

SARS 関連ウイルス万能 B 細胞の効率的活性化誘導のためのヘルパー T 細胞抗原設計法の確立

新中須亮

愛媛大学 学術支援センター 医科学研究支援部門 感染症研究支援分野

【研究の背景】

新型コロナウイルス感染症に関する最大の懸念は、新たなパンデミックが発生することである。そのため、迅速に対応しうるユニバーサルワクチンが存在することは有益である。申請者は、広域交差反応性中和抗体の効率的誘導法の確立を目指して研究を行ってきており、スパイク RBD のコア領域を標的とした改変 RBD 抗原が、そういった中和抗体を優位に誘導できることを明らかにしている¹⁾。しかしながら、この抗原のみをマウスに免疫しても液性免疫応答は誘導されない。その理由として、マウスや人において CD4 陽性ヘルパー T 細胞を活性化させるための抗原エピトープが RBD で乏しいこと(図 1)が一番の理由であると考えられる^{1, 2)}。そのため、抗 RBD 領域中和抗体の誘導に特化した RBD ワクチンのデザインにおいてはヘルパー T 細胞側の抗原についても考慮する必要がある。

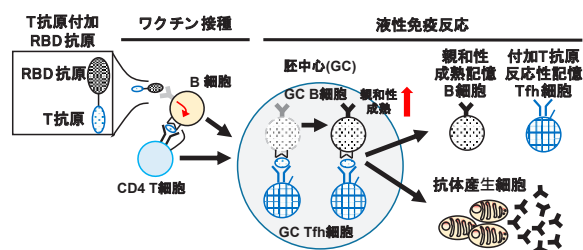


図1: 液性免疫応答を誘導するためにはT細胞とB細胞のT-B interactionが必須である。そのため、T抗原を有さないRBD抗原は外からT抗原を融合することにより初めて、胚中心の誘導やその後の抗体産生細胞、免疫記憶細胞の誘導が可能となる。

【目 的】

本課題では、既報の改変 SARS-CoV2 スパイク RBD ワクチン抗原¹⁾による、SARS 類縁交ウイルス差反応性抗体の誘導能を最大限に引き出すための、ヘルパー T 細胞新規抗原探索・設計法確立を目標に研究を行う。特に、1) 標的である免疫劣性 B 細胞エピトープに負の影響を与えないためペプチド(エピトープ)抗原にすること、2) 未経験標的ウイルス侵入時にも重要な役割を果たせる記憶 T 細胞を誘導すること、以上の点を最大限に考慮した設計を行い、新たな次世代ワクチン設計法確立に繋がる知見を得ることを目的とする。

【方 法】

不活化 SARS-CoV2 ビリオン接種マウスについて脾臓の細胞単離を行った。その後、in vitro でのスパイク蛋白刺激による活性化誘導(AIM)試験を行い、セルソーターを用いてスパイク蛋白反応性活性化ヘルパー T 細胞の回収を行った。回収した細胞については、10X Chromium を用いたシングルセル網羅的 RNA 解析と TCR レパトアの同時解析法を行い、遺伝子発現パターンを基にクラスター化を行った。さらに、Tfh 細胞クラスターについて TCR 情報についての詳細な解析をおこないリスト化し、興味のある TCR についてレトロウイルスベクターによる Activation reporter cell line (NFAT-GFP) への強制発現細胞の作製を行った。クローニングした TCR の抗原特異性については、スパイク蛋白のペプチドプールによる 1st スクリーニング、クローニングした TCR の認識エピトープ探索にはペプチドライブラリーによる 2nd スクリーニングにより評価を行なった。

【結 果】

シングルセル網羅的 RNA 解析と TCR レパトアの同時解析法を行った結果、胚中心での B 細胞活性化に必須の Tfh 細

胞分画のクラスターの存在が確認された。さらに、そのクラスターに存在する細胞について TCR の情報を確認したところ約 100 細胞から情報が得られた。その結果の分析から増殖が確認されたクローンを中心に、計 12 クローンについてクローニングを行い、それぞれの TCR について抗原特異性および認識エピトープについて評価した。その結果、2 クローンに対し、スパイク S2 領域のエピトープへの抗原特異性を確認することができた。

【考 察】

本ワクチンデザインではまず、スパイク蛋白の T 細胞抗原(流通している mRNA ワクチンの免疫原)を利用することが最適と考え、スパイク蛋白に存在する T 細胞エピトープの探索を行った。探索に際しては「質の高い液性免疫を誘導するためにはリンパ組織内にある胚中心 B 細胞が T_H 細胞からのサポートを受けることが大切である」という観点から、特にスパイク蛋白に反応性を示す細胞に着目し解析を行ったところ、結果、S2 領域に存在する 2 カ所のエピトープの同定に成功した。現在は、ワクチンデザインに向けた次のステップとして、同定した 2 種類の T 細胞抗原(エピトープ抗原)について、改変 RBD B 細胞抗原¹⁾と融合させたリコンビナント蛋白を作製中であり、ワクチン抗原完成後は、ワクチン接種マウスを用いた、免疫誘導試験(SARS 類縁ウイルスに広く反応できる広域反応性抗体誘導能の評価)および、動物への感染防御試験などによる概念実証を行なっていく計画である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本課題の目的は、これまでの液性免疫学の基礎研究から得られた知見を基に、その理屈を応用したワクチンデザイン法の確立である。そのため、まずはこのデザイン法が理にかなっているかについて、マウス等を用いた詳細な検討が必要である。このように、本研究はあくまで基礎研究の範疇ではあるものの、しかしながら、動物を使用した実験で期待通りの結果が得られた場合、今回のデザイン法はヒト用ワクチンのデザイン法としても即応用が可能であるため、貢献度は非常に高いと思われる。

【参考・引用文献】

1. Shinnakasu R, Sakakibara S, Yamamoto H, Wang P, Moriyama S, Sax N, Ono C, Yamanaka A, Adachi Y, Onodera T, Sato T, Shinkai M, Suzuki R, Matsuura Y, Hashii N, Takahashi Y, Inoue T, Yamashita K, and Kurosaki T*: Glycan engineering of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits cross-neutralizing antibodies for SARS-related viruses. *J Exp Med.* 218(12):e20211003. 2021
2. Lu X, Hosono Y, Ishizuka S, Nagae M, Ishikawa E, Motooka D, Ozaki Y, Sax N, Maeda Y, Kato Y, Morita T, Shinnakasu R, Inoue T, Onodera T, Matsumura T, Shinkai M, Sato T, Nakamura S, Mori S, Kanda T, Nakayama E, Shioda T, Kurosaki T, Takeda K, Kumanogoh A, Arase H, Nakagami H, Yamashita K, Takahashi Y, and Yamasaki S*: Identification of conserved SARS-CoV-2 spike epitopes that expand public cT_H clonotypes in mild COVID-19 patients. *J Exp Med.* 218(12):e20211327. 2021