

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09078

研究課題名(和文) SARS-CoV-2中和抗体の標的エピトープ同定

研究課題名(英文) Identification of Epitopes Targeted by Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2

研究代表者

加来 奈津子 (Kaku, Natsuko)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10899355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：COVID-19 mRNAワクチン接種者と自然感染者のエピトーププロファイルを、SARS-CoV-2の受容体結合ドメイン(RBD)ペプチド固相化マイクロアレイを用いて明らかにした。ワクチンに誘導される抗体は、自然感染抗体よりもRBD全体に広く分布すること、自然感染血清と比較して、ワクチン血清で観察された比較的低い中和抗体力価は、ワクチンによる液性免疫における効率の低いエピトープ成熟に起因する可能性があること、変異パネルを用いたアッセイでは、ワクチン血清のエピトープ多様性は、急速に進化するウイルスが中和抗体を回避する余地を少なくし、ワクチン免疫に利点を与える可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により中和抗体の標的となるエピトープが同定され、個別のエピトーププロファイルから、患者血清に含まれる抗体の中和活性を病原性ウイルスを用いずに予測可能となった。抗体の結合親和性は自然感染後/ワクチン接種後、時間とともに上昇し、ウイルス中和活性と相関する一方で、汎用臨床検査装置によっては抗体価が結合親和性とそれほど強く相関しないものがあるといった懸念を示した。さらに、ワクチン接種後のエピトープ成熟過程において、年齢によって大きな差異があること、自然感染後のワクチン接種はワクチン接種のみと比較してより高いウイルス中和抗体を獲得できることを明らかとし、今後のワクチン接種施策に資する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the epitope profiles of COVID-19 mRNA vaccine recipients and naturally infected individuals using an RBD peptide immobilized microarray of SARS-CoV-2. The findings revealed that vaccine-induced antibodies are more broadly distributed across the RBD compared to those from natural infection. The relatively lower neutralizing antibody titers observed in vaccine sera, as compared to natural infection sera, may be due to less efficient epitope maturation in the humoral response induced by the vaccine. Assays using a mutation panel demonstrated that the epitope diversity in vaccine sera potentially reduces the ability of the rapidly evolving virus to evade neutralizing antibodies, thereby providing an advantage to vaccine-induced immunity.

研究分野：宿主免疫

キーワード：SARS-CoV-2 COVID-19 エピトープ RBD 中和抗体 結合親和性 ペプチドマッピング mRNAワクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、世界に蔓延している COVID-19 原因ウイルス SARS-CoV-2 の感染成立の第 1 ステップは、ウイルスエンベロープ表面のスパイク (S) タンパク質と宿主細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) レセプターの結合である。ウイルス複製過程にこの結合は不可欠のため、S タンパク質を標的にする抗体は、ACE2 レセプターとの結合を阻害し感染を防御する中和抗体として作用すると考えられている。自然発生的に産生された抗体は、特異性や親和性の異なるポリクローナル抗体の集合で、感染を防御できる中和抗体と防御できない非中和抗体が混在している。実際に COVID-19 患者血清の研究でも S タンパク質だけでなくエンベロープ内部の核タンパク質をエピトープとする抗体が検出されている。

そこで本研究では、「SARS-CoV-2 中和抗体の標的エピトープの多様性解析」を核心とした。宿主の過剰免疫反応が重症病態の一端と示唆されているため、本研究が解明すべき仮説は、液性免疫の結果である抗体のエピトープ多様性解析(プロファイリング)が、幅広い重症度を規定する 1 要因である、ということである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、SARS-CoV-2 ポリクローナル抗体が標的とする多様なエピトープの中で、高い中和活性を持つ抗体が標的とするエピトープの高解像度な同定である。

血清に含まれるポリクローナル抗体が結合する多様なエピトープ情報(エピトーププロファイル)は、個人の SARS-CoV-2 に対する感染防御の有効性を表すと考えられる。独自にライブラリ化した血清のウイルス中和活性を測定し、患者の臨床情報と合わせて血清ライブラリとする。独自のペプチドアレイを用いて血清に含まれる抗体のエピトーププロファイルを高解像度に解析し、中和活性および重症度と相関するエピトープを同定する。高中和活性を示すエピトープの同定により、個人のエピトーププロファイルから産生抗体が中和抗体であるかどうか予測できるようになる。また、重症度と相関するエピトープの同定により、重症度が予測できるようになる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### 血清ライブラリ作成

当研究室が保有している COVID-19 患者血清は、診療情報、バイタル情報を含む臨床情報とともに供与されている。酸素要求量や酸素飽和度、リンパ球数など、これまで重症化と関与が報告されているパラメータを用いて、重症度の高低をつけた。中和活性の強弱は、培養細胞への SARS-CoV-2 感染による細胞変性効果で測定した。重症度や中和活性についての情報を血清ライブラリとした。

#### ペプチドアレイによる高中和活性エピトープ同定

独自のペプチドアレイと血清を反応させ、デザインしたポリペプチド鎖を標的のエピトープとする抗体をシグナルで検出した。陽性シグナルの位置が S タンパク質内のエピトープ位置を示し、シグナル濃度が標的エピトープと抗体との結合の半定量となる。ペプチドアレイで得られる情報がエピトーププロファイルである。確保している検体について、血清ライブラリで得た高い中和活性を持つ抗体が、標的とするエピトープを同定した。

#### ペプチドアレイと重症度相関エピトープ同定

血清ライブラリで得た重症度の高低と相関するエピトープを探索した。

#### 抗体のエピトープ成熟解析

抗体の中和活性には、量的パラメータである抗体価のみならず、抗原と抗体との結合親和性で表される抗体の成熟が強く影響することが研究の途上で判明した。そこで結合親和性の特性解析を実施した。

### 4. 研究成果

本研究では、Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA ワクチン接種者と COVID-19 患者のエピトーププロファイルを、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARSCoV-2) の受容体結合ドメイン(RBD)のペプチド(15mer)を固相化したマイクロアレイを用いて明らかにした。SARS-CoV-2 RBD を標的とするワクチンに誘導される抗体は、自然感染抗体よりも RBD 全体に広く分布すること、自然感染血清と比較して、ワクチン血清で観察された比較的低い中和抗体力価は、ワクチンによる液性免疫における効率の低いエピトープ成熟に起因する可能性があること、変異パネルを用いたアッセイでは、ワクチン血清のエピトープ多様性は、急速に進化するウイルスが中和抗体を回避する余地を少なくし、ワクチン免疫に利点を与える可能性があることを示した。

エピトープ成熟は、中和抗体と抗原である SARS-CoV-2 との結合親和性で表されることに焦点を当て解析を進めたところ、結合親和性は自然感染後あるいはワクチン接種後、数か月の時間経過に伴って上昇し、ウイルス中和活性と相関することを明らかとした。一方、臨床検査

で汎用される装置で測定された抗体価は、この結合親和性とよく相関するものと、それほど強く相関しないものがあり、検査対象者の背景や検査装置による影響についての懸念を示した。さらに、ワクチン接種後のエピトープ成熟過程において、年齢によって大きな差異があることを見出し、加齢に伴う免疫応答不全の可能性や、自然感染後のワクチン接種はワクチン接種のみと比較してより高いウイルス中和抗体を獲得できること、この能力にも年齢差が存在することを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Nakagama Yu, Komase Yuko, Kaku Natsuko, Nitahara Yuko, Tshibangu-Kabamba Evariste, Tominaga Tomoyo, Tanaka Hiroko, Yokoya Tomoaki, Hosokawa Minako, Kido Yasutoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Detecting Waning Serological Response with Commercial Immunoassays: 18-Month Longitudinal Follow-up of Anti-SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	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/spectrum.00986-22	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 Nakashima Kei, Ishida Masayuki, Matsui Hiroki, Yoshida Chihiro, Nagai Tatsuya, Shiraga Minoru, Nakaoka Hiroshi, Otsuka Yoshihito, Nakagama Yu, Kaku Natsuko, Nitahara Yuko, Kido Yasutoshi, Hirota Yoshio	4. 巻 18
2. 論文標題 Immunogenicity and safety of COVID-19 vaccine in lung cancer patients receiving anticancer treatment: A prospective multicenter cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Vaccines & Immunotherapeutics	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） 10.1080/21645515.2022.2140549	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 Nakagama Sachie, Nakagama Yu, Komase Yuko, Kudo Masaharu, Imai Takumi, Tshibangu-Kabamba Evariste, Nitahara Yuko, Kaku Natsuko, Kido Yasutoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Age-adjusted impact of prior COVID-19 on SARS-CoV-2 mRNA vaccine response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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） 10.3389/fimmu.2023.1087473	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 Matsuura Tomoka, Fukushima Wakaba, Nakagama Yu, Kido Yasutoshi, Kase Tetsuo, Kondo Kyoko, Kaku Natsuko, Matsumoto Kazuhiro, Suita Asae, Komiya Eriko, Mukai Emiko, Nitahara Yuko, Konishi Ayako, Kasamatsu Ayane, Nakagami-Yamaguchi Etsuko, Ohfuji Satoko, Kaneko Yukihiko, Kaneko Akira, Kakeya Hiroshi, Hirota Yoshio	4. 巻 40
2. 論文標題 Kinetics of anti-SARS-CoV-2 antibody titer in healthy adults up to 6?months after BNT162b2 vaccination measured by two immunoassays: A prospective cohort study in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5631 ~ 5640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2022.08.018	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 Nakagama Y, Candray K, Kaku N, Komase Y, Rodriguez-Funes M-V, Dominguez R, Tsuchida T, Kunishima H, Nagai E, Adachi E, Mumba N D, Yamasue M, Komiya K, Hiramatsu K, Uemura N, Sugiura Y, Yasugi M, Yamagishi Y, Mikamo H, Shiraishi S, Izumo T, Nakagama S, Watanabe C, Nitahara Y, Tshibangu-Kabamba E, Kakeya H, Kido Y	4. 巻 227
2. 論文標題 Antibody Avidity Maturation Following Recovery From Infection or the Booster Vaccination Grants Breadth of SARS-CoV-2 Neutralizing Capacity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 780 ~ 787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiac492	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 KAKU Natsuko, NAKAGAMA Yu, NITAHARA Yuko, KIDO Yasutoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Antibody testing as the guide to our living with COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 338 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.33.338	査読の有無 無
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 Kaku Natsuko, Nakagama Yu, Shirano Michinori, Shinomiya Sari, Shimazu Kazuhiro, Yamazaki Katsuaki, Maehata Yoshito, Morita Ryo, Nitahara Yuko, Yamamoto Hiromasa, Mizobata Yasumitsu, Kido Yasutoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Longitudinal ventilatory ratio monitoring for COVID-19: its potential in predicting severity and assessing treatment response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Critical Care	6. 最初と最後の頁 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13054-021-03768-2	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 Nitahara Yuko, Nakagama Yu, Kaku Natsuko, Candray Katherine, Michimuko Yu, Tshibangu-Kabamba Evariste, Kaneko Akira, Yamamoto Hiromasa, Mizobata Yasumitsu, Kakeya Hiroshi, Yasugi Mayo, Kido Yasutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 High-Resolution Linear Epitope Mapping of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein in COVID-19 mRNA Vaccine Recipients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0096521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/Spectrum.00965-21	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 Nakagama Yu, Nitahara Yuko, Kaku Natsuko, Tshibangu-Kabamba Evariste, Kido Yasutoshi	4. 巻 60
2. 論文標題 A Dual-Antigen SARS-CoV-2 Serological Assay Reflects Antibody Avidity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02262-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.02262-21	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 Yasugi Mayo, Nakagama Yu, Kaku Natsuko, Nitahara Yuko, Hatanaka Noritoshi, Yamasaki Shinji, Kido Yasutoshi	4. 巻 41
2. 論文標題 Characteristics of epitope dominance pattern and cross-variant neutralisation in 16 SARS-CoV-2 mRNA vaccine sera	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 6248 ~ 6254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2023.08.076	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 Matsuura Tomoka, Fukushima Wakaba, Nakagama Yu, Kido Yasutoshi, Kase Tetsuo, Kondo Kyoko, Kaku Natsuko, Matsumoto Kazuhiro, Suita Asae, Mukai Emiko, Nitahara Yuko, Konishi Ayako, Kasamatsu Ayane, Nakagama Sachie, Nakagami-Yamaguchi Etsuko, Ohfuji Satoko, Kaneko Yukihiko, Kaneko Akira, Kakeya Hiroshi, Hirota Yoshio	4. 巻 14
2. 論文標題 Factors impacting antibody kinetics, including fever and vaccination intervals, in SARS-CoV-2-naïve adults receiving the first four mRNA COVID-19 vaccine doses	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-57931-0	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 KAKU Natsuko, NAKAGAMA Yu, NITAHARA Yuko, KIDO Yasutoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 新型コロナウイルス感染症との共生社会への羅針盤：SARS-CoV-2抗体検査	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 338 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.33.338	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中釜 悠, Candray Katherine, 中釜 幸恵, 加来 奈津子, 仁田原 裕子, Tshibangu Evariste, 城戸 康年
2. 発表標題 SARS-CoV-2に対する血清抗体成熟化の臨床的意義
3. 学会等名 日本小児科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中釜 幸恵, 中釜 悠, 駒瀬 裕子, 工藤 正治, 今井 匠, 仁田原 裕子, 加来 奈津子, チバング・エバリステ, 城戸 康年
2. 発表標題 COVID-19のワクチン接種後抗体に及ぼす年齢の影響
3. 学会等名 日本渡航医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中釜 悠, チバング・エバリステ, カンドライ・カテリン, 加来 奈津子, 中釜 幸恵, 仁田原 裕子, 金子 明, マリア・ロドリゲス, リーナ・ドミンゲス, 城戸 康年
2. 発表標題 Covid-19パンデミックが医療システムへ及ぼした影響 日本、エルサルバドル、コンゴ民主共和国の医療従事者におけるSARS-CoV-2血清有病率の比較調査
3. 学会等名 日本渡航医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中釜 悠, カンドライ・カテリン, 加来 奈津子, チバング・エバリステ, 仁田原 裕子, 城戸 康年
2. 発表標題 抗体アビディティ成熟の観点からみた、SARS-CoV-2ワクチン誘導免疫と自然感染による免疫の差異
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Natsuko Kaku, Yu Nakagama, Yuko Nitahara, Hiroshi Takeya, Yasutoshi Kido
2. 発表標題 Avidity maturation favors convalescents over vaccinated individuals granting breadth in neutralizability and tolerance against SARS-CoV-2 variants
3. 学会等名 ASM Microbe (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁田原 裕子, 中釜 悠, 加来 奈津子, Tshibangu-Kabamba Evariste, 金子 明, 安木 真世, 城戸 康年
2. 発表標題 COVID-19 mRNAワクチン接種者におけるSARS-CoV-2スパイクタンパク質受容体結合ドメインの高解像度線形エピトープマッピング解析
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加来 奈津子, チバングカバンバ・エバリステ, 中釜 悠, 城戸 康年
2. 発表標題 コンゴ民主共和国カサイ州におけるSARS-CoV-2血清疫学
3. 学会等名 日本渡航医学会
4. 発表年 2022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			
エルサルバドル	CICES	National Rosales Hospital, San Salvador	El Salvador National Institute of Health	
コンゴ民主共和国	INRB			