

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03128

研究課題名(和文) MHC クラスII DRB3*0902保有牛における牛白血病抵抗性機序

研究課題名(英文) Mechanisms of the resistance against disease progression during bovine leukemia virus infection in cattle with DRB3*0902 allele

研究代表者

乗峰 潤三 (Norimine, Junzo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：30627667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：牛伝染性リンパ腫は、レトロウイルス科のウイルス(BLV: bovine leukemia virus)感染によって起こる牛の伝染性疾患である。本研究の目的は、防御免疫に重要な役割を果たすDRB3遺伝子が、BLVのプロウイルス量及び発症の抑制に関連している免疫学的機序を明らかにする事である。この抑制に強く関連性するDRB3*009:02アレルの4量体を作製し、このアレルによって提示されるBLVのT細胞エピトープを同定し、BLV抗原特異的ヘルパーT細胞を解析できた。牛を使った感染実験までは至らなかったが、BLV抗原特異的ヘルパーT細胞がウイルス増殖制御に関与することを証明する今後の研究に繋げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛伝染性リンパ腫ウイルス(BLV)による感染症は、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)による感染症と同様、その病態進行の機序は解明されていない。興味深い事に、BLVに感染してもDRB3*009:02アレルを保有する牛は、病態が進行しない。本研究では、このアレルの4量体(テトラマー)を作製し、これを利用してBLV特異的T細胞エピトープを同定した。牛DRB3*009:02のテトラマーが利用可能になった事で、このアレルが関与する抗原特異的防御免疫が解析できるようになった。特異的防御免疫の機序を明らかにすることは、類似する感染症の病態進行機序の解明そして治療法開発へつながることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Enzootic bovine leukosis is an infectious disease caused by infection of bovine leukemia virus (BLV) belonging to Retroviridae family. Purpose of this study is to understand immunological mechanisms in which DRB3 genes have been thought to play a critical role for a protective immunity and are associated with reduction of proviral load and resistance against disease progression. Among DRB3 genes, the DRB3*009:02 allele is so far most strongly associated with the protection and its tetramer was therefore generated. The epitope mapping method using this tetramer have identified several BLV-specific T cell epitopes and made possible to analyze BLV-specific helper T cells. Although experimental infection using cattle have not been achieved by the time, the tetramer generated in this study have greatly enhanced the future opportunity to clarify the mechanisms.

研究分野：感染症免疫学

キーワード：牛MHCクラスII テトラマー ヘルパーT細胞 CD4+T細胞 牛白血病 牛伝染性リンパ腫 プロウイルス量 病態進行

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫ウイルス(bovine leukemia virus: BLV)は、ヒト T リンパ球向性ウイルスと近縁のレトロウイルスである。これらのレトロウイルス感染症における病態進行の機序はまだわかっておらず、未だ治療法もワクチンも無い。病態進行において共通するのは、感染個体間で病態進行が異なることである。BLV 感染においては、この病態進行が MHC クラス II DRB3 遺伝子の多型(アリル型)性と極めて関連性が高い事がわかっている。特に DRB3*009:02 アリルを保有する牛は、BLV に感染してもそのプロウイルス量が極めて低く、また病態進行も抑制されている。MHC クラス II は、獲得免疫における細胞性免疫の中心的役割を果たすことから、BLV 感染時に DRB3*009:02 アリルが強い防御免疫を付与しているという仮説が成り立つ。この防御免疫機構を解明することは、重要なレトロウイルス感染症における治療法、ワクチン開発に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DRB3*009:02 分子による抗原提示によって誘導される抗原特異的 CD4⁺T 細胞を解析し、BLV 感染牛の病態進行に対する抵抗性/感受性の免疫学的機序を解明する事である。

3. 研究の方法

抗原特異的 CD4⁺T 細胞は、MHC クラス II アリルのタイプによってその免疫学的特徴(プロファイル)が異なってくるため、防御免疫の質に大きく影響する。従って、MHC クラス II アリルと関連する抗原特異的 CD4⁺T 細胞を特定し、その特徴を解析する事で BLV 感染牛の病態進行に対する抵抗性/感受性の免疫学的機序を解明する事が可能となる。しかしながら、牛において抗原特異的 CD4⁺T 細胞を特定するのはこれまで困難であった。申請者らは独自で牛 MHC クラス II 4 量体(テトラマー)を開発した。すなわち、このテトラマーを利用して BLV 抗原特異的 CD4⁺T 細胞を特定し、そのプロファイルを解析する。

(1)テトラマーの作製

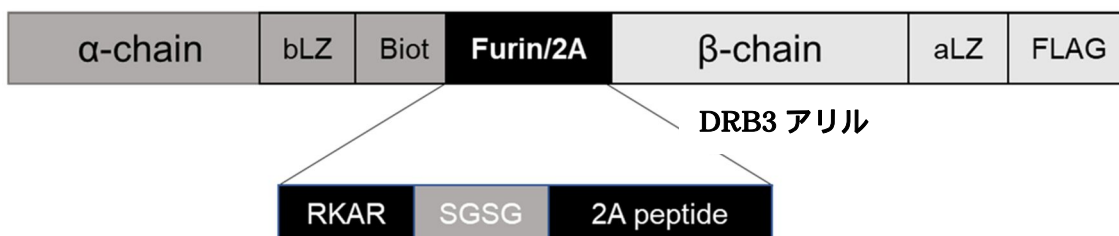
病態進行に対する抵抗性と関連する DRB3*009:02 アリルのテトラマー及び感受性に関連する DRB3*015:01 アリル、DRB3*002:01 アリルのテトラマーの作製

(2) DRB3*009:02 テトラマー、DRB3*015:01 テトラマー、DRB3*002:01 テトラマーを使った BLV タンパク質上の CD4⁺T 細胞エピトープの同定：TGEM(tetramer-guided epitope mapping)法

(3)BLV 感染実験によるテトラマーによる BLV タンパク質特異的 CD4⁺T 細胞の動態解析

4. 研究成果

(1) 病態進行に抵抗性であるアリルは DRB3*009:02 のみである。感受性であるアリルのうち本研究で DRB3*015:01 テトラマー、DRB3*002:01 テトラマーである。今回のテトラマー作製に使用した、哺乳類細胞を使って発現する新しい発現ベクターの概略図を下に示す。DRB3 アリル(β-chain)の部分を変えることにより、異なるアリルを発現することができる。すなわち、この部分に DRB3*009:02、DRB3*015:01、DRB3*002:01 を挿入した。MHC クラス II のα鎖とβ鎖を1つの発現ベクターに組み込んだことにより、ヘテロダイマーの発現効率をあげることができた。



Mitoma et al., Immunology, 2021

(2) DRB3*009:02 テトラマー、DRB3*015:01 テトラマー、DRB3*002:01 テトラマーを使った BLV タンパク質上の CD4⁺T 細胞エピトープの同定法：TGEM (tetramer-guided epitope

mapping)法を確立した。

TGEM 法に必要な牛 IL-2 の作製 (哺乳類系細胞 HEK-293 細胞を使った発現 *Mitoma et al., J. Vet. Med. Sci., 2020*)

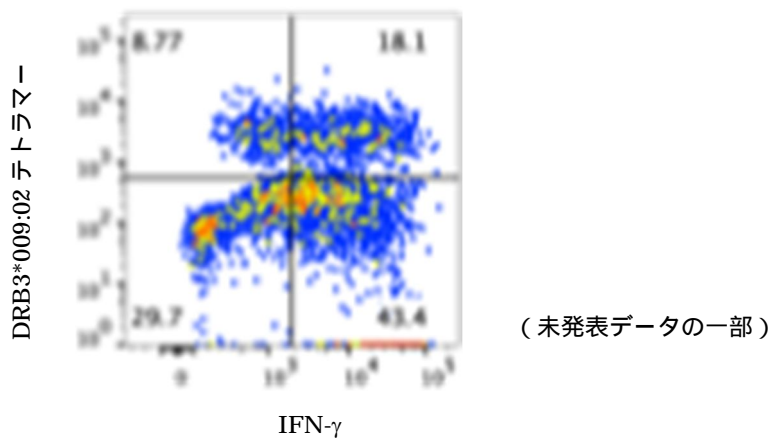
同定した BLV の主要な構造タンパク質である env 及び gag タンパク質の CD4⁺T 細胞エピートープ数 (アミノ酸配列は未発表のため未記載)

CD4⁺T 細胞エピートープ

拘束 DRB3 アリル	DRB3*009:02	DRB3*015:01	DRB3*002:01
BLV-CD4 ⁺ T 細胞エピートープ数	env 2	1	3 (or 4)
	gag 3 (or 4)	1	3 (or 4)

BLV 構造タンパク質の CD4⁺T 細胞エピートープを少なくとも 13 個同定した。また同定したそれぞれのエピートープを拘束する MHC クラス II の同定にも成功した。同定したエピートープのうち 3 個は、過去にも報告されているエピートープと一致するが、拘束 MHC クラス II アリルは同定されていなかった。本研究において使った TGEM 法によって、そのアリルを明らかにする事ができた。これらの結果から、TGEM 法がエピートープとその拘束 MHC クラス II アリルを同時に同定できる優れた CD4⁺T 細胞エピートープマッピング法である事がわかった。本研究結果は、まもなく論文投稿する予定である。

(3) 本研究によって、新しく構築した哺乳類細胞系発現ベクターを使って作製した DRB3*009:02 テトラマー、DRB3*015:01 テトラマー、DRB3*002:01 テトラマーは、BLV 特異的 CD4⁺T 細胞の数的動態解析に有用なツールである事が証明できた。さらにテトラマー陽性細胞の産生サイトカイン解析(プロファイル解析)を行なった結果、CD4 陽性細胞の 61%が IFN- γ 陽性であり、そのうち約 30%が(env ペプチドを載せた)DRB3*009:02 テトラマー陽性であった。(下図：DRB3*009:02 を保有する BLV 感染牛の末梢血単核細胞から CD4⁺T 細胞を選択した後、env ペプチドを載せた DRB3*009:02 テトラマー及び IFN- γ をフローサイトメトリー解析した)。これらの結果から、IFN- γ を産生する BLV タンパク質特異的 CD4⁺T 細胞が優れた免疫環境である事が示唆された。



しかしながら、本研究の目的は、BLV 感染牛の病態進行に対する抵抗性/感受性の免疫学的機序を解明する事である。すなわち、BLV の感染初期から慢性期に移行する時期の免疫学的状況を連続的に解析する必要がある。これは、感染実験においてのみ可能である。テトラマーによる BLV タンパク質特異的 CD4⁺T 細胞の連続的解析によって、DRB3*009:02 アリルを保有する牛と、他の DRB3 アリルを保有する牛では、どのようなプロファイルを持つ CD4⁺T 細胞がどのように活性化されるのかを見る必要があった。その感染実験が予期しなかった事情により実施できなくなった事は残念である。

結論として、本研究の実験手法は感染後の宿主免疫を解析するのに予想以上に有用である事が確認できた。また得られた成果は未完成ではあるが、ある程度仮説が正しい事を示唆している。今後、感染実験によるテトラマー解析を行い、BLV 感染症における MHC クラス II アリルの意義を明らかにできる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Notsu K, El Daous H, Mitoma S, Norimine J, Sekiguchi S	4. 巻 99
2. 論文標題 A pooled testing system to rapidly identify cattle carrying the elite controller BoLA-DRB3*009:02 haplotype against bovine leukemia virus infection.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 HLA	6. 最初と最後の頁 12-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tan.14502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mitoma S, Carr BV, Harvey Y, Moffat K, Sekiguchi S, Charleston B, Norimine J, Seago J	4. 巻 164
2. 論文標題 The detection of long-lasting memory foot-and-mouth disease (FMD) virus serotype O-specific CD4+ T cells from FMD-vaccinated cattle by bovine major histocompatibility complex class II tetramer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 266-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.13367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Daous Hala El, Mitoma Shuya, Elhanafy Eslam, Thi Nguyen Huyen, Thi Mai Ngan, Notsu Kosuke, Kaneko Chiho, Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Relationship between Allelic Heterozygosity in BoLA-DRB3 and Proviral Loads in Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animals	6. 最初と最後の頁 647 ~ 647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ani11030647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 MITOMA Shuya, EL-KHAIAT Heba M., UTO Tomofumi, SATO Katsuaki, SEKIGUCHI Satoshi, NORIMINE Junzo	4. 巻 83
2. 論文標題 Characterization of bovine interleukin-2 stably expressed in HEK-293 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 134 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Notsu Kosuke, Wiratsudakul Anuwat, Mitoma Shuya, Daous Hala El, Kaneko Chiho, El-Khaiat Heba M., Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Quantitative Risk Assessment for the Introduction of Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle Using a Cattle Movement Network Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 903 ~ 903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9110903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Notsu Kosuke, Wiratsudakul Anuwat, Mitoma Shuya, Daous Hala El, Kaneko Chiho, El-Khaiat Heba M., Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Quantitative Risk Assessment for the Introduction of Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle Using a Cattle Movement Network Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 903 ~ 903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9110903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 El Daous Hala, Mitoma Shuya, Elhanafy Eslam, Thi Nguyen Huyen, Thi Mai Ngan, Hara Akihiro, Duangtathip Karn, Takezaki Yuka, Kaneko Chiho, Norimine Junzo, Sekiguchi Satoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Establishment of a novel diagnostic test for Bovine leukaemia virus infection using direct filter PCR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transboundary and Emerging Diseases	6. 最初と最後の頁 1671 ~ 1676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbed.13506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 El Daous, H., 三苦修也, Elhanafy E., NgyenThi H., Mai T. N., 原彰宏, Duangtathip K., 竹崎由佳, 兼子千穂, 乗峰潤三, 関口敏
2. 発表標題 Direct filter PCR as a novel diagnostic test for bovine leukemia virus infection.
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 4. 三苦修也、Julian Seago、Veronica Carr、Katy Maffot、Bryan Charleston、関口敏、乗峰潤三。
2. 発表標題 牛MHCクラスIIテトラマを用いた口蹄疫ウイルス構造蛋白エピトープマッピング
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norimine J
2. 発表標題 The role of BoLA-DRB3 alleles on disease progression during bovine leukemia virus infection.
3. 学会等名 HTLV 19th International conference on human retrovirology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 克明 (Sato Katsuaki) (40301147)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	今内 寛 (Konnai Satoru) (40396304)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	関口 敏 (Sekiguchi Satoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	目堅 博久 (Mekata Hirohisa)		
研究協力者	三苦 修也 (Mitoma Shuya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関