

PRESS RELEASE

## **RSV 経鼻ワクチン実用化へ向けての第一歩**

### **RSV 疎水性低分子タンパク質エクトドメイン抗原を含むカチオン化ナノゲル経鼻ワクチンは防御免疫を誘導する**

#### **Cationic-nanogel nasal vaccine containing the ectodomain of RSV-small hydrophobic protein induces protective immunity in rodents**

本研究成果は、2023年7月24日に科学誌「NPJ Vaccines」(オンライン)に掲載されました。

##### **【概要】**

Respiratory syncytial virus (RSV)は、特に小児および高齢者における上気道および下気道感染症の主な原因であり、臨床現場では問題になっています。RSVの主要な膜貫通表面タンパク質(タンパク質 F および G)を含むさまざまなワクチンが研究開発されていますが、ワクチン増強疾患(Vaccine-Enhanced Disease, VED)リスクの可能性など課題が山積みでした。その中で、最近、米国ではFタンパク質ベースの注射型ワクチンが高齢者向けに認可になり、発症と重症化の予防が期待されています。一方で、このワクチンは注射によって投与されており、RSV 侵入門戸の呼吸器粘膜での感染阻止は難しいと考えられます。そこで、本研究では、RSV 感染阻止を目指した経鼻ワクチン開発に向けて、実験動物を使った研究開発を実施しました。ワクチン候補抗原としては、VED 回避を考慮し RSV 膜貫通表面タンパク質でもある疎水性低分子タンパク質のエクトドメイン(SHe)を選択し、その免疫誘導効果を増強する為に、キャリアタンパク質として肺炎球菌由来表面タンパク質 A (PspA) に結合させたキメラ蛋白抗原(SHe-PspA)をデザインしました。次に、我々が別途開発した鼻腔粘膜指向性と付着性を有するカチオン性コレステリル基含有プルラン(cCHP)ナノゲル内に、SHe-PspA を封入して製剤化し(cCHP-[SHe-PspA])、マウスとコトンラットに経鼻免疫しました。cCHP-[SHe-PspA]の経鼻投与は、SHe 特異的粘膜 IgA 抗体と血清 IgG 抗体の両者を誘導し、VED を誘導することなく上気道と下気道の両方で RSV の侵入を防ぎました。さらに、経鼻免疫は、注射投与よりも上気道での RSV に対する防御免疫効果が高い事が示唆されました。さらに、経鼻免疫で誘導される粘膜 RSV 特異的 IgA 応答が、気道上皮でのウイルス除去において重要である事も示唆されました。このように、カチオン性ナノゲル型 RSV 経鼻ワクチンは気道粘膜における RSV 感染に対する効果的な防御を誘導し、有望なワクチン候補として期待されます。

## 【研究成果】

### 1. SHe 抗原の設計と合成

本研究では経鼻ワクチン抗原として、RSV サブタイプ A の SH タンパク質のエクトドメインペプチド配列 (SHe) を使用しました。ワクチン候補抗原は、SHe 抗原の免疫原性増強を図る為に、キャリアタンパク質として肺炎球菌表面タンパク質 A (PspA) を用いてキメラ蛋白抗原 (SHe-PspA) をデザインしました。SHe-PspA 抗原は cCHP ナノゲルと 1:1 の抗原:ナノゲルモル比で調製し (図 1、アジュバント候補の cyclic-di-AMP(cdAMP)の存在または非存在下で経鼻免疫試験を実施しました。

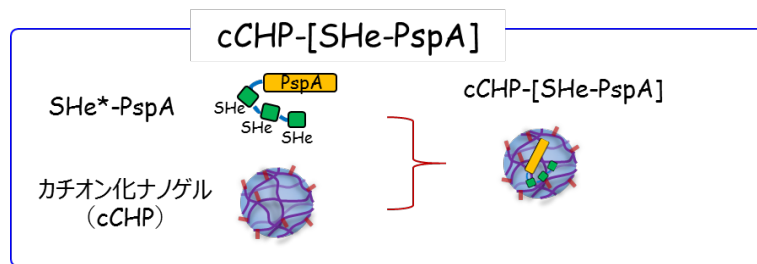


図 1 : cCHP-[SHe-PspA]の作製

### 2. cCHP-[SHe-PspA]による経鼻免疫は、全身系と粘膜表面両方に SHe 特異的免疫応答を誘導する

cCHP に SHe-PspA 抗原を封入した経鼻ワクチン(cCHP-[SHe-PspA])をマウスに接種しました。比較対照する為に PBS (非免疫)、SHe-PspA 単独、cCHP-[SHe-PspA]、cCHP-[SHe-PspA] + cdAMP の 4 群を設定し、経鼻免疫したマウスから採取した血清、鼻洗浄液、気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の SHe 特異的抗体価を測定しました。さらに、注射投与との比較をする為に、SHe-PspA と不完全フロイントアジュバント(IFA)または SHe-PspA のみで腹腔内免疫したマウスから採取したサンプルの抗体価を測定し、経鼻接種群と比較しました。

その結果、新たに開発した cCHP ベースの cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンが、マウスにおいて SHe 特異的粘膜 IgA および全身性 IgG 抗体応答の両方を誘導することが明らかになりました。さらに、経鼻アジュバントとして cdAMP を添加することで、有意に高い抗体価が誘導されました。一方で、注射投与群では、SHe 特異的 IgA 抗体は、気道粘膜面に誘導出来ませんでした。この結果は、経鼻ワクチンの有用性を示唆しています。さらに、cCHP-[SHe-PspA]とアジュバントを併用した経鼻免疫群では、SHe-PspA と IFA を併用し注射接種したマウスで誘導された SHe 特異的 IgG 抗体価と同レベルの抗体が検出されました。つまり、この結果は経鼻投与でも、注射投与と同レベルの全身免疫が誘導出来る事を示しました。また、T 細胞応答を調べたところ、cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンを接種したマウスの肺、頸部リンパ節、脾臓において、グランザイム B またはインターフェロン(IFN)- $\gamma$  産生抗原特異的 T 細胞が誘導されており、RSV に対して抗体による液性免疫だけではなく、細胞性免疫も誘導されている事が示唆されました。

### 3. cCHP-[SHe-PspA]による経鼻免疫は RSV 感染に対する防御免疫を誘導する

cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンにより誘導された抗原特異的免疫が、上気道および下気道の感染防御に役立っているかを評価するために、マウスを PBS、cCHP-[SHe-PspA]、または cCHP-[SHe-PspA]+cdAMP で経鼻免疫し、その後 RSV 感染試験を実施しました。また、注射投与との比較をする為に、SHe-PspA+IFA を用いた腹腔内免疫マウスにも RSV を感染させました。RSV 感染によって引き起こされる組織損傷の主要な部位である肺において、ウイルス量を調べた結果、cCHP-[SHe-PspA] 経鼻免疫マウスは、非免疫マウスと比較してウイルス価が有意に低くなっていました(図. 2 左上)。同じ傾向は注射投与群でも認められ、今回デザインした SHe-PspA キメラ蛋白のワクチン候補としての有用性を示しました。

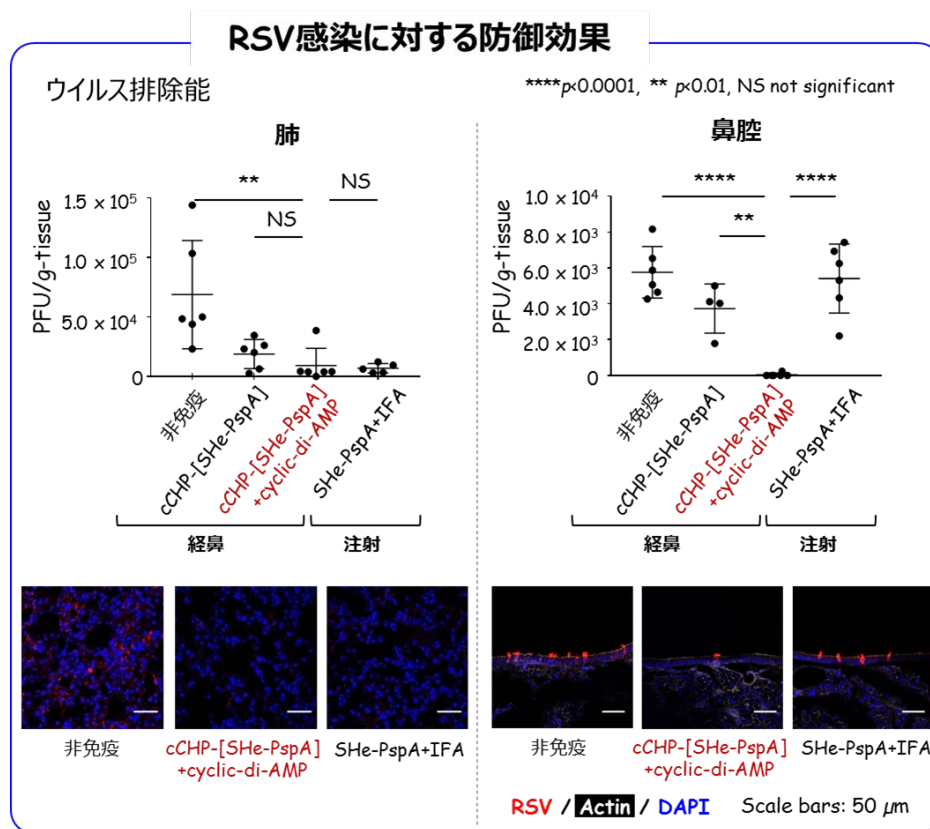


図 2 : cCHP-[SHe-PspA]はマウスの RSV 感染に対する防御免疫を誘導する

蛍光免疫染色により、肺および鼻腔粘膜へのウイルス浸潤を評価した結果を図 2 (下) に示します。ウイルス感染 4 日後に調べると、上記ウイルス量の結果を反映するように、cCHP-[SHe-PspA]経鼻投与と SHe-PspA+IFA 注射投与群では、肺へのウイルス浸潤はほとんど見られませんでした。つまり、今回デザインされたキメラ型ワクチン候補抗原 SHe-PspA の有用性をさらにサポートする結果となりました。

RSV の侵入門戸である鼻腔粘膜では、cCHP-[SHe-PspA]経鼻免疫マウス群では、ウイルス浸潤阻止効果を認める事が出来ました。一方で、SHe-PspA+IFA 腹腔内免疫マウスでは、その顕著な効果が認められませんでした。これらの結果は、抗原特異的粘膜 IgA および血清 IgG 抗体の誘導が、それ

それ上気道および下気道における RSV 複製阻害に中心的な役割を果たすことを示しています。さらに、その誘導には、経鼻ワクチンが有効である事を示唆しています。

#### 4. cCHP-[SHe-PspA]は、上気道におけるウイルス侵入に対する阻害活性を有する抗原特異的抗体を誘導する

cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンにより誘導された分泌型 IgA 抗体が RSV に直接結合するかを、マウス鼻洗浄液を使って検討しました (図 3)。野生型 (WT) BALB/c と分泌型 IgA 抗体を産生出来ない pIgR 欠損 (pIgR<sup>-/-</sup>) BALB/c マウスを cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンで免疫し、鼻洗浄液を収集し、SHe 特異的粘膜 IgA 抗体の役割を検討しました。経鼻免疫した野生型マウスから収集された抗体は、RSV に直接結合することがわかりました。一方で pIgR 欠損 (pIgR<sup>-/-</sup>) BALB/c マウスの鼻洗浄液中の RSV 結合抗体は顕著に低値でした。この結果は、経鼻ワクチンで誘導された鼻洗浄液中の RSV 特異的分泌型 IgA 抗体の同ウイルス侵入阻止効果を直接的に示しています。さらに、その誘導効果はアジュバント候補の cdAMP を添加した経鼻ワクチン投与群で優位でした。これらの結果は、cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンにより誘導された鼻腔 SHe 特異的 IgA 抗体が、RSV 侵入部位である気道粘膜表面における RSV 感染の抑制に重要な役割を果たしていることを示しています。

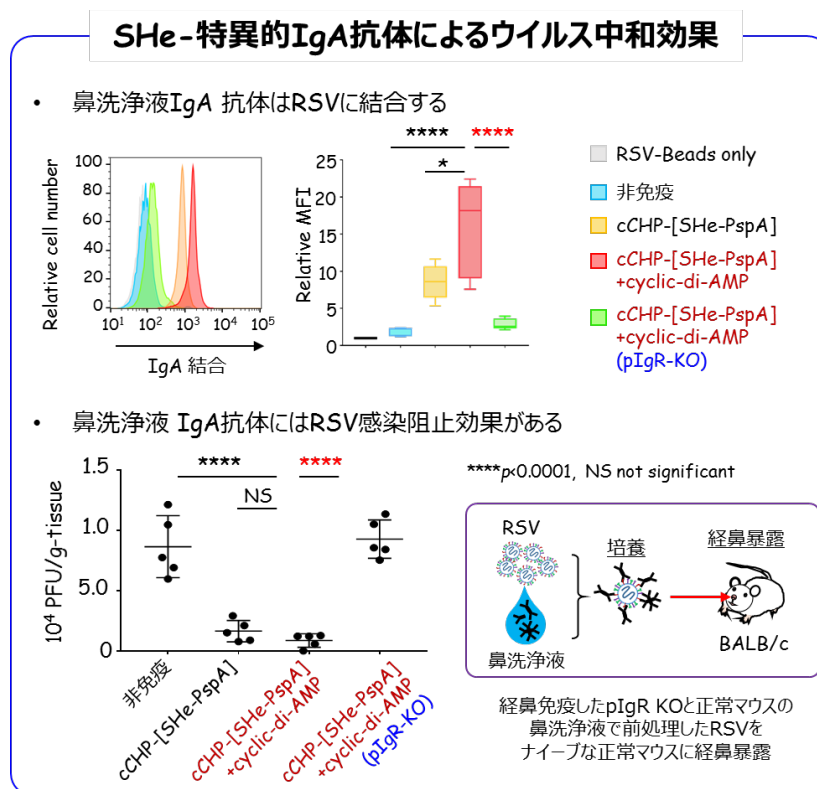


図 3 : cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンは上気道へのウイルス侵入を阻害する免疫を誘導する

## 5. cCHP-[SHe-PspA]によって誘導される肺免疫防御は、Fc 受容体を介した細胞性免疫機構に依存する

cCHP-[SHe-PspA]が誘導する肺におけるRSV 防御免疫についての解析も進めました。先行研究で、ウイルス表面抗原に結合する抗体は、感染防御に関わるFc 受容体を発現する白血球に、同受容体を介して結合し、ウイルス感染細胞を死滅または排除する事が報告されています。そこで、cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンで誘導された抗原特異的IgG 抗体がFc $\gamma$  受容体(Fc $\gamma$ R)を介してRSV 感染制御に関わっているか検討しました。WT およびFc $\gamma$ R-欠損(NOD バックグラウンド)マウスをcCHP-[SHe-PspA]+cdAMP で経鼻免疫し検討したところ、WT NOD マウスの肺におけるRSV 複製は有意に減少しました。一方で、Fc $\gamma$ R-null NOD マウスではRSV 複製は減少しませんでした(図4)。これらの結果は、cCHP-[SHe-PspA]+cdAMP 経鼻ワクチンによって誘導されたSHe 特異的血清IgG 抗体は、注射免疫によって誘導されるSHe 特異的IgG 抗体と同様に、RSV 肺感染に対するFc 受容体を介した細胞性免疫応答(ADCC など)によるウイルス排除に寄与していることを示しています。

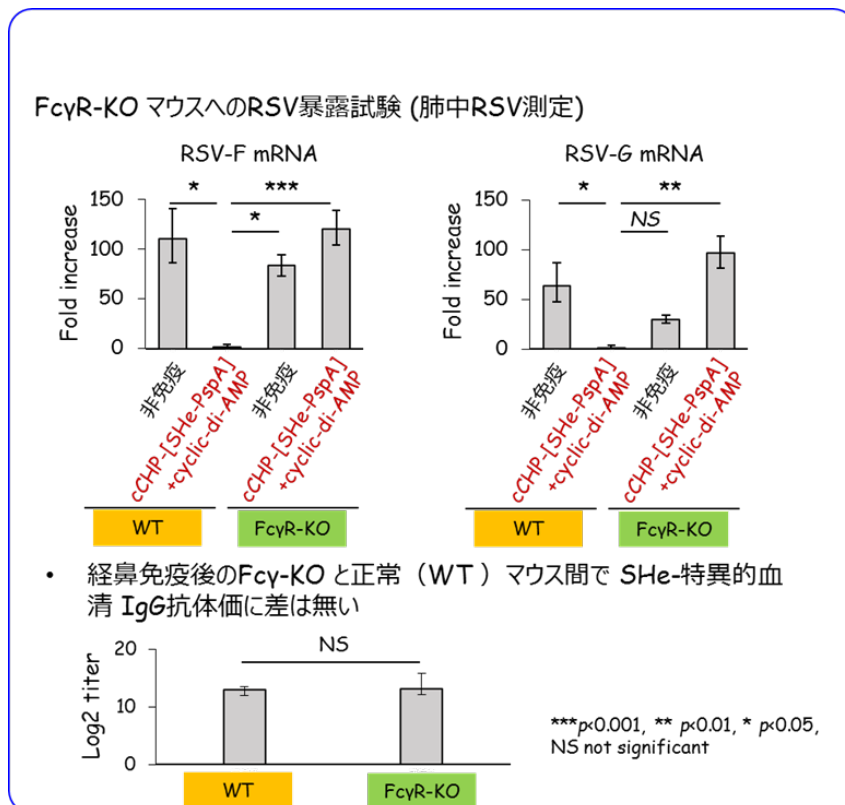


図4 : SHe 特異的 IgG 抗体は、Fc 受容体を介した細胞性免疫により RSV を肺から排除する

## 6. cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンはVEDを誘導しない

VEDは、RSVに対するワクチンによって引き起こされる合併症として知られています。そこで、実験的にVEDを引き起こすFI-RSV VEDモデルを用いて、cCHP-[SHe-PspA]+cdAMP経鼻ワクチンがVEDを惹起するかどうかを検討しました。対照群であるVED誘発群では、RSVによるアレルギー性気道炎症にみられる異常なTh2型サイトカイン産生と好酸球浸潤が認められました。一方で、cCHP-[SHe-PspA]+cdAMP経鼻免疫マウス群では、まったくそのような症状は認められませんでした(図5)。これらの結果は、cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンは、VEDを引き起こさないことを示唆し、安全性という視点から今後の臨床応用に向けて有用な結果となりました。

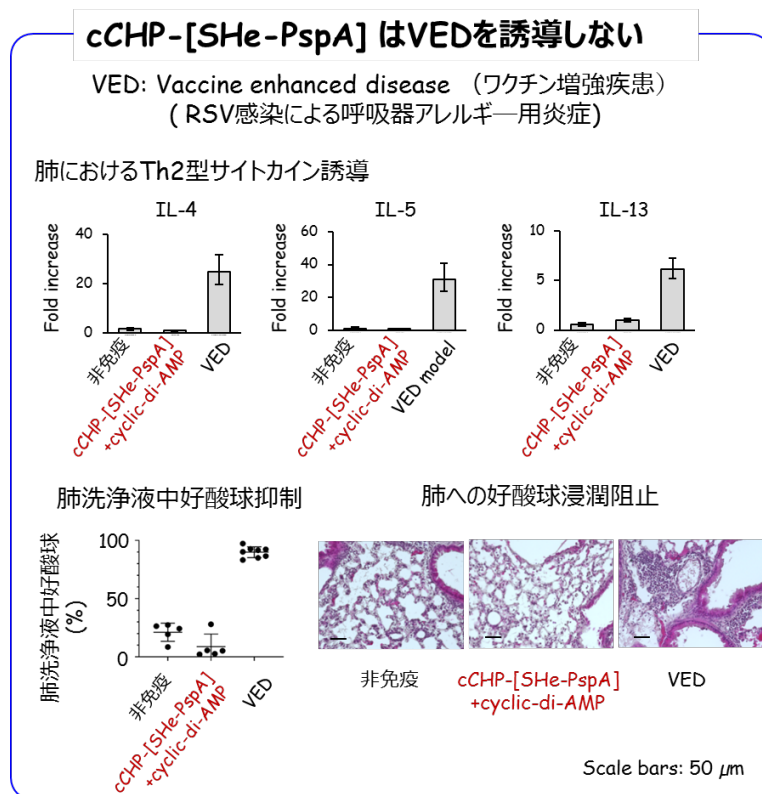


図5: cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンはRSV感染後にアレルギー性気道炎症を誘導しなかった

## 7. cCHP-[SHe-PspA]は、ヒトでのRSV感染を模倣するコットンラットにおいてRSVに対する防御効果を示すSHe特異的免疫応答を誘導した

cCHP-[SHe-PspA]の有効性をさらに確認する為、ヒトでのRSV感染に類似しRSVワクチン有効性実験モデル動物であるコットンラット(*Sigmodon hispidus*)を使って検討しました。コットンラットにおいてもcCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチン投与により、SHe特異的IgA抗体が鼻腔内に誘導されました

(図 6)。次に、免疫したコットンラットで RSV 感染実験を実施しました。cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチン投与コットンラット群では、肺のウイルス量は、顕著に抑制されていました。鼻腔においても、cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチン投与群はウイルス量を大幅に減少させました。マウスの結果だけでなく、RSV 感染標準モデルであるコットンラットの試験系を使っても、cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンの有効性を示す結果を得る事が出来ました。

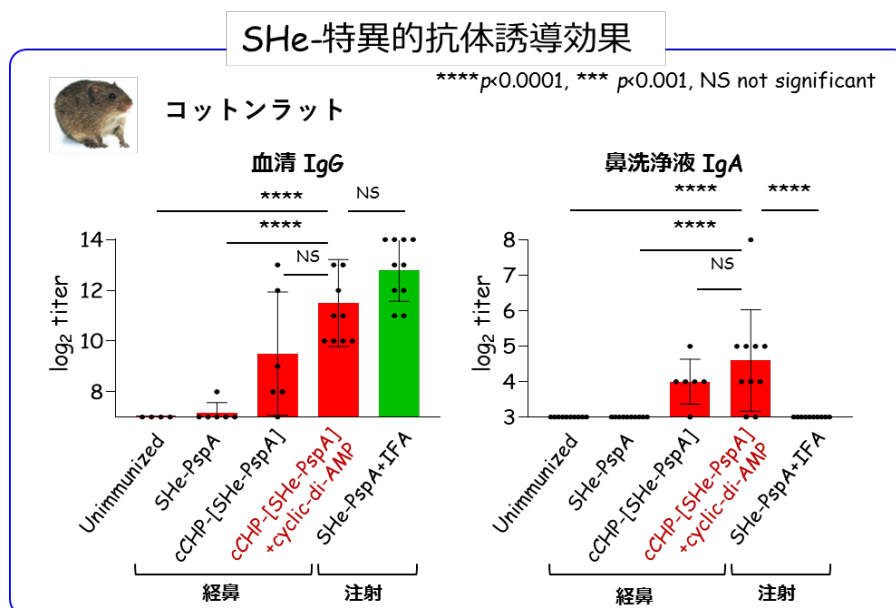


図 6 : cCHP-[SHe-PspA]経鼻ワクチンはコットンラットにおいても RSV に対する防御免疫を誘導した

#### 【まとめ】

cCHP ベースの SHe 経鼻ワクチンは、VED を引き起こすことなく、マウスとコットンラットの粘膜面と全身免疫の両方で RSV 特異的防御免疫を誘導することを実証しました。本製剤は、RSV 感染を予防するための新規経鼻ワクチンとして有望な候補と考えられます。

発表詳細は下記の URL からご覧ください。

#### 【掲載誌名】

NPJ Vaccines

#### 【論文タイトル】

Cationic-nanogel nasal vaccine containing the ectodomain of RSV-small hydrophobic protein induces protective immunity in rodents

## 【著者】

Shingo Umemoto<sup>1,2,3</sup>, Rika Nakahashi-Ouchida<sup>1,4,5,6</sup>, Yoshikazu Yuki<sup>4,5,7</sup>, Shiho Kurokawa<sup>4,5</sup>, Tomonori Machita<sup>4,5</sup>, Yohei Uchida<sup>4,5</sup>, Hiromi Mori<sup>4,5</sup>, Tomoyuki Yamanoue<sup>4,5</sup>, Takehiko Shibata<sup>8,9</sup>, Shin-Ichi Sawada<sup>10</sup>, Kazuya Ishige<sup>11</sup>, Takashi Hirano<sup>2</sup>, Kohtaro Fujihashi<sup>5,6,12,13</sup>, Kazunari Akiyoshi<sup>10</sup>, Yosuke Kurashima<sup>1,3,5,6,12,14,15</sup>, Daisuke Tokuhara<sup>3,16</sup>, Peter B Ernst<sup>3,17,18,19</sup>, Masashi Suzuki<sup>2</sup>, Hiroshi Kiyono<sup>1,3,5,6,7,19,20</sup> \* (\* Corresponding author)

## 【著者（日本語表記）】

梅本真吾<sup>1,2,3</sup>, 中橋（大内田）理佳<sup>1,4,5,6</sup>, 幸 義和<sup>4,5,7</sup>, 黒河志保<sup>4,5</sup>, 町田智紀<sup>4,5</sup>, 内田洋平<sup>4,5</sup>, 森 裕美<sup>4,5</sup>, 山野上朋之<sup>4,5</sup>, 柴田岳彦<sup>8,9</sup>, 澤田晋一<sup>10</sup>, 石毛和也<sup>11</sup>, 平野 隆<sup>2</sup>, 藤橋浩太郎<sup>5,6,12,13</sup>, 秋吉 一成<sup>10</sup>, 倉島洋介<sup>1,3,5,6,12,14,15</sup>, 徳原大介<sup>3,16</sup>, Peter B Ernst<sup>3,17,18,19</sup>, 鈴木正志<sup>2</sup>, 清野宏<sup>1,3,5,6,7,19,20</sup>

## 【著者所属】

1. 東京大学医科学研究所 東京大学特任教授部門 粘膜免疫学部門
2. 大分大学医学部 耳鼻咽喉科学講座
3. 千葉大学-UC San Diego 国際研究拠点 粘膜免疫治療学・ワクチン開発研究センター (Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine:cMAV) (CU-UCSD cMAV)
4. 東京大学医科学研究所 国際粘膜ワクチン開発研究センター
5. 千葉大学医学部附属病院 ヒト粘膜ワクチン学部門
6. 千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点
7. 株式会社 HanaVax
8. 東京医科大学微生物学分野
9. 国立感染症研究所 免疫部
10. 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻
11. ヤマサ株式会社 医薬・化成品事業部生物工学研究室
12. 東京大学医科学研究所 国際ワクチンデザインセンター
13. Department of Pediatric Dentistry, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA
14. 千葉大学国際高等研究基幹
15. 千葉大学大学院 医学研究院 イノベーション医学
16. 和歌山県立医科大学小児科学教室
17. Division of Comparative Pathology and Medicine, Department of Pathology,



University of California, San Diego, CA, USA

18. Center for Veterinary Sciences and Comparative Medicine, University of California, San Diego, CA, USA

19. 千葉大学未来医療教育研究機構

20. 千葉大学グローバルプロミネント研究基幹 粘膜免疫・アレルギー治療学

【DOI】10.1038/s41541-023-00700-3

【URL】<https://www.nature.com/articles/s41541-023-00700-3>

#### 【研究助成】

本研究は日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究 S(18H05280:H.K.); 日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究 B (20H03856:K.F.); 日本学術振興会 科学研究費助成事業 基盤研究 C (22K07942:D.T.); 日本学術振興会 科学研究費助成事業 挑戦的研究 (開拓) (20K20495:K.F.); 日本学術振興会 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 (A)) (18KK0432:Y.K.); 日本学術振興会 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化) (17KK0196:D.T.); 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)(「先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業」JP21am0401029:H.K., 「ワクチン開発 のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業(SCARDA)」JP223fa627003:R.N-O., Y.K., K.F., H.K.); 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」(NeDDTrim) (JP21ae0121040:H.K.); 千葉大学未来医療基金(Y.K.); 国際研究拠点 粘膜免疫治療学・ワクチン開発研究センター (Chiba University-UC San Diego Center for Mucosa Immunology, Allergy and Vaccine: cMAV ) (Y.K., P.E., H.K.); National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK) グラント P30 DK120515(P.E., H.K.); 東京大学医科学研究所 国際共同利用・共同研究拠点(K22-3045:P.E., Y.K., H.K., H.K.); 山田科学振興財団(Y.K.);そして 3M の寄付(H.K.)の支援の下で実施されました。

#### 【本リリースに関するお問い合わせ先】

千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点 (cSIMVa) URA  
大江洋子