

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12873

研究課題名(和文) システムバイオロジーを応用した次世代ワクチン安全性評価法の開発

研究課題名(英文) Application of Systems Biology for the evaluation of vaccine safety and quality

研究代表者

水上 拓郎 (Mizukami, Takuo)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長

研究者番号：60415487

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)：我々は、インフルエンザワクチン接種後の肺組織の網羅的遺伝子発現解析によって、ワクチンの安全性評価に資するバイオマーカー群(BMs)を同定し、BMsを用いた安全性評価法の開発とその作用機序の解明を行ってきた。そこで本研究課題では、システムバイオロジーを応用し、ワクチン・アジュバント接種後の網羅的遺伝子発現解析と生体反応の変化を詳細に解析して、ワクチンおよびアジュバントに共通して安全性評価が可能なユニバーサルバイオマーカー(UBMs)の同定を試みる。またUBMsを用いたワクチンの次世代安全性試験法を開発するとともに、ワクチン接種後の作用機序について明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究は、WHOや欧州、特にドイツのPaul-Ehrlich-Institutや英国のNational Institute for Biological Standards and Control、European Vaccine Initiativeなどを中心に様々なコンソーシアムが作られ、研究開発されている。我々はワクチン安全性評価、品質評価等に関し、先端の研究を実施し、成果を発表し、試験法の国際調和の観点からも非常に期待されている。またワクチンの有効性・安全性を評価するバイオマーカーが確定できれば、新規ワクチンやアジュバントの開発にも繋がると考えられ、多くの発展が期待されている。

研究成果の概要(英文)： Vaccine is most effective tool for preventing the infectious diseases. Most of the vaccine components are derived from inactivated pathogens, thus, the safety and consistency in a lot-to-lot basis are needed to ensure in the preclinical phase and after the licensure. However, these evaluation methods using animal for vaccine and adjuvant safety has not changed for long time.

Here we show that application of systems biology approaches enable to evaluate vaccine and adjuvant safety. We focused on the influenza vaccine and some adjuvants. We obtained the global gene expression profile after the vaccination in animal model and found that some typical gene signatures in lung clearly differed in each vaccine and adjuvant, respectively. We identified universal gene set that can evaluate safety of vaccine and adjuvant. This system will improve future evaluation methods for vaccine and adjuvant safety.

研究分野：ワクチン学

キーワード：システムズバイオロジー ワクチン アジュバント 安全性 バイオマーカー 肺 インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

ワクチンは感染症予防において非常に有効であり、感染症予防に重要なワクチンの規格・容量・用法などは特にグローバルな視点からも WHO を中心として国際的な調和がなされている。またワクチンは、乳幼児から高齢者までの広範囲な健康人に接種することからも安全性に関しても十分に担保されることが必要であり、通常の医薬品とは異なり、承認申請時に加えて、ロットリリースという形で有効性・安全性が全てのロットで確認されている。

ロットリリースは各国の規制当局において実施されている。安全性試験に関しては、約 50 年に渡り動物を用いた一般毒性試験が実施されてきたが、世界的な動物実験の基準理念である「3R の原則」の観点から、Replacement (代替), Reduction (削減), Refinement (改善) が求められてきた。また、人への外挿性に関しても問題があり、新規試験法の開発が望まれていた。

我々はインフルエンザワクチンおよびアジュバントの新規安全性評価法の開発を目指し、インフルエンザワクチン接種後の肺組織の遺伝子プロファイルと毒性病理的な変化を指標に、接種後 1 日目に特異的に上昇し、インフルエンザワクチンの安全性評価に資するバイオマーカー (BMs) の同定に成功してきた (Mizukami et al., *Vaccine* 2008)。これらの BMs を用い、ワクチンロットリリースに関わる一般毒性試験に代わる BMs を用いたワクチンの安全性評価法の開発が可能かを検討し、インフルエンザワクチンの安全性・品質をより高感度かつ迅速に定量化できる方法を開発した (Mizukami et al., *PLoS One* 2014)。更に粒子型インフルエンザワクチン (Virosome) の安全性についても検討し、日本では未承認の Virosome インフルエンザワクチンの安全性評価にも応用可能であることを示した (Momose et al., *PLoS One* 2015)。これらの一連の研究の成果から、毒性試験などの古典的な試験をベースに、システムバイオロジーを応用し、網羅的遺伝子発現解析と生体反応を再評価し、関連する BMs を特定することで、BMs を用いた試験、さらに in vitro の試験への置き換えが可能となることが考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では私たちの同定した BMs を用いて各種ワクチンにおいて同様に安全性が評価できるかを検証することを第一の目的とした。また、ワクチンやアジュバントの安全性評価ユニバーサルバイオマーカー (UBMs) の取得を目指し、アジュバント添加ワクチン接種後の肺組織を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うこととした。UBM が同定された場合は、私どもの開発したプラットフォームである QuantiGene Plex Gene Expression Assay (QGP 法)にて検証し、BMs による新規安全性試験法が開発可能かを検討する。さらに in vitro で BMs が上昇する細胞株の探索を行い、候補細胞株を用いた検証も実施することで、ワクチンの品質管理に応用可能な次世代安全性試験法の開発を行うことを目的とした。

これらの UBM はワクチンの作用機序において重要な役割を果たす可能性が高いので、個体レベルで機能解析を行うとともに、ワクチンの作用機序についての解析を進める。

3. 研究の方法

各種ワクチン・アジュバントを準備し、安全性評価法に用いる一般毒性試験法に準じ、マウスに 0.5mL 腹腔内接種する。接種後の体重・血液毒性等を 7 日間評価し、必要に応じ、フローサイトメトリー解析や組織学的検索を行い、末梢血及び各組織でのリンパ球サブセットの動態を明らかにする。また、それらの生理学的変化と相関して上昇する BMs について調べ、ユニバーサルバイオマーカーを明らかにすることを目的とした。また、in vitro で BMs が上昇する細胞株の探索を行い、候補細胞株で同じようにバイオマーカーで評価が可能かを検証することも目的とした。

バイオマーカーセットの遺伝子解析には Luminex® 100/200™ システムを用いて解析し、QuantiGene Plex Gene Expression Assay を用いて特別にデザインされた約 18 個のマウスバイオマーカーセットプローブ (Cxcl9, Cxcl11, Tap2, Csf1, Zbp1, Ifi47, Ifrd1, Mx2, Timp1, Psme1, Lgals3bp, Tapbp, Lgals9, Irf7, C2, Traf1d1, Psmb1) を用いて評価した。

網羅的遺伝子発現解析は、マウスの場合は、Agilent sureprint G3Mouse GE 8×60K, V2 を用いて解析した。候補細胞での検証に関しては、ヒト培養細胞での遺伝子発現解析には、Clariom S Human Array を用いた。

4. 研究成果

動物モデルにおいて検証した結果、我々の同定したバイオマーカー (Cxcl9, Cxcl11, Tap2, Csf1, Zbp1, Ifi47, Ifrd1, Mx2, Timp1, Psme1, Lgals3bp, Tapbp, Lgals9, Irf7, C2, Traf1d1, Psmb1) のいずれか数種類は、種々のアジュバント添加ワクチンに応じて発現誘導され、安全性評価に資することが明らかとなった。特に、Irf7 や Mx2, Csf1 や Timp1 は検証したアジュバントに共通して動く可能性が高いことが示唆され、あらゆるワクチンを評価できる BMs である可能性が高い。そこで、インフルエンザワクチンをモデルに有効性・安全性に関し、各種パラメータを設定して詳細に調べると、複数のバイオマーカーセットで安全性のみならず、有効性についても評価・予測可能であることが示唆された。

一方、複数の候補細胞にアジュバント・ワクチンを添加した結果、数種類の候補細胞において、BMs の上昇が確認できた。必ずしも全てのバイオマーカーが反応する訳ではないことも明らかとなった。また、アジュバントによっては、誘導はされるものの、濃度依存性が確認できないバ

バイオマーカーもあり、これらのバイオマーカーの誘導には in vivo での相互作用が必要であることが示唆された。その一方で濃度依存的に反応するバイオマーカーもわずかではあるが明らかとなり、バイオマーカーセットとしては少ないが、in vitro のスクリーニング等には応用可能ではないかと示唆された。今後、Air liquid culture 法の応用など、培養条件の検討やリンパ球との co-culture など、in vivo も模した環境が必要であることが示唆された。また、細胞種を増やして検証し、ユニバーサルバイオマーカーとして使用可能か検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Eita Sasaki, Hideki Asanuma, Haruka Momose, Keiko Furuhashi, Takuo Mizukami, Isao Hamaguchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunogenicity and Toxicity of Different Adjuvants Can Be Characterized by Profiling Lung Biomarker Genes After Nasal Immunization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.02171.	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 Eita Sasaki, Isao Hamaguchi, Takuo Mizukami	4. 巻 16(11)
2. 論文標題 Pharmacodynamic and safety considerations for influenza vaccine and adjuvant design	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.	6. 最初と最後の頁 1051-1061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/17425255.2020.1807936.	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 Eita Sasaki, Hideki Kusunoki, Haruka Momose, Keiko Furuhashi, Kazuo Hosoda, Kaori Wakamatsu, Takuo Mizukami*, Isao Hamaguchi	4. 巻 9
2. 論文標題 Changes of Urine Metabolite Profiles Are Induced by Inactivated Influenza Vaccine Inoculations in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52686-5	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 佐々木 永太, 濱口 功, 水上拓郎*	4. 巻 27
2. 論文標題 ワクチンの過去と未来（第2回） システムズバイオロジーがワクチンにもたらすもの	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 422- 427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Sasaki E., Asanuma H., Momose H., Furuhashi K., Mizukami T., Hamaguchi I.	4. 巻 17
2. 論文標題 Nasal alum-adjuvanted vaccine promotes IL-33 release from alveolar epithelial cells that elicits IgA production via type 2 immune responses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 e1009890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009890	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9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 水上 拓郎, 百瀬 暖佳, 佐々木 永太, 古畑 啓子, 楠 英樹, 浅沼 秀樹, 濱口 功
2. 発表標題 Reverse toxicologyによる新規アジュバント・スクリーニング系の開発
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水上拓郎.
2. 発表標題 システムバイオロジーによるワクチン・アジュバントの次世代評価法の開発
3. 学会等名 熊本大学平成29年度「文部科学省 地域イノベーション・エコシステム形成プログラム」有用植物×創薬システムインテグレーション拠点推進事業 特別講義(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上 拓郎, 百瀬 暖佳, 佐々木 永太, 平舘 裕希, 古畑 啓子, 佐藤 結子, 楠 英樹, 浅沼 秀樹, 濱口 功.
2. 発表標題 水上 拓郎, 百瀬 暖佳, 佐々木 永太, 平舘 裕希, 古畑 啓子, 佐藤 結子, 楠 英樹, 浅沼 秀樹, 濱口 功. ワクチン及びアジュバントの安全性に関するin vitro代替試験法の開発
3. 学会等名 第46回 日本毒性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 永太、浅沼 秀樹、百瀬 暖佳、古畑 啓子、水上 拓郎、浜口功.
2. 発表標題 遺伝子発現プロファイルを応用したワクチン・アジュバントの安全性・有効性予測 システムの構築.
3. 学会等名 第26回 日本免疫毒性学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木永太、浅沼秀樹、百瀬暖佳、古畑啓子、水上拓郎、浜口功.
2. 発表標題 アジュバント開発を目指したゲノミクス技術によるワクチン・アジュバントの 有効性・安全性プロファイル予測評価システムの開発
3. 学会等名 第11回 日本ワクチン学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizukami T.
2. 発表標題 Application of Systems Vaccinology for Evaluating the Safety of Vaccines and Adjuvants in Preclinical and Lot Release Tests.
3. 学会等名 4th Symposium on Research and Quality Control of Vaccines (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momose H, Sasaki E, Hiradate Y, Hamaguchi I, Mizukami T.
2. 発表標題 An approach to establish an in vitro evaluation assay for the safety control of influenza vaccines for batch release in Japan.
3. 学会等名 International Society of Vaccine meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上拓郎, 佐々木永太, 百瀬暖佳, 古畑啓子, 瀧口功.
2. 発表標題 システム・ワクチノロジーを応用したin vitro次世代アジュバント・ワクチン安全性評価法の開発
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mizukami T, Sasaki E, Momose H, Furuhashi K, Hamaguchi I
2. 発表標題 Systems vaccinology enable us to evaluate vaccine safety and quality in vitro.
3. 学会等名 WC11, the 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences
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