプターと Programmed death ligand 1 (PD-L1) が同定されている。PD-L1 は、感染細胞でその発現が亢進して、感染に対して活性化した免疫担当細胞上の PD-1 と結合する。その結果、本来、感染細胞の排除のために作用する免疫担当細胞を休眠状態に陥れる。さらに PD-1/PD-L1 の他にも、同様の免疫抑制因子として CTLA-4 や LAG-3 などが報告され、多くの宿主因子が免疫抑制に関与することが判ってきた。

しかし、同時にこのような免疫担当細胞の疲弊化は可逆的であることも明らかになっており、免疫担当細胞上の PD-1 とウイルス感染細胞上の PD-L1 の結合を阻害することで本来の防御効果を回復することが証明されている。以上より、この免疫抑制機序を解除することであれば、免疫担当細胞が従来持つ生体防御効果を回復あるいは増強することが期待される。現在、ヒトの慢性感染症や腫瘍疾患では、この PD-1/PD-L1 システムが注目されて多くの研究が進められているが、鶏等の産業動物では、免疫抑制因子相同遺伝子の情報が報告されているのみで、その機能は明らかにされていない。

そこで、鶏において、これらの免疫抑制因

子の機能を明らかにして、さらに免疫抑制機序を解除することが可能になれば、MD のみならず、未だ多くのワクチン実用化が発展途上である家畜の疾病制御や、環境ストレスなど多くの免疫抑制の誘導要因を克服しうる新規防除法の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、宿主に免疫抑制を引き起こす MD において、各種免疫抑制因子(PD-1/PD-L1 など)の発現動態を解析して、それら因子の機能・役割を解明する。さらに免疫増強アジュバント開発への応用を目的として、これらの免疫抑制因子を阻害することで鶏に免疫抑制からの回復および免疫増強を賦与できるかどうかを検討する。そして、鶏など産業動物種で広く応用可能であり、かつワクチンが開発されていない疾病等にも応用可能な、免疫抑制解除による非特異的新規感染症防除法の開発に向けた研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

鶏 PD-1 および PD-L1 遺伝子情報を基に樹立した定量的 Real-time PCR 法により、MD を始め、種々の感染症における PD-1 および PD-L1 遺伝子発現の経時的変化を、実験感染鶏を用いて解析した。強毒型 MDV を 1 日齢ヒナや成鶏に感染させ、経時的に血液(末梢血単核球: PBMC)、脾臓などの材料を採取して、PD-1 および PD-L1 遺伝子発現量を定量的 Real-time PCR 法により計測した。これらの検体を用いて PD-1 および PD-L1 の発現レベルと MD における病態形成と免疫抑制との関係を明らかにすることを目的として実施した。さらに MD ワクチン接種鶏を強毒型 MDV で攻撃した場合の PD-1 および PD-L1 遺伝子発現量の変化も検討した。また実験感染鶏や MD を発症した野外鶏から腫瘍病変を採取して、腫瘍細胞あるいは腫瘍浸潤リンパ球などでの免疫抑制因子の詳細な発現解析をレーザーマクロダイセクション法により行った。

さらに MD の病態形成における PD-1/PD-L1 経路の役割を明らかにするために、鶏 PD-1 のもうひとつのリガンドである PD-L2 について、その機能や実験感染鶏における発現を解析した。そして組換え PD-L2 発現株化細胞を作出して、鶏 PBMC や脾臓細胞と *in vitro* において共培養し、Th1 サイトカインである IFN-gamma の発現量を指標にして、PD-L2 の免疫抑制能を検討した。

次に免疫抑制因子の蛋白質レベルでの発現量・機能の解析および、免疫増強アジュバントとしての応用を目指して、鶏 PD-1、PD-L1、PD-L2 を Fc 融合組換えタンパク質として調製して(それぞれ PD-1-Ig、PD-L1-Ig、PD-L2-Ig)、フローサイトメトリー法を用いて、MDV 実験感染鶏由来 PBMC や MD 腫瘍由来細胞株などにおいてそれぞれが結合する分子の解析を行った。また PD-1-Ig 存在下で MD 腫瘍病変部

由来細胞を培養し、PD-1/PD-L 経路阻害試験を行い、PD-1-Ig の MD 腫瘍増殖への影響を検討した。

4. 研究成果

本研究では、鶏に免疫抑制を引き起こすマレック病において、各種免疫抑制因子（PD-1/PD-L など）の発現動態を解析して、それら因子の機能・役割を解明することを目的として実施した。そして、さらに免疫増強アジュバント開発への応用を目的として、これらの免疫抑制因子を阻害することで鶏に免疫抑制からの回復および免疫増強を賦与できるかどうかを検討した。

(1) MDV 感染鶏における免疫抑制因子の発現動態の解析

MDV 実験感染鶏における PD-1 および PD-L (PD-L1 および PD-L2) 遺伝子発現の経時的变化を定量的 Real-time RT-PCR 法により解析した結果、強毒型 MDV 感染鶏において、感染初期では、PBMC において PD-1 の発現が上昇し、潜伏感染期以降では、PD-L の発現が上昇することが示された。さらに感染後期において、感染鶏に観察された腫瘍病変部における PD-1 および PD-L の発現をレーザーマイクロディセクション法により解析したところ、腫瘍において PD-L が優位に発現していることが示された (図 1)。このことは、MD においても腫瘍が PD-L を介して宿主の免疫機構 (抗腫瘍免疫) を抑制している可能性を示唆している。同様に、他の免疫抑制因子 (CTLA-4) についても解析を行った。CTLA-4 も PD-1 同様に、MDV の感染により、発現が上昇することが示されたが、感染個体間で大きな格差がみられた。

前述のように、強毒 MDV 実験感染鶏では PD-1 および PD-L の発現動態が、非感染鶏と比較して変化していたが、MD ワクチン株 (CVI988) 接種後に強毒 MDV で攻撃した鶏群では、PD-1 や PD-L の発現上昇やその持続がほとんど認められなかった。以上の結果より、MD の病態形成・進行およびワクチンによる抗腫瘍効果に、PD-1/PD-L 経路が寄与していることが示唆された。今後より詳細な機序の解析が必要と考えられる。

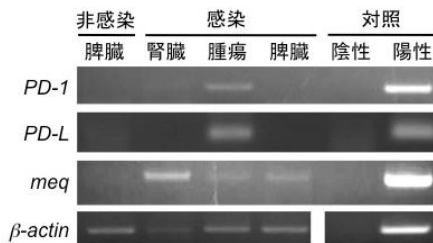


図1. MD腫瘍病変部におけるPD-1およびPD-L1の発現

(2) 鶏 PD-L2 の生物学的機能の解析

鶏 PD-1 および PD-L の生物学的機能の解析は、未だ報告がほとんどない。また鶏 PD-1 には、PD-L1 および PD-L2 があるが、PD-L1

については機能的分子であるかどうかも判明していないが、PD-L2 はリガンドとなり得ると考えられている。そこで、PD-L2 の機能を解析するために、PD-L2 安定発現細胞株を樹立して、サイトカイン産生能への影響などを指標にして免疫抑制能を解析した。

組換え PD-L2 発現株化細胞を作出して、ニワトリの PBMC や脾臓細胞と *in vitro* において共培養したところ、Th1 サイトカインである IFN-gamma の発現量が、対照に比べて低下することが示された。このことは、鶏においても他の動物で報告されているものと同様に、PD-L2 が免疫抑制の誘導に関与していることを示している。

次に MDV 実験感染鶏あるいは MD 野外発症鶏における PD-L2 の発現を real-time RT-PCR で解析した。MDV 実験感染鶏では、潜伏感染期において脾臓で対照に比べて、PD-L2 の発現が上昇していることが示された。さらに MD 発症鶏由来の腫瘍材料を用いて、PD-L2 の発現を解析した結果、PD-L2 は、腫瘍病変中の腫瘍細胞において強く発現していることが示された。以上の結果より、鶏 PD-L2 は、PD-1/PD-L 経路を介して免疫抑制を引き起こすことが示唆され、MD においても、腫瘍細胞に発現した PD-L2 が腫瘍の免疫回避に関与しており、MD の病態進行に重要な役割を果たすことが示唆された。今後、もう一方のリガンドである PD-L1 の機能解析や、PD-L2 の発現上昇に係る分子機構の解明は必要であると考えられる。

(3) 組換え鶏PD-1及びPD-Lの作製と

PD-1/PD-L経路阻害試験

鶏PD-1/PD-L分子の発現をタンパクレベルで解析し、さらにPD-1/PD-L経路による免疫抑制能を解析した。鶏PD-1、PD-L1、PD-L2をFc融合タンパク質として調製して(それぞれPD-1-Ig、PD-L1-Ig、PD-L2-Ig)、フローサイトメトリー法にて、それぞれと結合する分子の発現を解析した結果、マイトージェン刺激により活性化したニワトリ脾細胞では、PD-1、PD-L1、PD-L2と結合する分子の発現が上昇することが示され、ニワトリにおいても炎症反応の収束などにPD-1/PD-L経路が関与する可能性が示唆された。

さらに MD 腫瘍由来細胞株に対しても PD-1-Ig の結合が認められ、MD 腫瘍が PD-L を表出することで宿主免疫応答を回避することが予想された。また PD-L1-Ig および PD-L2-Ig にも結合したことから PD-1 やその他免疫抑制因子を発現している可能性も示唆された。そこで PD-1-Ig 存在下で MD 腫瘍病変部由来細胞を培養し、PD-L からのシグナルを阻害したところ、予想に反して、MD 腫瘍細胞の増殖促進および MDV ゲノム量の増加が認められた (図 2)。PD-L1 が活性化 CD8+T 細胞の存続に必要であるという報告もあり、今回確認された現象は PD-1-Ig が PD-L1 発現細胞へ活性化シグナルをもたらしたことによる

可能性もある。MDVの感染や腫瘍化T細胞に関連する免疫因子は他にも多数あり、今後の検討が必要と考えられる。

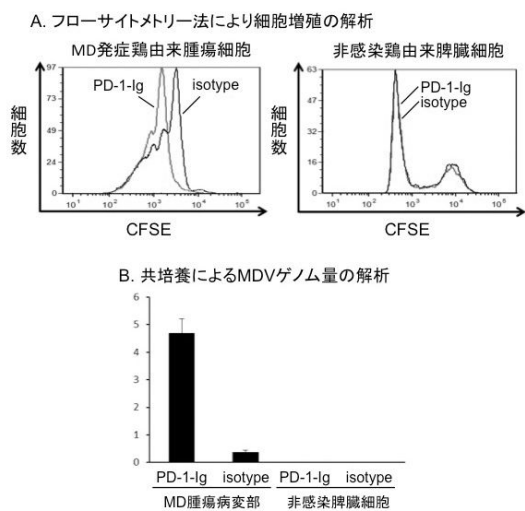


図2. MD発症鶏由来腫瘍細胞を用いたPD-1-Igの機能解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

Matsuyama-Kato, A., Murata, S., Isezaki, M., Takasaki, S., Kano, R., Konnai, S., & Ohashi, K. 2014. Expression analysis of programmed death ligand 2 in tumors caused by the avian oncovirus Marek's disease virus. *Arch. Virol.* 印刷中. 査読有り DOI:10.1007/s00705-014-2021-7.

Ikebuchi, R., Konnai, S., Okagawa, T., Yokoyama, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., & Ohashi, K. 2014. Influence of PD-L1 cross-linking on cell death in PD-L1-expressing cell lines and bovine lymphocytes. *Immunology* 印刷中. 査読有り DOI:10.1111/imm.12243.

Murata, S., Hashiguchi, T., Hayashi, Y., Yamamoto, Y., Matsuyama-Kato, A., Takasaki, S., Isezaki, M., Onuma, M., Konnai, S., & Ohashi, K. 2013. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 16: 137-143. 査読有り DOI:10.1016/j.meegid.2012.12.032.

Konnai, S., Suzuki, S., Shirai, T., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Sunden, Y., Mingala, C. N., Onuma, M., Murata, S., & Ohashi, K. 2013. Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cattle infected with bovine leukemia virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36: 63-69. 査読有り DOI:10.1016/j.cimid.2012.09.005.

Ikebuchi, R., Konnai, S., Okagawa, T., Yokoyama, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., & Ohashi, K. 2013. Blockade

of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Vet. Res.* 44: 59. 査読有り

DOI:10.1186/1297-9716-44-59.

Suzuki, S., Konnai, S., Okagawa, T., Ikebuchi, R., Shirai, T., Sunden, Y., Mingala, C.N., Murata, S., & Ohashi, K. 2013. Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiol. Immunol.* 57: 600-604. 査読有り

DOI:10.1111/j.1348-0421.12073.

Matsuyama-Kato, A., Murata, S., Isezaki, M., Kano, R., Takasaki, S., Ichii, O., Konnai, S., & Ohashi, K. 2012. Molecular characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in chickens infected with Marek's disease virus. *Virol. J.* 9: 94. 査読有り

DOI:10.1186/1743-422X-9-94.

Okagawa, T., Konnai, S., Ikebuchi, R., Suzuki, S., Shirai, T., Sunden, Y., Onuma, M., Murata, S., & Ohashi, K. 2012. Increased bovine Tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection. *Vet. Res.* 43: 45. 査読有り DOI:10.1186/1297-9716-43-45.

Murata, S., Hayashi, Y., Kato, A., Isezaki, M., Takasaki, S., Onuma, M., Osa, Y., Asakawa, M., Konnai, S., & Ohashi, K. 2011. Surveillance of Marek's disease virus in migratory and sedentary birds in Hokkaido, Japan. *Vet. J.* 192: 538-540. 査読有り

DOI:10.1016/j.tvjl.2011.07.006.

Murata, S., Konnai, S., & Ohashi, K. 2011. Analysis of transcriptional activities of the Meq proteins present in highly virulent Marek's disease virus strains, RB1B and Md5. *Virus genes* 43: 66-71. 査読有り

DOI:10.1007/s11262-011-0612-x.

Ikebuchi, R., Konnai, S., Shirai, T., Sunden, Y., Murata, S., Onuma, M., & Ohashi, K. 2011. Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses in vitro via PD-L1 blockade. *Vet. Res.* 42: 103. 査読有り

DOI:10.1186/1297-9716-42-103.

Shirai, T., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Suzuki, S., Sunden, Y., Onuma, M., Murata, S., & Ohashi, K. 2011. Molecular cloning of bovine lymphocyte activation gene-3 and its expression characteristics in bovine leukemia virus-infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 462-467. 査読有り

DOI:10.1016/j.vetimm.2011.08.018.
大橋和彦、松原綾子、村田史郎、今内覚.
2011. マガンなどの野生水禽の疾病抵抗性とマレック病ウイルスの分布. *J. V. M.*,
64: 21-26. 査読無し
<http://iss.ndl.go.jp/books/R100000002-1000000010707-00>

[学会発表](計 7件)

松山あゆ美、村田史郎、伊勢崎政美、今内覚、大橋和彦. マレック病腫瘍病変形成における免疫抑制因子発現機序の検討. 第156回 日本獣医学会学術集会 岐阜大学(岐阜) 2013年9月20日
村田史郎、松山あゆ美、伊勢崎政美、高崎紗蘭、市居修、今内覚、大橋和彦. マレック病感染鶏由来腫瘍病変部における免疫抑制因子PD-1/PD-L1発現の形態学的解析. 第154回 日本獣医学会学術集会 岩手大学(盛岡) 2012年9月16日
高崎紗蘭、村田史郎、松山あゆ美、伊勢崎政美、今内覚、大橋和彦. マレック病ウイルスワクチン接種鶏における免疫抑制因子PD-1およびPD-L1の発現解析. 第154回 日本獣医学会学術集会 岩手大学(盛岡) 2012年9月16日
Murata, S., Hashiguchi, T., Hayashi, Y., Yamamoto, Y., Kato, A., Takasaki, S., Isezaki, M., Konnai, S., & Ohashi, K. Characterization of Meq proteins from field isolates of Marek's disease virus in Japan. 9th International Symposium on Marek's Disease and Avian Herpesviruses, Berlin, Germany. June 24, 2012.
Matsuyama-Kato, A., Murata, S., Isezaki, M., Kano, R., Takasaki, S., Ichii, O., Konnai, S., & Ohashi, K. Characterization of immunoinhibitory factors PD-1/PD-L1 in chickens infected with Marek's disease virus. 9th International Symposium on Marek's Disease and Avian Herpesviruses, Berlin, Germany. June 24, 2012.
村田史郎、伊勢崎政美、松山あゆ美、高崎紗蘭、今内覚、大橋和彦. マレック病ウイルス強毒株由来 Meq および弱毒株由来 L-Meq による bcl-2 遺伝子発現調節の比較. 第152回 日本獣医学会学術集会 大阪府立大学(堺) 2011年9月20日
Murata, S., Hashiguchi, T., Okada, T., Kano, R., Onuma, M., Konnai, S., & Ohashi, K. Amino acid substitutions or insertion in the Meq proteins could affect their transactivation and transformation abilities. International Union of Microbiological Societies Congress, Sapporo, Japan. September 11, 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI, Kazuhiko)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号: 9 0 2 5 0 4 9 8

(2) 研究分担者

今内 覚 (KONNAI, Satoru)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 4 0 3 9 6 3 0 4

(3) 連携研究者

村田 史郎 (MURATA, Shiro)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号: 1 0 5 7 9 1 6 3