

(抜粋・要約)

#### ◇背景

SARS-CoV-2のパンデミックは、公衆衛生、社会生活、世界経済に未曾有の影響を及ぼしている。ワクチン開発推進のためのSARS-CoV-2に対する免疫応答の解明が、強力な抗ウイルス薬とともに緊急に求められている。抗体応答の主たる標的は、SARS-CoV-2ウイルス粒子表面のホモ三量体スパイク(S)タンパク質である。Sタンパク質は、受容体結合ドメイン(RBD)<sup>A</sup>を介してアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)に結合し、ウイルスの細胞内への侵入を促す。SARS-CoV-2反応性抗体および中和抗体はすでに、COVID-19回復者などから同定されているが、抗体生成の頻度や経時的変化は、ほとんど解明されていない。

#### ◇方法

##### ◇SARS-CoV-2感染者と検体採取

本研究の参加者(SARS-CoV-2感染者12人、女性6人、男性6人)は、ドイツの4カ所の病院で登録され、単回採血(7例、診断後8~36日)か経時的採血(5例、診断後8~69日の間に3回)のいずれかに割り付けられた。

#### ◇結果

##### ◇SARS-CoV-2感染者でのSタンパク質に対するポリクローナルなメモリーB細胞応答

SARS-CoV-2に対する抗体応答を調べるため、COVID-19患者7例(年齢:38~59歳、5例は軽症、2例は無症状)について血液検体を採取した。7例すべてで、血漿から精製したIgGはSタンパク質の外部ドメインに結合し(EC<sub>50</sub><sup>B</sup>:3.1~96.1 μg/mL)、7例中5例でSARS-CoV-2に対するIgGの中和活性が検出された(IC<sub>100</sub><sup>C</sup>:78.8~1500 μg/mL)。SARS-CoV-2特異的B細胞および抗体応答を分子レベルで解明するため、7例すべてについてB細胞のシングルセル・ソーティングと遺伝子配列の解析を行った。フローサイトメトリー解析の結果、IgG<sup>+</sup> B細胞のうち0.04~1.02%がSタンパク質外部ドメインに結合することが示され、それらのB細胞1,751個をシングルセル・ソーティングしてIgGのL鎖とH鎖の遺伝子配列を解析したところ、患者7例すべてで、単クローン由来の配列が22~45%を占める、ポリクローナルな抗体応答が起こっていた。

##### ◇SARS-CoV-2に対する抗体応答の経時的解析

SARS-CoV-2に対する抗体応答の経時的変化を明らかにするため、感染者5例から経時的に(診断後8~69日のいずれか3つの時点で)血液検体を採取した。感染者の血漿中IgGは、EC<sub>50</sub>:1.54~129 μg/mL、IC<sub>100</sub>値:78.8~1500 μg/mLであり、調査期間中、各感染者でこの値はほとんど変化しなかった。単一細胞レベルでB細胞

<sup>A</sup> Receptor-binding domain

<sup>B</sup> Half-maximal effective concentration(50%有効濃度。ここではS外部ドメインとの結合活性)

<sup>C</sup> 100% inhibitory concentration(100%阻害濃度。ここではSARS-CoV-2中和活性)

胞のクローン性と抗体特性を調べるため、3つの時点で5例すべてからSタンパク質外部ドメイン反応性IgG<sup>+</sup> B細胞2,562個をソーティングした。Sタンパク質反応性B細胞クローンの51% (254クローン中129クローン)は時間経過後も再度検出されたことから、2.5カ月の調査期間にわたりSARS-CoV-2 Sタンパク質反応性B細胞が存在し続けることが示唆された。

患者12例すべての単一細胞についてIgの遺伝子配列(6,587のH鎖およびL鎖)を解析したところ、Sタンパク質反応性B細胞のH鎖可変(V<sub>H</sub>)遺伝子は、健康な人のIgG<sup>+</sup> レパートリーのV<sub>H</sub>遺伝子と比較して、IgV<sub>H</sub> 3-30が高頻度であり、また体細胞突然変異<sup>D</sup>が少ないことがわかった(生殖細胞系配列との一致率の中央値:98.3% vs. 94.3%,  $p<0.0001$ )。

#### ◇COVID-19患者からの、高力価で、かつほとんど体細胞突然変異が起きていないSARS-CoV-2中和抗体の同定

抗体の特性を調べ、高力価中和抗体を同定するため、12例の患者全員から計312個のH鎖とL鎖のペアをクローニングした。255のIgG1抗体の作製に成功し、79(31%)の抗体が三量体Sタンパク質外部ドメインに結合した(EC<sub>50</sub>値:0.02~5.20 μg/mL)。12例中9例で計27種の中和抗体が得られ、SARS-CoV-2ウイルスに対するIC<sub>100</sub>値は0.04~100 μg/mLであった。中和活性と結合活性の間には正の相関がみられた( $r_s=0.441$ ,  $p=0.021$ )。27種の中和抗体のうち26種はRBDに結合したが、非中和抗体では27.5%のみであり、RBDがSタンパク質の主要なエпитープであることが示唆された。結合抗体79種中31種と中和抗体27種中10種が生殖細胞系と99~100%の同一性を示し、体細胞突然変異がほとんど起きていないことが明らかとなった。

#### ◇健康な非感染者に存在するSARS-CoV-2中和抗体の前駆体配列

結合抗体と中和抗体の多くで時間経過後も体細胞突然変異の発生頻度が低いことが明らかになったため、健康なドナー48人のナイーブB細胞受容体レパートリーについて、H鎖およびL鎖の遺伝子配列を解析した。検体はすべてSARS-CoV-2のアウトブレイク以前に採取されたものを用いた。79種のSARS-CoV-2結合抗体に類似したH鎖とL鎖を検索したところ、14抗体に関し、V/Jペアが同じH鎖クロノタイプ(アミノ酸の長さが±1 aaで、違いは最大3 aaまで)が61種同定された。SARS-CoV-2結合抗体および中和抗体の潜在的な前駆体配列が、ナイーブB細胞レパートリーに豊富に存在することが示唆された。

#### ◇考察・結論

12人の感染者から4,313クローンのSARS-CoV-2反応性B細胞をスクリーニングし、RBDを標的とする非常に力価の高いヒトモノクローナルSARS-CoV-2中和抗体を同定することができた。この抗体は、0.04 μg/mLという低濃度でウイルス感染を完全にブロックするため、SARS-CoV-2感染の予防および治療の選択肢として有望である。SARS-CoV-2感染後のメモリーB細胞応答を経時的に解析することにより、体細胞突然変異やクローンB細胞の増殖がほとんど起こらないことが明らかになった。またSARS-CoV-2非感染者からもSARS-CoV-2 Sタンパク質反応性抗体を分離することができたが、これらの抗体が他のヒトコロナウイルスへの以前の曝露の結果であるかなど解明すべき点は残っている。本研究結果は、ワクチン接種によって感染防御効果のある抗体を広く容易に誘導できる可能性を示唆するものである。

<sup>D</sup> Somatic hypermutation (SHM): 抗体を産生するB細胞において、抗体の多様性をつくり出すために免疫グロブリン遺伝子の可変領域に高頻度の変異が導入される現象