

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08489

研究課題名(和文) 新規経鼻噴霧型SARS-CoV-2ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of the novel nasal spray vaccines against SARS-CoV-2

研究代表者

河野 光雄 (Kawano, Mitsuo)

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00234097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗原として、SARS-CoV-2スパイク(S)タンパク遺伝子を非増殖型ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスベクターに導入し、SARS-CoV-2に対する新規経鼻噴霧型ワクチン(CoV2-S/非増殖型hPIV2)の開発を試みた。

ヒトアンジオテンシン変換酵素2発現トランスジェニックマウス(hACE2/Tg)にCoV2-S/非増殖型hPIV2を経鼻または経気道経路で接種し中和抗体誘導能を解析した。また、CoV2-S/非増殖型hPIV2接種後のhACE2/TgにSARS-CoV-2を感染させ、そのhACE2/Tgの生存率によりSARS-CoV-2弱毒生ワクチンとしての有効性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のSARS-CoV-2ワクチンは、筋肉注射による接種であるため、感染防御に最も必要である分泌型IgAの気道粘膜への誘導はない。本ワクチンは、経鼻あるいは経気道噴霧型の弱毒生ワクチンであり、ワクチン接種により全身の粘膜に分泌型のIgAを誘導できる。

注射等を行わない非増殖型hPIV2ワクチンの経鼻噴霧型デバイスによる投与法は、過去にパンデミックを引き起こし、今後もその可能性を否定できないSARS-CoV-2の感染において、粘膜免疫誘導型新規ワクチンとしてその感染防御を可能にする。また、医師の少ない発展途上国においては非常に有益なツールとなる。

研究成果の概要(英文)： We tried to develop the novel nasal spray vaccines against SARS-CoV-2 by introducing the gene of spike (S) protein of SARS-CoV-2 as an antigen into the non-proliferative human parainfluenza type 2 virus vector (CoV2-S/hPIV2-nonP).

Transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2/Tg) were inoculated with CoV2-S/hPIV2-nonP via the nasal or airway route, and the ability to induce neutralizing antibodies was analyzed. In addition, we infected hACE2/Tg with SARS-CoV-2 after vaccination with CoV2-S/hPIV2-nonP, and examined the effectiveness as a live attenuated vaccine for SARS-CoV-2 based on the survival rate of the hACE2/Tg.

研究分野：ウイルス学

キーワード：SARS-CoV-2 hPIV2 ワクチン 粘膜免疫 細胞性免疫 ADE

## 1. 研究開始当初の背景

SARS-CoV-2 は世界的流行 (パンデミック) を引き起こし、多くの感染者と死者をもたらし、世界各地でロックダウンを余儀なくされた。その要因として、ウイルスそのものの病原性に加え、感染力の強さと感染拡大の速さから、死者が急増していると考えられていた。

研究開始時点で、本ウイルスに対するワクチンは存在せず、世界各国で SARS-CoV-2 ワクチンの研究開発が急ピッチで進められていた。先行していた組換えウイルスワクチンとして、オックスフォード大学とアストラゼネカが共同開発したアデノウイルスベクターワクチン (AZD1222) は、第 3 相臨床試験に至っていた。また、国内では、大阪大学とアンジェスが共同開発した DNA ワクチン (AG0301-COVID19) が、第 1/2 相臨床試験に至っていた。しかしながら、AZD1222 については、2 例目の重篤な副作用が報告され、さらに、アデノウイルスをワクチンのバックボーンとして使用しており、アデノウイルスの既感染者には既に異なるタイプのアデノウイルス抗体が存在しており、ワクチンとしての有効性を抑制する危険性も懸念されていた。

また、AG0301-COVID19 に代表される DNA ワクチンは、注射による筋肉内接種を行うため、中和抗体価をもつ IgG は誘導可能であるが、感染防御に最も必要とされる粘膜免疫 (IgA) は誘導されず、当時のピークが過ぎたとしても、次の感染パンデミックが引き起こされる可能性は十分にありえた。このために、迅速な新規のワクチン開発が必要不可欠であり、アフターパンデミックを見据えた安全かつ有効なワクチン開発の必要性が求められた。さらに、その有効性を検証する有用な感染動物モデルもなく、その作製も急務であった。

## 2. 研究の目的

本研究においては、SARS-CoV-2 同様に気道粘膜に感染し、極めて病原性の低いヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) をワクチンのバックボーンとして用いた弱毒生ワクチン開発を行う。実際には、ウイルス増殖に必須の遺伝子を欠損させ安全性を高めた非増殖型医療用スペックヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (非増殖型 hPIV2) に、SARS-CoV-2 スパイク (S) 抗原上に存在する様々な機能領域を抗原として挿入したリコンビナントワクチン (CoV2-S/非増殖型 hPIV2) を作製し、高い中和抗体誘導能を有し、抗体依存性感染増強 (ADE) のない安全なワクチン開発を遂行する。さらに、ヒトアンギオテンシン変換酵素 2 (hACE2) 発現トランスジェニック (Tg) マウスを用いて SARS-CoV-2 感染モデル系 (COVID-19 モデル) を完成し、開発したワクチンの有効性を中和抗体誘導能と感染モデルマウスの生存率で確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) CoV2-S/非増殖型 hPIV2 ワクチンの作製

2-step PCR を用いて作製した SARS-CoV-2 スパイク (S) 抗原遺伝子を非増殖型 hPIV2 の外来遺伝子導入サイト (Not I) に挿入したプラスミド (pCoV2-S/非増殖型 hPIV2) を 3 種作製した。作製したそれぞれのゲノムを含むプラスミドを 3 種のポリメラーゼユニットならびに欠損させた遺伝子を発現するプラスミドと共に、Via-Fect と共に BSRT7/5 細胞 (T7 ポリメラーゼ発現細胞) にトランスフェクションし、その上清を欠損タンパク発現 Vero 細胞 (Vero-X) に感染させ CoV2-S/非増殖型 hPIV2 をレスキューした。

### (2) CoV2-S/非増殖型 hPIV2 の性状確認

CoV2-S/非増殖型 hPIV2 を MOI=0.05 で Vero-X に感染させ 24 時間ごとに上清を回収し、growth curve を作成した。また、同様に感染させた Vero-X 細胞での抗原量を 3 ~ 4 日毎に SARS-CoV-2-S 抗体を用いたウエスタンブロット法で確認した。

### (3) CoV2-S/非増殖型 hPIV2 の hACE2 発現トランスジェニックマウス (hACE2/Tg) への経鼻ならびに経気道投与による SARS-CoV-2 に対するワクチン効果の検討

図 1 に示したプロトコールに従って、1 群 8 ~ 12 匹の hACE2/Tg マウスに、CoV2-S/非増殖型 hPIV2 ワクチンを約 4 週おきに 3 回、経鼻ならびに経気道投与し、最終ワクチン投与から約 1 週間後に尾静脈より採血し、市販の ELISA キットを用いて中和抗体量を解析した。また、最終ワクチン投与から約 2 週間後に SARS-CoV-2 を感染させ、24 時間ごとにマウスの体重およびその生存率を解析し、SARS-CoV-2 に対するワクチン効果について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) CoV2-S/非増殖型 hPIV2 の作製

研究の方法に示した手順でワクチン作製用の 3 種のコンストラクト (pCoV2-S/非増殖型 hPIV2) を作製した (特許出願準備中のため非公開)。これらのプラスミドを用いて、リバースジェネティクス法によるウイルス回収を行った。作製した 3 種の CoV2-S/非増殖型 hPIV2 を MOI=0.05 で Vero-X に感染させ 24 時間ごとに上清を回収し、growth curve を作成した (図 2)。これらのワクチンベクターは、親株である hPIV2 とほぼ同様の増殖能を有し、安定したワクチン産生効率を示した。

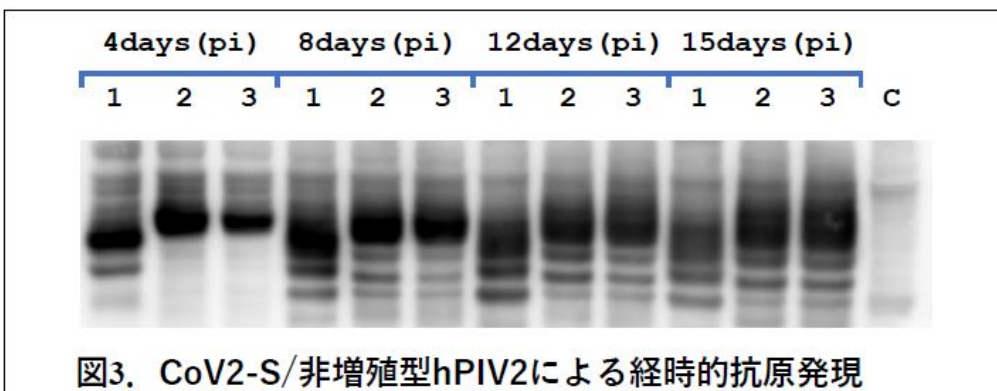
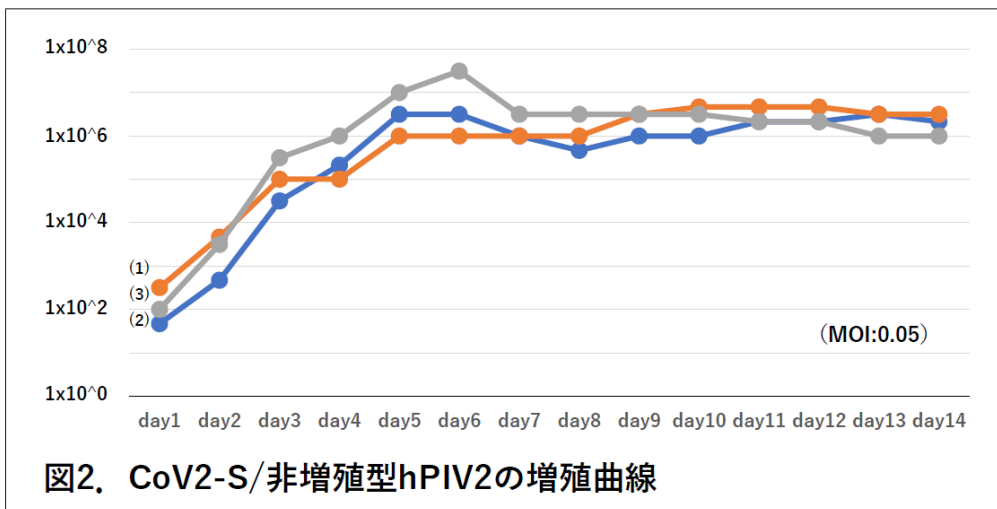
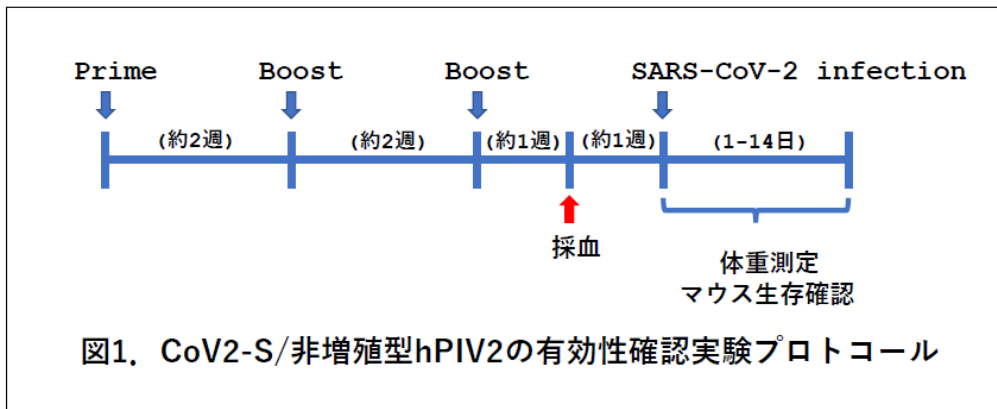
(2)CoV2-S/非増殖型 hPIV2 による抗原発現

作製した3種のCoV2-S/非増殖型 hPIV2 を MOI=0.05 で Vero-X に感染させ、4、8、12、15日後の SARS-CoV-2 スパイク蛋白抗原の発現量についてウエスタンブロット法を用いて解析した。

図3に示したように、感染後8日目をピークとして、3種のCoV2-S/非増殖型 hPIV2 ともほぼ同様の経時的発現を示した。

(3)CoV2-S/非増殖型 hPIV2 の hACE2 発現トランスジェニックマウス(hACE2/Tg)への経鼻ならびに経気道投与による SARS-CoV-2 に対するワクチン効果の検討

図1に示したプロトコールに従って、hACE2/Tg マウスに、CoV2-S/非増殖型 hPIV2 ワクチンを約4週おきに3回、経鼻ならびに経気道投与し、最終ワクチン投与から約1週間後の血清中の中和抗体量を解析した。また、最終ワクチン投与から約2週間後に SARS-CoV-2 を感染させ、経時的に感染マウスの体重およびその生存率を解析し、SARS-CoV-2 に対するワクチン効果について検討した(特許出願準備中のため非公開)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakai-Sugino K, Uematsu J, Yamamoto H, Kihira S, Kawano M, Nishio M, Tsurudome M, Sekijima H, O'Brien M, Komada H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibitory effects of kaempferol, quercetin and luteolin on the replication of human parainfluenza virus type 2 in vitro.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Drug Discov Ther	6. 最初と最後の頁 16-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2023.01099.	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 該当する

1. 著者名 Kimura-Ohba S, Asaka MN, Utsumi D, Takabatake Y, Takahashi A, Yasutomi Y, Isaka Y, Kimura T.	4. 巻 1869
2. 論文標題 d-Alanine as a biomarker and a therapeutic option for severe influenza virus infection and COVID-19.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.	6. 最初と最後の頁 166584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadis.2022.166584.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	浅賀 正充  (Asaka Masamitsu)  (60572865)	国立感染症研究所・ハンセン病研究センター 感染制御部・主任研究官   (82603)	

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
---------	---------