牛伝染性リンパ腫の個体差を克服可能なワクチン候補となる 牛伝染性リンパ腫ウイルスのエピトープの探索

白 蘭蘭¹、和田 智之¹、間 陽子^{2,3}

¹ 理化学研究所 光量子工学センター 光量子制御技術開発チーム 埼玉県和光市広沢 2-1

² 理化学研究所 科技ハブ産連本部 バトンゾーン研究推進プログラム 埼玉県和光市広沢 2-1

³ 東京大学大学院 農学生命科学研究科 農学国際専攻 地球規模感染症制御学講座 東京都文京区弥生 1-1-1

Identification of bovine leukemia virus epitopes as epitope-driven vaccine candidates that can overcome individual differences in bovine leukosis

Lanlan Bai¹, Satoshi Wada¹, Yoko Aida^{2,3}

¹ Photonics Control Technology Team, RIKEN Center for Advanced Photonics, Wako, Saitama, Japan

² Baton Zone Program, RIKEN Cluster for Science, Technology and Innovation Hub, Wako, Saitama, Japan

³ Laboratory of Global Infectious Diseases Control Science, Graduate School of Agricultural Life Science, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

はじめに

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) は悪性Bリンパ腫である地方病性牛伝染性リンパ腫 (EBL) の原因ウイルスであり、宿主細胞のDNAにプロウイルスとして組み込まれるレトロウイルスである。BLVはヒトの難治性疾患である成人T細胞白血病 (ATL) を誘発するヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) と近縁であることから、そのモデルとして注目を集めてきた。BLV感染牛の約3割は未発症健康、約7割は持続的リンパ球増多症、そして、長年の潜伏期間を経て約数%が牛伝染性リンパ腫を発症する (Gillet ら 2007; Aida ら 2013)。近年、EBLが増加し続けていることから、牛伝染性リンパ腫に対する予防・治療効果があるワクチン開発が強く求められている。現在、日本におけるBLVの抗体陽性率は6カ月齢以上の乳用牛で40.9%、肉用繁殖牛で28.7%に達し (Murakami ら 2011)、BLVの感染および発症率は全国的に上昇の一途をたどり被害は拡大する一方である。EBLは国際獣疫事務局 (OIE) の疾病リストのひとつに挙げられている (Polat ら 2017)。欧州連合 (EU) 加盟国ではいくつかの国家レベルの組織的な清浄化に取り組み、BLV感染牛の“摘発・淘汰”によりBLV-freeを実現しているが (Polat ら 2017)、他の大陸では感染は拡大の一途を辿ってい

る。例えば、米国のBLV調査研究によると乳牛の血清陽性率は83.9%であった (Animal and Plant Health Inspection Service 2020)。カナダでは個体レベルでの陽性率は36.7%を超え、群レベルでは78.3%であった (Nekouei ら 2015)。台湾では個体レベルでの陽性率は81.8%を超え、群レベルでは99.1%であった (Hsieh ら 2019)。韓国では個体レベルでの陽性率は50%を超え、群レベルでは86.8%であった (Suh ら 2005)。中国では個体レベルでの陽性率は31%~41.9%であることが報告された (Yang ら 2019; Yu ら 2019)。

BLVの遺伝子構成とそのウイルス粒子構造

BLVのゲノム全長は約8714bpで、遺伝子は2つの同一 long terminal repeat (LTR) 配列に挟まれる形で、構造タンパク質に必須な *gag*, *pro*, *pol*, *env* 遺伝子および制御タンパク質をコードしている *R3*, *G4*, *rex*, *tax* 遺伝子から構成されている (図1A)。また、近年の報告によると、BLVにコードされているmicroRNAがB細胞のがん化に関与する可能性が示唆されている

連絡者：間 陽子 東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻 地球規模感染症制御学講座
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
e-mail: aida@riken.jp

(Durkin ら 2016; Frie ら 2018)。

BLV のウイルス粒子は、直径約 100nm の球状である。 *gag* 遺伝子によってコードされる Gag ポリタンパク質前駆体 (Pr^{Gag}) はウイルス RNA を認識し、ウイルス粒子の形態形成を開始する。成熟により BLV の Gag タンパク質はウイルス粒子の主要な非グリコシル化タンパク質であるマトリックス (p15)、キャプシド (p24)、ヌクレオキャプシド (p12) として生成される。ウイルスゲノム RNA は p12 と結合しその外側を p24 が囲いコアを形成している。グリコシル化表面糖タンパク質 gp51 および膜貫通糖タンパク質 gp30 により包まれており、内側を p15 が裏打ちしている。gp51 は env にコードされるエンベロープ (Env) ポリタンパク質前駆体 (Pr^{Env}) から成熟後に形成される。 *pol* にコードされる逆転写酵素およびインテグラーゼは p24 が形成したコア内に内包され、標的細胞への遺伝子組込みに関わる (図 1B)。ウイルスの感染において、gp51 が宿主膜表面上の受容体 CAT1/SLC7A1 (Bai ら 2019a) に結合すると、gp30 の膜融合活性によってウイルスと宿主の細胞膜が融合する。これにより BLV のコアが宿主細胞に侵入する。そのため、BLV 感染動物において、gp51 は gp30 より強い免疫抗原性を示す。

図 1. BLV の遺伝子構成 (A) とそのウイルス粒子構造 (B)。 ウイルス粒子に 2 コピーの一本鎖ゲノム RNA がパッケージされている。キャプシド (p24) タンパク質は、ヌクレオキャプシド (p12) と相互作用するウイルス RNA を含み形成している。ウイルスゲノムと逆転写酵素もキャプシドにパッケージされている。マトリックス (p15) は、キャプシドと、表面タンパク質 (gp51) および膜貫通タンパク質 (gp30) の

複合体が挿入された細胞由来の脂質二重層によって形成される。

BLV 感染による体内免疫の動き

慢性感染症における疾患の進行に関わる主要因子は病原体に対する細胞性免疫および体液性応答である (Hill 1998)。慢性感染症のひとつである BLV 感染症の最も初期の兆候のひとつは、感染後約 1 ～ 8 週間での体液性抗ウイルス応答が始まることである (Radke ら 1990)。抗体は抗原決定基となる B/T 細胞エピトープに対応する特定の部位で抗原に結合し反応する (Eichmann and Rajewsky 1975; Davydov and Tonevitskii 2009; Reineke and Schutkowski 2009)。細胞性免疫応答は、主に疾患が急性期に向かって進行するのに伴い増強する (Kabeya ら 2001; Ito ら 2014)。CD8 陽性 T 細胞は病原体そのものやウイルス感染細胞を殺し、ウイルスの複製を阻害する (Haraguchi ら 1995)。さらに、ウイルス依存性およびウイルス非依存性の CD4 ヘルパー T 細胞応答は、BLV 感染で誘発される (Callebaut ら 1993; Kabeya ら 1996)。免疫システムが BLV 抗原によって永久に刺激され、一生涯にわたって抗ウイルス活性を増幅および持続することが知られている (Gillet ら 2007)。

BLV ワクチン開発の状況

これまでの BLV に対するワクチン開発は多岐にわたる (表 1)。例えば、不活化ワクチン、サブユニットワクチン (Onuma ら 1984; Burkhardt ら 1989)、組換えワクシニアウイルスワクチン (Portetelle ら 1991)、DNA ワクチン (Usui ら 2003)、弱毒化ワクチン (Willems ら 1994; Abdala ら 2019) など様々な観点から牛伝染性リンパ腫ワクチンの作製が試みられている。抗原を用いた感染防御に関しても多くの報告がある。たとえば、不活性化 BLV 抗原を使用し、ウシとヒツジに BLV 感染防御試験が行われた (Parfanovich ら 1983)。これらの抗原は BLV 特異的な抗体を産生させることに成功したが、BLV の感染を阻止することはできなかった。もう一方の戦略として、BLV エンベロープ抗原を発現させた組換えワクシニアウイルスによる免疫があり、これはヒツジを用いた実験ではプロウイルス量を低下させる事に成功しているが、ウシでは効果が見られなかった (Portetelle ら 1991; Ohishi ら 1992; Daniel ら 1993)。また、*env* 遺伝子や *tax* 遺伝子を発現するプラスミドを用いた DNA ワクチンも試みられ、免疫誘導には成功したが長期的な感染防御には至っていな

かった Usui ら 2003)。

近年、新たな BLV 感染防御の試みとして、Tax, G4 および microRNA 領域を欠損させた弱毒性の BLV を作製し、感染させることで BLV の防御を行う戦略を提唱している (Willems ら 1994; Barez ら 2015; Gillet ら 2016; Abdala ら 2019)。この戦略は一定の感染防御効果が得られているが、遺伝子組換えウイルスを野外のウシに感染させる事への安全性の担保は非常に難しく、実用化には未だ多くの障害が残っている。一方、ワクチン以外の戦略として、今内らは、標的細胞への免疫寛容を引き起こす PD-1(programmed cell death-1) とその受容体である PD-L1 を介したシグナル伝達を特異的抗体で阻害し免疫応答を活性化する方法を提唱されている (Nishimori ら 2017, Okagawa ら 2017)。免疫チェックポイント阻害剤を利用するこの療法は、国内

表 1. 牛伝染性リンパ腫に対するワクチン開発

ワクチンの種類	抗原	実験動物	効果
不活化ワクチン	BLV を薬剤で不活	ウシ、ヒツジ	感染を阻止
サブユニットワクチン	gp51/AI(OH) ₃	ウシ	液性免疫惹起
	gp51, gag/Virus Like Particles (VLP)	ウシ、ヒツジ	液性免疫と細胞性免疫惹起
組み換えワクシニアウイルスワクチン	g p 51/ g p 30 発現 RVV	ヒツジ、ウシ	細胞性免疫惹起、PVL 低下
	g p 51 発現 RVV	ヒツジ、ウサギ	免疫誘導なし
DNA ワクチン	g p 51/ g p 31/CMV プロモーター	ウシ	細胞性免疫惹起
	Tax/CMV プロモーター	ヒツジ	細胞性免疫惹起、BLV 複製抑制
弱毒化ワクチン	Tax, Rex, R3, G4 欠損 BLV	ウサギ、ラット	特異的な抗体産生、防御効果あり
	ITAM 変異 BLV	ヒツジ、ウシ	液性免疫惹起
	R3, G4 欠損 BLV	ヒツジ、ウシ	液性免疫惹起、PVL 低下
合成ペプチド	T/B 細胞エピトープ	ヒツジ、ウシ、マウス	液性免疫と細胞性免疫惹起

疾患感受性の個体差

ワクチンの開発を困難にしている疾患感受性の個体差の要因の 1 つとして主要組織適合抗原 (MHC) の多型が挙げられる (Takeshima and Aida 2006; Miyasaka ら 2013; Takeshima ら 2019)。MHC の高度な多型性は免疫応答と疾患感受性の個体差をもたらす。牛の MHC では bovine leukocyte antigen (BoLA) と呼称される。BoLA 遺伝子領域はウシ第 23 番染色体に位置し、細胞性免疫を引き起こす CD8 陽性 T 細胞への抗原を提示するクラス I 分子をコードするクラス I 遺伝子領域と獲得免疫全般を制御する CD4 陽性 T 細胞への抗原を提示するクラス II 分子をコードするクラス II 遺伝子領域があり、それぞれの遺伝子領域が極めて高度な多型性を示すとともに、多くのコピー数が存在するという特徴を有する。ウシ MHC クラス I 分子は α 鎖および β 2 ミクログロブリンが非共有結合した分子で

においても根治切除不能な悪性黒色腫に対して承認されていることから有望視されている。一方で、非常に高額な医療費が問題であり、採算性を考慮しなければならない畜産分野で用いるにはなお多くのハードルが存在する。

以上のように、一定の液性および細胞性免疫の誘導と、BLV の感染阻止効果が得られているものの、ワクチン効果の持続性の低さが問題であった。牛の BLV 感受性に対する個体差が非常に大きいこと、これまでのワクチン効果判定の基準が感染防御の有無でしかなかったことから、ワクチン試験の成否自体の判別が難しく、未だ BLV に対するワクチンの開発には成功していない。

そこで我々は、ワクチンが実用化されない原因のひとつである個体差の問題に着目した。

あり、 α 1 ドメインと α 2 ドメインがペプチドを収容する溝を作り、抗原ペプチドを CD8 陽性 T 細胞に提示することが知られている (Bjorkman ら 1987)。MHC クラス II 分子は α 鎖と β 鎖が非共有結合した分子であり (Aida ら 2015)、B 細胞、マクロファージ樹状細胞、および活性化 T 細胞で発現し、 α 1 ドメインと β 1 ドメインからなるペプチド収容溝がペプチドを噛み込み CD4 陽性 T 細胞に提示する (Miyasaka ら 2013)。BoLA クラス II 遺伝子群の中で BoLA-DRB3 が多型性に富み、機能的にも重要な遺伝子である (Gelhaus ら 1999a; 1999b)。BoLA-DRB3 遺伝子と BoLA-DRA 遺伝子によりコードされている DR 分子が、最も強く発現している。この DR 分子の β 鎖の中で、抗原ペプチドと直接結合する β 1 ドメインをコードする BoLA-DRB3 exon2 領域が突出して多型性が高く、わずか 272 塩基の配列中に 365 種類もの対立遺伝子が存在するこ

とを明らかにしている。著者らは、*BoLA-DRB3* 遺伝子の対立遺伝子を塩基配列レベルで決定できる PCR-Sequence based typing (SBT) 法を開発した (Takeshima ら 2007; 2009; 2011)。現在データベースで登録されている *BoLA* クラス I およびクラス II 遺伝子をコードしている遺伝子の多型性を表 2 に示している。

表 2. 牛主要組織適合抗原 (*BoLA*) クラス I およびクラス II の多型性の数

MHC	種類	数
Class I	<i>BoLA</i> -1	18
	<i>BoLA</i> -2	47
	<i>BoLA</i> -3	44
Class II	<i>BoLA</i> -NC1	23
	<i>BoLA</i> -DRB3	365
	<i>BoLA</i> -DQB	91
	<i>BoLA</i> -DQA	76

ホルスタイン種および黒毛和種において *BoLA-DRB3* 遺伝子は BLV 感染牛における末梢 B 細胞の数の制御に直接的な役割を果たすことが報告されている (Mirsky ら 1996)。PVL は BLV 感染の病態の進行に重要な役割を担っている (Miyasaka ら 2013; Ohno ら 2015; Lo ら 2020)。黒毛和種において、*BoLA-DRB3*0902* および *BoLA-DRB3*1101* は低プロウイルスロード (LPVL) に関連し、*BoLA-DRB3*1601* は高プロウイルスロード (HPVL) に関連している。一方、ホルスタイン牛において、*BoLA-DRB3*1501* および *BoLA-DRB3*1201* は HPVL に関連し、*BoLA-DRB3*0902* および *BoLA-DRB3*0201* は LPVL に関連している。今後の BLV に対する有効なワクチン開発・設計において、免疫応答の個体差を生む要因のひとつである感受性、抵抗性や中立性を制御している対立遺伝子を克服することは必須である。

新規候補 CD4 陽性 T 細胞エピトープ

一疾患感受性の個体差を克服一

以前の研究では、BLV のエピトープ (表 3) は宿主ウシやそれ以外の動物で同定されている。例えば、CD4 陽性 T 細胞エピトープとして、ウシでは BLV p24 由来の p24 31-55 および p24 141-165 が (Mager ら 1994)、マウスでは Env 由来の Env 61-78 が同定されている (Gatei ら 1993)。B 細胞エピトープとして、ウシでは gp51 58-78 (Bai ら 2015a) が、マウスでは Tax261-280 (Sakakibara ら 1998)、Env61-78 (Haraguchi ら 1995) および gp51pep61 (Gatei ら 1993) が、ウサギでは Env179-192 (Callebaut ら 1993) が同定された。これらウシ、マウスおよびウサギに同定されたエピトープが

大きく異なっていたことから、エピトープは動物種によって異なることを示している。

BLV 感染後の病態進行に、個体差の影響が著しく大きいことが知られている (Miyasaka ら 2013; Lo ら 2020)。同じウイルスに感染しても、ほとんど PVL が上昇しない個体と高いレベルの体内ウイルス量を示す個体が存在する (Jimba ら 2012)。著者らは、この個体差が生じる原因を解析してきた結果、*BoLA-DRB3* のアレルが強く病態進行と関連する事を明らかにした (Takeshima ら 2015; 2019)。前章で説明したように、この MHC クラス II アレルがコードしている MHC クラス II 分子は、プロセシングされた外来抗原由来ペプチドをペプチド収容溝に結合し、CD4 陽性 T 細胞に提示することで液性免疫や細胞性免疫を惹起する機能を有しており、免疫誘導のトリガーとなる分子である。このクラス II 分子のペプチド収容溝は極めて高い多型性を有しており、個体によって結合しやすいペプチドの種類や結合親和力が異なる事が免疫応答の個体差を誘発していると考えられている。よって、発症しやすいウシが有する MHC クラス II 分子の立体構造がわかれば、そのクラス II 分子に最も結合しやすいワクチン抗原をデザインすることができ、免疫を効果的に誘導できるワクチンを設計できると考えられた。そこで、著者らは、BLV に対する疾患感受性の個体差の影響を最小限にするために、感受性を規定する *BoLA-DRB3* アレル有する個体を受精卵移植技術により作製し、BLV 感染実験を行った。BLV 接種後、感受性 *BoLA-DRB3*1601* ホモアレルを有するウシでは BLV 体内ウイルス量はほぼ同レベルに高く上昇した。続いて、これらの BLV 感染牛の CD4 陽性 T 細胞を分画し、BLV Gag、Env と Tax 全長配列由来の 20-mer オーバーラッピングペプチドを用いた CD4 エピトープマッピングを細胞増殖試験により実施した。その結果、計 115 個のペプチドから 11 個の CD4 陽性 T 細胞エピトープをスクリーニングできた (Bai ら 2019b) (図 2)。*BoLA-DRB3*1601* アレル保有牛では他のアレル保有牛に比べ同定された CD4 陽性 T 細胞エピトープの数が少ないことが明らかになった (表 3)。*BoLA-DRB3* 遺伝子は、抗原エピトープの認識と抗原特異的 T 細胞応答の両方を調節している (Madden 1995; Takeshima and Aida 2006)。事実、短期間で BLV 誘発性 EBL を発症する EBL のモデル動物ヒツジを用いた感染防御実験によって検証した結果、EBL 発症に対して抵抗性対立遺伝子を有するヒツジは BLV 感染後、感受性対立遺伝子を持つ個体と異なり、強い免疫応答が誘導さ

表 3. 従来同定された BLV のエピトープ

エピトープの種類	使用した動物	BLV のタンパク質	エピトープ名	アミノ酸配列	参考文献
CD4 陽性 T 細胞	マウス	Env	Env 61-78	PQGRRRFGARAMVTYDCE	Gatei ら 1993
	ウシ	p24	31-55	PGSQVWIQTLRLAILQADPTPADLE	Mager ら 1994
	ウシ	p24	141-165	AESYVEFVNRLQISLADNLPDGVPK	Mager ら 1994
CD8 陽性 T 細胞	マウス	Env	Env 121-140	GIFTLTWEIWGYDPLITFSL	Gatei ら 1993
T 細胞	マウス	Tax	Tax 111-130	SPFQPYQCQLPSASSDGC	Sakakibara ら 1998
	マウス	Tax	Tax 131-150	IGHGLLPWNNLVTHPVLGKV	Sakakibara ら 1998
B 細胞	ウサギ	Env	Env 177-192	PDCAICWEPSPWAVE	Callebaut ら 1993
	マウス	Tax	Tax 261-280	HVWSSPQALQRFLHDPTLTW	Sakakibara ら 1998
	マウス	gp30	Env 61-78	AQNRRGLDWLYIRLGFQ	Haraguchi ら 1995
	マウス	gp51	pep61	PQGRRRFGARAMVTYDCE	Gatei ら 1993
	ウシ	gp51	58-78	PQGRRRFGARAMVTYDCE	Bai ら 2015
	ウサギ	gp51	Env39-48	CAKSPRYTLD	Portetelle ら 1989
中和	ウサギ	gp51	Env78-92	EPRCPYVGADHFDCP	Portetelle ら 1989
	ウサギ	gp51	Env144-157	PDPPQPDFPQLNSD	Portetelle ら 1989
	ウサギ	gp51	64-73	RRRFGARAMV	Callebaut ら 1993
	ウサギ	gp51	98-117	SQADQGSFYVNHQILFLHLK	Callebaut ら 1993

れ、ウイルス増殖が抑えられ、最終的に EBL を発症しないという興味深い知見を得た (Nagaoka ら 1999)。これらの結果は、免疫応答が MHC クラス II 多型による CD4 陽性 T 細胞エピトープの個体差に寄与することを示唆した。

新規候補 CD8 陽性 T 細胞エピトープ

一疾患感受性の個体差を克服一

CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を介した免疫応答はウイルス感染細胞の排除に重要な防御機構である。以前の研究では、BLV 抗原に対する細胞性免疫が BLV 複製の抑制に寄与し、疾患の進行の遅延につながると思定されていた。ただし、それは BLV Env および Tax タンパク質の選択された領域に対する少数のペプチドのみを用いて BLV CD8 陽性 T 細胞エピトープを用いた実験による結果であった。MHC クラス I の 1 および 2 ドメインは、抗原由来ペプチドを収容し、それらを CD8 陽性 T 細胞に提示するペプチド収容溝を形成する (Madden 1995; Takeshima and Aida 2006)。MHC クラス I 分子へのペプチドの結合は、CD8 陽性 T 細胞への抗原提示において最も選択的な部位である。以前の研究では、BLV 抗原に対する細胞性免疫が BLV 複製の抑制に寄与し、それによって疾患の進行の遅延につながると仮定されていた (Ohishi ら 1991; Kabeya ら 1996; Elemans ら 2014)。そこで、我々は感受性 *BoLA-DRB3* アレル保有実験感染

牛を用いて、BLV Env、Gag および Tax 全長由来の 20-mer オーバーラッピングペプチドを用いて CD8 陽性 T 細胞の細胞増殖試験と細胞毒性試験を行い、11 個の濃度依存的に反応する CD8 陽性 T 細胞エピトープを同定した (Bai ら 2015b) (図 2A、B)。CD8 陽性 T 細胞エピトープは、LPVL を示すウシでは少なく、HPVL を持つウシでは多かった。この結果は CD8 陽性 T 細胞エピトープの数と PVL が相関していることを強く示唆している (表 4)。また、Env gp30 由来の T 細胞エピトープが同定された。さらに、ペプチドワクチン候補として同定された CD8 陽性 T 細胞エピトープのアミノ酸の保存性を Wu-Kabat 変動指数により解析を行った。Wu-Kabat 変動指数が 1 はアミノ酸部位が単一であることを、値が 2 より大きい時は多形部位であることを示している。興味深いことに、gp51N11 (DQGSFYVNHQILFLHLKQCH) の下線で示している 4 つの残基と gp51N12 (ILFLHLKQCHGIFTLTWEIW) の下線で示している 3 つの残基は、Wu-Kabat 変動指数が 4 を超えた。対照的に、gp30 由来のエピトープは多型性が低かった。特に、gp30N16 (LAPCLIKCLTSRLKLLRQA) は、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ (ITAM) および免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ (ITIM) の上流のプロリンに富む領域が含まれる。さらに、転写活性化領域とロイシンリッチ活性化ドメインを含む領域に同定された Tax エピトープは多型性が低いことが解った。これまでは、Env タンパ

ク質 gp51 はウイルスの細胞表面受容体への結合を仲介し、感染動物で特異的抗体の産生を誘導するため、ワクチン候補として焦点があてられてきた。しかし、BLV 感受性アレル保有牛を標的にした CD8 陽性 T 細胞

胞エピトープでは、gp51 ではなく、低い多型性を示したことから gp30 および Tax 由来のエピトープが BLV ワクチン開発の候補として非常に有用であると考えられた。

表 4. 実験感染牛の情報および同定された CD4 陽性 T 細胞エピトープ、CD8 陽性エピトープの数

牛 No.	BoLA-DRB3 アレル	BoLA-DQA1 アレル	CD4 陽性 T 細胞エピトープ の数	CD8 陽性 T 細胞エピトープ の数
S2	1601:1601	10012:10012	1	7
S4	1601:1601	10012:12021	1	4
R1	2703:1501	10011:0204	6	2
N1	0503:1501	10011:0101	5	5

共通 B 細胞エピトープ

—ワクチン接種動物を識別できる Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA) マーカー—

DIVA とは、ワクチン接種動物と野外感染動物とを区別するマーカーである。DIVA 理念に基づいたワクチン開発を行うことは、国家防疫上重要で、特に人獣共通感染症の場合大きなメリットとなる。これまでの研究では、BLV 由来タンパク質の一部を用い、ウサギやマウスを標的にした B 細胞エピトープと中和エピトープ (表 2) が同定されている。ウサギを標的にした B 細胞エピトープ Env 177-192(Callebaut ら 1993) と Tax 261-280 (Sakakibara ら 1998)、マウスを標的にした gp30 由来の B 細胞エピトープ Env 61-78 (Haraguchi ら 1995) と gp51 由来の pep61 (Gatei ら 1993) が同定されている。また、ウサギを標的にした中和エピトープ Env 39-48、Env 78-92、Env 144-157 (Portetelle ら 1989)、Env 64-73 および Env 98-117 (Callebaut ら 1993) が同定されている。著者らは全ての BLV 感染牛に共通な抗体産生の標的とする「共通 B 細胞エピトープ」および「共通抗体結合部位」が存在するとすれば、その標的を用いて DIVA マーカーを構築可能ではないかと考えた。そこで、BLV 感染前後の血清を用いて共通 B 細胞エピトープの同定を行った。まず、BLV-Env および BLV-Gag 蛋白質由来の 156 個オーバーラッピングペプチドを固定したペプチドマイクロアレイ法を用いて、網羅的にウシ個体が有する BLV 抗体のエピトープを解析し、Env 由来の共通 B 細胞エピトープ、gp51p16-C の同定に成功した (Bai ら 2015a) (図 2A)。続いて、同定した共通 B 細胞エピトープのシングルアラニン置換ペプチドを合成し、異なる 25 種類の BoLA-DRB3 アレルを保有する 670 頭 BLV 感染牛の 91% に共通に反応する 5 つの抗体結合部位 (R7, R9,

F10, V14 と Y18) を同定した (Bai ら 2015a)。その中の R7 と F10 アミノ酸部位は変異がなく、保存性が高かった。他の 3 つアミノ酸部位には、変異は存在するが、その保存率は 99% であった。そこで、この 5 つのアミノ酸残基の Env の機能に対する影響を解析した結果、9 番目のアルギニン (R) をアラニン (A) に置換した BLV は、抗原発現や蛋白質の機能には影響されず、血清反応のみ減弱する事が明らかとなり、9R を 9A に変異させるとワクチン抗原接種ウシと自然感染ウシを見極めるための重要なマーカーとなる事が示唆された。自然感染牛とワクチン接種・未感染牛を識別するには競合 ELISA で検出する事が可能である。この同定された共通 B 細胞エピトープは BLV gp51 の中和ドメイン 1、CD4 陽性 T 細胞エピトープ及び構造認識 F エピトープとオーバーラップしている。したがって、共通 B 細胞エピトープである gp51p16-C は、モノクローナル抗体産生、BLV 感染の診断のための抗原、BLV ワクチン戦略などに非常に重要であると考えられる。

図 2. BLV Env (gp51 および gp30) (A) および Tax (B) タンパク質の推定アミノ酸配列に基づく CD4/CD8 陽性 T 細胞エピトープおよび共通 B 細胞エピトープの概略図。推定上の gp51 および gp30 タンパク質は矢印で示している。同定された CD4 陽性 T 細胞エピトープを青い太字の下線で示し、CD8 陽性 T 細胞エピトープをピンク太字の下線で示し、共通 B 細胞エピトープ (gp51p16-C) を黒太字の下線および黄色で示している。

まとめ

我々が BLV 実験感染牛を用いて同定した CD4 および CD8 陽性 T 細胞エピトープは以前にウシ、ヒツジおよびマウスを用いて同定した BLV に対する T 細胞

エピトープとは異なっていた。この結果から、動物種に加えて、個体差も BLV エピトープの種類に影響を与えるという仮説が考えられた。事実、BLV に対するワクチン開発において、BLV に対する免疫反応性の個体差が大きな壁となっている。*BoLA-DRB3* 感受性アレル保有 BLV 実験感染牛を用いた CD4 および / CD8 陽性 T 細胞エピトープマッピングの結果によって、膜貫通タンパク質 gp30 が細胞性免疫を誘導できる BLV ワクチンの最良の標的領域で有ることを初めて示すことができた。さらに、BLV 感染における Th 細胞の発現が *BoLA-DRB3* アレルと関連している事も示された。B 細胞は、膜に結合した免疫グロブリン受容体によって病原体の抗原を認識し、それに応じて、抗原に特異的な抗体を産生する。抗体は抗原決定基または B 細胞エピトープに対応する特定の部位で抗原に結合することから、この同定された共通 B 細胞エピトープは国家防疫上重要な DIVA マーカー、エピトープ駆動型ワクチンを設計に対する優れた候補であり、疾患の制御と診断にとっても重要な情報であると考えられる。

謝辞

本研究の動物飼育、採血は北海道立総合研究機構動物研究センターの小原 潤子博士と他の研究員の皆様にご協力いただきました。また、理研の分子ウイルス学特別研究ユニットの皆様には、技術支援、親切なサポート、優れたアドバイスをいただきました。ここに深謝の意を表します。

文献

- Abdala A, Alvarez I, Brossel H, Calvinho L, Carignano H, Franco L, Gazon H, Gillissen C, Hamaidia M, Hoyos C, Jacques JR, Joris T, Laval F, Petersen M, Porquet F, Porta N, Ruiz V, Safari R, Suárez Archilla G, Trono K, Willems L. 2019. BLV: lessons on vaccine development. *Retrovirology*, 16:26.
- Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN. 2013. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Frontiers in Microbiology*, 4: 328.
- Aida Y, Takeshima SN, Baldwin CL, Kaushik AK. 2015. Bovine immunogenetics, In: *The Genetics of cattle*. 2nd ed. 130-152. CABI, Nosworthy Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DX UK.
- Animal and Plant Health Inspection Service. 2020. Bovine Leukosis Virus (BLV). United states department of agriculture. Available from <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease-information/cattle-disease-information/bovine-leukemia-disease-info>.
- Bai L, Otsuki H, Sato H, Kohara J, Isogai E, Takeshima SN, Aida Y. 2015a. Identification and characterization of common B cell epitope in bovine leukemia virus via high-throughput peptide screening system in infected cattle. *Retrovirology*, 12: 106.
- Bai L, Sato H, Kubo Y, Wada S, Aida Y. 2019a. CAT1/

- SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. *FASEB Journal*, fj201901528R.
- Bai L, Takeshima SN, Isogai E, Kohara J, Aida Y. 2015b. Novel CD8(+) cytotoxic T cell epitopes in bovine leukemia virus with cattle. *Vaccine*, 33: 7194-7202.
- Bai L, Takeshima SN, Sato M, Davis WC, Wada S, Kohara J, Aida Y. 2019b. Mapping of CD4(+) T-cell epitopes in bovine leukemia virus from five cattle with differential susceptibilities to bovine leukemia virus disease progression. *Virology Journal*, 16: 157.
- Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutiérrez G, Hamaidia M, Jacques JR, Perike S, Neelature Sriramareddy S, Renotte N, Staumont B, Reichert M, Trono K, Willems L. 2015. Recent Advances in BLV Research. *Viruses*. 7: 6080-6088.
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 329: 506-512. Burkhardt H, Rosenthal S, Wittmann W, Starick E, Scholz D, Rosenthal HA, Kluge KH. 1989. Immunization of young cattle with gp51 of the bovine leukosis virus and the subsequent experimental infection. *Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin*, 43: 933-942.
- Callebaut I, Voneche V, Mager A, Fumiere O, Krchnak V, Merza M, Zavada J, Mammerickx M, Burny A, Portetelle D. 1993. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *Journal of Virology*, 67: 5321-5327.
- Daniel RC, Gatei MH, Good MF, Boyle DB, Lavin MF. 1993. Recombinant viral vaccines for enzootic bovine leucosis. *Immunology and Cell Biology*, 71: 399-404.
- Davydov IaI, Tonevitskiĭ AG. 2009. Linear B-cell epitope prediction. *Molekuliarnaia biologii*, 43: 166-174.
- Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Burny A, Georges M, Van den Broeke A. 2016. Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology*. 13:33.
- Eichmann K, Rajewsky K. 1975. Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *European journal of immunology* 5: 661-666.
- Elemans M, Florins A, Willems L, Asquith B. 2014. Rates of CTL killing in persistent viral infection in vivo. *PLoS Computational Biology*, 10: e1003534.
- Frie MC, Droscha CJ, Greenlick AE, Coussens PM. 2018. MicroRNAs Encoded by Bovine Leukemia Virus (BLV) Are Associated with Reduced Expression of B Cell Transcriptional Regulators in Dairy Cattle Naturally Infected with BLV. *Frontiers in veterinary Science*. 4:245.
- Gatei MH, Good MF, Daniel RC, Lavin MF. 1993. T-cell responses to highly conserved CD4 and CD8 epitopes on the outer membrane protein of bovine leukemia virus: relevance to vaccine development. *Journal of Virology*, 67: 1796-1802.
- Gelhaus A, Forster B, Horstmann RD. 1999a. Evidence for an additional cattle DQB locus. *Immunogenetics*, 49: 879-885.
- Gelhaus A, Forster B, Wipperfurth C, Horstmann RD. 1999b. Evidence for an additional cattle DQA locus, BoLA-DQA5. *Immunogenetics*, 49: 321-327.
- Gillet NA, Florins A, Boxus M, Berteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4: 18.
- Gillet NA, Hamaidia M, de Brogniez A, Gutiérrez G, Renotte N, Reichert M, Trono K, Willems L. 2016. Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo. *PLoS Pathogens*. 12:e1005588.
- Haraguchi S, Good RA, Day NK. 1995. Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunology Today*, 16: 595-603.
- Hill AV. 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annual review of immunology*, 16: 593-617.
- Hsieh JC, Li CY, Hsu WL, Chuang ST. 2019. Molecular Epidemiological and Serological Studies of Bovine Leukemia Virus in Taiwan Dairy Cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 427.
- Ito M, Hayashi K, Adachi E, Minamisawa T, Homma S,

- Koido S, Shiba K. 2014. Combinatorial contextualization of peptidic epitopes for enhanced cellular immunity. *PLoS One*, 9:e110425.
- Jimba M, Takeshima SN, Murakami H, Kohara J, Kobayashi N, Matsuhashi T, Ohmori T, Nunoya T, Aida Y. 2012. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Veterinary Research*, 8: 167.
- Kabeya H, Ohashi K, Ohishi K, Sugimoto C, Amanuma H, Onuma M. 1996. An effective peptide vaccine to eliminate bovine leukaemia virus (BLV) infected cells in carrier sheep. *Vaccine*, 14: 1118-1122.
- Kabeya H, Ohashi K, Onuma M. 2001. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *Journal of Veterinary Medical Science*. 63:703-708.
- Lo CW, Borjigin L, Saito S, Fukunaga K, Saitou E, Okazaki K, Mizutani T, Wada, S, Takeshima SN, Aida Y. 2020. BoLA-DRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. *Viruses*, 12: 352.
- Madden DR. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annual of Review of Immunology*, 13: 587-622.
- Mager A, Masengo R, Mammerickx M, Letesson JJ. 1994. T cell proliferative response to bovine leukaemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values. *The Journal of General Virology*, 75: 2223-2231.
- Mirsky ML, Olmstead CA, Da Y, Lewin HA. 1996. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *Journal of virology*, 70: 2178-2183.
- Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, Matsumoto Y, Kobayashi N, Matsuhashi T, Sentsui H, Aida Y. 2013. Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens*, 81: 72-82.
- Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Yamamoto T, Tsutsui T. 2011. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Veterinary Microbiology*, 148: 84-88.
- Nagaoka Y, Kabeya H, Onuma M, Kasai N, Okada K, Aida Y. 1999. Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. *Cancer Reserch*, 59: 975-981.
- Nekouei O, VanLeeuwen J, Sanchez J, Kelton D, Tiwari A, Keefe G. 2015. Herd-level risk factors for infection with bovine leukemia virus in Canadian dairy herds. *Preventive Veterinary Medical*, 119: 105-113.
- 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: e0174916.
- Ohishi K, Suzuki H, Yamamoto T, Maruyama T, Miki K, Ikawa Y, Numakunai S, Okada K, Ohshima K, Sugimoto M. 1991. Protective immunity against bovine leukaemia virus (BLV) induced in carrier sheep by inoculation with a vaccinia virus-BLV env recombinant: association with cell-mediated immunity. *The Journal of Genenral Virology*, 72: 1887-1892.
- Ohishi K, Suzuki H, Yasutomi Y, Onuma M, Okada K, Numakunai S, Ohshima K, Ikawa Y, Sugimoto M. 1992. Augmentation of bovine leukemia virus (BLV)-specific lymphocyte proliferation responses in ruminants by inoculation with BLV env-recombinant vaccinia virus: their role in the suppression of BLV replication. *Microbiology and Immunology*, 36: 1317-1323.
- Ohno A, Takeshima SN, Matsumoto Y, Aida Y. 2015. Risk factors associated with increased bovine leukemia virus proviral load in infected cattle in Japan from 2012 to 2014. *Virus Research*. 210: 283-290.
- 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 Programmed Death-1 Rat-Bovine Chimeric Antibody for Immunotherapy of Bovine Leukemia Virus Infection in Cattle. *Frontiers in Immunology*. 8: 650.
- Onuma M, Hodatsu T, Yamamoto S, Higashihara M, Masu S, Mikami T, Izawa H. 1984. Protection by

- vaccination against bovine leukemia virus infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 45: 1212-1215.
- Parfanovich MI, Zhdanov VM, Lazarenko AA, Nomm EM, Simovart Yu A, Parakin VK, Lemesh VM. 1983. The possibility of specific protection against bovine leukaemia virus infection and bovine leukaemia with inactivated BLV. *The British Veterinary Journal*, 139: 137-146.
- Polat M, Takeshima SN, Aida Y. 2017. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virology of Journal*, 14: 209.
- Portetelle D, Dandoy C, Burny A, Zavada J, Siakkou H, Gras-Masse H, Drobecq H, Tartar A. 1989. Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *Virology*, 169: 34-41.
- Portetelle D, Limbach K, Burny A, Mammerickx M, Desmettre P, Riviere M, Zavada J, Paoletti E. 1991. Recombinant vaccinia virus expression of the bovine leukaemia virus envelope gene and protection of immunized sheep against infection. *Vaccine*, 9: 194-200.
- Radke K, Grossman D, Kidd LC. 1990. Humoral immune response of experimentally infected sheep defines two early periods of bovine leukemia virus replication. *Microbial and Pathogenesis*, 9: 159-171.
- Reineke U, Schutkowski M. 2009. Epitope mapping protocols. Preface. *Methods in Molecular Biology*, 524: v-vi.
- Sakakibara N, Kabeya H, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M. 1998. Epitope mapping of bovine leukemia virus transactivator protein Tax. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60: 599-605.
- Suh GH, Lee JC, Lee CY, Hur TY, Son DS, Ahn BS, Kim NC, Lee CG. 2005. Establishment of a bovine leukemia virus-free dairy herd in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 6: 227-230.
- Takeshima SN, Aida Y. 2006. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal*, 77: 138-150.
- Takeshima SN, Miki A, Kado M, Aida Y. 2007. Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DQA1 exon 2. *Tissue Antigens*, 69: 189-199.
- Takeshima SN, Giovambattista G, Okimoto N, Matsumoto Y, Rogberg-Munoz A, Acosta TJ, Onuma M, Aida Y. 2015. Characterization of bovine MHC class II DRB3 diversity in South American Holstein cattle populations. *Tissue Antigens*, 86: 419-430.
- Takeshima SN, Matsumoto Y, Aida Y. 2009. Short communication: Establishment of a new polymerase chain reaction-sequence-based typing method for genotyping cattle major histocompatibility complex class II DRB3. *Journal of Dairy Science*, 92: 2965-2970.
- Takeshima SN, Matsumoto Y, Miyasaka T, Arainga-Ramirez M, Saito H, Onuma M, Aida Y. 2011. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens*, 78: 208-213.
- Takeshima SN, Ohno A, Aida Y. 2019. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology*, 16: 14.
- Usui T, Konnai S, Tajima S, Watarai S, Aida Y, Ohashi K, Onuma M. 2003. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65: 1201-1205.
- Willems L, Kerkhofs P, Dequiedt F, Portetelle D, Mammerickx M, Burny A, Kettmann R. 1994. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proceeding of The National Academy of Science of The United States of America*, 91: 11532-11536.
- Yang Y, Fan W, Mao Y, Yang Z, Lu G, Zhang R, Zhang H, Szeto C, Wang C. 2019. Bovine leukemia virus infection in cattle of China: Association with reduced milk production and increased somatic cell score. *Journal of Dairy Science*. 99:3688-3697.
- Yu C, Wang X, Zhou Y, Wang Y, Zhang X, Zheng Y. 2019. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. *BMC Veterinary Research*. 15:179.