

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08772

研究課題名(和文) SLIT有効性機序のIgG親和性成熟の解明と抗体誘導型舌下ワクチンのPOC取得

研究課題名(英文) The proof-of-concept studies of Ab-inducing sublingual vaccine by clarifying affinity maturation of SLIT-induced antigen-specific IgGs.

研究代表者

渡部 良広 (Watanabe, Yoshihiro)

金沢大学・附属病院・特任教授

研究者番号：50832185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らの独自技術を用いて、特定標的分子(ヒトIgEおよびSARS-CoV-2 S抗原)の機能性エピトープ部位を同定した。それを用いて、通常の皮下投与および舌下投与(sublingual administration)することにより、IgG抗体価とIgA抗体価の上昇を見出した。特に、IgA抗体誘導は、例えばウイルスの粘膜部位での初期感染を強く阻害する作用が期待される。特にS抗原においては、RBD-ACE2結合阻害能を有する中和エピトープ部位とS2-HR1/2領域に変異株共通のユニバーサル中和抗体エピトープを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この間にパンデミックとなった新型コロナウイルス感染症のワクチン開発に応用して、本手法の有用性と舌下ワクチンによるIgA誘導(粘膜免疫の主要防御抗体)の新規知見を明示した。エピトープ舌下ワクチンが、初期感染防御ワクチンとして、また中和抗体能を増強する“ブースターワクチン”となる可能性を示した。特許出願(国際特許を含む)しており、連携企業探索およびSCARDA事業に応募して、将来発生する“新興・再興感染症の蔓延”に早期に対応できる基盤ワクチン技術として確立する。このために継続して研究開発を行う予定である。この成果は、Vaccines誌に2022年度に発表した。

研究成果の概要(英文)：Using our established antigen (Ag)-antibody (Ab) technology, the functional epitope sites of specific target molecules (human IgE and SARS-CoV-2 Spike antigen) were identified. Then, the sequential subcutaneous administration and sublingual administration of the identified neutralizing Ab-epitopes revealed that nAbs specific to the identified epitopes increase Ab-titer and switched to IgA Ab class. In actual, it has been considered that IgA Ab induction can potently inhibit the initial infection at the mucosal site of the virus, for example. Moreover, in the Spike antigen, a universal neutralizing Ab-epitope common to mutant strains was found in the S2-HR1/2 region.

研究分野：免疫アレルギー学、先端医療開発学、創薬科学

キーワード：中和エピトープ 舌下ワクチン アレルギー IgA IgE 感染症 ブースター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗体の医薬応用を背景として、製造コストや医療経済上の負担を軽減できる方法として、抗体のエピトープ解析技術をこれまで確立してきた。本解析手法を用いて、中和抗体など機能性抗体の認識エピトープを同定することで、抗体医薬を代替できるワクチン技術を開発する。

(2) この過程で、舌下感作による“抗体の親和性成熟”と“IgA 抗体へのクラススイッチ”の学術的な究明を行うことで、舌下ワクチンの有用性基盤を明確にしたいと考えた。

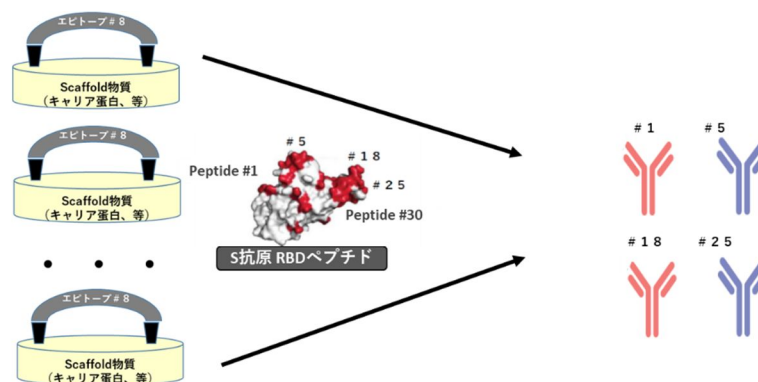
2. 研究の目的

(1) 目的は、エピトープ抗原の同定、その舌下感作による抗体医薬の代替であり、舌下ワクチンというワクチンモダリティの可能性の追求である。

(2) これを学術的に裏打ちするために、“抗体親和性成熟”と“Ig クラススイッチ”の達成されていることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 申請者らの独自技術(右図1)を用いて、特定標的分子(ヒト IgE および SARS-CoV-2 S 抗原に決定)の機能性エピトープ部位を同定した。即ち、個々のエピトープ特異的抗体をマウス感作により誘導して、このマウス抗血清(抗体)のパネルを製作することを特徴としている。



< 図1 . 標的抗原部位を網羅するエピトープ抗体のパネル作製 >

この「エピトープ抗体のパネル」を活用して、引続いて、各エピトープ抗体の機能(RBD-ACE2 結合の阻害活性、疑似感染系の阻害作用など)を解析し、“中和エピトープ”を同定する。

(2) それら中和エピトープを抗原とし、通常の下投与および本研究では舌下投与(sublingual administration)することにより、IgG 抗体価と IgA 抗体価の上昇を検討した。特に IgA 抗体誘導は、食物および環境アレルギー等の消化器、呼吸器疾患の病態修飾、またウイルスや細菌の粘膜部位初期感染を強く阻害する作用が期待される。

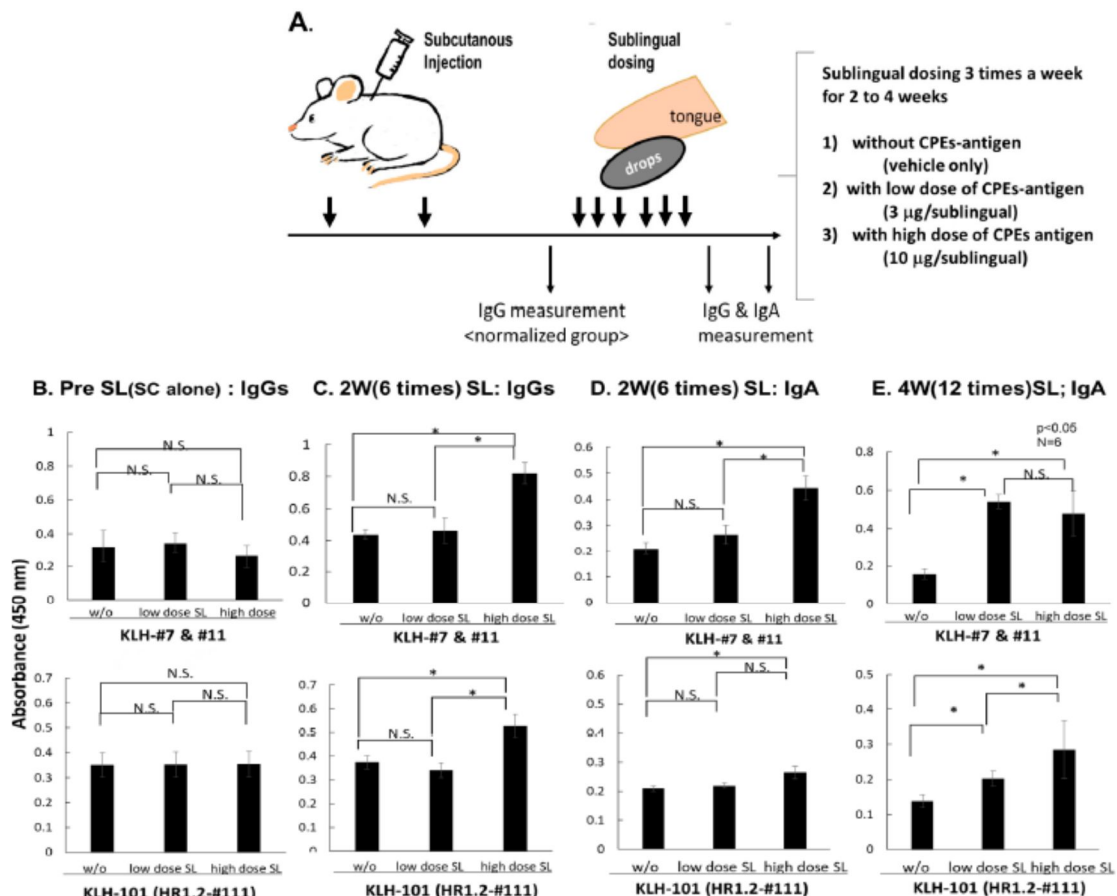
(3) 選択した標的分子は、この時期に新型コロナ感染症がパンデミックとなったので、新型コロナウイルス S 抗原の RBD 部位と HR1/2 部位とした。hACE2 結合阻害、疑似感染系での感染阻害によって、中和抗体エピトープを同定した。引き続き、中和エピトープ認識 IgA 抗体誘導をエピトープ抗原の舌下ブーストによって達成されるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 成果は Vaccines 誌に報告した (Vaccines, 11(2):287, 2023. DOI; 0.3390/vaccines11020287)。以下に短く記す。

(2) 上記方法にて同定した SARS-CoV-2 の感染責任部位エピトープを用いて、多価エピトープ抗原を作製して、マウス舌下に感作するプロトコルの検討を行った。明確な IgA 抗体価の上昇は、感染防止に有効な粘膜免疫には必須の反応であり、週3回の間歇投与で2週間~4週間で明確に上昇した。IgA クラススイッチ前の IgG 抗体価も同様に上昇した。IgA へのクラススイッチは、2週間の舌下6回投与で達成されており、舌下感作は十分早い IgA クラススイッチを達成することを明らかにした。継続的な舌下感作によって特異抗体価は維持される。従って、低下した IgG 抗体および粘膜粘液の主要抗体クラスの IgA 抗体価を上昇維持できる投与経路として、舌下

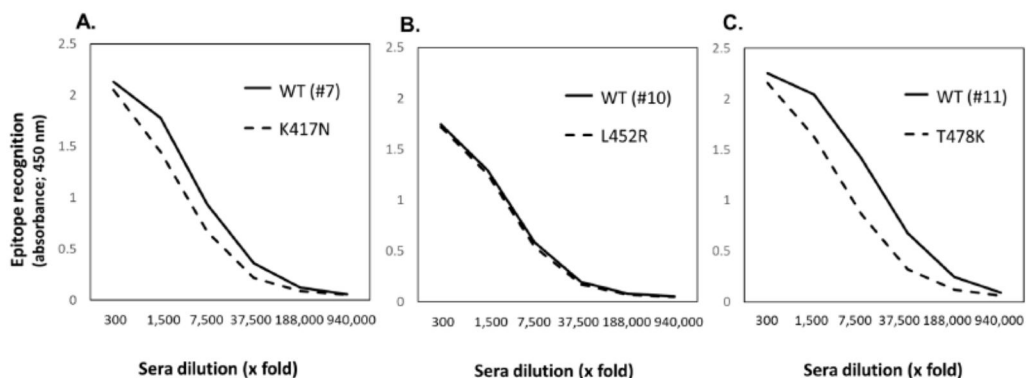
の有用性を明らかにした。(図2を参照)



< 図2 . エピトープ抗原の舌下ブーストによる、IgG 抗体上昇と IgA 抗体誘導 >

- A. マウスへの皮下感作と引き続く舌下ブーストの実験プロトコール
- B. 舌下投与前：各群の中和エピトープ特異的 IgG 抗体価
- C. 2週間舌下投与後：IgG 抗体価の上昇（高用量舌下ブースト群）
- D. 2週間舌下投与後：IgA 抗体価の上昇（高用量舌下ブースト群）
- E. 4週間舌下投与後：IgA 抗体価の上昇（低用量および高用量舌下ブースト群）

(3) また前段として実施したエピトープ認識抗体の詳細解析については、SARS-CoV-2 ウイルス疑似感染系における中和能を検討し、疑似感染系で中和能を有するエピトープを3か所明らかにした。1か所はS2-HR2領域にあり、変異ウイルスに共通の“universal”エピトープであり、2か所はオミクロン株など変異体ウイルスで変異の認められる部位であることが判明した。そこで、WT（武漢株）エピトープ認識抗体の変異体エピトープ（Omicron株等）への交差性を検討した結果、RBD部位の2か所中和エピトープ認識抗体は、変異体に高い交差性を示した。(図3) このように、中和エピトープ同定によって、抗体誘導を中和部位に収束させ、その交差性を担保しつつ、効果的にワクチン有効性（中和能）を維持しうることを明らかにした。



< 図3 . 武漢株 RBD 中和エピトープ抗体の、Delta/Omicron 変異株配列への交差性 >

- A. 武漢株 RBD 認識抗体（#7 エピトープ）の、K417N 変異配列エピトープ交差性
- B. 武漢株 RBD 認識抗体（#10 エピトープ）の、L452R 変異配列エピトープ交差性
- C. 武漢株 RBD 認識抗体（#11 エピトープ）の、T478K 変異配列エピトープ交差性

以上、エピトープ抗体の有用性を示し、舌下ブーストによる IgA 抗体へのクラススイッチが短期間（2週間/6回投与）で確実に達成されること、および多価エピトープ抗体のワクチン抗原の有用性を、新型コロナウイルス-S 抗原を具体例として明らかにした。
現在引続いて、同定した中和エピトープの更なるワクチン活用技術の構築を行っている。

（4）舌下ブーストによる IgA スイッチングと IgG 抗体価の上昇は、本マウスモデル系にて詳細に解析し、舌下ブースト条件の実用性についても明らかにしたが、舌下および経口投与による抗体の抗原認識親和性の向上については、別途に組換え抗体を多数取得する試験を行い、抗原認識能を有する組換え抗体を多数取得している。これら組換え抗体のパネルを用いて、抗原認識能の向上（＝親和性成熟）を抗体遺伝子変異の挿入頻度と程度を解析している。
引続いて採択された基盤 C 研究課題にて、取得済の組換え抗体を用いて、順次 Ig-CDRs（相補決定部位）の詳細解析を行い、舌下ブーストの有用性を示す学術的知見を積み上げていく予定としている。

（以上）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihiro Watanabe, Natsuko Hosokawa, Misaki Yoshida, Tomoyuki Miura, Mitsuhiro Kawano	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Closed Linear Epitopes in S1-RBD and S2-HR1/2 of SARS-CoV-2 Spike Protein Able to Induce Neutralizing Abs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vaccines11020287	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 抗体誘導性ポリペプチドおよびワクチン	発明者 渡部良広	権利者 金沢大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-104912	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 抗体誘導性ポリペプチドおよびワクチン	発明者 渡部良広	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/025330	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	細川 菜津子 (HOSOKAWA NATSUKO)	金沢大学・附属病院・研究員 (13301)	
研究協力者	三浦 智行 (MIURA TOMOYUKI)	京都大学・医生物学研究所・准教授 (14301)	
研究協力者	吉田 美咲 (YOSHIDA MISAKI)	金沢大学・附属病院・医員 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	川野 充弘 (KAWANO MITSUHIRO) (20361983)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	

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