

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06570

研究課題名(和文)新型コロナウイルス認識T細胞の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of SARS CoV-2 specific T cells

研究代表者

宮内 浩典 (Miyachi, Kosuke)

国立感染症研究所・エイズ研究センター・客員研究員

研究者番号：50619856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Tfh細胞はCoV-2中和抗体産生B細胞の誘導に中心的な役割を果たすことが期待されるが、Tfh細胞の分化メカニズムやCoV-2感染防御における機能については不明な部分が多い。本研究ではCoV-2ワクチン投与マウスや、CoV-2感染マウスモデルを用いて、CoV-2特異的Tfh細胞と抗CoV-2スパイク抗体産生B細胞を解析することにより、Tfh細胞による中和抗体産生B細胞の誘導メカニズムについて解明を試みた。CoV-2特異的ヘルパーT細胞のシングルセルmRNA解析より、CD40Lを発現し、IL-4、IL-13、IL-21を産生するT細胞が抗CoV-2中和抗体産生に寄与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的なパンデミックが進行中である新型コロナウイルスによるCOVID19感染症における重症化の予測と防止は、緊急の課題である。COVID19感染症においてコロナウイルス特異的メモリーT細胞の存在の有無が、新型コロナウイルス感染時の病態に大きく影響するという仮説が提唱されており、特に濾胞型ヘルパーT細胞(Tfh細胞)はメモリー細胞として季節性コロナ感染後にヒトの体内に長期的に維持されることから、次世代ワクチンの標的として有望である。本研究によってCoV-2特異的Tfh細胞の性質の一端を明らかにしたことで、次世代のウイルスワクチン開発戦略を立てる上で重要な情報を提供できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Although Tfh cells are expected to play a pivotal role in the induction of CoV-2 neutralizing antibody-producing B cells, the differentiation mechanism of Tfh cells and their protective function against CoV-2 infection remain unclear. In this study, we attempted to elucidate the mechanism of induction of neutralizing antibody-producing B cells by Tfh cells by analyzing CoV-2-specific Tfh cells and anti-CoV-2 spiking antibody-producing B cells using CoV-2 vaccine-treated mice and CoV-2 infected mouse models. Single-cell mRNA analysis of helper T cells from these mice revealed that Tfh cells expressing CD40L and producing IL-4, IL-13, and IL-21 contribute to the production of anti-CoV-2 neutralizing antibodies.

研究分野：免疫学

キーワード：SARS-CoV-2 Tfh

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界的なパンデミックが進行中である新型コロナウイルス (CoV-2) による COVID19 感染症における重症化の予測と防止は、緊急の課題である。COVID19 感染症において新型コロナウイルス特異的メモリーT細胞の存在の有無が、新型コロナウイルス感染時の病態に大きく影響するという仮説が提唱されている。とくに濾胞型ヘルパーT細胞 (Tfh 細胞) はメモリー細胞として季節性コロナ感染後にヒトの体内に長期的に維持されることが知られている。メモリー-Tfh 細胞は CoV-2 感染時のウイルス中和抗体産生に中心的な役割を果たすことが期待されるが、メモリーTfh 細胞の分化メカニズムや CoV-2 感染防御における機能については不明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では CoV-2 スパイクタンパク質をワクチンとして投与したマウスや、CoV-2 感染マウスモデルを用いて、CoV-2 特異的 Tfh 細胞と抗 CoV-2 スパイク抗体産生 B 細胞を解析することにより、メモリーT細胞が CoV-2 感染防御に果たす役割とメモリーTFH 細胞の分化メカニズムについて解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3 - 1 . CoV-2 ワクチン投与マウスにおける、CoV-2 特異的ヘルパーT細胞、B細胞の解析

CoV-2 感染を阻害する中和抗体に寄与する T細胞の性質と機能を明らかにする目的で、我々は CoV-2 スパイク抗原により免疫したマウスにおけるウイルス特異的ヘルパーT細胞とB細胞の解析を行った。まず、哺乳類細胞系に CoV-2 スパイクタンパク質発現プラスミドベクターをトランスフェクションすることで、リコンビナント CoV-2 スパイクタンパク質を発現させ、導入したタグアミノ酸配列を用いて精製をおこなった。次に、精製したリコンビナント CoV-2 スパイクタンパク質をアジュバンドとともにマウスに免疫した。2週間おきの2回の免疫の後、免疫マウスの血清を採取して、血清中の抗ウイルス抗体の中和抗体価を CoV-2 感染培養細胞系にて確認した (図1)。CoV-2 ワクチンによって誘導されるウイルス抗原特異的ヘルパー細胞と抗ウイルス抗体産生 B細胞を解析するため、これらのマウスのリンパ節における Tfh 細胞と CoV-2 スパイク結合 B細胞の検出を試みた。その結果、PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>のヘルパーT細胞である Tfh 細胞と、CoV-2 スパイクに結合する B細胞が検出された (図2)。次に、ウイルス抗原特異的なヘルパーT細胞を検出するためにリンパ節細胞を CoV-2 スパイクペプチドによって刺激した。これらの細胞をセルソーターにより分取し、シングルセルトランスクリプトーム解析をおこなった。

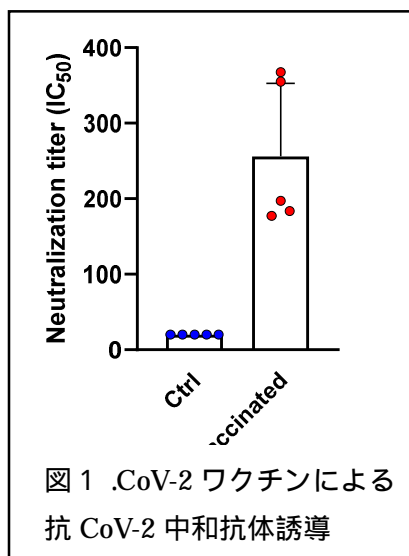


図1 .CoV-2 ワクチンによる抗 CoV-2 中和抗体誘導

#### 3 - 2 . CoV-2 感染マウスモデルの樹立と CoV-2 特異的ヘルパーT細胞、B細胞の解析

CoV-2感染マウスにおけるCoV-2特異的ヘルパーT細胞、B細胞を解析する目的で、CoV-2の受容体であるヒトACE-2のノックイン (KI) マウスを樹立し、CoV-2を経鼻投与後、体重変化と肺胞洗浄液中のウイルスRNA量、肺組織でのウイルスタンパク質の解析をおこなっ

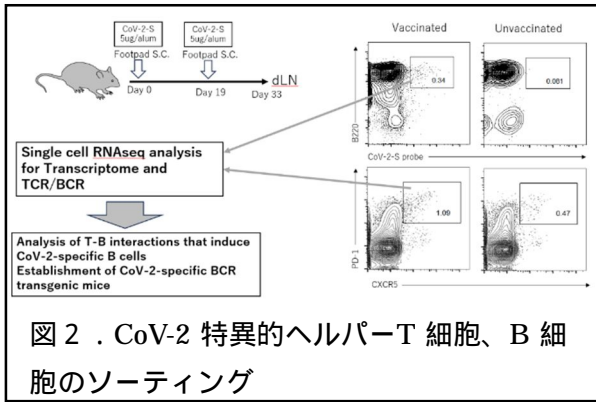


図2 . CoV-2 特異的ヘルパーT 細胞、B 細胞のソーティング

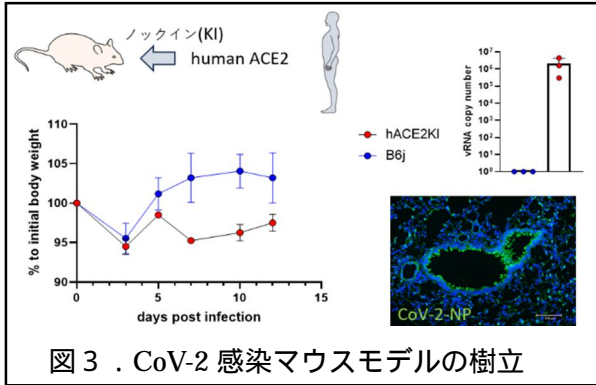


図3 . CoV-2 感染マウスモデルの樹立

た。CoV-2経鼻投与による一過性の体重低下と肺胞洗浄液中のウイルスRNA、肺組織中のウイルスタンパク質が観察されたことから、CoV-2感染マウスモデルの樹立に成功したと判断した(図3)。これらのCoV-2感染マウスのリンパ節では非感染マウスではほとんど見られないTfh細胞の誘導と、抗体産生B細胞の活性化が認められた。さらにCoV-2特異的T細胞の解析を目的として、これらの感染マウスから分離したリンパ節細胞をCoV-2スパイクタンパク質抗原ペプチドを使用して活性化後、ヘルパーT細胞とCoV-2特異的B細胞をソーティングしシングルセルRNAシーケンス解析をおこなった。

#### 4 . 研究成果

##### 4 - 1 . CoV-2ワクチン投与マウスにおける、CoV-2特異的ヘルパーT細胞、B細胞の解析

CoV-2スパイクタンパク質をワクチンとして投与したマウスのリンパ節からヘルパー細胞とB細胞を分離してシングルセルRNAシーケンス解析をおこなった結果、ヘルパーT細胞の特定の集団の中に、CoV-2スパイクペプチド特異的に活性化し、B細胞の抗体産生に関するCD40L分子やIL-4、IL-13、IL-21といったサイトカインを産生するT細胞集団を確認した(図4)。今後、この集団のT細胞受容体を解析することによりCoV-2特異的Tfhの分化メカニズムの解明を目指す予定である。

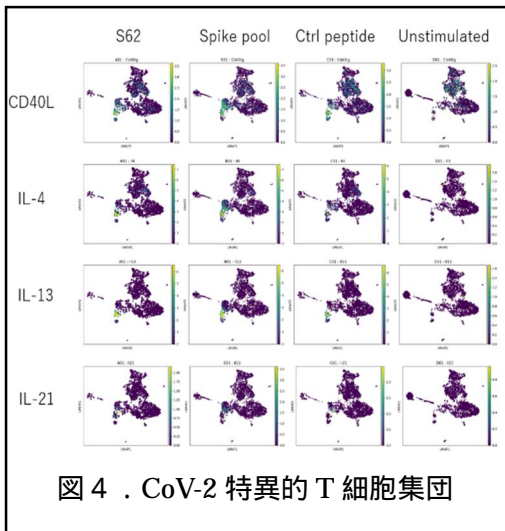


図4 . CoV-2 特異的 T 細胞集団

##### 4 - 2 . CoV-2感染マウスにおけるCoV-2特異的ヘルパーT細胞、B細胞の解析

CoV-2を感染させたマウスよりリンパ節を分離し、CoV-2特異的ヘルパーT細胞、B細胞についてシングルセルトランスクリプトーム解析を行った。各T細胞サブセットにおける既知の遺伝子発現パターンを利用してクラスタリングを行うことで、CoV-2特異的ヘルパーT細胞を各ヘルパーT細胞サブセットに分離した。詳細な解析については現在進行中であるが、CoV-2特異的T細胞にはウイルス特異的抗体産生B細胞をサポートする

Tfhを含む様々なヘルパーT細胞のサブセットが含まれることが明らかとなり、そのうちの特定のサブpopulationにはメモリーT細胞特有の遺伝子発現パターンを有するものが認められた。今後、同一個体におけるB細胞の遺伝子発現パターンと照らし合わせて解析を進めることで、中和抗体産生を誘導するCoV-2メモリーTfh細胞の分化メカニズムの一端が明らかになるものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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