The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	感染症における経鼻ワクチンの有用性評価と基盤技術の開発
Author(s)	河合, 惇志
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92109
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　　（河合　惇志）	
論文題名	感染症における経鼻ワクチンの有用性評価と基盤技術の開発

論文内容の要旨

経鼻ワクチンは、従来の注射型ワクチンと異なり、血中のみならず、多くの病原体の初発感染部位である上気道でも抗体産生を誘導可能であるなど、重症化だけでなく感染そのものを防御し得る理想のワクチンとして世界的に期待されている。さらに申請者は、実用化されていない経鼻アジュバントを用いた検討ではあるものの、インフルエンザウイルスの膜蛋白質であるノイラミニダーゼ（NA）を経鼻ワクチンすることで、抗原性の異なるヘテロローガスなウイルス株に対しても感染防御し得ることを先駆けて見出すなど（Kawai A, et al. J Virol.2021）、経鼻ワクチンの有用性を報告している。しかし、経鼻ワクチンにおいて、1）抗原を単独で鼻腔に投与しても、上皮細胞からなる粘膜バリアを通過困難であり、鼻腔リンパ組織への抗原送達効率が乏しいために粘膜免疫を効率的に誘導できないことや、2）粘膜免疫を安全に誘導可能なアジュバントが存在しないなど、未だ多くの問題が山積みされており、実用化は困難を極めている。本観点から申請者は、アジュバントを用いることなく、粘膜免疫を誘導可能なワクチン抗原送達技術の開発を推進してきた。近年、鼻腔内のIgAは病原体に結合し排除するだけでなく、トランスサイトーシスにより鼻腔リンパ組織へと運び、抗原特異的な免疫応答を効率的に誘導することが明らかとなっている。そのため、鼻腔内に既に存在しているIgAが認識する蛋白質に目的のワクチン抗原を融合させることで、IgA自身が抗原送達キャリア（キャリア抗体）となり、ワクチン抗原を鼻腔リンパ組織に送達し、粘膜免疫を効率良く誘導可能であると考えられた。そこで申請者は上記のコンセプトに基づき、生体内抗体を活用した新たな経鼻ワクチン基盤技術の開発を試みた。

ほとんど全ての成人は、インフルエンザウイルスに罹患歴があるため、インフルエンザウイルスの膜蛋白質であるヘマグルチニン（HA）に対する抗体を、血中および鼻腔中に保有している。そのため、キャリア抗体が認識する蛋白質としてHAを用い、ワクチン標的である新型コロナウイルス由来S蛋白質のレセプター結合ドメイン（RBD）を融合させたRBD-HAを哺乳類細胞で作製した。まず、インフルエンザウイルスに罹患歴があり、鼻腔中にHA特異的IgAが存在するマウス（罹患マウス）にRBD-HAを経鼻ワクチンし、RBD特異的IgAが誘導されるかを評価した。その結果、RBD-HA群において、PBSおよびRBD単独群と比較して、アジュバント未添加であるにも関わらず、鼻腔洗浄液中のRBD特異的IgAおよび血中IgGの顕著な上昇が認められた。また、その強度は動物実験において経鼻ワクチンのアジュバントとして汎用されるc-di-GMPとRBDの共投与群と同程度であった。一方で、罹患歴のないマウスでは、RBD-HAを経鼻ワクチンしても抗体産生の上昇は認められなかった。次に、罹患マウスにおいてワクチン抗原が効率的に粘膜上皮バリアを突破し、鼻腔リンパ組織中の樹状細胞に送達されているかを評価した。蛍光蛋白質であるEGFPとHAを融合したEGFP-HAを経鼻投与した後、鼻腔リンパ組織中の樹状細胞への取り込みを、フローサイトメーターを用いて解析したところ、罹患マウスにおいて、EGFP陽性樹状細胞の割合の有意な上昇が認められた。そこで経鼻ワクチン後、新型コロナウイルスを上気道に感染させ、防御可能かを評価した。その結果、RBD-HA群においてPBS群と比較して、鼻腔洗浄液中のウイルス量の有意な減少が認められた。以上の結果より、罹患マウスにおいて、RBD-HAを経鼻ワクチンすることで、RBD特異的抗体産生を強力に誘導可能であること、さらには、上気道における感染を顕著に防御可能であることが明らかとなった。

次に、鼻腔中IgAおよび血中IgGのキャリア抗体としての重要性をより詳細に解析することで、本コンセプトの免疫誘導メカニズムを解析した。ナイーブマウスに罹患マウスの血清から精製したHA特異的IgG（HA-IgG）を移入し、罹患マウスと同程度の血中HA-IgGを保有するマウスを作製した。その後、RBD-HAを経鼻ワクチンし、RBD特異的な抗体産生を解析することで、経鼻ワクチンにおける血中IgGの関与を評価した。また、鼻腔IgAの関与は、罹患マウスから回収したHA特異的IgAを含む鼻腔洗浄液（鼻腔-IgA）をRBD-HAと共に、ナイーブマウスに経鼻ワクチンすることで評価した。その結果、HA-IgGを保有するマウスにRBD-HAをワクチンした群において、ナイーブマウスの血清から精製した抗体を移入したマウスと比較して、粘膜面におけるRBD特異的IgAの顕著な上昇が認められた。ま

た鼻腔-IgAとRBD-HAを共投与した群では、RBD特異的抗体産生の上昇は認められなかった。一方で、血中にHA-IgGを保有するマウスにRBD-HAと鼻腔-IgAを共投与したところ、RBD-HA単独群と比較して抗体産生の上昇が観察された。以上の結果より、RBD-HA経鼻ワクチンの免疫誘導には、血中HA-IgGがキャリア抗体として重要であることが明らかとなった。また、鼻腔中IgAも、HA特異的IgG存在下ではあるが、免疫応答を増強する役割があることが示唆された。次に、本ワクチンシステムの汎用性を評価することを目的とし、肺炎球菌由来のワクチン抗原として注目されているPneumococcal surface protein A (PspA)とHAを融合したPspA-HA、およびRespiratory syncytial virus（RSウイルス）の膜蛋白質であるglycoprotein (G) とHAを融合したG-HAを作製し、それぞれ罹患マウスにアジュバントを用いずに経鼻ワクチンした。その結果、どの抗原を用いてもナイーブマウスに経鼻ワクチンした群と比較して、罹患マウスにワクチンした群で鼻腔洗浄液中の抗原特異的IgAの有意な上昇が認められた。さらに、キャリア抗体が認識する蛋白質を変更することで、インフルエンザ感染以外の既存免疫を利用できるか評価したところ、肺炎球菌感染およびmRNAワクチンにより誘導された抗体をキャリア抗体として利用可能であることを明らかとした。

以上、本研究では、感染やワクチン接種により既に生体内に存在する抗体を活用することで、経鼻ワクチンにおいてアジュバントを用いることなく、ワクチン抗原特異的免疫応答を強力に誘導可能であることを明らかとした。本研究結果が、感染症に対する安全で有効な経鼻ワクチン開発に向けた基盤技術となり得るものと期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　　名　　（河合　惇志）		
論文審査担当者	（職）	氏　　名
	主 査　　教授	吉岡　靖雄
	副 査　　招へい教授	國澤　純
	副 査　　教授	齊藤　達哉

論文審査の結果の要旨

経鼻ワクチンは、従来の注射型ワクチンと異なり、血中のみならず、多くの病原体の初発感染部位である上気道でも抗体産生を誘導可能であるなど、重症化だけでなく感染そのものを防御し得る理想のワクチンとして世界的に期待されている。しかし経鼻ワクチンにおいて、1）抗原を単独で鼻腔に投与しても、上皮細胞からなる粘膜バリアを通過困難であり、鼻腔リンパ組織への抗原送達効率が乏しいために粘膜免疫を効率的に誘導できないことや、2）粘膜免疫を安全に誘導可能なアジュバントが存在しないなど、未だ多くの問題が山積みされており、実用化は困難を極めている。

本観点から申請者は、インフルエンザをモデルとして、ノイラミニダーゼ（NA）のワクチン抗原としての有用性を評価するため、注射型ワクチン・経鼻ワクチンにおける抗体産生評価および感染防御能をヘマグルチニン（HA）と比較しつつ検討した。さらに、実用化を見据えた、安全性の高い経鼻ワクチン開発に向けて、生体内抗体を抗原送達キャリアとして活用する、新たなコンセプトに基づいた経鼻ワクチン基盤技術の構築を図った。

その結果、以下の結論を得た。

1. 経鼻ワクチン及び注射型ワクチンにおいて、NA は、HA よりも交差反応性が高く、特に経鼻ワクチンにおいて非常に優れたワクチン抗原となり得ることを明らかとした。

2. 経鼻 NA ワクチンの優れた交差反応性は、鼻腔中に分泌される多量体 IgA が単量体 IgA や IgG と比較して、抗原のより広範な部位に結合できることに起因することを明らかとした。

3. 感染やワクチンなどにより誘導された既存免疫を利用し、強力に抗体産生を誘導可能なアジュバントフリー経鼻ワクチンプラットフォームを開発した。

4. 本ワクチンプラットフォームによる免疫誘導には、既に生体内に存在する IgG、IgA、$CD4^{+}$T 細胞が寄与することを明らかとした。

以上、本論文の成果は、新規ワクチン開発に向けた新たな概念を提供するものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。