

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09951

研究課題名(和文)重症肺炎を起こすヒトコロナウイルスに対する新規ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of a new vaccine against human coronavirus causing severe pneumonia

研究代表者

岩田 奈織子 (Iwata-Yoshikawa, Naoko)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：10360695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コロナウイルスのスパイク(S)タンパク質はワクチンターゲットの候補だが、いくつかの動物実験でSARS-CoVに対する不十分な免疫が感染時に肺の好酸球浸潤誘発を示唆している。本研究では、組換えSタンパク質で金ナノ粒子(AuNP)とToll like receptor (TLR) アゴニストの両アジュバントを評価した。AuNPを添加したSタンパク質は、SARS-CoV感染後、重症化は免れたが肺の好酸球浸潤は阻止できなかった。一方、TLRアゴニストを添加したワクチンは肺の好酸球浸潤がなく、高度な中和抗体を誘導した。この研究の結果は、重症肺炎を引き起こすコロナウイルスに対するワクチンの開発をサポートする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARSはアジアを中心に2003年に大流行した重症呼吸器感染症で、現在は終息しているが再興の可能性がある。そしてMERSは2012年に中東で発見された新規のヒトコロナウイルスであるMERS-CoVが原因で重症肺炎を起こす。現在も患者数は増加し、2015年の春には隣国の韓国で、病院内のアウトブレイクが起こり、一大ニュースとなった。これらの重症呼吸器感染症に対して、ハイリスク者および医療従事者へのワクチン接種が流行防止措置として上げられるが、候補となるワクチンは未だにない。本研究で得られた結果は、重症肺炎を起こすヒトコロナウイルスに対する新規ワクチンの開発において、それをサポートするものである。

研究成果の概要(英文)：The spike (S) protein of coronavirus is a candidate vaccine target for blocking coronavirus infection. However, some animal studies have suggested that inadequate immunization against SARS CoV induces a lung eosinophilic immunopathology upon infection. The present study evaluated two kinds of vaccine adjuvants for use with recombinant S protein: gold nanoparticles (AuNPs) and Toll like receptor (TLR) agonists. The AuNP adjuvanted protein induced a strong IgG response but failed to improve vaccine efficacy or to reduce eosinophilic infiltration because of highly allergic inflammatory responses. On the other hand, the TLR agonist adjuvanted vaccine induced highly protective antibodies without eosinophilic infiltrations. The findings of this study will support the development of vaccines against severe pneumonia associated coronaviruses.

研究分野：感染症の病理

キーワード：ワクチン 重症肺炎 コロナウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SARS はアジアを中心に 2003 年に大流行した重症呼吸器感染症で、現在は終息しているが再興の可能性がある。そして MERS は 2012 年に中東で発見された新規のヒトコロナウイルスである MERS-CoV が原因で重症肺炎を起こす。現在も患者数は増加し、2015 年の春には隣国の韓国で、病院内のアウトブレイクが起こり、一大ニュースとなった。これらの重症呼吸器感染症に対して、ハイリスク者および医療従事者へのワクチネーションが流行防止措置として上げられるが、候補となるワクチンは未だにない。

我々はこれまでに SARS-CoV 不活化ワクチンの効果と副反応について SARS 発症マウスモデルを用いて研究を行い、以下の興味深い結果を得ている(Iwata-Yoshikawa N et al., J Virol., 2014)。マウスを SARS-CoV 全粒子不活化ワクチンで免疫し、抗体誘導後ウイルスを感染させるとウイルス粒子の成分である nucleocapsid(N)タンパクの影響により、肺局所に好酸球が浸潤し炎症が重度になる事が分かった。しかし、それは PolyI:C, PolyU などの Toll-like receptor アゴニストをアジュバントとして用いると軽減することも明らかにした。この研究から免疫時に自然感染を模倣した強い自然免疫活性を引き起こす事で、感染防御効果のある副反応を示さない質の良い中和抗体を誘導できる事が明らかになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、重症肺炎を起こすヒトコロナウイルスに対する新規ワクチンの作製で、副反応を引き起こす N タンパクを除いた、かつ高い自然免疫活性を持つアジュバントを組み合わせた新規のヒトコロナウイルスワクチンの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) SARS-CoV スパイクタンパク質の作製 SARS-CoV に対するワクチン作出のため、受容体結合領域を含む SARS-CoV のスパイクタンパク質 (S タンパク質) をバキュロウイルスタンパク質発現システムを用いて作製し、BALB/c マウスを用いてその免疫原性を評価した。

(2) SARS-CoV S タンパク質の免疫原性向上と副反応を抑制するアジュバントの検討

BALB/c マウスに S タンパク質吸着金ナノ粒子、Toll-like receptor (TLR) リガンド添加 S タンパク質、S タンパク質、PBS のそれぞれを 2 週間隔、2 回、皮下免疫を行った。最終免疫から 3 週間後に SARS-CoV を経鼻接種し感染を行い、10 日間の臨床症状観察、肺の病理学的解析およびウイルス価測定、そして 2 回免疫から 2 週間後の血液から抗原特異的 IgG と中和抗体価を測定した。

4. 研究成果

(1) 作製した S タンパク質をマウスに皮下接種すると濃度依存的に中和抗体価と抗原特異的 IgG の産生が認められた。S タンパク質 0.5 μ g を 2 回接種する事で十分な防御抗体が誘導する事ができ、免疫原性を持つ抗原が作出できた。しかし、免疫-攻撃実験を行うと感染後のすべての免疫群のマウスの肺で好酸球浸潤が認められた。これらの現象は RS ウイルスの副反応としても報告されており、これらのことから、この S タンパク質をワクチン抗原として使用するには好酸球浸潤の改善を行う必要があると考えられた。

(2) S タンパク質の免疫原性を向上させ、(1)の実験で認められた肺の好酸球浸潤を抑制するためアジュバントの添加を試みた。SARS-CoV の免疫-感染後の好酸球浸潤は Th1/Th2 バランスが Th2 に傾くことで起こると考えられているため、免疫応答を調節する事ができる金ナノ粒子 (AuNPs) をアジュバントとして用いた。また、UV 不活化 SARS-CoV ワクチンの研究においてすでに効果が判明している TLR リガンドを対象のアジュバントとして用いた。その結果、S タンパク質吸着金ナノ粒子を免疫

したマウスでは、高い抗原特異的 IgG 応答が見られたにも関わらず、感染後の重症化を防ぐことはできず、肺においても好酸球浸潤と eotaxin, IL-4, IL-5 の強い発現が認められた。一方、Toll-like receptor (TLR) リガンド添加 S タンパク質を免疫したマウスでは、Th1/Th2 バランスの良い免疫応答が認められ、高い中和抗体も誘導されていた。また、感染後の重症化および好酸球浸潤も抑制できた。特徴的だったのは、IL-17 の上昇が感染 5 日目に見られた事だった。これは中和抗体の存在下で、SARS-CoV に感染したマウスの肺において Th17 応答が起きている事が示唆される。この結果、アジュバントによる特異的 T 細胞の活性化は有効なワクチン開発および SARS-CoV 感染による好酸球浸潤の抑制に重要な役割を持つと考えられる。

(3) SARS-CoV 免疫-感染で見られた好酸球浸潤は他のコロナウイルスにも認められる現象なのか検証するため、SARS-CoV と同様にヒトに重症肺炎を引き起こす MERS-CoV を用いて検証を行った。MERS-CoV 感染トランスジェニックマウスを用いて免疫-感染実験を行うと 2 回目免疫後の血清において S タンパク質単独免疫群では抗原特異的 IgG1 のみ上昇し、感染後には肺に好酸球浸潤が見られた。そしてサイトカイン、ケモカインのパターンについても、Th2 サイトカインの上昇が見られた。一方、TLR 添加タンパク質免疫群では IgG1 および IgG2a のどちらの上昇も認め

られ Th1/Th2 バランスの良い免疫応答だった。さらに感染後の肺の好酸球浸潤が阻止された。MERS-CoV においても、S タンパク質免疫後の感染で肺に好酸球浸潤が見られ、免疫病理機序は SARS-CoV の免疫-感染モデルと同様であった。さらにアジュバントとして TLR リガンドを加えることによって、感染後の好酸球浸潤を抑制できる可能性を示した。これらの結果は、重症肺炎を引き起こすコロナウイルスに対する今後の新規ワクチン開発研究において重要な知見である。

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 0件）

1. 著者名 Naoko Iwata-Yoshikawa, Tadashi Okamura, Yukiko Shimizu, Osamu Kotani, Hironori Sato, Hanako Sekimukai, Shuetsu Fukushima, Tadaki Suzuki, Yuko Sato, Makoto Takeda, Masato Tashiro, Hideki Hasegawa, Noriyo Nagata.	4. 巻 93
2. 論文標題 Acute respiratory infection in human dipeptidyl peptidase 4-transgenic mice infected with Middle East respiratory syndrome coronavirus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Virol.	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/JVI.01818-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hanako Sekimukai, Naoko Iwata-Yoshikawa, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Michiyo Kataoka, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Kenichi Niikura, Katsuhiko Arai, Noriyo Nagata	4. 巻 64
2. 論文標題 Gold Nanoparticle-Adjuvanted S Protein Induces a Strong Antigen-Specific IgG Response Against Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus Infection, but Fails to Induce Protective Antibodies and Limit Eosinophilic Infiltration in Lungs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 33-51.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12754.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hanako Sekimukai, Naoko Iwata-Yoshikawa, Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Makoto Takeda, Katsuhiko Arai, Hideki Hasegawa, Noriyo Nagata.
2. 発表標題 Expression and characterization of spike proteins of human coronavirus associated with severe pneumonia.
3. 学会等名 XIVth International Nidovirus Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hanako Sekimukai, Naoko Iwata-Yoshikawa, Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushima, Hideki Tani, Michiyo Kataoka, Katsuhiko Arai, Kenichi Niikura, Hideki Hasegawa, Noriyo Nagata
2. 発表標題 Development of a vaccine against human coronavirus using gold nanoparticles.
3. 学会等名 第40 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 関向華子、岩田(吉河)奈織子、福間藍子、福土秀悦、谷 英樹、長谷川秀樹、永田典代
2. 発表標題 重症肺炎を引き起こすヒトコロナウイルスのスパイクタンパク質の作製とその有用性について
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2016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