

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21614

研究課題名(和文)コンフォメーション変化による抗体産生回避機構を凌駕する次世代型組換えワクチン創成

研究課題名(英文)Development of next generation recombinant vaccines against antigens allowing conformational change for escape from antibody production

研究代表者

野阪 哲哉(Nosaka, Tetsuya)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30218309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生涯繰り返し感染するウイルスは、エンベロープ蛋白の立体構造を感染前後で大きく変化させ、中和抗体が生じにくい。RSウイルスのF蛋白のprefusion安定化DS-Cav1変異体(McLellan JS et al., Science 342, 592-598, 2013)を我々の独自開発の非増殖型ウイルスベクターBC-PIVに搭載したワクチンを作製し、ハムスターに経鼻投与したところ、血清中にRSウイルスの増殖を強く抑制する中和抗体が誘導された。変異株を含むSARS-CoV-2のスパイク蛋白のprefusion安定化変異体においても同様の結果が得られ、ワクチン作製の共通戦略となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19で明らかになったように生涯何度でも感染するウイルスが存在する。インフルエンザウイルスやRSウイルスもそうであるが、これらRNAウイルスは一般にDNAウイルスより変異しやすい。しかし、それだけが原因ではない。上記のウイルスは感染に関与するエンベロープ蛋白が感染前後で大きく立体構造を変えると特徴を有する。感染前の不安定な立体構造を安定化させる変異を導入した蛋白を抗原として用いることによって効率よく中和抗体が誘導されることが今回明らかになった。このことは、今後の振興・再興感染症のパンデミック対策として有効なワクチンを迅速に作製することにおいて大いに役立つと思われる。

研究成果の概要(英文)：Recurrently infectious viruses such as RSV escape from neutralizing antibody production through conformational change of the envelope protein upon infection. We have generated an intranasal vaccine expressing the prefusion-stabilized DS-Cav1 mutant (McLellan JS et al., Science 342, 592-598, 2013) of RSV F protein, by using a replication-defective BC-PIV vector which we developed. BC-PIV/DS-Cav1 efficiently induced the neutralizing antibody in the sera after intranasal immunization of hamsters. Similarly, BC-PIV expressing the prefusion-stabilized spike protein of SARS-CoV-2 including various variant strains efficiently induced the neutralizing antibody production upon intranasal immunization of hamsters. Thus it is possible that this strategy can be applicable to any enveloped virus showing conformational change of the surface protein upon infection to overcome the common escape machinery from neutralizing antibody production.

研究分野：ウイルス学、免疫学、分子生物学

キーワード：遺伝子組換えワクチン RSウイルス プレフュージョン型 中和抗体 hPIV2 SARS-CoV-2 新型コロナウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

COVID-19 は人類を約 3 年間にわたり大きな混乱に陥れ、多くの命を奪った。繰り返し感染するウイルスが存在することは専門家の間では周知の事実であったが、一般社会ではウイルス疾患に一度罹ると、再度の感染は起こりにくいと考えられがちである。その常識を覆したのが SARS-CoV-2 であり、この新規ウイルスに対して当初著効を示したのが BioNTech (Pfizer) と Moderna の mRNA ワクチンであった。彼らのワクチンの設計図にはある工夫がなされていた。全長の spike 蛋白の 986、987 番目のアミノ酸を Proline に置き換える 2P 変異 (K986P、V987P) が導入されていたのである。実は 2P 変異が Spike 蛋白を prefusion 状態で安定化させることは知られており (Wrapp, D., et al., Science 367, 1260-1263, 2020)、近縁ウイルス MERS-CoV の spike 蛋白に対するワクチンにおいても 2P 変異 (V1060P、L1061P) が有効であることは報告済みであった (Pallesen, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 114, E7348-E7357, 2017)。今回の COVID-19 ワクチンの中で有効性が高かったものは大半が spike 蛋白に 2P 変異が導入されており、野生型を用いたものは効果が劣るものが多かった。この現象は RS ウイルスでは以前から問題になっており、特にホルマリンで不活化した RSV 全粒子ワクチンでは過去に乳児で死亡例が生じている。ホルマリン処理により F 蛋白が postfusion 型に変換した結果、中和活性のない抗体が主に産生され、RSV が感染した際に防御されるどころか逆に ERD (Enhanced Respiratory Disease) が生じたことが原因と言われている。RS ウイルスのワクチンは 60 年近く実用化されたものがなかったが、2023 年 5 月に、GSK 社の Arexvy (prefusion 型の遺伝子組換え RS ウイルス F 蛋白抗原と、AS01E アジュバントを組み合わせたもの) が世界初の RSV ワクチン (高齢者向け) として米国 FDA に承認された。しかし、免疫が未熟な乳児に対する有効な RSV ワクチンは未だ存在せず、開発途上国を中心に RSV で命を落とす例が後を絶たない。RSV もコロナウイルス同様、生涯何度でもヒトに感染する。

我々は、繰り返し感染するウイルスは、ウイルス感染の前後で不安定な prefusion 型から安定な postfusion 型に立体構造を劇的に変化させる (図 1) ことによって、中和活性のある、prefusion 型抗原に対する抗体が作られにくくなっているという仮説を立てた。

感染前後における RSV F 蛋白のコンフォメーション変化

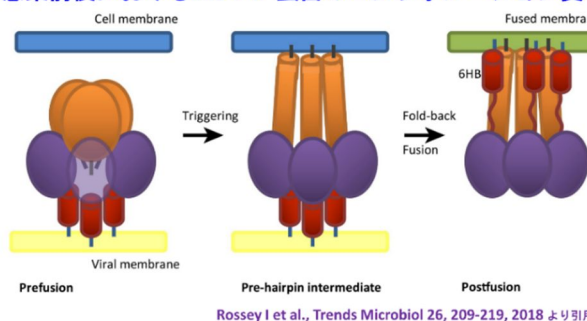


図1

2. 研究の目的

我々は、地元発祥のバイオベンチャー企業であるバイオコモ (株) と共同で、健常成人にはほとんど病原性を示さず、生涯繰り返し感染するヒトパラインフルエンザ2型ウイルス (hPIV2) に由来する非増殖型ベクター BC-PIVを開発した (日米中で特許成立済み)。BC-PIV は、ヒト樹状細胞において、代表的なウイルスベクターである通常のレトロウイルスベクターの約100倍の遺伝子発現能を有する (Hara K et al., Hum Gene Ther 24, 683-691, 2013)。

本研究は、BC-PIV をベースに、RSV prefusion F 蛋白に対する遺伝子組換えワクチンを創成し、感染前後でのコンフォメーション変化により宿主による中和抗体産生を回避しているウイルスに対するプラットフォーム的な予防ストラテジーを確立し、様々なアンメットメディカルニーズに対処する礎を築くことが目的である。

3. 研究の方法

BC-PIVプラットフォーム技術

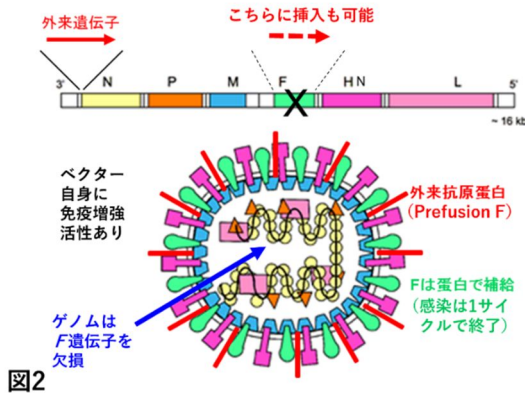


図2

BC-PIVへのpre-fusion F変異体の取込み

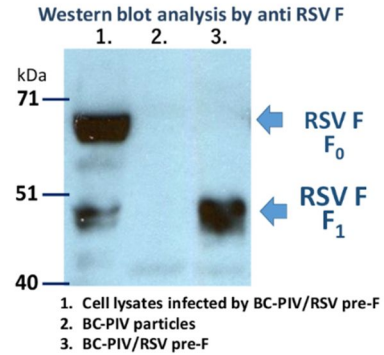


図3

斬新かつ有効・安全な次世代型遺伝子組換えワクチンを作製するため、BC-PIV ベクターを基盤としたプラットフォーム技術に基づき、下記要項を満たす開発物の作出計画を立てた(図2)。

- 1) hPIV2 F 遺伝子欠損による完全非増殖型の生ワクチン (不活化ワクチンの注射では細胞性免疫、粘膜免疫はほとんど誘導されない)
- 2) 導入抗原は最初からベクター粒子上に蛋白として搭載 (宿主に感染後翻訳、産生される通常型では免疫機構により排除される機会が増える)
- 3) 変異導入により抗原の立体構造を感染前の状態で安定化し、当該微生物に対する適格な中和抗体を誘導 (野生型では感染前後、或いは不活化前後でコンフォメーションが大きく変わり、有効な中和抗体が誘導できないことがしばしば起こる)
- 4) 遺伝子発現能が最強かつ宿主染色体には組み込まれない RNA ウイルスのベクター化
- 5) ワクチンの基本となるベクターを増幅するための安定したパッケージング細胞が存在
- 6) 自身に対する中和抗体が誘導されにくいウイルスをベクター骨格として使用
- 7) ベクターのエンベロープを介して感染し、感染は1サイクルで完結 (搭載する外来抗原を介した感染の必要性をなくす)

我々は予備的な実験において prefusion 構造の安定化のために点突然変異 (S155C-S290C) を導入した RSV prefusion 型 F 蛋白遺伝子を BC-PIV に搭載し、感染細胞に安定発現させるのみならず、組換えウイルスの表面にも同蛋白を搭載することに成功した(図3)。BC-PIV は皮下、筋肉内投与に加えて経鼻感染も可能であり、ベクター自体に対する抗体もできにくいいため、RSV ワクチン用ベクターとして理想的である。本申請では prefusion 型 F 蛋白をさらに安定化させる変異 (McLellan JS et al., Science 342, 592-598, 2013) を導入し(図4)、当該抗原・遺伝子を BC-PIV に搭載したワクチンを作製、生化学的に解析後、RSV 感染を阻止する活性があるか否か、GFP 発現 RSV とマウスを用いた動物実験で検証する。感染防御実験は共同研究先でもあり、RSV 研究で最先端を走るドイツの Fraunhofer 研究所に委託した。

4. 研究成果

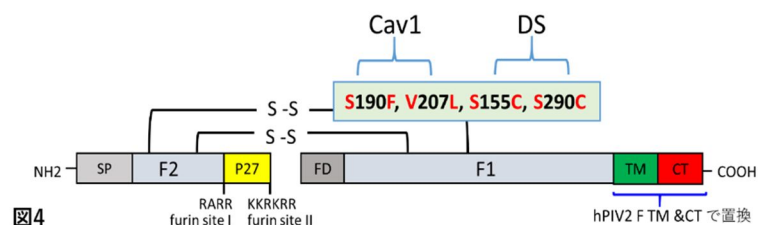


図4

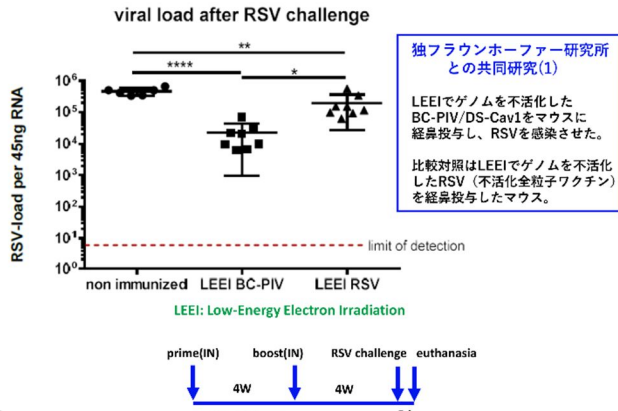


図5 ゲノム不活化BC-PIV/DS-Cav1経鼻投与マウスにおけるRSV中和抗体

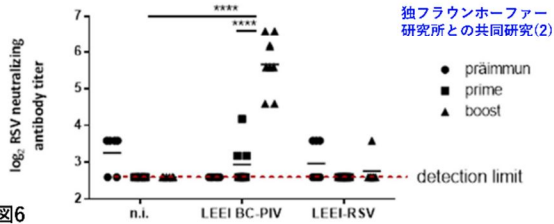


図6

Irradiationによる不活化)よりも強いRSV増殖抑制効果が観察された。マウスでは細胞性免疫の効果が低いことが想定されるので、DS-Cav1変異体F蛋白がBC-PIVエンベロープ上で prefusion 型として安定化し、中和抗体を誘導したことが示唆される。実際、HEp-2細胞を用いた plaque assay では、マウス血清中に GFP 発現 RSV の増殖を抑制する活性が観察され、この活性は2回の経鼻投与でより顕著であった(図6)。

次に、BC-PIVの転写が活発なハムスターを用いてBC-PIV/DS-Cav1の投与実験を行った。今回はBC-PIVの不活化処理は行っておらず、非増殖型の生ワクチンとしての効果を見た。結果は、素晴らしいもので、BC-PIV/DS-Cav1は強力な抗体誘導効果を示した(図7)。さらに、このハムスター血清中に中和活性があるか否かを同じくHEp-2細胞とGFP発現RSVを用いた plaque assayにより解析したところ、コントロールのBC-PIV/EGFPを2回経鼻投与したハムスター(n=5)と比較して、BC-PIV/DS-Cav1を2回経鼻投与(1×10⁸ TCID₅₀/匹)したハムスター(n=5)では200倍希釈でも有意差(p<0.001)のある中和活性が検出された(札幌医大 小笠原 徳子博士らとの共同研究)。さらに、ワクチン投与ハムスターにRSVを感染させるチャレンジ試験も本学で行ったが、同実験ではRSVのハムスターへの感染効率が極端に悪く、コントロールベクター投与群でもRSV感染後に肺炎を起こさず、RSVも検出されなかったことから、再実験を行うことになった。現在、RSVのハムスターへの感染手技、ウイルス投与量などを鋭意検討中である。

第二番目に仮説を実証するために用いたウイルスは、本課題の研究期間中にちょうど一致してパンデミックになったSARS-CoV-2である。前述の通り、同ウイルスのspike蛋白を用いて2P変異による prefusion 安定化抗原を免疫原として研究を行った(図8)。S-2Pが2P変異を持つspike全長であり、BioNTech(Pfizer)とModerna社が用いたmRNAワクチンと遺伝子配列は結果的に全く同じであった。S-2PMは、それをさらに改変し、spike蛋白の膜貫通・細胞質内ドメインをhPIV2 F蛋白の同領域で置換したもので、より安定してBC-PIV上に搭載されやすくなったものである。結果として、このS-2PM型が最も安定してSARS-CoV-2受容体であるヒトACE2に結合したため、BC-PIV/S-2PMを以後の実験に用いた。同ワクチンをハムスターに1回経鼻投与したところ、SARS-CoV-2の肺での増殖を完全に抑えた。2回経鼻投与すれば鼻甲介でのウイルスの増殖もほぼ完全に抑え、動物実験モデルでは最も有効性の高いワクチンの一つと考えられ

最初にGFP発現RSVとマウスを用いて実験した。マウスではhPIV2、すなわちBC-PIVはほとんど転写されないため、ベクター上に搭載された抗原蛋白による効果を主に判定できる。図5に示した通り、BC-PIV/DS-Cav1の2回の経鼻投与でRSV全粒子ワクチン(LEEI: Low-Energy Electron

ハムスターへの経鼻投与後の血清を用いたELISA

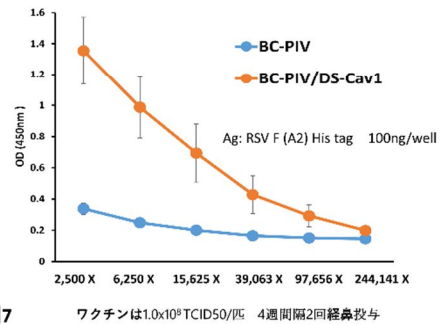
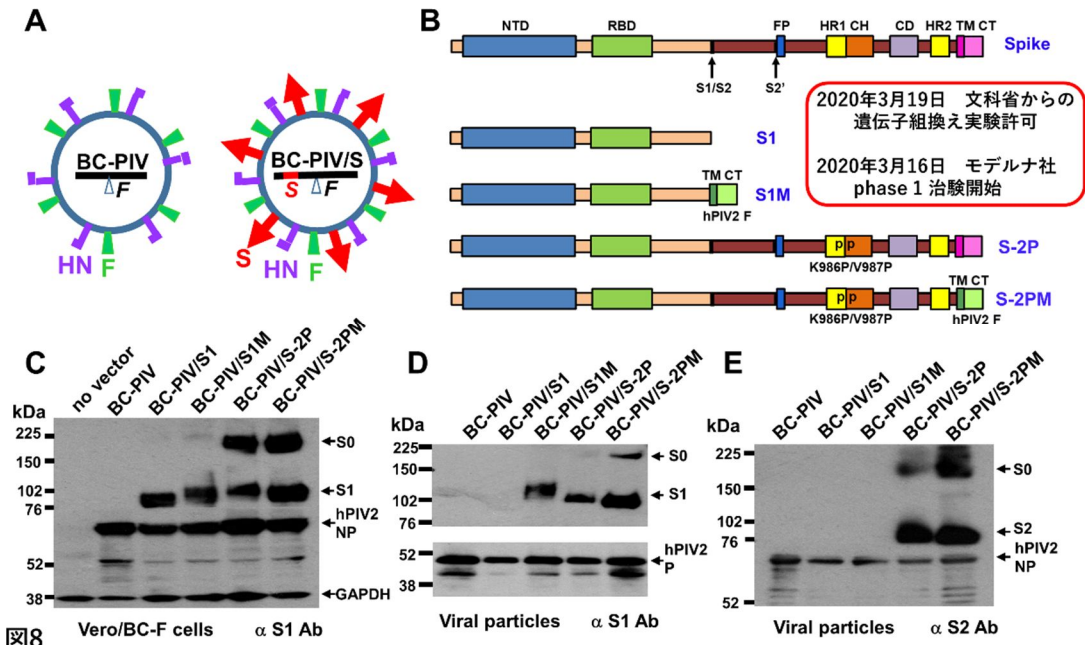


図7

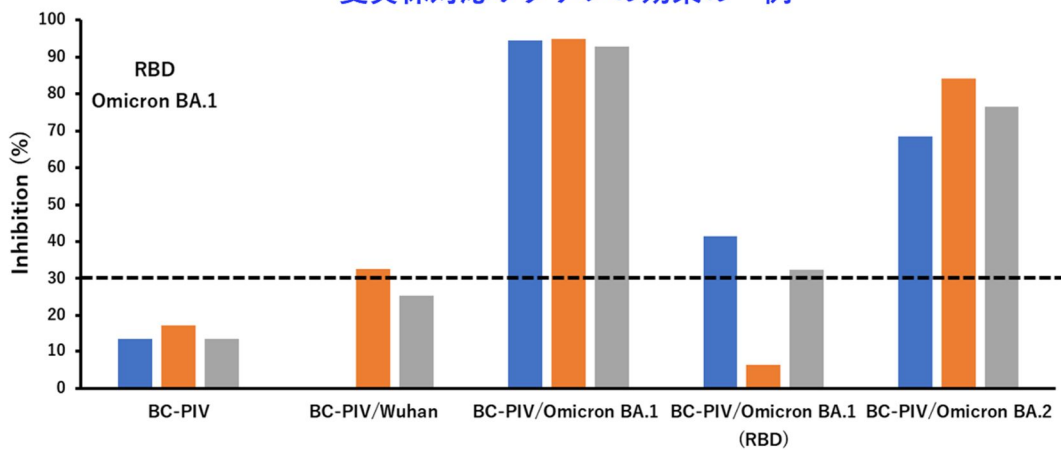


た（東大医科研 河岡義裕博士らとの共同研究）(Ohtsuka J., et al., iScience 24, 103379, 2021)。ヒトへの実用化面では、我々は製造システムを確立していなかったために、COVID-19 ワクチンレースでは海外のグループの後塵を拝したが、2023年4月よりAMED（SCARDA）のワクチン・新規モダリティ研究開発事業の支援を受け、RSV ワクチンでの社会実装を進めている。

BC-PIV を用いた我々の遺伝子組換えワクチン作製プラットフォーム技術は、遺伝子配列がわかれば、約3週間でワクチン候補を作出できるので、SARS-CoV-2 に関しては、Wuhan 型のみならず、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 κ 、 λ 、 \omicron (BA.1)、 \omicron (BA.2) 型 spike 蛋白に対するワクチンも作製し、変異株対応中和抗体アッセイキット（GeneScript 社 cPass kit）を用いて有効性を確認した（図9）。

以上、RSV F 蛋白、SARS-CoV-2 spike 蛋白（変異型を含む）遺伝子を用いて prefusion 安定化蛋白として発現すべく、遺伝子/蛋白同時搭載型ウイルスベクターを介して経鼻投与すれば適切な中和抗体を誘導できることが実証され、こうした抗原の立体構造に基づいたワクチンデザインを行うことにより、コンフォメーション変化による抗体産生回避機構を凌駕する次世代型組換えワクチンの創成が可能であることを実証することができた。

変異株対応ワクチンの効果の一例



- BC-PIV/Omicron BA.1 >>> BC-PIV/Omicron BA.1(RBD)
→ 全長の方が圧倒的に効果が高い
- BC-PIV/Omicron BA.1 > BC-PIV/Omicron BA.2
- BC-PIV/Omicron BA.2でも高い中和抗体価が誘導

図9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 野阪哲哉	4. 巻 54 (Suppl)
2. 論文標題 新型コロナウイルスに対する次世代型鼻スプレーワクチン開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 脳と発達	6. 最初と最後の頁 S89
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 Ohtsuka J, Imai M, Fukumura M, Maeda M, Eguchi A, Ono R, Maemura T, Ito M, Yamayoshi S, Kataoka Y, Kawaoka Y, Nosaka T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Non-propagative human parainfluenza virus type 2 nasal vaccine robustly protects the upper and lower airways against SARS-CoV-2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103379	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 D'Alessandro-Gabazza CN, Yasuma T, Kobayashi T, Toda M, Abdel-Hamid AM, Fujimoto H, Hataji O, Nakahara H, Takeshita A, Nishihama K, Okano T, Saiki H, Okano Y, Tomaru A, D'Alessandro VF, Shiraishi M, Mizoguchi A, Ono R, Ohtsuka J, Fukumura M, Nosaka T, et al. and Gabazza EC.	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-29064-3	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 Sawaki A, Miyazaki K, Yamaguchi M, Takeuchi T, Kobayashi K, Imai H, Tawara I, Ono R, Nosaka T, Katayama N.	4. 巻 111
2. 論文標題 Genetic polymorphisms and vincristine-induced peripheral neuropathy in patients treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 686-691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02832-x	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 Ono R, Masuya M, Inoue N, Shinmei M, Ishii S, Maegawa Y, Maharjan BD, Katayama N, Nosaka T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Tet1 is not required for myeloid leukemogenesis by MLL-ENL in novel mouse models.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248425	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 小笠良一、野阪哲哉.	4. 巻 78 増刊号3
2. 論文標題 血液腫瘍モデル動物の現状と展望. In: 金倉謙 編集. 造血器腫瘍学 (第2版) - 基礎と臨床の最新研究動向 - . II. 造血器腫瘍の基礎	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 152-158
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 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野阪哲哉
2. 発表標題 新型コロナウイルスに対する次世代型鼻スプレーワクチン開発
3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野阪哲哉、福村正之、大塚順平
2. 発表標題 ワクチン開発と今後の課題
3. 学会等名 第31回日本産業衛生学会全国協議会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryoichi Ono, Masahiro Masuya, Makoto Shinmei, Satomi Ishii, Yuri Maegawa, Bishnu Devi Maharjan, Naoyuki Katayama, Tetsuya Nosaka.
2. 発表標題 Tet1 is not necessarily essential for MLL-ENL-induced myeloid leukemia.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 SARS-CoV-2 vaccine	発明者 野阪、小埜、河岡、 今井、山吉、福村、 大塚	権利者 三重大学、東京 大学、バイオコ モ株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/J P2021/26368	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>三重大学大学院医学系研究科 感染症制御医学・分子遺伝学分野 https://www.medic.mie-u.ac.jp/microbiol/ 三重大学卓越型研究施設 次世代型VLPワクチン研究開発センター https://www.mie-u.ac.jp/research/vlp-vakzin/</p>

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		
ドイツ	フラウンホーファー研究所		