






学部長	所属長	本部長	副本部長	室長
				

令和4年 3月 25日

理事長 殿

学長 殿

令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症
対策支援プロジェクト研究報告書

標記の件に関しまして、別紙のとおり報告いたします。

また、本研究報告の内容は、近畿大学学術情報リポジトリ（KURepo）に公開する旨、承諾いたします。

1. カテゴリー	<input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 開発・提案 / カテゴリーNo 20
2. 企画題目	肺滞在型メモリーCD8T細胞長期維持機構の解明

研究代表者

所 属： 医学部 免疫学教室職・氏名： 講師・高村 史記

令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症
対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	肺滞在型メモリーCD8T細胞長期維持機構の解明
研究者所属・氏名	研究代表者：高村 史記 共同研究者：

1. 研究、開発・提案 目的及び内容

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染拡大沈静化の有効手段と期待される重症化予防ワクチンは各国に普及しつつあるが、様々なウイルス表面タンパク変異株出現による中和抗体免疫逃避が懸念される。一方、T細胞免疫応答は株間で保存された内部タンパクを標的とすることで変異株にも広く対応可能である。現状のワクチンもT細胞免疫応答誘導性に優れるが、筋肉内接種では感染防御に有効な呼吸器粘膜における免疫応答誘導は困難であり、今後はT細胞免疫応答を効率よく呼吸器粘膜に誘導可能なワクチン開発が望まれる。

呼吸器粘膜に長期間維持される滞在型メモリーCD8T細胞（Tissue-resident memory CD8 T cell: CD8 T_{RM}）は局所にて感染細胞を早期認識・排除することで感染防御免疫の最前線を担う。従って、肺粘膜にてCD8 T_{RM}をいかに効率よく誘導・維持するかが新型コロナウイルスを含む呼吸器感染症ワクチン開発の最重要課題である。申請者はマウスインフルエンザウイルス感染モデルを用いて、肺におけるCD8 T_{RM}分化・維持の場を世界で初めて特定し（J. Exp. Med. 2016）、その部位から上皮組織に継続的にCD8 T_{RM}が供給されることで防御免疫が強化されていることを発見した（J. Exp. Med. 2019）。しかしながら、肺CD8 T_{RM}分化・維持の場は治癒に伴い早期に消失してしまうこと、即ち、肺CD8 T_{RM}長期維持は困難であることも判明した。

一方、申請者は先行研究にて新型コロナウイルスワクチンにも使用されているアデノウイルスベクターを経鼻接種することで、肺局所にて抗原発現が持続し、本来定常状態にてT_{RM}に分化することのない循環型メモリーT細胞が継続的にT_{RM}へと分化し、且つ、局所にて増殖・蓄積することを発見し、この現象を「T_{RM}インフレーション」と命名した（Mucosal Immunol. 2021）。この機構では分化・維持の場の消失とは無関係に肺CD8 T_{RM}が長期維持可能である。本研究では肺にてT_{RM}インフレーションが誘導される機構を解明し、将来のワクチン開発に応用することを目的とした。

2. 研究、開発・提案 経過及び成果

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。ウイルス接種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。

2. 肺における CD8 T_{RM} インフレーション誘導部位の同定

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。

3. インフレーションを起こした肺 CD8 T_{RM} の性状解析

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、Ifi272L2a、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。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・提案 計画

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。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日（予定を含む）
第 50 回日本免疫学会学術集会	学会発表（ポスター）	2021 年 12 月 8 日

5. 研究、開発・提案 課題の成果発表等

解析、追加実験が済み次第論文発表予定