

学 位 論 文 題 名

ウシ白血病ウイルス感染症における病態の進行と宿主免疫応答

学位論文内容の要旨

ウシ白血病ウイルス（BLV）に感染してもほとんどのものは白血病を発症せず、また白血病を発症する個体でも、その発症までに平均 7-8 年と長い期間がかかる。このことから、BLV には宿主との共存をはかる機構が存在し、感染個体との間に病態進行にかかわる様々な要因が存在すると考えられる。これまでに BLV の病態進行に影響を与える因子として主要組織適合抗原複合体（MHC）クラス II ハプロタイプ、細胞性免疫応答能、サイトカインプロファイルの変化、および p53 遺伝子の突然変異などが報告されている。本研究では、BLV 感染症におけるこのような病態の進行を阻止する試みとして、1) 細胞性免疫を誘導するペプチドワクチンの開発、2) 感染初期におけるサイトカイン反応の変化と BLV 感受性の関係についての解析、および 3) BLV の宿主免疫調節機構について検討し、以下の成績を得た。

1) 細胞性免疫を誘導するペプチドワクチンの開発

BLV エンベロープ（BLVEnv）のエピトープペプチドを免疫したヒツジは細胞性免疫を誘導し、BLV 攻撃に対しウイルスの増殖を阻止することができた。また、ウイルス中和抗体はウイルス増殖を認めた個体でも上昇していることから、BLV の増殖阻止には特に細胞性免疫が重要であることが示唆された。しかしながら、免疫した全てのヒツジに免疫を付与することはできず、ワクチン効果に個体差を認めた。

ペプチドの抗原運搬系としてマンナン被覆リポソーム（M-Lip）を開発した。エピトープを含む BLVEnv98-117 ペプチドを M-Lip に封入して免疫することにより、BALB/c マウスにペプチド抗原特異的タイプ 1 型ヘルパー T 細胞（Th1）を誘導することができた。

2) 感染初期におけるサイトカイン反応の変化と BLV 感受性との関係

BLV 感染後 2 週目において、全てのヒツジの末梢血単核球（PBMC）におけるインターフェロン（IFN） γ 、インターロイキン（IL） γ -2、4、6、および 10 の発現が抑制された。これに対し、腫瘍壊死因子（TNF） α は BLV の増殖を認めたヒツジでは発現が抑制されたものの、BLV 増殖を阻止したヒツジでは発現が亢進した。また、BLV 抗原に対する特異的細胞性免疫応答を示さなかった個体においても、BLV 攻撃後のウイルス増殖を阻止するヒツジが認められた。これらの成績は、BLV 感染初期において T 細胞機能は一時的に抑制されるものの、非特異的免疫反応としてマクロファージ等から産生される TNF α 等の炎症性サイトカインが BLV 感染細胞の排

除に効果的に働くことを示唆している。TNF α の遺伝子は MHC クラス III 領域に位置し、MHC ハプロタイプによりその産生能が決定されることが、マウス、およびヒトで報告されている。BLV に対する感受性決定因子の一つとして MHC ハプロタイプが知られているが、これまでに報告されている MHC クラス II のみならず、TNF α の産生を制御する MHC クラス III 領域も BLV 感染に対する感受性に関連する遺伝的要因である可能性が示唆された。

3) BLV の宿主に対する免疫調節機構

組み換え BLVEnv 蛋白を免疫したヒツジから、中和活性を持たない抗体が誘導され、BLV 抗原に対する細胞性免疫が抑制された個体が認められた。これは、免疫機能を抑制する機能、および抗体依存性ウイルス感染促進を引き起こす機能が BLVEnv 蛋白中に存在する可能性を示唆している。

一方、マウスを用いた実験で、BLVEnv に存在するペプチド（ペプチド 61、CKS-17/BLV）にリンパ球機能を調節する活性が存在することが明らかとなった。このうち CKS-17 は、レトロウイルス間で保存されたペプチドであり、各種動物に免疫抑制を引き起こすことが報告されているが、BLV における同領域のペプチド CKS-17/BLV でも免疫機能を抑制する機能が認められた。一方、ペプチド 61 は、リポ多糖体（LPS）刺激に対するリンパ球増殖反応は抑制するものの、IL-2 に対する反応性の亢進を介してコンカナバリン A（Con A）刺激に対するリンパ球増殖反応を促進した。また、ペプチド 61 は、ヒツジの PBMC に作用し、免疫抑制と深く関わりのあるタイプ 2 サイトカイン産生性 CD8 陽性細胞集団を活性化し、B 細胞等含まれる MHC クラス II 陽性細胞集団を誘導した。これらの成績は BLVEnv 内に宿主の免疫機能を調整し、BLV 感染症の病態形成に関与する活性が存在することを示唆している。

BLV 感染症に対しては、感染は防御できなくても病態進行を阻止する治療法の開発が求められている。BLV 感染症の病態進行阻止における Th1 型免疫の誘導、および TNF α 発現の重要性についての情報は、この治療方法の開発において大変重要であろう。今後 BLV 感染個体における、TNF α 発現、あるいは p55、p75 両 TNF α レセプターの発現動態を解析することは、さらに BLV 感染症の病態を理解するために重要である。BLV の病態形成に関与する細胞性免疫応答とサイトカイン反応は、MHC ハプロタイプによる遺伝的要因によって制御されている。本研究で明らかになった病態形成に関与する遺伝的要因について、BLV 感染動物の病態をコントロールするための遺伝学的な研究が今後さらに展開されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 喜 田 宏
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋
副 査 助 教 授 岡 崎 克 則

学 位 論 文 題 名

ウシ白血病ウイルス感染症における病態の進行と宿主免疫応答

ウシ白血病ウイルス (BLV) に感染してもほとんどのウシは発症せず、発症する個体でも、平均 7 - 8 年と長い期間がかかる。本研究では、BLV 感染症における病態の進行を阻止する試みとして、1) 細胞性免疫を誘導するペプチドワクチンの開発、2) 感染初期におけるサイトカイン反応の変化と BLV 感受性の関係についての解析、および 3) BLV の宿主免疫調節機構について検討した。

まず細胞性免疫を誘導するペプチドワクチンの開発を目的として、BLV エンベロープ (BLVEnv) エピトープペプチドを作製した。その接種によりヒツジに細胞性免疫が誘導され、BLV 攻撃に対しウイルスの増殖をが阻止されることを明らかにした。また、ペプチドの抗原運搬系としてマンナン被覆リポソーム (M-Lip) を開発した。エピトープを含む BLVEnv98-117 ペプチドを M-Lip に封入して免疫することにより、マウスにペプチド抗原特異的タイプ 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) を誘導することができた。

次に BLV 感染初期におけるサイトカイン反応の変化と BLV 感受性との関係について検討した。その結果、BLV 感染後 2 週目において、全てのヒツジの末梢血単核球 (PBMC) でインターフェロン γ 、インターロイキン-2、4、6、および 10 の発現が抑制された。これに対し、腫瘍壊死因子 (TNF) α は BLV の増殖を認めたヒツジでは発現が抑制されていたが、BLV 増殖を阻止したヒツジでは亢進していた。この成績は、BLV 感染初期において TNF α 等の炎症性サイトカインが感染細胞の排除に効果的に働くことを示唆している。

最後に BLV の宿主に対する免疫調節機構について解析した。マウスを用いた実験で、BLVEnv に存在するペプチド (ペプチド 61、CKS-17/BLV) に免疫調節活性のあることを明らかにした。このうち CKS-17 は、レトロウイルス間で保存されたペプチドであり、各動物に免疫抑制を起こすことが報告されているとおり、BLV における同領域のペプチド CKS-17/BLV でも免疫抑制機能が認められた。一方、ペプチド 61 は、リポ多糖体刺激に対するリンパ球増殖反応は抑制するものの、コンカナバリン A 刺激に対するリンパ球増殖反応を促進した。また、ペプチド 61 は、ヒツジの PBMC に作用し、Th2 型サイトカイン産生性 CD8 陽性細胞集団を活性化した。これらの成績は BLVEnv は宿主の免疫機能を調節し、BLV 感染症の病態形成に関与することを示唆している。

本研究により BLV 感染症の病態進行阻止における Th1 型免疫の誘導、および TNF α 発現の重要性を明らかにした。よって審査員一同は、壁谷英則氏が博士 (獣医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。