

厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
分担研究報告書

COVID-19 mRNA ワクチン追加接種後の T 細胞性免疫反応推移に関する解析

研究協力者	山本 拓也	医薬基盤・健康・栄養研究所	プレシジョン免疫プロジェクト
研究協力者	野木森拓人	医薬基盤・健康・栄養研究所	プレシジョン免疫プロジェクト
研究協力者	升田 雄士	医薬基盤・健康・栄養研究所	プレシジョン免疫プロジェクト
研究分担者	福島 若葉	大阪公立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
研究協力者	松浦 知香	大阪公立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
研究分担者	大藤さとこ	大阪公立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
研究協力者	加瀬 哲男	大阪公立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
研究協力者	近藤 亨子	大阪公立大学医学部・附属病院事務局	大阪公立大学大学院医学研究科研究支援プラットフォーム生物統計部門
共同研究者	松本 一寛	大阪公立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
共同研究者	吹田安佐詠	大阪公立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
共同研究者	迎 恵美子	大阪市立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
共同研究者	笠松 彩音	大阪市立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
共同研究者	小西 絢子	大阪市立大学大学院医学研究科	公衆衛生学
共同研究者	小宮枝里子	大阪公立大学大学院医学研究科	整形外科学
共同研究者	山口 悦子	大阪公立大学大学院医学研究科	医療の質・安全管理学
研究協力者	掛屋 弘	大阪公立大学大学院医学研究科	臨床感染制御学
研究協力者	城戸 康年	大阪公立大学大学院医学研究科	ウイルス学／寄生虫学分野
研究協力者	中釜 悠	大阪公立大学大学院医学研究科	寄生虫学
研究協力者	加来奈津子	大阪公立大学大学院医学研究科	ウイルス学
研究協力者	仁田原裕子	大阪公立大学大学院医学研究科	ウイルス学
研究協力者	金子 幸弘	大阪公立大学大学院医学研究科	細菌学
研究協力者	金子 明	大阪公立大学大学院医学研究科	寄生虫学
研究代表者	廣田 良夫	医療法人相生会臨床疫学研究センター	

研究要旨

本研究では新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチンの T 細胞性免疫原性について、mRNA ワクチン Booster 接種において記憶 CD8 T 細胞反応が効果的に誘導されるための分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。本報告の解析対象者は、医療従事者を中心とする 20~64 歳の健康成人で、mRNA ワクチンを既に 2 回接種した 335 人（男性：60 人，女性：275 人，年齢中央値：46 歳）である。介入のない前向き観察研究であり、大阪公立大学医学部により mRNA ワクチン 3 回目接種前、接種 10~15 日後、接種 3 か月後、接種 6 か月後に採血が行われた。335 人のうち全てのタイムポイントの検体が揃っている 177 人について、HLA タイピングを行なった。HLA タイピングの結果をもとに、101 人について mRNA ワクチン接種 3 ヶ月後の抗原特異的 CD8 T 細胞反応の解析を行なった。抗原特異的 CD8 T 細胞の検出には、Spike 抗原内に存在する HLA-A*24:02 拘束性エピートプである NYNYLYRLF (NF9) および QYIKWPWYI (QI9) のそれぞれのペプチドを搭載した HLA テトラマーを使用した。解析した 101 名のうち、70 人で QI9 認識 CD8 T 細胞が陽性であり、48 人で NF9 認識 CD8 T 細胞が検出された。表現型解析において、QI9 認識 CD8 T 細胞は NF9 認識 CD8 T 細胞と比較して、より分化が進行し、免疫チェックポイント分子 PD-1 の発現上昇及び IL-2/IL-15 受容体 CD122 の発現低下が見られた。この結果は、同じ Spike 抗原内のドミナントエ

ピトープでありながら、エピトープ毎に CD8 T 細胞反応の質が異なることを示唆しており、今後はこの現象が mRNA ワクチンの CD8 T 細胞に対する Booster 効果に寄与しているか検証する。

A. 研究目的

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的な大流行を受け、mRNA ワクチン技術基盤が新たなワクチンモダリティとして急速に開発され、全世界で接種が開始された。この mRNA ワクチンは特定の標的遺伝子に対して迅速に適応可能という特徴を持ち、COVID-19 だけでなく他の感染症やがんに対する新しい予防・治療法開発の道が開かれる可能性がある技術基盤である。実際にインフルエンザウイルス、RS ウイルスをはじめとする各種感染症やメラノーマ、膵臓がんなどに対する mRNA ワクチンの開発が世界中で進められている (Barbier et al., *Nat. Biotech.*, 2022)。

COVID-19 mRNA ワクチンは強力に抗体反応を誘導することが多くの論文により明らかとなっている (Belik et al., *Nat. Com.*, 2022, Herring et al., *Clin. Infect. Dis.*, 2023)。さらに CD4 T 細胞反応についても、mRNA ワクチン 1 回目接種の段階で早期に強く誘導されることが報告されている (Painter et al., *Immunity*, 2021)。一方で mRNA ワクチンによる CD8 T 細胞反応は抗体反応や CD4 T 細胞反応と比較して弱く、また、半減期 27 日という短さでその頻度は減少する (Goel et al., *Science*, 2021)。加えて、我々は mRNA ワクチンにより誘導される CD8 T 細胞反応について、細胞傷害分子の発現量が mRNA ワクチン接種後経時的に減少することを報告している (Nogimori et al., *Front. Immunol.*, 2023)。つまり、mRNA ワクチンにより誘導される CD8 T 細胞は、量のみならずその質も長期維持されない。元来 CD8 T 細胞はウイルス感染細胞やがん細胞の排除に不可欠な役割を持つため、効果的な CD8 T 細胞反応の誘導法は、ウイルス再感染制御の鍵となる。

低下した CD8 T 細胞反応を改善する方法として、ワクチン複数回接種 (Booster 接種) が挙げられる。事実、多くの方が mRNA ワクチンを 3 回以上接種しており、抗体反応に関しては Booster 接種により増大する。一方で CD8 T 細胞反応に関しては、50% 程度の人にしか Booster 接種効果が見られないことが示唆されている (Maringer et al., *Sci. Immunol.*, 2022)。つまり、mRNA ワクチンの追加接種が CD8 T 細胞反応に及ぼす影響は一様ではなく、効

果的な CD8 T 細胞反応誘導方法論を見出すためには、このような個人差を生み出す分子メカニズムを解明することが重要である。以上の背景を踏まえ、本研究では、臨床検体を用いた解析を通じて、mRNA ワクチン Booster 接種において記憶 CD8 T 細胞反応が効果的に誘導されるための分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 研究デザイン

前向きコホート研究 (市販後ワクチンの観察研究)

2. 実施期間

実施計画の公表日～2027年3月31日

3. 対象者の選択基準

選択基準：以下 1)～6) すべてを満たす者

- 1) 以下 (a) (b) (c) のいずれかに該当する者
 - (a) 「大阪府における新型コロナウイルスワクチンの有効性と安全性に関する前向きコホート研究」* に参加した者
 - (b) 大阪公立大学医学部附属病院の職員
 - (c) 大阪公立大学医学部・医学研究科の教職員・学生

* 大阪公立大学医学部附属病院臨床研究審査委員会承認番号：OCU010E、実施計画番号 [jRCT 番号]：jRCT1051200143

- 2) 年齢 20 歳以上
- 3) 過去に新型コロナウイルスワクチンを 2 回接種した者
- 4) 新型コロナウイルスワクチン 2 回目接種後 5 ヶ月を経過した者
- 5) 研究期間中、所定の回数の採血ができる見込みの者
- 6) 研究参加について本人の自由意思による文書同意を得た者

除外基準：以下 1) 2) のいずれかに該当する者

- 1) 過去に未承認の新型コロナウイルスワクチンを接種したことがある者 (例：承認前の治験での接種など)
- 2) 研究責任医師又は研究分担医師が研究対象者として不適格と判断した者

4. 細胞性免疫の評価

研究対象者の末梢血中の SARS-CoV-2 特異的 T 細胞反応を評価するため、大阪公立大学にて採血および細胞調製された検体を使用した。具体的には、COVID-19 mRNA ワクチン 3 回目接種前、接種 10～15 日後、接種 3 か月後、接種 6 か月後にて採血が行われた。末梢血単核細胞 (PBMCs) の分離・凍結が行われた後に医薬基盤・健康・栄養研究所に提供された。各個人の HLA-A タイピングは LABType SSO HLA A Locus (VERITAS) を用い、説明書に従い実施した。凍結細胞を融解後、フローサイトメーターを用いて抗原特異的 T 細胞の解析を行なった。具体的には、PBMCs を、50U/ml の benzonase nuclease (Millipore, Darmstadt, Germany)、10% のウシ胎児血清、およびペニシリン・ストレプトマイシンを含む 1 ml の RPMI1640 培地中で 2 時間インキュベートした。その後、QI9 ペプチド及び NF9 ペプチドをそれぞれ搭載した HLA テトラマーを加え、15分37度でインキュベートした。PBS で洗浄後、Live/Dead 試薬及び各種表面抗原に対する蛍光色素抗体を加え、15分室温でインキュベートした。PBS で洗浄後、1%PFA で固定し、FACSymphonyA5 (BD Biosciences) を用いてデータを取得した。データは FlowJo v.10.8.1 を用いて解析された。

(倫理面への配慮)

本研究は医薬基盤・健康・栄養研究所及び大阪公立大学医学部の倫理審査委員会の承認を得た後に同意を得られたドナーの検体のみ実施した。個人情報 は共同研究機関である大阪公立大学で記号化され、個人情報管理者によって管理・保管される。医薬基盤・健康・栄養研究所には匿名化された試料や情報が提供され、個人を特定することはできない。

C. 研究結果

335名の参加者から、ワクチン 3 回目接種前、接種 10～15 日後、接種 3 ヶ月後、接種 6 ヶ月後の全てのタイムポイントの検体が揃っている 177名を対象として、まずは HLA タイピングを行なった。その結果、HLA-A24 遺伝子を有する人が 101名、HLA-A02 遺伝子を有する人が 86名であり、HLA-A24 遺伝子及び HLA-A02 遺伝子のどちらも有していない人が 26名であった (図 1)。HLA-A24 遺伝子を有している 101名を対象に、3 回目ワクチ

ン接種後 3 ヶ月におけるエピトープ特異的 CD8 T 細胞の頻度をフローサイトメリーにより解析した。これまで、COVID-19 感染者で CD8 T 細胞反応が惹起される多数のイムノドミナントエピトープが報告されている。その中でも本研究では Spike 抗原内に存在する HLA-A*24:02 拘束性エピトープである NYNYLYRLF (NF9) および QYIKWPWYI (QI9) (Francis et al., *Sci. Immunol.*, 2021) に対する CD8 T 細胞反応を評価した。FSC-A, SSC-A 及び FSC-H に基づくサイズゲートにより、シングルレットなリンパ球をゲートし、その後、死細胞の除去及び CD3 陽性 T 細胞の分画を行なった。CD3 陽性 T 細胞をさらに CD4 及び CD8 で展開し、CD8 T 細胞を分画した (図 2A)。CD8 T 細胞中の QI9-HLA テトラマー陽性及び NF9-HLA テトラマー陽性細胞の頻度を算出した。HLA-A24 遺伝子を持たない人をネガティブコントロールとし、平均値 +2SD をカットオフ値として定義した。その結果、QI9 に対する反応を示す人が 69.3%、NF9 に対する反応を示す人が 47.5% であった (図 2B)。101名の中で、QI9 及び NF9 の両方に反応を示す人は 38人、QI9 のみに反応を示す人は 32人、NF9 のみに反応を示す人は 10人、反応を示さない人は 21人であった (図 2C)。

SARS-CoV-2 S 抗原特異的 CD8 T 細胞の表現型を解析するため、CD27 及び CD45RO 分子の発現に基づき、CD8 T 細胞を分画した。CD27、CD45RO の両者を発現する分画をセントラルメモリー型 (Tcm) と定義し、さらに IL-7 受容体分子である CD127 の発現に基づいて分画した。CD27 陰性画分については、CD57 分子の発現に基づいてエフェクターメモリー型 (Tem) およびターミナルエフェクター型 (Tte) に分画した。CD27 陽性 CD45RO 陰性画分についてはさらに CD45RA、CCR7、CD95、CD58 の発現に基づいて、幹細胞様メモリー型 (Tscm) と定義した (図 3A)。QI9-HLA テトラマー陽性 CD8 T 細胞及び NF9-HLA テトラマー陽性 CD8 T 細胞の表現型の割合を計算したところ、QI9 に反応性を示す CD8 T 細胞は NF9 に対する CD8 T 細胞と比較して、Tem の頻度が低く、Tte の頻度が有意に高いことが示された (図 3B)。

次に、SARS-CoV-2 S 抗原特異的 CD8 T 細胞の

表現型解析について、メモリー型の評価に加えて、免疫チェックポイント分子 PD-1 及び IL-2/IL-15 受容体分子 CD122 の発現量について検証した。その結果、QI9 に反応性を示す CD8 T 細胞は NF9 に対する CD8 T 細胞と比較して、PD-1 分子の発現量が高く、CD122 分子の発現量が低かった (図 3C)。

D. 考察

本研究では新型コロナウイルスワクチンにより誘導される獲得免疫について、特に CD8 T 細胞に着目して解析を行なった。今回は SARS-CoV-2 Spike タンパク質中の HLA-A24 拘束性ドミナントエピトープである QI9 及び NF9 を使用し、ワクチン 3 回目接種 3 ヶ月後の抗原特異的 CD8 T 細胞の頻度解析及び表現型解析を行なった。

頻度解析から、QI9 に反応性を示す人は 69.3% であり、47.5% であった NF9 と比較して QI9 はよりドミナントなエピトープであることが示された。これは過去の報告とも一致している (Kuse et al., *Nat. Com.*, 2022)。表現型解析から、QI9 に対する CD8 T 細胞に関して、ターミナルエフェクター型のメモリー CD8 T 細胞が Tsem, Tem, Tem と比較して頻度が高く、より分化が進行したサブセットに偏っていた。興味深いことに、NF9 に対する CD8 T 細胞では Tem 型に偏っており、エピトープ毎に異なる表現型を示すことが明らかとなった。さらに QI9 に対する CD8 T 細胞は PD-1 分子の発現が高く、CD122 分子の発現が低いことから、疲弊状態にあり、増殖能が低下していると考えられる。以上のようにエピトープ毎に抗原特異的 CD8 T 細胞の表現型が異なる理由として、エピトープと CD8 T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) の親和性に起因すると考えられる。QI9 は NF9 よりもドミナントなエピトープであり、複数回のワクチン接種により繰り返し刺激されることで分化・疲弊が進んでいるかもしれない。

本研究は CD8 T 細胞の 3 回目 Booster 効果に影響を与える要因を探索するものであるが、今回の報告ではワクチン 3 回目接種 3 ヶ月の 1 タイムポイントのみの結果である。限られた結果ではあるが、エピトープ毎に抗原特異的 CD8 T 細胞の表現型が異なることが、Booster 効果に影響しているのではないかとの手がかりを掴むことができた。

mRNA ワクチンは新規モダリティではあるが、

SARS-CoV-2 パンデミックという特殊な環境によって世界中で利用されるようになった。しかし、その免疫原性についてはまだまだ解明されていない部分が多々あるように思える。今後、COVID-19 以外の新興・再興感染症や、がんに対して mRNA ワクチンを適用させるためには、更なる基礎的な知見を積み重ねる必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表 (発表雑誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

