

## 1 8 急性期 COVID-19 における SARS-CoV-2 に対する抗原特異的獲得免疫は年齢と疾患の重症度に関連する

米国カリフォルニア州ラ・ホラ免疫学研究所・カリフォルニア大学サンディエゴ校の Crotty らのグループ<sup>1)</sup>は、SARS-CoV-2 に対する獲得免疫のうち、抗体を産生する B 細胞、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の 3 つの視点から COVID-19 の免疫反応を捉えることを目的とした。

対象は、54 例の COVID-19 患者（24 例は急性期）で重症度は軽症から重篤例までが含まれ、発症から検体採取までは 4 日から 37 日であった。対照群は健康者 15 例であり、SARS-CoV-2 特異的抗体、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞を種々の方法で定量化した。

### 結 果

#### 1) SARS-CoV-2 特異的抗体の反応

S タンパクの RBD 領域は他のコロナウイルスと比べると変異があり、中和抗体の標的となっている。そこで、SARS-CoV-2 の RBD IgG, IgM, IgA の力価を測定した。その結果ほとんどの例で（24/28 急性, 15/15 回復期）で RBD IgG が検出されたが、28%では低かった。また、RBD IgA は同様に恒常的に検出されたのに対し、IgM の頻度は低かった。次に、S タンパク全長に対する IgG, IgM, IgA の力価を測定した。その結果、S タンパクの IgG, IgA はほとんどの例で急激に反応が見られた（IgG:25/28 急性, 15/15 回復期; IgA:27/28 急性, 14/15 回復期）。IgM の頻度は RBD 同様低かった。S タンパクの IgG と IgA は RBD の IgG と IgA の力価と相関した。次に、診断で用いられている核カプシドタンパクに対する Ig 力価を測定した。その結果、IgG と IgA はほとんどの例で検出されたが、IgM の頻度が低かった。IgG と IgA の力価は S タンパクと核カプシドで相関した。次に機能的抗体について、中和活性を調べた。生ウイルスと偽ウイルス(PSV)での結果は相関したので、PSV での結果を検討した。SARS-CoV-2 の中和抗体はほとんどの例(25/28 急性, 14/15 回復期)で検出可能であった。また、中和抗体の力価は RBD の IgG, IgA と相関したことから、RBD が標的であることがわかった。

#### 2) SARS-CoV-2 特異的 CD4+T 細胞の反応

CD4+T 細胞は、SARS-CoV-2 ペプチドプールで刺激された抗原特異的細胞を、TCR 刺激によって誘導されたマーカーをもとに、サイトカインに依存しないで定量化する方法(AIM-FC, 表面 CD40L+OX40+)によって調べた。その結果、SARS-CoV-2 特異的 CD4+T 細胞は、ほとんどの回復期検体(14/15)で検出された。この結果は、前回のわれわれの報告と一致するものであった。しかし、急性期の検体では 77%でしか検出されなかった(23/30)。まとめると、十分な反応をする CD4+T 細胞は、急性期の 50%(15/30)、93%の回復期(14/15, >0.1% SARS-CoV-2 特異的 combined CD4+細胞)で検出された。INF  $\gamma$ , IL-2 は急性期、回復期両者の細胞で同定されたが、ペプチド刺激の上清からも検出された。

### 3) SARS-CoV-2 特異的 CD8+T 細胞の反応

SARS-CoV-2 特異的 CD8+の検出には、ペプチドプールによる試験管内刺激と AIM-FC(表面 CD69+CD137/4-1BB+)で行った。その結果、S (Spike), N (Nucleocapsid), M (Membrane), および MP\_R (Megapool of Peptide Representing the top predicted HLA class II epitopes outside of S)に特異的な CD8+が 87% (13/15, >0.1% combined AIM+CD8+T 細胞) の回復期例で検出されたが、急性期では 53%(16/30)に過ぎなかった。多くの場合、INF  $\gamma$ +CD8+T が検出され、これらの細胞は granzyme B, TNF  $\alpha$  を発現していたが、IL-10 は発現していなかった。

### 4) 獲得免疫反応と COVID-19 の重症度

SARS-CoV-2 抗原特異的抗体、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞はそれぞれ正の相関関係があった(p<0.0001)。特異抗原の経時的な変化をみると、重症の C81 患者では、22 病日(d22 PSO)に測定限界の抗体しかなかったが、d32 には抗体価の上昇があり、これは他の症例より 3 週間も遅かった。また、CD4+T と CD8+T は d22 の時点で 0.1%であった。C97 も重症であったが、d13 までは CD4+T と CD8+T が検出されなかった。このように、重症例では、抗体価の上昇は一定の傾向がなく、多くの場合 CD4+T と CD8+T が検出されなかった。抗体の出現が重症度と関連しなかったため、この場合は、他の受動免疫が重要と思われた。また、CD4+T と CD8+T はより軽症例で検出され、抗体がまったく上昇しないにもかかわらず軽症な例では、CD4+T と CD8+T が検出されたことから、T 細胞による免疫が重要と考えられた。以上の結果から、免疫反応にはいろいろな

場合が考えられたので、以下の 2 つの検討を行った。1 つは、より単純化した受動免疫の解析(ADIM)であり、もう 1 つは、抗原特異的な広範囲の補正マトリックス解析である。ADIM では、3 つの免疫がない場合を 0 とし、1 つある場合は 2、2 つある場合は 3、3 つすべての場合を 4 とした。その結果、すべての場合が存在し、急性期の 35%と入院なしの 73%が ADIM3 に適合した。受動免疫が弱い場合は、より重篤な COVID-19 の病態であった( $p=0.007$ , ADIM0&1 vs. ADIM 2&3)。したがって、より広い受動免疫は、COVID-19 の重症化を防いでいると考えられた。

次に、より広範囲の解析では、抗原特異的なものも含め 111 の項目を検討し、同時に一般的な免疫応答細胞、プラズマサイトカイン、年齢、合併症、COVID-19 の重症度も同時に検討した。それらをヒートマップにプロットし (correlograms) 解析したところ、急性期に限ると CD4+T 反応特異的なもの (e.g. S, N, M, MP\_R) と機能的なもの (e.g.  $INF\ \gamma$ ,  $T_{FH}$ ) は階層構造クラスターを形成し、有意な相関関係にあったことから、急性期では CD4+T の反応が恒常的であると考えられ、CD8+T も同様であった。抗原特異的な T 細胞と SARS-CoV-2 抗体に絞って解析するために、抗原特異的な計測と、これまでに発表した免疫学的な手法を用いた。代理マーカーを用いて解析したが、抗原特異的な階層構造のクラスターは形成されなかった。しかしながら、活性化 CD8+T と SARS-CoV-2 特異的な CD8+T は合理的な相関関係を示した ( $r=0.55$ ,  $p=0.0002$ )。SARS-CoV-2 特異的な CD4+T と抗体はより限定的な相関を示した。代理マーカーによる結果は SARS-CoV-2 特異的 T 細胞や抗体の直接計測に及ばなかった。

5) 高齢者では受動免疫が協調せず、ナイーブな CD4+や CD8+細胞が少ない年齢は、COVID-19 の重症度と相関した( $p=0.0002$ )が、これは広く認められている。注目すべきことに、抗原特異的な SARS-CoV-2 免疫反応と年齢との相関があった。そこで、免疫的な関係同士を高年齢急性期患者で検討した。その結果、SARS-CoV-2 の受動免疫反応は 65 歳以上ではそれより若い人と比べてバラバラであった。ナイーブ CD4+と CD8+は年齢と負の相関があり、COVID-19 のピーク時の重症度とも負の相関があった。CD4+に関しては急性期では相関があったが、全症例を加えると相関が消失した。このことから、少ない CD8+T は COVID-19 の重症化のリスクファクターと考えられた。

## 6) COVID-19 の重症度と抗原特異的免疫反応の強い関係

これらの結果から、どの抗原特異的な免疫反応が COVID-19 の重症度ともっとも関連があるのかを検討した。その結果、急性期で重症度の軽いものとは  $\text{INF } \gamma$ -産生  $\text{CD8+T}$  が相関していた ( $\text{INF } \gamma$  ICS  $r=-0.80$ ,  $p=0.005$ 、 $\text{INF } \gamma$  分泌  $r=-0.63$ ,  $p=0.002$ )。全症例で見ると、SARS-CoV-2 特異的  $\text{CD8+T}$  細胞であった ( $r=-0.43$ ,  $p=0.002$ )。また、SARS-CoV-2 特異的  $\text{cT}_{\text{FH}}$  でも認められた。注目すべきことに、スパイク特異的  $\text{CSCR3-CCR6+CD4+T}$  細胞とスパイク特異的  $\text{CSCR3-CCR6+cT}_{\text{FH}}$  は低い重症度と相関していた ( $r=-0.57$ ,  $p=0.0001$ )。IL-17 $\alpha$  は一般的には認められず、IL-22 は認められたが重症度と相関はなかった。これらのことから、 $\text{CD4+T}$  による  $\text{CCR6}$  の発現は、肺への集積の結果であると考えられた。統計学的に有意な特異抗体と重症度とは相関がなかった。これらのことより、SARS-CoV-2 特異的 T 細胞の強い発現が COVID-19 の低い重症度と関連していた。

## 考 察

今回の急性期の COVID-19 患者の抗原特異的な抗体と T 細胞の結果から、1) 獲得免疫反応が COVID-19 の重症度に歯止めをかける、2) 抗体、 $\text{CD4+T}$  細胞、 $\text{CD8+T}$  細胞の協調した反応が個々の反応よりよく、とくに SARS-CoV-2 特異的  $\text{CD4+T}$  細胞が COVID-19 の低い重症度に関連している、3) CXCL10 は T 細胞の反応が障害された際の血清マーカーであろう、4) 加齢とナイーブ T 細胞の欠乏が重症な COVID-19 にかかりやすくなる、などの点が明らかになった。これらの発見は、COVID-19 の免疫機構と病理を理解する上で、またワクチン開発において重要である。

今回、中和抗体価で重症度が減少することの予想はできなかった。その代わりに、広範囲の協調した獲得免疫反応が低い重症度と関連があった。逆に言うと、こういった反応がない、または少ないと重症度が増すことになる。SARS-CoV-2 に特異的な  $\text{CD4+T}$  細胞は、免疫の防御的な反応と関連していた。お互いに補い合う働きが中和抗体、 $\text{CD4+T}$  細胞、 $\text{CD8+T}$  細胞の間にある。 $\text{CD4+}$  や  $\text{CD8+T}$  細胞は、急性期の感染をコントロールし、消失させるのに重要である。加えて、 $\text{T}_{\text{FH}}$  細胞は、多くの IgG 反応や高度の中和抗体の産生に必須である。これらの反応は、ワクシニアウイルスやポックスウイルス感染でも見られる。

ナイーブ T 細胞が見られないことは、COVID-19 が重症化する際の免疫学的

リスクとなる。高齢者でナイーブ T 細胞が少ないことは、重症 COVID-19 のリスクを悪化させる。なぜなら、初期の自然免疫が SARS-COV-2 によって阻害されると、T 細胞のプライミングも阻害されるからである。さらに肺内では、加齢によって特異的な抗原提示細胞が減少している可能性もある。ナイーブ T 細胞が減少していることは、リンパ球減少、重症者でみられる全体的な T 細胞の減少などによって増悪する。

獲得免疫は、免疫病理学的な原因になる可能性がある。病的な獲得免疫が COVID-19 の免疫病理に関与している明確な証拠はない。入院 COVID-19 患者では、CD4+T 細胞を歪めるような TH2 や TH17 サイトカインを持っていなかった。また、CD8+T 細胞に反応するサイトカインのプロファイルは入院患者とそうでない患者とで差がなかった。今回の結果から、重症患者では、獲得免疫反応は遅延し、ばらばらになる。獲得免疫に関する知見により、不規則な自然免疫こそが COVID-19 の免疫病理学的な中心である。

ワクチン開発は主要な話題である。ワクチンは自然の感染における防衛的な免疫を直接真似る必要はないが、そこからの情報を得るべきである。現在進行している感染を制御することは予防することより挑戦的である。今回のデータから、中和抗体は急性期の COVID-19 を解決する役割はあるものの、統計的な相関は、SARS-CoV-2 特異的な CD4+ないしは CD8+T 細胞より抗体の方は少なかった。このことから、ワクチンのアプローチは、中和抗体のみならず SARS-CoV-2 に特異的な CD4+や CD8+T 細胞を誘導するようなものが、SARS-CoV-2 感染による COVID-19 で見られるような協調した獲得免疫反応を生むであろう。

#### 文献

- 1) Moderbacher CR, et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. Cell 2020 doi:10.1016/j.cell.2020.09.038