

「単一細胞レパトア-脂質オミクス解析による抗ウイルス応答メカニズムの解明」

かずさ DNA 研究所オミックス医科学研究室 室長

氏名 遠藤 裕介

要旨

昨今のパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスを含め、感染症の多くには未だ有効な治療薬が少ない。また、開発中のものも含め現状の治療薬はウイルス表面のスパイクタンパクやウイルスポリマーゼを標的としたものが依然として中心となっており、感染症に対する新たな創薬モダリティが求められている。

こうした背景の基、申請者らは脂質代謝を標的とすることで、インフルエンザや SARS-CoV-2 感染を抑制する知見を得ている。そのメカニズムとして、宿主の脂質代謝を人為的に抑制することで、T 細胞の抗ウイルス応答を増強させると同時に、ウイルスの脂質利用を制限させる、2 重の感染防御システムが作動していることを見出している。しかし、脂質代謝を介した抗ウイルス応答に関して、どの T 細胞クローンが保護作用を発揮しているのか？など創薬開発に向けて解決すべき問題が残されている。そこで、本提案研究では、脂質代謝を基盤とした抗ウイルス免疫応答を担う細胞・分子ネットワークの解明を目指し、研究を推し進めた。具体的には、インフルエンザウイルス感染モデルを用いて単一細胞マルチオミクス解析を行ったところ、特に再感染時において Tfh や Th1、及び CD4 陽性 CTL 分画がサブクラスターとして同定された。また、脂質代謝阻害剤の投与タイミングによる抗ウイルス作用について検証を行ったところ、感染前に阻害剤を吸入させる予防モデルにおいて、感染前の 3 日前であれば感染後と同様に顕著な抗ウイルス効果が認められた。これら一連の研究結果より、脂質代謝阻害による抗ウイルス応答は特定の保護活性を有する免疫細胞サブセットにより誘導されることが示唆された。

背景・目的

ウイルスは生体内に侵入すると免疫システムに認識され、活性化した免疫細胞から IFN が産生され、抗ウイルス応答が開始される。免疫システムの活性化をはじめとして、ウイルスに対する生体防御応答の一端は解明されているが、昨今のパンデミックを引き起こした新型コロナウイルスをはじめとして、ウイルス感染症の多くには未だ有効な治療薬が少ない。そのような背景の下、申請者らは脂質代謝酵素 SCD2 を T 細胞特異的に欠損・薬理阻害することで I 型 IFN 産生の増加および抗ウイルス遺伝子の発現増強など劇的に抗ウイルス免疫応答を上昇させる興味深い知見を見出している¹⁻³⁾。

また、新型コロナウイルスやインフルエンザウイルスに代表されるようなエンベロープを有するウイルスは宿主の脂質膜を利用することで効率よく増殖し、感染を拡大させる。実際に我々の予備検討より、上皮細胞の脂質合成経路を薬理阻害することでウイルスが脂質を利用できなくなり、上皮細胞の感染自体が制限される予備結果を得ている。さらに、肺へ SCD2 阻害薬を吸入させることで、T 細胞の抗ウイルス応答を増強させながら、同時にウイルスの脂質利用を制限させる状況が作りだせる。この手法を用いると、致死性のインフルエンザウイルスに対して非常に強い防御応答を誘導することが可能である。

こうした申請者らの実績・経験を活かして、脂質代謝を基盤とした抗ウイルス免疫応答を担う細胞・

分子ネットワークの解明を行う。特に、脂質代謝コントロールによって保護作用を発揮する T 細胞クローンの同定、また 2 重の感染防御を発揮する脂質代謝特性を解明し、脂質代謝に着目した従来とは異なる画期的な創薬モダリティの開拓を目指し、研究を推進した。

方法

① 感染症動物モデルにおける単一細胞マルチオミクス解析

ウイルス感染マウスモデルを用いて、感染前後の複数の時点（感染前、感染ピーク期、記憶期、再感染期）において、肺から単核球を分離し、単一細胞マルチオミクス解析（トランスクリプトーム、表面マーカー、TCRレパトア解析）を実施した。得られたデータのマッピング・トランスクリプトーム解析・表面マーカー解析・TCRレパトア解析はCell Rangerを用いて実施し、Seuratアルゴリズムにより統合した。その統合データを用いてWeighted Nearest Neighbor (WNN) 法によるクラスタリングを行い、各免疫細胞に該当する細胞分画を同定すると同時に、各分画に特徴的なmRNAおよび表面マーカーを抽出した。さらに、TCRレパトア解析を組み合わせることで、各T細胞分画におけるクローン拡大の程度を評価した。

② 感染症治療に向けた SCD2 阻害薬の投与タイミング・量の検証（インフルエンザ/SARS CoV2）

これまでの予備的知見より、肺へSCD2阻害薬を吸入させることで、T細胞の抗ウイルス応答を増強させながら、ウイルスの脂質利用を制限させる状況が作りだせる。事実、SCD2阻害薬をウイルス感染と同タイミングで投与することにより、致死性のインフルエンザウイルスに対して非常に強い防御応答を誘導することが可能である。本項目では、SCD2阻害薬の投与タイミング（事前、同時、感染後）および投与量について、マウス感染症モデルを用いて検証した。

結果

研究項目①に関して、インフルエンザウイルス感染前後や再感染時の肺 T 細胞を用いて単一細胞マルチオミクス解析を行ったところ、再感染時においてユニークな特徴を示す細胞集団が認められた。特に、CD4 陽性 T 細胞については、 $Cxcr5^+Pdcd1^+Bcl6^+$ の Tfh 分画、 $Tbx21^+Cxcr3^+Ifng^+$ の Th1 分画が集団として認められた。さらに、Th1 分画の中には *Gzm*、*Ifnar* や *Ccl4* を高発現する細胞傷害活性を持った CD4 陽性 CTL (Cytotoxic T Lymphocyte) 分画もサブクラスターとして検出された。また、TCR レパトア解析についても同時に行ったところ、Tfh 分画や一部の Th1 分画において高いクローナリティを示す細胞集団が示されている。これらの細胞集団についてパスウェイ解析を行った。結果として、CD4 陽性 CTL ではいくつかのケモカイン受容体や脂質代謝に関する因子が濃縮されていたのに対して、Tfh 分画では *Dusp* (Dual Specificity Phosphatase) ファミリーを含む脱リン酸化酵素が顕著に認められた。

研究項目②に関しては、SCD2 阻害剤の投与タイミングによる抗ウイルス作用について検証を行った。感染前に阻害剤を吸入させる予防モデルにおいて、感染前の 3 日前であれば感染後と同様に顕著な抗ウイルス効果が認められた。一方で、感染前より 1 週間程度の投与だとほとんど抗ウイルス作用は認められなかった。また、SCD2 阻害剤を吸入させ生存したマウスに対して、再感染を行ったところ、初期感染の 5-10 倍のウイルス量（通常のマウスでは 1 倍量でも致死に該当するタイター）に対しても強力な抵抗性が認められた。

考察

本研究は、未だ有効なモダリティが不足している感染症に対して、脂質代謝という新たな観点から取り組み、感染の治療や予防を目指し、研究を行った。また、感染の早期から病態重症化及び再感染に到る経時的な免疫応答シーケンスについて、保護作用を発揮する特定の細胞集団の同定についても並行して検討した。その成果として、脂質代謝酵素 SCD2 阻害剤の同時投与だけでなく事前投与によりインフルエンザウイルスに対して強力な防御作用を示すことが明らかとなった。この結果は、SCD2 阻害剤はインフルエンザウイルスに対して強力な予防効果を示すことを意味している。ただし、感染前より 1 週間程度の投与だとほとんど抗ウイルス作用は認められなかったため、より長期の予防作用を与えるためには阻害剤の半減期を改善する必要がある。この結果に加えて、SCD2 阻害剤を吸入させ生存したマウスに対して、再感染を行ったところ、初期感染の 5-10 倍のウイルス量に対しても強力な抵抗性が認められた。これは、SCD2 阻害剤がウイルス感染に対する免疫記憶形成に対して、アジュヴァントとして作用していることを示している。

さらに、一連の感染-免疫応答におけるシングルセル解析によって、Tfh や CD4 陽性 CT などいくつかの特異的 T 細胞サブセットが検出された。現在、これらのサブセットのどの集団が保護作用に対して最も重要であるかを検証中である。さらに、免疫記憶アジュヴァント活性を有する SCD2 阻害群についても同様のシングルセル解析を進めており、脂質代謝によって与えられる強力な再感染防御がどのサブセットに依存しているのか検討を進めている。

今後、免疫細胞自身の *De novo* 脂質代謝の作用と、生体環境から免疫細胞へと働きかける脂質代謝物の生理作用を双方向から精査していくことが疾患治療を評価する上で重要であると考えられる。どの代謝物、どの代謝経路を制御すればより効率的に疾患治療へと応用できるのか、疾患ごとの代謝物・免疫細胞のリンクについて研究を進め、「代謝で免疫を制御する」ことを目指していきたい。

共同研究者

金城 雄樹・東京慈恵会医科大学 細菌学講座・教授

引用論文

- 1) Kanno T., Miyako K., Nakajima T., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou HK., Ohara O., Nakayama T., and **Endo Y.*** SCD2-mediated cooperative activation of IRF3-IRF9 regulatory circuit controls type I interferon transcriptome in CD4⁺ T cells. *Frontiers in Immunol.*:13:904875 (2022) (*Corresponding author)
- 2) **Endo Y.***, Kanno T., and Nakajima T. Fatty acid metabolism in T cell function and differentiation. *International Immunology*, 34(11)579-587 doi:10.1093/intimm/dxac025. (2022) (*Corresponding author)
- 3) Kanno T., Nakajima T., Yokoyama S., Asou HK., Sasamoto S., Kamii Y., Hayashizaki K., Ouchi Y., Onodera T., Takahashi Y., Ikeda K., Hasegawa Y., Kinjo Y., Ohara O., Nakayama T., and **Endo Y.*** Scd2-mediated monounsaturated fatty acid metabolism regulates cGAS-STING-dependent type I IFN in CD4⁺ T cells. *Communications Biology* 4:820 (2021) (*Corresponding author).

助成研究に関連した発表論文

- 1) Kamii Y., Hayashizaki K., Kannno T., Chiba A., Ikegami T., Saito M, Yukihiro Akeda Y, Ohteki Y, Kubo M, Yoshida K, Kawakami K, Oishi K, Araya J, Kuwano K, Kronenberg M., **Endo Y.**, and Kinjo Y. IL-27 regulates the differentiation of follicular helper NKT cells via metabolic adaptation of mitochondria. *PNAS* (2024)
- 2) Kanno T., Miyako K., Endo T., Yokoyama S., Asou K. H., Yamada K., Ohara O., Nakayama T., Kimura Y. M. and **Endo Y.***. ACC1-mediated fatty acid biosynthesis intrinsically controls thymic iNKT cell development. *Int. Immunol.* (2023) (*Corresponding author)
- 3) **Endo Y.***, Kanno T., Nakajima T., Ikeda K., Taketomi Y., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou K. H., Miyako K., Hasegawa Y., Kawashima Y., Ohara O., Murakami M., and Nakayama T. 1-Oleoyl-lysophosphatidylethanolamine stimulates ROR γ t activity in Th17 cells. *Sci. Immunol.* 8 (86):eadd4346. (2023) (*Corresponding author)
- 4) Konno R., Kanno T., Ohara O., **Endo Y.**, and Kawashima Y. Dataset for proteogenomic signature analysis of differentiation of CD4⁺ T cell subsets. *J. Proteome Data and Methods* (2023).
- 5) Kanno T., Nakajima T., Miyako K., and **Endo Y.***. Lipid metabolism in Th17 cell function. *Pharmacol Ther.* 245:108411. (2023) (*Corresponding author)
- 6) Kanno T., Konno R., Miyako K, Nakajima T., Yokoyama S., Sasamoto S., Asou HK., Ohzeki J., Kawashima Y., Hasegawa Y., Ohara O., and **Endo Y.***. Characterization of proteogenomic signatures of differentiation of CD4⁺ T cell subsets. *DNA Res.* 30 (1):dsac054. (2023) (*Corresponding author)