

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02648

研究課題名(和文) 製剤学・免疫学を基盤とした粘膜投与型核酸ワクチンの開発-Covid-19予防-

研究課題名(英文) Development of nucleic acid vaccine for mucosal-application based on pharmaceuticals and immunology -For Covid-19 prevention-

研究代表者

佐々木 均 (Sasaki, Hitoshi)

長崎大学・熱帯医学研究所・特命教授

研究者番号：00170689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、mRNAに正電荷を有する様々な高分子や脂質を結合し、さらに免疫細胞への指向性を有する負電荷化合物を結合することで局所投与型の新たなmRNA微粒子ワクチンを構築した。このmRNA微粒子ワクチンは粒子径が100-200nm程度の球状の負電荷微粒子で抗原提示細胞に効率的に取り込まれ、内包するmRNAからタンパク質を発現した。このmRNA微粒子ワクチンに卵白アルブミンやSARS-CoV-2の抗原をコードしたmRNAを搭載し、マウスに種々の経路から投与したところ、特に経肺投与で高い免疫誘導効果が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、局所投与後に高い免疫誘導効果を示す新たなmRNA微粒子ワクチンの技術を開発した。このmRNA微粒子ワクチンは内包するmRNAがコードする抗原を変更するだけで様々な感染症に応用することが可能であり、パンデミック時にも速やかなワクチン開発を実現できる画期的な技術である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we constructed novel mRNA nanoparticles for topical vaccination with various cationic polymers, lipids, and anionic compounds. The mRNA nanoparticle vaccine was a spherical, negatively charged nanoparticle with approximately 100-200 nm particle size. The mRNA nanoparticle vaccine was efficiently taken up by antigen-presenting cells, and expressed proteins from the mRNA encapsulated in the nanoparticles. We loaded this mRNA microparticle vaccine with mRNA encoding ovalbumin and SARS-CoV-2 antigens; and administered them to mice via various routes. We found that the mRNA microparticle vaccine had a strong immune induction effect, especially after pulmonary administration.

研究分野：薬剤学

キーワード：ワクチン mRNA 感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中国武漢からはじまった新型コロナウイルス感染症はとどまるところを知らず、世界規模で拡大した。世界中が感染症の脅威を再認識するとともに、今後の新規ウイルスやウイルス変異によるパンデミックにも警鐘がならされている。このため世界中で様々な治療薬やワクチンの研究・開発が進んでいる。

これまでに我々は様々な物性の医薬品や微粒子を点眼、経皮、経肺投与して、薬物動態や薬理作用を数学的に解析してきた。その結果、動態に影響する因子を明らかにするとともに、数学に立脚した革新的製剤を開発してきた。しかし、ヒトの粘膜は、部位により解剖生理学や免疫細胞密度・有効面積などに違いがあり、最適な粘膜投与ワクチンの構築法や投与量・回数は不確かである。各種投与法の利点と欠点、合理的な選択法など、疑問の点も多い。特に mRNA は水溶性の高分子であるため、単独では細胞への取り込み効率が極めて低く、免疫誘導効果が弱いため、Drug delivery system (DDS) 技術の開発と製剤化が不可欠であり、如何に最適化するかは指標も必要である。

2. 研究の目的

本研究では、核酸ワクチンの中でも安全性の高い mRNA を用い、経肺投与や点鼻投与、点眼により免疫細胞にワクチンを標的化することのできる微粒子ワクチンの開発を行う。新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を対象疾患とし、免疫誘導効果を詳細に評価する。また、免疫応答の仕組みや特徴を解析し、粘膜投与型微粒子ワクチンの開発指針とする。

3. 研究の方法

(1) mRNA の設計

モデル mRNA として、ホタルルシフェラーゼ (FLuc) および分泌型の深海エビルシフェラーゼ (NanoLuc) をコードした mRNA を用いた。FLuc をコードした pDNA を鋳型に mRNA を作成し、mRNA の非翻訳領域やシグナル配列、末端の polyA などの mRNA 構造の最適化を行い、樹状細胞株 (DC2.4 細胞) において高いタンパク発現効果を示す mRNA を調製した。また、免疫誘導メカニズムの評価のためにモデル抗原である卵白アルブミン (OVA) をコードした mRNA を用いた。さらに、実際の病原体として新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を選択し、SARS-CoV-2 の受容体結合部位 (RBD) をコードした mRNA を作成した。

(2) mRNA 微粒子ワクチンの調製

mRNA に様々な正電荷高分子や脂質を結合し、免疫細胞への指向性を有する負電荷化合物を結合することで mRNA 微粒子ワクチンを構築した。構築した微粒子ワクチンの粒子径や表面電荷を測定し、実際の形状は透過型電子顕微鏡を用いて観察した。また、DC2.4 細胞に微粒子ワクチンを添加し、タンパク発現効率が高い組成を複数選択した。

(3) mRNA 微粒子ワクチン投与後の滞留性とタンパク発現の評価

FLuc mRNA を用いた mRNA 微粒子ワクチンを作成し、マウスへ経肺投与や点鼻投与、点眼投与した。投与後のタンパク質発現を *in vivo* イメージングシステムを用いて評価した。また、NanoLuc mRNA を用いた mRNA 微粒子ワクチンをマウスへ投与し、血液中のルシフェラーゼ活性からタンパク質発現効率を測定した。

(4) 実験動物を用いた免疫誘導効果の評価

OVA または SARS-CoV-2 の RBD mRNA を用いた微粒子ワクチンをマウスに 2 週間おきに計 4 回投与した。各投与前日と最終免疫から 2 週間後に採血を行い、血清中の OVA や RBD に対する IgG 抗体の誘導を ELISA を用いて評価した。また、最終免疫から 2 週間後に鼻腔洗浄液や気管支肺胞洗浄液等採取し、粘膜における IgA 抗体の誘導を同様に評価した。さらに、脾臓から脾細胞を採取し、抗原タンパク質と培養後の INF- γ 産生を細胞性免疫の指標として測定した。また、mRNA 微粒子ワクチンと数種のアジュバントを併用し、その免疫誘導効果を評価した。

4. 研究成果

数種のキットを用いて FLuc mRNA を調製し、mRNA の Cap 構造や末端の polyA の付加などが及ぼすタンパク発現効果への影響を検討した。この結果、polyA 配列を付加し、Cap 構造の中でも特に Trilink 社の CleanCap を用いた mRNA で高いタンパク発現が認められた。一方で、研究室で調製した mRNA にはロット間でタンパク発現効果にバラツキが認められたため、本検討では Trilink 社の mRNA 合成サービスを利用し、高効率な mRNA を大量に調製することとした。

この mRNA に正電荷を有する様々な高分子や脂質を結合し、さらに免疫細胞への指向性を有する負電荷化合物を結合することで mRNA 微粒子ワクチンを構築した。構築した mRNA 微粒子ワクチンの粒子径や表面電荷を測定したところ、粒子径が 100-200 nm 程度の負電荷の微粒子が調製できた。また、樹状細胞株である DC2.4 細胞に NanoLuc mRNA を用いた種々の mRNA 微粒子ワクチンを添加し、ルシフェラーゼ活性を指標にタンパク質発現効果を評価した。この結果、正電荷高分子を用いた mRNA 微粒子ワクチンと比較して、正電荷脂質を用いた mRNA 微粒子ワクチンでより高いタンパク質発現効果が認められた。また、いくつかの機能性脂質を添加することでタンパク質発現効果が強く増強された。さらに、mRNA 微粒子ワクチンを実験動物に経肺投与し、肺におけるタンパク質発現効果を評価した場合にも同様の傾向が確認できた。今回検討した組成の中から、タンパク質発現効果や生体分解性、安全性等を勘案し、ワクチンに最適と思われる 1 組成を選択した。透過型電子顕微鏡観を用いてこの mRNA 微粒子ワクチンを観察したところ、球形の微粒子が観察された (図 1)。

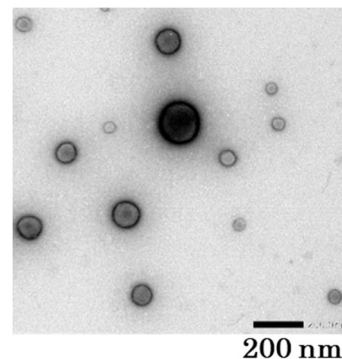


図 1. mRNA 微粒子ワクチンの電子顕微鏡観察画像

この mRNA 微粒子ワクチンに、分泌型 NanoLuc をコードした mRNA を搭載し、マウスに経肺や経鼻、点眼、皮下、筋肉内など種々の経路から投与したところ、全ての投与方法で血清中に NanoLuc 活性が確認できた。また、非分泌型の FLuc をコードした mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンを同様にマウスに投与し、投与部位や主要臓器におけるルシフェラーゼ活性を測定した結果、投与部位選択的なタンパク質発現が実証できた。図 2 には、FLuc mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンを経肺投与後の主要臓器におけるルシフェラーゼ発現(A)と経鼻投与後の全身におけるルシフェラーゼ発現(B)を *in vivo* イメージングシステムを用いて観察した画像を示す。mRNA 微粒子ワクチン投与後のマウスにルシフェリンを腹腔内投与し発光を観察した結果、mRNA 微粒子ワクチン経肺投与後には肺のみで、経鼻投与後には鼻のみでルシフェラーゼによる強い発光が観察され、mRNA 微粒子ワクチンは局所投与後に投与部位のみで mRNA からタンパク質を発現していることが確認できた。

SARS-CoV-2 のパンデミック時に全世界で使用されたファイザーやモデルナ社の mRNA ワクチンは筋肉内投与後に 10%以上が全身に移行し、肝臓や脾臓に蓄積し炎症の原因となることが報告されている。本研究で開発した mRNA 微粒子ワクチンは投与部位選択的なタンパク質発現を示すことから、既存の mRNA ワクチンと比較して高い安全性が期待できる。

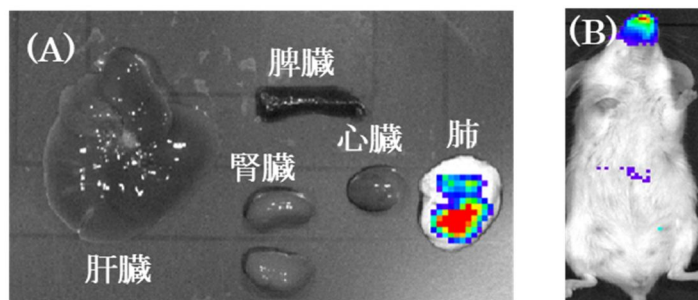


図 2. mRNA 微粒子ワクチン経肺投与後の主要臓器におけるルシフェラーゼ発現 (A) と経鼻投与後の全身におけるルシフェラーゼ発現 (B)

そこで、まずモデル抗原である OVA をコードした mRNA を mRNA 微粒子ワクチンに搭載し、免疫誘導効果を評価した。mRNA 微粒子ワクチンをマウスの肺や鼻、眼へ 2 週間毎に複数回投与し、投与後の血清中の OVA 特異的な IgG 抗体を測定した。この結果、mRNA 微粒子ワクチンの経肺投与では OVA に特異的な血清中 IgG 抗体の上昇が認められた。一方で、mRNA 微粒子ワクチンを経鼻投与したマウスにおいては若干の IgG 抗体の誘導が認められたものの、点眼投与後のマウスでは確認できなかった。さらに、OVA の mRNA 単独、OVA とは異なる FLuc の mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチン、OVA の mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンをマウスに経肺投与し、詳細な免疫誘導効果を評価した。OVA の mRNA 単独や FLuc の mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンを投与しても OVA に対する血清中 IgG 抗体や気管支肺胞洗浄液中 IgA 抗体は上昇せず、免疫後のマウスから採取した脾細胞を OVA で刺激しても INF- γ の放出は認められなかった。しかしながら、OVA の mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンを経肺投与したマウスでは血清中の IgG 抗体と気管支肺胞洗浄液中の IgA 抗体の強い誘導が確認され、脾細胞を OVA で刺激することで INF- γ が強く放出された。

mRNA 微粒子ワクチンによる高い液性免疫と細胞性免疫の誘導効果が認められたことから、SARS-CoV-2 の RBD をコードした mRNA を mRNA 微粒子ワクチンに搭載し、マウスに複数回経肺投与後の免疫誘導を評価した。この結果、OVA の mRNA を用いた場合と同様に、mRNA 単独や FLuc の mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンでは SARS-CoV-2 に対する免疫誘導効果は認められなかったが、RBD mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンの投与によって SARS-CoV-2 に対する特異的な液性免疫と細胞性免疫の誘導が実証できた。さらに、ヒト ACE2 を発現させた培養細胞を用いて SARS-CoV-2 に対する中和抗体の有無を評価した。この結果、mRNA 微粒子ワクチンを投与したマウスの血清を培地中に添加することで SARS-CoV-2 の培養細胞への感染が抑制され、血清中の SARS-CoV-2 に対する中和抗体の存在が確認できた。そこで、ヒト ACE2 ノックインマウスを用いた感染実験を実施した。RBD mRNA を搭載した mRNA 微粒子ワクチンを投与したマウスに SARS-CoV-2 を感染させたところ、mRNA 微粒子ワクチンの投与によって、マウスの肺における生きた SARS-CoV-2 量が顕著に低下し、高い感染予防効果が認められた。

一方で、この mRNA 微粒子ワクチンを単独でマウスに経鼻投与した結果、十分な免疫誘導効果が得られなかった。そこで、複数のアジュバントを mRNA 微粒子ワクチンと併用し、免疫誘導効果を検討したところ、mRNA 微粒子ワクチンに適したアジュバントを見いだすことができた。また、mRNA 微粒子ワクチンをアジュバントと共に筋肉内や皮内に投与したところ、どちらの投与方法でも SARS-CoV-2 に対する液性免疫の誘導が確認できたことから、現在は筋肉内投与や皮内投与での検討も続けている。

以上のように本研究では、局所投与後に強い免疫誘導効果を示す新たな mRNA 微粒子ワクチンの技術を開発した。この mRNA 微粒子ワクチンは内包する mRNA を変更するだけで様々な感染症に応用することが可能である。予備的検討ではあるが、インフルエンザのヘマグルチンをコードした mRNA を用いて mRNA 微粒子ワクチンを調製し、経肺または経鼻投与した結果、両投与方法によってヘマグルチンに対する液性免疫が誘導できることも確認している。今後は様々な感染症に対してこの mRNA 微粒子ワクチンを応用していきたいと考えている。

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 Kurosaki Tomoaki, Nakamura Hiroki, Sasaki Hitoshi, Kodama Yukinobu	4. 巻 16
2. 論文標題 Suitable Promoter for DNA Vaccination Using a pDNA Ternary Complex	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 679 ~ 679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics16050679	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒崎 友亮、兒玉 幸修、佐々木 均
2. 発表標題 mRNAワクチンのための負電荷微粒子の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒崎 友亮、兒玉 幸修、中嶋 幹郎、佐々木 均
2. 発表標題 抗原提示細胞標的型ナノ粒子の経肺投与による粘膜免疫の誘導
3. 学会等名 日本薬剤学会第38年会
4. 発表年 2023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
研究分担者	黒崎 友亮 (Kurosaki Tomoaki) (00582016)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教 (17301)	

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
研究分担者	平山 謙二 (Hirayama Kenji) (60189868)	長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・教授 (17301)	

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