

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850194

研究課題名(和文) マレック病ウイルス新規ワクチンの開発：宿主免疫抑制機構の緩和による効果増強

研究課題名(英文) Development of a novel vaccine to control virulent strains of Marek's disease virus: enhancement of vaccine efficacy by modulating the host immunosuppression pathway

研究代表者

村田 史郎 (Murata, Shiro)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・助教

研究者番号：10579163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年マレック病ウイルスは、野外において病原性の増強が報告されている。そこで、より防御効果の高い新たなワクチン開発を行うために、免疫抑制因子であるPD1とPD-L1の機構に着目した。分泌型PD-1遺伝子を挿入した組換え生ワクチンを作製し、宿主が持つPD1/PD-L1による免疫抑制能を競合的に緩和させ、より強い細胞性免疫が誘導できるワクチン開発を行った。その結果、既存のワクチンと比較して、新規組換えワクチンを接種した鶏由来の末梢血単核球は、MDV抗原に対する高いインターフェロン 産生能を示し、本組換えワクチンがより効果的な細胞性免疫応答を誘導する能力を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Field isolates of Marek's disease virus (MDV) have tended to increase in virulence, and therefore, the development of more effective vaccines would be desirable. To develop a novel vaccine, we focused on the PD1/PD-L1 pathway that contributes to the immune suppression, and reconstituted the recombinant MDVs that carry the soluble-PD1 gene to competitively inhibit the immunosuppression regulated by the endogenous PD1. The recombinant vaccine expressing soluble PD1 induced higher production of interferon in the immune cells from the vaccinated chickens, indicating that this vaccine potentially possesses an ability to induce more effective cell-mediated immunity in chickens.

研究分野：獣医伝染病学

キーワード：マレック病 マレック病ウイルス 組換えワクチン PD1 PD-L1 免疫抑制因子

### 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 (マレック病: MD) を引き起こし、養鶏産業に甚大な被害をもたらしてきた。現在では、弱毒生ワクチンの開発により、MD の発生は激減し概ね制御されている。しかし最近になり、ワクチン接種にも関わらず MD を発症するワクチンブレイクが報告されるようになってきており、今後さらに病原性の強い MDV が出現する可能性は否定できない。そのため、現行のワクチンより効力の高いワクチン開発が急務とされている。

従来から MDV は3つの血清型に分類されており、そのうち非病原性である血清型2と3および血清型1の弱毒株が現在のワクチンとして使用されている。最近では遺伝子組換え技術を用いて、血清型1の強毒株より病原性に関わる遺伝子をノックアウトした組換えワクチンが試作されている。このような試みに加え、MDV の病原性増強に対抗できるワクチンを作製するためには、新たな視点による有効なワクチン開発が求められる。

近年、慢性感染症や腫瘍性疾患の発生には免疫抑制受容体 Programmed death-1 (PD1) とそのリガンドである Programmed death-ligand 1 (PD-L1) が関与することが報告されている。PD1 は、主に T 細胞に発現する受容体で、PD-L1 と結合すると細胞内に抑制性シグナルを送り T 細胞を疲弊化させる。通常、抗原提示細胞が主に PD-L1 を発現し、不適切な免疫応答を調節しているが、様々なウイルス感染細胞や腫瘍細胞にも PD-L1 の発現上昇が報告されており、免疫応答からの回避に関わることが知られている。MDV 感染鶏においても、腫瘍病変部における PD-L1 の発現上昇が認められており、MD の病態形成にも PD1/PD-L1 経路が関連していると考えられている。一方で、PD1 と PD-L1 の結合は可逆的で、抗体等で結合阻害を行うと疲弊化 T 細胞は再活性化し、感染細胞や腫瘍細胞を再び攻撃できるようになる。医学領域ではこの手法を用いた治療法が、臨床治験まで進められている。このような PD1/PD-L1 経路阻害を利用した治療法・予防法の開発は、獣医学領域においても応用可能であると考えられる。

### 2. 研究の目的

病原性が増強した MDV に対抗でき、より効力の高い新規ワクチンを開発するために、PD1 と PD-L1 による免疫抑制機構に着目した。ワクチン自体に PD1 を発現させることで、宿主が持つ PD1/PD-L1 による免疫抑制機構を競合的に緩和させ、より効果的に細胞性免疫を誘導する組換えワクチンの作製を行う。また、作製した組換えワクチンの効果について、現行のワクチンの中で最も効果が高いとされる血清型1弱毒株である CVI988 と比較し、その有効性を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) 新規組換えワクチン作製のため、MDV 強毒株である RB1B ゲノムより *meq* 遺伝子が位置する 2 つのリピート配列 (Terminal Repeat Long (TRL), Internal Repeat Long (IRL)) より IRL をノックアウトした感染性クローンをを用いた (ベルリン自由大学 Dr. Kaufer より分与)。*meq* 遺伝子欠損 MDV は非病原性であるため、残る *meq* 遺伝子を *En Passant* Mutagenesis 法により、ウサギ免疫グロブリンの定常部を鶏 *PD1* 遺伝子細胞外領域に連結させた分泌型 *PD1* 遺伝子 (*PD1-Ig*) または鶏 *PD1* 遺伝子全長に *myc* エピトープタグを連結させた膜発現型 *PD1* 遺伝子 (*PD1-myc*) と置換させた (図1, a)。得られたクローンのうち、*PD1* 遺伝子を持ち、*meq* 遺伝子を持たないクローンを制限酵素断片長多型解析 (RFLP) により選抜し、PCR およびシーケンス解析、さらにサザンブロッティングによる確認を行った。
- (2) 作製した遺伝子改変プラスミドを鶏胎子線維芽細胞 (CEF) ヘリン酸カルシウム法により導入し、組換え MDV を再生させた。ワクチン効果検討のために、vRB-1B (強毒株), vRB-1B\_ΔIRL\_Δ*meq*, vRB-1B\_ΔIRL\_Δ*meq*\_PD1-*myc*, vRB-1B\_ΔIRL\_Δ*meq*\_PD1-*Ig* の4種類の組換え MDV を再生させた (図1, a)。ウイルスを再生させた後、組換え MDV による培養細胞または培養上清中への PD-1 の発現・分泌をウェスタンブロット法により確認した。また、*in vitro* における各組換え MDV とワクチン株 (CVI988) の増殖能をプラークアッセイにより比較した。
- (3) 組換え MDV の *in vivo* における効果を検討するため、感染実験を行った。上記の4種類の組換え MDV に加え、ワクチン株の CVI988、および対照群として PBS を初生ヒナに接種した。接種後8週間、1週毎に末梢血を採取し、リアルタイム PCR 法により生体内におけるウイルス増殖をモニタリングした。
- (4) 各組換え MDV の免疫誘導能の比較を行った。接種後8週目に、上記の各鶏群の血漿中における MDV 抗体価およびインターフェロンγ (IFNγ) 産生量を ELISA 法により計測した。また、同時に末梢血単核球 (PBMC) を採材し、MDV 感染細胞より抽出した抗原を用いた刺激培養を行い、PBMC 培養上清中における IFNγ 産生量を ELISA 法により測定した。

### 4. 研究成果

MDV 強毒株である RB1B 株の完全長ゲノムより IRL を欠損させたクローンをを用いて、新規組換えワクチンの作製を行った。TRL に位置する *meq* 遺伝子を *PD1-Ig* または *PD1-myc* と置換させることで、それぞれ分泌型 PD1

または膜発現型 PD1 をもつ組換え MDV を作製した (図 1, a)。得られたクローンを RFLP によりスクリーニングを行ったところ、いずれも予想される泳動パターンを示した (図 1, b, 矢頭: pRB-1B; 6.2kb, p $\Delta$ meq; 5.4kb, pPD1-myc; 6.3kb, pPD1-Ig; 6.6kb)。また、遺伝子挿入部位について塩基配列解析を行い、予想外の変異が挿入されていないことを確認した。最後に、PD1 遺伝子が目的の位置に挿入されていることをサザンブロッティ

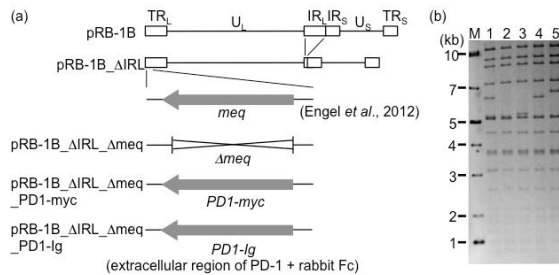


図1. 組換えMDVの作製  
(a) 組換えMDVの模式図, (b) 遺伝子置換の確認(RFLP). 1: pRB-1B, 2: pRB-1B\_ΔIRL, 3: pRB-1B\_ΔIRL\_Δmeq, 4: pRB-1B\_ΔIRL\_Δmeq\_PD1-myc, 5: pRB-1B\_ΔIRL\_Δmeq\_PD1-Ig

ングにより確認した。

次に上記で得られたプラスミドを CEF に導入し、ウイルスを再生させた。再生された組換えウイルスによる PD1 タンパク質の発現を確認したところ、vPD1-myc 感染 CEF および vPD1-Ig 感染 CEF 培養上清中に、それぞれ予想された分子サイズにシグナルが認められた。このことから、vPD1-myc および vPD1-Ig 共に感染細胞において PD1 タンパク質を発現していることが確認された。また、組換え MDV の *in vitro* における増殖能を検討したところ、いずれのウイルスにも差は認められなかった。

CVI988 は強毒株に比べ *in vivo* における増殖能が劣るため、再生した組換えウイルスについても *in vivo* における増殖能を検討した。その結果、強毒株クローンである vRB-1B を接種した鶏群の末梢血においては、接種後 2-3 週に急性感染期、4-5 週に潜伏感染期、6 週以降にウイルスの再活性化が認められ、MDV による病態形成時の一般的なウイルス動態を示した。一方で、組換え MDV および CVI988 を接種した鶏群においては、観察期間を通じて末梢血中にウイルスは検出されなかった。このように、組換え MDV の生体内における増殖能は、強毒株に比べて劣っていた。今後は、組換え MDV の生体内での増殖能が CVI988 に比べて改善されているか検討するため、脾臓等のリンパ組織におけるウイルス量の測定・比較を経時的に行う必要がある。

作製した組換え MDV の効果を比較するため、ウイルス接種後 8 週目の血漿中における抗 MDV 抗体の測定を行った。その結果、対照群に比べ、いずれの鶏群においても有意な抗体価の上昇が認められたが、各組換え MDV 接種鶏群間において差は認められなかった。そのため、抗体産生(液性免疫)誘導については、各ワクチンともほぼ差は無いと考えられ

た。次に組換え MDV 接種後 8 週目の血漿中における IFN $\gamma$  の産生量を計測したところ、いずれの鶏群ともほぼ産生は認められなかったが、PBMC を MDV 抗原で刺激培養し、培養上清中への IFN $\gamma$  の分泌を測定したところ、vPD1-Ig 接種鶏群由来の PBMC においてのみ、IFN $\gamma$  産生の有意な上昇が認められた。このことから、分泌型 PD1 をコードする vPD1-Ig は、効率良く細胞性免疫を誘導し、より強力な 2 次免疫応答を誘導できることが示唆された。今後は、強毒株接種によるワクチン効果判定を行い抗 MD 効果について検討する必要がある。

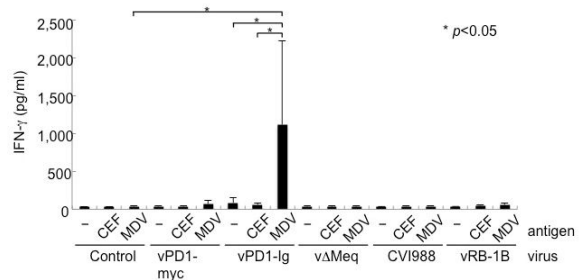


図2. 組換えワクチン接種鶏における抗原特異的IFN- $\gamma$ 応答. -: 抗原未添加, CEF: CEF由来抗原, MDV: MDV感染CEF由来抗原, Control: PBS接種鶏

抗 MD ワクチンの作用として、ワクチン接種による IFN $\gamma$  の産生が重要であることが示されている。そのため、本研究における成果は、既存の抗 MD ワクチンに比べ、より有効性が期待できると考えられる。本ワクチンを将来的に応用するためにも、今後はより詳細なワクチン効果判定や安全性試験などの解析を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計24件)

- 1) Mekata, H., Murata, S., Mingala, C. N., Ohashi, K. & Konnai, S. 2015. Expression of regulatory dendritic cell-related cytokines in cattle experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. J. Vet. Med. Sci. In press. 査読有り.
- 2) Murase, Y., Konnai, S., Yamada, S., Githaka, N., Isezaki, M., Ito, T., Takano, A., Ando, S., Kawabata, H., Murata, S. & Ohashi, K. 2015. An investigation of binding ability of *Ixodes persulcatus* Schulze Salp15 with Lyme disease spirochetes. Insect Biochem. Mol. Biol. 19:59-67. 査読有り.
- 3) Suzuki, S., Konnai, S., Okagawa, T., Ikebuchi, R., Nishimori, A., Kohara, J., Mingala, C. N., Murata, S. & Ohashi K. 2015. Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 15:115-124. 査読有り.
- 4) Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R.,

- Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S. & Ohashi, K. 2014. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN-production from tumor infiltrating cells by PD-L1 blockade. PLOS ONE 9:e98415. 査読有り.
- 5) Nishimori, A., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Nakajima, C., Suzuki, Y., Mingala, C., Murata, S. & Ohashi, K. 2014. Identification and characterization of bovine programmed death-ligand 2. Microbiol. Immunol. 58:388-397. 査読有り.
- 6) Ikebuchi, R., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Nakahara, A., Murata, S. & Ohashi, K. 2014. Differences in cellular function and viral protein expression between IgM<sup>high</sup> and IgM<sup>low</sup> B cells in bovine leukemia virus-infected cattle. J. Gen. Virol. 95:1832-1842. 査読有り.
- 7) Githaka, N., Konnai, S., Bishop, R., Odongo, D., Lekolool, I., Kariuki, E., Gakuya, F., Kamau, L., Isezaki, M., Murata, S. & Ohashi, K. 2014. Identification and sequence characterization of novel Theileria genotypes from the waterbuck (*Kobus defassa*) in a Theileria parva-endemic area in Kenya. Vet. Parasitol. 202:180-193. 査読有り.
- 8) Matsuyama-Kato, A., Murata, S., Isezaki, M., Takasaki, S., Kano, R., Konnai, S. and Ohashi, K. 2014. Expression analysis of programmed death ligand 2 in tumors caused by the avian oncovirus Marek's disease virus. Arch. Virol. 159:2123-2136. 査読有り.
- 9) 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 142:551-561. 査読有り.
- 10) Hidano, A., Konnai, S., Yamada, S., Yoshimura, H., Githaka, N., Isezaki, M., Higuchi, H., Nagahata, H., Ito, T., Takano, A., Ando, S., Kawabata, H., Murata, S. & Ohashi, K. 2014. Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from Ixodes persulcatus Schulze tick. Insect Mol. Biol. 23:466-474. 査読有り.
- 11) 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.
- 12) Ooshiro, M., Konnai, S., Katagiri, Y., Afuso, M., Arakaki, N., Tsuchi, O., Murata, S. & Ohashi, K. 2013. Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. Vet. Rec. 173:527. 査読有り.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Githaka, N., Konnai, S., Skilton, R., Kariuki, E., Kanduma, E., Murata, S. & Ohashi, K. 2013. Genotypic variations in field isolates of Theileria species infecting giraffes (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi* and *Giraffa camelopardalis reticulata*) in Kenya. Parasitol. Int. 62:448-453. 査読有り.
- 16) Imamura, S., Nakamizo, M., Kawanishi, M., Nakajima, N., Yamamoto, K., Uchiyama, M., Hirano, F., Nagai, H., Kijima, M., Ikebuchi, R., Mekata, H., Murata, S., Konnai, S. & Ohashi, K. 2013. Bovine whole-blood culture as a tool for the measurement of endotoxin activities in Gram-negative bacterial vaccines. Vet. Immunol. Immunopathol. 153:153-158. 査読有り.
- 17) 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.
- 18) Mekata, H., Konnai, S., Mingala, C.N., Abes, N.S., Gutierrez, C.A., Dargantes, A.P., Witola, W.H., Inoue, N., Onuma, M., Murata, S. & Ohashi, K. 2013. Isolation, cloning, and pathologic analysis of Trypanosoma evansi field

- isolates. Parasitol. Res. 112:1513-1521. 査読有り.
- 19) Imamura, S., Konnai, S., Yamada, S., Parizi, L. F., Githaka, N., Vaz, I. da S. Jr., Murata, S. & Ohashi, K. 2013. Identification and partial characterization of a gut *Rhipicephalus appendiculatus* cystatin. Ticks Tick Borne Dis. 4:138-144. 査読有り.
- 20) Murase Y., Konnai, S., Githaka, N., Hidano, A., Taylor, K., Ito, T., Takano, A., Ando, S., Kawabata, H., Tsubota, T., Murata, S. & Ohashi, K. 2013. Prevalence of Lyme Borrelia in Ixodes persulcatus Ticks from an Area with a Confirmed Case of Lyme Disease. J. Vet. Med. Sci. 75:215-218. 査読有り.
- 21) Asakawa, M., Nakade, T., Murata, S., Ohashi, K., Osa, Y. & Taniyama, H. 2013. Recent viral disease of Japanese Anatid with a fatal case of Marek's disease in an endangered species, white-fronted goose (*Anser albifrons*). In Ducks: Habitat, Behavior and Diseases, Hambrick, J. and Gammon, L. T. (Eds.), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, New York, pp. 37-47. 査読無し.
- 22) 長雄一, 大越安吾, 平井綱雄, 藤井啓, 大橋和彦, 村田史郎, 遠藤大二, 金子正美, 田中克佳, 浅川光彦. 2014. 野生鳥類-畜産防疫の手引き-牛舎に侵入する野生鳥類. 酪農ジャーナル 67:29-31. 査読無し.
- 23) 西森朝美, 今内覚, 池淵良洋, 岡川朋弘, 村田史郎, 大橋和彦. 2013. 免疫抑制受容体 PD-1 のリガンド PD-L2 の機能的特徴と臨床応用研究. 動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会ニュースレター 7:19-20. 査読無し.
- 24) 今内覚, 村田史郎, 大橋和彦. 2013. 牛白血病ウイルスの感染予防対策. DAIRYMAN 63:42-43. 査読無し.
- [学会発表](計10件)
- 1) Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Nishimori, A., Maekawa, N., Murata, S. & Ohashi, K. Increase of cells expressing PD-1 and PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses in vitro via its blockade. Immunity to Veterinary Pathogens: Informing Vaccine Development. Keystone, Colorado, USA. January 20-25, 2015.
- 2) Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., Kagawa, Y., Murata, S. & Ohashi, K. Expression of PD-L1 on dog tumor cells and enhancement of IFN-g production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. Immunity to Veterinary Pathogens: Informing Vaccine Development. Keystone, Colorado, USA. January 20-25, 2015.
- 3) Nishimori, A., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Nakajima, C., Suzuki, Y., Mingala, C. N., Murata, S. & Ohashi, K. Identification and characterization of bovine programmed death-ligand 2 (PD-L2). Immunity to Veterinary Pathogens: Informing Vaccine Development. Keystone, Colorado, USA. January 20-25, 2015.
- 4) 前川直也, 今内覚, 池淵良洋, 岡川朋弘, 足立真実, 高木哲, 賀川由美子, 村田史郎, 大橋和彦. イヌ免疫抑制因子 PD-1 および PD-L1 を標的とした新規腫瘍免疫療法の検討. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 北海道大学(札幌). 2014 年 9 月 9 日~12 日.
- 5) Murata, S., Matuyama-Kato, A., Isezaki, M., Konnai, S. & Ohashi, K. Expression analysis of programmed death ligand 2 in tumors caused by the avian oncovirus Marek's disease virus. The 39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe International Exhibition Hall, Kobe, Japan. July 19-23, 2014.
- 6) 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構の検討. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜大学(岐阜市). 2013 年 9 月 20 日~22 日.
- 7) 前川直也, 今内覚, 池淵良洋, 岡川朋弘, 足立真実, 高木哲, 賀川由美子, 村田史郎, 大橋和彦. イヌ免疫抑制因子 PD-1 および PD-L1 の同定と新規免疫療法樹立への基礎研究. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜大学(岐阜市). 2013 年 9 月 20 日~22 日.
- 8) 西森朝美, 今内覚, 池淵良洋, 岡川朋弘, 村田史郎, 大橋和彦. ウシ免疫抑制因子 PD-L1 および PD-L2 の組換えタンパク質作製と免疫機能解析. 第 156 回日本獣医学会学術集会. 岐阜大学(岐阜市). 2013 年 9 月 20 日~22 日.
- 9) Ikebuchi, R., Konnai, S., Okagawa, T., Yokoyama, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S. & Ohashi, K. Establishment of anti-bovine PD-1 monoclonal antibody and increase of anti-viral response by PD-1 blockade in bovine leukemia virus-infected cattle. 10<sup>th</sup> International Veterinary Immunology Symposium. Milan, Italy. August 28-September 1, 2013.

- 10) Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T.,  
Murata, S. & Ohashi, K. Regulation of  
T cell exhaustion by blockade of PD-L1  
and LAG-3 in persistently  
lymphocytotic cattle infected with  
bovine leukemia virus. 10<sup>th</sup>  
International Veterinary Immunology  
Symposium. Milan, Italy. August  
28-September 1, 2013.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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：10579163

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし