

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17947

研究課題名（和文）抗体レパトア解析を用いた新たなワクチン有効性評価手法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel vaccine efficacy evaluation method using antibody repertoire analysis

研究代表者

佐野 芳 (Sano, Kaori)

国立感染症研究所・インフルエンザ・呼吸器系ウイルス研究センター・研究員

研究者番号：40832770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では皮下接種インフルエンザワクチンを接種された集団と経鼻不活化全粒子インフルエンザワクチンを接種された集団において、ワクチン接種により誘導された抗体の抗ウイルス活性や遺伝子配列の比較を行った。その結果、異なるワクチンの接種により、誘導される抗体レパトアが遺伝子レベルで異なることが示唆され、また、皮下接種ワクチンと比較して、経鼻ワクチン接種ではIgG状態で複数のウイルス株と反応性を示す交叉反応性抗体クローンが多く誘導されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では異なるワクチンの接種により異なる抗体レパトアが誘導されることを示したが、抗体可変領域の遺伝子配列を抗体の機能と結びつける上には、それぞれの抗体クローンがどのようにして抗原と結合しているかという構造的観点からより詳細な解析を行っていく必要があることが今後の課題として明らかとなった。一方で、本研究で得られた交叉反応性抗体クローンと過去に報告されている広域中和抗体クローンとでその遺伝子配列に類似点が認められたことから、抗体遺伝子配列からその機能を予測し、さらに抗体遺伝子レパトアからワクチン有効性を評価することが将来的に不可能ではないことが示唆された。

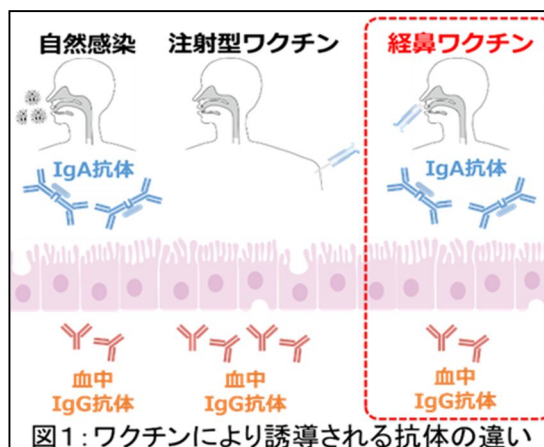
研究成果の概要（英文）：In this study, we compared the antiviral activity and gene sequences of antibodies induced in those vaccinated with a trivalent subcutaneous influenza vaccine and those vaccinated with an intranasal inactivated whole particle influenza vaccine. The results suggested that the antibody repertoire induced by different vaccines differs at the genetic level, and intranasal vaccination could induce cross-reactive antibody clones which presented reactivity with multiple virus strains at IgG state more efficiently compared to subcutaneous vaccination.

研究分野：ワクチン学、ウイルス学

キーワード：ワクチン 経鼻ワクチン インフルエンザ 抗体レパトア IgA抗体

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスはヒトの上気道の粘膜上皮細胞に感染し増殖する。そのため、インフルエンザウイルスと最前線で戦う抗体は、生体の粘膜に最も多く誘導される IgA 抗体である (Gutzeit *et al.*, *Immunol Rev.* 2014)。現行の注射型インフルエンザワクチンが誘導できるのは血中の IgG 抗体のみであるため、ウイルスへの感染後の重症化防止に寄与するが、感染自体を防ぐことはできない。これに対し、経鼻インフルエンザワクチンは自然感染と同様に抗原を上気道内に投与することで、血中の IgG 抗体に加え上気道粘膜上の IgA 抗体も誘導し、ウイルスの感染を防ぐことができる(図 1)。申請者が在籍する研究グループがこれまでに実施した臨床研究の結果、経鼻不活化全粒子型インフルエンザワクチンを接種されたヒトの気道粘膜上および血中にはウイルス感染を防ぐのに十分量のウイルス中和抗体が誘導されることが明らかになっている (Ainai *et al.*, *Hum Vaccin Immunother.* 2013)。



一方で近年、抗体医薬への応用の可能性を見据えて、インフルエンザワクチン接種者の体内に誘導される個々の抗体の性質を解析する研究が世界中で活発に実施されている。その結果、抗体個々の構造や機能によってウイルスへの感染防御機構が異なっており、そのような抗体の機能は古典的な中和抗体測定法では評価できないことが明らかになってきた。このことは、血中に誘導された抗体の「量」を指標とした従来のワクチン有効性の評価方法では、ワクチンにより誘導される免疫の「質」を十分に評価できていないことを意味している。

そのため、経鼻不活化インフルエンザワクチンの有効性発現機構の科学的根拠を明確に示すためには、「経鼻不活化インフルエンザワクチン接種によって、どのような機能的特徴を有する抗体がそれぞれどの程度ヒト体内で誘導されるのか」という問いに答える必要がある。この問いの解答は、適切な免疫を適切な量で誘導することができる理想的なワクチンの開発にとって必要不可欠で根源的な科学的根拠を与えるものであると同時に感染症学という臨床医学や免疫学という基礎医学においても重要な知見となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は経鼻および注射型不活化インフルエンザワクチン接種によってヒト体内に誘導される免疫の「質」の違いを個々の抗体分子の機能的側面と遺伝子的側面の双方から評価し、経鼻不活化ワクチンの有効性発現機構を解明することを目的とした。

従来のインフルエンザワクチンの有効性評価研究は血中に誘導される特異抗体の総量を指標に実施されているのに対し、当該研究は申請者の研究室が独自に開発している経鼻不活化ワクチンにより誘導される抗体の特徴をモノクローナルレベルで個別に評価した上で抗体遺伝子情報と関連付けることにより抗体集団全体 (レパトア) を高分解かつ網羅的に俯瞰する点に独自性と創造性がある。また、近年、ワクチン接種や病原体への感染後にどのような免疫反応が惹起されているかを評価するために、ヒト体内における抗体の遺伝子的特徴を網羅的に解析する抗体レパトア解析が注目を集めており、本研究でもワクチン接種者体内で誘導された抗体集団の特徴づけに抗体レパトア解析を応用する。

3. 研究の方法

本研究では「経鼻不活化インフルエンザワクチンと注射型インフルエンザワクチンの 2 種類のワクチンの接種により誘導された抗体集団が異なる」という作業仮説に基づき、抗体機能および抗体遺伝子の両面からのアプローチにより、経鼻ワクチンおよび注射型ワクチンにより誘導された抗体集団 (レパトア) を明らかにする。

まず、ワクチン接種者由来抗体のモノクローナルレベルでの抗体機能評価及び遺伝子解析を行い、抗体機能と遺伝子的特徴とが紐づけされたデータセットを構築する。次に、構築した抗体機能データセットを参照することにより、次世代シーケンスにより得られた網羅的な抗体遺伝子レパトア解析結果から網羅的かつ定量的な抗体機能データを作製し、二種類のワクチン接種により形成される抗体レパトアの評価・比較を行う (図2)。具体的には以下の4項目の検討を行う。

(1) ワクチン接種者由来モノクローナルIgG抗体のウイルス抗原への結合性解析

経鼻不活化インフルエンザワクチンおよび注射型不活化インフルエンザワクチンの接種者由来形質芽細胞から抽出した抗体遺伝子をもとに作製したモノクローナル IgG 抗体のウイルス抗原への結合活性を ELISA により評価する。培養細胞系を用いて作製したインフルエンザウイルスの主要抗原である、ヘマグルチニン (HA) およびノイラミニダーゼ (NA) の組換え分泌型タンパク質をウイルス抗原として用いる。皮下接種ワクチンおよび経鼻ワクチンの接種者から得られた抗体のうち、HA 抗原あるいは NA 抗原との結合性が認められた抗体クローンについて、より詳細な機能解析を行う。

(2) ウイルス抗原に結合性を有する IgG 抗体の機能解析

HA 結合抗体クローンについては、HI (Hemagglutination Inhibition) 試験により、得られた交差結合性クローンが HA 上のレセプター結合サイト (ウイルスがターゲット細胞に侵入する際に必須となる領域) と結合し、ウイルスの細胞への結合・感染を阻止できるか否かを評価する。既報の論文で、多くの HA 交差結合性抗体はウイルスの細胞上のレセプターへの結合を直接阻止するのではなく、抗体依存性細胞障害 (ADCC) という機構により、ウイルスの排除に働くことが報告されている。そのため、複数のウイルス垂型の HA に対し結合能が認められたものの、HI 試験で陰性となったクローンについては ADCC 活性の有無を ADCC レポーターアッセイにより評価する。NA 結合抗体については NI (Neuraminidase Inhibition) 試験により、実際に NA 結合性抗体がウイルスの NA 活性を阻害し、ウイルスの増殖抑制能を有しているかを評価する。上記の検証により抗ウイルス機能を有すると示された抗体クローンについては、ウイルス中和試験により、得られたウイルス抗原結合抗体クローンがウイルスの細胞への感染性を低下させる能力、ウイルス中和能があるかを検証する。

(3) ワクチン接種者由来抗体の遺伝子解析

ワクチン接種者から単離された形質細胞から得られた全抗体遺伝子をダイレクトシーケンスし、DNA 配列を得る。得られた抗体遺伝子配列の遺伝子的特徴 (由来遺伝子座や変異率) を IgBLAST により同定し、モノクローナル抗体それぞれの遺伝子的特徴とその機能の紐づけデータを作成する。また、ワクチン接種者から採取した末梢血単核球から抽出した抗体遺伝子の網羅的遺伝子解析を次世代シーケンサーにより解析し、経鼻不活化ワクチン接種者と注射型不活化ワクチン接種者体内で誘導された抗体レパトアの遺伝子配列を得る。得られた抗体レパトア遺伝子情報の意味づけを前述のモノクローナルレベルの解析で得られた抗体遺伝子・機能の紐づけデータにより行い、経鼻不活化ワクチン接種者と注射型不活化ワクチン接種者体内で形成された抗体レパトアを抗体遺伝子・機能により評価し、二つのレパトアの比較を行う。

4. 研究成果

本研究では、3 価皮下接種ワクチンあるいは経鼻不活化全粒子 3 価ワクチンを接種された健康

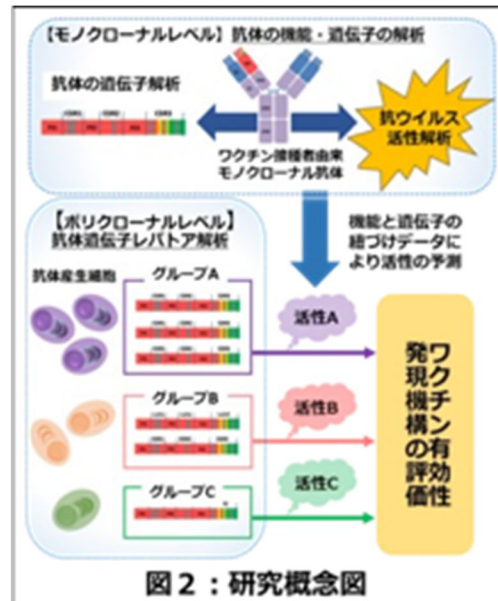


図2：研究概念図

成人ボランティアそれぞれ 11 名あるいは 10 名から採取した末梢血中の形質芽細胞がコードする抗体遺伝子をもとに組み換え抗体ライブラリを作成し、その性状解析を行った。3 価皮下接種ワクチンを接種した SC 群からは合計 546 のモノクローナル抗体が得られ、うち 391 が IgG 抗体由来、155 が IgA 抗体由来であった。経鼻不活化全粒子 3 価ワクチンを接種した IN 群からは合計 386 のモノクローナル抗体が得られ、うち 235 が IgG 抗体、151 が IgA 抗体由来であった。IN 群では SC 群と比較し、得られたモノクローナル細胞のうち IgA 抗体由来である割合が高かった。得られた全ての抗体クローンは、IgBLAST を用いて可変領域を構成する V_H、(D)_H、J 遺伝子座を決定し、可変領域遺伝子配列をヒト IgG1 発現ベクターおよび IgK/IgL (軽鎖) 発現ベクターに組み込んだ。作製した IgG1 および IgK/IgL 発現ベクターを哺乳類培養細胞である Expi293F 細胞に共導入し、細胞培養上清中に分泌された組み替えの IgG1 抗体を精製した。このように作製した IgG1 抗体ライブラリをこの後の解析に用いた。

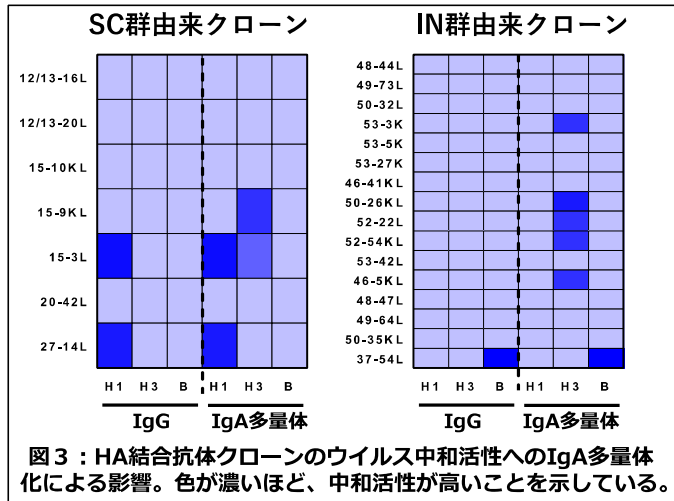
(1) ワクチン接種者由来モノクローナルIgG抗体のウイルス抗原への結合性解析

IN 群および SC 群由来の組換え IgG 抗体のウイルス抗原への結合活性を評価するため、まずインフルエンザウイルス不活化全粒子ワクチンを抗原とした ELISA を行った。その結果 SC 群では 349、IN 群では 159 の抗体クローンは H1N1 亜型、H3N2 亜型、あるいは B 型インフルエンザウイルスのいずれかに対して結合活性を有する抗体クローンであった。このうち、インフルエンザウイルスの表面糖タンパク質である HA および NA への結合活性を有する抗体クローンを選抜するため、組換え HA および NA を抗原とする ELISA を行った。組換え HA および NA は IN 群および SC 群が免疫されたワクチンに含まれる H1N1 亜型、H3N2 亜型、あるいは B 型インフルエンザウイルスのウイルス株由来の HA および NA の遺伝子配列を 3 量体あるいは 4 量体形成ドメインの含まれるタンパク質発現ベクターに組み込み、Expi293F 細胞にて発現を行い、上清からタンパク質精製を行うことで得た。その結果、SC 群では 135、IN 群では 54 の抗体クローンがいずれかのウイルス株の HA への結合活性を有することがわかった。興味深いことに、HA への結合活性を有するクローンのうち、SC 群では 9、IN 群では 15 の抗体クローンが異なる複数のウイルス株への結合活性を有する交叉反応性を有する抗体クローンであり、このような交叉反応性抗体クローンは SC 群よりも IN 群で優位に多く誘導されていた。また、SC 群では 22、IN 群では 7 の抗体クローンがいずれかのウイルス株の NA への結合活性を有することがわかった。このことから、接種経路に関わらず、NA への抗体誘導効率が HA に比べて悪いことが示唆された。次に、以上のスクリーニングから、HA あるいは NA との結合性が認められた抗体クローンについて、より詳細な機能解析を行った。

(2) ウイルス抗原に結合性を有する IgG および IgA 抗体の機能解析

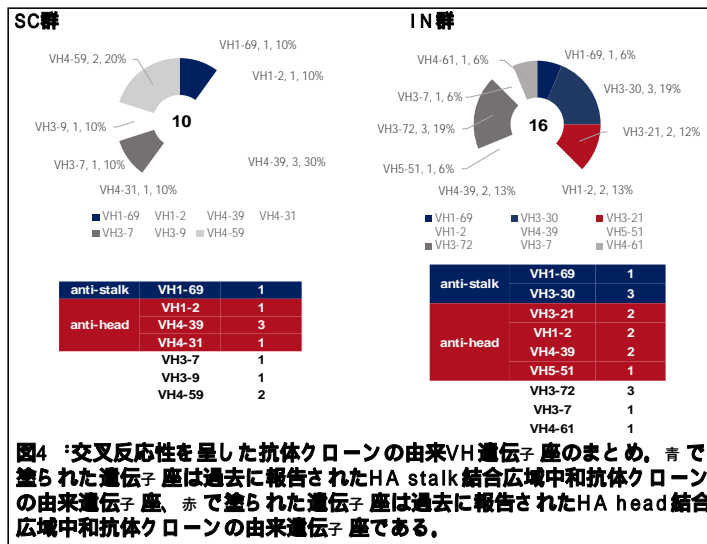
経鼻ワクチン接種を行った場合には、血中への IgG 誘導よりも呼吸器粘膜上への IgA 抗体の誘導が効率的に行われる。また、IgG 抗体と IgA 抗体とでは定常領域に存在している糖鎖修飾の違いや、IgA 抗体が多量体構造をとることなどの要因により、同じ HA に結合する抗体クローンであっても IgG 状態と IgA 状態とで異なる抗ウイルス活性を示すとのことが明らかとなった (Sano K *et al.*, PLOS ONE 2021)。そのため、HA および NA に結合する抗体クローンについては、その可変領域遺伝子配列を IgA 発現ベクターに組み込み、これを IgK/IgL 発現ベクター および粘膜上皮に存在する分泌型 IgA 抗体を構成する J 鎖と分泌因子 (SC) 発現ベクターを Expi293F 細胞に共導入し、細胞培養上清中に分泌された組み替えの単量体型および多量体型 IgA 抗体を精製した。作製した IgG 抗体と単量体型および多量体型の IgA 抗体を用いてウイルス中和試験、抗 HA 抗体クローンについては HI 試験、抗 NA 抗体クローンについては NI 試験を実施し、全ての抗体の抗ウイルス活性プロファイルを得た。その結果、抗 HA 抗体クローンでは、IgG 状態では抗ウイルス活性がない場合でも、IgA 多量体状態では抗ウイルス活性を有するような場合が認められた (図 3)。また、抗 NA 抗体クローンでは、IgG 状態や IgA 多量体状態では抗ウイルス活性がない場合でも、IgA 単量体状態では抗ウイルス活性を有するようなクローンが認められた。このことから、抗体のクローンによ

ってIgG、単量体型IgA、多量体型のIgAとで活性が異なり、単に抗体の可変領域遺伝子配列からその抗ウイルス活性が決まるのではなく、可変領域と抗原との結合、定常領域と抗原との結合、また多量体化による分子あたりの結合力の亢進といった複数の要因が重なり合って抗体の抗ウイルス活性の有無や強度が決定されることが明らかとなった。



(3) ワクチン接種者由来抗体の遺伝子解析

次に、SC群およびIN群から得られた全抗体遺伝子の遺伝子的特徴(由来遺伝子座や変異率)をIgBLASTにより同定した。その結果、複数のウイルス株のHAと結合活性を示した交叉反応性クローンのうち、SC群では9クローンのうちの1クローンはHAのhead領域を標的とする既報の広域中和抗体クローンの由来遺伝子座を使用しており、5クローンはHAのstalk領域を標的とする既報の広域中和抗体クローンの由来遺伝子座を使用していることが明らかとなった。



また、IN群では交叉反応性抗体クローン15クローンのうちの7クローンはHAのhead領域を標的とする既報の広域中和抗体クローンの由来遺伝子座を使用しており、4クローンはHAのstalk領域を標的とする既報の広域中和抗体クローンの由来遺伝子座を使用していた(図4)。また、ワクチン接種者から採取した末梢血単核球から抽出した抗体遺伝子の網羅的遺伝子解析を次世代シーケンサーにより解析したところ、IN群とSC群とで誘導されている抗体の遺伝子レパトアが異なっているとのデータが得られ、現在はこのデータについて、より詳細な解析を行なっている。

以上のことから、本研究では3価皮下接種ワクチンを接種された集団と経鼻不活化全粒子3価ワクチンを接種された集団において、ワクチン接種により誘導された抗体の抗ウイルス活性や遺伝子配列の比較を行った。その結果、異なるワクチンの接種により、誘導される抗体レパトアが遺伝子レベルで異なることが示唆され、また、皮下接種ワクチンと比較して、経鼻ワクチン接種ではIgG状態で複数のウイルス株と反応性を示す交叉反応性抗体クローンが多く得られた。しかしながら抗ウイルス抗体は同一の可変領域を有していてもそのバックボーンにより活性が異なることがあり、抗体可変領域の遺伝子配列を抗体の機能と結びつける上には、それぞれの抗体クローンがどのようにして抗原と結合しており、それが抗体バックボーンによりどのように変化するかという観点からより詳細な解析を行なっていく必要があることが今後の課題として明らかとなった。一方で、本研究で得られた交叉反応性抗体クローンの多くで、可変領域遺伝子の由来遺伝子座が過去に報告されている広域中和抗体クローンの由来遺伝子と一致しており、抗体遺伝子配列からその機能を予測し、さらに抗体遺伝子レパトアからワクチン有効性を評価することが将来的に不可能ではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Bhavsar Disha, Sano Kaori, Singh Gagandeep, Krammer Florian	4. 巻 4
2. 論文標題 An ELISA Based Method to Measure Mucosal Antibody Responses Against SARS CoV 2 in Human Saliva	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Current Protocols	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpz1.1024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shingai Masashi, Iida Sayaka, Kawai Naoko, Kawahara Mamiko, Sekiya Toshiki, Ohno Marumi, Nomura Naoki, Handabile Chimuka, Kawakita Tomomi, Omori Ryosuke, Yamagishi Junya, Sano Kaori, Aina Akira, Suzuki Tadaki, Ohnishi Kazuo, Ito Kimihito, Kida Hiroshi	4. 巻 98
2. 論文標題 Extraction of the CDRH3 sequence of the mouse antibody repertoire selected upon influenza virus infection by subtraction of the background antibody repertoire	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01995-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sano Kaori, Kimura Miyuki, Sataka Akiko, Hasegawa Hideki, Tani Hideki, Suzuki Tadaki	4. 巻 169
2. 論文標題 Characterization of antibodies targeting severe fever with thrombocytopenia syndrome virus glycoprotein Gc	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-024-05968-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bhavsar Disha, Singh Gagandeep, Sano Kaori, Gleason Charles, Srivastava Komal, PARIS Study Group, Carreno Juan Manuel, Simon Viviana, Krammer Florian	4. 巻 14
2. 論文標題 Mucosal antibody responses to SARS-CoV-2 booster vaccination and breakthrough infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.02280-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Cousins Kimberley, Sano Kaori, Lam Brandon, R?ltgen Katharina, Bhavsar Disha, Singh Gagandeep, McRae Oliver, Jeong Stephanie, Aboelregal Nouran, Ho Hsi-en, Boyd Scott, Krammer Florian, Cunningham-Rundles Charlotte	4. 巻 11
2. 論文標題 Detection of SARS-CoV-2 Antibodies in Immunoglobulin Products	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice	6. 最初と最後の頁 2534 ~ 2541.e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2023.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sano Kaori, Saito Shinji, Suzuki Tadaki, Kotani Osamu, Ainai Akira, van Riet Elly, Tabata Koshiro, Saito Kumpei, Takahashi Yoshimasa, Yokoyama Masaru, Sato Hironori, Maruno Takahiro, Usami Kaede, Uchiyama Susumu, Ogawa-Goto Kiyoko, Hasegawa Hideki	4. 巻 16
2. 論文標題 An influenza HA stalk reactive polymeric IgA antibody exhibits anti-viral function regulated by binary interaction between HA and the antibody	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0245244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kaori Sano, Hideki Asanuma, Kei Miyakawa, Hideki Hasegawa
2. 発表標題 Low induction efficiency of anti-SARS-CoV-2 spike IgA antibodies at the upper respiratory tract by intranasal immunization
3. 学会等名 2024 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kaori Sano
2. 発表標題 Induction of mucosal antibody responses by SARS-CoV-2 mRNA vaccination in previously infected individuals.
3. 学会等名 The Joint 24th International Conference on Emerginig Infectious Diseases in the Pacific Rim of the U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) Acute Respiratory Infections Panel
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐野芳, 黒澤信幸, 齊藤慎二, 相内章, 鈴木忠樹, 磯部正治, 長谷川秀樹
2. 発表標題 経鼻接種型不活化ワクチンと皮下接種型不活化ワクチンにより誘導された抗インフルエンザ抗体の質についての比較解析
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, van Riet E, Ainai A, Tabata K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, and Hasegawa H
2. 発表標題 Anti-viral Functions by Steric Hindrance of HA and NA Observed in an Intranasal Vaccine Derived Influenza HA-stalk Reactive IgA Antibody
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sano K, Saito S, Suzuki T, Kotani O, van Riet E, Ainai A, Tabata K, Takahashi Y, Yokoyama M, Sato H, and Hasegawa H
2. 発表標題 HA-stalk Reactive Secretory IgA Antibodies Exhibit Anti-viral Activity by Steric Hindrance of Viral HA and NA
3. 学会等名 Options X for the Control of Influenza (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------