

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15993

研究課題名（和文）免疫抑制受容体を標的とした牛白血病に対する新規制御法の開発

研究課題名（英文）Development of immunotherapy targeting immunoinhibitory receptors for control of bovine leukemia virus infection

研究代表者

岡川 朋弘 (Okagawa, Tomohiro)

北海道大学・獣医学研究院・特任助教

研究者番号：80829036

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）：牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）感染症に対する新規制御法への応用を目指して、免疫抑制受容体を標的とした複数の阻害抗体を樹立し、免疫活性化効果と抗ウイルス効果を検証した。その結果、これらの阻害抗体を併用すると、ウシの免疫細胞におけるTh1サイトカインの応答が増強され、強力な抗ウイルス効果を示した。さらにこれらの阻害抗体を生体投与が可能な治療用抗体に改変し、哺乳類細胞の発現系を用いた大量生産に着手した。今後は、本研究で開発した治療用抗体について大規模な臨床研究を行い、BLV感染症の新規制御法への応用を進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国内の農場ではBLV感染が拡大しており、日本国内の35%以上のウシがBLVに感染している。BLV感染の蔓延に伴い牛伝染性リンパ腫の発生も急増している。牛伝染性リンパ腫は届出伝染病に指定されており、その発生数は過去21年間で42倍に増加した。腫瘍を発症したウシは淘汰（全廃棄）の対象となるためその経済的被害は大きい。しかしながら、BLVに対する有効なワクチンや治療法は存在しないため、新規制御法の開発が求められている。本研究で開発した免疫抑制受容体を標的とした治療用抗体は、免疫活性化によって抗ウイルス効果を発揮することができ、BLVが国内に広く蔓延した現状を打破する新規制御法として有望である。

研究成果の概要（英文）：To develop a novel control strategy against bovine leukemia virus (BLV) infection, we established several blocking antibodies targeting immunoinhibitory receptors and tested their immune-activating and antiviral effects. As a result, the combination of these blocking antibodies enhanced the response of Th1 cytokines in bovine immune cells and showed a strong antiviral effect. We have also modified these inhibitory antibodies into therapeutic antibodies that can be administered in vivo, and have begun mass production using a mammalian cell expression system. In the future, we would like to conduct large-scale clinical studies of the therapeutic antibodies developed in this study and apply them to novel methods for controlling BLV infection.

研究分野：獣医免疫学

キーワード：牛伝染性リンパ腫 牛白血病 BLV 免疫抑制受容体 T細胞 新規制御法 免疫活性化

1. 研究開始当初の背景

牛伝染性リンパ腫ウイルス（牛白血病ウイルス, bovine leukemia virus; BLV）は、ウシの B 細胞に感染し、長い潜伏期間を経て感染牛に B 細胞性リンパ腫である地方病型牛伝染性リンパ腫（地方病型牛白血病）を引き起こす。近年、日本国内の農場では BLV の感染牛が急増しており、2009-2011 年の調査によると全国の肉牛の 28.7%、乳牛の 40.9% が BLV に感染している。BLV の蔓延に伴い、牛伝染性リンパ腫（牛白血病）の発生が国内で急増している。実際に農林水産省の発表によると、2019 年の牛伝染性リンパ腫の発生数は 21 年前の 41 倍に達している。牛伝染性リンパ腫は家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されており、腫瘍（リンパ腫）を発症した牛は淘汰（全廃棄）の対象となるため、その経済的被害は大きい。

BLV 感染症をはじめとする慢性感染症では、抗ウイルス応答の中心を担う T 細胞を機能的に疲弊させ、ウイルスが宿主の免疫応答を回避し、感染を持続している。T 細胞の疲弊化は、病原体抗原による過剰な T 細胞の活性化に対する負のフィードバックとして、programmed death 1 (PD-1) などの免疫抑制受容体が T 細胞表面に過剰発現し引き起こされる（図 1）。免疫抑制受容体 PD-1 は感染細胞などに発現したリガンド programmed death-ligand 1 (PD-L1) と結合することにより、T 細胞の活性化シグナルを阻害し、細胞増殖、サイトカイン産生、細胞傷害能等の T 細胞の機能を抑制する。その結果、T 細胞は免疫応答を十分に発揮できず、病原体の持続感染を許してしまう。しかしその一方で、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って阻害することで、疲弊化 T 細胞が再活性化され、本来発揮すべきエフェクター機能を回復することも知られている。実際に医学領域では PD-1、PD-L1 に対する抗体医薬品が発売され、ヒトの腫瘍疾患に対する新たな治療法として利用されている。

我々は、BLV 感染症をはじめとするウシの慢性感染症に対する新規制御法とするべく、免疫抑制受容体 PD-1 とそのリガンド PD-L1 を標的とした抗体薬の開発を進めてきた。申請者は、BLV 感染牛では T 細胞における PD-1 の発現と、B 細胞（BLV 感染細胞）における PD-L1 の発現が上昇し、T 細胞の疲弊化が誘導されることで、病態進行が助長されることを明らかにした。さらに、抗ウシ PD-L1 キメラ抗体ならびに抗ウシ PD-1 キメラ抗体を開発し、BLV 感染牛に対する抗体投与試験を実施した。これらのキメラ抗体薬の投与により、生体内で抗ウイルス T 細胞応答が活性化され、プロウイルス量を減少させることに成功した。しかし、BLV 感染牛の中でもプロウイルス量の高い、持続性リンパ球増多症（persistent lymphocytosis; PL）牛に対しては、抗 PD-L1 キメラ抗体の単独投与では十分な抗ウイルス効果を発揮できなかった。プロウイルス量の高い PL 牛においても、免疫活性化効果ならびに抗ウイルス効果を発揮させるには、さらなる戦略が求められる。

2. 研究の目的

本研究では、BLV 感染症に対してより効果的な治療法を確立するため、抗 PD-L1 抗体・抗 PD-1 抗体と他の治療用抗体を併用し、BLV 感染牛において免疫活性化効果および抗ウイルス効果を検証する。併用法の標的としては、T 細胞の疲弊化に促す PD-1 以外の免疫抑制受容体 CTLA-4、TIM-3、LAG-3 を候補とする。我々はこれまでに、BLV 感染牛において、複数の免疫抑制受容体が PD-1 と同様に発現上昇していることを既に確認しており、治療標的として有望であると考えている。

3. 研究の方法

まず、我々が樹立した抗 CTLA-4 抗体、抗 TIM-3 抗体および抗 LAG-3 抗体について、ウシ PBMC に対する T 細胞活性化効果を評価した。BLV 感染牛あるいは非感染牛の血液から分離した末梢血単核球（PBMC）を、BLV 抗原、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体、あるいはスーパー抗原の刺激下で、抗 CTLA-4 抗体、抗 TIM-3 抗体または抗 LAG-3 抗体を添加して培養した。T 細胞応答を評価するために、刺激培養した PBMC における IFN- γ 産生 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより測定した。また、PBMC の培養上清に分泌された Th1 サイトカイン（IFN- γ 、TNF- α あるいは IL-2）の量を ELISA により測定した。さらに、抗 PD-L1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体との併用による T 細胞活性化効果を検証した。上記の PBMC 培養試験と同様にして、抗 PD-L1 抗体または抗 PD-1 抗体と、抗 CTLA-4 抗体、抗 TIM-3 抗体または抗 LAG-3 抗体を 2 種類ずつ併用して培養に添加した。その後、上述の方法に従って T 細胞の応答を解析した。

次に、T 細胞活性化効果の高かった抗 CTLA-4 抗体あるいは抗 TIM-3 抗体について、抗ウイルス効果をシンシチウム形成阻害試験により評価した。BLV 感染牛由来 PBMC と BLV 感受性細胞（CC81 細胞株）の共培養に、抗 CTLA-4 抗体、抗 TIM-3 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体およびを添加して培養し、シンシチウム（合胞体）の形成を顕微鏡下で計測した。

そして、将来的な臨床応用を視野に入れて、各標的分子に対する治療用抗体を樹立した。それぞれの治療用抗体の発現プラスミドを哺乳類細胞に導入し、抗体発現細胞を構築した。抗体

発現細胞の培養上清から Protein A を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより治療用抗体を精製した。精製した抗体の純度は SDS-PAGE にて確認した。次に、それぞれの治療用抗体の標的受容体に対する結合性をフローサイトメトリーまたは Biacore によって評価した。また、標的分子とリガンドとの結合に対する治療抗体の阻害活性を、フローサイトメトリーまたは ELISA を用いて測定した。さらに、治療用抗体による T 細胞活性化効果を上述の PBMC 培養試験の方法に従って解析した。

4. 研究成果

まず、抗 CTLA-4 抗体、抗 TIM-3 抗体および抗 LAG-3 抗体を単剤で用いて T 細胞活性化効果を評価したところ、いずれの抗体もウシ T 細胞からの Th1 サイトカイン産生を活性化した。次に、それぞれの抗体を抗 PD-L1 抗体あるいは抗 PD-1 抗体と併用すると、T 細胞の活性化効果が増強されることが明らかになった。特に、抗 CTLA-4 抗体または抗 TIM-3 抗体において、T 細胞の活性化効果が顕著に認められた。さらに、抗 CTLA-4 抗体あるいは抗 TIM-3 抗体によってシンシチウム形成が阻害された。抗 TIM-3 抗体と抗 PD-L1 抗体を併用すると、より顕著にシンシチウム形成が阻害された。

さらに、これらの抗体を改変し、生体に投与可能な治療用抗体を樹立した。治療用抗体の発現には、大量生産が可能な哺乳類細胞の発現系を用いている。一部の治療用抗体については抗体高発現細胞の取得を完了しており、今後、治療用抗体を大量に生産することが可能となった。また、樹立した治療用抗体については、標的受容体への結合性、標的受容体とリガンドの結合阻害活性、T 細胞活性化効果を評価し、改変前の抗体と同等の活性を維持していることを確認した。

以上の研究成果から、免疫抑制受容体を標的とした阻害抗体を併用することで、ウシの T 細胞応答を活性化し抗ウイルス効果を強力に発揮することが明らかになった。さらに、本研究ではウシの生体に投与可能な治療用抗体の樹立に成功した。今後は、本研究で樹立した治療用抗体について臨床研究を行い、BLV 感染症に対する新規制御法へと応用することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Maekawa N, Goto S, Watari K, Minato E, Kobayashi A, Kohara J, Yamada S, Kaneko M, Kato Y, Takahashi H, Terasaki N, Takeda A, Yamamoto K, Toda M, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K	4. 巻 203
2. 論文標題 Prostaglandin E2 induced immune exhaustion and enhancement of anti-viral effects by anti-PD-L1 antibody combined with COX-2 inhibitor in bovine leukemia virus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1313-1324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900342	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 -

1. 著者名 Inagaki H, Konnai S, Kaburagi H, Murota H, Takabatake N, Watari K, Okagawa T, Maekawa N, Murata S, Ohashi K	4. 巻 67
2. 論文標題 Vector transmission of bovine leukemia virus during summer season in Northern Hokkaido	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 235-239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/jjvr.67.3.235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watari K, Konnai S, Maekawa N, Okagawa T, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K	4. 巻 15
2. 論文標題 Immune inhibitory function of bovine CTLA-4 and effects of its blockade in IFN- production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12917-019-2082-7	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 -

1. 著者名 今内覚, 岡川朋弘, 前川直也, 中島千絵, 鈴木定彦, 山本啓一, 戸田幹洋, 村田史郎, 大橋和彦	4. 巻 67
2. 論文標題 動物用抗体医薬品の開発および臨床研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本動物用医薬品協会会報	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sajiki Yamato, Konnai Satoru, Cai Zimeng, Takada Kensuke, Okagawa Tomohiro, Maekawa Naoya, Fujisawa Sotaro, Kato Yukinari, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Enhanced Immunotherapeutic Efficacy of Anti-PD-L1 Antibody in Combination with an EP4 Antagonist	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ImmunoHorizons	6. 最初と最後の頁 837-850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/immunohorizons.2000089	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 -

1. 著者名 Sajiki Yamato, Konnai Satoru, Okagawa Tomohiro, Maekawa Naoya, Nakamura Hayato, Kato Yukinari, Suzuki Yasuhiko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 114
2. 論文標題 A TLR7 agonist activates bovine Th1 response and exerts antiviral activity against bovine leukemia virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental & Comparative Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dci.2020.103847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今内 寛, 岡川 朋弘, 前川 直也, 村田 史郎, 大橋 和彦	4. 巻 784
2. 論文標題 牛白血病の病態発生機序解析を基盤とする新制御法の試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 畜産技術	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamato Sajiki, Satoru Konna, Yoshinori Ikenaka, Tomohiro Okagawa, Naoya Maekawa, Carlos Logullo, Itabajara da Silva Vaz Jr., Shiro Murata, Kazuhiko Ohashi	4. 巻 236
2. 論文標題 Prostaglandin-related immune suppression in cattle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2021.110238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto S., Konnai S., Hirano Y., Kohara J., Okagawa T., Maekawa N., Sajiki Y., Watari K., Minato E., Kobayashi A., Gondaira S., Higuchi H., Koiwa M., Tajima M., Taguchi E., Uemura R., Yamada Shinji, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Yamamoto K., Toda M., Suzuki Y., Murata S., Ohashi K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Upregulation of PD-L1 Expression by Prostaglandin E2 and the Enhancement of IFN- by Anti-PD-L1 Antibody Combined With a COX-2 Inhibitor in Mycoplasma bovis Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2020.00012	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 -

1. 著者名 Goto S., Konnai S., Hirano Y., Kohara J., Okagawa T., Maekawa N., Sajiki Y., Watari K., Minato E., Kobayashi A., Gondaira S., Higuchi H., Koiwa M., Tajima M., Taguchi E., Uemura R., Yamada Shinji, Kaneko Mika K., Kato Yukinari, Yamamoto K., Toda M., Suzuki Y., Murata S., Ohashi K.	4. 巻 68
2. 論文標題 Clinical efficacy of the combined treatment of anti-PD-L1 rat-bovine chimeric antibody with a COX-2 inhibitor in calves infected with Mycoplasma bovis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 77-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/jjvr.68.2.77	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 -

1. 著者名 Sajiki Yamato, Konnai Satoru, Goto Shinya, Okagawa Tomohiro, Ohira Kosuke, Shimakura Honami, Maekawa Naoya, Gondaira Satoshi, Higuchi Hidetoshi, Tajima Motoshi, Hirano Yuki, Kohara Junko, Murata Shiro, Ohashi Kazuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 The Suppression of Th1 Response by Inducing TGF- 1 From Regulatory T Cells in Bovine Mycoplasmosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2020.609443	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 -

1. 著者名 Yamato Sajiki, Satoru Konnai, Reiko Nagata, Satoko Kawaji, Hayato Nakamura, Sotaro Fujisawa, Tomohiro Okagawa, Naoya Maekawa, Yukinari Kato, Yasuhiko Suzuki, Shiro Murata, Yasuyuki Mori, Kazuhiko Ohashi	4. 巻 83
2. 論文標題 The enhancement of Th1 immune response by anti-PD-L1 antibody in cattle infected with <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 162-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0590	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Okagawa T, Konnai S, Maekawa N, Nishimori A, Goto S, Sajiki Y, Watari K, Kohara J, Kato Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K
2. 発表標題 Establishment of anti-bovine PD-1 chimeric antibody and a pilot clinical study in bovine leukemia virus infection
3. 学会等名 12nd International Veterinary Immunology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sajiki Y, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Goto S, Murata S, Ohashi K
2. 発表標題 Contribution of prostaglandin E2 to disease progression and enhancement of antiviral effects by anti-PD-L1 antibody combined with COX-2 inhibitor in bovine leukemia virus infection
3. 学会等名 12nd International Veterinary Immunology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujisawa S, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Murata S, Ohashi K
2. 発表標題 Effects of bovine tumor necrosis factor alpha decoy receptors on cell death and inflammatory cytokine kinetics: potential for bovine inflammation therapy
3. 学会等名 12nd International Veterinary Immunology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watari K, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Murata S, Ohashi K
2. 発表標題 Functional analysis of bovine CTLA-4 in bovine leukemia virus infection
3. 学会等名 12nd International Veterinary Immunology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐治木大和, 今内覚, 岡川朋弘, 前川直也, 後藤伸也, 小原潤子, 山田慎二, 加藤幸成, 鈴木定彦, 村田史郎, 大橋和彦
2. 発表標題 BLV感染症に対するCOX-2阻害剤と抗PD-L1抗体併用法の抗ウイルス効果の検討
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 中村隼人, 今内覚, 岡川朋弘, 佐治木大和, 渡慧, 神谷可菜, 齋藤麻矢, 前川直也, 村田史郎, 大橋和彦
2. 発表標題 牛白血病ウイルス感染症における免疫抑制受容体TIM-3の発現解析および機能解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡川朋弘
2. 発表標題 牛の慢性感染症に対する免疫チェックポイント阻害抗体薬の臨床研究
3. 学会等名 第12回動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>【プレスリリース】(2019年8月7日) ウシの疾病に有効となる抗ウイルス効果の確認に成功～牛白血病などの新規制御法への応用に期待～ https://www.hokudai.ac.jp/news/2019/08/post-557.html</p> <p>[Research Press Release] August 7, 2019 The drug combination effective against bovine leukemia https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/the-drug-combination-effective-against-bovine-leukemia/</p> <p>【プレスリリース】プロスタグランジンE2を介した免疫チェックポイント阻害薬の新たな耐性獲得機構の解明(2020年12月22日) https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/12/e2.html</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------