

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20932

研究課題名（和文）自己反応性を回避するワクチンの技術基盤開発

研究課題名（英文）The development of influenza virus vaccine aimed at avoiding or reducing auto-reactivity

研究代表者

岡村 千絵子（OKAMURA, Chieko）

関西医科大学・附属免疫医学研究所・助教

研究者番号：20621551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウィルスの表面抗原ヘマグルチニン(HA)の保存された領域（stem領域）は、様々な変異株に効く万能ワクチンの標的になり得る。しかし、stem領域を認識する多くの抗インフルエンザ広域中和抗体は自己反応性をもち、ワクチン開発を困難にしている。本研究では、抗インフルエンザ広域中和抗体に結合する12アミノ酸からなる環状ペプチドとキャリアタンパク質を均一な配向性で架橋した人工抗原により、マウスにおいて抗原特異的な抗体産出とインフルエンザウィルスに対する中和活性が誘導できることを明らかにした。誘導された抗体の自己反応性について、今後引き続き詳しく分析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、環状ペプチドとキャリアタンパク質の人工抗原によってインフルエンザウィルスに対する抗体産出と中和活性が誘導できた。キャリアタンパク質特異的なヘルパーT細胞が事前に体内に存在していることが、B細胞による抗原特異的な抗体の産出に重要であることが示唆された。COVID-19によるパンデミック収束にワクチンによる集団免疫獲得が鍵となったように、次のパンデミックでは有効かつ安全なワクチン開発が重要となる。ペプチドをベースとするワクチン抗原についての本研究成果は、インフルエンザウィルスパンデミックを想定した新規万能ワクチン開発へ貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：The evolutionarily conserved stem region of the surface antigen hemagglutinin (HA) of the influenza virus, has a potential target for a universal vaccine against a broad spectrum of influenza virus strains. However, many stem-directed broadly neutralizing antibodies exhibit self-reactivity, complicating vaccine development. In this study, we generated a novel vaccine antigen combining 12-amino-acid synthetic cyclic peptides, that bind to a broadly neutralizing antibody against influenza virus, and a carrier protein with uniform orientation. Our research demonstrates that this vaccine antigen can induce antibodies that bind to the influenza HA stem, displaying neutralizing activity. The self-reactivity of the induced antibodies will be further analyzed in detail in ongoing research.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ワクチン開発 インフルエンザウィルス 自己反応性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは病原体などの多様な抗原に反応できるように多彩な抗体を生み出す。この抗体の中には自己由来のタンパク質や細胞を認識するものも含まれるが、後に自己抗体となる抗原受容体 (B cell receptor, BCR) を発現する B 細胞は発生過程で、抗体再編成、除去、あるいは不応答状態にされる。この自己免疫寛容機構により、自己抗原に高い相同性を持つような標的に対する免疫反応を誘導することは困難である。自己に似た抗原を持つウィルスはこの自己免疫寛容を利用して、免疫システムの攻撃を回避している可能性もある。インフルエンザウィルスのヘマグルチニン抗原 (HA) には変異しづらい種間で保存された幹の領域 (stem 領域) が存在する。この HA の stem 領域は様々な変異株に中和活性を持つ万能ワクチンの標的になり得る。しかし、stem を認識する広域中和抗体の多くが自己反応性であり生体内で産出誘導されにくい。stem 領域を認識する広域中和抗体は自己寛容のメカニズムによって除去されると考えられている。自己免疫寛容を回避できれば、自己抗原に似ている抗原に対する抗体を誘導できるが、自己免疫疾患など正常組織への障害といった副作用が起こる可能性が高い。インフルエンザウィルス万能ワクチン開発には、自己免疫寛容を維持したまま、自己抗原に似た標的抗原に対する抗体を産出誘導する必要がある。

2. 研究の目的

申請者ら研究グループはこれまで、stem 領域を認識する広域中和抗体 C179 抗体に結合する環状ペプチド (L1) を野生型マウスに投与し、インフルエンザウィルス H1N1 株と H2N2 株に対して中和活性を誘導することができた (未発表データ)。本研究では、この環状ペプチドを抗原として用い、キャリアタンパク質とアジュバントの組み合わせを検討し、低い自己反応性かつ高い中和活性を誘導する免疫抗原の開発を目指す。

3. 研究の方法

架橋剤 Sulfo-SMCC を用いてキャリアタンパク質 Spike に 12 アミノ酸からなる環状ペプチド (L1) を結合させ、抗原 Spike/Sulfo-SMCC/L1 を作成する (図 1)。この際、Spike 1 分子に何個の架橋剤が結合しているのか定量するとともに、C179 抗体に対する抗原性も確認する。

キャリアタンパク質特異的なメモリー CD4+ T 細胞を誘導する目的で野生型マウスに事前接種として Spike のみを皮内投与する。Spike 投与後 1 ヶ月後に、Spike/Sulfo-SMCC/L1 を Addavax アジュバントとともに皮内接種し、マウス血清中の抗体価と中和活性価を調べる。

4. 研究成果

(1) 抗原 Spike/Sulfo-SMCC/L1 の作成

Sulfo-SMCC は *N*-ヒドロキスクシンイミド活性エステルとマレイミド基を有する架橋剤である。最初に、Spike のアミノ基に Sulfo-SMCC の *N*-ヒドロキスクシンイミド活性エステルを反応させ、Spike/Sulfo-SMCC 複合体を作製した。Spike に結合した Sulfo-SMCC のマレイミド基を定量し、Spike 1 分子中の 13 個のアミノ基に Sulfo-SMCC が結合したことがわかった。次に、

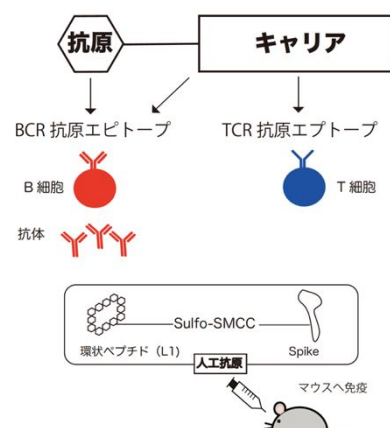


図 1. 人工抗原のデザイン

Spike/Sulfo-SMCC のマレイミド基と還元処理をした L1 のチオール基を反応させた。Spike に結合した Sulfo-SMCC の 15 倍のモル量の L1 を反応させた時に、Spike/Sulfo-SMCC/L1 複合体 1 分子がインフルエンザ HA 抗原 (H2 型; C179 抗体が最も強く結合する) 0.7 分子と同等の C179 反応性を持つことを ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法で確認した。

(2) 抗原 Spike/Sulfo-SMCC/L1 による抗体誘導評価

Spike 特異的なメモリー CD4⁺ T 細胞を誘導するため野生型マウス C57BL/6Jcl メスに Spike のみを皮内に 2 回事前接種した。その 1 ヶ月後、Spike/Sulfo-SMCC/L1 (L1 量 2ug/匹) をアジュバント AddaVax とともに皮内投与した。免疫 10 日後に採血し、血清中の抗 Spike 抗体価と抗 miniHA (stem 領域のみの HA) 抗体価を ELISA 法で測定したところ、いずれも免疫前の血清よりも免疫後の血清で抗体価が有意に増加していた (図 2)。

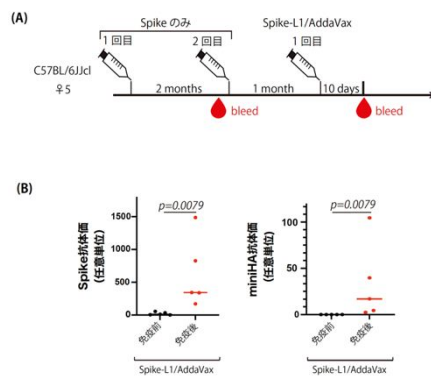


図 2. 免疫マウス血清の抗体価

(A) マウス免疫スケジュール (B) 抗 Spike, miniHA 抗体価については免疫前よりも 1 回免疫後の血清で有意に増加していた。
Mann Whitney t 検定を行った。

(3) 抗原 Spike/Sulfo-SMCC/L1 による中和抗体誘導評価

(2) でのマウス血清をもちいて、H1N1 型インフルエンザウイルス (PR8) に対する中和活性を調べた。コントロールとして未免疫マウス血清を用いた。Spike/Sulfo-SMCC/L1 を免疫した 5 個体のマウスのうち、4 個体が未免疫マウス血清よりも高い中和活性を示した (図 3)。

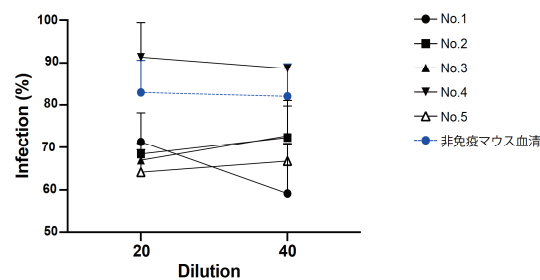


図 3. 免疫マウス血清のインフルエンザウイルス (PR8) に対する中和活性

Spike-L1/AddaVax を免疫したマウス (5 個体) の血清を 20 倍、40 倍希釈で添加した時の H1N1 型インフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/1934, PR8) の感染率を示す。陰性コントロールとして非免疫マウス血清を用いた。

本研究において、均一な配向性と抗原性を持つ免疫源 Spike/Sulfo-SMCC/L1 の調整法を確立した。この Spike/Sulfo-SMCC/L1 によって、インフルエンザウイルス中和活性を持つ抗体が誘導された。今後、個体差のない均一な抗体価および中和活性値上昇を目指し、免疫方法およびキャリア蛋白の選択等の更なる検討が必要である。またより高い抗体価誘導が可能となった場合、自己反応性についても検討する必要がある。Spike/Sulfo-SMCC/L1 によって誘導される抗原特異的な B 細胞レパトアについての解析を終えることができなかったため、引き続き B 細胞レパトアの自己反応性と中和活性を詳しく分析する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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