



Title	カプシド改変アデノウイルスベクターを基盤としたワクチン開発に関する研究
Author(s)	大西, 里佳
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105575
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 (大西里佳)

論文題名 カプシド改変アデノウイルスベクターを基盤としたワクチン開発に関する研究

論文内容の要旨

感染症は、依然として人類の大きな脅威となっており、近年の新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の世界的流行は、新興・再興感染症に対する迅速かつ有効な予防手段確立の重要性を改めて浮き彫りにした。感染症の制御において、ワクチンは最も有効な手段である。近年、多様なワクチンモダリティが開発されており、特にCOVID-19パンデミック下では、mRNAワクチンやアデノウイルス（Ad）ベクターワクチンが前例のない速度で実用化され、世界的な感染制御に多大な貢献を果たした。Adベクターは、高い遺伝子導入効率、宿主ゲノムに挿入されないという安全性、冷蔵での長期保存が可能、Adベクター粒子そのものが自然免疫を活性化する、搭載する抗原遺伝子を入れ換えるだけで様々な感染症に対応可能、などワクチンとしての多くの特長を有する。

Adのカプシドタンパクは主にファイバー、ペントンベース、ヘキシソンの3種類の主要タンパクから構成され、ウイルスの細胞への結合および取り込みに重要な役割を担う。ヒトを宿主とするヒトAdには、100種類以上の血清型および遺伝子型が存在し、中でもヒト5型Ad（Ad5）がこれまで長年に渡り研究が進められてきた。Ad5ベクターの主な細胞内取り込み経路としては、①ファイバーがCoxsackievirus adenovirus receptor（CAR）に結合する経路、②ペントンベースが α vインテグリンと結合する経路、③ヘキシソンに血液凝固因子 Factor X（FX）が結合し、FXが細胞表面のヘパラン硫酸に結合する経路が知られている。このようなAd5ベクターの受容体依存的な細胞内への取り込み経路は、その生体内分布や細胞指向性を規定する重要な因子である。しかしながら、それぞれの受容体を介した細胞内取り込み経路が、ワクチン効果そのものにどのような影響を及ぼすのかについては、依然として不明な点が多い。

第一章では、現在最も汎用されているAd5ベクターにおいて、その感染経路、すなわちCAR、 α vインテグリン、およびFX依存的な細胞内取り込みがワクチン効果誘導に及ぼす影響を、筋肉内および鼻腔内投与経路において検討した。まず、各感染受容体を介した遺伝子導入経路を欠失したカプシド改変Adベクターをマウスに筋肉内投与し、血清中の抗原特異的IgG抗体価を評価した。その結果、全てのカプシド改変Adベクターは従来のAdベクターと同程度の抗原特異的IgG抗体価を誘導していたことから、感染受容体依存的な細胞内取り込み経路はワクチン効果誘導に有意な影響を与えないことが明らかとなった。次に、カプシド改変Adベクターワクチンを鼻腔内投与し、血清、気管支肺胞洗浄液（BALF）、および鼻腔洗浄液中に含まれる抗原特異的抗体価を評価した。その結果、CARとの結合を欠失させたAdベクター投与群でのみ、血清中の抗原特異的IgG抗体価、BALF中の抗原特異的IgGおよびIgA抗体価、ならびに鼻腔洗浄液中の抗原特異的IgA抗体価が、従来のAdベクターと比較して有意に低値であった。したがって、鼻腔内投与後のAdベクターによる効果的なワクチン効果の誘導にはCARを介した細胞内取り込みが重要であることが明らかとなった。実際に、CARとの結合部位に変異を導入したAdベクターは、肺において遺伝子導入効率が減少していたことから、CAR発現細胞への遺伝子導入がワクチン効果の誘導に重要であることが示唆された。これらの結果から、Adベクターワクチンの効果的なワクチン効果の誘導には、投与経路に応じて、Adベクターの遺伝子導入細胞を最適化することが重要であることが考えられた。

Ad5ベクターに関する研究が進む一方で、多くの成人が自然感染によりAd5に対する中和抗体を有していることが、Ad5ベクターを基盤とした医薬品を臨床応用する上で大きな課題となっている。そこで、Ad5ベクターの既存抗体の問題を克服する戦略として、ヒトでの中和抗体保持率が低いヒト35型Ad（Ad35）ベクターに着目した。既存抗体の影響を受けにくい有望なワクチンプラットフォームとなり得るAd35ベクターであるが、Ad35ベクターの産生効率が従来のAd5ベクターに比べて劣ることが実用化への課題であった。

第二章では、抗Ad5中和抗体による阻害を回避し、大量調製可能かつ効果的な新規Ad35ベクターワクチンを開発することを目的とした。これまでにAdはE4領域のopen reading frame (ORF) 6とE1B55K遺伝子が同じ型由来でないと感染増殖できないことが報告されている。Adベクターのパッケージング細胞であるHEK293細胞はAd5のE1B55Kを発現していることから、Ad35のE4領域のORF6、6/7またはORF4、6、6/7をAd5の対応する遺伝子に置換することで、高効率にベクター生産が可能なE4改変型Ad35ベクターの開発に成功した。E4改変型Ad35ベクターは各種培養細胞にお

いて、従来のAd5ベクターと同程度の遺伝子導入効率を示した。また、E4改変型Ad35ベクターは、Ad5ベクターの課題である中和抗体による遺伝子導入阻害も回避可能であった。筋肉内投与後の遺伝子発現では、CD46 transgenic (TG) マウスにて野生型マウスよりも高い遺伝子導入効率を示したが、ワクチン効果を検討したところ、筋肉内投与において有意な抗体産生誘導は観察されなかった。この原因の一つとして、CD46TGマウスの筋肉ではCD46が発現しているものの、その発現量は他の組織と比べてやや低いことが考えられた。そこで、CD46以外の感染受容体を介してAd35ベクターが遺伝子導入できるよう、ファイバーノブのHI loop領域にavインテグリンと結合するArginine-Glycine-Aspartate (RGD) ペプチド配列を挿入したベクターを作製した。RGDペプチドを挿入したAd35ベクターでは、RGDペプチドを挿入していないベクターと比較して有意に高い抗体価を示した。さらに、RGDペプチドを挿入したE4改変型Ad35ベクターは、Ad5ベクターで免疫したマウスにおいても抗原特異的抗体の誘導は阻害されることなく、効果的なワクチン効果を示した。

以上より、Adベクターワクチンによるワクチン効果の誘導は、細胞内取り込みに利用する感染受容体の種類に影響されるが、その程度はAdベクターの血清型や投与経路に依存することが明らかとなった。また、Ad35ベクターはRGDペプチドを挿入することで筋肉内投与後のワクチン効果が向上し、その抗原特異的な抗体誘導能は、抗Ad5既存免疫を持つマウスにおいても維持されていた。カプシドを改変することで得られたこれらの結果は、遺伝子導入細胞の種類や投与部位での遺伝子発現量の違い、および利用する受容体に起因する細胞内動態・自然免疫応答の違いが、総合的にワクチン効果を規定している可能性を示唆するものである。本研究の成果は、Adベクターを基盤とするワクチン開発のみならず、ワクチン開発分野全体の進展において重要な知見となる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 西 里 佳)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授
	副 査	教 授
	副 査	教 授
		水口 裕之
		吉岡 靖雄
		齊藤 達哉

論文審査の結果の要旨

感染症は、依然として人類の大きな脅威となっており、近年の新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の世界的流行は、新興・再興感染症に対する迅速かつ高機能なワクチン開発の重要性を改めて浮き彫りにした。アデノウイルス（Ad）ベクターは、ワクチンとしての多くの特長を有することから注目を集めているものの、幾つかの問題点を有しており、更なる改良が求められている。

ヒトを宿主とするヒトAdには、100種類以上の血清型および遺伝子型が存在し、中でもヒト5型Ad（Ad5）を基本骨格とした Ad ベクターが汎用されている。Ad5ベクターの主な細胞内取り込み経路としては、①ファイバーがCoxsackievirus-adenovirus receptor（CAR）に結合する経路、②ペントンベースが α vインテグリンと結合する経路、③ヘキソンに血液凝固因子 Factor X（FX）が結合し、FXが細胞表面のヘパラン硫酸に結合する経路が知られている。このような各受容体を介したAd5ベクターの細胞内取り込み経路は、その生体内分布や細胞指向性を規定する重要な因子である。しかしながら、それぞれの受容体を介した細胞内取り込み経路が、ワクチン効果にどのような影響を及ぼすかは、ほとんど明らかとなっていない。一方、Ad5ベクターの臨床応用における最大の課題は、多くの成人が保有する中和抗体の存在である。そこで、抗体保有率の低いヒト35型Ad（Ad35）ベクターに着目した。Ad35ベクターは既存抗体の影響を回避できる有望なプラットフォームであるが、Ad5ベクターに比べ産生効率が低い点が実用化への障壁となっている。

本研究では、Adベクターワクチンの最適化ならびに高機能化を目的として、カプシドタンパク質の各種改変を施した改良型Adベクターによるワクチン効果を評価した。まず、Ad5ベクターを基盤としたワクチンにおける細胞内取り込み経路がワクチン効果に及ぼす影響を検討した。次に、ベクター産生効率およびワクチン効果の向上を目的として、改変型Ad35ベクターワクチンを開発し、ワクチンベクターとしての有用性を評価した。

本検討により以下の結果を得た。

1. Ad5 ベクターにおいては、筋肉内投与後のワクチン効果は細胞内取り込み経路に依存しなかった。一方で、鼻腔内投与では CAR を介した遺伝子導入がワクチン効果の誘導に重要であることを示した。
2. ウイルス複製に重要なウイルス遺伝子を最適化することにより、高効率に産生可能な Ad35 ベクターの開発に成功した。さらに、Ad35 ベクターのファイバーに Arginine-Glycine-Aspartate（RGD）ペプチドを挿入することで筋肉内投与後のワクチン効果が向上し、その抗原特異的な抗体誘導能は、抗 Ad5 既存免疫を持つマウスにおいても維持されていた。

本研究は、Adカプシドを改変・最適化することによるAdベクターの細胞内取り込み経路の変化が、最終的なワクチン効果を決定・向上させている可能性を示唆するものであり、それは遺伝子導入される細胞の種類や、利用する受容体に起因する細胞内動態・自然免疫応答の違いに起因するものと推察された。本成果は、Adベクターを基盤とするワクチン開発のみならず、ワクチン開発分野全体の進展に寄与し、高機能かつ安全なワクチン開発への道筋を示したことから極めて意義深く、本論文は博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。