



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

2022 年度（令和 4 年度）博士論文

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

大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻

創薬ナノデザイン学分野

博士後期課程 河合惇志

目次

緒論	2
本論	
第一節 NA のワクチン抗原としての有用性評価	5
第二節 生体内に存在する既存免疫を利用した アジュバントフリー経鼻ワクチン基盤技術の開発	27
結論	57
貢献度	58
謝辞	59
参考文献	60

緒論

天然痘やペスト、スペイン風邪など、過去を振り返ってみても人類の歴史は感染症との闘いの歴史である^{1,2}。昨今の COVID-19 を鑑みても、感染症は未だに人類における脅威となっており、今後も新興・再興感染症の脅威が避けられないことは明白である。従って、感染症を適切に制御し制圧することは、人類に課せられた最重要課題であるといえよう。その点、ワクチンは感染症に対する最も有効な手段の一つである。ワクチンによって病原体特異的な免疫をあらかじめ獲得しておくことで外敵の侵入や重症化を防ぎ、かつ多数の人が免疫を有することで、感染拡大を阻止可能な集団免疫効果が期待される。過去には世界保健機関（WHO）による天然痘根絶計画が可決され、ワクチン接種の推進により、1980 年に天然痘の世界根絶宣言が出されるなど非常に優れた効果を示している。

一方でこれまでに、数多くの有望なワクチンが研究開発されてきたにも関わらず、未だ克服できていない感染症が数多く存在している。最も身近な感染症の一つであるインフルエンザもその内の一つである。インフルエンザは、インフルエンザウイルスを病原体とする気道感染症であり、発症すると咳や喉の痛みなどの呼吸器症状だけでなく、高熱、倦怠感などの全身症状もみられ、QOL が著しく低下する。重度な合併症には急性脳症や重症肺炎などもあり、最悪の場合、死亡するケースも認められる³。事実、WHO の統計データによれば、毎年、世界人口の 5-10% の人が感染し、25 万から 50 万の死亡件数が報告されている⁴。また、従来の季節性インフルエンザと抗原性が大きく異なる新型インフルエンザは、10 年から 40 年の周期で発生しており、人々が免疫を獲得していないことから世界的大流行（パンデミック）となることが危惧される。このように、季節性および新型インフルエンザは、人々の健康だけでなく、経済活動をはじめとする社会機能に与える影響も甚大である⁵。

インフルエンザウイルスには 3 量体蛋白質であるヘマグルチニン（HA）と 4 量体蛋白質であるノイラミニダーゼ（NA）が主要膜蛋白質として存在しており、HA と NA の抗原性の違いから、複数の亜型に分類されている。A 型インフルエンザでは、HA は H1 から H18 の 18 種類、NA は N1 から N11 までの 11 種類の亜型が確認されており、最近の季節性インフルエンザウイルスとしては、H1N1 ウイルス、H3N2 ウイルス、B 型ウイルスが流行している^{6,7}。ウイルスは、気道上皮細胞表面にある糖蛋白質のシアル酸残基に HA を介して結合し、細胞に吸着する。その後、取り込まれたウイルスは、宿主細胞内においてウイルスゲノムを複製し、子孫ウイルス粒子が形成される。続いて、NA が細胞表面のシアル酸を分解することによって、子孫ウイルスは細胞表面より放出され、新たな細胞への感染が可能となる⁸⁻¹¹。インフルエンザウイルスは、増殖速度が著しく、1 個のウイルスが体内に侵入してから、24 時間後には 100 万個にまで増殖すると言われている。

現在、国内では季節性インフルエンザに対して、安全性を重視したスプリットワクチンが

用いられており、毎年流行株を予測し、選定された株由来のスプリットワクチンを皮下接種することで中和抗体を誘導し、感染を防御している¹²。しかし、現行のワクチンの主成分である HA は頻繁に抗原変異を起こし、毎年少しずつ抗原性を変化させている。そのため、ワクチン株と異なる株のウイルスが流行すると、ワクチンにより誘導された抗体がウイルス感染を防御できないため、ワクチン効果が減弱するという問題がある¹³⁻¹⁷。また、突如発生する新型インフルエンザは、そもそも流行株を予測することが困難である。そのため、ワクチン株と同一株（ホモローガス）の感染を予防するだけでなく、同一亜型株でも抗原性が異なる株（ヘテロローガス）の感染をも予防できる、交差反応性を示すワクチンの開発が世界的急務となっている。

一方で、もう 1 つの主要膜蛋白質である NA は、HA と比較して、ウイルス膜表面の蛋白質量が 5-10 倍少ないこともあり、スプリットワクチンや不活化全粒子ワクチンをワクチンした場合、NA ではなく HA に対する抗体が優位に産生されることが知られている^{17,18}。そのため、NA に着眼したワクチン開発は、HA と比較して非常に立ち遅れているのが現状である¹⁹。しかし、NA は抗原変異が起きにくいことから、近年、交差反応性を示すワクチン抗原として期待されている。そのため、NA のワクチン抗原としての有用性をより詳細に評価することは、ヘテロローガスな感染防御をも見据えた、より効果の高いワクチン開発を進めていく上で極めて重要な課題であると考えられる²⁰⁻²⁴。

さらに近年、鼻から抗原を噴霧する経鼻ワクチンが次世代型ワクチンとして期待されている。現行の大半のワクチンは、筋肉および皮下から抗原を投与する注射型ワクチンであり、血中や下気道に抗原特異的な IgG を誘導可能である。しかし鼻や上気道のような局所での免疫誘導能は極めて乏しい。そのため、新型コロナウイルスやインフルエンザウイルスのように上気道で感染・増殖するウイルスに対しては、あくまで肺炎などの重症化の阻止が主な目的であり、感染そのものを抑える効果はあまり期待できない。一方で、鼻からワクチンを噴霧する経鼻ワクチンは、注射型ワクチンと異なり、1) 鼻腔や肺など、上気道・下気道に病原体特異的 IgA を誘導することで、粘膜面での初発感染防御が可能な上、2) 病原体が粘膜面を突破してしまっても、血中でも病原体特異的 IgG を誘導し重症化を防ぐなど、2 段階の防御が可能である。しかし、経鼻ワクチンは、長年の研究にも関わらず、①抗原を鼻腔に投与しても、上皮細胞を通過することが困難であり、鼻腔リンパ組織への抗原送達効率が極めて乏しいために、粘膜免疫を効果的に誘導できないこと<経鼻ワクチン用の抗原送達キャリアが皆無>、②免疫応答の誘導には、免疫細胞を活性化するアジュバントが必要であるものの、脳への移行などが危惧されており、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こと<適切な経鼻アジュバントが皆無>など、未だ多くの問題が山積みされている。そのため、「安全・安心かつ効果的な免疫応答の惹起」という極めて単純な課題の

克服こそが、経鼻ワクチン創製に向けた最大の課題であると言える。

以上の観点から本研究では、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 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、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に成功したため、博士論文として纏める次第である。

本論

第一節 NA のワクチン抗原としての有用性評価

NA はウイルスの膜上でホモ 4 量体を形成しており、疎水性膜貫通領域、stalk 領域、酵素活性部位を有する head 領域で構成される²⁵⁻²⁷。シアリダーゼ活性を有する NA は、ウイルスと感染細胞のシアル酸を介した結合を切断する役割があり、ウイルスが感染細胞から遊離する際に必須の蛋白質である²⁸⁻³⁰。さらに最近の研究により、気道上皮細胞が産生するムチン層を NA が切断することで、上気道粘膜においてウイルスの侵入を助ける役割があることも明らかになっている^{11,31,32}。また、亜型間において、酵素活性部位はアミノ酸配列だけでなく、立体構造も保存されていることが知られている^{33,34}。そのため、NA のシアリダーゼ活性を阻害する中和抗体を、血中および感染初発部位である上気道粘膜に誘導することができれば、ウイルスの増殖のみならず、感染部位への侵入そのものを防ぐと共に、交差反応性をも有し得る可能性がある³⁵⁻³⁸。

現行のスプリットワクチンは、皮下に投与しており、血中の IgG は誘導できるものの、ウイルスの感染初発部位である上気道粘膜での免疫誘導能に乏しく、IgA がほとんど産生されない^{39,40}。そのため、現行のワクチンは、感染そのものを防御するのではなく、重症化の阻止が主な目的である。上述の通り、近年、鼻からワクチンを噴霧する経鼻ワクチンが全身レベルの免疫応答だけでなく、鼻腔や肺など、上気道・下気道に IgA を誘導することで粘膜面での初発感染防御が可能となることから次世代型ワクチンとして期待されている^{41,42}。インフルエンザワクチンにおいても、弱毒化ウイルスを用いた経鼻ワクチンは既に、米国 FDA により承認されている（Flumist, MedImmune Vaccines, Inc., USA）。さらに国内でも、一般財団法人 阪大微生物病研究会が、不活化全粒子を用いた経鼻ワクチンの開発を進めており、今後ますます発展していくと考えられる。その一方で、経鼻ワクチンにおける、NA のワクチン抗原としての有用性は未だほとんど評価されていない。

そこで本節では、組換え NA 蛋白質（rNA）を用い、rHA と比較しつつ、注射型ワクチンおよび経鼻ワクチンにおける抗体産生や感染防御能を評価することで、NA のワクチン抗原としての有用性を評価した。

【実験材料と方法】

試薬・ウイルス

Horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG は Merck Millipore (Burlington, MA, USA) より購入した。Horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgA は SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA) より購入した。Aluminium hydroxide gel (alum) は InvivoGen (San Diego, CA, USA) より購入した。Cyclic-di-GMP は Invivogen より購入した。K-type CpG ODN は GeneDesign (Ibaraki, Osaka, Japan) より購入した。Fetuin from bovine serum は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。Lectin from Arachis hypogaea (peanut) peroxidase conjugate (PNA-HRP) は Sigma-Aldrich より購入した。H1N1 influenza A viruses (strain: A/Puerto Rico/8/34) および H1N1 influenza A viruses (strain: A/New Caledonia/20/99) を一般財団法人阪大微生物病研究会 (Suita, Osaka, Japan) より分与して頂いた。また H1N1 influenza A viruses (strain: A/California/07/2009) は国立感染症研究所 浅沼秀樹先生より分与して頂いた。

実験動物

6 週齢の C57 BL/6j マウス (雄) は、日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは室温で 12 時間ごとの点灯、消灯のサイクルで飼育した。全ての動物実験は大阪大学微生物病研究所の動物実験施設で行い、大阪大学実験規程に準じた。

細胞培養

Expi293F 細胞、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来である MDCK 細胞を用いた。Expi293 細胞は Expi293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、8% CO₂、37 °C で振盪培養 (120 rpm) した。MDCK 細胞は、MDCK 培養用メディアウム (0.4% BSA、1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液添加 D-MEM/Ham's F-12 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)) を用いて、5% CO₂、37 °C で培養した。

NA および HA 発現ベクターの作製

HA 発現プラスミドは、A/California/07/2009 (Cal) 株 (GenBank accession number: ACV82259.1)、A/New Caledonia/20/99 (NC) 株 (GenBank accession number: LC120393.1)、または A/Puerto Rico/08/34 (PR8) 株 (GenBank accession number:

P03452.2) 由来の HA をコードする cDNA の配列を哺乳類細胞発現のために最適化し、N 末端および C 末端に、Nhe I と HindⅢの制限酵素認識配列を付加した配列を人工合成により作製し、Nhe I と HindⅢで切断した上で、哺乳類細胞発現用ベクターである pcDNA3.1 (-) プラスミドに挿入し、C 末端側に His タグを付加した。また HA の 3 量体形成を目的として、HA の C 末端側に T4 バクテリオファージ由来の 3 量体形成ドメインである foldon (GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL) を挿入した。NA 発現プラスミドは A/California/07/2009 株 (GenBank accession number: MN596847.1)、A/New Caledonia/20/99 株 (GenBank accession number : AJ518092.1)、または A/Puerto Rico/08/34 株 (GenBank accession number: LC120393.1) 由来の NA をコードする cDNA の配列を哺乳類細胞発現のために最適化し、N 末端および C 末端に、Nhe I と HindⅢの制限酵素認識配列を付加した配列を人工合成により作製し、それぞれ Nhe I と HindⅢで切断した後、pcDNA3.1 (-) プラスミドに挿入し、N 末端側に His タグを付加した。また NA の 4 量体形成を目的として、NA の N 末端側に Staphylothermus marinus 由来の tetrabrachion (GSIINETADDIVYRLTVIIDDRYESLKNLITLRADRLEMIINDNVSTILASG) を挿入した。

哺乳類細胞への遺伝子導入

哺乳類細胞への蛋白質発現プラスミドの遺伝子導入は、Expi293 Expression System (Thermo Fisher Scientific) を用いた。目的の蛋白質をコードする哺乳類細胞発現用プラスミド (30 µg) と ExpiFectamine 293 (80 µL) を混合し、室温 20 分で静置した後、25.5 mL で培養している Expi293F 細胞に、混合溶液を添加し、37 °C、8% CO₂ の条件下で、18 時間振盪培養 (120 rpm) した。その後、ExpiFectamine 293 transfection enhancer 1 および 2 をそれぞれ 1.5 mL、150 mL 添加した。rHA は 5 日、rNA は 10 日後に、上清から各蛋白質を精製した。

蛋白質精製および SDS-PAGE

トランスフェクション後、5-10 日間培養した Expi293 F 細胞を遠心機で 8,000 × g、4 °C で 10 分間遠心し、その後上清を回収し、Ni-Sepharose HisTrap FF column (GE Healthcare, Diegem, Belgium) を取り付けた Akta explorer chromatography system (GE Healthcare) を用いて精製した。まず、回収してきた上清を、His Trap FF column に流し、His タグ付き蛋白質をカラムに吸着させた。その後、イミダゾール (終濃度 : 0.5 M) を含んだ 20 mM リン酸ナトリウム溶液で溶出した。次に、溶出してきた蛋白質溶液を、Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off, 10 kDa, Merck Millipore) を用いて 500 µL ま

で濃縮し、ゲル濾過カラムである Superose 6 Increase 10/300 GL column (GE Healthcare) に流した。A high-molecular-weight standard kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて、目的の蛋白質画分だと推定される画分のみを Amicon Ultra centrifugal filters で濃縮した。さらに、濃縮蛋白質を 5% メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich) を含む 2 × sample buffer (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と混合し、95 °C で 5 分間熱処理をした後、4%–15% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gel (Bio-Rad) に流し、電気泳動した。

注射型ワクチンにより誘導された抗体の血漿中抗体価評価

C57 BL/6J マウスの尾根皮下に 0、21 日目で Cal 株由来単量体 rNA、Cal 株由来 4 量体 rNA、または Cal 株由来 3 量体 rHA を alum (250 µg/mouse) と共に 1.0 µg/mouse で投与した。投与試料は PBS (-) で調製し、マイジェクター (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) を用いて 50 µL/mouse で投与した。最終免疫から 7 日後に眼底より血漿を回収し、Cal 株由来 rHA または rNA 特異的抗体価および Cal 株特異的抗体価を ELISA により評価した。Cal 株由来 rHA または rNA (終濃度 1 µg/mL) を 0.1 M Sodium Carbonate buffer (pH 9.6) を用いて希釈し、96 well half area microplates (Corning Inc., Corning, NY, USA) に添加し、4 °C で 1 晩静置し、固相化した。固相したプレートに 0.05% PBS/Tween20 (PBS-T) で 3 回洗浄した後、1% Block Ace (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を添加し、1 時間室温で静置した。先程と同様に洗浄した後、マウスの眼底から採血した血漿サンプルを、0.4% Block Ace で希釈し、プレートに添加し、2 時間室温で静置した。2 時間後、プレートを洗浄し、0.1% Block Ace で 5000 倍希釈した horseradish-peroxidase 標識 goat anti-mouse IgG (Merck Millipore) を添加し、1 時間室温で静置した。その後、0.8 mM tetramethyl benzidine (Nacalai Tesque) を用いて発色し、2 N H₂SO₄ により発色反応を停止後、microplate reader (Power Wave HT, BioTek, Winooski, VT, USA) を用いて OD_{450–570} を測定し、血漿中の抗体価を評価した。

経鼻ワクチンにより誘導された抗体の鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液、血漿中の抗体価評価

C57 BL/6J マウスの鼻に、0、21 日目で Cal 株由来 rNA (5.0 µg/mouse) もしくは Cal 株由来 rHA (5.0 µg/mouse) を c-di-GMP (2.0 µg/mouse) と共に投与した。投与試料は PBS (-) で調製し、ピペットマンを用いて片鼻 3.0 µL ずつ、計 6.0 µL/mouse で投与した。最終免疫から 7 日後に眼底より血漿を回収し、さらに鼻腔洗浄液、肺胞洗浄液を回収し、Cal 株由来 rNA または rHA 特異的抗体価を ELISA により評価した。Cal 株由来 rNA または rHA (終濃度 1 µg/mL) を 0.1 M Sodium Carbonate buffer (pH 9.6) を用いて

希釈し、96 well half area microplates に添加し、4 °C で 1 晩静置し、固相化した。固相化したプレートを 0.05% PBS-T で 3 回洗浄した後、1% Block Ace を添加し、1 時間室温で静置した。先程と同様に洗浄した後、マウスから回収した血漿サンプルを、0.4% Block Ace で希釈し、プレートに添加し、2 時間室温で静置した。2 時間後、プレートを洗浄し、0.1% Block Ace で 5000 倍希釈した horseradish-peroxidase 標識 goat anti-mouse IgA、もしくは Horseradish-peroxidase 標識 goat anti-mouse IgG を添加し、1 時間室温で静置した。その後、0.8 mM tetramethyl benzidine を用いて発色し、2 N H₂SO₄ により発色反応を停止後、microplate reader を用いて OD₄₅₀₋₅₇₀ で測定し、各抗体価を評価した。

鼻腔洗浄液の回収

C57 BL/6J マウスの鼻に、0、21 日目で rNA (5.0 µg/mouse) もしくは rHA (5.0 µg/mouse) を c-di-GMP (2 µg/mouse) と共に投与した。投与試料は PBS (-) で調製し、ピペットマンを用いて片鼻 3.0 µL ずつ、計 6.0 µL/mouse で投与した。最終免疫から 7 日後に腎動脈切断による脱血によりマウスを安楽死させた。その後、マウス頸部を切断し、下顎骨を切除した後、上顎側に露出した鼻咽腔から鼻孔にむけて、ピペットマンを用いて、200 µL の PBS を注入し、鼻孔より流出した液を回収した。この操作を 2 回した後、回収した計 400 µL の液を 600 × g、4 °C で 5 分間遠心し、その上清を鼻腔洗浄液とした。

肺胞洗浄液の回収

C57 BL/6J マウスの鼻に、0、21 日目で rNA (5.0 µg/mouse) もしくは rHA (5.0 µg/mouse) を c-di-GMP (2 µg/mouse) と共に投与した。投与試料は PBS (-) で調製し、ピペットマンを用いて片鼻 2.5 µL ずつ、計 5.0 µL/mouse で投与した。rNA および rHA を c-di-GMP と共に経鼻投与した後、最終免疫から 7 日後に腎動脈切断による脱血によりマウスを安楽死させた。その後、横隔膜を切除し気管を露出させ、22G 留置針 (Terumo Corporation) を気管に穿刺し、カテーテルを挿管した。挿管後、気管を 5-0 縫合糸 (Alfresa Pharma Corporation, Osaka, Japan) により結紮した。1 mL シリンジ (Terumo Corporation) を用い、肺内に PBS を 0.7 mL 注入し、シリンジを用いて流入させた PBS を回収した。続けて、PBS を同様の方法で 0.5 mL 投与し、回収することにより肺胞洗浄液を約 1 mL 回収した。肺胞洗浄液は 600 × g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を回収し、ELISA により肺胞洗浄液中 IgG を測定した。

インフルエンザウイルス感染

上気道感染：初回免疫から 31 日後、Cal ウイルス (6.0×10^6 TCID₅₀/mL)、PR8 ウイルス (1.2×10^5 TCID₅₀/mL)、または NC ウイルス (1.9×10^7 TCID₅₀/mL) を、それぞれ片鼻 2.5 μ L ずつ経鼻投与し、感染させた。さらに、感染 3 日後の鼻腔洗浄液を回収し、MDCK 細胞を用いて、鼻腔洗浄液中のウイルス量を評価した。

下気道感染：初回免疫から 31 日後、Cal ウイルス (1.0×10^6 TCID₅₀/mL)、または NC ウイルス (3.2×10^6 TCID₅₀/mL) を、片鼻 15 μ L ずつ経鼻投与し、感染させ、体重減少と生存率を評価した。また人道的観点から、感染 0 日からの体重減少率が 25% となった点をエンドポイントと設定した。

ELLA (Enzyme-linked Lectin Assay) を用いたシアリダーゼ活性評価

糖蛋白質である Fetuin を、0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) で終濃度 50 μ g/mL に調製し、96 well half area microplates に添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 晩静置し、固相化した。次に、0.05% PBS-T で 6 回洗浄した後、rNA を DPBS (+ 0.9 mM Ca^{2+} , 0.5 mM Mg^{2+} , 1% BSA) で段階希釈し、プレートに添加した。16-18 時間、37 $^{\circ}$ C で静置し、再び 0.05% PBS-T で洗浄した後、PBS で 1 mg/mL に希釈した horseradish-peroxidase 標識 Peanut agglutinin (PNA) をプレートに添加し、室温で 1 時間静置した。先ほどと同様に洗浄した後、0.8 mM tetramethyl benzidine を用いて発色し、2 N H_2SO_4 により発色反応を停止後、microplate reader を用いて OD₄₅₀ で吸光度測定し、NA のシアリダーゼ活性を評価した。

上気道感染後の鼻腔洗浄液中のウイルス量評価

上気道にウイルスを感染し、3 日後の鼻腔洗浄液を、0.4% BSA、1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液、2 μ g/mL アセチル化トリプシンを添加した D-MEM/Ham's F-12 メディウムを用いて $10^{0.5}$ 倍ずつ段階希釈し、PBS で洗浄した MDCK 細胞に添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、飽和蒸気圧下で 3 日間培養した。培養した細胞は室温にて 4% paraformaldehyde を添加し、10 分間静置することで固定した後に、アミドブラック染色液を添加し 30 分室温で静置し染色した。染色液を水で洗浄した後に 0.1 N NaOH を添加し、OD₆₃₀ を microplate reader により測定した。

統計解析

統計解析には Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。グラフは平均値と標準偏差 (SD) で表し、有意差検定は Tukey's test を用いた。生存率は二群間の Kaplan-Meier 曲線を log-rank test で検定して有意差を評価した。統計学的有意差は、 $P < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【結果】

単量体 rNA および 4 量体 rNA のシアリダーゼ活性評価および抗体産生評価

本検討では、ウイルス膜上の NA を模倣するため、4 量体形成ドメインである tetrabrachion を付加した 4 量体 rNA を作製した (Figure 1)。まず、4 量体形成ドメインを付加していない単量体 rNA とワクチン効果を比較することで、4 量体 rNA がワクチン抗原として適切かを評価した。そこで、季節性インフルエンザウイルス (H1N1) の一つである A/California/07/2009 (Cal 株) 由来単量体および 4 量体 rNA を、Expi293F 細胞により発現させ、His trap カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。その後、ゲル濾過カラムおよび SDS-PAGE を用いて、目的の蛋白質の精製度などを評価した。その結果、ゲル濾過カラムにおいて、4 量体 rNA は 200 kDa の位置に、単量体 rNA は 50kDa の位置にピークが観察された (Figure 2a)。また、SDS-PAGE 解析では、単量体および 4 量体 rNA においてそれぞれ、40 kDa、50 kDa の単一バンドとして確認された (Figure 2b)。また、rHA では 70 kDa の単一バンドが確認された (Figure 2b)。以上の結果は、純度の高い目的蛋白質が精製できており、4 量体ドメインにより適切な 4 量体 rNA が形成されていることを示している。次に、ELLA により rNA のシアリダーゼ活性を評価した。ELLA は、糖蛋白質である Fetuin の末端に存在するシアル酸が、NA のシアリダーゼ活性により切断されることを利用した評価系である。その結果、4 量体 rNA ではシアリダーゼ活性を示したものの、単量体 rNA ではシアリダーゼ活性を示さなかった (Figure 2c)。

次に、ワクチン後の、抗原特異的な抗体産生を評価するため、単量体 rNA または 4 量体 rNA を水酸化アルミニウム (alum) と共に皮下投与し、血漿中のウイルス特異的抗体価および rNA 特異的抗体価を評価した。その結果、4 量体 rNA ワクチン群において、非ワクチン群および単量体 rNA ワクチン群と比較して、4 量体 rNA 特異的抗体価および Cal ウイルス特異的抗体価の有意な上昇が認められた (Figure 2, d and e)。さらに、これらの感染防御効果を評価するため、ワクチン後に、ホモローガスなウイルスである Cal ウイルスを、片鼻 15 μ L ずつ経鼻より下気道感染させた。下気道感染は、肺まで達するような多量の液量 (片鼻 15 μ L ずつ) でウイルスを感染させることで、重症化し、肺炎などの合併症が誘発された状態を模しており、体重推移や生存率でのワクチン効果が評価可能となる。その結果、非ワクチン群では、体重が経日的に減少し、生存率が 40%まで低下した (Figure 2, f and g)。また、単量体 rNA ワクチン群は、非ワクチン群と同程度体重が減少し、生存率が 40%まで低下するのに対して、4 量体 rNA ワクチン群では、体重減少はほとんど認められず、全てのマウスにおいて生存が認められた (Figure 2, f and g)。以上の結果より、4 量体 rNA は単量体 rNA と比較して、ワクチン抗原として優れていることが示された。

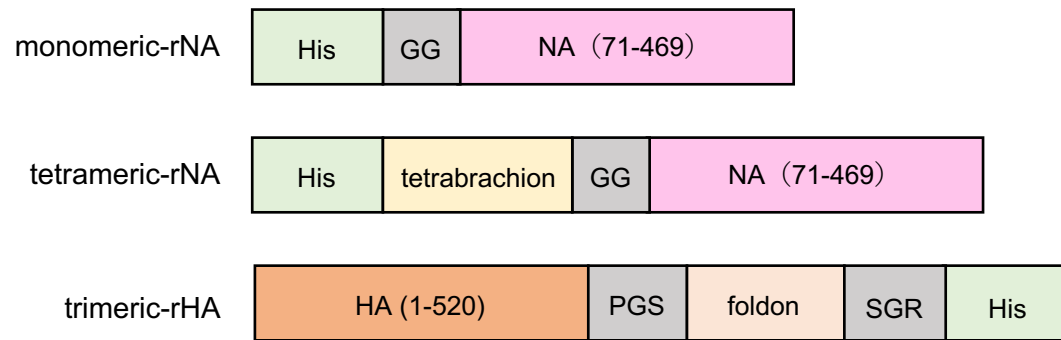


Figure 1. Construction of recombinant proteins.

Schematic primary structures of monomeric-rNA, tetrameric-rNA, and trimeric HA with foldon. Each protein was fused to His tag in N- and C-terminal regions, respectively.

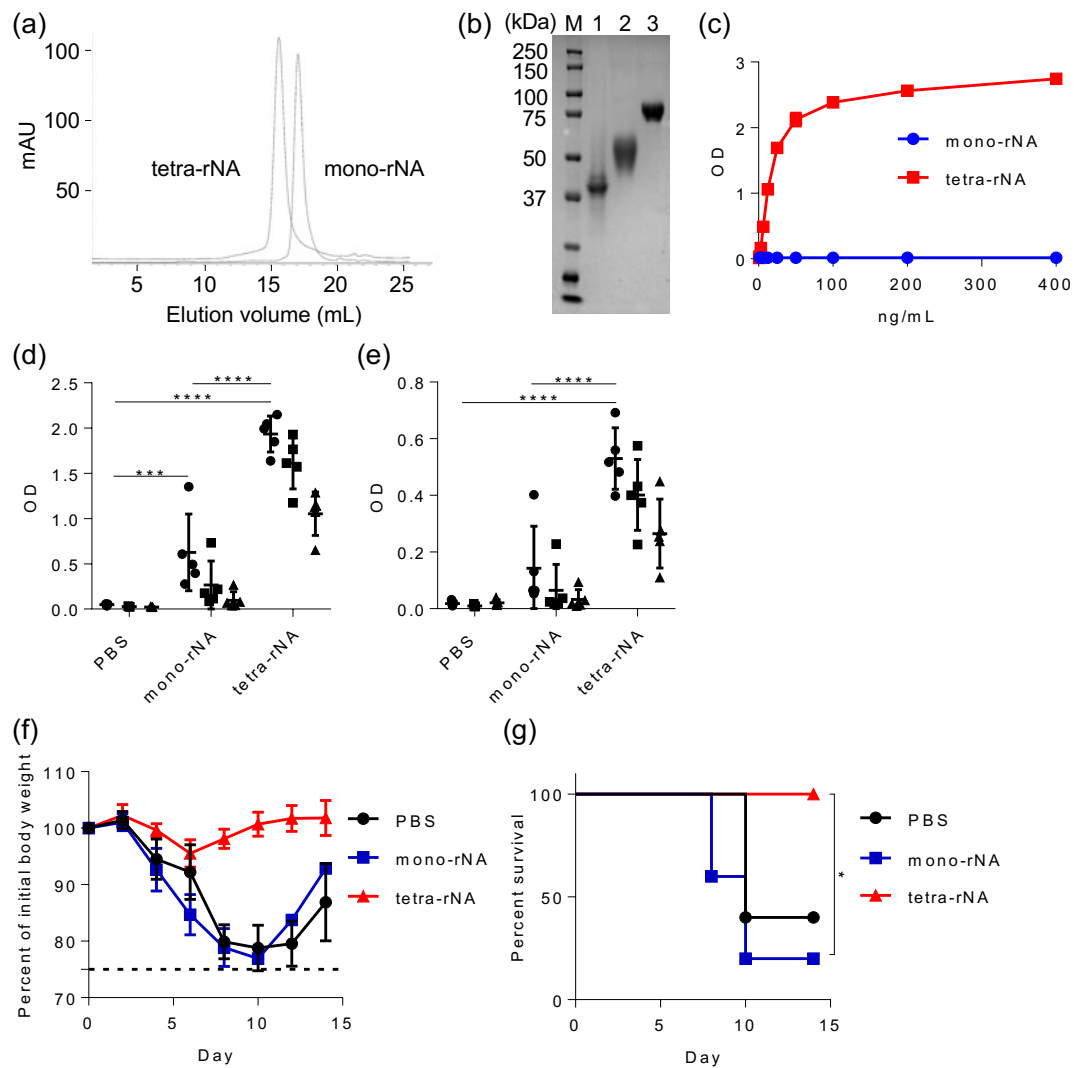


Figure 2. Potential of recombinant tetrameric NA as a vaccine antigen. (a) Monomeric recombinant NA (rNA) and tetrameric rNA from Cal7 were generated in Expi293F cells and analyzed via size-exclusion chromatography. (b) Purified rNAs and rHA were analyzed through SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue. M, marker; lane 1, monomeric rNA from Cal7; lane 2, tetrameric rNA from Cal7; lane 3, rHA from Cal7. (c) The sialidase activity of serially diluted rNAs was evaluated through enzyme-linked lectin assay ($n = 3$). (d–g) Mice ($n = 5$) were immunized subcutaneously with monomeric rNA from Cal7 (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) plus alum or tetrameric rNA from Cal7 (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) plus alum. At 7 days after final immunization, plasma levels of (d) tetrameric rNA-specific IgG and (e) Cal7 virus-specific IgG were evaluated by using ELISA. We used 160- (●), 800- (■), and 4000- (▲) fold diluted plasma. At 10 days after final immunization, mice were challenged with Cal7 (homologous virus) and the percentage changes in (f) body weight and (g) survival were monitored. Data are given as means \pm SD. (d and e) Significant differences (***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; Tukey's test) were analyzed only for the 160-fold-diluted samples. (g) *, $P < 0.05$ according to comparison of Kaplan–Meier curves by using the log-rank test.

rNA のワクチン抗原としての有用性評価（注射型ワクチン）

次に、注射型ワクチンにおける rNA のワクチン抗原としての有用性を rHA と比較した。また、これ以降の検討では rNA は 4 量体 rNA を、rHA は 3 量体 rHA を用いている。また、一般的に蛋白質抗原をワクチンする際は蛋白質量を指標に投与されることを鑑みて、両ワクチン抗原の比較は蛋白質量で揃えて投与した。まず、rNA または rHA を 1 μ g/mouse で alum と共に皮下投与した際の、血漿中における Cal 株由来 rNA 特異的抗体価および rHA 特異的抗体価を評価した。当然の結果ではあるが、rNA 特異的抗体価においては、rNA ワクチン群で、非ワクチン群と比較して抗体価の有意な上昇が確認された一方で、rHA ワクチン群では、rNA 特異的抗体価の上昇は認められなかった (Figure 3a)。また、rHA 特異的抗体価は、rHA ワクチン群において、非ワクチン群と比較して抗体価の有意な上昇が確認された (Figure 3b)。次にワクチン後、ホモローガスな株である Cal ウイルスを、片鼻 15 μ L ずつ、経鼻より下気道感染させた。その結果、非ワクチン群では、経日的に体重が減少するのに対して、rHA および rNA ワクチン群は、体重減少がほとんど認められず、全匹生存した (Figure 3, c and d)。次に、ヘテロローガスな感染に対する交差反応性を評価するため、抗原量を 10 μ g に増加したうえで、rNA または rHA を alum と共にマウスに皮下投与した。その後、ヘテロローガスな株である H1N1 型 A/NewCaledonia/20/99 (NC) 株を片鼻 15 μ L ずつ、下気道に感染させた。その結果、非ワクチン群は、体重が経日的に減少し、生存率が 10%にまで低下した (Figure 3, e and f)。また、rNA ワクチン群では、rHA ワクチン群と比較して体重減少の有意な抑制が認められた (Figure 3e)。さらに rHA ワクチン群では 80%まで生存率が低下することが確認された一方で、rNA ワクチン群では全匹の生存が確認された (Figure 3f)。

次に、注射型ワクチンにおける上気道感染に対する防御効果を評価した。上気道感染は、下気道に達しない程度の液量（片鼻 2.5 μ L ずつ）でウイルスを感染させるため、実際の季節性インフルエンザ感染と同様に、上気道粘膜での感染を観察し伴っており、より現実に近い感染を模倣している。また下気道感染と違い、感染に体重減少は認められないため、感染 3 日後に鼻腔洗浄液を回収し、ウイルス量を測定することで、ワクチン効果を評価した。その結果、ホモローガスな感染であるにも関わらず、rNA および rHA ワクチン群のいずれにおいても PBS 投与群と比較してウイルス量の減少は認められなかった (Figure 3g)。

以上の結果より、注射型ワクチンでは、rNA および rHA ワクチン群において、ホモローガスな下気道感染に対しては同程度のワクチン効果を示す一方で、ヘテロローガスな感染に対しては、rNA ワクチン群の方が、rHA ワクチン群と比較して交差反応性が高いことが示された。一方で注射型ワクチンでは、上気道感染に対してほとんど防御効果を示さないことが明らかとなった。

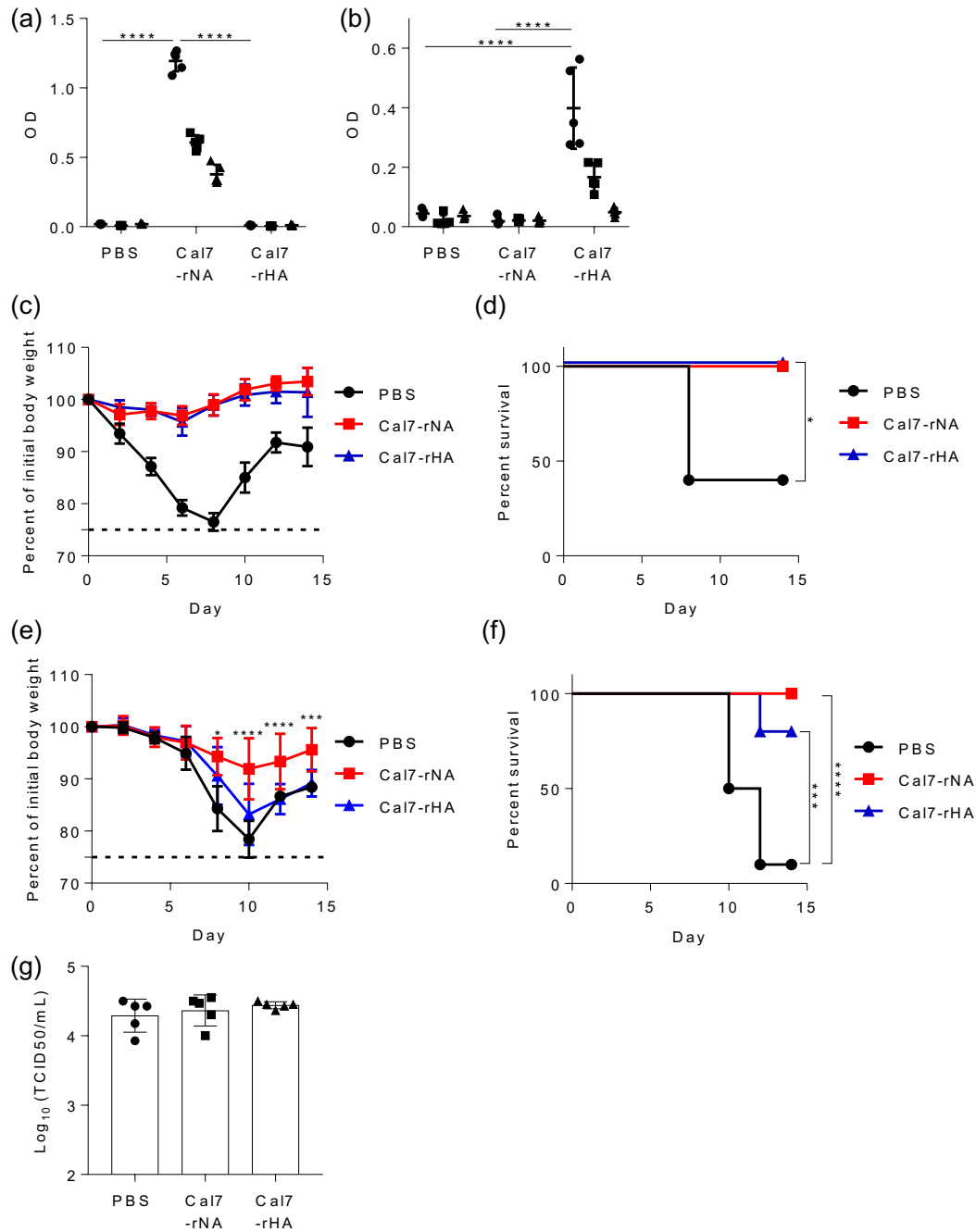


Figure 3. Comparison of rNA and rHA from Cal7 as vaccine antigens via subcutaneous immunization. Mice were immunized subcutaneously with Cal7-rNA plus alum or Cal7-rHA (a-d, 1 μ g/mouse; e-g, 10 μ g/mouse) plus alum. Plasma levels of (a) Cal7-rNA- and (b) Cal7-rHA-specific IgG were evaluated by ELISA of 160- (●), 800- (■), and 4000- (▲) fold diluted samples. At 10 days after the final immunization, mice were challenged with (c and d) Cal7 (homologous virus) or (e and f) NC20 (heterologous virus) to achieve lower respiratory tract infection. The percentage changes in (c and e) body weight and (d and f) survival were monitored after challenge with viruses. (g) At 10 days after the final immunization, mice were challenged with Cal7 (homologous virus) to cause upper respiratory tract infection. At 3 days after challenge, virus titers in nasal wash samples were evaluated. (a-d, g) $n = 5$ per group; (e and f) $n = 10$ per group. (a-g) Data are given as means \pm SD. (a and b) Significant differences (****, $P < 0.0001$; Tukey's test) were analyzed only for the 160-fold-diluted samples. (d) *, $P < 0.05$ vs. PBS-treated control mice, according to comparison of Kaplan–Meier curves by using the log-rank test. (e) *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ between Cal7-rNA-immunized mice and Cal7-rHA-immunized mice as indicated by using Tukey's test. (f) ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ according to comparison of Kaplan–Meier curves by using the log-rank test.

rNA のワクチン抗原としての有用性評価（経鼻ワクチン）

次に、経鼻ワクチンにおける rNA のワクチン効果を評価した。アジュバントは、ヒトでは使用できないものの、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 STING の活性化リガンドである c-di-GMP を用いた。なお、抗原の経鼻投与において、多くの研究で、20 μ L という下気道まで到達する量が用いられている。しかし、この液量は、ヒトにおける投与を模倣しているとは言い難いため、本検討においては、片鼻 3.0 μ L という少量で投与することで、より実際の臨床に近い形で、経鼻ワクチンの有用性を評価した。

まず、経鼻ワクチンにより全身レベルおよび上気道・下気道において免疫応答が誘導されているかを評価するため、Cal 株由来 rNA または Cal 株由来 rHA を c-di-GMP と共に経鼻投与した際の、血漿、鼻腔洗浄液、および肺胞洗浄液中の抗体価を評価した。その結果、鼻腔洗浄液中では、非ワクチン群と比較して、rNA ワクチン群において rNA 特異的 IgA が、rHA ワクチン群においては、rHA 特異的 IgA の有意な上昇が認められた（Figure 4, a and d）。また、血漿および肺胞洗浄液中では、非ワクチン群と比較して、rNA ワクチン群において rNA 特異的 IgG が、rHA ワクチン群では rHA 特異的 IgG の有意な上昇が認められた（Figure 4, b, c, e, and f）。さらにヘテロローガスな株である PR8 株由来 rNA および rHA に対する交差反応性を評価したところ、rHA ワクチンではホモローガスな株と比較して鼻腔洗浄液、血漿、および肺胞洗浄液中抗体価が極端に減少することが示された（Figure 4, d-f）。一方で、rNA ワクチンではホモローガスな株と比較して鼻腔洗浄液および血漿中抗体価の有意な減少が認められたものの、rHA ワクチン群と比較して PR8 に対する交差反応性が高いことが示唆された（Figure 4, a and b）。これらの結果より、経鼻ワクチンによって、鼻腔内には抗原特異的 IgA が誘導され、さらに血中および肺胞中では抗原特異的 IgG が誘導されることが示された。さらに、rHA ワクチンで誘導される抗体と比較して、rNA をワクチンした際に誘導される抗体は交差反応性が高いことが示唆された。

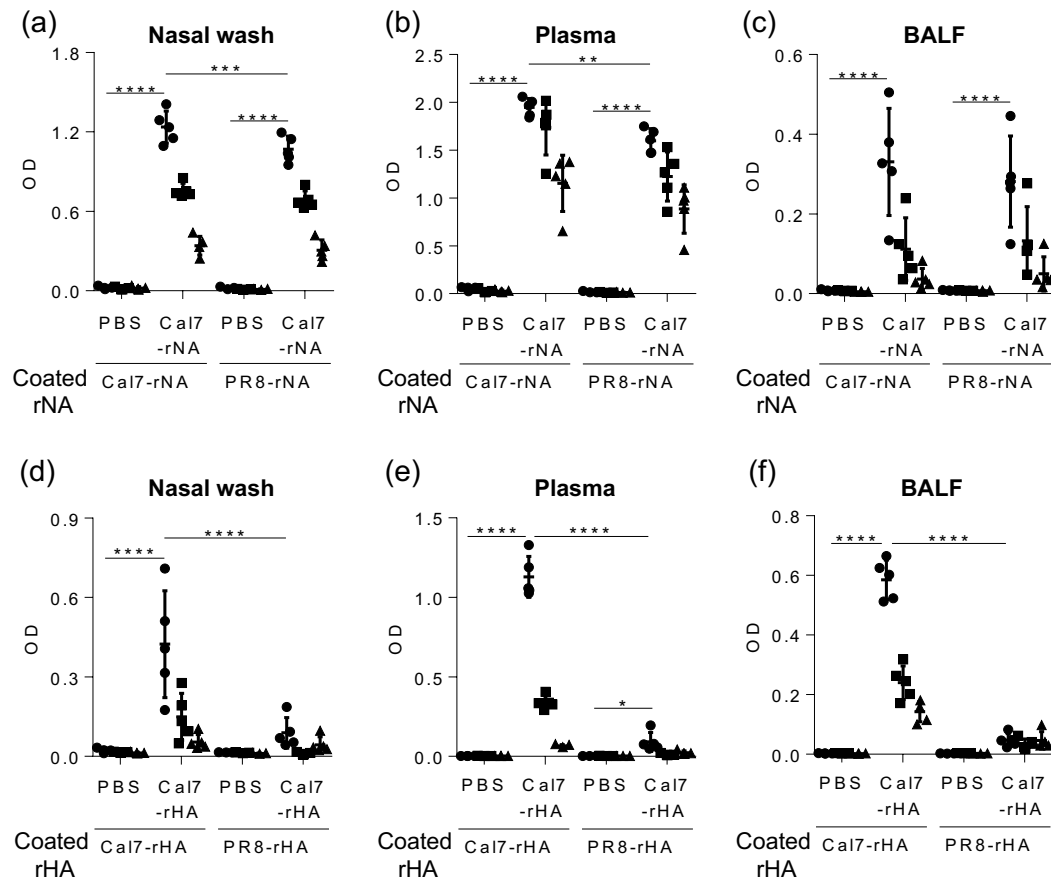


Figure 4. Antibody responses after intranasal immunization with rNA or rHA. Mice were immunized intranasally with Cal7-rNA (5 μ g/mouse) plus c-di-GMP or Cal7-rHA (5 μ g/mouse) plus c-di-GMP. (a-c) The levels of Cal7-rNA-specific and PR8-rNA-specific (a) IgA in nasal wash, (b) IgG in plasma, and (c) IgG in BALF from Cal7-rNA-immunized mice were evaluated by using ELISA at 7 days after final immunization. (d-f) The levels of Cal7-rHA-specific and PR8-rHA-specific (d) IgA in nasal wash, (e) IgG in plasma, and (f) IgG in BALF from Cal7-rHA-immunized mice were evaluated by using ELISA at 7 days after the final immunization. We used (a and d) 1- (●), 2- (■), and 4- (▲) fold dilutions of nasal wash samples, (b and e) 160- (●), 800- (■), and 4000- (▲) fold dilutions of plasma samples, and (c and f) 5- (●), 25- (■), and 125- (▲) fold dilutions of BALF samples. (a-f) *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ as indicated by using Tukey's test.

次に、誘導された rNA および rHA 特異的 IgA、IgG の感染防御効果を評価するため、経鼻ワクチンしたマウスに、ホモローガスな株である Cal 株を上気道感染させ、3 日後、鼻腔洗浄液中のウイルス量を測定した。その結果、非ワクチン群と比較して、rNA および rHA ワクチン群において、ウイルス量の有意な減少が認められた (Figure 5a)。また、rNA ワクチン群と rHA ワクチン群においては、有意な違いは観察されなかった。さらにワクチン後、Cal 株ではなくヘテロローガスな株である PR8 株を感染させたところ、rHA ワクチン群ではウイルス量が全く減少しないのに対して、rNA ワクチン群では、非ワクチン群および rHA ワクチン群と比較してウイルス量の有意な減少が認められた (Figure 5b)。以上の結果より、経鼻ワクチンでは、rNA ワクチン群および rHA ワクチン群において、ホモローガスな

上気道感染に対しては同程度のワクチン効果を示す一方で、ヘテロローガスな感染に対しては、rNA ワクチン群の方が rHA ワクチン群と比較して交差反応性が高く、ホモローガスな株に対するワクチン効果と同等レベルの優れたワクチン効果を示した。そこで、他の株由来の rNA をワクチン抗原として用いても、上記と同様のワクチン効果が認められるかを評価した。本検討では、NC 株由来 rNA および rHA をワクチン抗原として用いて評価した。まず NC 株由来 rNA および rHA をワクチンした後、ホモローガスな株である NC 株を上気道感染させ、先程と同様に鼻腔洗浄液中のウイルス量を測定した。その結果、非ワクチン群と比較して、rNA および rHA ワクチン群において同程度のウイルス量の減少が認められた (Figure 5c)。さらにヘテロローガスな株である Cal 株を上気道感染させたところ、rNA ワクチン群においてのみ、非ワクチン群と比較してウイルス量の有意な減少が認められた (Figure 5d)。

次に、Cal 株由来 rNA および rHA を経鼻ワクチン後、インフルエンザウイルスを下気道感染させ、体重変化および生存率により感染防御効果を評価した。ホモローガスな Cal 株を下気道感染させたところ、非ワクチン群は、経日的に体重が減少していき、感染から 8 日目で全匹死亡した (Figure 5, e and f)。また rHA ワクチン群では、非ワクチン群と比較して、若干の体重減少の抑制および生存率の上昇が認められた (Figure 5, e and f)。一方、rNA ワクチン群においては、非ワクチン群と比較して、体重減少の抑制および有意な生存率の上昇が認められた (Figure 5, e and f)。以上の結果より、rNA を用いた経鼻ワクチンは、上気道感染のみならず、ホモローガスな下気道感染をも防御し得ることが示された。ほとんどの成人が過去にインフルエンザに感染した経験があり、HA のみならず NA に対する抗体を保有していることが近年明らかとなりつつある^{19,43}。そこで、罹患経験を持つ人に対するブーストワクチンとして rNA を利用できないか検討した。罹患歴がある人を模倣して、マウスの上気道に Cal 株を感染させ、感染から 30 日経過したマウスに rNA および rHA を、アジュバントを用いずに経鼻ワクチンした。その結果、Cal 株感染によって、未感染マウスと比較して、HA 特異的抗体産生の上昇が認められたものの、rNA 特異的抗体価の上昇はほとんど認められなかった (Figure 6, a-d)。一方で、鼻腔洗浄液および血漿中のいずれにおいても、rNA をブーストしたマウスにおいて、PBS ブースト群と比較して、rNA 特異的抗体価の有意な上昇が認められた (Figure 6, a and b)。また、rHA をブーストしたマウスでは、rHA 特異的抗体価の有意な上昇が認められなかった。そこでブースト後、PR8 株を上気道感染させ鼻腔洗浄液中のウイルス量を測定した。その結果、rNA ブーストマウスにおいて、コントロール群および rHA ブースト群と比較して、ウイルス量の有意な減少が認められた (Figure 6e)。以上の結果より、罹患歴があるマウスにおいては、アジュバントを用いずとも rNA をブーストすることで、強力に rNA 特異的抗体産生を上昇させ、ヘテ

□□ーガスな上気道感染を防御し得ることが示唆された。

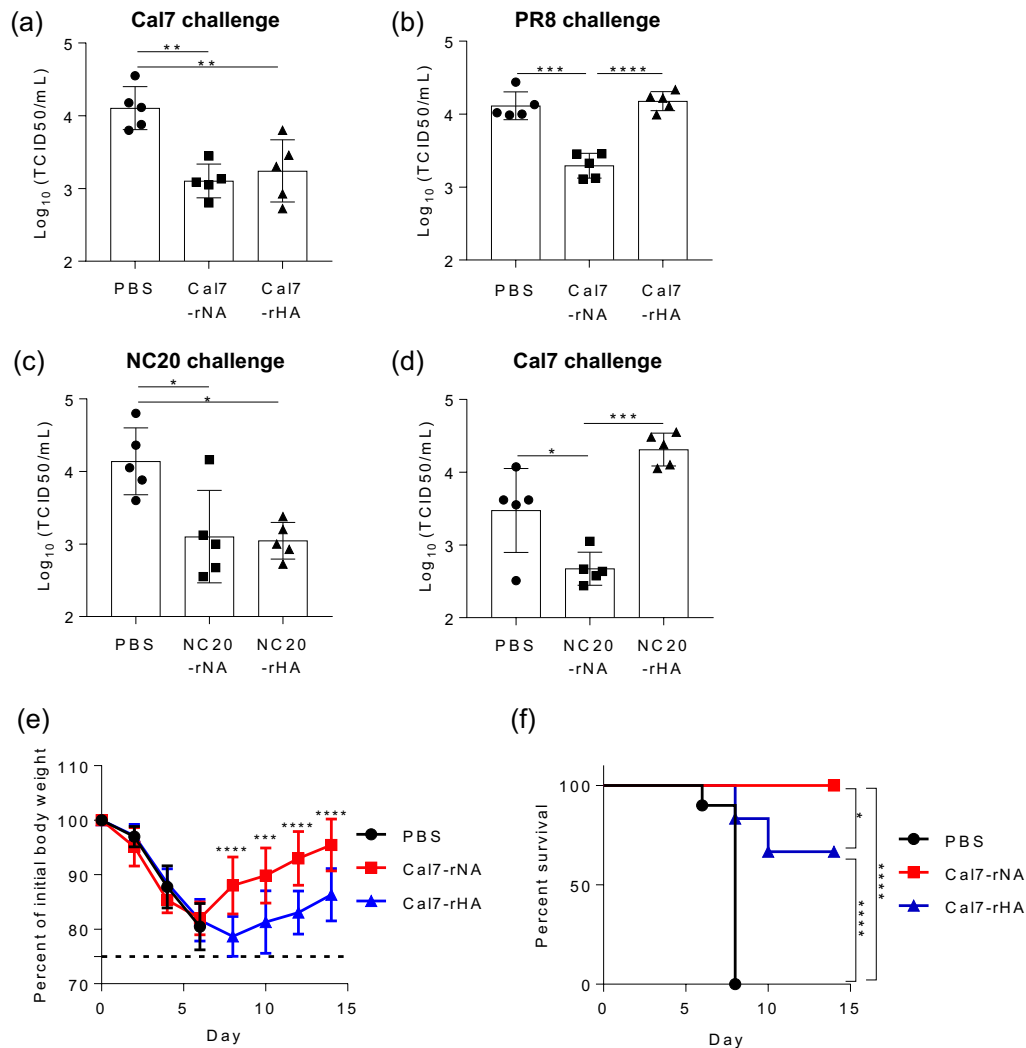


Figure 5. Protective effects against influenza virus after intranasal immunization with rNA or rHA. Mice were immunized intranasally with (a, b, e, and f) Cal7-rNA plus c-di-GMP or Cal7-rHA (5 µg/mouse) plus c-di-GMP or (c and d) NC20-rNA plus c-di-GMP or NC20-rHA (5 µg/mouse) plus c-di-GMP. At 10 days after final immunization, mice were challenged with (a) homologous Cal7, (b) heterologous PR8, (c) homologous NC20, or (d) heterologous Cal7 to achieve upper respiratory tract infection. (a-d) At 3 days after challenge, virus titers in nasal wash samples were evaluated. (e and f) At 10 days after the final immunization, mice were challenged with Cal7 (homologous virus) to achieve lower respiratory tract infection. The percentage changes in (e) body weight and (f) survival were monitored after challenge with virus. (a-d) $n = 5$ per group; (e and f) $n = 10$ per group. (a-e) Data are given as means \pm SD ($n = 5$ per group). (a-d) *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ according to Tukey's test. (e) ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ between Cal7-rNA-immunized mice and Cal7-rHA-immunized mice as indicated by using Tukey's test. (f) *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ according to comparison of Kaplan–Meier curves by using the log-rank test.

これまでの結果より、rNA は rHA と比較して交差反応性が高いことが示された。特に経鼻ワクチンにおいて、rNA はヘテロローガスな株に対してもホモローガスな株と同等レベルの優れた交差反応性を示したことから、経鼻ワクチンと注射型ワクチンにより誘導される抗体の質が異なる可能性が考えられた。そこで、経鼻ワクチンおよび注射型ワクチンにより誘導される抗体の認識エピトープを評価した。まず、抗体の認識部位を評価するために、過去の文献を参考に、アミノ酸の 1 箇所に変異を入れた 26 種類の変異体 rNA を、哺乳類細胞を用いて作製した¹⁹。野生型 rNA をマウスの鼻および皮下に投与し、回収してきた血漿 IgG および鼻腔洗浄液中 IgA の、各変異体 rNA に対する反応性を ELISA により評価した。なお、野生型 rNA と比較して、ある変異体 rNA に対する反応性が低下することとは、その部位に対する抗体が優位に誘導されていることを示している。また、本検討では野生型 rNA に対する抗体価を 100%としており、抗体価が 50%以下に低下した変異体 rNA の箇所に抗体が誘導されたと定義した。その結果、注射ワクチン後の血漿中 IgG では、Q250A、V264T、N273D、V338M、V338A、および S339A の変異体 rNA において、野生型 rNA と比較して 50%以下にまで抗体価の減少が認められた (Figure 7a)。また、経鼻ワクチン後の血漿中 IgG および血漿中 IgA においても同様の傾向が認められた (Figure 7, b and c)。一方で、経鼻ワクチン後の鼻腔洗浄液中 IgA では、血漿 IgG および IgA で観察された Q250A、V264T、N273D、V338M、V338A、S339A に加えて、N309S、N341D、P377A、S388A、I396T、および N397K の変異体 rNA において抗体価の減少が認められた。これらの結果から、鼻腔洗浄液中 rNA 特異的 IgA が、血漿中の NA 特異的 IgG や IgA よりも多くのエピトープを認識していることが示された。

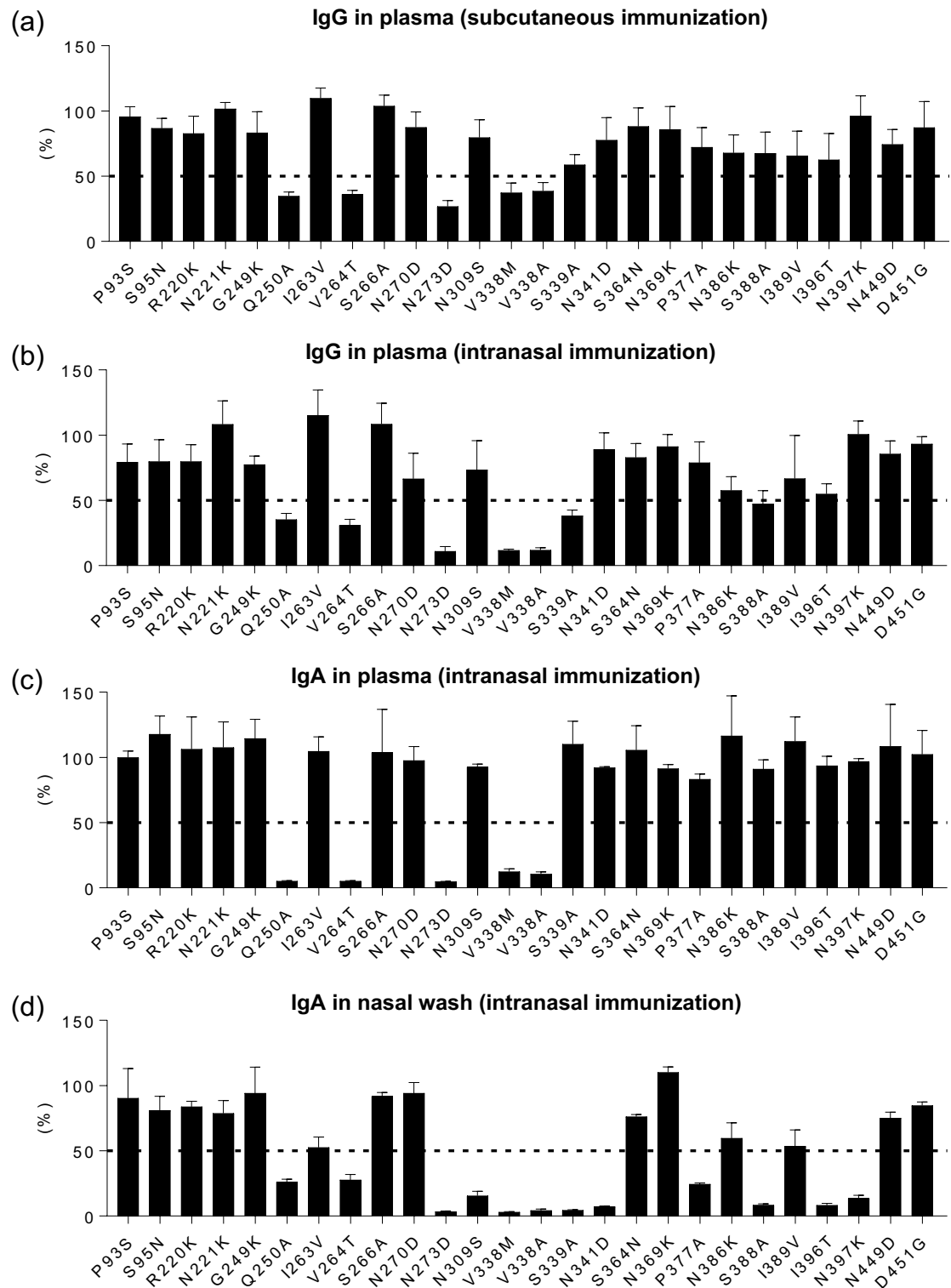


Figure 7. Identification of epitopes recognized by anti-NA antibodies. Levels of mutant rNA-specific (a) IgG in plasma from mice immunized subcutaneously with Cal7-rNA plus alum and of mutant rNA-specific (b) IgG in plasma, (c) IgA in plasma, and (d) IgA in nasal wash from mice immunized intranasally with Cal7-rNA plus c-di-GMP were evaluated by using ELISA. The ELISA signals for mutant rNAs relative to that for wild-type rNA are shown as percentages.

【考察】

一般的に、抗原が多量体化されることで、B 細胞受容体の架橋を促進し、B 細胞活性化と抗原特異的抗体応答の増加を促すことが知られている⁴⁴⁻⁴⁶。本検討において、単量体 rNA と比較して、4 量体 rNA ワクチン群では抗体産生の上昇が認められており、4 量体化ドメインによる rNA の多量体化が、B 細胞の活性化を増強し、免疫応答を増強した結果だと考えられる。さらに抗体価に相関して、ホモローガスなウイルスに対する感染防御効果が認められたことから、抗体を強く誘導できる 4 量体 rNA が、単量体 rNA よりもワクチン抗原として優れていることが示された。また、NA の酵素活性部位に対する抗体が感染防御において重要であるという報告もなされている^{38,47,48}。その点、単量体 rNA はシアリダーゼ活性をほとんど有しておらず、構造的にも異常をきたしている可能性があり、NA の酵素活性部位に対する抗体が産生されにくい状況にあったと推察される。そのため、単量体 rNA ワクチン群では、4 量体 rNA ほどではないものの、ウイルス特異的抗体が産生されていたにも関わらず、感染防御効果が全く認められなかったのではないかと考えている。

また、注射型ワクチンにおいて、NA はヘテロローガスな感染を防御可能であることが報告されている一方で、これまで HA と比較したワクチン効果は検討されていなかった²³。本検討では、rNA と rHA をワクチン抗原として用いた場合の効果を比較し、rNA ワクチン群においてのみ、ヘテロローガスな感染を防御し得ることを見出した。本検討に用いた株において、NA では、Cal7 と PR8、NC20 の配列相関性はそれぞれ 85%、83%であった。また、rHA では Cal7 と PR8、NC20 はそれぞれ 80%および 78%となっており、そのため、本検討において示したような rNA ワクチンによる高い交差防御能は、上記の各亜型間における配列の保存性が寄与していることが考えられた。

さらに、経鼻ワクチン後の上気道感染において、ホモローガスな感染では rNA、rHA ワクチン群は同程度のウイルス量の減少が認められた一方で、ヘテロローガスな感染に対しては、rNA ワクチン群でのみウイルス量の有意な減少が認められた。本結果は、rNA を経鼻ワクチンすることで誘導された IgA が、rHA 特異的 IgA よりも交差反応性を示すことを明示している。実際、rNA 特異的 IgG および IgA は、rHA に比べてヘテロローガスな株に対する交差反応性が高いことを ELISA により確認している。一方でこれまでに、経鼻ワクチンにより誘導される HA 特異的 IgA は、HA 特異的 IgG よりも交差反応性を示すことが報告されている⁴⁹。しかし、少なくとも本検討においては、rHA ワクチン群において、ウイルス量の減少は認められておらず、ヘテロローガスなウイルス感染を防御可能な量の IgA が産生されていなかったと考えられる。さらに、rNA を経鼻ワクチンすることで、ホモローガスな下気道感染において rHA よりも優れたワクチン効果を発揮することも明らかとなった。これらの結果は、肺胞洗浄液中および血中の IgG がウイルスの排除に関与したものと

考えられる。即ち、従来から報告されている通り、rNA の経鼻ワクチンは、IgA により上気道感染を防御しつつ、万が一、ウイルスが下気道に移行したとしても、IgG により 2 段階の感染防御が可能であることを示している。

本検討において、rNA を経鼻ワクチンした際に誘導される鼻腔洗浄液中 IgA が、血中 IgG および IgA と比較して、抗原のより広範な部分を認識していることを明らかとした。本検討において、経鼻ワクチンにより、ホモローガスな感染と同等レベルでヘテロローガスな感染をも防御した結果は、上気道に誘導された IgA がヘテロローガスな株においても保存されている領域に結合し、感染を防いだと考えられた。いくつかの研究により、NA において交差反応性を示す抗体の認識箇所が同定されている^{50,51}。例えばモノクローナル抗体を用いた研究により、H1N1 由来 NA の 273、309、338、および 339 番目のアミノ酸残基を認識する抗体は、様々な亜型株に対しても交差反応性を示し感染防御することを示している^{50,52}。また、377、388 番目のアミノ酸は H1N1 における株間において保存されており、今回、鼻腔洗浄液中 NA 特異的 IgA のみが 309、377 および 388 番目のアミノ酸残基を認識していたことは、経鼻ワクチンにおける高い交差防御に関与していることが考えられた。一方で他にも、341、396 および 397 番目のアミノ酸残基については鼻腔洗浄液中 IgA のみで結合が認められた。しかし、これらのアミノ酸を認識する抗体の交差反応性について報告はされておらず、今後さらなる検討が必要である。また興味深いことに、同じ IgA においても血漿中 IgA と比較して鼻腔洗浄液中 IgA は抗原の広範な部位を認識した。一般的に、分泌型 IgA は通常二量体や四量体などの重合体で存在する一方で、血漿中 IgA は主に単量体で存在している⁵³。また単量体 IgA と比較して、多量体 IgA はアビディティが高いため、ウイルスに対する中和活性が高いことが知られている^{40,54,55}。さらに近年、インフルエンザウイルス特異的な多量体 IgA は、単量体 IgA や IgG と比較して、強い交差防御活性を示すことが報告されている⁵⁶⁻⁵⁹。そのため、今回鼻腔洗浄液中 IgA において広範な部位に対する結合が認められた結果は、多量体化することで、単量体では弱い結合だった抗体が結合できるようになったからだと考えられた。

本検討では、同一亜型内（H1N1）で抗原性の異なる株（ヘテロローガスな株）に対するワクチン効果を評価してきた。一方で、H3N2 や H7N9 のような異なる亜型（ヘテロサブタイプ）の感染に対する rNA のワクチン効果に関しては評価できていない。過去に、注射型ワクチンにより rNA を免疫した場合、ヘテロサブタイプな感染に対しては、感染防御効果を示さないことが報告されている²³。一方で、経鼻ワクチンにおいて、rNA を抗原として用いた際のヘテロサブタイプな上気道感染、さらには下気道感染に対する防御効果は未だ明らかとなっていないため、今後の解析が期待される。

今後の課題としては、現行のワクチンにおいて、HA はもちろんのこと、いかにして NA

に対する抗体産生を増強できるかが重要であると考えている。そもそも、現行のスプリットワクチンにおいては、HA 含量は規定されている一方で、NA 含有量は規定されておらず、各ワクチン製造メーカーによってワクチンに含まれている NA の量は異なっている現状にある。そのため、まず、現行のスプリットワクチンや不活化全粒子中の NA の含有量を、正確に把握、あるいは規定することが重要であると考えている。また、単量体と比較した検討により、NA の構造や活性は、ワクチン効果に非常に影響していることが考えられるため、不活化されたスプリットワクチンや全粒子ワクチンに含まれる NA の構造・活性が変化していないかを詳細に調査する必要もあると考えられた。さらに、現行のスプリットワクチンは、HA と NA の含有量の違いもあり、たとえ NA が含まれていたとしても、HA に対する抗体が優位に産生されてしまう。そのため、ワクチン中の NA 含有量を増加させることも重要である。近年、人工的にウイルスを作製することが可能となったことから、ウイルス膜上の NA 量を増加させたウイルスを作製することができれば、HA だけでなく NA に対しても抗体を多く誘導可能となり、より交差反応性を示すワクチンが開発できる可能性も考えられる。また、糖鎖解析の技術が発達したことにより、生体の免疫機構に糖鎖が非常に深く関わっていることが明らかになってきている。実際、rHA の表面糖鎖を改変し、糖鎖を減少させることで、B 細胞が抗原にアクセスしやすくなり、抗体産生が上昇するという成果が近年報告されている^{60,61}。これらの糖鎖改変は非常に簡単な操作によりできるため、NA の糖鎖にも適応することで、より広範な株に対して交差反応性を高める可能性も考えられる。今後は、これらの技術を活用し、NA にも焦点をあてた、より応用的で、現実的なワクチンの開発を推進していくことが期待される。

第二節 生体内に存在する既存免疫を利用した アジュバントフリー経鼻ワクチン基盤技術の開発

2019年に巻き起こった SARS-CoV-2 のパンデミックにより、過去に類を見ない速度でワクチンが開発され、世界中に普及している。現在承認されている mRNA やアデノウイルスベクター、組換え蛋白質ワクチンは強力に血中抗体や T 細胞応答を誘導し、非常に有効なワクチン効果を示している^{62,63, 64}。一方で、現行の mRNA ワクチンは上気道に IgA を誘導しにくいことから、感染そのものを完全に防御できないことが報告されている⁶⁵⁻⁶⁷。そのため、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な経鼻ワクチンの開発が待望されている。

しかし経鼻ワクチンは、2000 年から 2001 年にスイスで行われた不活化インフルエンザウイルスを用いた経鼻ワクチンの臨床試験において、添加したアジュバントが原因とされる顔面麻痺といった重篤な副反応が確認され中止されている⁶⁸。また現在でも、注射型ワクチンとは異なり、安全性の観点から臨床で使われている経鼻ワクチン用アジュバントは存在しない。さらに経鼻ワクチンの大きな問題点として、抗原を鼻腔に投与しても粘膜上皮バリアが障壁となり、粘膜組織に存在する樹状細胞や、マクロファージ、B 細胞といった抗原提示細胞への抗原送達能が乏しいため効果的に免疫を誘導できないことが挙げられる。そのため、安全性を考えると、より効率的に抗原を目的の場所に届ける送達キャリアの開発こそが経鼻ワクチン実用化を見据えた上で極めて重要であると考えられる。

上述した通り、経鼻ワクチンの最大の問題点として、上皮バリアが障壁となり抗原が効率的に粘膜組織へと送達されないことが挙げられる。また、たとえバリアを突破したとしても抗原提示細胞に効率的に取り込まれる必要がある。一方で、鼻腔には数多の抗原特異的 IgA が分泌されており、病原体の排除に迅速に対応している。例えば、ほぼ全ての成人は過去にインフルエンザに罹った経験があるため、インフルエンザウイルスの HA に対する抗体を血中のみならず鼻腔にも保有している⁴⁰。また、近年の研究により、鼻腔の IgA は病原体の排除のみならず、トランスサイトーシスにより病原体を粘膜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⁶⁹⁻⁷¹。また IgG は、抗体の Fc 部位と抗原提示細胞上に発現する Fc 受容体の相互作用を介して、結合した抗原の取り込みと細胞の活性化を促進すること

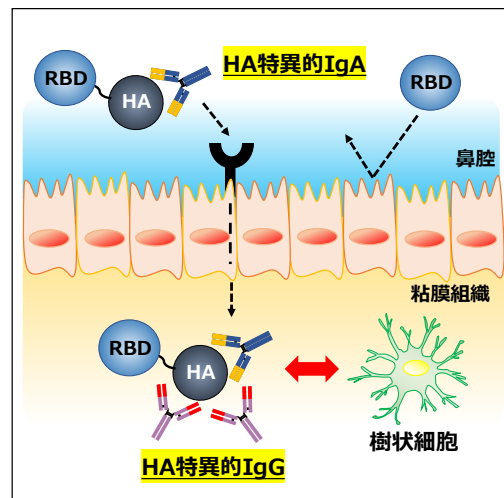


Figure 8. Graphical abstract

が知られている^{72,73}。そのため、鼻腔および血中に既に存在する抗体が認識する蛋白質（キャリア蛋白質）に目的のワクチン抗原を融合させることで、抗体自身が抗原送達キャリアとなり、ワクチン抗原を鼻腔リンパ組織中の抗原提示細胞へと送達し、粘膜免疫を効率良く誘導可能であると考えられた（Figure 8）。

そこで本節では、上記のコンセプトに基づき、生体内抗体をワクチン抗原送達キャリアとして利用可能かを評価すると共に、免疫誘導メカニズムについて詳細に検討した。

【実験材料と方法】

ウイルス

H1N1 influenza A virus (strain: A/California/07/2009)は国立感染症研究所より分与して頂いた。SARS-CoV-2 (MA10)はSARS-CoV-2 NIID (strain: 2019-nCoV_Japan_TY_WK-5212020)を backbone とし、過去の文献に倣い CPER 方を用いて作製した⁷⁴。

実験動物

6-7 週齢の BALB/c マウス（雄）および C57 BL/6j マウス（雄）は、日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスは室温で 12 時間ごとの点灯、消灯のサイクルで飼育した。全ての動物実験は大阪大学微生物病研究所の動物実験施設で行い、大阪大学実験規程に準じた。

遺伝子発現ベクターの作製

SARS-CoV-2 由来の NTD、RBD、Spike 発現プラスミドは、 α 株 (GenBank accession number: MN908947.3) 由来の蛋白質をコードする cDNA の配列を哺乳類細胞に最適化し pcDNA3.1 (-) に挿入し、C 末端側に His タグを付加した。なお、Spike の cDNA には、D614G、K986P、V987P、R682G、R683S、R685S のアミノ酸変異を PCR により導入した。また、Spike の 3 量体化形成を目的として、Spike の C 末端側に foldon を挿入した。HA は第一節の実験材料と方法に準じた。Respiratory syncytial virus (RS virus) の G 蛋白質発現プラスミドは、A2 株 (GenBank accession number: AAB59857.1) 由来の蛋白質をコードする cDNA の配列を哺乳類細胞に最適化し pcDNA3.1 (-) に挿入し、C 末端側に His タグを付加した。肺炎球菌由来の pneumococcal surface protein A (PspA) 発現プラスミドは、WU 株 (GenBank accession number: AF071814) 由来の蛋白質をコードする cDNA の配列を pcDNA3.1 に挿入し、N 末側に His タグを付加した。より詳細な各ベクター情報は下記に記した。

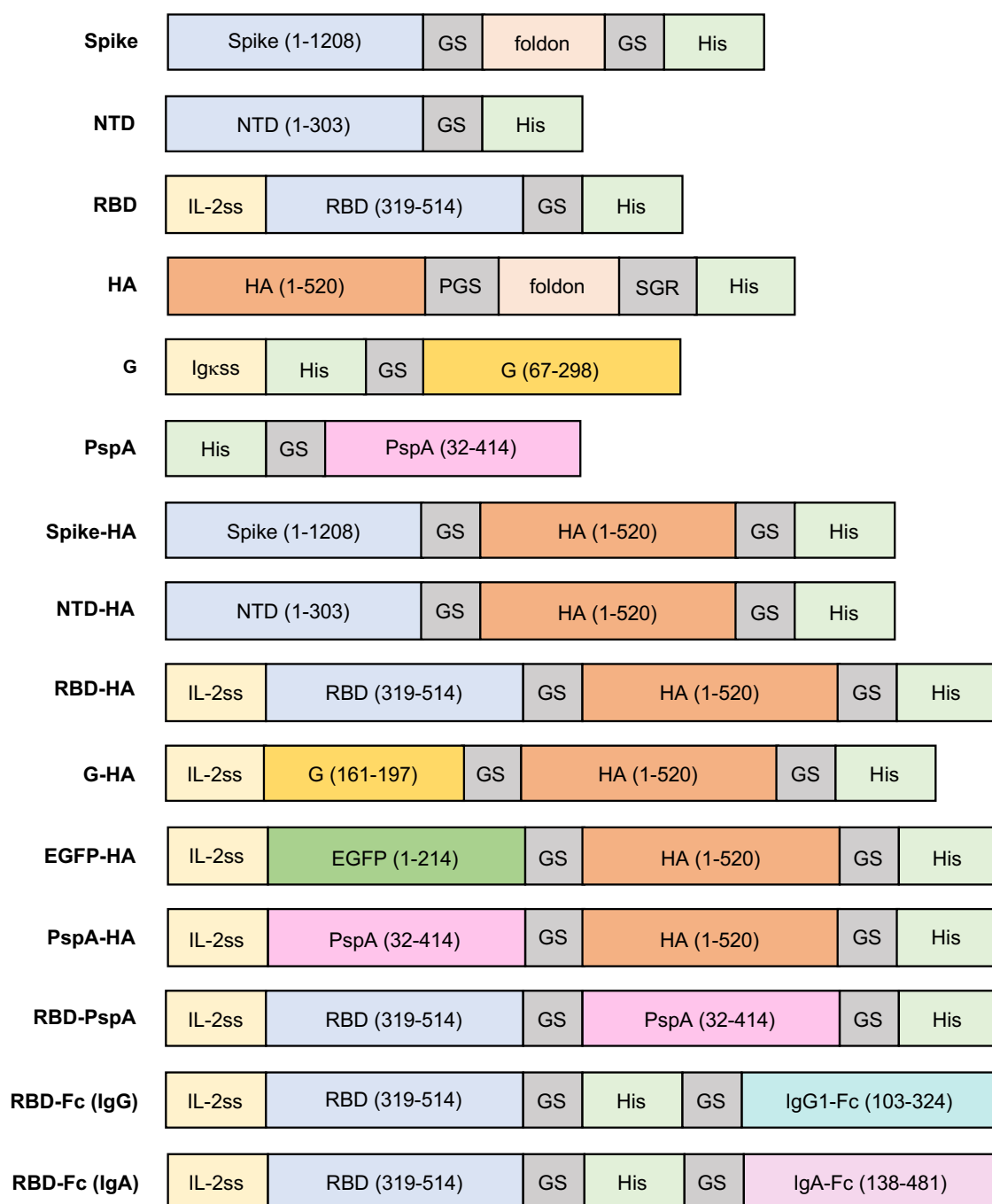


Figure 9. Construction of recombinant proteins.

哺乳類細胞への遺伝子導入

哺乳類細胞への遺伝子導入は、第一節の実験材料と方法に準じた。

蛋白質精製および SDS-PAGE

蛋白質精製および SDS-PAGE は、第一節の実験材料と方法に準じた。なお、本節の各蛋白質は、遺伝子導入後 4 日間培養した後の上清を回収し精製した。

免疫実験

経鼻投与：麻酔下において、BALB/c マウスに 3.0×10^3 TCID₅₀ のインフルエンザウイルス（Cal 株）、もしくは 4×10^6 CFU の肺炎球菌（WU2）を片鼻 2.5 μ L ずつ計 5 μ L で感染し、感染から 30、51 日目にワクチン抗原（10 μ g/mouse）を単独もしくは c-di-GMP（5 μ g/mouse）と共に経鼻投与した。投与試料は PBS で調製し、片鼻 3.5 μ L ずつ計 7 μ L/mouse で経鼻投与した。また、BALB/c マウスの尾根部皮下に、0、21 日目で Spike を発現する mRNA（1 μ g/mouse）を投与し、30、51 日目にワクチン抗原（10 μ g/mouse）を単独もしくは c-di-GMP（5 μ g/mouse）と共に経鼻投与した。44、58 日目の血漿および 65 日目の鼻腔洗浄液を回収し、抗体産生評価を行った。

皮下投与：麻酔下において、BALB/c マウスに 3.0×10^3 TCID₅₀ のインフルエンザウイルス（Cal 株）を片鼻 2.5 μ L ずつ計 5 μ L で感染し、感染から 30、51 日目のマウス尾根部皮下にワクチン抗原（10 μ g/mouse）を単独もしくは alum（100 μ g/mouse）と共に皮下投与した。投与試料は PBS で調製し、50 μ L/mouse で皮下投与した。

血漿、鼻腔洗浄液中の抗体価評価

抗体価評価は、第一節の実験材料と方法に準じた。

シュードウイルスを用いた中和活性評価

前日に、培養メディウム（2% FBS, 1% ペニシリン/ストレプトマイシン添加 DMEM high glucose）で調製した VeroE6/TMPRSS2 細胞（ 1.2×10^4 cells）を 96-well half white plates（Greiner BIO-ONE, Kremsmunster, Austria）に播種し、37 °C、5% CO₂、飽和蒸気圧下で 24 時間培養した。翌日、56 °C、30 分間で非働化处理した鼻腔洗浄液を 4 倍ずつ段階希釈し、表面に SARS-CoV-2 由来 Spike 蛋白質を発現するシュードタイプウイルスと 1 : 1 で混和した後、37°C、1 時間静置した。その後、この混合溶液を PBS で洗浄した VeroE6/TMPRSS2 細胞に 50 μ L/well で添加し、37 °C、5% CO₂ で 48 時間培養した。培養した細胞に室温で ONE-Glo™-EX Reagent（Promega, Madison, WI, USA）を 50 μ L 添加し、マイクロプレートリーダーを用いて発光を測定した。

SARS-CoV-2 感染

上気道感染：最終免疫から 14 日後、SARS-CoV-2（ 5.0×10^4 PFU）を、片鼻 2.5 μ L ずつ経鼻投与し、感染させた。さらに、感染 3 日後の鼻甲介を回収し、ホモジナイズした後、ブラックアッセイによりウイルス量を評価した。

下気道感染：最終免疫から 14 日後、SARS-CoV-2 (2.0×10^5 PFU) を、片鼻 10 μ L ずつ経鼻投与し、感染させ、体重減少と生存率を評価した。また人道的観点から、感染 0 日からの体重減少率が 25% となった点をエンドポイントと設定した。

肺炎球菌感染

最終免疫から 14 日後、肺炎球菌 (WU2) (5.0×10^6 PFU) を、片鼻 15 μ L ずつ経鼻投与し、感染させ、体重減少と生存率を評価した。また人道的観点から、感染 0 日からの体重減少率が 25% となった点をエンドポイントと設定した。

NALT、Nasal Passage、脾臓細胞の再刺激によるサイトカイン産生評価

インフルエンザウイルスを上気道感染させた BALB/c マウスに、30、51 日目で Spike-HA および Spike を c-di-GMP と共に経鼻ワクチンした後、65 日目で NALT、Nasal Passage を回収した。細胞培養用メディウム (10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、50 mM 2-メルカプトエタノール添加 RPMI1640) 中で 5 mL シリンジ (Terumo Corporation) のプランジャー部を用い、すり潰した後、70 μ m セルストレーナー (Corning Inc.) に通し、各細胞を回収した。すり潰した細胞は 50 mL 遠沈管 (Corning Inc.) に回収し、600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心後、上清を吸引し ACK lysis buffer (0.01 M Tris-HCL、150 mM NH_4Cl 溶解水) を 2 mL 添加し、混和後、室温で 5 分静置し溶血させた。その後、細胞培養用メディウムを 2 mL 加え、溶血反応を止め、600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した。上清を吸引後、培養用メディウムで懸濁し、再度 70 μ m セルストレーナーに通して細胞塊を除き、細胞数を測定した。1 well あたり $1-3 \times 10^6$ cells となるように 96 well U-bottomed culture plate (1:1000 dilution; Thermo Fisher Scientific) に播種し、Spike を終濃度 50 μ g/mL となるよう培養用メディウムで調製し添加した後、37 $^{\circ}$ C、21 時間静置した。その後、500 倍希釈となるよう調製した protein transport inhibitor cocktails (Thermo Fisher Scientific) を添加し、37 $^{\circ}$ C、5 時間静置した。600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した後、上清を廃棄し、FACS buffer (2% FBS, 1 mM EDTA (DOJINDO, Kumamoto, Japan)、0.05% sodium azide (WAKO, Saitama, Japan) 添加 PBS) で調製した anti-mouse CD16/CD32 antibody (1:100 dilution; clone: 93; BioLegend, San Diego, CA, USA), Fixable Viability Dye eFluor 780 (Thermo Fisher Scientific), Alexa647 anti-mouse CD45 antibody (1:200 dilution; clone: 30-F11; BioLegend), PE anti-mouse CD3 ϵ antibody (1:200 dilution; clone: 145-2C11; BioLegend), FITC anti-mouse CD4 antibody (1:200 dilution; clone: GK1.5; BioLegend), BV605 anti-mouse CD8a antibody (1:200 dilution; clone: 53-6.7; BioLegend), BV510 anti-mouse CD44 antibody

(1:200 dilution; clone: IM7; BioLegend)を添加後、遮光条件下、4 °C で 30 分間静置し染色した。その後、FACS buffer による洗浄 (FACS バッファを 150 μ L/well で添加し、ピペッティング後、600 \times g、4 °C、5 分遠心し上清を廃棄) を 2 回行い、その後 BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization solution Kit (BD Biosciences, Sparks, MO, USA) を用いて、BV421 anti-IFN- γ antibody (1:200 dilution; clone: XMG1.2; BioLegend), PE/Cy7 anti-IL-13 antibody (1:200 dilution; clone: eBio13A; Thermo Fisher Scientific)を添加し、遮光条件下、4 °C で 30 分間静置し染色した。FACS buffer による洗浄 (FACS バッファを 150 μ L/well で添加し、ピペッティング後、600 \times g、4 °C、5 分遠心し上清を廃棄) を 2 回行い、200 μ L/well で懸濁しフローサイトメーターで解析した。解析にあたり、CD4⁺画分を CD45⁺ CD44^{high} CD4⁺、CD8⁺画分を CD45⁺ CD44^{high} CD8⁺とした。

抗体精製

血清サンプルを、3,000 \times g、4 °C、15 分遠心し、上清から Akta explorer chromatography system を用いて、total IgG を精製した。total IgG の精製には Protein G column (GE Healthcare) を用い、20 mM phosphate buffer (pH 7.0) で 20 mL までメスアップした血清を流し、血清中の抗体をカラムに吸着させ、100 mM glycine HCl buffer (pH 2.7) で溶出した。また溶出液は 1 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) を用いて溶出と同時に中和した。その後、Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off, 30 kDa) を用いて PBS に置換した。

精製抗体移入実験

ナイーブマウスおよびインフルエンザウイルスを上気道感染させた BALB/c マウスの血清から精製した精製抗体 (naive-IgG, flu-IgG) を、300 μ L の液量で 2 mg ナイーブマウスに腹腔投与し、24 時間後に RBD-HA を経鼻ワクチンした。

鼻腔洗浄液移入実験

ナイーブマウスおよびインフルエンザウイルスを上気道感染させた BALB/c マウスから 400 μ L の鼻腔洗浄液を回収し、限外濾過チューブを用いて 20 倍濃縮した。その後、RBD-HA を濃縮鼻腔洗浄液と共にナイーブマウスに経鼻投与した。

NALT, Nasal Passage における樹状細胞の抗原取り込みおよび活性化評価

インフルエンザウイルスを上気道感染させた BALB/c マウスに、感染から 30 日目に EGFP-HA を経鼻投与し、6 時間および 24 時間後の NALT、Nasal Passage を回収した。細胞培

養用メディウム（10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、50 mM 2-メルカプトエタノール添加 RPMI1640）中で 5 mL シリンジのプランジャー部を用い、すり潰した後、70 μ m セルストレーナーに通し、各細胞を回収した。すり潰した細胞は 50 mL 遠沈管に回収し、600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心後、上清を吸引し ACK lysis buffer を 2 mL 添加し、混和後、室温で 5 分静置し溶血させた。その後、細胞調製メディウムを 2 mL 加え、溶血反応を止め、600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した。上清を吸引後、培養用メディウムで懸濁し、再度 70 μ m セルストレーナーに通して細胞塊を除き、細胞数を測定した。1 ウェルあたり $1-3 \times 10^6$ cells となるように 96 well U-bottomed culture plate に播種し、600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心した後、上清を廃棄し、FACS buffer で調製した anti-mouse CD16/CD32 antibody, Fixable Viability Dye eFluor 780, Alexa647 anti-mouse CD45 antibody, PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD11c antibody (1:200 dilution; clone: N418; BioLegend), BV421 anti-mouse I-A/I-E antibody (1:200 dilution; clone: M5/114.15.2; BioLegend), PE anti-mouse CD86 antibody (1:200 dilution; clone: GL-1; BioLegend) を添加後、遮光条件下、4 $^{\circ}$ C で 30 分間静置し染色した。その後、FACS buffer による洗浄（FACS バッファを 150 μ L/well で添加し、ピペッティング後、600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分遠心し上清を廃棄）を 2 回行い、その後 BD Cytofix/CytopermTM Fixation/ Permeabilization solution Kit を用いて、Alexa488 anti-GFP antibody (1:200 dilution; clone: FM264G; BioLegend) を添加し、遮光条件下、4 $^{\circ}$ C で 30 分間静置し染色した。FACS buffer による洗浄を 2 回行い、200 μ L/well で懸濁しフローサイトメーターで解析した。解析にあたり、樹状細胞画分を CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ とした。

Depletion 抗体を用いた CD4⁺ T 細胞の除去

インフルエンザウイルスを上気道感染させた BALB/c マウスに、感染から 30、32 日目に 200 μ g の anti-CD4 antibody (clone: GK1.5; Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA)、もしくはアイソタイプコントロールとして anti-keyhole limpet hemocyanin antibody (clone: LTF-2; Bio X Cell) を 300 μ L の液量で腹腔投与し CD4⁺T 細胞の除去を行った。その後、CD4⁺T 細胞の除去とナイーブ T 細胞の回復を評価するために、感染後 34、58、86、114 日目の血漿を回収した。各血漿サンプルは、50 μ L/well で 96 well U-bottomed culture plate に添加し、ACK lysis buffer を 200 μ L 加え、ピペッティングした後室温で 5 分静置した。600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心後、上清を廃棄し、再び ACK lysis buffer を 200 μ L 加え、ピペッティングした後室温で 5 分静置した。600 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心後、上清を廃棄し、FACS buffer で調製した anti-mouse CD16/CD32 antibody and stained with Fixable Viability Dye eFluor 780, Alexa488 anti-mouse CD90.2 antibody (1:200

dilution; clone:30-H12; BioLegend), PE anti-mouse TCR β chain antibody (1:200 dilution; clone: H57-597; BioLegend), BV605 anti-mouse CD8a antibody, and PE anti-mouse CD4 antibody (1:200 dilution; clone: RM4-5; BioLegend) を添加後、遮光条件下、4 °C で 30 分間静置し染色した。その後、FACS buffer による洗浄を 2 回行い、AccuCheck Counting Beads (Thermo Fisher Scientific)を加えた FACS buffer を 200 μ L で細胞を懸濁しフローサイトメーターで解析した。解析にあたり、CD4⁺画分を CD45⁺ CD90.2⁺ TCR- β ⁺とした。CD4⁺T 細胞の回復を確認した後、感染後 116、137 日目に RBD-HA (10 μ g/mouse) を片鼻 3.5 μ L ずつ計 7 μ L/mouse で経鼻投与した。130、144 日目の血漿および 151 日目の鼻腔洗浄液を回収し、抗体産生評価を行った。

骨髓由来樹状細胞の誘導

BALB/c マウスの両後脚の大腿骨および脛骨を回収し、両骨端を切除した後に、25 G 注射針(Terumo Corporation)と 5 mL シリンジを用いて、細胞調製メディウムを片脚につき 5 mL ずつ髓腔に流し込み、骨髓細胞を回収した。回収した骨髓は注射器のプランジャーを用いてすり潰した後、70 μ m セルストレーナーに通して凝集物を除き、50 mL 遠心管に回収した。1500 rpm, 4 °C、5 分遠心後、上清を廃棄し、ACK lysis buffer を 5 mL 添加し、混和した後、室温に 5 分静置し溶血させた。その後、細胞調製メディウムを 5 mL 加え、溶血反応を止め、1500 rpm、4 °C、5 分遠心した。上清を廃棄した後、細胞調製メディウムで調製した細胞を 6 well plate に 1×10^7 cells/well となるよう播種し、GM-CSF を終濃度 20 ng/mL で添加し、37 °C、3 日間培養した。その後、メディウム交換を行い、さらに 3 日間培養した。培養開始から 6 日後、培養上清および PBS で洗浄し剥がしてきた細胞をプールし、各実験に用いた。

***In Vitro* における BMDC を用いた抗原取り込み評価**

誘導した BMDC を培養用メディウムで 5×10^5 cells/mL となるように 96 well U-bottomed culture plate に播種し、EGFP-HA (終濃度 : 1 μ g/mL) をナイーブマウスの血清から精製した IgG (naive-IgG) (終濃度 : 20 μ g/mL) 、インフルエンザ感染マウスの血清から精製した精製 IgG (flu-IgG) (終濃度 : 20 μ g/mL) 、および CpG ODN (1 or 10 μ g/mL) を加え、37 °C、5% CO₂ で培養した。6 時間もしくは 24 時間後に 600 \times g、4 °C、5 分遠心し上清を廃棄した後、FACS buffer で調製した anti-mouse CD16/CD32 antibody, Fixable Viability Dye eFluor 780, PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD11c antibody, APC anti-mouse CD80 antibody (1:200 dilution; clone: 16-10A1; BioLegend), BV421 anti-mouse I-A/I-E antibody, PE/Cy7 anti-mouse CD11b antibody (1:200

dilution; clone: M1/70; BioLegend) を添加し、遮光条件下、4 °C で 30 分間静置し染色した。その後、FACS buffer による洗浄を 2 回行い、その後 BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization solution Kit を用いて、Alexa488 anti-GFP antibody を添加し、遮光条件下、4 °C で 30 分間静置し染色した。FACS buffer による洗浄を 2 回行い、200 µL/well で懸濁しフローサイトメーターで解析した。解析にあたり、樹状細胞画分を CD45⁺ MHCII⁺ CD11c⁺ CD11b^{middle} とした。

統計解析

統計解析には Prism を用いた。グラフは平均値と標準偏差 (SD) で表し、有意差検定は Tukey's test を用いた。生存率は二群間の Kaplan–Meier 曲線を log-rank test で検定して有意差を評価した。統計学的有意差は、 $P < 0.05$ の場合を有意であるとした。

【実験結果】

RBD-HA のワクチン抗原としての有用性評価

本検討ではまず、新型コロナウイルスのワクチン標的として汎用される Spike 蛋白質のレセプター結合ドメイン (RBD) をワクチン抗原として用いた。また、ほぼ全ての人がインフルエンザに罹患した経験があることを鑑み、キャリア蛋白質として HA を用い、RBD と HA を融合させた RBD-HA を組換え蛋白質として作製した。なお本検討で用いている RBD は SARS-CoV-2 の α 株由来の配列を用い、HA は H1N1 型の Cal 株由来の配列を用いている。まず Expi293F 細胞により発現した RBD-HA を His trap カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。その後、RBD-HA および RBD の精製度を評価したところ、ゲル濾過カラムにおいて RBD-HA は 85 kDa、RBD は 26 kDa の位置にピークが観察された (Figure 10a)。また SDS-PAGE 解析では、RBD-HA では 90 kDa 付近に、RBD では 30 kDa 付近にバンドが検出された (Figure 10b)。以上の結果から、純度の高い目的蛋白質が精製できていることが示された。

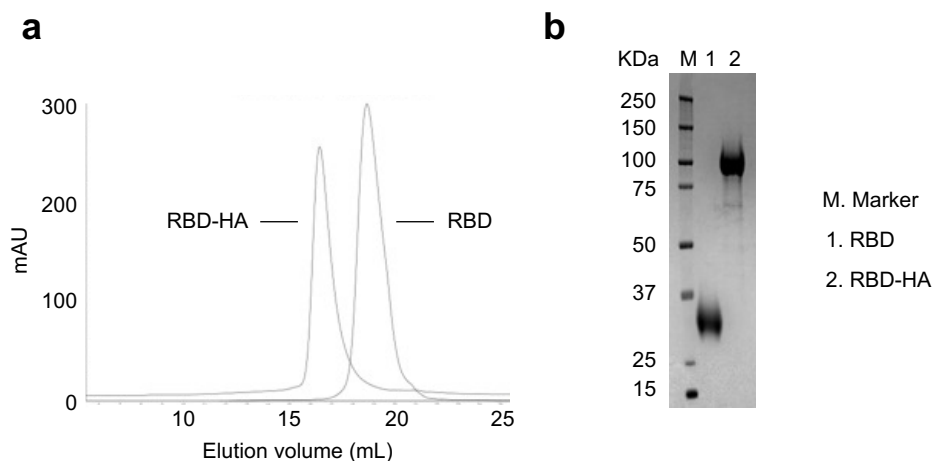


Figure 10. Construction and characterization of recombinant RBD-HA.

(a) Recombinant RBD and RBD-HA generated in Expi293F cells was purified by size-exclusion chromatography after metal ion chromatography. (b) Purified recombinant RBD and RBD-HA were analyzed through SDS-PAGE followed by staining with Coomassie Brilliant Blue. M, marker; lane 1, RBD; lane 2, RBD-HA.

次に、生体内の抗体をキャリア抗体として利用し、血中および鼻腔においてワクチン抗原特異的な抗体産生を誘導可能か評価した。まず、過去に感染歴がある人を模倣して、インフルエンザウイルスを上気道に感染させたマウス (flu-mice) を作製し、感染から 30 日、51 日後に RBD-HA を経鼻ワクチンした際の血漿中および鼻腔洗浄液中の RBD 特異的抗体産生を評価した (Figure 11a)。なお本検討では比較対象として、RBD に c-di-GMP を添加して経鼻ワクチンした群 (RBD-c-diGMP 群)、および注射型ワクチンとの比較として、RBD に alum を添加して皮下投与した群を用いた (scRBD-alum 群)。その結果、1 回目のワク

チンから 14 日後の血漿中において、RBD-HA をワクチンした flu-mice では、アジュバントを用いていないにもかかわらず RBD-c-di-GMP 群および scRBD-alum 群と比較して RBD 特異的 IgG の有意な上昇が認められた (Figure 11b)。一方で、ナイーブマウスに RBD-HA を経鼻ワクチンしても RBD 特異的 IgG の上昇は認められなかった (Figure 11b)。また、2 回目のワクチンから 7 日後の血漿中においても、flu-mice に RBD-HA をワクチンした群では、RBD-c-di-GMP ワクチンと比較して、RBD 特異的 IgG の有意な上昇が認められた (Figure 11c)。また、その強度は RBD-alum 群と同程度であった (Figure 11c)。さらに、2 回目のワクチンから 14 日後の鼻腔洗浄液中では、RBD-HA ワクチン群において、RBD-c-di-GMP ワクチン群と比較して、RBD 特異的 IgA の有意な上昇が認められた (Figure 11d)。一方で、scRBD-alum ワクチン群では IgA の上昇は認められなかった (Figure 11d)。以上の結果より、インフルエンザに罹患経験のあるマウスに RBD-HA を経鼻ワクチンすることで、RBD 特異的 IgG、IgA のいずれにおいても強力に誘導可能であることが示された。

上記検討では、インフルエンザウイルス感染から 30 日後に経鼻ワクチンしていたが、感染から長期間経過したマウスにおいても同様に、RBD-HA をワクチンすることで RBD 特異的抗体産生を誘導可能か評価した。まず、マウスにインフルエンザウイルスを上気道感染させた後、経月的に血漿を回収し、血漿中の HA 特異的抗体価を測定した。その結果、未感染マウスと比較して、感染マウスでは感染後 112 日から 140 日程度まで HA 特異的抗体価の上昇が認められ、その後、維持されていることを確認した (Figure 11e)。そこで、感染から 175、196 日目の flu-mice に RBD-HA もしくは RBD-c-di-GMP を経鼻ワクチンし、血漿中、および鼻腔洗浄液中 RBD 特異的抗体価を測定した。その結果、血漿中 IgG および鼻腔洗浄液中 IgA のいずれにおいても、RBD-c-di-GMP 群と比較して、RBD-HA ワクチン群で抗体価の有意な上昇が認められた (Figure 11, f and g)。また、RBD-HA ワクチン群では、RBD-c-di-GMP と比較して、ワクチン後の血漿中において HA 特異的 IgG の有意な上昇も認められた (Figure 11e)。以上の結果より、感染から長期間経過したマウスにおいても、RBD-HA ワクチンによりアジュバント共投与群と同等レベルに抗体産生を誘導可能であること、さらには RBD-HA が HA に対するブーストワクチンとなり得ることが示された。

本検討では、生体内抗体を抗原送達キャリアとして利用するというコンセプトに基づいて検討を行っている。一方で似たコンセプトとして、ワクチン抗原に抗体の Fc 部位を融合させて免疫原性を向上させる戦略が知られている。過去の研究において、Fc 部位を融合した Fc 融合抗原は、Fc 受容体を介して抗原提示細胞に効率的に取り込まれ、抗原特異的抗体産生が上昇することが報告されている⁷⁵⁻⁷⁷。そこで、RBD-HA と比較することを目的とし、RBD に IgG および IgA 由来の Fc 部位を融合した RBD-Fc を作製し、アジュバントを用いずに flu-mice に経鼻ワクチンした (Figure 11h)。その結果、RBD-IgG および RBD-IgA

ワクチン群では RBD 特異的 IgG の上昇が全く認められない一方で、RBD-HA ワクチン群では RBD 特異的 IgG の顕著な上昇が認められた (Figure 11i)。以上の結果より、本コンセプトに基づいた経鼻ワクチンは、従来の Fc 融合戦略と比較して、抗体誘導という観点で非常に優れていることが示唆された。

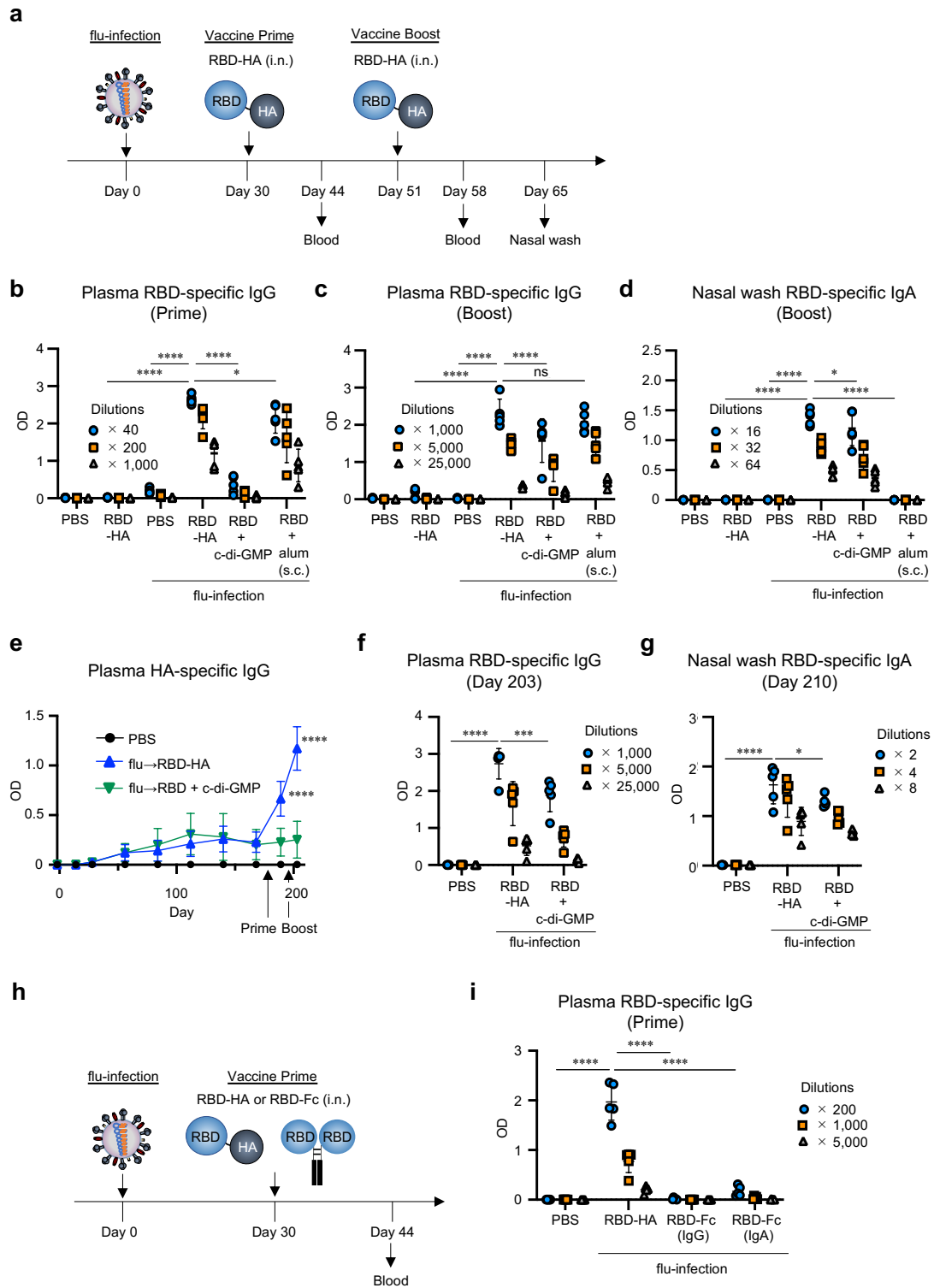


Figure 11. Adjuvant-free intranasal vaccination with RBD-HA induces both systemic IgG and mucosal IgA.

(a) Experimental scheme: BALB/c mice were intranasally infected with flu virus (flu-mice), followed by intranasal immunization with RBD-HA without adjuvant, RBD plus c-di-GMP, and subcutaneous immunization with RBD plus alum at 30 and 51 days after flu infection. (b-d) The RBD-specific levels were evaluated using ELISA (b) plasma IgG levels after primary immunization, (c) plasma IgG levels after boost, (d) nasal wash IgA levels after boost immunization. (e) Time course of HA-specific plasma IgG from flu infection to intranasal immunization were evaluated using ELISA. Blood was collected at 0, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 168, 189, and 203 days after flu infection. We used 25,000-fold dilutions of plasma samples. (f and g) The RBD-specific levels were evaluated using ELISA (f) plasma IgG levels after boost and (g) nasal wash IgA levels after boost immunization. (h) Experimental scheme: flu-mice were immunized intranasally with RBD-HA, RBD-Fc (IgG), or RBD-Fc (IgA) without adjuvant at 30 days after flu infection. (i) The RBD-specific plasma IgG levels were evaluated using ELISA. Data are represented as means \pm SD. $n = 5$. Each experiment was performed more than twice. $*P < 0.05$; $***P < 0.001$; $****P < 0.0001$ as indicated by Tukey's multiple comparisons test. ns, not statistically significant. (e) $****P < 0.0001$ between RBD-HA immunized flu-mice and RBD plus c-di-GMP-immunized flu-mice as indicated by Tukey's multiple comparisons test.

RBD-HA ワクチンによる感染防御評価

次に、鼻腔洗浄液中 RBD 特異的 IgA が中和活性を有しているかを、SARS-CoV-2 の膜蛋白質である Spike 蛋白質を膜表面に持つシュードタイプウイルスを用いて評価した。その結果、ホモローガスな株である α 株に対して、PBS 投与群、scRBD-alum 群では中和活性をほとんど示さなかった一方で、RBD-HA、RBD-c-di-GMP ワクチン群の順で強い中和活性を示した (Figure 12a)。またヘテロローガスな株である δ 株、Omicron 株に対しては、 α 株と比較すると減弱はするものの、RBD-HA および RBD-c-di-GMP ワクチン群において中和活性が認められた (Figure 12, b and c)。そこで、第一節でのインフルエンザ感染と同様に、SARS-CoV-2 をマウスの上気道または下気道に感染し、ワクチン効果を評価した。上気道感染の結果、RBD-HA ワクチン群において、PBS 投与群、scRBD-alum ワクチン群と比較して、鼻腔中のウイルス量の有意な減少が認められた (Figure 12d)。また、RBD-HA ワクチン群と RBD-c-di-GMP ワクチンにおいて有意な違いは観察されなかった。また下気道感染の結果、PBS 投与群および RBD-c-di-GMP ワクチン群において経日的に体重が減少するのに対して、RBD-HA および scRBD-alum ワクチン群では体重減少が全く認められなかった (Figure 12e)。さらに、非ワクチン群のナীবマウスおよび flu-mice に感染させた場合、それぞれ生存率が 60%と 40%にまで低下した。一方で、RBD-HA、RBD-c-di-GMP、scRBD-alum ワクチン群では全匹の生存が確認された (Figure 12f)。以上の結果より、アジュバントを用いていないにも関わらず、RBD-HA ワクチンは上気道および下気道感染の両方において強力に感染防御効果を示すことが明らかとなった。

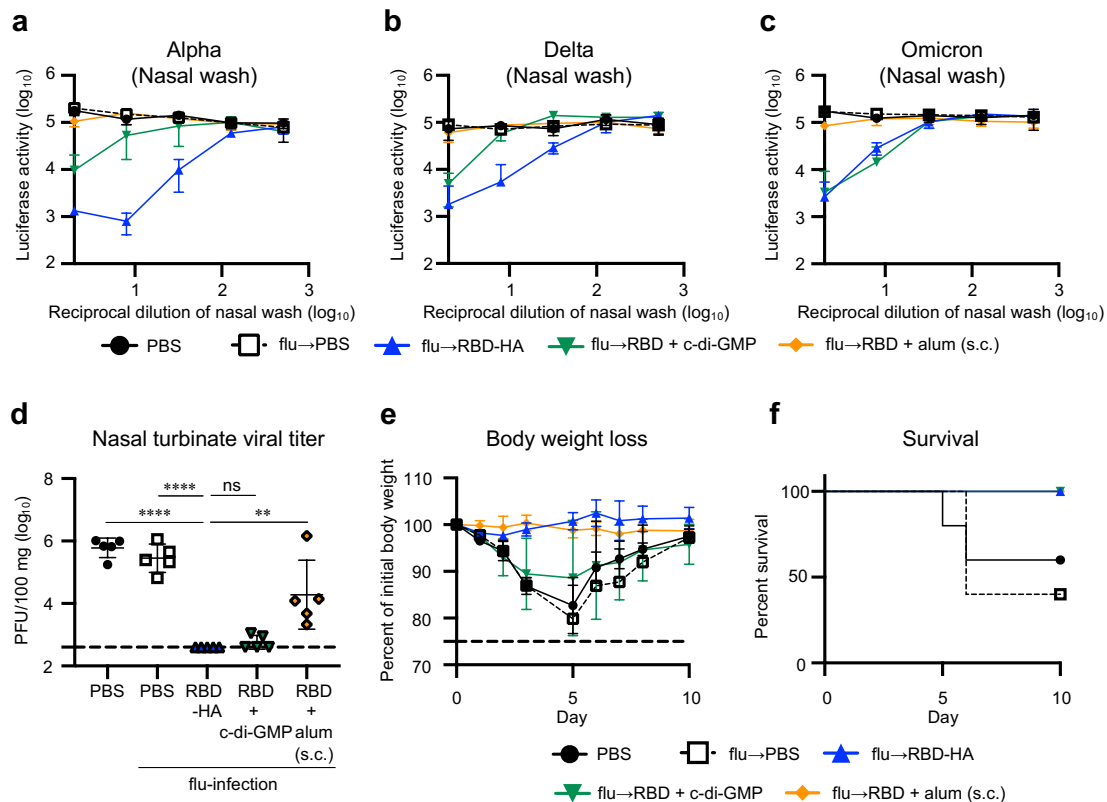


Figure 12. Intranasal RBD-HA vaccination protects mice from SARS-CoV-2 challenge in the upper and lower respiratory tracts.

Flu-mice were intranasally immunized with RBD-HA, RBD plus c-di-GMP, and were subcutaneously immunized with RBD plus alum at 30 and 51 days after flu infection. (a-c) Measurement of neutralization against vesicular stomatitis virus-based pseudotyped viruses displaying (a) Alpha, (b) Delta, or (c) Omicron Spike of SARS-CoV-2 in nasal wash. (d) Mice were challenged with SARS-CoV-2 to achieve upper respiratory tract infection. Three days after challenge, virus titers were evaluated in nasal turbinate tissues by plaque assay. (e and f) Mice were challenged with SARS-CoV-2 to achieve lower respiratory tract infection. Following virus challenge, the percentage changes in (e) body weight and (f) survival was monitored. (a-d) $n = 5$; (e and f) $n = 4-5$. (a-f) Data are represented as means \pm SD. (d) The dotted line represents the limit of detection. Each experiment was performed more than twice. (d) $**P < 0.01$; $****P < 0.0001$ as indicated by Tukey's multiple comparisons test. ns, not statistically significant.

抗原特異的な T 細胞応答評価

ここまで、flu-mice に 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を明らかとしてきた。そこで、本コンセプトに基づいた経鼻ワクチンが、抗体のみならず抗原特異的な T 細胞応答を誘導可能か評価した。本検討では RBD ではなく、CD4⁺および CD8⁺T 細胞が認識するエピトープを豊富に持つ SARS-CoV-2 由来 Spike 蛋白質に HA を融合した Spike-HA を用いた。まず、Spike-HA においても抗原特異的な抗体産生を誘導可能か評価する為に、flu-mice に Spike-HA を経鼻ワクチンした後、2 回目免疫から 7 日後の血漿中、および 14 日後の鼻腔洗浄液中の Spike 蛋白質特異的抗体価を測定した。その結果、Spike-HA ワクチン群において、Spike-c-di-GMP 群と比較して、

血漿中 IgG および鼻腔洗浄液中 IgA の有意な上昇が認められた (Figure 13, a and b)。そこで、Spike 蛋白質特異的な T 細胞応答を評価するために、最終免疫から 14 日後、マウスの脾臓、および粘膜免疫の主要な誘導部位である nasal-associated lymphoid tissue (NALT)、nasal passage を回収した。その後、各組織から得た細胞を Spike 蛋白質と共培養することで再刺激し、フローサイトメトリーを用いて Spike 蛋白質特異的な CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞中の IFN- γ および IL-13 を測定した。その結果、Spike-c-di-GMP ワクチン群において、他の群と比較して、脾臓中の IFN- γ および IL-13 陽性 CD4⁺、CD8⁺ T 細胞の割合の有意な上昇が認められた (Figure 13c)。一方で Spike-HA ワクチン群では、各 T 細胞における IFN- γ および IL-13 産生はほとんど観察されなかった (Figure 13c)。また、NALT、nasal passage では、他の群と比較して、Spike-c-di-GMP ワクチン群において、IFN- γ および IL-13 陽性 CD4⁺ T 細胞の割合の有意な上昇が認められた一方で、IFN- γ および IL-13 陽性 CD8⁺ T 細胞の割合にほとんど違いが認められなかった (Figure 13, d and e)。また Spike-HA ワクチン群では、各 T 細胞における IFN- γ および IL-13 産生はほとんど観察されなかった (Figure 13, d and e)。以上の結果から、抗体誘導とは対照的に Spike-HA は Spike 蛋白質特異的な T 細胞の誘導能が乏しいことが示唆された。

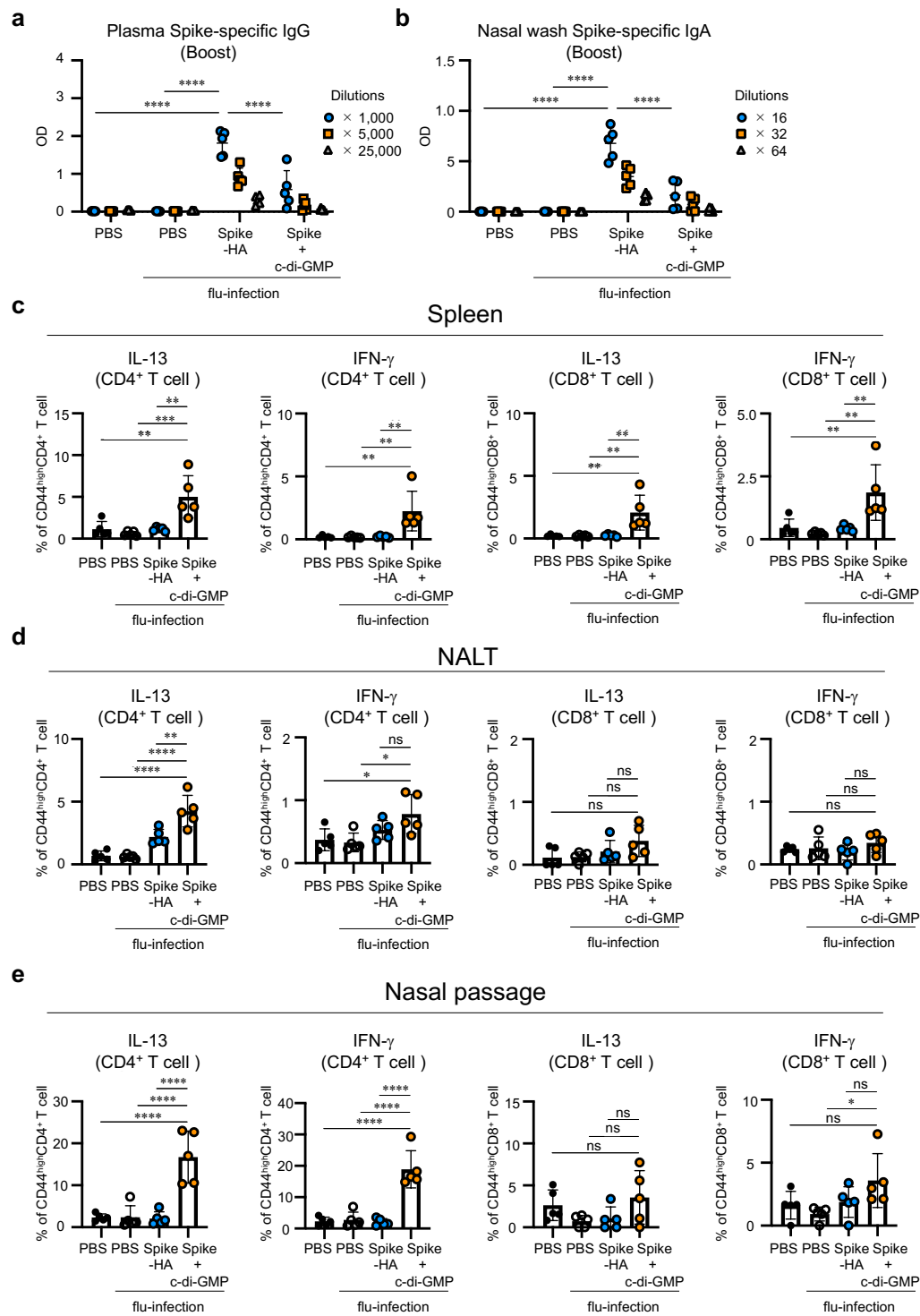


Figure 13. Intranasal immunization with Spike-HA can induce Spike-specific antibodies but is inefficient in inducing T cell responses.

(a-e) BALB/c flu-mice were immunized intranasally with Spike-HA or Spike plus c-di-GMP at 30 and 51 days after flu infection. (a, b) The levels of Spike-specific IgG in plasma and IgA in nasal washes were evaluated using ELISA (a) plasma IgG levels after boost immunization and (b) nasal wash IgA levels after boost immunization. (c-e) Spike-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in (c) spleen, (d) NALT, and (e) nasal passage 14 days after boost immunization were evaluated by flow cytometry. (a-e) Data are represented as mean \pm SD. n = 5. Each experiment was performed more than twice. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001 as indicated by Tukey's multiple comparisons test. ns, not statistically significant.

免疫誘導における生体内抗体の関与評価

次に、RBD-HA ワクチンにおける免疫誘導メカニズムを解析した。まずコンセプト通りに、キャリア抗体存在下においてワクチン抗原が効率的に粘膜組織中樹状細胞に取り込まれているかを評価した。抗原の取り込みを評価するために、蛍光蛋白質である EGFP と HA を融合した EGFP-HA を作製し、flu-mice に経鼻投与した。その後、フローサイトメトリーを用いて NALT および nasal passage 中の樹状細胞を解析した (Figure 14, a and b)。なお、樹状細胞の活性化は、活性化マーカーとして知られる副刺激分子 (CD86) を指標に評価した。その結果、EGFP-HA 投与から 6 時間後の nasal passage において、ナイーブマウスに EGFP-HA を投与した群で、PBS 投与群と比較して、EGFP 陽性樹状細胞の割合の有意な上昇が認められた (Figure 15, a and b)。さらに、EGFP-HA を投与した flu-mice では、これらの群と比較して、より高い EGFP 陽性樹状細胞の割合の上昇が認められた (Figure 15, a and b)。また、EGFP-HA 投与から 24 時間後の NALT において、他の群と比較して、EGFP-HA を投与した flu-mice で CD86⁺陽性樹状細胞の割合の有意な上昇が認められた (Figure 15, c and d)。以上の結果から、インフルエンザ感染マウスに EGFP-HA を投与することで、粘膜組織中の樹状細胞における抗原の取り込みが促進し、さらに樹状細胞が活性化されることが示された。

インフルエンザウイルスに感染したマウスでは、HA 特異的な抗体や T 細胞の誘導など、様々な免疫応答が起きていることが知られている。そこでまず、RBD-HA ワクチンにおける HA 特異的な抗体の重要性を評価した。まず、RBD-HA を HA と共に flu-mice に経鼻ワクチンし、RBD-HA とキャリア抗体の相互作用が、HA により競合阻害され得るかを評価した。なお本実験では、Control 群としてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を RBD-HA に加えて経鼻ワクチンした。その結果、RBD-HA 単独群と比較して、OVA 添加群では血漿中 RBD 特異的 IgG に変化が認められなかった一方で、HA 添加群において血漿中 RBD 特異的 IgG の有意な減少が認められた (Figure 15e)。そこで、より直接的に IgG の関与を評価するために、ナイーブおよびインフルエンザ感染マウスの血清から IgG を精製した (naive-IgG、flu-IgG)。まず HA 特異的 IgG が樹状細胞における抗原の取り込みおよび活性化を促進し得るかを *in vitro* において評価した。GM-CSF を用いて誘導したマウス骨髓由来樹状細胞 (BMDC) に、EGFP-HA を naive-IgG、flu-IgG、およびアジュバントである CpG 核酸と共に添加し、添加から 6 時間および 24 時間後にフローサイトメトリーにより細胞を解析した (Figure 14c)。その結果、添加から 6 時間後、flu-IgG 共添加群において、EGFP-HA 単独添加群および naive-IgG 共添加群と比較して、EGFP 陽性樹状細胞の割合の有意な上昇が認められた (Figure 15f)。さらに添加から 24 時間後の flu-IgG 共添加群において、EGFP-HA 単独添加群および naive-IgG 共添加群と比較して、活性化マーカーである CD80 陽性

樹状細胞の割合の有意な上昇が認められた (Figure 15g)。また、その強度はアジュバントである CpG 核酸共添加群と同程度であった (Figure 15g)。次に、より詳細に IgG の関与を明らかとするために、2 mg の各精製 IgG (naive-IgG, flu-IgG) をナイーブマウスの腹腔に移入した。まず、抗体移入直後の血漿中 HA 特異的 IgG を測定したところ、naive-IgG 移入マウスでは、抗体価が全く検出されなかった (Figure 15h)。一方で、flu-IgG 移入マウスでは、インフルエンザ感染マウスと同程度の血漿中 HA 特異的 IgG が観察された (Figure 15h)。そこで、移入から 24 時間後のマウスに RBD-HA を経鼻ワクチンし、鼻腔洗浄液中 RBD 特異的 IgA を評価した。その結果、flu-IgG 群においてのみ鼻腔洗浄液中 RBD 特異的 IgA の顕著な上昇が認められた (Figure 15i)。以上の結果より、RBD-HA を経鼻ワクチンした際に誘導される RBD 特異的抗体産生には、HA 特異的 IgG が寄与していることが示された。

次に、鼻腔中に誘導される HA 特異的 IgA の関与を評価した。まず、インフルエンザ感染から 30 日後に、HA 特異的 IgA を含む鼻腔洗浄液 (flu-NW) を回収した。その後、RBD-HA を flu-NW と共にナイーブマウスに共投与し、RBD 特異的抗体産生が誘導されるかを評価した。その結果、RBD-HA と flu-NW を共投与した群において RBD 特異的 IgA の上昇は認められなかった (Figure 15j)。また、0.5 mg の flu-IgG を移入したマウスに RBD-HA を経鼻ワクチンしても、先ほどの 2 mg の flu-IgG を移入した結果とは異なり、RBD 特異的 IgA の上昇は認められなかった。一方で、0.5 mg の flu-IgG を移入したマウスに RBD-HA と flu-NW を共投与したところ、RBD-HA 単独群と比較して、RBD 特異的 IgA の有意な上昇が認められた (Figure 15j)。以上の結果から、鼻腔中の HA 特異的 IgA は、HA 特異的 IgG 存在下においてではあるが、RBD-HA ワクチンによる免疫応答を増強する可能性が示唆された。

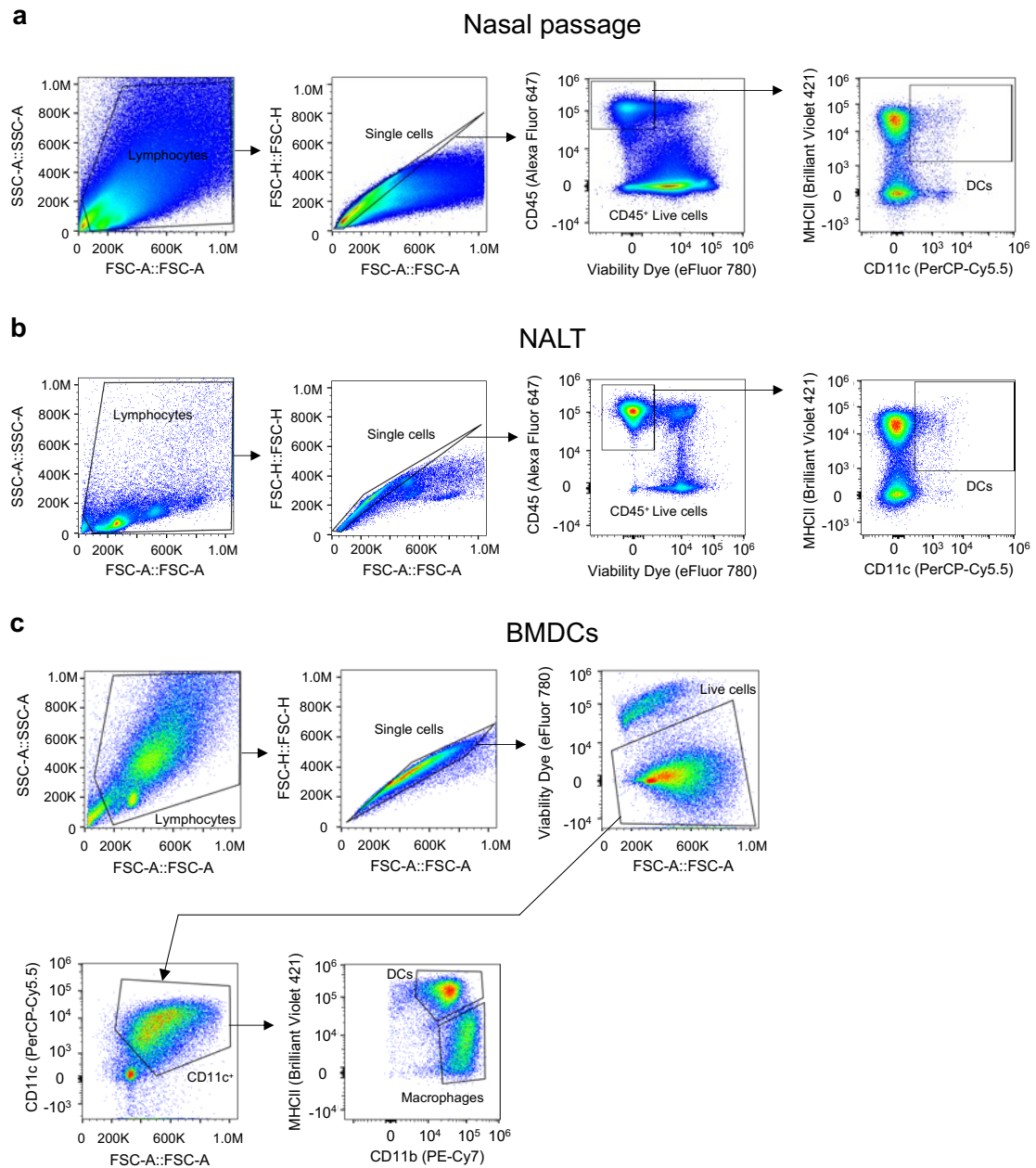


Figure 14. Gating strategies for analysis of DCs responses in nasal passage and NALT.

(a) Gating strategy to identify uptake of EGFP by DCs in nasal passage. (b) Gating strategy for analysis of CD86, a co-stimulatory molecule, expression on DCs in NALT. (c) Gating strategy to identify BMDCs in bone marrow-derived DC with GM-CSF.

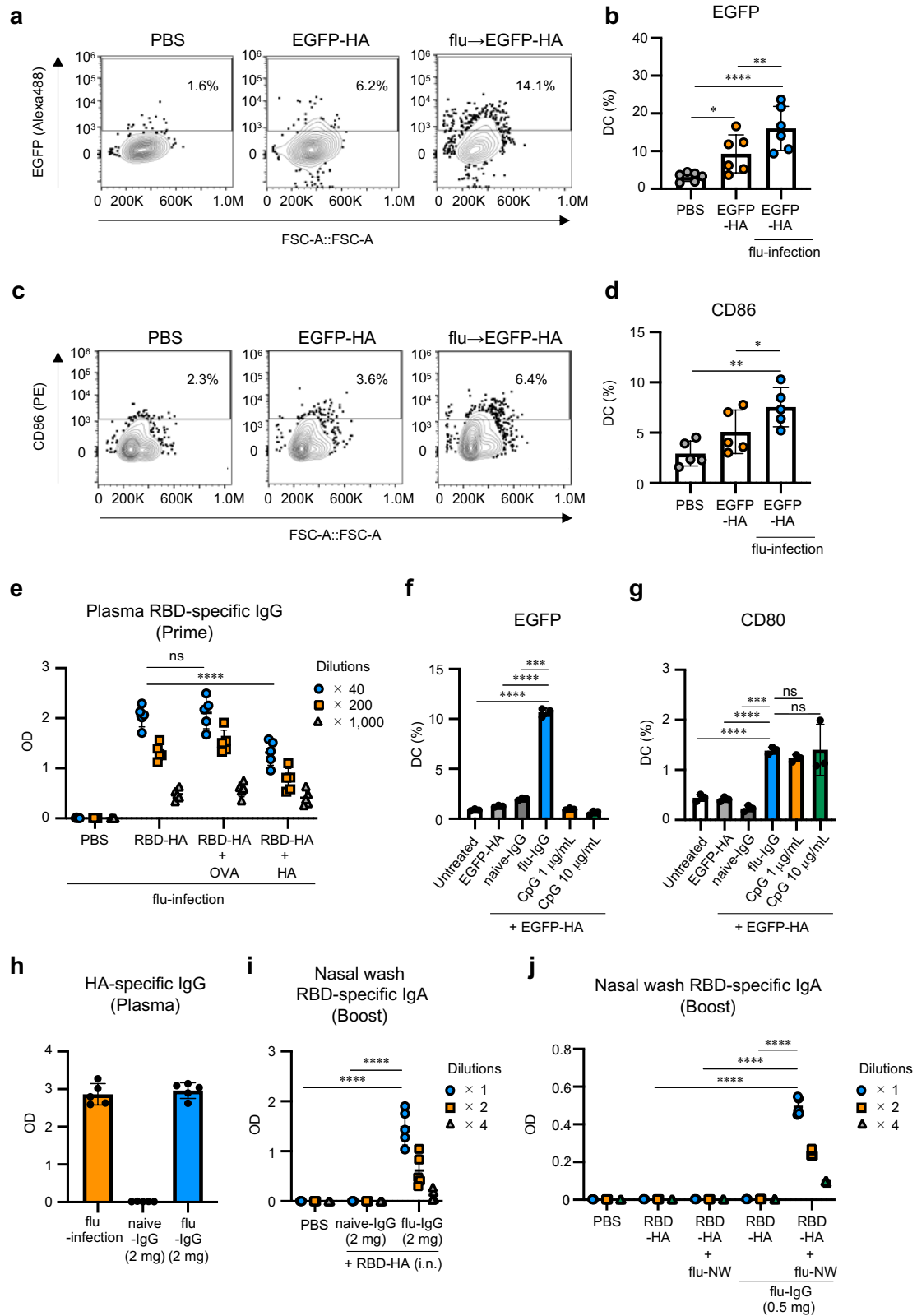


Figure 15. HA-specific pre-existing IgG and IgA contribute to the immune responses induced by intranasal vaccination with RBD-HA.

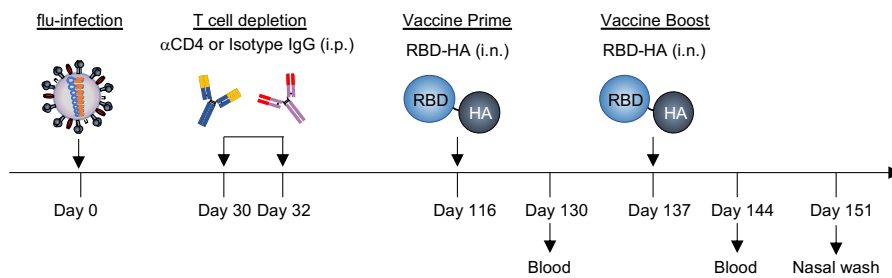
(a-d) Naive- or flu-mice were immunized intranasally with EGFP-HA. Uptake of EGFP by DCs and co-stimulatory molecule expression on DCs were evaluated by flow cytometry. (a and b) The percentage of DCs positive for EGFP in nasal passage. (c and d) The percentage of DCs positive for CD86. (e) Flu-mice were intranasally immunized with RBD-HA plus OVA or HA. The levels of RBD-specific IgG were evaluated using ELISA. (f and g) Antigen uptake and co-stimulatory molecule expression in bone marrow-derived DCs (BMDCs) were evaluated *in vitro* by flow cytometry. BMDCs were treated with EGFP-HA, EGFP-HA plus naive-IgG, flu-IgG, or CpG ODN. (f) The percentage of BMDCs positive for EGFP. (g) The percentage of BMDCs positive for CD80. (h-j) BALB/c mice received purified naive-IgG or flu-IgG and were immunized intranasally after 24 h with RBD-HA or RBD-HA plus flu-NW. (h) The levels of HA-specific IgG after passive transfer, and (i and j) the levels of RBD-specific IgA after boost immunization were evaluated using ELISA. (a and b) $n = 6$; (f and g) $n = 3$; (c, d, e, h, i, and j) $n = 5$. (a-j) Data are represented as means \pm SD. Each experiment was performed more than twice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's multiple comparisons test. ns, not statistically significant.

免疫誘導における T 細胞の関与評価

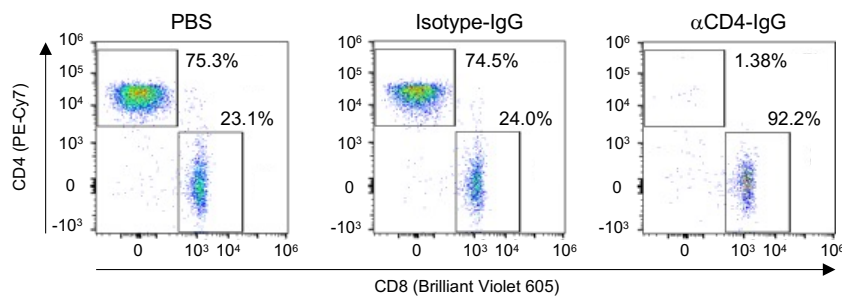
上述した通り、インフルエンザ感染は抗体のみならず、HA 特異的 T 細胞も誘導することが知られている。そこで、RBD-HA ワクチンによって誘導される免疫誘導に、 $CD4^+$ T 細胞が関与するか評価した。まず、インフルエンザ感染から、30 および 32 日目に anti- $CD4$ antibody ($\alpha CD4$ -IgG) を腹腔投与し、HA 特異的 $CD4^+$ T 細胞を除去した。その後、血中の $CD4^+$ T 細胞数を指標に、ナイーブ $CD4^+$ T 細胞が回復したタイミングで RBD-HA を経鼻ワクチンした (Figure 16a)。まず $\alpha CD4$ -IgG 投与により $CD4^+$ が除去されているかを評価するために、 $\alpha CD4$ -IgG 投与から 2 日後の血中の $CD4^+$ T 細胞を、フローサイトメトリーを用いて測定した。その結果、PBS 群や isotype IgG 投与群では血中 T 細胞の内、約 75% が $CD4^+$ T 細胞、約 24% が $CD8^+$ T 細胞であるのに対して、 $\alpha CD4$ -IgG 投与群では、血中 T 細胞を占める $CD4^+$ T 細胞の割合が約 1.4% にまで低下していた (Figure 16b)。以上の結果から、 $\alpha CD4$ -IgG 投与により、それまでに誘導されていた $CD4^+$ T 細胞の大部分が除去されたことが示された。次に、 $CD4^+$ T 細胞を除去した後、経月的に血中 $CD4^+$ T 細胞数を計測し、 $\alpha CD4$ -IgG 投与マウスにおいてナイーブ $CD4^+$ T 細胞数が回復するまで観察した。その結果、 $\alpha CD4$ -IgG 投与マウスの血中 $CD4^+$ T 細胞数は、感染から 114 日後にコントロールマウスと同程度にまで回復した (Figure 16c)。なお本実験で示した、 $CD4^+$ T 細胞の除去からナイーブ T 細胞の回復までの期間は、過去に報告された論文と概ね一致している⁷⁸。また感染から 114 日後の血漿中 HA 特異的 IgG を測定したところ、 $\alpha CD4$ -IgG 投与マウスと isotype-IgG 投与マウスにおいて抗体価の有意な差は認められなかった (Figure 16d)。そこで、感染から 116 日後に RBD-HA を経鼻ワクチンした結果、isotype-IgG 投与マウスと比較して、 $\alpha CD4$ -IgG 投与マウスにおいて 1 回目免疫、および 2 回目免疫後の血漿中 RBD 特異的 IgG の有意な減少が認められた (Figure 16, e and f)。さらに鼻腔洗浄液中 RBD 特異的 IgA でも同様に、 $\alpha CD4$ -IgG 投与マウスにおいて、isotype-IgG 投与マウスと比較し

て抗体価の有意な減少が認められた (Figure 16g)。以上の結果より、RBD-HA ワクチンによって誘導される免疫応答には、一部 HA 特異的 CD4⁺T 細胞が関与することが示された。

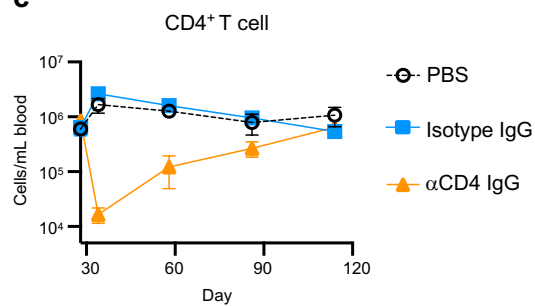
a



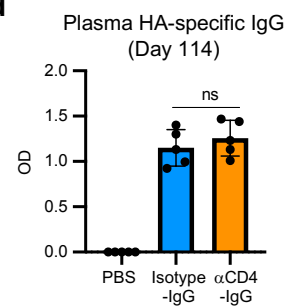
b



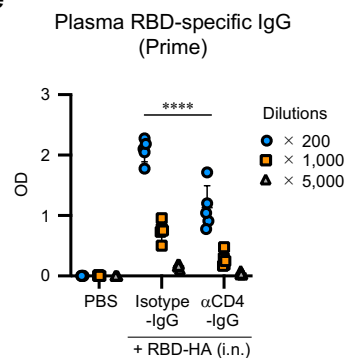
c



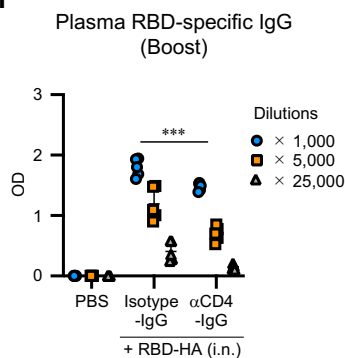
d



e



f



g

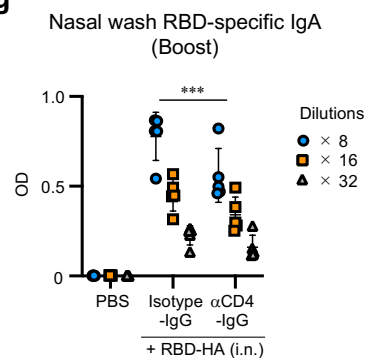


Figure 16. Pre-existing HA-specific CD4⁺ T cells contribute to the immune responses induced by intranasal vaccination with RBD-HA.

(a) Experimental scheme: for depletion of HA-specific pre-existing CD4⁺ T cells, flu-mice were intraperitoneally injected with 200 µg anti-CD4 antibody (GK1.5) or isotype antibody at 30 and 32 days, respectively after flu infection. (b) Representative flow plots of gate on live CD45⁺ CD90.2⁺ TCR-β⁺ cells are shown two days after injection with depletion antibody. (c) CD4⁺ T cells numbers in blood were monitored from 28 to 114 days after infection. Blood was collected at 28, 34, 58, 86, and 114 days after flu infection. (d) The plasma HA-specific IgG levels two days prior to immunization with RBD-HA. We used 200-fold dilutions of plasma samples. (e-f) Flu-mice were immunized intranasally with RBD-HA at 116 and 137 days after flu infection. The RBD-specific levels were evaluated using ELISA (e) plasma IgG levels after prime, (f) plasma IgG levels after boost, and (g) nasal wash IgA levels after boost immunization. (c-g) Data are represented as means ± SD. n = 5. Each experiment was performed more than twice. ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001 as indicated by Tukey's multiple comparisons test.

本コンセプトに基づいた経鼻ワクチンプラットフォームの汎用性評価

本研究の最終的な目的は、過去に誘導された免疫を利用したアジュバントフリー経鼻ワクチンのプラットフォームの構築である。そこで、他の感染症においても、同様のコンセプトに基づく経鼻ワクチンの開発が可能であるか、その汎用性を評価した。本検討では病原体として肺炎球菌および respiratory syncytial virus (RS ウイルス) を用いた。肺炎球菌は、日本における死亡要因の第 5 位である肺炎の主要な原因菌である。肺炎球菌の注射型ワクチンは既に実用化されており、高齢者においてワクチン接種が推奨されている。一方で、肺炎球菌において、経鼻ワクチンでこれまで承認された前例はない。また RS ウイルスは、特に乳幼児において肺炎や急性細気管支炎といった重篤な症状を引き起こすことがあり、現在、メガファーマが RS ウイルスに対するワクチン開発を進めているものの、経鼻ワクチンの開発はほとんど行われていない。そこでまず、SARS-CoV-2 の Spike 蛋白質の N 末端ドメインである NTD と HA を融合した NTD-HA、肺炎球菌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 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 flu-mice 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、flu-mice 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 (Figure 17, a-c)。次に、PspA-HA を経鼻ワクチンした後、肺炎球菌を下気道に感染させ、感染防御効果を評価した。その結果、flu-mice に PspA-HA をワクチンした群においてのみ、PBS 投与群と比較して、体重減少の抑制が認められ、さらに全匹の生存が確認された (Figure 17, d and e)。以上の結果から、HA に目的のワクチン抗原を融合し経鼻ワクチンすることで、アジュバントを用いずとも任意のワクチン抗原特異的抗体産生を誘導可能であることが示された。

次に、本経鼻ワクチンプラットフォームにおいて、インフルエンザ感染以外の既存免疫を利用できるかを評価した。まず、HA の代わりに PspA をキャリア蛋白質として用い、ワク

チン抗原である RBD を融合させた RBD-PspA を作製した。肺炎球菌を上気道に感染した後、感染から 30 日および 51 日後に RBD-PspA を経鼻ワクチンした (Figure 17f)。その結果、肺炎球菌感染マウスに RBD-PspA を経鼻ワクチンした群において、PBS 投与群および RBD 単独群と比較して、鼻腔洗浄液中 RBD 特異的 IgA の有意な上昇が認められた (Figure 17g)。一方で、ナীবマウスに RBD-PspA をワクチンしても抗体価の上昇は認められなかった (Figure 17g)。以上の結果は、インフルエンザ以外の感染により誘導された既存免疫においても、本コンセプトに基づく経鼻ワクチンに利用可能であることが示された。

近年、SARS-CoV-2 の出現により、mRNA ワクチンが世界中で普及しており、多くの人々が mRNA ワクチンによって誘導された Spike 蛋白質特異的抗体および CD4⁺T 細胞を保有している。そこで、mRNA ワクチンによって誘導された既存免疫を本コンセプトに応用可能かを評価した。まず、SARS-CoV-2 由来の Spike 蛋白質を発現する mRNA をマウスの皮下に 2 回免疫し、Spike 蛋白質および RBD 特異的な免疫が誘導されているマウスを作製した (mRNA-mice)。これらマウスに RBD-HA を経鼻ワクチンし、RBD 特異的抗体および CD4⁺T 細胞を介して、今度は HA に対する抗体産生が誘導されるかを評価した (Figure 17h)。その結果、PBS 投与群と比較して、RBD-HA をワクチンした mRNA-mice において、鼻腔洗浄液中の HA 特異的 IgA の有意な上昇が認められた (Figure 17i)。また、HA-c-di-GMP ワクチン群と有意な差は認められなかった。以上の結果より、RBD-HA の経鼻ワクチンにおいて、過去の感染だけでなく mRNA ワクチンによって誘導された既存免疫を利用し、ワクチン抗原特異的 IgA を誘導可能であることが示された。

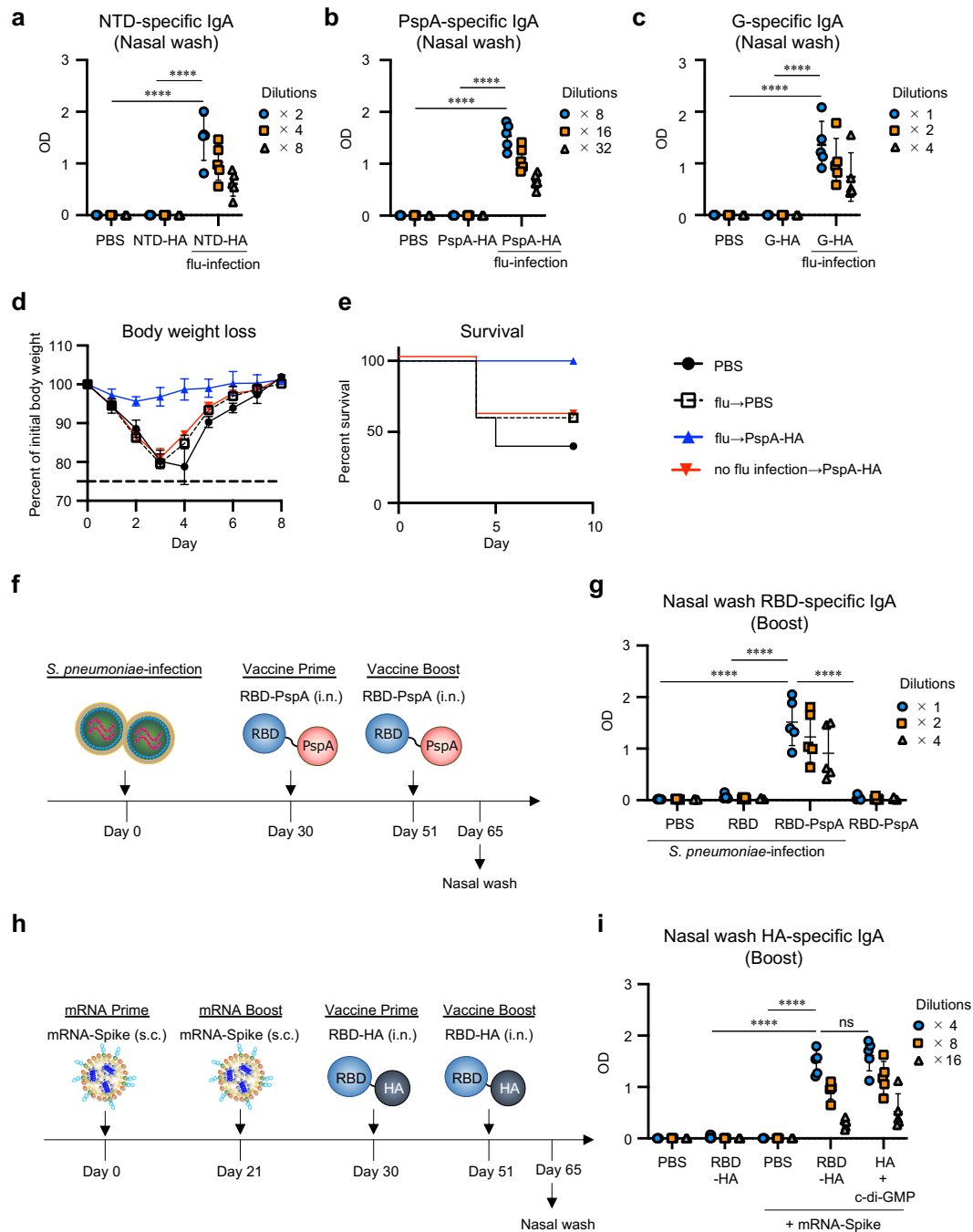


Figure 17. Intranasal subunit vaccine platform that utilizes pre-existing immunity is highly versatile.

(a-e) Flu-mice were immunized intranasally with (a) NTD-HA, (b, d, e) PspA-HA, or (c) G-HA at 30 and 51 days after flu infection. (a-c) The levels of (a) NTD-, (b) PspA-, (c) G-specific IgA in nasal wash were evaluated using ELISA. (d, e) fourteen days after boost immunization, flu-mice were challenged with *S. pneumoniae* to achieve lower respiratory tract infection. The percentage changes in (d) body weight and (e) survival were monitored after challenge with *S. pneumoniae*. (f) Experimental schema: BALB/c mice were infected intranasally with *S. pneumoniae*, followed by intranasal immunization with RBD-PspA or RBD without adjuvant at 30 and 51 days after *S. pneumoniae* infection. (g) The RBD-specific nasal wash IgA levels were evaluated using ELISA. (h) Experimental schema: BALB/c mice were subcutaneously immunized with 1 μ g of mRNA vaccine encoding SARS-CoV-2 Spike twice, followed by intranasal immunization with RBD-HA or HA plus c-di-GMP at 30 and 51 days after mRNA vaccine. (i) The HA-specific nasal wash IgA levels were evaluated using ELISA. (a-i) Data are represented as means \pm SD. $n = 5$. Each experiment was performed more than twice. **** $P < 0.0001$ as indicated by Tukey's multiple comparisons test. ns, not statistically significant.

【考察】

本検討では、インフルエンザ感染マウスに RBD-HA を経鼻ワクチンすることで、アジュバントを用いることなく、RBD 特異的 IgG および IgA を強力に誘導し得ることを明らかにした。さらに、RBD-HA による免疫応答の誘導には、HA 特異的 IgG、IgA、および HA 特異的 CD4⁺T 細胞が寄与していることが示された。一方で、HA 特異的 IgG のみでも RBD-HA による免疫応答を誘導可能であったことから、本経鼻ワクチンプラットフォームにおいて、キャリア蛋白質特異的な生体内 IgG は極めて重要であることが考えられる。一般的に、樹状細胞をはじめとする抗原提示細胞は、FcγRI、FcγRIIb、FcγRIII、FcγRIV を含むいくつかの Fcγ 受容体を膜表面に発現していることが知られている⁷⁹⁻⁸¹。抗原に結合した IgG (免疫複合体) は、抗体の Fc 部位と Fcγ 受容体の相互作用を介して、抗原提示細胞に効率的に取り込まれると共に、細胞を活性化し、抗原提示を促進することが報告されている⁸²⁻⁸⁴。過去の報告によると、破傷風トキソイドや B 型肝炎抗原などの抗原を免疫複合体の状態で投与すると、免疫原性が 10 倍から 1000 倍に高まることが明らかとされている^{72,73}。さらに、IgG は全身面だけでなく、粘膜組織である NALT においても存在することが報告されている^{85,86}。以上のことを鑑みると、本検討で HA 特異的 IgG 存在下において RBD-HA 経鼻ワクチンにより強力に免疫応答が誘導された結果は、粘膜バリアを突破した一部の抗原が NALT や血中において IgG と免疫複合体を形成し、抗原提示細胞に効率的に取り込まれ、細胞を活性化したからだと考えられた。

さらに本検討において、RBD-HA による免疫誘導には IgA が関与している可能性を見出した。粘膜上皮細胞が形成する粘膜バリアは、通常ウイルスや細菌などの病原体の侵入を防ぐ働きがある。しかし、経鼻ワクチンにおいてはこれらの粘膜バリアが仇となり、ワクチン抗原が目的の免疫誘導組織まで効率的に送達されないことが問題となっている。一方で、近年の報告では、IgA が Dectin-1 や Siglec-5 などを通じて、結合した抗原をトランスサイトシスにより粘膜バリア直下の粘膜免疫組織への送達を促進することが示されている⁶⁹。本研究でも、EGFP-HA を用いた検討により、インフルエンザ感染マウスにおいて粘膜組織中の樹状細胞における EGFP-HA の取り込みが上昇することを示した。そのため、これらの結果は、インフルエンザ感染により誘導された鼻腔中 IgA がワクチン抗原に結合し、効率的に粘膜組織へと送達したからだと考えられた。一方で本検討では、HA 特異的 IgG 存在下においてのみ、RBD-HA と鼻腔洗浄液の共投与により RBD 特異的抗体産生の上昇が観察された。しかし、これらの結果が、IgA 単独では免疫応答を誘導できないのか、単に鼻腔洗浄液中の IgA 量が免疫応答を誘導するには不足しているのかは実証できていない。また今回、IgA の関与を評価するために鼻腔洗浄液を用いたが、あくまで間接的に IgA の関与を示したにすぎない。当然、精製 IgA を用いた直接的な検討をする必要があるが、現状、マウス

IgA を精製する手法が確立されていない。そのため、今後より詳細に IgA を実証するため、IgA ノックアウトマウスを用いた検討を行う必要があると考えている。

また、RBD-HA ワクチンによる免疫誘導には HA 特異的 CD4⁺T 細胞が関与していることを明らかとした。過去の報告において、単独では抗体が誘導されにくい抗原（ハプテン）に、免疫誘導能が高い蛋白質（キャリア蛋白質）を融合させることで、ハプテンに対する抗体産生を促進させることが明らかとされている⁸⁷⁻⁸⁹。また B 細胞は、BCR に結合した抗原を取り込み、自身の MHC クラス II に抗原の一部を提示することが知られている。本検討のデータとこれらの報告を踏まえると、RBD に融合した HA が、RBD に対するキャリア蛋白質として働いたことが示唆された。即ち、RBD-HA を経鼻ワクチンした際に、1) RBD 部分に結合する BCR を持つ B 細胞が RBD-HA を取り込み、MHCII に HA の一部を抗原提示し、2) それらを HA 特異的な CD4⁺T 細胞が認識することで、3) 両者の相互作用により RBD 特異的 BCR を持つ B 細胞が活性化し、RBD 特異的抗体産生が増強したと考えられた。また、上述した通り、インフルエンザ感染は HA 特異的な IgG、IgA、CD4⁺T 細胞を誘導することが知られている⁹⁰⁻⁹²。本検討において RBD-HA ワクチンにより HA に対する免疫応答も迅速かつ強力に誘導されることを示した。その際、HA 特異的免疫細胞が活性化する際に放出するサイトカイン等が様々な免疫応答を促進し、バイスタンダー効果的に RBD に対する免疫応答の誘導に寄与した可能性も考えられた。そのため、アジュバントを用いていないにも関わらず、RBD-HA において強力に免疫応答を誘導した結果は、これらの既存免疫を利用した総合的な結果であることが示唆された。

一方で、抗体を介してワクチン効果を増強するコンセプトとして、Fc 融合戦略が古くから知られている。この戦略は、抗原に抗体の Fc 部位を融合することで、抗体の取り込みを促進させることにより抗原特異的な免疫応答を促進する。近年、Fc 融合蛋白質を経鼻ワクチンすることにより、全身面のみならず粘膜面における抗原特異的な抗体産生を増強し得ることが報告されている^{93,94}。しかし、これらの結果はアジュバントを併用した検討であり、アジュバントを用いずにワクチンした際に同様に粘膜免疫応答を誘導できるかについては明らかとなっていない。本検討において見出した経鼻ワクチンプラットフォームは、従来の Fc 融合戦略と比較して、非常に高い抗体産生を誘導することを明らかとした。また本検討の実験条件において Fc 融合抗原は、アジュバント未添加の場合、粘膜免疫応答をほとんど誘導しないことが示された。Fc 融合抗原と本経鼻ワクチンプラットフォームの大きな違いとして、後者はポリクローナルな抗体をキャリア抗体として利用できる点にあると考えている。上述したように、Fc γ 受容体は構造や機能の違いから Fc γ RI、Fc γ RIIb、Fc γ RIII、Fc γ RIV に分類され、各 Fc γ 受容体ごとに抗体との親和性が異なることが知られている⁹⁵⁻⁹⁷。例えば Fc γ RI はモノクローナルな抗体に対しても高親和性を示し結合できるのに対して、

Fc γ RIIb、Fc γ RIII、Fc γ RIV はモノクローナルな抗体に対しては親和性が低く、そのため免疫複合体のような、抗体がポリクローナルな状態で存在する場合においてのみ相互作用する⁹⁸。したがって、抗原に対して一つの Fc 部位しか持たない Fc 融合蛋白質は Fc γ RI しか利用できない。一方で本プラットフォームでは、キャリア蛋白質に対して様々なポリクローナル抗体が誘導されており、Fc γ RI に加えて他の Fc γ 受容体も利用可能である。そのため、本経鼻ワクチンプラットフォームにおいて、Fc 融合蛋白質よりも優れた免疫誘導能を示した結果は、抗体と CD4⁺T 細胞の両方を利用可能であることに加え、ポリクローナルな抗体を利用可能であることに起因していることが考えられた。一方で、Spike-HA を用いた検討において、ワクチン抗原に対する T 細胞応答はほとんど誘導されなかった。Spike-HA を免疫したマウスは、インフルエンザに感染しており、HA に対する T 細胞が既に誘導されている。そのため、Spike-HA ワクチンにより、既に多量に存在する HA 特異的 T 細胞が再活性化および迅速に増殖し、Spike 特異的 T 細胞が増殖する際に必要な様々な因子を競合的に奪ったため、十分な Spike 特異的 T 細胞応答が誘導されなかったことが考えられた。

今後、ヒトへの使用を考えた時、どの既存免疫を利用するかが極めて重要になることが想定される。例えば、本検討で主に用いたインフルエンザに対する既存免疫は、ある疫学調査によると、調査対象となった 77% のヒトの血中において、感染防御に十分な HA 特異的抗体を保有していることが報告されている⁹⁹。さらに、ほとんどの成人が破傷風とジフテリアの予防接種を受けた経験から、約 97% のヒトがこれに対する血清抗体を有していることが報告されている¹⁰⁰。そのため、多くの人々が持つ上記のような既存免疫を選択し利用することは、本経鼻ワクチンプラットフォームにおいて有用であると考えられる。また近年、腸内細菌をはじめとする細菌由来の糖に対する抗体がヒトにおいて保存されていることが報告されており¹⁰¹、これらの抗体は共生細菌や悪玉細菌の生体内におけるバランスを制御するために保存されていると考えられている¹⁰²。例えば、 α Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) と呼ばれる糖鎖に対する抗体は、ヒトにおいて最も豊富な生体内抗体であることが知られている。これらの抗体は、生体内に存在する全ての IgG 抗体の約 1% を占めており、ほぼ全ての人が保有している¹⁰³。既に、これらの糖鎖に対する抗体を利用したワクチン戦略がいくつか報告されているものの、未だ経鼻ワクチンへと応用した報告はない^{100,101}。そのため、今後このような抗体を利用できるかを検討することで、感染歴やワクチン歴がない人に対しても適用できる経鼻ワクチン開発が可能になるのではないかと考えている。

一方で本検討では、既存免疫を利用するにあたって、どの程度の免疫が存在している必要があるかについて明らかとするには至らなかった。本検討では、インフルエンザ感染により誘導された HA 特異的 IgG は、少なくとも 6 ヶ月間は減少を示さなかった。しかし、人において HA に対する抗体価は、感染またはワクチン接種後の数週間で上昇し、その後、時

間の経過とともに減少することが判明している¹⁰⁴。そのため、人によって保有している抗体の量や免疫の強さに違いがあることが推察される。今後、本検討において見出した経鼻ワクチンプラットフォームをヒトへと適用するためには、必要とする抗体や CD4⁺T 細胞の量などを適切に把握しておく必要があり、今後の課題である。

結論

本検討では、NA のワクチン抗原としての有用性評価、及びアジュバントフリー経鼻ワクチン基盤技術の構築を図り、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、rNA は、rHA 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、本結果は、インフルエンザワクチンにおいて NA に着眼したワクチン開発の必要性を示すものであると考えている。特に本研究を通じて明らかとなった、投与経路によって誘導される抗体の認識エピトープが異なるという知見は、今後のワクチン開発に資する重要な知見となり得るものである。また、今回見出した新たな経鼻ワクチンプラットフォームは、これまでの経鼻ワクチンにおける問題点を解消し、安全で有効な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。

貢献度

<第一節>

- ・共同研究者の山本康之さんには、rNA のプラスミド設計についてご指導頂いた。
- ・共同研究者の竹下浩平先生には、rNA ワクチンについてのご意見を頂くと共に、コンセプトの立案についてご助言を頂いた。
- ・山本拓也先生、野木森拓人先生には、実験条件についての多くのご指導を頂いた。

<第二節>

- ・共同研究者の徳納渚沙さんには、感染実験等においてご協力頂いた。
- ・共同研究者の國澤純先生には、NALT, nasal passage の回収方法をご指導頂いた。
- ・共同研究者の秋田英万先生、田中浩揮先生、Jessica Anindita さんには、mRNA ワクチンの作製方法をご指導頂いた。
- ・共同研究者の松浦善治先生、小野慎子先生には、シュードタイプウイルスをご提供頂いた。
- ・共同研究者の岡本徹先生には、SARS-CoV-2 の培養方法についてご指導頂いた。
- ・共同研究者の山崎晶先生には、RBD-HA ワクチンについてのご意見を頂くと共に、コンセプトの立案についてご助言を頂いた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、大阪大学大学院薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野 特任教授 吉岡靖雄先生には、御指導、御鞭撻を賜ると共に、終始御配慮賜りました。ここに、衷心より感謝の意を表します。

大阪大学大学院薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野 特任講師 平井敏郎先生には、研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と御助言を賜り、大変お世話になりました。この場をお借りして、心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々な専門的技術指導と共に、貴重な御指導・御鞭撻を頂きました国立研究開発法人理化学研究所 竹下浩平研究員、一般財団法人微生物病研究会 山本康之研究員、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所免疫老化プロジェクト 山本拓也プロジェクトリーダー、野木森拓人研究員、同研究所ワクチンマテリアルプロジェクト 國澤純先生、東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野 教授の秋田英万、千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室 助教の田中浩揮先生、Jessica Anindita 修士、大阪大学微生物病研究所 ウイルス制御学グループ 特任教授の松浦善治先生、特任助教の小野慎子先生、同研究所 感染機構研究部門 教授の岡本徹先生、同研究所 分子免疫制御分野 教授の山崎晶先生に心より御礼申し上げます。

加えて、本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を頂きました、大阪大学微生物病研究所 事務員 稲中雅子様、心より御礼申し上げます。また研究生を送るにあたり大変お世話になった歴代研究室メンバーの三里一貴研究員、民谷繁幸博士、白井星記修士、金井優紀修士、渋谷銘人修士、北川聡基修士、吉川英佑修士に感謝申し上げます。また、終始共に励まし合い、支え合った松田鉄平学士、河原永悟修士、千福航太学士、橋本壮一郎さん、平田陽暉さんを含む大阪大学大学院薬学研究科創薬ナノデザイン学分野の院生、学生の皆様に謹んで感謝申し上げます。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、日本学術振興会、また、常に温かく見守り支えてくれた家族に感謝致します。

引用文献

- 1 Saunders-Hastings, P. R. & Krewski, D. Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens* **5** (2016). <https://doi.org/10.3390/pathogens5040066>
- 2 Hu, D. *et al.* Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E7730-E7739 (2016). <https://doi.org/10.1073/pnas.1608732113>
- 3 Jayasundara, K., Soobiah, C., Thommes, E., Tricco, A. C. & Chit, A. Natural attack rate of influenza in unvaccinated children and adults: a meta-regression analysis. *BMC Infect Dis* **14**, 670 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0670-5>
- 4 Krammer, F. & Palese, P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 167-182 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrd4529>
- 5 Molinari, N. A. *et al.* The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine* **25**, 5086-5096 (2007). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.03.046>
- 6 Tong, S. *et al.* New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* **9**, e1003657 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003657>
- 7 Baigent, S. J. & McCauley, J. W. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays* **25**, 657-671 (2003). <https://doi.org/10.1002/bies.10303>
- 8 Kilbourne, E. D., Laver, W. G., Schulman, J. L. & Webster, R. G. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. *J Virol* **2**, 281-288 (1968). <https://doi.org/10.1128/JVI.2.4.281-288.1968>
- 9 Russell, C. J. Acid-induced membrane fusion by the hemagglutinin protein and its role in influenza virus biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **385**, 93-116 (2014). https://doi.org/10.1007/82_2014_393
- 10 de Graaf, M. & Fouchier, R. A. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J* **33**, 823-841 (2014). <https://doi.org/10.1002/emboj.201387442>
- 11 Wohlbold, T. J. & Krammer, F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses* **6**, 2465-2494 (2014). <https://doi.org/10.3390/v6062465>
- 12 Gerdil, C. The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* **21**, 1776-1779 (2003). [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(03\)00071-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00071-9)
- 13 Tricco, A. C. *et al.* Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* **11**, 153 (2013). <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-153>

- 14 de Jong, J. C., Beyer, W. E., Palache, A. M., Rimmelzwaan, G. F. & Osterhaus, A. D. Mismatch between the 1997/1998 influenza vaccine and the major epidemic A(H3N2) virus strain as the cause of an inadequate vaccine-induced antibody response to this strain in the elderly. *J Med Virol* **61**, 94-99 (2000).
- 15 Wrammert, J. *et al.* Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* **453**, 667-671 (2008).
<https://doi.org/10.1038/nature06890>
- 16 Moody, M. A. *et al.* H3N2 influenza infection elicits more cross-reactive and less clonally expanded anti-hemagglutinin antibodies than influenza vaccination. *PLoS One* **6**, e25797 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025797>
- 17 Whitlock, E. P., Garlitz, B. A., Harris, E. L., Beil, T. L. & Smith, P. R. in *Screening for Hereditary Hemochromatosis: A Focused Evidence Review U.S. Preventive Services Task Force Evidence Syntheses, formerly Systematic Evidence Reviews* (2006).
- 18 Hutchinson, E. C. *et al.* Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat Commun* **5**, 4816 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms5816>
- 19 Chen, Y. Q. *et al.* Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies. *Cell* **173**, 417-429 e410 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.030>
- 20 Schulman, J. L., Khakpour, M. & Kilbourne, E. D. Protective effects of specific immunity to viral neuraminidase on influenza virus infection of mice. *J Virol* **2**, 778-786 (1968). <https://doi.org/10.1128/JVI.2.8.778-786.1968>
- 21 Couch, R. B., Kasel, J. A., Gerin, J. L., Schulman, J. L. & Kilbourne, E. D. Induction of partial immunity to influenza by a neuraminidase-specific vaccine. *J Infect Dis* **129**, 411-420 (1974). <https://doi.org/10.1093/infdis/129.4.411>
- 22 Martinet, W. *et al.* Protection of mice against a lethal influenza challenge by immunization with yeast-derived recombinant influenza neuraminidase. *Eur J Biochem* **247**, 332-338 (1997). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00332.x>
- 23 Wohlbold, T. J. *et al.* Vaccination with adjuvanted recombinant neuraminidase induces broad heterologous, but not heterosubtypic, cross-protection against influenza virus infection in mice. *mBio* **6**, e02556 (2015).
<https://doi.org/10.1128/mBio.02556-14>
- 24 Sandbulte, M. R. *et al.* Discordant antigenic drift of neuraminidase and hemagglutinin in H1N1 and H3N2 influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20748-20753 (2011). <https://doi.org/10.1073/pnas.1113801108>
- 25 Wang-Jairaj, J. *et al.* Zanamivir aqueous solution in severe influenza: A global Compassionate Use Program, 2009-2019. *Influenza Other Respir Viruses* **16**, 542-551 (2022). <https://doi.org/10.1111/irv.12947>

- 26 Gamblin, S. J. & Skehel, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem* **285**, 28403-28409 (2010).
<https://doi.org/10.1074/jbc.R110.129809>
- 27 McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E. & McKimm-Breschkin, J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* **10**, 39 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>
- 28 Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H. D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* **78**, 12665-12667 (2004).
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12665-12667.2004>
- 29 Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H. D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* **12**, 159-166 (2002). <https://doi.org/10.1002/rmv.352>
- 30 Gaymard, A., Le Briand, N., Frobert, E., Lina, B. & Escuret, V. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clin Microbiol Infect* **22**, 975-983 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.007>
- 31 Yang, X. *et al.* A beneficiary role for neuraminidase in influenza virus penetration through the respiratory mucus. *PLoS One* **9**, e110026 (2014).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110026>
- 32 Cohen, M. *et al.* Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virol J* **10**, 321 (2013). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-321>
- 33 Eichelberger, M. C. & Wan, H. Influenza neuraminidase as a vaccine antigen. *Curr Top Microbiol Immunol* **386**, 275-299 (2015). https://doi.org/10.1007/82_2014_398
- 34 Xu, X., Zhu, X., Dwek, R. A., Stevens, J. & Wilson, I. A. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *J Virol* **82**, 10493-10501 (2008).
<https://doi.org/10.1128/JVI.00959-08>
- 35 Yasuhara, A. *et al.* Antigenic drift originating from changes to the lateral surface of the neuraminidase head of influenza A virus. *Nat Microbiol* **4**, 1024-1034 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41564-019-0401-1>
- 36 Webster, R. G. & Laver, W. G. Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J Immunol* **99**, 49-55 (1967).
- 37 Krammer, F. *et al.* NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines? *mBio* **9** (2018). <https://doi.org/10.1128/mBio.02332-17>
- 38 Marcelin, G., Sandbulte, M. R. & Webby, R. J. Contribution of antibody production against neuraminidase to the protection afforded by influenza vaccines. *Rev Med Virol* **22**, 267-279 (2012). <https://doi.org/10.1002/rmv.1713>
- 39 Murphy, B. R. & Clements, M. L. The systemic and mucosal immune response of

- humans to influenza A virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **146**, 107-116 (1989).
https://doi.org/10.1007/978-3-642-74529-4_12
- 40 Terauchi, Y. *et al.* IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum Vaccin Immunother* **14**, 1351-1361 (2018).
<https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1438791>
- 41 Tamura, S. *et al.* Functional role of respiratory tract haemagglutinin-specific IgA antibodies in protection against influenza. *Vaccine* **8**, 479-485 (1990).
[https://doi.org/10.1016/0264-410x\(90\)90250-p](https://doi.org/10.1016/0264-410x(90)90250-p)
- 42 Hasegawa, H., Ichinohe, T., Tamura, S. & Kurata, T. Development of a mucosal vaccine for influenza viruses: preparation for a potential influenza pandemic. *Expert Rev Vaccines* **6**, 193-201 (2007). <https://doi.org/10.1586/14760584.6.2.193>
- 43 Yusuf, H. & Kett, V. Current prospects and future challenges for nasal vaccine delivery. *Hum Vaccin Immunother* **13**, 34-45 (2017).
<https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1239668>
- 44 Akkaya, M., Kwak, K. & Pierce, S. K. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* **20**, 229-238 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2>
- 45 Casten, L. A. & Pierce, S. K. Receptor-mediated B cell antigen processing. Increased antigenicity of a globular protein covalently coupled to antibodies specific for B cell surface structures. *J Immunol* **140**, 404-410 (1988).
- 46 Zabel, F. *et al.* Viral particles drive rapid differentiation of memory B cells into secondary plasma cells producing increased levels of antibodies. *J Immunol* **192**, 5499-5508 (2014). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400065>
- 47 Colman, P. M., Varghese, J. N. & Laver, W. G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**, 41-44 (1983).
<https://doi.org/10.1038/303041a0>
- 48 Murphy, B. R., Kasel, J. A. & Chanock, R. M. Association of serum anti-neuraminidase antibody with resistance to influenza in man. *N Engl J Med* **286**, 1329-1332 (1972). <https://doi.org/10.1056/NEJM197206222862502>
- 49 Saito, S. *et al.* IgA tetramerization improves target breadth but not peak potency of functionality of anti-influenza virus broadly neutralizing antibody. *PLoS Pathog* **15**, e1007427 (2019). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007427>
- 50 Wan, H. *et al.* Molecular basis for broad neuraminidase immunity: conserved epitopes in seasonal and pandemic H1N1 as well as H5N1 influenza viruses. *J Virol* **87**, 9290-9300 (2013). <https://doi.org/10.1128/JVI.01203-13>
- 51 Jiang, L. *et al.* Comparative Efficacy of Monoclonal Antibodies That Bind to Different Epitopes of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus Neuraminidase. *J Virol* **90**, 117-

- 128 (2016). <https://doi.org:10.1128/JVI.01756-15>
- 52 Wan, H. *et al.* Structural characterization of a protective epitope spanning A(H1N1)pdm09 influenza virus neuraminidase monomers. *Nat Commun* **6**, 6114 (2015). <https://doi.org:10.1038/ncomms7114>
- 53 Gianchecchi, E. *et al.* How to assess the effectiveness of nasal influenza vaccines? Role and measurement of sIgA in mucosal secretions. *Influenza Other Respir Viruses* **13**, 429-437 (2019). <https://doi.org:10.1111/irv.12664>
- 54 Renegar, K. B., Small, P. A., Jr., Boykins, L. G. & Wright, P. F. Role of IgA versus IgG in the control of influenza viral infection in the murine respiratory tract. *J Immunol* **173**, 1978-1986 (2004). <https://doi.org:10.4049/jimmunol.173.3.1978>
- 55 Suzuki, T. *et al.* Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7809-7814 (2015). <https://doi.org:10.1073/pnas.1503885112>
- 56 Tumpey, T. M., Renshaw, M., Clements, J. D. & Katz, J. M. Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection. *J Virol* **75**, 5141-5150 (2001). <https://doi.org:10.1128/JVI.75.11.5141-5150.2001>
- 57 Takada, A., Matsushita, S., Ninomiya, A., Kawaoka, Y. & Kida, H. Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* **21**, 3212-3218 (2003). [https://doi.org:10.1016/s0264-410x\(03\)00234-2](https://doi.org:10.1016/s0264-410x(03)00234-2)
- 58 Maurer, M. A. *et al.* Glycosylation of Human IgA Directly Inhibits Influenza A and Other Sialic-Acid-Binding Viruses. *Cell Rep* **23**, 90-99 (2018). <https://doi.org:10.1016/j.celrep.2018.03.027>
- 59 Okuya, K. *et al.* Potential Role of Nonneutralizing IgA Antibodies in Cross-Protective Immunity against Influenza A Viruses of Multiple Hemagglutinin Subtypes. *J Virol* **94** (2020). <https://doi.org:10.1128/JVI.00408-20>
- 60 Chen, J. R. *et al.* Vaccination of monoglycosylated hemagglutinin induces cross-strain protection against influenza virus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2476-2481 (2014). <https://doi.org:10.1073/pnas.1323954111>
- 61 Wu, C. Y. *et al.* Influenza A surface glycosylation and vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 280-285 (2017). <https://doi.org:10.1073/pnas.1617174114>
- 62 Sadoff, J. *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 2187-2201 (2021). <https://doi.org:10.1056/NEJMoa2101544>
- 63 Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **586**, 516-527 (2020). <https://doi.org:10.1038/s41586-020-2798-3>
- 64 Sheikh-Mohamed, S. *et al.* Systemic and mucosal IgA responses are variably

- induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection. *Mucosal Immunol* **15**, 799-808 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00511-0>
- 65 Topol, E. J. & Iwasaki, A. Operation Nasal Vaccine-Lightning speed to counter COVID-19. *Sci Immunol* **7**, eadd9947 (2022). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add9947>
 - 66 Langel, S. N. *et al.* Adenovirus type 5 SARS-CoV-2 vaccines delivered orally or intranasally reduced disease severity and transmission in a hamster model. *Sci Transl Med* **14**, eabn6868 (2022). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn6868>
 - 67 Cevik, M. *et al.* SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe* **2**, e13-e22 (2021). [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5)
 - 68 Mutsch, M. *et al.* Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* **350**, 896-903 (2004). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030595>
 - 69 Rochereau, N. *et al.* Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol* **11**, e1001658 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001658>
 - 70 Rochereau, N. *et al.* Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. *J Allergy Clin Immunol* **137**, 214-222 e212 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.042>
 - 71 Rochereau, N. *et al.* Secretory IgA as a vaccine carrier for delivery of HIV antigen to M cells. *Eur J Immunol* **45**, 773-779 (2015). <https://doi.org/10.1002/eji.201444816>
 - 72 Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F. & Guyre, P. M. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* **157**, 541-548 (1996).
 - 73 Celis, E. & Chang, T. W. Antibodies to hepatitis B surface antigen potentiate the response of human T lymphocyte clones to the same antigen. *Science* **224**, 297-299 (1984). <https://doi.org/10.1126/science.6231724>
 - 74 Torii, S. *et al.* Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction. *Cell Rep* **35**, 109014 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109014>
 - 75 Adamova, E. *et al.* Enhanced antigen-specific antibody and cytokine responses when targeting antigen to human FcGAMMA receptor type I using an anti-human FcGAMMA receptor type I-streptavidin fusion protein in an adjuvant-free system. *Immunol Invest* **34**, 417-429 (2005). <https://doi.org/10.1080/08820130500265372>
 - 76 Czajkowsky, D. M., Hu, J., Shao, Z. & Pleass, R. J. Fc-fusion proteins: new

- developments and future perspectives. *EMBO Mol Med* **4**, 1015-1028 (2012).
<https://doi.org:10.1002/emmm.201201379>
- 77 Guyre, P. M. *et al.* Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. *Cancer Immunol Immunother* **45**, 146-148 (1997). <https://doi.org:10.1007/s002620050418>
- 78 Zhao, J. *et al.* Airway Memory CD4(+) T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses. *Immunity* **44**, 1379-1391 (2016).
<https://doi.org:10.1016/j.immuni.2016.05.006>
- 79 Guillems, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* **14**, 94-108 (2014). <https://doi.org:10.1038/nri3582>
- 80 Zhu, X. *et al.* MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* **166**, 3266-3276 (2001). <https://doi.org:10.4049/jimmunol.166.5.3266>
- 81 Lanzavecchia, A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **8**, 773-793 (1990). <https://doi.org:10.1146/annurev.iy.08.040190.004013>
- 82 Amigorena, S. & Bonnerot, C. Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules. *Semin Immunol* **11**, 385-390 (1999).
<https://doi.org:10.1006/smim.1999.0196>
- 83 Amigorena, S. & Bonnerot, C. Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol Rev* **172**, 279-284 (1999).
<https://doi.org:10.1111/j.1600-065x.1999.tb01372.x>
- 84 Regnault, A. *et al.* Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**, 371-380 (1999).
<https://doi.org:10.1084/jem.189.2.371>
- 85 Sealy, R., Jones, B. G., Surman, S. L. & Hurwitz, J. L. Robust IgA and IgG-producing antibody forming cells in the diffuse-NALT and lungs of Sendai virus-vaccinated cotton rats associate with rapid protection against human parainfluenza virus-type 1. *Vaccine* **28**, 6749-6756 (2010). <https://doi.org:10.1016/j.vaccine.2010.07.068>
- 86 Asakura, K., Saito, H., Hata, M. & Kataura, A. Antigen specific immunoglobulin production by NALT lymphocytes in rats. *Acta Otolaryngol Suppl* **523**, 80-83 (1996).
- 87 Mitchison, N. A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur J Immunol* **1**, 10-17 (1971).
<https://doi.org:10.1002/eji.1830010103>
- 88 Rajewsky, K., Schirmacher, V., Nae, S. & Jerne, N. K. The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity. *J Exp Med* **129**, 1131-1143

- (1969). <https://doi.org/10.1084/jem.129.6.1131>
- 89 Herzenberg, L. A., Tokuhisa, T. & Herzenberg, L. A. Carrier-priming leads to hapten-specific suppression. *Nature* **285**, 664-667 (1980). <https://doi.org/10.1038/285664a0>
 - 90 Krammer, F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol* **19**, 383-397 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0143-6>
 - 91 Brown, D. M., Roman, E. & Swain, S. L. CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol* **16**, 171-177 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.smim.2004.02.004>
 - 92 Miao, H. *et al.* Quantifying the early immune response and adaptive immune response kinetics in mice infected with influenza A virus. *J Virol* **84**, 6687-6698 (2010). <https://doi.org/10.1128/JVI.00266-10>
 - 93 Ye, L., Zeng, R., Bai, Y., Roopenian, D. C. & Zhu, X. Efficient mucosal vaccination mediated by the neonatal Fc receptor. *Nat Biotechnol* **29**, 158-163 (2011). <https://doi.org/10.1038/nbt.1742>
 - 94 Lu, L. *et al.* A neonatal Fc receptor-targeted mucosal vaccine strategy effectively induces HIV-1 antigen-specific immunity to genital infection. *J Virol* **85**, 10542-10553 (2011). <https://doi.org/10.1128/JVI.05441-11>
 - 95 Van den Hoecke, S. *et al.* Hierarchical and Redundant Roles of Activating FcγR1s in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies. *J Virol* **91** (2017). <https://doi.org/10.1128/JVI.02500-16>
 - 96 Huber, V. C. *et al.* Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccine Immunol* **13**, 981-990 (2006). <https://doi.org/10.1128/CVI.00156-06>
 - 97 Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* **5**, 520 (2014). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
 - 98 Bournazos, S., Gupta, A. & Ravetch, J. V. The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nat Rev Immunol* **20**, 633-643 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00410-0>
 - 99 Petrie, J. G. *et al.* Antibodies Against the Current Influenza A(H1N1) Vaccine Strain Do Not Protect Some Individuals From Infection With Contemporary Circulating Influenza A(H1N1) Virus Strains. *J Infect Dis* **214**, 1947-1951 (2016). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw479>
 - 100 Abdel-Motal, U. M., Guay, H. M., Wigglesworth, K., Welsh, R. M. & Galili, U. Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells. *J Virol* **81**, 9131-9141 (2007). <https://doi.org/10.1128/JVI.00647-07>
 - 101 Sarkar, S. *et al.* Synthesis of a single-molecule L-rhamnose-containing three-

- component vaccine and evaluation of antigenicity in the presence of anti-L-rhamnose antibodies. *J Am Chem Soc* **132**, 17236-17246 (2010).
<https://doi.org:10.1021/ja107029z>
- 102 Okai, S. *et al.* High-affinity monoclonal IgA regulates gut microbiota and prevents colitis in mice. *Nat Microbiol* **1**, 16103 (2016).
<https://doi.org:10.1038/nmicrobiol.2016.103>
- 103 Galili, U., Rachmilewitz, E. A., Peleg, A. & Flechner, I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med* **160**, 1519-1531 (1984).
<https://doi.org:10.1084/jem.160.5.1519>
- 104 Petrie, J. G., Ohmit, S. E., Johnson, E., Truscon, R. & Monto, A. S. Persistence of Antibodies to Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Following One or Two Years of Influenza Vaccination. *J Infect Dis* **212**, 1914-1922 (2015).
<https://doi.org:10.1093/infdis/jiv313>