



Title	エンテロウイルスD68に対する新規ワクチン開発
Author(s)	千福, 航太
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101936
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 千 福 航 太 ）	
論文題名	エンテロウイルスD68に対する新規ワクチン開発
<p>論文内容の要旨</p> <p>エンテロウイルスD68 (Enterovirus-D68; EV-D68) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されるノンエンベロープの一本鎖 RNA ウイルスである。EV-D68は、主に小児に対して呼吸器疾患を引き起こす病原体であるが、四肢に運動麻痺を呈する急性弛緩性脊髄炎などの中枢神経疾患との関連も注目されている。EV-D68は、1962年に米国で初めて分離され、2013年までに世界中で報告されたEV-D68症例は700例程度であった。しかし、2014年に世界的なアウトブレイクが発生して以来、2018年まで隔年でアウトブレイクが発生し、アウトブレイクの発生と同時に急性弛緩性脊髄炎の症例数の増加が認められた。さらに、2021年、2022年には、複数の国において、EV-D68感染による重度の呼吸器疾患の報告が増加した。日本でも、2015年および2018年にアウトブレイクが発生しており、同時に急性弛緩性脊髄炎の症例数の増加が認められた。EV-D68は今後も流行する可能性があり、公衆衛生上の脅威であるが、承認された治療薬やワクチンは存在しない現状にある。従って、EV-D68に対するワクチンの開発は、急務であると言える。</p> <p>これまでに、EV-D68に対するワクチンとして、不活化全粒子 (inactivated whole-virion; IWV) ワクチンとウイルス様粒子 (virus-like particle; VLP) ワクチンの有用性を示した先行研究が数例存在する。これらの先行研究では、IWVワクチンおよびVLPワクチンが、マウスにおいてEV-D68に対する中和抗体を誘導し、呼吸器感染および四肢麻痺の発症を予防できることが示されている。一方で、IWVワクチンを開発する上で重要な側面である、ウイルス不活化方法や併用するアジュバント、製造時のウイルス培養工程などは最適化されていない現状にある。また、IWVワクチンとVLPワクチンの免疫原性は十分に比較されておらず、免疫原性の違いは不明確である。そこで本研究では、まず、EV-D68に対するIWVワクチンの開発を目標に、最適なウイルス不活化剤ならびにアジュバントを検討した。続いて、ワクチン製造に汎用されている細胞において増殖可能なEV-D68株を開発することで、IWVワクチンの製造工程の最適化を図った。最後に、VLPワクチンを作製し、その免疫原性をIWVワクチンと比較した。</p> <p>最適なウイルス不活化剤を検討するため、代表的なウイルス不活化剤であるホルマリン、β-プロピオラクトン、過酸化水素のいずれかをを用いてEV-D68を不活化し、IWVを作製した。作製したIWVをマウスに皮下より免疫したところ、EV-D68に対する中和抗体価は、いずれの不活化剤を用いた場合でも同等であった。続いて、β-プロピオラクトンを用いてEV-D68を不活化して作製したIWVを、最も汎用されているアジュバントである水酸化アルミニウム (alum)、Toll-like receptor 9に対する合成一本鎖DNAリガンドであるCpG核酸、水中油型エマルジョンアジュバントであるAddaVaxと共に免疫した。その結果、IWVを単独で免疫した場合と比較して、alumの併用によっては中和抗体価や感染防御効果の向上は認められなかった。一方で、CpG核酸またはAddaVaxを併用した場合、中和抗体価や感染防御効果の有意な向上が認められた。</p> <p>次に、IWVワクチンの製造工程の最適化を図った。IWVワクチンは一般に、培養細胞などを用いて増殖させたウイルスを原料として製造される。EV-D68の培養にはヒト横紋筋肉腫由来RD細胞が一般に使用されてきたが、これまでに承認されたワクチンの製造に、RD細胞が使用された前例は無い。また、RD細胞はヌードマウスに対して造腫瘍性を示すことが報告されており、RD細胞をワクチン製造用細胞として使用することは、安全性への懸念から現実的ではない。そこで、ワクチン製造に汎用されているMRC-5細胞とVero細胞で増殖可能なEV-D68株 (馴化株) の開発を試みた。まず、MRC-5細胞において、EV-D68の継代培養を繰り返したところ、MRC-5細胞馴化株の分離に成功した。一方で、Vero細胞において、EV-D68の継代培養を繰り返しても、Vero細胞馴化株を分離することはできなかった。そこで、Vero細胞において、MRC-5細胞馴化株の継代培養を繰り返したところ、Vero細胞馴化株の分離に成功した。本手法により、複数の親EV-D68株に由来するMRC-5細胞馴化株とVero細胞馴化株を分離した。続いて、親株または馴化株を不活化して作製したIWVワクチンをマウスに免疫し、馴化によって免疫原性が変化したかどうかを、中和抗体価と感染防御効果を指標に評価した。その結果、親株と馴化株が同程度の優れた免疫原性を示す場合もあれば、馴化によって免疫原性が著しく低下する可能性があることが明らかとなった。</p> <p>最後に、VLPワクチンとIWVワクチンの免疫原性を比較した。EV-D68の構造タンパク質前駆体であるP1を発現するプ</p>	

ラスミドと、P1から各構造タンパク質を切り出す3CDプロテアーゼを発現するプラスミドを作製した。これらのプラスミドをチャイニーズハムスター卵巢細胞由来ExpiCHO-S細胞にトランスフェクションすることでVLPを発現させた。続いて、VLPとIWVをマウスに免疫し、抗体応答を比較した。その結果、血中EV-D68特異的IgG抗体レベルは、VLP群の方がIWV群よりも有意に低かった。一方で、EV-D68に対する中和抗体価は、VLP群とIWV群と同等であった。また、EV-D68感染に対する防御効果は、VLP群とIWV群で同等であった。以上より、VLPによるEV-D68特異的IgG抗体の誘導は、IWVよりも乏しいものの、中和抗体価や感染防御効果は同等であったことから、VLPはIWVよりも優れた中和活性を示す抗体を誘導可能であることが示された。この機序を解析するため、VLPとIWVが誘導するEV-D68特異的IgG抗体が認識する中和エпитープに違いがあるかどうかを、エпитープペプチドを固相化抗原として用いたELISA法により評価した。その結果、VLP群では、PBS投与群と比較して、VP1 BC loopおよびVP1 C末端のエピトープペプチドに対するIgG抗体レベルの有意な上昇が認められず、そのレベルはIWV群より有意に低かった。一方で、その他のエピトープペプチドに対するIgGレベルは、VLP群とIWV群で同等であった。各中和エピトープを認識する抗体ごとの中和活性の違いは現段階では不明であるが、IWV群においてVLP群よりも有意に高いレベルで誘導されたVP1 BC loopとVP1 C末端に存在する中和エピトープを認識する抗体は、他の中和エピトープを認識する抗体よりも中和活性が低く、中和への寄与が小さいため、IWV群とVLP群の中和抗体価が同等となった可能性がある。

以上の検討から、1. 不活化剤として β -プロピオラクトンを用いて作製したIWVに、CpG核酸またはAddaVaxをアジュバントとして添加したワクチンが特に有用であること、2. MRC-5細胞への馴化を経由することでVero細胞馴化株を効率的に分離可能である一方で、株によっては馴化に伴い免疫原性が低下するリスクがあること、3. VLPワクチンとIWVワクチンは同等の中和抗体価、感染防御効果を示すが、誘導される中和抗体のエピトープが異なる可能性があることが示された。本研究結果は、エンテロウイルスD68に対するIWVワクチンおよびVLPワクチンの開発に資する重要な知見となり得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （千福航太）			
	(職)		氏 名
論文審査担当者	主 査	齊藤達哉	教授
	副 査	水口裕之	教授
	副 査	平井敏郎	特任講師（常勤）

論文審査の結果の要旨

エンテロウイルスD68 (Enterovirus-D68; EV-D68) は、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類されるノンエンベロープの一本鎖 RNA ウィルスである。EV-D68は、主に小児に対して呼吸器疾患を引き起こす病原体であるが、四肢に運動麻痺を呈する急性弛緩性脊髄炎などの中枢神経疾患との関連も注目されている。EV-D68は、1962年に米国で初めて分離され、2013年までに世界中で報告されたEV-D68症例は700例程度であった。しかし、2014年に世界的なアウトブレイクが発生して以来、2018年まで隔年でアウトブレイクが発生し、アウトブレイクの発生と同時に急性弛緩性脊髄炎の症例数の増加が認められた。さらに、2021年、2022年には、複数の国において、EV-D68感染による重度の呼吸器疾患の報告が増加した。日本でも、2015年および2018年にアウトブレイクが発生しており、同時に急性弛緩性脊髄炎の症例数の増加が認められた。EV-D68は今後も流行する可能性があり、公衆衛生上の脅威であるが、承認された治療薬やワクチンは存在しない現状にある。従って、EV-D68に対するワクチンの開発は急務であると言える。

これまでに、EV-D68に対するワクチンとして、不活化全粒子ワクチンとウイルス様粒子 (virus-like particle; VLP) ワクチンの有用性を示した先行研究が数例存在する。これらの先行研究では、不活化全粒子ワクチンおよびVLPワクチンが、マウスにおいてEV-D68に対する中和抗体を誘導し、呼吸器感染および四肢麻痺の発症を予防できることが示されている。一方で、不活化全粒子ワクチンを開発する上で重要な側面である、ウイルス不活化方法や併用するアジュバント、製造時のウイルス培養工程などは最適化されていない現状にある。また、不活化全粒子ワクチンとVLPワクチンの免疫原性は十分に比較されておらず、免疫原性の違いは不明確である。

本観点から申請者は、まず、EV-D68に対する不活化全粒子ワクチンの開発を目標に、最適なウイルス不活化剤ならびにアジュバントを検討した。続いて、ワクチン製造に汎用されている細胞において増殖可能なEV-D68株を開発することで、不活化全粒子ワクチンの製造工程の最適化を図った。最後に、VLPワクチンを作製し、その免疫原性を不活化全粒子ワクチンと比較した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 不活化剤として β -プロピオラクトンを用いて作製した不活化全粒子に、CpG ODNまたはAddaVaxをアジュバントとして添加した注射型ワクチンが特に有用である。
2. MRC-5細胞への馴化を経由することでVero細胞馴化株を効率的に分離可能である一方で、株によっては馴化に伴い免疫原性が低下するリスクがある。
3. VLPワクチンと不活化全粒子ワクチンは同等の中和抗体誘導、感染防御効果を示すが、誘導される抗体のエピトープが異なる可能性がある。

以上、本論文の結果は、エンテロウイルスD68に対する不活化全粒子ワクチンおよびVLPワクチンの開発に資する重要な知見であり、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。