

## ◇背景

SARS-CoV-2感染症であるCOVID-19の臨床症状は、無症状から呼吸不全までさまざまであるが、重症化を決定付けるメカニズムは未だ解明されていない。現在、急性期のCOVID-19診断はPCR検査にて行われるが、検査数に限界があり、有症状者が優先的に検査されることから、感染者数の過小評価や致死率の過大評価につながっている。抗体検査により、無症状感染者の検出が可能と考えられるが、普及には至っておらず、また抗体応答は変動しやすく短命であることも課題となっている。コロナウイルスに対する細胞性免疫応答は液性免疫よりも持続的であると予測されているものの、その特性は明らかとされていない。一方、コロナウイルス構造タンパク質中に存在するいくつかのT細胞エピトープが予測または特定されており、特にヘルパーT細胞の応答と中和抗体の生成との関連も示唆されている。そこで、本研究では、COVID-19患者のSARS-CoV-2スパイク糖タンパク質(S)反応性CD4<sup>+</sup>T細胞の特性(存在比率<sup>A</sup>, および表現型)について、SARS-CoV-2に曝露されていない健康なドナー(HD)との比較とともに、解析した。

## ◇方法

### ◇研究対象者

本研究には、18人のCOVID-19患者(平均年齢:約53歳;女性28%;症状発現後の検体採取日:平均約15日)と、68人のHD(平均年齢:約42歳;女性約60%)を組み入れた。対象としたCOVID-19患者は、2020年3月1日~4月2日の期間にPCR検査で陽性が確認され、ベルリン市内のシャリテ・ベルリン医科大学病院に入院した症例とし、疾患重症度[軽症:入院・酸素補充なし, 重症:入院・酸素補充あり(ハイフロー<sup>B</sup>を含む), 重篤:入院・侵襲的人工呼吸]にもとづき分類された。

### ◇血清学的検査

抗SARS-CoV-2 IgGはELISAキット(EUROIMMUN社製)を用い、常在性コロナウイルス(HCoV)<sup>C</sup>に対するIgG測定には、各HCoV由来の組換えスパイクタンパク質を発現させたVeroB4細胞を用いる組換え免疫蛍光アッセイ(rIFA)を用いた。

## ◇結果

### ◇スパイク糖タンパク質(S)反応性CD4<sup>+</sup>T細胞の同定

スパイク糖タンパク質のN末端側およびC末端側のエピトープ領域を含む2種のペプチドプール(S-IおよびS-II)

<sup>A</sup> フローサイトメトリーによる解析で、対象とする細胞の、測定サンプル中における存在比率。

<sup>B</sup> high-flow nasal cannula (HFNC) 高流量鼻カニューラ酸素療法

<sup>C</sup> human endemic “common cold” coronavirus: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1の4株を用いた。

にて<sup>D</sup>, 患者およびHDから採取した末梢血単核細胞を刺激し, 4-1BB<sup>E</sup>とCD40L<sup>F</sup>の共発現をマーカーとして抗原反応性CD4<sup>+</sup> T細胞を同定した。患者18人中の67%にS-I反応性の, 83%にS-II反応性のCD4<sup>+</sup> T細胞が検出された。COVID-19重篤患者の多くは, S-I反応性を示さなかった。また, HD 68人中の35%にもS-II反応性CD4<sup>+</sup> T細胞が検出された〔以降, RHD (SARS-CoV-2反応性の健康なドナー)と呼ぶ〕。S-I反応性CD4<sup>+</sup> T細胞は約6%で検出され, HDの全例で, Sサブユニット1 (S1)特異的なIgG抗体は陰性であった。なお, 患者およびRHDのS反応性CD4<sup>+</sup> T細胞は, メモリー細胞であり, その大部分はTh1への分化を示すIFN $\gamma$ を発現していた。

#### ◇RHDのS反応性CD4<sup>+</sup>T細胞の常在性コロナウイルスとの交差反応性

SARS-CoVのMHC-IIエピトープに関して, 常在性の「感冒」ヒトコロナウイルス(HCoV)-229E, -NL63, -OC43, および-HKU1との相同性は, ペプチドプールS-IIの方がS-Iに比べて高い。このことから, HDでみとめられたS-IIに特徴的な反応性は, HCoVに対する過去の免疫応答に由来した可能性が考えられる。HD 18人について, 4種の常在性HCoVに特異的な抗体を測定した結果, 全例で4種すべてのIgG抗体が検出された。また, RHDのS-II反応性CD4<sup>+</sup> T細胞を単離し, OC43および229E由来のS (HCoV) -IおよびS (HCoV) -IIにて再刺激した結果, S (HCoV) -IIに対する強い応答性が確認された。

#### ◇COVID-19患者に特異的な活性化シグネチャ

COVID-19患者のS反応性CD4<sup>+</sup> T細胞は, 最近の活性化を意味するCD38, HLA-DR, およびKi-67を多く発現していたが, RHDのS反応性CD4<sup>+</sup> T細胞では, CD38, HLA-DRおよびKi-67の発現はみられないか, もしくはその発現割合は非常に低かった。

#### ◇考 察

HDに検出されたS反応性T細胞は, HCoVのC末端エピトープへの交差反応性を示すことから, 過去にHCoVに感染した際に獲得された細胞性免疫に由来すると推察される。冬季の「感冒(上気道感染症)」の約20%がHCoVに由来するとされ, 疫学的なデータにもとづくと, 成人では2~3年毎にHCoVに感染すると推定される。なお, HDに存在するS交差反応性CD4<sup>+</sup> T細胞のCOVID-19における臨床的な役割はなおも不明であり, より大規模なコホートによる調査が必要である。

#### ◇結 論

本研究から, SARS-CoV-2患者のみならず抗体陰性の非感染者においても, ある程度の割合でSARS-CoV-2のSタンパク質に交差反応性を示す細胞性免疫が存在していることが明らかになった。これは, ヒト常在性コロナウイルスに対する過去の細胞性免疫の獲得に由来する可能性がある。本知見は, 今後のワクチン開発を進める上でも重要な示唆を与える。

<sup>D</sup> SARS-CoVのMHC-IIエピトープ情報をもとに設計した, SARS-CoV-2スパイク糖タンパク質由来ペプチド混合物。スパイク糖タンパク質のN末端側(1-643; 21種類のエピトープを含む)をカバーするS-I (158種の15-merの混合物)およびC末端側(633-1273; 13種類のエピトープを含む)をカバーするS-II (156種の15-merまたは17-mer)の2つのペプチドプールを調整した。中和抗体の標的サブユニットS1の受容体結合ドメイン(RBD)のペプチドはS-IIに含まれている。

<sup>E</sup> 別名CD137。活性化CD4<sup>+</sup> T細胞表面に発現するTNFスーパーファミリーに属するリガンドタンパク質(TNFRSF9)。

<sup>F</sup> 別名CD154。活性化CD4<sup>+</sup> T細胞表面に発現するTNFスーパーファミリーに属するリガンドタンパク質であり, 抗原提示細胞表面のCD40(TNFRSF5)と結合する。