

呼吸器感染ウイルス感染防御ワクチン開発の基礎研究

高村史記

近畿大学医学部免疫学教室

【研究の背景】

現在、世界的なパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルスや将来的なパンデミックが懸念されている高病原性鳥インフルエンザウイルスは肺を感染の首座とし、重篤な肺炎症状を引き起こす。肺におけるウイルス拡散後の免疫応答は炎症増悪による呼吸機能不全を招くため、拡散前に局所にてウイルス感染細胞を早期破壊することが望ましい。抗原特異的滞在型メモリーCD8T細胞(CD8 T_{RM})は粘膜局所に定着し、感染細胞を早期破壊することで防御免疫の最先端を担っている。従って、肺 CD8 T_{RM}を効果的に誘導・維持するワクチン開発は、特に重症化が懸念される高齢者にとって急務である。

我々は2匹のマウスを外科的に結合するパラビオーシス法(互いの血管が融合し、循環型メモリーT細胞が共有される)にて、一方に残る滞在型と両者を行き来する循環型のメモリーCD8T細胞を識別することで肺実質におけるインフルエンザウイルス特異的 CD8 T_{RM}分化の場(傷害組織の修復巣)を世界で初めて同定し、その維持機構を解明してきた^{1,2)}。しかしながら、肺 CD8 T_{RM}維持の場(修復巣)は治癒に伴い早期消失してしまうことも判明した¹⁾。従って、肺 CD8 T_{RM}を長期維持するための新たな戦略が求められる。

【目 的】

我々はアデノウイルスベクター経鼻免疫マウスにて肺組織限局的に CD8 T_{RM}が爆発的に増殖し続けることを発見した³⁾。この細胞増殖の源は、通常、肺 CD8 T_{RM}とは独立して維持される循環型メモリーCD8T細胞であり、肺局所における抗原刺激に加え(未知の)特殊なシグナルを受領することで効率的に CD8 T_{RM}へと変換されていることも判明した(CD8 T_{RM}インフレーションと命名)。この機構では治癒による維持の場の消失と無関係に肺 CD8 T_{RM}を長期維持することが可能である。そこで、本研究ではアデノウイルスベクター経鼻免疫にて誘導される CD8 T_{RM}インフレーション機構を解明し、ワクチン開発へ向けた基礎研究を行う。

【方 法】

1. アデノウイルスベクター接種後の肺における抗原発現部位の解析

GFP 発現アデノウイルスベクター(大阪大学薬学部・水口裕之教授より供与)をマウスに経鼻接種し、経時的に肺組織を採取して凍結切片を作成。多重蛍光免疫組織化学にて肺における GFP 発現細胞を検出・同定した。

2. 肺における CD8 T_{RM}インフレーション誘導部位の同定

インフルエンザウイルス NP タンパク発現アデノウイルスベクター(Ad-NP)をマウスに経鼻免疫し 42 日後に肺を採取、HE 染色にて形態を確認した。また、多重蛍光免疫染色にて増殖マーカーである Ki-67 と CD8 発現を指標に肺 CD8 T_{RM}インフレーション部位を調べると共に、増殖 CD8T細胞と接着している細胞集団の同定も試みた。

3. インフレーションを起こした肺 CD8 T_{RM}の性状解析

インフルエンザウイルス x31 株(H3N2)感染マウス、Ad-NP 経鼻免疫マウスを感染(もしくは免疫)30 日後(メモリー形成後)にパラビオーシス法にて結合し(これにより循環型と滞在型メモリーCD8T細胞の識別が可能となる)、14 日後に x31 感染マウスの脾臓と肺、Ad-NP 経鼻免疫マウスの肺よりセルソーターを用いて抗原特異的 CD8T細胞を採取しシングルセル RNA

シーケンスを行った。

【結 果】

GFP 発現アデノウイルスベクターを経鼻接種後のマウス肺の多重免疫染色にて、肺胞に存在する CD11c 陽性細胞(肺胞マクロファージ)や細気管支上皮細胞及び肺胞上皮細胞にて GFP の発現が認められた。これらの細胞集団がウイルス抗原発現細胞であると考えられる。

肺における CD8 T_{RM} インフレーション誘導部位を特定するため、アデノウイルスベクター経鼻免疫マウスの肺を組織学的に調べたところ、免疫後 42 日目においても広範囲にわたり細気管支周囲に細胞浸潤がみられ、異所性リンパ節様構造(iBALT)の形成も確認された。両部位にて増殖マーカーである Ki-67 発現 CD8T 細胞が確認されたが、その頻度は細気管支周囲細胞浸潤巣にて高かったことより、細気管支周囲細胞浸潤巣が主要な肺 CD8 T_{RM} インフレーション誘導部位であると示唆された。また、この部位に存在する Ki-67 発現 CD8T 細胞の多くが CD11c 陽性樹状細胞、もしくは F4/80 陽性肺間質マクロファージと近接していたことより、これらの細胞集団が局所抗原刺激を供給し、メモリーCD8T 細胞の増殖(インフレーション)を誘導しているものと示唆された。

更に、シングルセル RNA シーケンスにてインフルエンザウイルス感染マウス、もしくはアデノウイルスベクター経鼻免疫マウスより採取した肺 CD8 T_{RM} の性状を比較したところ、既存の知見と同様、アデノウイルスベクター経鼻免疫マウス肺 CD8 T_{RM} にて強い増殖傾向が見られた。また、アデノウイルスベクター経鼻免疫にて誘導された肺 CD8 T_{RM} はインフルエンザウイルス感染により誘導された肺 CD8 T_{RM} と比較し、CD8T 細胞機能を抑制する各種免疫チェックポイント因子(Havcr2、Lag3、Rgs16、Klrc1、Klrd1 等)発現が亢進しており、局所における抗原再刺激の影響であると考えられた。更に、1 型インターフェロンや IL-27 等で発現誘導され、T 細胞疲弊の軽減や増殖、機能亢進、長期生存にも関与する遺伝子群の発現上昇も確認され(Stat1、Ifi27L2a、Ly6a、Ccl5、AW12010 等)、T_{RM} インフレーションの誘導には局所抗原刺激のみならず、これらサイトカインの刺激も関与していることが示唆された。

【考 察】

本研究より、アデノウイルスベクターにて導入された遺伝子が細気管支上皮細胞などにて持続的に発現し、その抗原を提示した肺滞在型の樹状細胞もしくはマクロファージの刺激を受けることで細気管支周囲にてメモリーCD8T 細胞が継続的に増殖することが肺 T_{RM} インフレーションの実態であると考えられる。ヒトにおけるアデノウイルスベクターを用いた肺への遺伝子導入は安全面の懸念より現実的ではないため、今後は継続的に軽度な 1 型インターフェロン発現誘導を伴う細気管支上皮を標的とした遺伝子輸送技術の開発が望まれる。また、下気道のみならず鼻腔や鼻腔関連リンパ組織(NALT)にも CD8 T_{RM} が誘導され、長期維持されることが知られている。アデノウイルスベクターの経鼻腔接種であればヒトでの応用の可能性も考慮されるため、今後はこの手法にて鼻腔内にて T_{RM} インフレーションが誘導されるのかどうかを検討したい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

新型コロナウイルスワクチンの普及により、特に mRNA ワクチンによる液性及び細胞性免疫応答誘導効果とそれに伴う感染拡大防止効果は周知された。現状のワクチンにて残された課題は二つ、即ち、1) 全身免疫では付与できなかった、感染局所における感染防御免疫応答の誘導と、2) 変異ウイルスにも対応可能な交差反応性ワクチン開発である。呼吸器粘膜における T_{RM} インフレーションの誘導はこの両者を可能とするばかりか、更なる課題である呼吸器メモリーの長期維持を可能とする現象であり、その全容解明は将来のワクチン開発に極めて重要な知見をもたらすものと考えられる。

【参考・引用文献】

- 1) **Takamura S**, Yagi H, Hakata Y, et al. Specific niches for lung-resident memory CD8⁺ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance. *J. Exp. Med.* 2016 Dec 12;213(13):3057-73.

- 2) **Takamura S**, Kato S, Motozono C, et al. Interstitial-resident memory CD8⁺ T cells sustain frontline epithelial memory in the lung. *J. Exp. Med.* 2019 Dec 2;216(12):2736-47.
- 3) Uddback I, Cartwright EK, Scholler AS, et al. Long-term maintenance of lung resident memory T cells is mediated by persistent antigen. *Mucosal Immunol.* 2021 Jan;14(1):92-99.