

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19681

研究課題名（和文）新型コロナウイルスの感染予防抗体を誘導する次世代の非増殖型組換え生ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a replication-deficient recombinant virus vaccine to induce neutralizing antibody against SARS-CoV-2.

研究代表者

内藤 忠相（NAITO, TADASUKE）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50455937

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）：新型コロナウイルスSARS-CoV-2の感染予防に資する副作用が少ない新規組換えワクチンの開発を試みる。SARS-CoV-2の細胞内侵入は、スパイク蛋白質がACE2受容体と結合して開始する。一方で、宿主免疫はスパイク蛋白質を抗原とした中和抗体を誘導するため、スパイク蛋白質が感染予防ワクチンの成分となる。本研究では、感染性は失活しているが免疫原性を保持するSARS-CoV-2の変異型スパイク抗原の単離を試みた。SARS-CoV-2の感染成立に必須なスパイク蛋白質による細胞融合活性を指標にスクリーニング解析を行った結果、感染性が失活する可能性が高い単一アミノ酸変異型スパイク蛋白質の単離に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスワクチンの主流となっているmRNAワクチンは、接種後の数日間は免疫力が低下するなどの副作用が問題となっており、より安全性が高い効果的なワクチンの開発が求められている。本研究では、SARS-CoV-2のワクチン抗原となるスパイク蛋白質において、病原性発現に関与する機能を低下させる単一アミノ酸変異部位の同定に成功した。今後は、変異スパイク蛋白質を搭載する組換えウイルスを作製して免疫原性を調べることで、有効かつ副反応が軽い新規ワクチンの開発に展開する。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a novel recombinant virus vaccine with fewer side effects for prevention of SARS-CoV-2 infection, we attempted to isolate a mutant spike antigen of SARS-CoV-2 that retains immunogenicity but lost infectivity. SARS-CoV-2 encodes a surface glycoprotein, spike, which binds to the ACE2 receptor and mediated viral entry. The spike protein not only mediates viral entry but also triggers the host immune response to produce anti-spike neutralizing antibodies. As a result of screening analysis using spike-mediated cell-cell membrane fusion assay, we succeeded in isolation of a single amino acid mutation targeting the receptor binding motif of spike protein, which is highly likely to inactivate SARS-CoV-2 infectivity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：新型コロナウイルス 弱毒生ワクチン 組換えウイルスワクチン 中和抗体 細胞融合

### 1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の世界的な大流行の結果、ヒト体内における増殖に馴化した抗原変異株が出現し、それら変異株に起因する新型コロナウイルス感染症の再燃が問題となっている。市中で次々と新規の抗原変異株が流行する現況においては、特定の SARS-CoV-2 株のみに感染予防効果を示すワクチンの接種では公衆衛生対策として万全ではない。SARS-CoV-2 ワクチンの主流となっている mRNA ワクチンに関しても、接種後の数日間は免疫力が低下するなどの副作用が問題となっており、より安全性が高い効果的なワクチンの開発が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、SARS-CoV-2 の感染予防に有効性を示し、かつ安全性に優れた組換えウイルスワクチンの開発を試みる。具体的には、「感染性は失活しているが免疫原性を保持する SARS-CoV-2 の変異型スパイク抗原」をスクリーニングした後、組換えワクチンの母体株として安全性が確保済みの水疱性口内炎ウイルス (VSV: Vesicular stomatitis virus) に搭載させることで、弱毒生ワクチンと不活化ワクチンの長所を備えた非増殖型の新規組換え SARS-CoV-2 ワクチンを創出する (図 1)。

本研究で単離を目指す「細胞受容体 ACE2 非結合性かつ中和抗体を誘導可能な変異型スパイク蛋白質」を抗原とする組換えウイルスワクチンについては、現時点で国内外から報告例はない。今後、人類に甚大な感染被害をもたらす新規病原体が出現した際、感染予防対策の 1 つとして本研究のアイデアを応用した組換えワクチンのシステムが活用できるよう基礎研究に取り組む。

### 3. 研究の方法

本研究では、スパイク蛋白質の抗原変異および細胞融合活性に関与するアミノ酸部位を網羅的に同定し、非増殖型の組換え SARS-CoV-2 ワクチンに応用可能なウイルス抗原のスクリーニング解析を行う。SARS-CoV-2 粒子表面に発現するスパイク蛋白質は、ACE2 と結合してウイルス粒子と細胞の膜融合を起こす事で感染を成立させ、かつ SARS-CoV-2 の感染を抑制する中和抗体の標的抗原となる (図 2)。

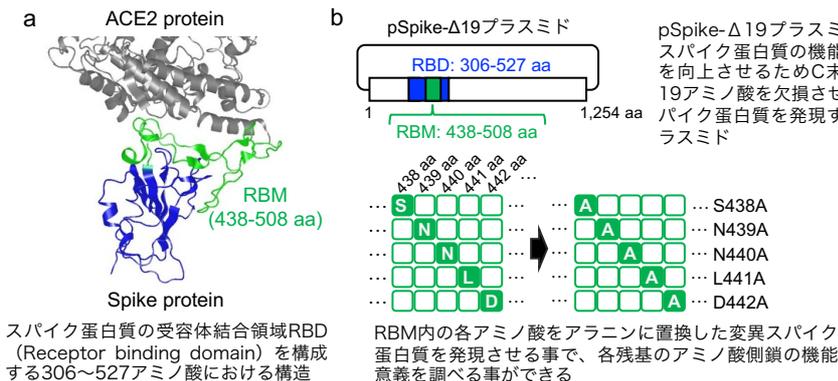
そこで、SARS-CoV-2 武漢株に由来するスパイク蛋白質の受容体結合領域における受容体結合モチーフ (RBM: Receptor binding motif) の各残基 (438~508 アミノ酸) をアラニンに置換した変異スパイク蛋白質の発現プラスミドライブラリーを作製して培養細胞に導入し、スパイク蛋白質発現に依存した細胞融合活性が促進または抑制する変異部位を探索した (図 3: a and b)。



図2 SARS-CoV-2 粒子の細胞内侵入機序



図3 スパイク蛋白質と受容体ACE2の3次元構造およびアラニンスキニング変異導入法

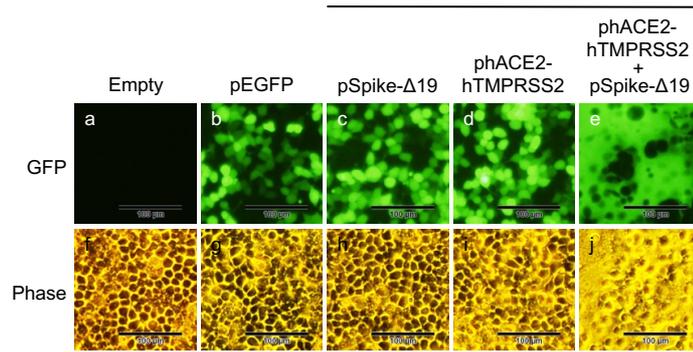


#### 4. 研究成果

培養細胞 293T および蛋白質発現プラスミドを用いて、スパイク蛋白質の細胞融合活性を評価した(図4)。武漢株に由来するスパイク蛋白質発現プラスミド(pSpike-Δ19: スパイク蛋白質の機能発現を向上させるためにC末端領域の19アミノ酸を欠損させている)およびACE2とTMPRSS2を発現するプラスミド(phACE2-hTMPRSS2)を細胞に共導入することにより、個々の細胞が融合した巨細胞が形成された(図4:e and j)。細胞融合の様子はEGFP発現プラスミドの共導入により視覚化した。

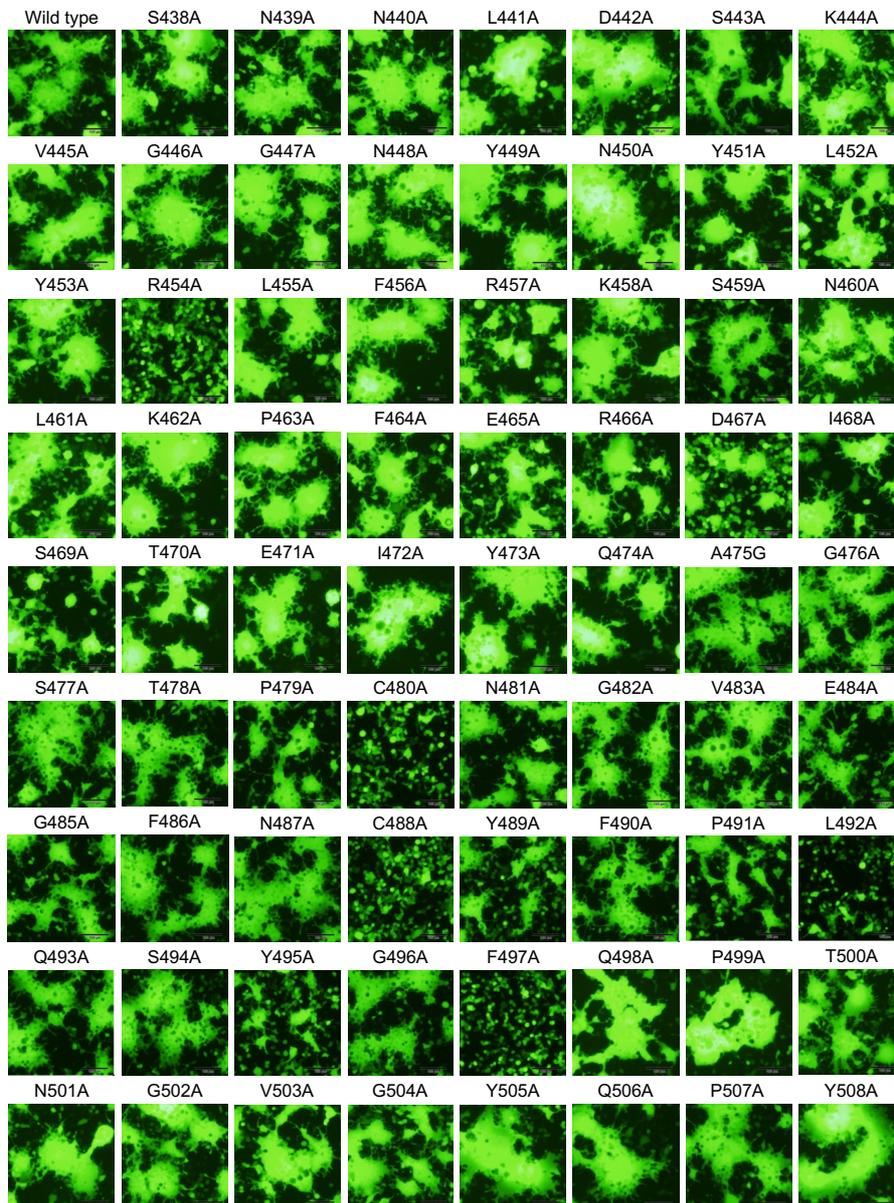
続いて、スパイク蛋白質のRBMを構成する各アミノ酸残基をアラニンに置換した71種類の変異スパイク蛋白質発現プラスミドを用いて細胞融合活性を制御するアミノ酸部位を探索した結果、454番目のArg残基(R)、480番目と488番目のCys残基(C)、492番目のLeu残基(L)および497番目のPhe残基(F)をAla残基(A)に置換する事で巨細胞の形成が抑制された(図5:R454A, C480A, C488A, L492A, F497A)。また、それら5種類の変異型スパイク蛋白質は、膜融合活性の促進に必須である宿主プロテアーゼの切断を受けないことが示唆された。今回に見出した

図4 スパイク蛋白質発現が誘導する細胞融合活性の評価系



293T細胞に各種プラスミドを導入した後、48時間後における細胞の様子を位相差蛍光顕微鏡を用いて観察した

図5 細胞融合活性を制御するスパイク蛋白質におけるアミノ酸残基の探索



293T細胞に変異スパイク蛋白質発現プラスミドを導入した後、48時間後における細胞の様子を位相差蛍光顕微鏡を用いて観察した

スパイク蛋白質の細胞融合活性を制御するアミノ酸残基は、オミクロン株の RBM において保存されていた一方で、ACE2 受容体との直接的な相互作用に関与するアミノ酸には含まれていなかった (図 6) (文献①)。すなわち、R454、C480、C488、L492 および F497 の各残基はスパイク蛋白質の機能維持のために不変的なアミノ酸である事が示唆され、先行研究においても各残基の機能意義が報告されている (図 7) (文献② R454:文献③ C480/C488:文献④ L492:文献⑤ F497)。

図6 スパイク蛋白質のRBM配列

```

武漢株  SNNLDSKVGoGGNoYNYLYoRoLFRKSNLKPoPPERDISTEIQoAGSTPoCoNGVEGFNoCoYFPoIoQSYGoFoQPTNGVGYQPY
          ** ***** *****
オミクロン株  SNKLDoSKVSGNoYNYLYRLFRKSNLKPoPPERDISTEIQoAGNKPCNGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQPY
(B.1.1.529 lineage)
  
```

武漢株とオミクロン株のRBM配列の比較し、両株で保存されているアミノ酸を\*表記した。  
 本研究結果により細胞融合活性を制御するアミノ酸残基として示唆された5種を黄色ハイライト表記した。  
 ACE2と直接的に相互作用するアミノ酸残基を黒丸で表記した。

加えて、オミクロン株由来のスパイク蛋白質の細胞融合活性を調べた結果、武漢株由来のスパイク蛋白質の発現時に認められた著しい巨細胞形成は誘導されない事が示唆された (図 8:b and e)。一方で、オミクロン株由来の RBM を武漢株由来の RBM と入れ替えたキメラ蛋白質 (Spike chimera) を発現するプラスミドを構築して同様に細胞融合活性を評価した結果、Spike chimera 蛋白質の発現によって巨細胞の形成が認められた事から、オミクロン株由来の RBM には細胞融合を誘導する機能が備わっている事が示唆された (図 8:c and f)。以上の結果からオミクロン株由来のスパイク蛋白質においては、RBM 以外の構造領域が細胞融合活性の制御に強く関与する事が明らかとなった。

今後、単離した武漢株由来のスパイク蛋白質の各変異体を搭載する組換え VSV を作製して免疫原性を調べることで、有効性が高くかつ副作用が軽い新規 SARS-CoV-2 ワクチンの開発に展開する予定である。さらに、SARS-CoV-2 現流行株のスパイク蛋白質の RBM に本研究で明らかになったアミノ酸変異を導入する事で、現流行株の感染を予防する有効性の高いワクチン抗原として機能するかどうかを検討する。

図7 細胞融合活性を制御するスパイク蛋白質のアミノ酸部位

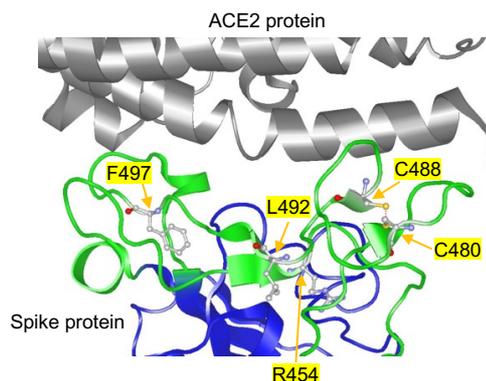
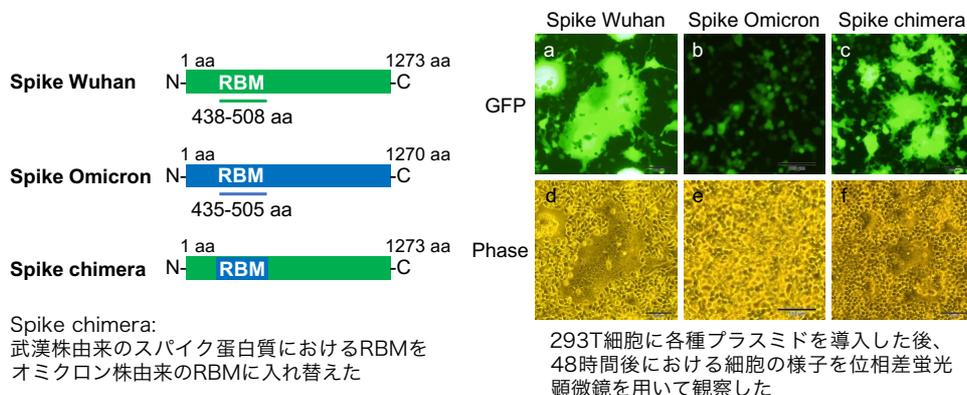


図8 オミクロン株由来のRBMが関与する細胞融合活性の評価



〈引用文献〉

- ① Jun Lan, *et al.*, Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor, Nature, 2020.
- ② Zi-Sin Yang, *et al.*, Targeting the receptor binding domain and heparan sulfate binding for antiviral drug development against SARS-CoV-2 variants, Sci Rep, 2024.
- ③ Yunlong Shi, *et al.*, Thiol-based chemical probes exhibit antiviral activity against SARS-CoV-2 via allosteric disulfide disruption in the spike glycoprotein, Proc Natl Acad Sci USA, 2022.
- ④ Joyanta Kumar Saha and Md. Jahir Raihan, The binding mechanism of ivermectin and levosalbutamol with spike protein of SARS-CoV-2, Struct Chem, 2021.
- ⑤ Hocheol Lim, *et al.*, Hot spot profiles of SARS-CoV-2 and human ACE2 receptor protein interaction obtained by density functional tight binding fragment molecular orbital method, Sci Rep, 2020.

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miura Michi, Kiuchi Naho, Lau Siu-Ying, Mok Bobo Wing-Yee, Ushirogawa Hiroshi, Naito Tadasuke, Chen Honglin, Saito Mineki	4. 巻 -
2. 論文標題 A statistical framework for quantifying the nuclear export rate of influenza viral mRNAs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.88468.1	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 Miura Michi, Naito Tadasuke, Saito Mineki	4. 巻 9
2. 論文標題 Current Perspectives in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection and Its Associated Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 867478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmed.2022.867478	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 Mori Kotaro, Ohniwa Ryosuke L., Takizawa Naoki, Naito Tadasuke, Saito Mineki	4. 巻 95
2. 論文標題 Development of a Genetically Stable Live Attenuated Influenza Vaccine Strain Using an Engineered High-Fidelity Viral Polymerase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00493-21	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤忠相、後川潤、齊藤峰輝
2. 発表標題 遺伝的安定性に優れた弱毒生インフルエンザワクチンの開発
3. 学会等名 第37回中国四国ウイルス研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学微生物学教室ホームページ  
<https://m.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/>

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