

ウシの慢性感染症における免疫疲弊化機序の解明と新規治療法の開発

岡川 朋弘（北海道大学 大学院獣医学研究院）

okagawa@vetmed.hokudai.ac.jp

本研究では、ウシの慢性感染症に共通の免疫回避機構として、免疫抑制受容体が T 細胞の疲弊化を引き起こし、病態進行や臨床症状を促進することを発見し、これらの受容体を標的とする抗体薬を開発した。さらにウシで抗体薬の臨床試験を実施し、T 細胞応答の回復効果と抗ウイルス効果を実証した。さらに、様々な臨床研究を通じて抗体薬の最適な使用法を検証した。本研究を基盤として、ウシに対する疾病横断的な制御法の実用化が期待される。

はじめに

近年の農場の大規模化に伴い、感染症対策は産業動物の飼養管理における最重要課題の一つとなった。ワクチンや抗生物質で制御可能な急性感染症とは対照的に、慢性感染症は効果的な予防法や治療法が存在せず、国内の農場において甚大な経済被害を生じている。実際に、家畜伝染病予防法に定められたウシの感染症は 2022 年に国内で 6188 頭発生したが、そのうちの 70% (4334 頭) が「牛伝染性リンパ腫」、19% (1147 頭) が「ヨーネ病」という慢性感染症であった。慢性感染症では病原体がウシに持続感染し、慢性的な臨床症状を呈する (図 1)。慢性感染症の病原体は宿主免疫応答の回避機構を有しており、効果的なワクチンや治療法の開発が困難で、摘発淘汰以外の対策が無かった (図 1)。そこで申請者は「T 細胞の疲弊化」という免疫機能不全に着目して、臨床研究により疲弊化の分子機序を解明し、ウシ慢性感染症の治療に応用可能な抗体薬の開発に取り組んだ。

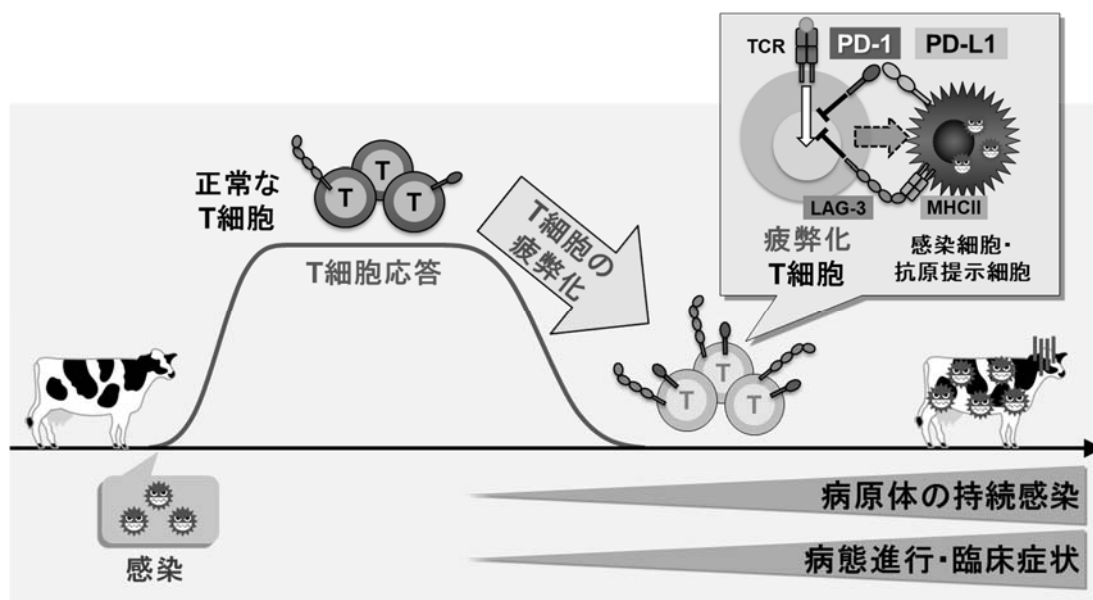


図 1. 慢性感染症の病態進行と T 細胞の疲弊化

牛伝染性リンパ腫の病態進行と免疫応答

地方病型牛伝染性リンパ腫 (enzootic bovine leukosis, EBL) は、牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine

leukemia virus, BLV) の感染が原因となって引き起こされる全身性の悪性リンパ腫を主徴とする疾病である。BLV は牛をはじめとする反芻類の B 細胞に感染し、宿主のゲノムにプロウイルスとして組み込まれて持続感染する。BLV 感染牛は無症状キャリア (aleukemic, AL) を経て、約 30% が持続性リンパ球増多症 (persistent lymphocytosis, PL) を呈する。さらに感染牛の数%は EBL を発症し、リンパ節をはじめとする全身の臓器に B 細胞性リンパ腫を呈し、予後不良で死に至る。BLV 感染から EBL 発症までには、一般的に 5~10 年の長い潜伏期間を要し、その病態進行ならびに腫瘍発症には、ウイルス因子による宿主遺伝子転写の異常制御や宿主免疫応答の抑制などが関連すると言われている。特に免疫応答の中でも細胞性免疫の抑制が顕著に認められ、PL 牛では AL 牛と比べて、T 細胞から分泌される Th1 サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2 など) の発現が低下することが示されている。さらに、EBL および PL 牛において、CD4⁺ T 細胞の BLV 抗原に対する反応性が低下することも明らかになっている。T 細胞応答の低下により宿主の抗ウイルス免疫応答が減弱するため、牛伝染性リンパ腫の病態進行には「T 細胞の疲弊化」が関与していると考えられる。

BLV 感染症における T 細胞の疲弊化機序の解析と新規治療法の検証

我々の研究開始当初、慢性感染症のマウスモデルにおいて、持続的な免疫応答によって T 細胞に免疫抑制受容体 (PD-1, LAG-3, TIM-3) が過剰発現し、T 細胞の活性化シグナルの抑制によって T 細胞の疲弊化が誘導されることが報告されていた (図 2)。この知見に着目し、我々は臨床獣医師から提供された血液検体を利用して BLV 感染症の免疫学的解析に取り組んだ。その結果、BLV 感染牛の病態進行に伴って、T 細胞における免疫抑制受容体 (PD-1、LAG-3、TIM-3) が過剰発現し、サイトカイン産生などのエフェクター機能が減弱することを明らかにした (図 2)^{1,2,3)}。

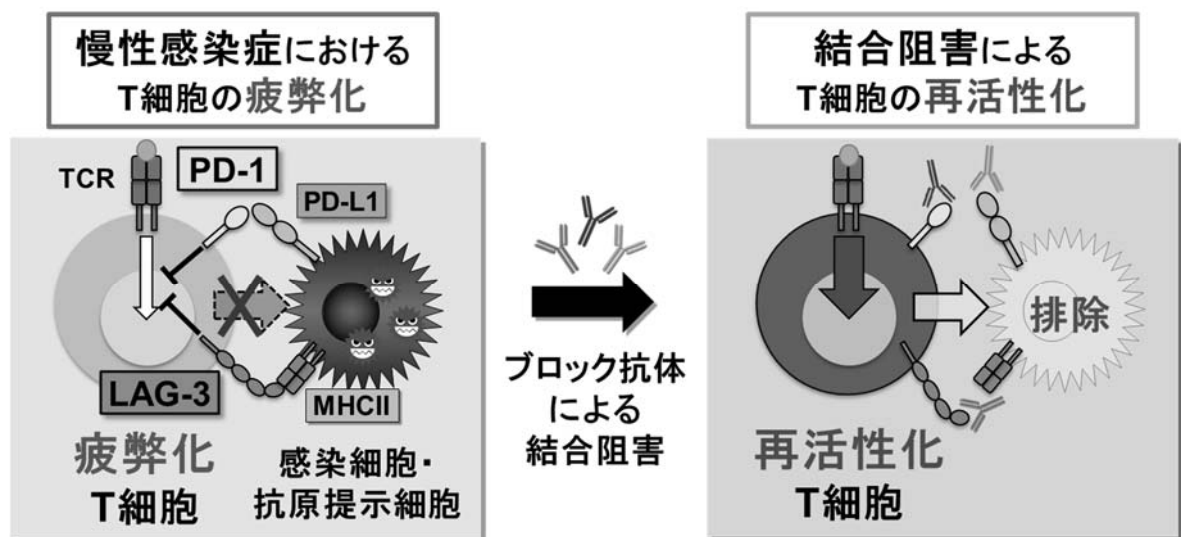


図 2. 免疫チェックポイント分子を介した T 細胞の疲弊化機序とその活性化戦略

さらに、これらの免疫抑制因子に対する阻害抗体 (抗ウシ PD-1 キメラ抗体、抗ウシ PD-L1 キメラ抗体など) を樹立し (図 2)^{4,5,6)}、これらの抗体薬をウシの治療用に大量生産して BLV 感染牛に投与すると、牛の生体内において抗ウイルス免疫応答が活性化され、BLV のウイルス量を減少させることに成功した (図 3)^{4,6,7)}。以上の研究成果により、免疫抑制受容体を標的とした抗体療法は、BLV 感染牛において T 細胞応答を再活性化し、抗ウイルス効果を発揮することが示さ

れ、BLV 感染症の新規治療法として有望であることが示唆された。

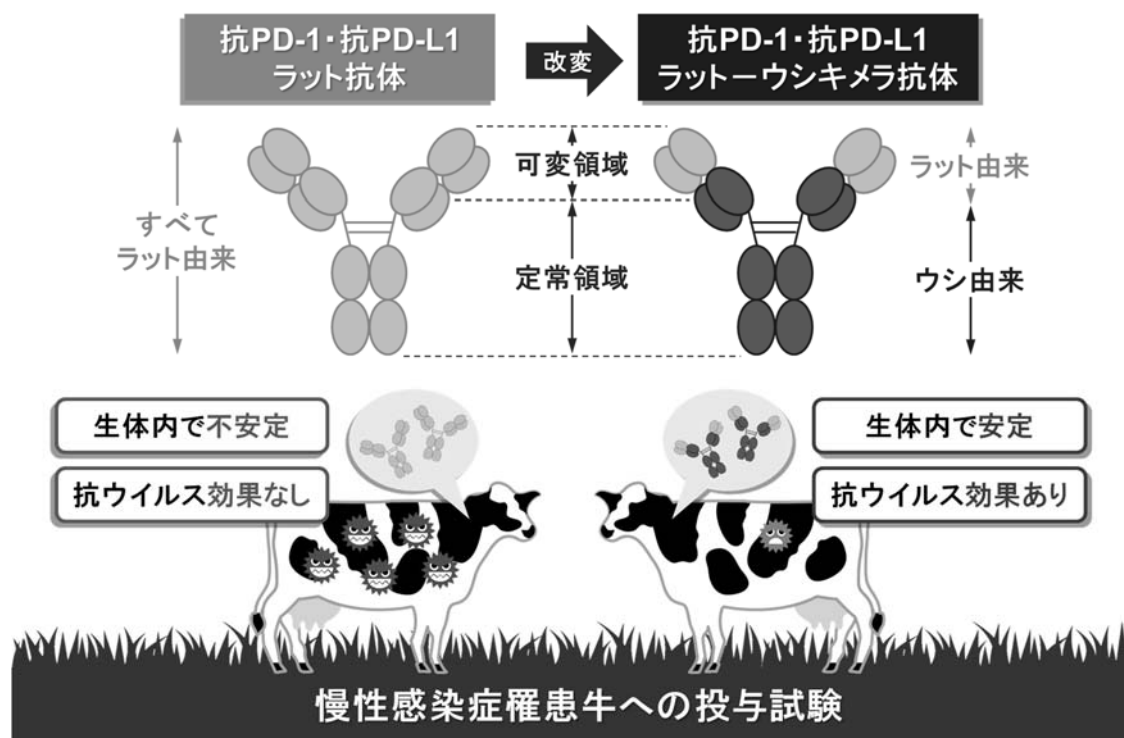


図 3. 抗ウシ PD-1・抗ウシ PD-L1 キメラ抗体の開発と臨床研究

ウシにおける疾病横断的な T 細胞の疲弊化機序の解析

次に、免疫抑制受容体を介した 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かどうかを検証し、免疫抑制受容体が疾病横断的な治療標的となりうるかを検証した。そこで、先行研究において T 細胞の疲弊化が報告されていた、ヨーネ病やアナプラズマ症において解析を実施したところ、これらの疾病においても、PD-1 や LAG-3 の過剰発現によって T 細胞の疲弊化や臨床症状が促進されていた^{8,9)}。そこで、これらの疾病に罹患したウシにおいて、抗体薬（抗ウシ PD-1 抗体、抗ウシ PD-L1 抗体など）を用いて免疫抑制受容体とリガンドの結合をた阻害すると、T 細胞応答が回復することを明らかになった^{8,9)}。以上により、免疫抑制受容体を標的とした抗体薬はウシの慢性感染症に対して幅広く効果を発揮する新規治療法となりうることを示された。

まとめと今後の展望

以上の研究成果から、ウシの慢性感染症においては共通して、PD-1、LAG-3、TIM-3 などの免疫抑制受容体を介して T 細胞の疲弊化（機能抑制）が引き起こされ、病態進行に関与することが明らかになった。さらに我々は、様々な免疫チェックポイント分子を標的とした阻害抗体を開発し、抗 PD-1 ならびに抗 PD-L1 キメラ抗体がウシに対して、免疫活性化効果ならびに抗ウイルス効果を発揮することを明らかにした。さらに我々は、これらの抗体薬とワクチンや他剤との併用も検証し、抗体薬の最適な使用法を模索している^{7,10)}。以上のように我々は抗体薬の臨床応用を目指して、臨床現場の問題から着想を得た多角的な視点から研究に取り組んでいる。加えて、動物医薬品の開発においては医薬品の開発ならびに生産コストを十分に考慮しなければならない。また、牛は大型動物であるため、生体投与には大量の薬剤が必要になる。特に抗体医薬品は

生産コストが高額なため、現在我々は製薬会社と連携して、抗体医薬品を大量かつ安価に生産する技術の開発を進めている。今後本研究を基盤として、抗体薬がウシの疾病横断的な制御法として臨床応用されることが期待される。

引用文献

- 1) **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.
- 2) **Okagawa T**, Konnai S, Nishimori A, Maekawa N, Goto S, Ikebuchi R, Kohara J, Suzuki Y, Yamada S, Kato Y, Murata S, Ohashi K. 2018. Cooperation of PD-1 and LAG-3 in the exhaustion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells during bovine leukemia virus infection. *Vet. Res.*, 2018, 49: 50.
- 3) Nakamura H, Konnai S, **Okagawa T**, Maekawa N, Sajiki Y, Watari K, Kamitani K, Saito M, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. 2023. Combined immune checkpoint blockade enhances antiviral immunity against bovine leukemia virus. *J. Virol.*, 2023, **97**: e0143022.
- 4) **Okagawa T**, Konnai S, Nishimori A, Maekawa N, Ikebuchi R, Goto S, Nakajima C, Kohara J, Ogasawara S, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. 2017. Anti-bovine PD-1 rat-bovine chimeric antibody for immunotherapy of bovine leukemia virus infection in cattle. *Front. Immunol.*, **8**: 650.
- 5) **Okagawa T**, Konnai S, Goto S, Sajiki Y, Ganbaatar O, Nishimori A, Maekawa N, Goto S, Watari K, Nakamura H, Wang C, Tachibana T, Kato Y, Kameda Y, Kohara J, Terasaki N, Kubota M, Takeda A, Takahashi H, Suzuki Y, Maekawa N, Murata S, Ohashi K. 2023. Development of a high-affinity anti-bovine PD-1 rabbit-bovine chimeric antibody using an efficient selection and large production system. *Vet. Res.*, 54: 82.
- 6) Nishimori A, Konnai S, **Okagawa T**, Maekawa N, Ikebuchi R, Goto S, Sajiki Y, Suzuki Y, Kohara J, Ogasawara S, Kato Y, Murata S, Ohashi K. 2017. In vitro and in vivo antiviral activity of an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) rat-bovine chimeric antibody against bovine leukemia virus infection. *PLoS One*, 12(4): e0174916.
- 7) 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. 2019. 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. *J. Immunol.*, **203**: 1313–1324.
- 8) **Okagawa T**, Konnai S, Nishimori A, Ikebuchi R, Mizorogi S, Nagata R, Kawaji S, Tanaka S, Kagawa Y, Murata S, Mori Y, Ohashi K. 2016. Bovine immunoinhibitory receptors contribute to the suppression of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific T-cell responses. *Infect. Immun.*, **84**: 77–89.
- 9) **Okagawa T**, Konnai S, Deringer JR, Ueti MW, Scoles GA, Murata S, Ohashi K, Brown WC. 2016. Cooperation of immunoinhibitory receptors contributes to T-cell exhaustion in *Anaplasma marginale*-infected cattle. *Infect. Immun.*, **84**: 2779–2790.
- 10) **Okagawa T**, Konnai S, Nakamura H, Ganbaatar O, Sajiki Y, Watari K, Noda H, Honma M, Kato Y, Suzuki Y, Maekawa N, Murata S, Ohashi K. 2023. Enhancement of vaccine-induced T-cell responses by PD-L1 blockade in calves. *Vaccines*, **11**: 559.