

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07041

研究課題名(和文)長期免疫誘導型肺サーファクタント由来アジュバント添加新型コロナ経粘膜ワクチン開発

研究課題名(英文)Development of mucosal COVID-19 vaccine with pulmonary surfactant derived adjuvant which can induce long lasting immunity.

研究代表者

木本 貴士(KIMOTO, Takashi)

徳島大学・先端酵素学研究所・特任助教

研究者番号：90724261

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)：2019年末に発生した新型コロナパンデミックは健康・生命のみならず社会・経済にも大きな被害をもたらした。この事態を受けて過去に例を見ない早さでワクチンが開発・実用化されたが、その多くは注射型ワクチンであり、ウイルス侵入門戸である気道粘膜の免疫能が低い。研究代表者は本研究で肺サーファクタント由来アジュバントSF10を新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)抗原と混合し、マウスに経粘膜(経気道・経口)接種することで、気道粘膜に強力な抗新型コロナ免疫を誘導できることを確認した。またこの免疫の持続性を確認したところ、少なくとも最終免疫一年間は、それら免疫が持続することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19(新型コロナウイルス感染症)の発生により、感染症に対する危機管理の重要性がより高まってきている。その中で、重症化や致死を予防できるワクチンはもちろん、感染伝播や感染そのものを予防できるワクチンが望まれている。現行のワクチンは大半が注射型ワクチンでありウイルス等病原体が侵入する粘膜における免疫誘導能は低い。研究代表者は、生体成分肺サーファクタント由来粘膜アジュバントSF10の開発に成功し、本研究期間中に、新型コロナウイルスに対して粘膜防御免疫を誘導できることを確認した。加えてその免疫が長期に渡って維持されることから、今後SF10を用いた粘膜ワクチン開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：COVID-19 pandemic that occurred at the end of 2019 caused significant damage not only to health and life, but also to society and the economy. In response to this situation, vaccines against this virus were developed and commercialized at an unprecedented speed, but most of them were injectable vaccines, which have low immunogenicity in the respiratory mucosa, the gateway to virus entry. In this study, we confirmed that intramucosal (oral and respiratory tract) administration of SF10, a pulmonary surfactant-derived adjuvant mixed with SARS-CoV-2 antigen, induces strong anti-SARS-CoV-2 immunity in the respiratory tract mucosa. We also confirmed the persistence of this immunity and found that it lasted for at least one year after the last immunization.

研究分野：ワクチン

キーワード：粘膜ワクチン 肺サーファクタント 新型コロナウイルス 長期免疫記憶

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

SF10 は、ヒト肺サーファクタントを基盤に開発された安全性の高い生体成分粘膜アジュバントである。本アジュバントは抗原運搬型アジュバントで、ワクチン抗原を搭載した SF10 が抗原提示細胞へ効率よく抗原を運搬し強い免疫を誘導する。開発当初、SF10 は注射型ワクチンでは誘導されない気道粘膜 IgA 抗体を誘導する経鼻インフルエンザワクチン (HAV) のアジュバントとして開発された (Influenza Other Respir Viruses. 2013;7;1218)。その後、経鼻 (経気道) だけでなく経口でも強力な抗 HAV 血中 IgG と粘膜 IgA を誘導することが判明した (Vaccine. 2019;37;612)。最近、臨床応用に向けた開発も進展し、SF10 を利用した経粘膜投与ワクチンは、安全性確認試験 (GLP 試験) が終了し、安全性と有効性の高いワクチンとして期待されている。特に HAV-SF10 経口投与ワクチンは強力で、マウスへの免疫後一年経過しても高い血中 IgG と気道粘膜 IgA が検出され、致死量のインフルエンザウイルスをマウスへ感染させたところ 100% の生存率を示した。一方、現行の HAV 皮下ワクチン投与の場合、血中 IgG は免疫一年後でも検出されるものの粘膜 IgA はまったく検出されず、感染試験では 60% のマウスが死亡した。これら結果は呼吸器感染症において、長期間粘膜 IgA を持続誘導することが感染防御に極めて重要であることを示唆している。

### 2. 研究の目的

長期間持続する感染防御免疫を誘導することは、優れたワクチン条件の一つである。SF10 は強力なアジュバントであり、過去の感染症ワクチンの実績から COVID-19 においても有効であると推測される。しかし、免疫原性の低い COVID-19 でも長い免疫記憶ができるかは不明であり、本研究では SF10 添加 COVID-19 ワクチンをマウスへ経粘膜 (経口と経気道) 投与し、その免疫持続性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) SF10 アジュバントの新型コロナワクチンにおける有効性評価

新型コロナウイルススパイクプロテイン 1 (S1) のリコンビナントタンパク質を本研究のワクチン抗原として用いた。1 µg 又は 10 µg の S1 を単独、あるいは SF10 と混合し (S1-SF10)、7 週齢雌の BALB/c マウスへ経気道および経口接種した。対照群として S1 単独あるいは AS03 混合 S1 を筋肉内に接種 (S1-AS03) した。2 週間隔で 3 回免疫し、最終免疫 2 週間後に、血清と肺洗浄液の抗 S1 抗体を ELISA で、感染防御能を S1/アンギオテンシン変換酵素 2 (ACE2) 結合阻害試験により解析した。また同マウスの脾臓と肺の抗 S1 抗体産生細胞 (ASC) と S1 応答性サイトカイン産生細胞 (CSC) を ELISPOT で検出した。

#### (2) 長期免疫誘導の解析

BALB/c マウス (雌、7 週齢) に 1 µg の S1-SF-10 を経気道で摂取した。2 週間隔で 3 回免疫し、最終免疫 2 週間、半年、そして一年後に、血清と肺洗浄液の抗 S1 抗体を ELISA で、脾臓の S1 応答性サイトカイン産生細胞を ELISPOT で検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) SF10 は、抗原性の弱いリコンビナントタンパク質をワクチン抗原としても顕著な抗原特異的免疫を誘導した。

従来はインフルエンザウイルス不活化ワクチンを抗原として SF10 の有効性を評価してきた。今回は市販の S1 リコンビナントタンパク質を抗原として用いるが、一般的にリコンビナントのワクチン抗原は不活化ワクチンより抗原性が劣ることが知られている。そこでまず、市販の S1 抗原が、SF10 の有効性評価に使用できるかを確認した。10 µg の S1 単独を筋注・経気道・経口摂取したマウスは、筋注群がわずかに血清 IgG を誘導したものの免疫誘導能が弱く、リコンビナントの抗原性の弱さが改めて確認された。一方、この抗原に、SF10 を混合し、経粘膜接種すると抗原量が 1 µg の場合も含めて抗原特異的抗体を誘導することが確認された (図 1A, B)。COVID-19 パンデミック発生当時は、いかにしてワクチン抗原を効率よく調達できるかが大きな課題であった。従来の不活化ワクチンによるワクチン抗原の調製は、ウイルスを一度増殖させる必要があり、ウイルスの流出管理も含め緊急時に迅速に行うことは困難であった。今回のパンデミックを契機に、ワクチン抗原は不活化ワクチンからリコンビナントタンパク質へ移行することが推測される。このような中で、今回 SF10 がリコンビナントタンパク質をワクチン抗原としても抗原特異的免疫を誘導できた意義は大きいと考える。

図1A 血清のS1特異的IgG抗体

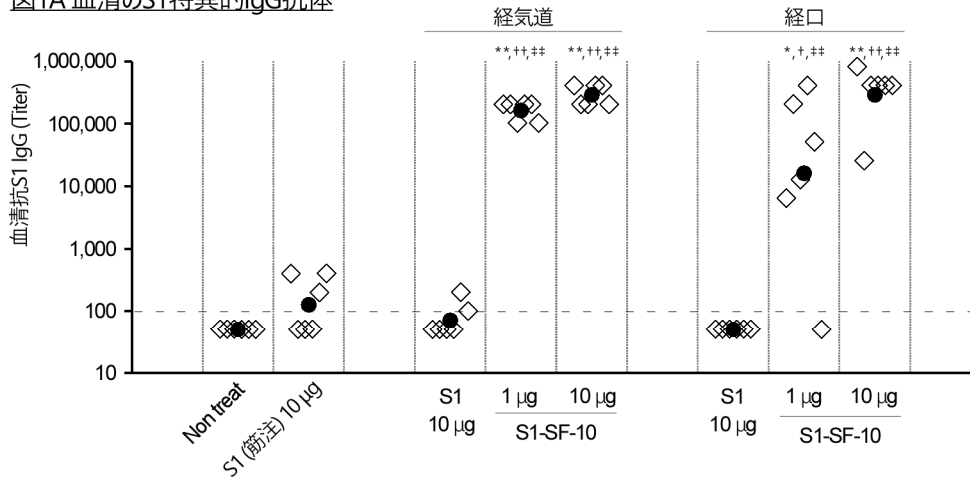
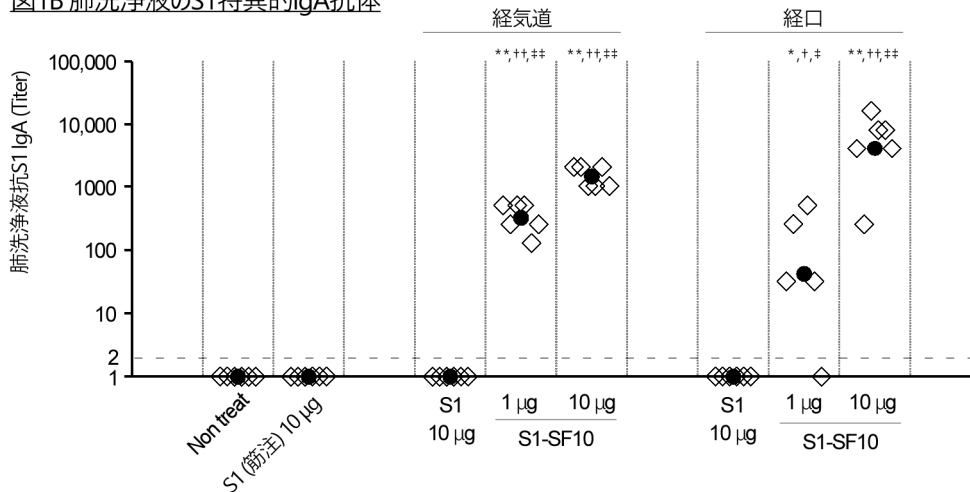


図1B 肺洗浄液のS1特異的IgA抗体



(2) SF10 混合新型コロナワクチン経粘膜接種、特に経気道接種は、気道粘膜における免疫を強力に誘導した

SF10 がリコンビナントの新型コロナウイルス抗原 S1 を用いても免疫誘導できることが確認された。しかし、その誘導された免疫が新型コロナウイルスの感染防御に意味があるのかは不明である。そこで、強力な筋注型アジュバント AS03 を混合したワクチン (S1-AS03) と比較した時の、抗体誘導効果と新型コロナウイルスの S タンパク質と宿主細胞の感染受容体であるアンギオテンシン変換酵素 2 との結合阻害を検討した。S1-SF10 経気道及び経口接種は、S1-AS03 筋注接種では誘導できなかった血清 IgA を誘導し、また血清 IgG においては S1-AS03 筋注接種と同等の抗体価を示すことが確認された (図 2A)。肺洗浄液では経気道及び経口接種の優位性が顕著に表れ、S1-SF10 経気道及び経口接種群は、IgA 抗体を誘導したのみならず S1-AS03 筋注群より 4 倍以上高い IgG 抗体誘導効果を示した (図 2A)。新型コロナウイルスは、ウイルス表面の Spike protein と感染宿主細胞表面の ACE2 が結合することで感染するため、両者の結合阻害抗体は感染防御抗体として働く。免疫したマウスの血清および肺洗浄液の S1/ACE2 結合阻害能を解析した結果、血清は S1-AS03 筋注群が高い結合阻害効果を示し、次いで S1-SF-10 経口、経気道群の順に高い阻害活性を示した (図 2B)。一方肺洗浄液は、S1-SF-10 経気道・経口接種群が S1-AS03 筋注群と比較し顕著に高い結合阻害活性を示した (図 2B)。

経気道・経口のような経粘膜接種群が、筋注群より気道粘膜の防御免疫誘導能が高い結果を受けて、脾臓と肺の ASC あるいは CSC を検出した。その結果、S1-SF10 経気道・経口接種群の脾臓と肺から、S1-AS03 筋注群ではほとんど誘導されなかった IgA ASC がそれぞれ明確に検出され、また S1-SF10 経粘膜接種によって、肺の IgG ASC が S1-AS03 の 5 倍以上多く誘導された (図 3A)。さらに CSC を解析した結果、すべての接種群において、脾臓の S1 応答性 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-17A CSC が誘導された一方で、感染局所の肺において、これら 3 つのサイトカインをすべて誘導したのは、S1-SF-10 経気道接種群のみであった (図 3B)。

図2A 血清と肺洗浄液のS1特異的抗体

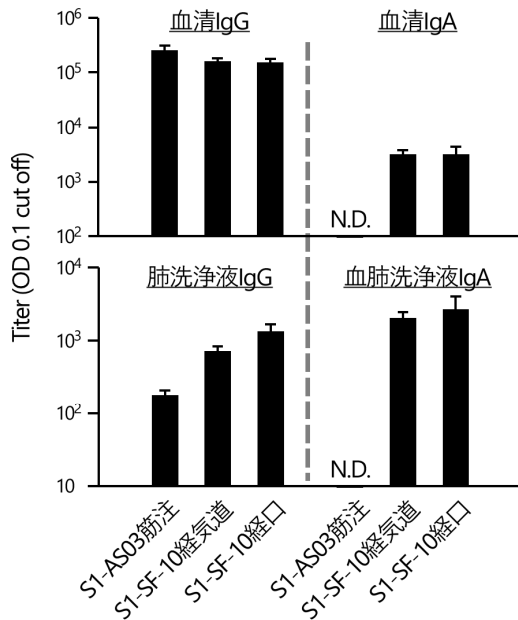


図2B 血清と肺洗浄液のS1/ACE2結合阻害 (感染防御能)

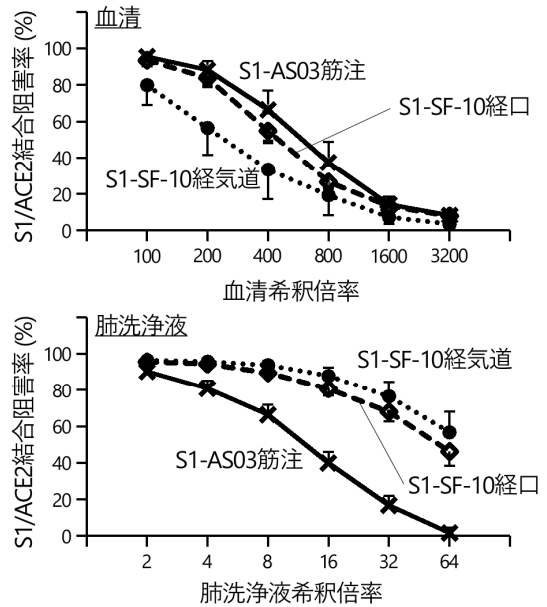


図3A 脾臓と肺におけるS1特異的抗体産生細胞

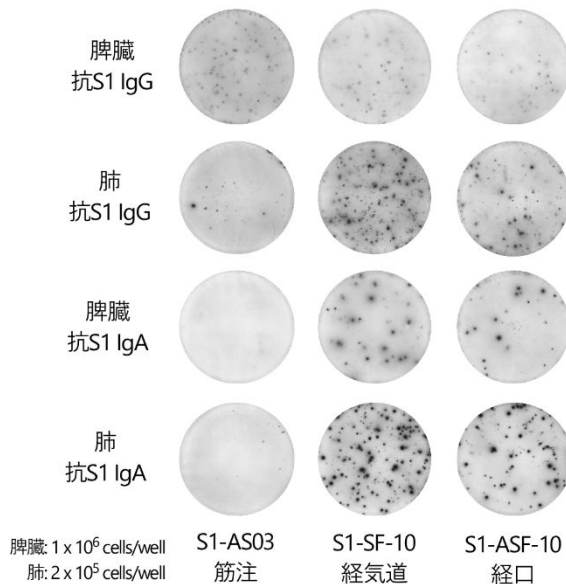
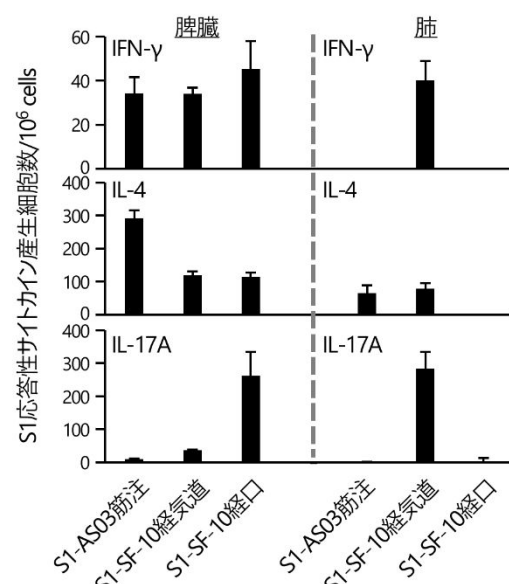


図3B 脾臓と肺におけるS1応答性サイトカイン産生細胞



(3) S1-SF10 経気道接種して少なくとも1年は免疫が持続した。

S1-SF10 経気道接種がウイルス侵入門戸である気道粘膜の免疫を強力に誘導できることが分かった。最後にこの免疫が長期間持続するかを検討した。S1-SF-10 経気道接種したマウスの抗 S1 血清 IgG は、最終免疫 2 週間後から半年後、さらに一年後も持続はしていたもののピーク時の 1/5 以下まで低下することが確認された。しかしながら、ピーク時の抗体価が非常に高いため、実質的な有効性は維持されていたと推測される。今後免疫マウスへの感染実験等を行い、真の有効性を確認する必要がある。次に脾臓における S1 応答性サイトカイン産生細胞を検出したところ、S1-SF-10 経気道接種マウスは最終免疫 2 週間後には IL-4 産生細胞は少ないものの、IFN-、IL-17A、そして IL-10 産生細胞が多量に検出された。一年後にこの免疫記憶が持続しているかを確認したところ、IL-4 産生細胞も大幅に増加し、加えて IFN-、IL-17A、そして IL-10 サイトカイン産生細胞も減少することなく維持されていた。以上、S1-SF-10 経気道接種による B 細胞免疫と T 細胞免疫が共に少なくとも一年持続することが分かった。IL-17A は IgA 誘導を促進する作用がある反面、炎症惹起といった負の側面もある。しかしながら、IL-17A と共に免疫抑制に働く IL-10 が誘導されることで過剰な免疫を抑えながら、IgA を含めた感染防御免疫を誘導できると推測される。

リコンビナント抗原を用いた本検討で、SF10 の長期免疫持続も含めて有効性が確認されたことから、今後新型コロナワクチンのみならず、様々な感染症ワクチンに SF10 アジュバントが応用可能であると期待される。

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kameda Keiko, Takahashi Etsuhisa, Kimoto Takashi, Morita Ryoko, Sakai Satoko, Nagao Mizuho, Fujisawa Takao, Kido Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 A Murine Model of Food Allergy by Epicutaneous Adjuvant-Free Allergen Sensitization Followed by Oral Allergen Challenge Combined with Aspirin for Enhanced Detection of Hypersensitivity Manifestations and Immunotherapy Monitoring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 757 ~ 757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15030757	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 -
1. 著者名 Kimoto Takashi, Sakai Satoko, Kameda Keiko, Morita Ryoko, Takahashi Etsuhisa, Shinohara Yasuo, Kido Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Induction of systemic, mucosal, and cellular immunity against SARS CoV 2 in mice vaccinated by trans airway with a S1 protein combined with a pulmonary surfactant derived adjuvant SF 10	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Influenza and Other Respiratory Viruses	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) 10.1111/irv.13119	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 -
1. 著者名 Kimoto Takashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Development of a safe and effective novel synthetic mucosal adjuvant SF-10 derived from physiological metabolic pathways and function of human pulmonary surfactant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 544 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2021.11.030	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木本貴士、堺聡子、亀田桂子、高橋悦久、木戸博
2. 発表標題 肺サーファクタント由来人工合成アジュバントSF-10混合新型コロナCOVID-19ワクチンは、気道粘膜免疫を強力に誘導できる。
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会 第58回学術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本貴士、堺聡子、亀田桂子、友廣京佳、高橋悦久、木戸博
2. 発表標題 ヒト肺サーファクタント由来人工合成アジュバントSF-10混合新型コロナCOVID-19ワクチンは、感染局所の肺と血液でAS03より優位な感染防御免疫を誘導した。
3. 学会等名 第26回ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木本 貴士、堺 聡子、亀田 桂子、森田 涼子、高橋 悦久、木戸 博
2. 発表標題 肺サーファクタント由来人工合成アジュバントSF-10混合新型コロナCOVID-19ワクチンは、感染防御に有効な抗体を誘導できる。
3. 学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会 第57回学術研究会
4. 発表年 2021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
---------	---------