

牛の感染免疫に関する最近の知見

今内 覚[†]

北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9)

Recent Findings in Bovine Infection Immunity

Satoru KONNAI[†]*Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan*

1 はじめに

病原微生物の侵入に対して宿主は免疫によって対抗する。牛においても病原微生物に対する感染防御機構は、人やマウスと同様である。すなわち、食細胞を中心とした自然免疫とリンパ球による獲得免疫の協調作用により病原微生物に対抗する。自然免疫系における食細胞による病原体の認識機構は、微生物間で共通の分子構造を抗原非特異的に認識するのに対し、獲得免疫系におけるリンパ球は、受容体の遺伝子再構成により多彩なレパートリーを形成し、微細な抗原構造を特異的に認識する機構を備えている。このようなリンパ球の一部は、免疫を記憶した亜集団へ分化し、病原体の生体内への再侵入時に強い免疫応答を誘導する。このように宿主が備え持つ感染免疫は、非特異的防御のみならず抗原特異性や免疫記憶を有しており、病原体排除に重要な役割を担う。しかし、種々の感染症の中には、予防や治療が困難な感染症がまだ数多く存在する。これらの原因の一つは、病原微生物が免疫回避や攪乱を引き起こし病態が進行することにある。このような感染症に対し有効な治療薬やワクチンを開発するためには、病原体と宿主の相互作用を解明することが重要である。本総説では、どのような異常な免疫応答によって病態が形成され死に至るのか、またどのような免疫回避機構で持続感染が成立し病態を發揮するのか、国内外の感染免疫に関する研究動向を簡単に解説するとともに、これらに関する最近の牛における知見について紹介したい。

2 制御性T細胞

制御性T細胞は、自己組織に対する免疫反応（自己免疫）やアレルギーなどの過剰な免疫応答の抑制を担うT細胞集団を指す [1]。この制御性T細胞は、CD4分子、Interleukin (IL)-2 受容体 α 鎖であるCD25分子及び特異的分子マーカーである転写因子Foxp3を発現し、胸腺内で自然発生する内在性制御性T細胞（naturally occurring regulatory T cell : nTreg）と末梢血中のナイーブT細胞から分化する誘導性制御性T細胞（inducible regulatory T cell : iTreg）に大別される。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞は免疫制御機能を担う一方、自己免疫、移植拒絶反応や病原微生物などの外来抗原に対する免疫反応の抑制にも関わっていると考えられている。その機序としては、リンパ球の増殖や機能発現を抑えるサイトカインであるTransforming growth factor (TGF)- β やTh1細胞やマクロファージの反応を抑えるサイトカインであるIL-10を産生することで免疫応答を抑制することが知られている [2]。あるいは他のT細胞にTGF- β やIL-10の産生を誘導させることによりT細胞の機能を抑制する。さらにCD25を高発現することで、IL-2を枯渇させ、T細胞の活性化を抑制する [2]。この他にも、制御性T細胞は免疫抑制受容体であるCytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4; CD152)を発現しており、抗原提示細胞上のCD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) (B7ファミリー)と結合することで、インドールアミン酸素添加酵素 (Indoleamine 2,3-dioxy-

[†] 連絡責任者：今内 覚 (北海道大学大学院獣医学研究科)

〒060-0818 札幌市北区北18条西9 ☎011-706-5216 FAX 011-706-5217

E-mail : konnai@vetmed.hokudai.ac.jp

[†] Correspondence to : Satoru KONNAI (Department of Disease Control, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo, 060-0818, Japan

TEL 011-706-5216 FAX 011-706-5217 E-mail : konnai@vetmed.hokudai.ac.jp

genase; IDO) を産生させる。IDO はトリプトファンを枯渇させることで特にエフェクターT細胞の増殖を抑制し、キヌレニンを生成することでエフェクターT細胞をアポトーシスに陥らせ、免疫機能を抑制している [3]。またCTLA-4は、同じくCD80/CD86をリガンドとするT細胞活性化を誘導する共刺激分子であるCD28に比べて10～20倍親和性が高く、競合的にCD28とCD80/CD86の結合を阻害することで、T細胞の活性化を抑制していると考えられている [4]。さらにCTLA-4は制御性T細胞だけでなく、活性化したエフェクターT細胞にも発現しており、自己または他のエフェクターT細胞によるIL-2産生を抑制することで免疫応答の収束にも重要な役割を担っている [3]。このようにCTLA-4は、制御性T細胞やエフェクターT細胞に発現して過剰な免疫応答を抑制する機能を持つと考えられる。一方、制御性T細胞は生体における免疫応答の調節に必要不可欠なものであるが、ウイルスなどの外来抗原に対する免疫応答、すなわち感染免疫において制御性T細胞による抑制機能が病態の増悪に関与することも報告されている。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染症ではCD3⁺CD4⁺T細胞におけるCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞の割合が増加し、ウイルス量と正の相関を示すことが報告されている [5]。さらにHIV感染症のすべての病態においてCD4⁺T細胞、特にHIVに感染しているCD4⁺T細胞ではCTLA-4の発現上昇が起り、病態進行やウイルス量と正の相関があることや [6]、HIV感染症の病態進行に伴いCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞でのCTLA-4の発現が上昇することも報告されている [5]。加えて、サル免疫不全ウイルス (SIV) 感染症では、腸間膜や鼠径リンパ節などでCD4⁺細胞におけるCTLA-4やFoxp3、さらに制御性T細胞によって誘導される酵素であるIDOの発現が増加し、ウイルス量と正の相関を示すことも明らかにされている [7]。C型肝炎ウイルス (HCV) においても、肝臓に局在するCD8⁺T細胞におけるCTLA-4の発現上昇が報告されている [8]。このように慢性感染症においてCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞及びCTLA-4は病態の進行に深く関与しており、病原体はこれらの免疫抑制機能を利用して生体からの排除を免れていると考えられる。この他に、トリパノソーマ感染症においてもCTLA-4の発現上昇が重篤な病態進行に関与しているとの報告がある [9]。

牛の感染症の病態形成における制御性T細胞の関与は、ヨーネ病 [10-12] やネオオスオスポラ症等 [13, 14] の限られた疾患で報告がされているが、完全な解明には至っていない。ヨーネ病は非結核性抗酸菌群のヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) の経口感染により起り、長い不顕性感染期と難治性の慢性下痢を特徴とする牛及び反芻獣の疾病である。分娩1

～数週間後の発症が多く、慢性肉芽腫性腸炎による慢性的な下痢、消瘦、泌乳量の低下を呈し、発症数月から1年以内に死亡する。ヨーネ病における制御性T細胞の関与は古くにChiodiniら [15, 16] によって報告され、感染牛由来の制御性T細胞は、菌体抗原に対するCD4⁺細胞の増殖反応を抑制することが確認されている。さらにValheimら [10] はリンパ節のCD25⁺細胞が増加すると、末梢での菌体抗原に対する免疫反応が減弱することも報告した。しかし、この時点では、牛のCD25⁺細胞が制御性T細胞に相当するものかは明確ではなかった。その後、Seoら [17] は牛のFoxp3特異抗体を樹立し、牛のCD4⁺CD25⁺細胞もまたマウスや人と同じように抑制性の機能を保有することを示している。de Almeidaら [11] はヨーネ菌感染牛由来検体を用いたCD4⁺細胞やCD25⁺細胞の欠損試験によりIL-10が減少することからIL-10の産生細胞は制御性T細胞であること、制御性T細胞の欠損試験やIL-10抗体を用いた抑制試験によってInterferon (IFN)- γ が上昇することからヨーネ病に認められる液性免疫優位の環境は制御性T細胞の関与することを示している。興味深いことにCoussensら [12] の最近の知見では、ヨーネ病の病理発生には、牛白血病ウイルス (BLV) の重複感染が関与している可能性を示唆している。すなわちBLVとの重複感染牛ではリンパ節内等の制御性T細胞の数が劇的に減少しており、これが慢性肉芽腫性腸炎などの炎症の惹起に関与しているとしている。一方で、Suzukiら [18, 19] が行ったBLV感染牛の病態別における制御性T細胞の動態解析では、病態進行に伴いFoxp3⁺CD4⁺細胞及びFoxp3⁺CD25⁺細胞が有意に増加しIFN- γ の減少やTGF- β の増加に伴う免疫抑制と相関していること、さらに制御性T細胞上のCTLA-4発現も病態進行につれて有意に発現が上昇しており、制御性T細胞は免疫不全を伴うBLV感染牛の病態進行に深く関与していることを報告している。牛の制御性細胞に関しては、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T細胞より、WC1.1⁺やWC1.2⁺をおもな分画とするGamma-delta ($\gamma\delta$) T細胞 [20] やCD14⁺細胞の方がIL-10の産生が多く、より免疫抑制能を持つとした報告もされており大変興味深い [21]。前述のSuzukiらは、さらにBLV感染牛におけるWC1.1⁺、WC1.2⁺及びCD14⁺細胞におけるCTLA-4の発現解析も行っている。これらの分画では末梢血単核球 (PBMCs) と比較してCTLA-4発現細胞数の割合は高く、CD4⁺細胞中のCTLA-4⁺細胞の割合と同程度またはそれ以上であることを報告している。またBLV感染牛におけるCTLA-4発現WC1.1⁺、WC1.2⁺細胞数やCTLA-4発現量はBLV非感染牛に比べ増加している傾向を示し、WC1.1⁺やWC1.2⁺細胞におけるCTLA-4の発現がBLVの病態進行にも関与している可能性がある

としている [19]。既述のHoekら [21] の報告のように $\gamma\delta$ -T細胞の制御性T細胞としての機能が報告されている一方、Lundbergら [22] により $\gamma\delta$ -T細胞の細胞傷害性も報告されている。興味深いことに、種々の病態を呈するBLV感染牛由来の $\gamma\delta$ -T細胞を用いてウイルス由来のenv発現線維芽細胞に対する細胞傷害性試験を行った結果、感染していても病態が進まない牛では $\gamma\delta$ -T細胞が抗ウイルス作用を発揮すること、病態が進行している牛由来の細胞では細胞傷害性を持たないことを報告している。Murakamiら [23] は、病態が進行しているBLV感染牛に対してIFN- γ の生体投与試験を行い、抗ウイルス作用は末梢血中の $\gamma\delta$ -T細胞数の増加により発揮されることを報告している。このように、体表や粘膜での病原体排除に関わるとされてきた $\gamma\delta$ -T細胞は、牛でも感染免疫に重要であることが示唆されている。しかし、牛を含めた反芻獣や鳥類で多く認められる $\gamma\delta$ -T細胞は動物固有の免疫反応の担い手として注目された時期もあるが、その後の詳細な解析はほとんど進んでいない。今後の牛の種々の感染症における $\gamma\delta$ -T細胞の変化を解析し、より詳細な免疫機能について検討する必要がある。

3 サイトカイン産生異常による病態形成

サイトカインは生体の恒常性の維持や病原微生物の排除に非常に重要な因子である。しかし、過剰な産生は生体を傷つけ、時には死に至らしめる要因となりうる表裏一体の因子でもある。このような炎症性サイトカインを主とする各種サイトカインが過剰産生される現象をサイトカインストームといい人の種々の重篤疾患（高病原性鳥インフルエンザ [24]、出血熱 [25]、マラリア [26]、重症急性呼吸器症候群 [27] など）においては臨床症状や致死率と密接に関わることが報告されている。人やマウスモデルでは、サイトカインストームを誘引する病原体因子やマクロファージ系細胞等を主とするサイトカイン産生細胞の同定などサイトカインストーム発生機序の解明が進んでいる [28, 29]。

Theileria parva (*T. parva*) は牛に感染する血液原虫で東海岸熱の起因病原体である。アフリカ大陸東部に分布するコイトマダニによって媒介される*T. parva*は感染すると、10～20日の期間内で顕性化しリンパ節腫脹、41℃以上の熱発、削瘦、重度の肺水腫による呼吸不全等の症状が現れ、肺や消化管、肝臓への感染リンパ球の浸潤によって多臓器不全が引き起こされ死に至る。感受性牛での致死率は70～100%にも至り、現在もなおアフリカの畜産生産に深刻な影響を与え続けている [30]。このような劇症型の症状と非常に高い致死率の所以は、サイトカインストームによるものであることが報告されている。Yamadaら [31] の*T. parva*実験感染牛を用

いたサイトカインプロファイルの解析では、感染後の原虫の増殖に伴い炎症性サイトカインであるTumor necrosis factor (TNF)- α が10倍以上に発現上昇すること、さらにIL-6、IL-10においては30倍以上の爆発的増加が認められている。このような炎症性サイトカインの過剰産生は臨床症状の重篤度と相関する一方、細胞性免疫の担い手であるIL-2やIFN- γ の産生を抑制し原虫増殖を許容する状態に陥っていることが報告されている [31]。このような劇症型の症状は、牛への実験的なIL-6やTNF- α の投与実験で認められる全身性の激しい炎症、発熱やリンパ節の腫脹 [32, 33] などと一致し過剰な炎症性サイトカインが東海岸熱の重篤な病態形成の原因となることを示唆している。同様に牛に致死的なタイレリア症を引き起こす*T. annulata*でも、*in vitro*条件ではあるが、TGF- β が原虫の増殖環境及び炎症反応を規定し、その後の病態形成に関与する可能性が報告されている [34]。他の感染症では、牛にスーラ病を起こす*Trypanosoma evansi* (*T. evansi*)の牛への感染実験でTNF- α の過剰な発現亢進が確認され、白血球数の急激な減少（白血球減少症）や貧血誘発の病理発生機序の一つとして考えられている [35]。*T. evansi*は、世界の熱帯・温帯地域に幅広く分布する血液原虫で、家畜に消耗性疾患であるスーラ病を起こす。フィリピン共和国では肝蛭症に次ぐ家畜被害が報告されており畜産生産上深刻な影響を与えている。また近年、病原性の強い株や薬剤耐性株の流行が示唆されているがその詳細は不明である。TNF- α の過剰な産生による貧血症状等の病態悪化は他の牛に感染するトリパノソーマ症でも確認されている [36]。Mekataら [37] は牛や水牛からの*T. evansi*分離株を用いてマウスに接種したところ、制御性樹状細胞が抑制されることで炎症性の反応が亢進することを報告している。また、*T. evansi*実験感染牛の末梢血中においても炎症制御に関与するchemokine CCL8やIL-10の発現増加が認められることから、マウス同様に牛でも制御性樹状細胞が*T. evansi*感染の病態形成に関与している可能性があるとしている [36]。このように、牛の劇症型感染症でも、サイトカインストームによる病態形成が確認されている。しかし、どのような病原体因子により、このような過剰なサイトカイン産生が促されるかは明らかではなく、さらなる病態発生機序の解明が必要であると考えられる。

興味深いことに、このような悪性病原体に感染したすべての牛が死に至るわけではない。すなわち、いわゆる疾病抵抗性の牛も存在する。既述のChaussepiedら [34] は、感受性種では致死的な*T. annulata*感染において、抵抗性牛由来の細胞を用いて原虫に対する免疫応答に関わる遺伝子発現及び機能解析を行っている。その結果、TGF- β 発現誘導の差が*T. annulata*に対する疾

病感受性を規定しているとしている。一方、同じ牛属でアフリカサハラ砂漠以南に分布するアフリカ水牛 (*Syncerus caffer*) は、種々の疾病に対して抵抗性を示す、アフリカ水牛は上記の *T. parva* や *T. evansi* をはじめ種々の牛の悪性伝染病病原体のレゼルボアとして機能することが報告されている [38, 39]。 *T. parva* 原虫感染アフリカ水牛を解析した報告では、高度な原虫血症を呈しているにもかかわらず、原虫感染牛で認められた炎症性サイトカインの過剰発現は確認されず *T. parva* に対する疾患感受性の違いを示す極端な例として紹介されている [40]。同じ病原体に対して異なる疾患感受性を示す品種間の解析は、将来的な疾病抵抗性家畜の樹立に寄与すると考えられており、詳細な遺伝子背景や免疫応答など今後の機序解明が待たれる。

4 リンパ球の免疫疲弊

Programmed death 1 (PD-1) と Programmed death-ligand 1 (PD-L1) は、近年同定された細胞膜上の免疫抑制受容体とそのリガンドであり B7-CD28 ファミリーに属している [41]。人において、PD-1 はおもに活性化 T 細胞や B 細胞の細胞膜に発現している。また、休止期の T 細胞では発現が確認されないが、活性化により誘導されることが報告されている [42]。一方、PD-L1 は活性化 T 細胞、樹状細胞、単球、血管内皮細胞、肝臓の間質細胞、角質細胞など、造血系に限らず非造血系の細胞にも広く発現している。この 2 つの分子からなる PD-1/PD-L1 機構は T 細胞による過剰な免疫反応を抑制し、免疫寛容にも強く関与していることが解明されている [42]。PD-1 の細胞内領域には、免疫抑制レセプターの細胞内に見られる immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM; I/L/V/S/TxYxxL/V/I) が 2 カ所存在する。PD-1 と PD-L1 が結合すると ITIM によって 2 つのチロシン脱リン酸化酵素 (SH2-Containing protein tyrosine phosphatase : SHP)-1 及び SHP-2 が誘導され、抑制性シグナルが細胞内に伝達される。この抑制性シグナルが、近傍の CD3/CD28 からの活性化シグナルを阻害することで IL-2, TNF- α や IFN- γ などのサイトカインの転写活性を低下させ免疫寛容が起こっていると考えられている [41]。通常の生体内、たとえば胎盤などの免疫学的寛容が起きやすい組織では PD-L1 が恒常的に発現しており、自己抗原反応性 T 細胞の PD-1 と結合することで、免疫系システムによる破壊から正常組織を保護している [43]。獲得免疫によって導かれたエフェクター細胞が、標的抗原が存在するにもかかわらず細胞性免疫の機能を発揮しない場合がある。おもに難治性の慢性感染症や腫瘍疾患で認められる現象であり、この状態をリンパ球の疲弊化という。近年の研究から PD-1/PD-L1 機構を代表とする種々の免疫

抑制因子が、この免疫疲弊化に強く関与することが示唆され、難治性疾病の病態進行及び維持に関連することが明らかにされている。すなわち、PD-1 が、抗原特異的 T 細胞 (エフェクター細胞) 上で発現が上昇し、感染細胞や腫瘍細胞で発現した PD-L1 と結合することでエフェクター細胞の免疫疲弊化を誘導する。結果的に PD-1 からの抑制性シグナルを受けた T 細胞は抗原提示などの活性化刺激を受けても反応しない無応答 (アネルギー) に陥り、細胞増殖能、サイトカイン産生能、パーフォリンやグランザイム依存性の細胞傷害機能が著しく低下する。慢性感染症の例をあげると、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 感染 [44], HIV 感染 [45], ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染 [46], B 型及び C 型肝炎 [47, 48], エプスタイン・バー・ウイルス (EBV) 感染 [49], 結核 [50], リステリア症 [51], マラリア [52], トキソプラズマ等 [53] で報告されている。また、慢性感染症だけではなく、メラノーマ、非小細胞肺癌、ホルモン療法耐性前立腺がん、腎細胞がん、大腸がんなどの種々腫瘍性疾患においても PD-1/PD-L1 機構の関連が示唆されている [54]。このように PD-1/PD-L1 機構は免疫異常を呈するさまざまな疾患において、非常に重要な役割を果たしている。感染症や腫瘍疾患における PD-1 及び PD-L1 発現上昇の機序は①同一抗原の持続的的刺激、②病原体由来因子による制御、③ IL-2 や IL-7 などのサイトカイン環境などによるものと示唆されているが、広範囲な病原体種や癌種に及んで認められている現象から詳細についてはいまだ明らかにされていない [55]。また近年の解析で、抗原特異的リンパ球に発現する Lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (Tim-3) などの PD-1/PD-L1 機構以外の免疫抑制因子についても免疫疲弊化への関与が示唆され、現在解析が進められている [56]。一方、この免疫疲弊化は可逆的であることから、抗体等を用いて抗原特異的リンパ球の免疫賦活化を図る研究も行われている。同制御法の特徴はサイトカインの単独投与とは異なり、抗原特異的なエフェクター細胞を標的とすることから細胞増殖能をはじめ種々のサイトカインの誘導及び細胞傷害機能など多機能的な効果により抗病原体効果や抗腫瘍効果が発揮されることにある。各種動物感染モデルや腫瘍モデルにおいても、免疫抑制因子に対する抗体の投与によって細胞性免疫が再活性化され病原体の排除効果や腫瘍の退縮並びに延命効果が報告されている [57]。また、人においては、種々の腫瘍患者の PD-1/PD-L1 機構を標的とした抗体療法が第 I 相臨床試験まで行われ、良好な抗腫瘍効果等が報告されている。現在、本法を改変した新規治療法の治験が次々と追隨している [58]。

獣医畜産領域での免疫疲弊の研究は、ほとんど行われておらず、唯一、BLV感染症においてウイルス動態や病態進行とPD-1をはじめとする免疫抑制因子の発現が密接に関与していることが報告されている。BLV感染症は感染後、無症状期 (AL)、持続性リンパ球増多症期 (PL) を経てB細胞の白血病 (地方病型牛白血病: EBL) を発症する。この病態進行にはウイルスの排除に必要なサイトカインの産生能やリンパ球の機能が低下するなど細胞性免疫の抑制が顕著である。BLV感染牛の病態別に比較解析した報告ではPL牛ではAL牛と比較して、IFN- γ 、IL-2、IL-12などTh1サイトカイン発現が低下することや、EBL牛及びPL牛のCD4⁺T細胞はBLV抗原に対する幼若化反応性が低下すること、EBL及びPL牛由来PBMCsでIL-10の発現が上昇し液性免疫へ移行していることが明らかになっている [59]。これらの報告により感染牛の病態進行には細胞性免疫の低下を主とする免疫抑制が大きく関与すると考えられてきたが病態発生機序については明らかではなかった。Ikebuchiら [60, 61] は、各病態におけるPD-1及びPD-L1の発現解析より、病態が進むに伴いPD-1はCD4及びCD8陽性細胞、PD-L1はB細胞上で発現が亢進していることを報告し、PD-L1の発現は白血球数、ウイルス力価及びプロウイルス量と有意な正の相関を示す一方、免疫抑制の指標であるIFN- γ 発現量には有意に負の相関を示しPD-1/PD-L1が免疫抑制機序の一端であることを報告している [61]。また、LAG-3についてもBLV感染症に認められる免疫疲弊化との関連が示唆されている。LAG-3は構造上CD4抗原に非常に近縁な、細胞膜表面上の膜貫通蛋白質であり免疫グロブリンスーパーファミリーに属する重要なT細胞の恒常的制御因子として同定されている。人やマウスではおもに活性化T細胞に発現することが明らかとなっており、その細胞内領域には免疫抑制シグナルに重要なKIEELEモチーフが人やマウスで保存されている [62]。LAG-3はCD4に比べて100倍以上の高い親和性で主要組織適合抗原 (Major histocompatibility complex: MHC) クラスII分子と結合することでT細胞内に免疫抑制シグナルを送り、その機能抑制や恒常性維持に寄与している [63]。LAG-3も慢性感染症や腫瘍疾患において、その病態進行及び維持に関連することが報告されている [64]。Shiraiら [65] は、牛のLAG-3遺伝子を同定し、BLV感染牛における発現解析を行っている。その結果、感染牛でリンパ球のLAG-3の発現が亢進していることを報告している。また、病態別の解析では、発現細胞数には差が認められなかったが、病態が進むにつれてリンパ球上のLAG-3発現量が上昇していることを明らかにし、BLV感染によりB細胞上の発現が上昇するMHC-class II (LAG-3リガンド) との相互作用が免疫抑制機

序の一つではないかとしている [66]。さらにOkagawaら [67] は、新規の牛の免疫抑制因子であるTim-3について報告を行っている。Tim-3は、Timファミリーに属する細胞膜表面上の膜貫通蛋白質であり、CD4⁺Th1細胞の抑制性制御因子として同定されている [68]。その細胞内領域にはチロシンキナーゼリン酸化部位が存在し、Tim-3はチロシンキナーゼ型受容体として機能する [68]。Tim-3のリガンドとしてはレクチンの一種であるガレクチン-9 (Gal-9) が報告されておりTim-3の糖鎖を認識して結合する [69]。Tim-3はGal-9と結合することで細胞内へのカルシウム流入を誘導し、Tim-3⁺T細胞内にシグナルを送ることで、Th1サイトカインや炎症性サイトカインの分泌及び細胞増殖を抑制するとともに、T細胞に対して細胞死を誘導する [69]。Tim-3は特にIFN- γ を分泌するTh1細胞において高く発現しているため、このTh1細胞が選択的に細胞死を誘導され、細胞性免疫が抑制される [69]。Tim-3は、マウスのLCMVの慢性感染時にLCMV特異的CD8⁺T細胞において高発現していることが報告されている [70]。このLCMV特異的CD8⁺T細胞の大部分はPD-1とも共発現しており、Tim-3経路とPD-1経路の双方により抗ウイルスサイトカインであるIFN- γ やIL-2、TNF- α の産生が抑制され、抑制性サイトカインであるIL-10の産生が促進される。また、HIV感染CD4⁺T細胞やHIV特異的CD8⁺T細胞において、病態進行に伴いTim-3の発現が上昇し、T細胞の疲弊化を促進しているという報告もある [71]。C型肝炎においてもTim-3とPD-1の発現によるCD4⁺T細胞やHCV特異的CD8⁺T細胞の機能抑制と病態との関連が示唆されている [72, 73]。Okagawaら [67] は病態別にBLV感染牛のCD4⁺及びCD8⁺細胞におけるTim-3及びリガンドであるGal-9の発現量を解析した結果、病態進行に伴い上昇し、IL-2やIFN- γ の産生抑制の原因の一つであることを報告している。免疫異常を呈する牛の疾患は多いが、機序についてはほとんど明らかになっていない。今後、他の牛の感染症における免疫疲弊化についてより詳細な研究解析が待たれる。また既述のように人ではPD-1またはPD-L1抗体の投与により、疲弊化に陥った免疫細胞の再活性化を誘導し、慢性感染症や腫瘍疾患への治療効果を増強する可能性が示唆されている。現在行われている人の臨床応用研究において、PD-1またはPD-L1抗体投与される際に懸念される副作用は報告されていない。今後、牛病を含めた獣医畜産領域への応用が期待される。

5 おわりに

牛の免疫学研究は、人やマウスの研究に比べかなりの後進研究であることは否めない。これは牛を対象とする

基礎免疫及び臨床免疫研究者の絶対的な数の少なさに加え、研究に不可欠な牛特異的な抗体や試薬の欠如などが影響している。たとえば、種々の免疫応答の解析には抗原特異的な反応か否かの評価が求められ、人やマウスではエピトープペプチド-MHC テトラマー等を用いた解析が日々行われている。しかし、MHC テトラマーによる解析は、雑種である牛ではほぼ不可能であり抗原特異的免疫の証明がきわめて困難な状態にある。牛の疾病も人と同様にワクチンによる制御が理想であるが、ワクチン不在の牛の疾病はまだ多い。経済動物を対象とする場合、新規ワクチン・治療薬の開発研究には臨床応用時のコスト面を常に考慮せねばならない。その結果、病態解析や開発研究が進まず、いまだ摘発・淘汰に頼ることも多い。しかし、淘汰一辺倒の制御法からの打開も必要であり、そのためには免疫学的アプローチによる病態解明は必須である。世界中には種々の牛の感染症が存在し、今なお生産性低下の一因となっている。それら起因病原体の種類はさまざまであるが、その病原体に対する宿主の免疫応答もさらにさまざまである。今後、各疾病のさらなる病態発症機序の解明がなされ、新たな制御法確立への道が開かれることが望まれる。今回は、限られたごく一部の牛の感染免疫に関する知見を紹介した。このような動物を対象とする免疫学的知見は国際獣医免疫シンポジウムで活発な討論がなされており、前回（2010年）は東京で開催されている。なお、第10回国際獣医免疫シンポジウム（10th IVIS International Veterinary Immunology Symposium）は2013年8月28日から9月1日にイタリア・ミラノで開催される。

引用文献

- [1] Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT : Role of regulatory T cells in allergy and asthma, *Curr Opin Immunol*, 15, 627-633 (2003)
- [2] 矢田純一 : 2. 免疫制御T細胞, 医系免疫学, 第11版, 498-501, 中外医学社, 東京 (2009)
- [3] Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S : Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation, *Trends Immunol*, 32, 428-433 (2011)
- [4] Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK : Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes, *J Exp Med*, 176, 1595-1604 (1992)
- [5] Zhang Z, Jiang Y, Zhang M, Liu J, Sun G, Shi W, Wang Y, Shang H : Alterations of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in HIV-infected slow progressors of former blood donors in China, *Microbiol Immunol*, 54, 625-633 (2010)
- [6] Kaufmann DE, Walker BD : PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention, *J Immunol*, 182, 5891-5897 (2009)
- [7] Boasso A, Vaccari M, Hryniewicz A, Fuchs D, Nacsa J, Cecchinato V, Andersson J, Franchini G, Shearer GM, Chougnet C : Regulatory T-cell markers, indoleamine 2, 3-dioxygenase, and virus levels in spleen and gut during progressive simian immunodeficiency virus infection, *J Virol*, 81, 11593-11603 (2007)
- [8] Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM : Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade, *PLoS Pathog*, 5, e1000313 (2009)
- [9] Graefe SEB, Jacobs T, Wächter U, Bröker BM, Fleischer B : CTLA-4 regulates the murine immune response to *Trypanosoma cruzi* infection, *Parasite Immunol*, 26, 19-28 (2004)
- [10] Valheim M, Hasvold HJ, Storset AK, Larsen HJ, Press CM : Localisation of CD25⁺ cells and MHCII⁺ cells in lymph nodes draining *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccination granuloma and the presence of a systemic immune response, *Res Vet Sci*, 73, 77-85 (2002)
- [11] de Almeida DE, Colvin CJ, Coussens PM : Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis, *Vet Immunol Immunopathol*, 125, 234-245 (2008)
- [12] Coussens PM, Sipkovsky S, Murphy B, Roussey J, Colvin CJ : Regulatory T cells in cattle and their potential role in bovine paratuberculosis, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 35, 233-239 (2012)
- [13] Almería S, Serrano B, Yániz JL, Darwich L, López-Gatius F : Cytokine gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from *Neospora caninum* naturally infected dams throughout gestation, *Vet Parasitol*, 183, 237-243 (2012)
- [14] Almería S, Araujo RN, Darwich L, Dubey JP, Gasbarre LC : Cytokine gene expression at the materno-fetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation, *Parasite Immunol*, 33, 517-523 (2011)
- [15] Chiodini RJ, Davis WC : The cellular immunology of bovine paratuberculosis : the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4⁺ activity, *Microb Pathog*, 13, 447-463 (1992)
- [16] Chiodini RJ, Davis WC : The cellular immunology of bovine paratuberculosis : immunity may be regulated by CD4⁺ helper and CD8⁺ immunoregulatory T lymphocytes which down-regulate gamma/delta⁺ T-cell cytotoxicity, *Microb Pathog*, 14, 355-367 (1993)
- [17] Seo KS, Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, Bohach GA : Development of monoclonal antibodies to detect bovine FOXP3 in PBMCs exposed to a *staphylococcal superantigen*, *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 30-36 (2009)
- [18] Suzuki S, Konnai K, Okagawa T, Ikebuchi R, Shirai T, Sunden Y, Mingala CN, Onuma M, Murata S, Ohashi

- K : Evidence of Tregs involvement during progression of bovine leukemia virus infection, (*in submission*)
- [19] Suzuki S, Konnai K, Okagawa T, Ikebuchi R, Shirai T, Sundén Y, Mingala CN, Onuma M, Murata S, Ohashi K : Increased expression of regulatory T cell-associated marker, CTLA-4, during bovine leukemia virus infection, (*in submission*)
- [20] Davis WC, Brown WC, Hamilton MJ, Wyatt CR, Orden JA, Khalid AM, Naessens J : Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR, *Vet Immunol Immunopathol*, 52, 275-283 (1996)
- [21] Hoek A, Rutten VP, Kool J, Arkesteijn GJ, Bouwstra RJ, Van Rhijn I, Koets AP : Subpopulations of bovine WC1⁺ gammadelta T cells rather than CD4⁺ CD25^{high}Foxp3⁺ T cells act as immune regulatory cells *ex vivo*, *Vet Res*, 40, 6 (2009)
- [22] Lundberg P, Splitter GA : gammadelta (+) T-Lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host, *J Virol*, 74, 8299-8306 (2000)
- [23] Murakami K, Sentsui H, Inoshima Y, Inumaru S : Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma, *Vet Immunol Immunopathol*, 101, 61-71 (2004)
- [24] To KF, Chan PK, Chan KF, Lee WK, Lam WY, Wong KF : Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus, *J Med Virol*, 63, 242-246 (2001)
- [25] Baize S, Leroy EM, Georges AJ, Georges-Courbot MC, Capron M, Bedjabaga I, Lansoud-Soukate J, Mavoungou E : Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients, *Clin Exp Immunol*, 128, 163-168 (2002)
- [26] Hirunpetcharat C, Finkelman F, Clark IA, Good MF : Malaria parasite-specific Th1-like T cells simultaneously reduce parasitemia and promote disease, *Parasite Immunol*, 21, 319-329 (1999)
- [27] Huang KJ, Su IJ, Theron M, Wu YC, Lai SK, Liu CC, Lei HY : An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients, *J Med Virol*, 75, 185-194 (2005)
- [28] Ghosh K, Shetty S : Blood coagulation in falciparum malaria--a review, *Parasitol Res*, 102, 571-576 (2008)
- [29] Sriskandan S, Altmann DM : The immunology of sepsis, *J Pathol*, 214, 211-223 (2008)
- [30] Norval RAI, Perry BD, Young AS, The Epidemiology of Theileriosis in Africa, 481, Academic Press, London (1992)
- [31] Yamada S, Konnai S, Imamura S, Simuunza M, Chembensofu M, Chota A, Nambota A, Onuma M, Ohashi K : Quantitative analysis of cytokine mRNA expression and protozoan DNA load in *Theileria parva*-infected cattle, *J Vet Med Sci*, 71, 49-54 (2009)
- [32] Bielefeldt Ohmann H, Campos M, Snider M, Raipin N, Beshkorwayne T, Popowych Y, Lawman MJ, Rossi A, Babiuk LA : Effect of chronic administration of recombinant bovine tumour necrosis factor to cattle, *Vet Pathol*, 26, 462-472 (1989)
- [33] Jongen-Lavrencic M, Peeters HRM, Rozemuller H, Rombouts WJC, Martens ACM, Vreugdenhil G, Pillay M, Cox PH, Bijser M, Brutel G, Breedveld FC, Swaak AJG : IL-6-induced anaemia in rats : possible pathogenic implications for anaemia observed in chronic inflammations, *Clin Exp Immunol*, 103, 328-334 (1996)
- [34] Chaussepied M, Janski N, Baumgartner M, Lizundia R, Jensen K, Weir W, Shiels BR, Weitzman JB, Glass EJ, Werling D, Langsley G : TGF- β 2 induction regulates invasiveness of *Theileria*-transformed leukocytes and disease susceptibility, *PLoS Pathog*, 6, e1001197 (2010)
- [35] Mekata H, Konnai S, Mingala CN, Abes NS, Gutierrez CA, Dargantes AP, Witola WH, Inoue N, Onuma M, Murata S, Ohashi K : Isolation, cloning and pathologic analysis of *Trypanosoma evansi* field isolates (*in submission*).
- [36] Sileghem M, Flynn JN, Logan-Henfrey L, Ellis J : Tumour necrosis factor production by monocytes from cattle infected with *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* : possible association with severity of anaemia associated with the disease, *Parasite Immunol*, 16, 51-54 (1994)
- [37] Mekata H, Konnai S, Mingala CN, Abes NS, Gutierrez CA, Dargantes AP, Witola WH, Inoue N, Onuma M, Murata S, Ohashi K : Kinetics of regulatory dendritic cells in inflammatory responses during *Trypanosoma evansi* infection, *Parasite Immunol*, 34, 318-329 (2012)
- [38] Munang'andu HM, Siamudaala V, Matandiko W, Mulumba M, Nambota A, Munyeme M, Mutoloki S, Nonga H : Detection of *Theileria parva* antibodies in the African buffalo (*Syncerus caffer*) in the livestock-wildlife interface areas of Zambia, *Vet Parasitol*, 166, 163-166 (2009)
- [39] Moloo SK, Orinda GO, Sabwa CL, Minja SH, Masake RA : Study on the sequential tsetse-transmitted *Trypanosoma congolense*, *T. brucei brucei* and *T. vivax* infections to African buffalo, eland, waterbuck, N'Dama and Boran cattle, *Vet Parasitol*, 80, 197-213 (1999)
- [40] Okagawa T, Konnai S, Mekata H, Githaka N, Suzuki S, Kariuki E, Gakuya F, Kanduma E, Shirai T, Ikebuchi R, Ikenaka Y, Ishizuka M, Murata S, Ohashi K : Transcriptional profiling of inflammatory cytokine genes in African buffaloes (*Syncerus caffer*) infected with *Theileria parva*, *Vet Immunol Immunopathol*, 148, 373-379 (2012)
- [41] Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu YC, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D : PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 zeta signalosome and downstream signaling to PKC theta,

- FEBS Letters, 574, 37-41 (2004)
- [42] Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH : PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26, 677-704 (2008)
- [43] Holets LM, Carletti MZ, Kshirsagar SK, Christenson LK, Petroff MG : Differentiation-induced post-transcriptional control of B7-H1 in human trophoblast Cells, *Placenta*, 30, 48-55 (2009)
- [44] Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu BG, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R : Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection, *Nature*, 439, 682-687 (2006)
- [45] Wang XC, Zhang Z, Zhang SY, Fu JL, Yao JX, Jiao YM, Wu H, Wang FS : B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection, *Eur J Immunol*, 38, 3226-3236 (2008)
- [46] Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, Akimoto M, Suzuki S, Matsushita K, Uozumi K, Tei C, Arima N : PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients, *Leukemia*, 23, 375-382 (2009)
- [47] Chen LG, Zhang Z, Chen WW, Zhang ZD, Li YG, Shi M, Zhang JY, Chen LP, Wang SD, Wang FS : B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B, *J Immunol*, 178, 6634-6641 (2007)
- [48] Jeong HY, Lee YJ, Seo SK, Lee SW, Park SJ, Lee JN, Sohn HS, Yao S, Chen L, Choi I : Blocking of monocyte-associated B7-H1 (CD274) enhances HCV-specific T cell immunity in chronic hepatitis C infection, *J Leukoc Biol* 83, 755-764 (2008)
- [49] Greenough TC, Campellone SC, Brody R, Jain S, Sanchez-Merino V, Somasundaran M, Luzuriaga K : Programmed Death-1 expression on Epstein Barr virus specific CD8⁺ T cells varies by stage of infection, epitope specificity, and T-cell receptor usage, *PLoS One*, 5, e12926 (2010)
- [50] Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, Martínez GJ, Quiroga MF, Abbate E, Musella RM, Chuluyan HE, García VE. Programmed death (PD)-1 : PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis, *J Immunol*, 181, 116-125 (2008)
- [51] Yao S, Wang S, Zhu Y, Luo L, Zhu G, Flies S, Xu H, Ruff W, Broadwater M, Choi IH, Tamada K, Chen L : PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection, *Blood*, 113, 5811-5818 (2009)
- [52] Butler NS, Moebius J, Pewe LL, Traore B, Doumbo OK, Tygrett LT, Waldschmidt TJ, Crompton PD, Harty JT : Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection, *Nat Immunol*, 13, 188-195 (2011)
- [53] Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA : Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8⁺ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade, *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 9196-9201 (2011)
- [54] Blank C, Gajewski TF, Mackensen A : Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion : implications for tumor immunotherapy, *Cancer Immunol Immunother*, 54, 307-314 (2005)
- [55] Kaufmann DE, Walker BD : PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention, *J Immunol*, 182, 5891-5897 (2009)
- [56] Khaitan A, Unutmaz D : Revisiting immune exhaustion during HIV infection, *Curr HIV/AIDS Rep*, 8, 4-11 (2011)
- [57] Velu V, Titanji K, Zhu BG, Husain S, Pladevega A, Lai LL, Vanderford TH, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR : Enhancing SIV-specific immunity *in vivo* by PD-1 blockade, *Nature*, 458, 206-210 (2009)
- [58] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM : Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity, *Curr Opin Immunol*, 24, 207-212 (2012)
- [59] Kabeya H, Ohashi K, Onuma M : Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection, *J Vet Med Sci*, 63, 703-708 (2001)
- [60] Ikebuchi R, Konnai S, Sunden Y, Onuma M, Ohashi K : Molecular cloning and expression analysis of bovine programmed death-1, *Microbiol Immunol*, 5, 291-298 (2010)
- [61] Ikebuchi R, Konnai S, Shirai T, Sunden Y, Murata S, Onuma M, Ohashi K : Increase of cells expressing PD-L1 in bovine leukemia virus infection and enhancement of anti-viral immune responses *in vitro* via PD-L1 blockade, *Vet Res*, 42, 103 (2011)
- [62] Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DA : Cutting edge : molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3, *J Immunol*, 169, 5392-5395 (2002)
- [63] Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F : CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins, *Eur J Immunol*, 25, 2718-2721 (1995)
- [64] Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ : Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection, *Nature Immunol*, 10, 29-37 (2009)
- [65] Shirai T, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Suzuki S, Sunden Y, Onuma M, Murata S, Ohashi K : Molecular cloning of bovine lymphocyte activation gene-3 and its expression characteristics in bovine leukemia virus-infected cattle, *Vet Immunol Immunopathol*, 144, 462-467 (2011)
- [66] Konnai S, Suzuki S, Shirai T, Ikebuchi R, Okagawa T, Mingala CN, Sunden Y, Onuma M, Murata S, Ohashi K : Enhanced expression of LAG-3 on lymphocyte subpopulations from persistently lymphocytotic cat-

- tle infected with bovine leukemia virus, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis (in press)*
- [67] Okagawa T, Konnai S, Ikebuchi R, Suzuki S, Shirai T, Sunden Y, Onuma M, Murata S, Ohashi K : Increased bovine Tim-3 and its ligand expressions during bovine leukemia virus infection, *Vet Res*, 43, 45, (2012)
- [68] Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GJ, Kuchroo VK : Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease, *Nature*, 415, 536-541 (2002)
- [69] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK : The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity, *Nature Immunol*, 6, 1245-1252 (2005)
- [70] Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Araki K, Freeman GJ, Kuchroo VK, Ahmed R : Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection, *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 14733-14738 (2010)
- [71] Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schwenker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hycza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA : Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection, *J Exp Med*, 205, 2763-2779 (2008)
- [72] Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR : Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells, *J Virol*, 83, 9122-9130 (2009)
- [73] McMahan RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, Gretch DR, Rosen HR : Tim-3 expression on PD-1⁺ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed *in vitro* cytotoxicity, *J Clin Invest*, 120, 4546-4557 (2010)