

Title	RSウイルスワクチンの副反応機序の解明と新規ワクチン開発
Author(s)	河原, 永悟
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/96143">https://doi.org/10.18910/96143</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

2023 年度（令和 5 年度）博士論文

# RS ウイルスワクチンの 副反応機序の解明と新規ワクチン開発

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

博士課程 河原永悟

目次	
緒論	2
本論	4
第一節	G 蛋白質ワクチンの副反応の解析と機序解明 4
第二節	有効かつ安全な新規 G 蛋白質ワクチンの開発 26
第三節	F 蛋白質ワクチンの URT および LRT における 感染防御機構の解明 54
結論	67
謝辞	68
参考文献	69

## 緒論

呼吸器合胞体ウイルス (respiratory syncytial virus, RSV) は 2 歳までにほぼすべての乳幼児が感染し、その後も再感染を繰り返す<sup>1,2</sup>。RSV は通常、上気道 (upper respiratory tract, URT) に感染し、鼻水や咳などの風邪様症状を引き起こすが、特に生後 6 カ月未満の乳児や基礎疾患を有する高齢者では、下気道 (lower respiratory tract, LRT) まで感染が拡大することにより、肺炎や細気管支炎などの重篤な呼吸器疾患を引き起こす<sup>2,3</sup>。RSV の感染者数は世界で年間 6,400 万人であり、死者 16 万人のうち 12 万人が 60 カ月未満の乳幼児である<sup>4,5</sup>。上記現状により、乳児および高齢者を対象とした RSV ワクチンの開発が活発に行われている。特に、高齢者対象ワクチンは高齢者に直接ワクチンを接種する仕様であるのに対し、乳児対象ワクチンは妊婦からの母子移行抗体による感染予防を目的とした母子免疫ワクチンが主体である<sup>6</sup>。また、2022 年には、RSV 感染症は日本において今後のパンデミックに備えるべき重点感染症に指定され、2023 年には、世界初の RSV ワクチン (高齢者用) が承認された<sup>7</sup>。

一方で、RSV ワクチンは、ワクチン関連疾患増強 (vaccine-associated enhanced disease, VAED) が長年問題となっており、他の感染症ワクチンと比較して開発が大幅に遅れた<sup>8</sup>。VAED とは、副反応の一種で、ワクチン接種によりウイルス感染した際の症状が増悪する現象を指す<sup>9</sup>。代表的な事例として、ウイルス全粒子をホルマリンにより不活化したホルマリン不活化 RSV (FI-RSV) ワクチンの臨床試験では、ワクチン接種後に RSV に感染した 20 人のうち 16 人が重篤な下気道炎で入院し、その後 2 人が死亡した<sup>10,11</sup>。死亡患者の肺からは過剰な好酸球浸潤が観察され<sup>8,12</sup>、動物を用いた解析により、好酸球浸潤の原因は 2 型ヘルパー T (Th2) 応答であることが示唆されている<sup>8,13</sup>。つまり、VAED は、FI-RSV ワクチン中のいずれかの RSV 由来蛋白質による Th2 応答が原因であると考えられるが、未だ原因蛋白質の同定には至っていない。したがって、FI-RSV のようにウイルス全粒子を用いた RSV ワクチンは安全性の確証に時間を要しており開発が遅れている。一方で、組換え蛋白質を抗原として用いたサブユニットワクチンの開発が盛んに行われている。

RSV ワクチンにおいて、RSV 表面に発現する G 蛋白質および F 蛋白質は、宿主細胞への感染過程において、それぞれ接着および膜融合に関与しており、主要なワクチン標的抗原となっている<sup>2</sup>。F 蛋白質は、ホモ 3 量体から成り、感染前は構造的に準安定な pre-fusion (pre-F) form を形成しているが、感染時に宿主細胞と膜融合する際には、pre-F form から構造的に安定な post-fusion (post-F) form に変化する<sup>2</sup>。Pre-F は post-F と比較して中和抗体によって認識されるエピトープが多く存在するため、組換え pre-F ワクチンは高

い中和抗体誘導能を有する<sup>14</sup>。近年、アミノ酸置換によって Pre-F に構造を安定化させた変異 F 蛋白質である DS-Cav1 が開発されたことを契機に、F 蛋白質ワクチンの開発が急速に進展している<sup>15</sup>。F 蛋白質ワクチンの臨床試験では、重篤な副反応は報告されておらず、RSV の LRT 感染による重症下気道炎に対しては、高齢者で 90%以上、母子免疫ワクチンを介した生後 180 日未満の乳児で約 70%の有効性を示した<sup>7,16</sup>。以上より、F 蛋白質ワクチンは有効性および安全性が立証され、現在では、上述した世界初の RSV ワクチンを含む 2 種類の F 蛋白質ワクチンが承認されている<sup>7,17</sup>。一方で、F 蛋白質ワクチンは、RSV の LRT 感染による重症化に対して高い予防効果を発揮するものの、感染予防効果が高齢者で約 60%、母子免疫ワクチンを介した生後 180 日未満の乳児で 40%未満と低い現状にある<sup>7,16</sup>。したがって、F 蛋白質ワクチンは感染防御効果において改良の余地があり、RSV の初感染部位である URT における感染防御効果の向上が望まれている。

一方で、F 蛋白質と同様に、G 蛋白質も中和抗体の認識エピトープを有しており、G 蛋白質ワクチンは動物モデルにおいて感染防御に有効であることが報告されている<sup>18-21</sup>。また、G 蛋白質ワクチンは LRT において F 蛋白質ワクチンとの併用効果も報告されており<sup>22,23</sup>、F 蛋白質ワクチンの感染防御効果の向上に有用であると考えられている。さらに、新型コロナウイルスワクチンでも示されるように、特定の抗原に対するワクチンに依存すると、変異ウイルスの出現や流行を招く恐れがある。現実問題として、F 蛋白質を標的としたモノクローナル抗体に対しては、既に RSV の逃避変異が報告されている<sup>2,24</sup>。したがって、F 蛋白質に対する抗体から逃避する変異ウイルスの流行に備えるためにも、G 蛋白質を標的とする RSV ワクチンの開発は急務であると考えられる。しかし、G 蛋白質ワクチンは、副反応が懸念されており、開発が難航している<sup>20</sup>。過去に、哺乳類細胞 (mammalian cells) を用いて作製した精製組換え G 蛋白質 (mG) をマウスにワクチンした際、RSV 感染を防御した一方で、FI-RSV ワクチンと同様に、Th2 型免疫応答を増強し、RSV 感染後に肺で過剰に好酸球が増加することが報告された<sup>22,25,26</sup>。しかし、G 蛋白質ワクチンの副反応に関する知見は未だに乏しく、詳細な副反応の解析と安全性の向上が待望されている。

以上の観点から本研究では、まず、G 蛋白質ワクチンの副反応の解析および機序解明を行い、それらから得た知見を基に、有効かつ安全な新規 G 蛋白質ワクチンの開発を試みた。また、F 蛋白質ワクチンの URT における感染防御効果の向上を目指し、LRT および URT における感染防御効果を比較および評価した。

# 本論

## 第一節 G 蛋白質ワクチンの副反応の解析と機序解明

G 蛋白質ワクチンは、単一抗原ワクチンだけでなく、F 蛋白質との混合ワクチンとしても臨床応用が期待されている。しかし、前述のように、哺乳類細胞を用いて作製した精製組換え G 蛋白質 (mG) ワクチンは、動物モデルにおいて、RSV 感染を防御する一方で、FI-RSV ワクチンと同様に、Th2 型免疫を誘導し、RSV 感染後に肺で過剰に好酸球を誘導することが報告されており、副反応が懸念されている<sup>20,25,27</sup>。そのため、これまで G 蛋白質ワクチンの開発では、RSV 感染後に肺へ浸潤した好酸球数を副反応の指標として、安全性の改良が試みられてきた<sup>20</sup>。一方で、G 蛋白質ワクチンの副反応の解析はほとんど進んでおらず、好酸球が気道炎症と関連するかどうかについても不明である。したがって、G 蛋白質ワクチンの臨床応用を目指すためには、副反応の詳細な解析および安全性の指標となるパラメータの同定が必要不可欠である。

そこで本節では、ワクチン抗原として mG を用いて、G 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の副反応の解析および機序解明を試みた。

### 【実験材料と方法】

#### 実験動物

6-7 週齢の BALB/c マウス（雌）を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 12 時間の明暗サイクル（点灯：8 時、消灯：20 時）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（プロトコル番号：BIKEN-AP-R01-15-2、BIKEN-AP-R02-14-5）。

#### 組換え G 蛋白質の作製と精製

G 蛋白質のアミノ酸配列は RSV-A2 株（GenBank accession number : AAB59857.1）に由来する。mG 発現プラスミドは、鈴木忠樹先生（Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan）にご提供いただいた。プラスミドには、N 末端に His タグを付加した G 蛋白質のエクトドメイン（アミノ酸 67-298）を哺乳類細胞発現のために最適化した cDNA を組み込んだ。mG は、Expi293 Expression System（Thermo Fisher Scientific, Hampton, NH, USA）を用いて発現させた。プラスミド（30

μg) と ExpiFectamine 293 (80 μL) を混合し、室温で 10 分間静置した後、 $7.5 \times 10^7$  cells/25 mL に調整した Expi293F 細胞に混合溶液を添加し、37 °C、8% CO<sub>2</sub> の条件下で、18 時間振盪培養 (120 rpm) した。その後、ExpiFectamine 293 transfection enhancer 1 を 150 μL、ExpiFectamine 293 transfection enhancer 2 を 1.5 mL、100 × ペニシリン/ストレプトマイシン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を 250 μL 添加した。トランスフェクションから 6 日後に、培養上清を 8,000 × g、4 °C で 10 分間遠心して回収した。その後、上清を 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 (GE Healthcare) に流し、His タグ付き蛋白質をカラムに吸着させた。その後、5 mM イミダゾールを含んだ 20 mM リン酸ナトリウム溶液で非特異的に吸着した蛋白質を除去した後、0.5 M イミダゾールを含んだ 20 mM リン酸ナトリウム溶液で蛋白質を溶出した。次に、溶出された蛋白質溶液を、Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off, 30 kDa, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に加え、7,500 × g、4 °C で遠心して 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。その後、A high-molecular-weight standard kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて、溶出プロファイルから目的の蛋白質画分と推定される画分のみを Amicon Ultra centrifugal filters で濃縮した。濃縮された蛋白質の精製度は、sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および Coomassie Brilliant Blue 染色によって確認した。SDS-PAGE は、蛋白質溶液を 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、10% Extra PAGE One Precast Gel (Nacalai Tesque) にアプライし、200 mV (定電圧) で 45 分間電気泳動した。その後、ゲルを EzStain Aqua (Atto, Tokyo, Japan) で染色し、ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) で撮影した。また、蛋白質の濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて決定した。

### **RSV の培養と濃縮**

HEp-2 細胞および RSV-A2 株は、柴田岳彦先生 (Department of Microbiology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan) にご提供いただいた。HEp-2 細胞は、DMEM 培地 (10% FBS、1% ペニシリン、1% ストレプトマイシンを添加した DMEM (4.5g/L

Glucose) with L-Gln and Sodium Pyruvate (Nacalai Tesque) ) を用いて、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で培養した。-1 日目に HEp-2 細胞を 150 mm 細胞培養表面処理済みディッシュ (Corning, NY, USA) に  $6.0 \times 10^6$  cells/well で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で一晩培養した。0 日目に、培地を吸引し、10 mL の DMEM 培地に懸濁した  $1 \times 10^5$  plaque-forming units (PFU) / $10^7$  cells の RSV を HEp-2 細胞に播種した。1 時間ごとにディッシュを振盪しつつ、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 7 時間培養し、RSV を細胞に接着・感染させた。その後、培地を吸引し、予め 37 °C に温めておいた 20 mL の DMEM 培地を加え、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 5 日間培養した。5 日目に、培養後のディッシュを -80 °C で凍結し、6 日目に室温にて融解した。その後、上清を 50 mL チューブに移して、700 × g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を回収した。その上清を、もう一度、700 × g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を回収して、細胞片を除去した。次に、RSV を濃縮するため、上清を超遠心チューブに移した後、38.5 mL Open-Top Thinwall Ultra-Clear Tube (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) に移し、クッションとして 1 mL の 20% sucrose (in PBS) をチューブの底に注いだ。その後、SW32Ti 10U2690 (Beckman Coulter) を用いて、Optima L-100XP (Beckman Coulter) で 71,000 × g、4 °C で 3 時間 30 分遠心し、ペレットを PBS に懸濁して -80 °C で凍結した。また、RSV の力価は別日に下記のプラークアッセイにて測定した。-1 日目に、HEp-2 細胞を 24 well plate (Thermo Fisher Scientific) に  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で一晩培養した。0 日目に、培地を吸引後、RSV を希釈した 500 μL の DMEM 培地を加え、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 2 時間培養し、RSV を細胞に接着・感染させた。その後、上清を除去し、0.6% カルボキシメチルセルロースナトリウムを添加した DMEM 培地を 1 mL 加え、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 3 日間培養した。3 日目に、培養上清を除去し、予め 4 °C に冷却しておいた 1 mL のメタノールを加え、-80 °C で 1 時間インキュベートすることで、RSV と細胞を固定した。その後、プレートを室温で融解させ、上清のメタノールを除去した後、-80 °C で一晩インキュベートした。4 日目に、プレートを室温で融解後、5% スキムミルク (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) を添加した PBS を 1 mL 加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。上清をデカントで除去した後、5% スキムミルク溶液で 500 倍希釈した anti-RSV polyclonal antibody (catalog numbers: AB1128, Merck Millipore) を 500 μL 加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。上清をデカントで除去し、1 mL の 5% スキムミルク溶液でウェルを 1 回洗浄した後、5% スキムミルク溶液で 100 倍希釈した horseradish-peroxidase 標識 donkey anti-sheep/goat IgG polyclonal antibody (catalog numbers: STAR88P, Bio-rad) を 250 μL 加え、37

℃で1時間インキュベートした。その後、1 mLのPBSで2回洗浄し、0.3 mg/mL 4-chloro-1-naphthol (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) と 0.03 % hydrogen peroxide を添加したPBSを500 µL加えて発色反応を行った。ブランクを目視で計測し、RSVの力価を決定した。全てのウイルス実験は、大阪大学微生物病研究所施設審査委員会の承認を得た（プロトコル番号：BIKEN-00224-002）。

### **マウスへのワクチンおよびRSV感染**

6週齢のBALB/cマウス(雌)の尾根皮下に、0日目および21日目に、mG (1 µg/mouse) を単独あるいはAlhydrogel adjuvant 2% (Alum; InvivoGen, San Diego, CA, USA) (50 µg/mouse) とともに投与した。投与試料はPBS (-) で調製し、BD ロードーズ™ インスリン皮下投与用針付注射筒 (Becton Dickinson) を用いて50 µL/mouseで投与した。その後、28日目に、頬静脈より血清を回収、または頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、脾臓を回収した。また、RSV感染は、31日目(ワクチン接種後10日目)に、麻酔下において $1.0 \times 10^5$  PFU/30 µL PBSのRSVを片鼻15 µLでマウスに経鼻投与することで感染させた。感染5日後(36日目)に、麻酔下で下大静脈切断による脱血によりマウスを安楽死させた後、横隔膜を切除し、肺(気道を除く)を回収した。

### **ELISAを用いた血漿中抗体価の評価**

最終免疫から7日後に頬静脈より血漿を回収し、G蛋白質特異的抗体価をELISAにより評価した。mG(終濃度1 µg/mL)を0.1 M Sodium Carbonate buffer (pH 9.6)で希釈し、96 well half area microplates (Corning)のウェルに加え、4℃で一晩静置し、mGをウェルに固相化した。固相したプレートをPBS-T (0.05 % Tween 20を添加したPBS)で3回洗浄した後、1% Block Ace (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)を添加し、室温で1時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄した後、血漿サンプルを0.4% Block Aceで希釈し、ウェルに加え、室温で2時間インキュベートした。その後、PBS-Tで3回洗浄し、0.1% Block Aceで希釈した horseradish-peroxidase 標識 goat anti-mouse IgG (catalog number: AP503, dilution 1/5,000; Merck Millipore)、IgG1 (catalog numbers: 1070-05, dilution 1/8,000; SouthernBiotech, Birmingham, USA)、IgG2a (catalog number: ab97245, dilution 1/5,000; Abcam, Cambridge, UK)、IgG2b (catalog numbers: 1090-05, dilution 1/5,000; SouthernBiotech)を添加し、室温で1時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄した後、0.8 mM tetramethyl benzidine

(Nacalai Tesque) を用いて発色し、2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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<sub>450-570</sub> を測定した。

### **肺胞洗浄液 (BALF) 中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定**

RSV 感染後 1-7 日後に麻酔下において下大静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, Tokyo, Japan) 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 (Alfreda Pharma Corporation, Osaka, Japan) により結紮した。1 mL シリンジ (Terumo Corporation) を用いて肺内に PBS を 1 mL 注入し、洗浄液を回収した。その後、600 × g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を BALF して回収した。BALF 中の LDH は Cytotoxicity LDH assay kit-WST (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて下記の方法で測定した。96 well flat-bottom plate (AGC Techno Glass, Chiba, Japan) に 100 μL の BALF を加えた後、100 μL の Assay Buffer を添加し、暗所、室温で 30 分間インキュベートした。その後、50 μL の Stop Buffer を加えて反応を停止させ、microplate reader を用いて OD<sub>490</sub> を測定した。

### **RNA 抽出・リアルタイム RT-PCR**

マウスの右肺を 1 mL の TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) および 3 個の 4 mm ステンレスビーズ (TAITEC, Saitama, Japan) が入った 2 mL スクリューキャップチューブ (WATSON, Tokyo, Japan) に回収した。その後、ビーズクラッシャー μT-12 (TAITEC) を用いて、3,200 rpm で 60 秒間破碎し、室温で 5 分間インキュベートした。組織破碎液に 200 μL のクロロホルムを加え、15 秒間激しく攪拌した後、2-3 分間室温で放置した。その後、12,000 × g、4 °C で 20 分間遠心し、上清を 350 μL 回収した。回収した上清を 500 μL のイソプロパノールと混合し、ボルテックスした後、4 °C で 10 分間インキュベートした。その後、12,000 × g、4 °C で 15 分間遠心し、上清を除去した。1 mL の 75% エタノールを加えてボルテックスで混合した後、7,500 × g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を除去した。その後、12,000 × g、4 °C で 1 分間遠心し、上清を完全に除去した。RNA ペレットを室温で 10 分間乾燥させた後、1 mL の Nuclease free water を加え、ボルテックスで RNA を溶解した。それを 60 °C で 10 分間インキュベートすることで、RNA を完全に溶解させた後、RNA 濃度を測定した。次に、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行い、RNA から cDNA を合成した。

7  $\mu$ L の Nuclease free water に 2  $\mu$ L の 5x RT Master Mix および 1  $\mu$ L の RNA 溶解液を混合し、サーマルサイクラーを用いて 37 °C で 10 分間、50 °C で 5 分間、98 °C で 5 分間インキュベートした。次に、LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて、リアルタイム RT-PCR を行った。10  $\mu$ L の LightCycler 480 SYBR Green I Master と 0.1  $\mu$ L の 100  $\mu$ M forward primer および reverse primer、6.8  $\mu$ L の Nuclease free water を混合し、LightCycler 480 Multiwell Plate 384 (Roche Diagnostics) のウェルにアプライした後、3  $\mu$ L の cDNA 溶液を加えた。プレートをシールした後、ボルテックスで混合し、1,500  $\times$  g、室温で 2 分間遠心した。その後、Light Cycler 480-II (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて、サンプル中の RSV の N 蛋白質の遺伝子を定量した。検量線には、RSV-A2 株 (GenBank accession number: AAB59858.1) 由来の N 蛋白質の全長遺伝子を組み込んだプラスミドを段階希釈したものを用いた。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーは Table 1 に示した。

**Table 1. Primer sequences used for real-time RT-PCR**

Gene	5' primer	3' primer
<i>Gapdh</i>	5'-CAGGTTGTCTCCTGCGACTT-3'	5'-AGCCGTATTCATTGTCATACCAGG-3'
<i>Irfng</i>	5'-GGATGCATTCATGAGTATTGC-3'	5'-CCTTTTCCGCTTCCTGAGG-3'
<i>I14</i>	5'-AGATCATCGGCATTTTGAACG-3'	5'-TTTGGCACATCCATCTCCG-3'
<i>I15</i>	5'-ACAAGCAATGAGACGATGAGGC-3'	5'-TTTCCACAGTACCCCCACGG-3'
<i>I113</i>	5'-CTCCCTCTGACCCCTAAGGAGCTT-3'	5'-GGTCCACACTCCATACCATGCTG-3'
<i>I17a</i>	5'-TTTAACTCCCTTGGCGCAAAA-3'	5'-CTTTCCCTCCGCATTGACAC-3'
<i>I16</i>	5'-CTGTAGCTCATTCTGCTCTGGA-3'	5'-CAACTGGATGGAAGTCTCTTGC-3'
<i>Tnfa</i>	5'-CCTCTCATGCACCACCATCAA-3'	5'-TTCTGAGACAGAGGCAACCTG-3'
<i>Ccl11</i>	5'-TGCTCACGGTCACTTCCTTC-3'	5'-GGTGCATCTGTTGTTGGTGATT-3'
<i>RSV-N</i>	5'-CATCCAGCAAATACACCATCCA-3'	5'-TTCTGCACATCATAATTAGGAGTATCAA-3'

### 肺への浸潤細胞の解析

625  $\mu$ L の RPMI 培地を加えた gentleMACS C Tubes (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) にマウスの左肺を回収し、400 U/mL collagenase IV (Thermo Fisher Scientific) および 200 U/mL DNase I (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を添加した RPMI 培地を 625  $\mu$ L 加えた後、ハサミで肺を切り刻み、37 °C で 1 時間振盪した。その後、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotech) を用いて、単一細胞懸濁液を得た。5 mL の RPMI 培地を加えた後、セルストレーナーを用いて完全に単一細胞に分離し、15 mL チューブに移した。その後、400  $\times$  g、4 °C で 5 分間遠心し、上清を除去した。2 mL の ACT lysis buffer (8.3 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5) を

加え、室温で5分間インキュベートすることで、溶血処理を行った。その後、5 mLのRPMI培地を追加し、400 × g、4 °Cで5分間遠心した。上清を除去し、2 mLのRPMI培地に再懸濁した後、20分の1量（100 μL）を96 well U-bottom plate (Violamo; AS ONE, Osaka, Japan)に移し、細胞表面染色を行った。染色用メディウムで、Fixable Viability Dye eFluor 780 (dilution 1/1,000) および Table 2 (Analysis of infiltrating cells into the lungs) に示す抗体を希釈し、50 μL/well で加えて、暗所、4 °Cで15分間インキュベートした。200 μLの染色用メディウムを加え、800 × g、4 °Cで4分間遠心し、細胞を洗浄した後、200 μLの染色用メディウムに細胞を懸濁し、メッシュに通して、新しい96 well U-bottom plate (Violamo)に移した。その後、Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) を用いてデータを取得し、FlowJo software version 10.9 (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA) を用いてデータ解析を行った。

**Table 2. Antibodies used for flow cytometry.**

<b>T cell re-stimulation</b>				
<b>Antibodies</b>	<b>Clone</b>	<b>Catalog number</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
<b>Cell surface antigen staining</b>				
anti-mouse CD16/CD32 antibody	93	101302	1:200	BioLegend
APC anti-mouse CD3ε antibody	145-2C11	100312	1:200	BioLegend
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD4 antibody	GK1.5	100430	1:500	BioLegend
Brilliant Violet 510 anti-mouse/human CD44 Antibody	IM7	103044	1:200	BioLegend
Brilliant Violet 605 anti-mouse CD8a antibody	53-6.7	100744	1:200	BioLegend
<b>Intracellular cytokine staining</b>				
Brilliant Violet 421 anti-mouse IL-4 Antibody	11B11	504120	1:200	BioLegend
Brilliant Violet 605 anti-mouse IFN-γ Antibody	XMG1.2	505840	1:200	BioLegend
PE anti-mouse/human IL-5 Antibody	TRFK5	504304	1:200	BioLegend
PE-Cyanine7 anti-mouse/human IL-13 Antibody	eBio13A	25-7133-82	1:200	Thermo Fisher Scientific
<b>Analysis of infiltrating cells into the lungs</b>				
<b>Antibodies</b>	<b>Clone</b>	<b>Catalog number</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
anti-mouse CD16/CD32 antibody	93	101302	1:200	BioLegend
FITC anti-mouse Ly-6G Antibody	1A8	127606	1:500	BioLegend
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD11c Antibody	N418	117328	1:200	BioLegend
APC anti-mouse Siglec-F Antibody	REA798	130-112-175	1:200	Miltenyi Biotec
Alexa Fluor 700 anti-mouse CD4 Antibody	GK1.5	100430	1:500	BioLegend
Alexa Fluor 700 anti-mouse I-A/I-E Antibody	M5/114.15.2	107622	1:500	BioLegend
Brilliant Violet 421 anti-mouse I-A/I-E Antibody	M5/114.15.2	107632	1:200	BioLegend
Brilliant Violet 421 anti-mouse CD3 Antibody	17A2	100227	1:200	BioLegend
Brilliant Violet 510 anti-mouse/human CD11b Antibody	M1/70	101263	1:200	BioLegend
Brilliant Violet 605 anti-mouse CD8a Antibody	53-6.7	100744	1:200	BioLegend
PE anti-mouse CD45 Antibody	30-F11	103106	1:200	BioLegend
PE/Cyanine7 anti-mouse CD3 Antibody	17A2	100220	1:200	BioLegend
PE/Cyanine7 anti-mouse CD4 Antibody	RM4-5	100528	1:200	BioLegend
<b>CD4<sup>+</sup> T cell depletion</b>				
<b>Antibodies</b>	<b>Clone</b>	<b>Catalog number</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
anti-mouse CD16/CD32 antibody	93	101302	1:200	BioLegend
Alexa Fluor 488 anti-mouse CD90.2 (Thy1.2) Antibody	30-H12	105316	1:500	BioLegend
Brilliant Violet 605 anti-mouse CD8a antibody	53-6.7	100744	1:200	BioLegend
PE anti-mouse TCR β chain Antibody	H57-597	109208	1:200	BioLegend
PE/Cyanine7 anti-mouse CD4 Antibody	RM4-5	100528	1:200	BioLegend

### **CD4<sup>+</sup> T 細胞および好酸球、好中球の除去**

CD4<sup>+</sup> T 細胞を除去するために、最終免疫から 9 日後 (RSV 感染前日) に、100 µg の Anti-mouse CD4 antibody (clone: GK1.5, catalog number: BE0003-1, Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA) あるいは IgG2b isotype control (clone: LTF-2, catalog number: BE0090, Bio X Cell) を 200 µL の PBS に加え、マウスに腹腔内投与した。好酸球の除去には、RSV 感染前日および感染から 2 日後に、100 µg の Anti-mouse CCR3 antibody (clone: 6S2-19-4, catalog number: BE0316, Bio X Cell) あるいは IgG2b isotype control を 200 µL の PBS に加え、マウスに腹腔内投与した。好中球の除去には、RSV 感染前日および感染から 1 日後、3 日後に、50 µg の Anti-mouse Ly6G antibody (clone: 1A8, catalog number: 127649, BioLegend, San Diego, CA, USA) あるいは IgG2a isotype control (clone: RTK2758, catalog number: 400565, BioLegend) を 200 µL の PBS に加え、マウスに腹腔内投与した。また、細胞除去の確認は、上記の「肺への浸潤細胞の解析」にて行った。

### **肺における T 細胞応答の解析**

前述の溶血処理後の肺の細胞を 1 mL の細胞培養用メディウム (10% FBS、1% ペニシリン、1% ストレプトマイシン、28.5 µM 2-メルカプトエタノールを添加した L-グルタミン含有 RPMI 1640 培地) に再懸濁した後、20 分の 1 量 (50 µL) を 96 well U-bottom plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した。その後、細胞培養用メディウムで希釈した 100 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および 2 µg/mL ionomycin、protein transport inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) を 50 µL/well で添加し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 4 時間培養した。その後、800 × g、4 °C で 4 分間遠心し、培養上清を除去した後、細胞表面染色を行った。染色用メディウム (2% FBS, 0.05% Sodium azide, 1 mM EDTA) で、Fixable Viability Dye eFluor 780 および Table 2 (Analysis of cytokine-producing T cells, Cell surface antigen staining) に示す抗体を希釈し、50 µL/well で加えて、暗所、4 °C で 15 分間インキュベートした。その後、200 µL の染色用メディウムを加え、800 × g、4 °C で 4 分間遠心し、細胞を洗浄した。100 µL の BD Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences, Sparks, MO, USA) を加え、暗所、4 °C で 20 分間インキュベートして細胞を固定した後、100 µL の BD Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) を加え、800 × g、4 °C で 4 分間遠心し、上清を除去した。その後、200 µL の BD Perm/Wash Buffer で 2 回洗浄および膜透過処理を行った。BD Perm/Wash

Buffer で Table 2 (Analysis of cytokine-producing T cells, Intracellular cytokine staining) に示す抗体を希釈し、50  $\mu$ L/well で加えて、暗所、4  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。200  $\mu$ L の BD Perm/Wash Buffer で 2 回洗浄した後、200  $\mu$ L の染色用メディアウムに細胞を懸濁し、メッシュに通して、96 well U-bottom plate (Violamo) に移した。その後、Attune NxT Flow Cytometer を用いてデータを取得し、FlowJo software version 10.9 を用いてデータ解析を行った。

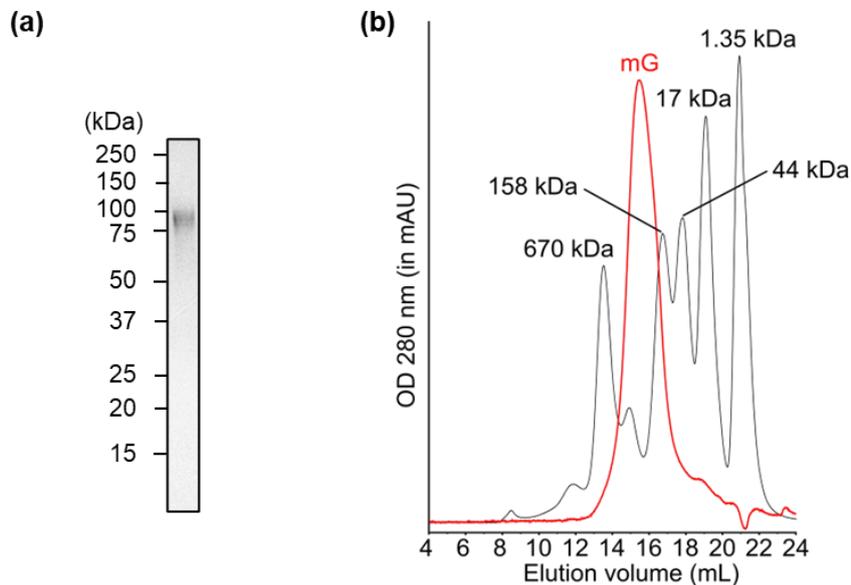
### **統計解析**

統計解析には、GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) または中央値で示し、有意差検定は、場合に応じて one-way ANOVA および two-way ANOVA、Tukey's test、Sidak's test、Dunnett's test、unpaired Student *t* test を用いた。統計学的有意差は  $P < 0.05$  のとき有意であるとした。

## 【結果】

### mG の作製および抗体誘導能の評価

まず、G 蛋白質ワクチンの RSV 感染後の副反応を評価するために、副反応を誘発することが知られている mG を、哺乳類細胞を用いて作製した。過去の報告より、G 蛋白質は多量体を形成することが報告されている。ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイルより、単一ピークの画分を回収した後、SDS-PAGE を用いて精製度を確認した (Figure 1a, b)。その結果、mG は約 90 kDa の位置に単一バンドで観察され、高純度に精製されたことを確認した (Figure 1a)。また、ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイルより、mG は多量体を形成していることが推察された (Figure 1b)。



**Figure 1. Purity of vaccine antigens.**

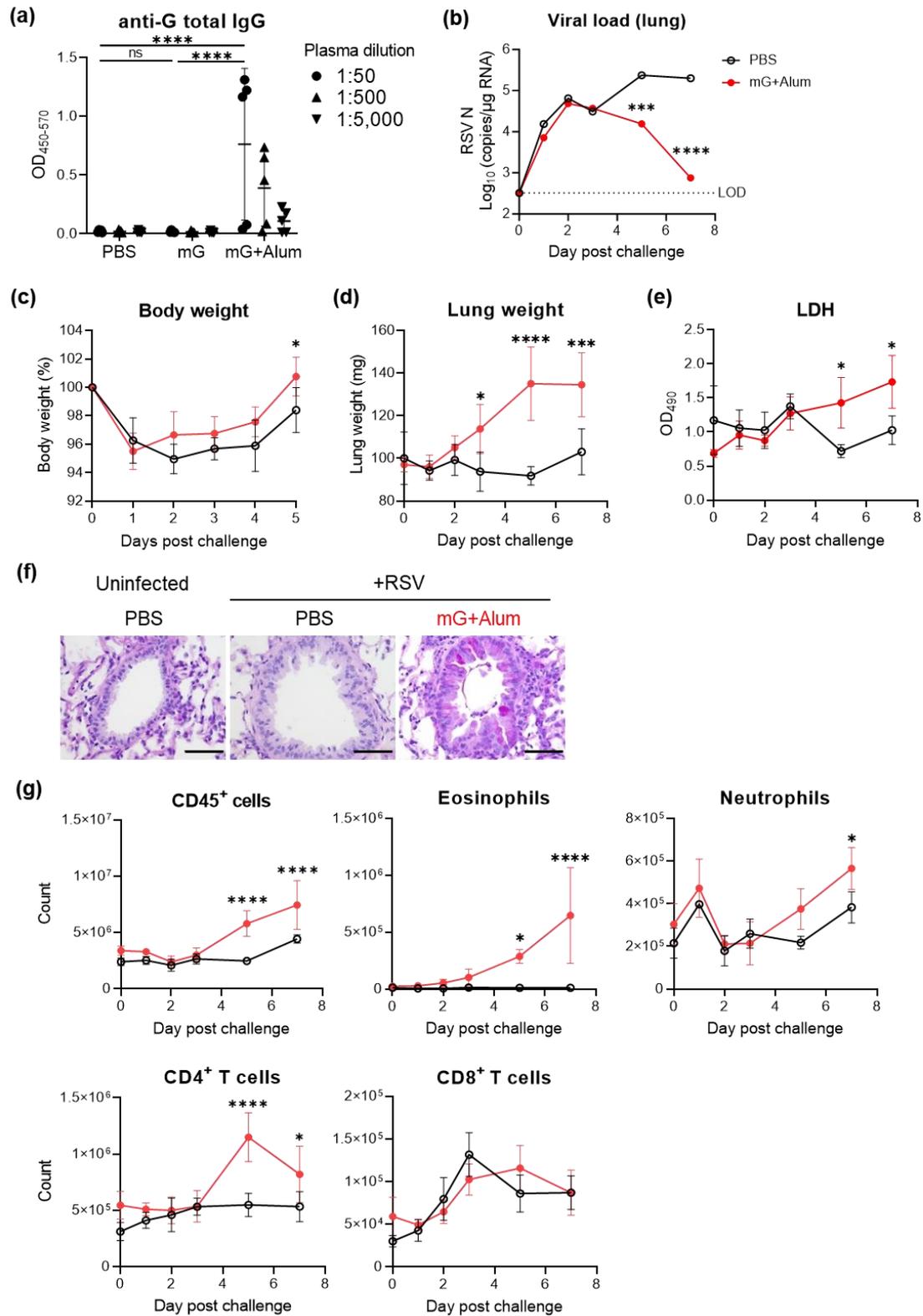
(a) 1  $\mu$ g of non-reduced recombinant G protein expressed in mammalian cells (mG) was analyzed through sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Coomassie Brilliant Blue staining. (b) mG was purified using immobilized metal ion affinity chromatography followed by size exclusion gel filtration chromatography. The elution profiles of mG (red line) in size exclusion gel filtration chromatography were overlaid with the elution profile of the standard proteins (black line). This experiment was performed twice.

次に、mG ワクチンによる抗体産生を評価した。mG 単独、あるいは水酸化アルミニウム (Alum) を添加し、0 日目と 21 日目にマウスに皮下投与して、28 日目の血漿中の G 特異的 total IgG を ELISA にて測定した (Figure 2a)。その結果、非ワクチン群と比較して、

mG 単独ワクチン群は G 特異的抗体を誘導しなかった一方で、mG+Alum 群は mG 単独ワクチン群と比較しても有意に抗体を誘導した (Figure 2a)。以降は、G 特異的抗体を誘導した mG+Alum ワクチンを用いて副反応の解析を行った。

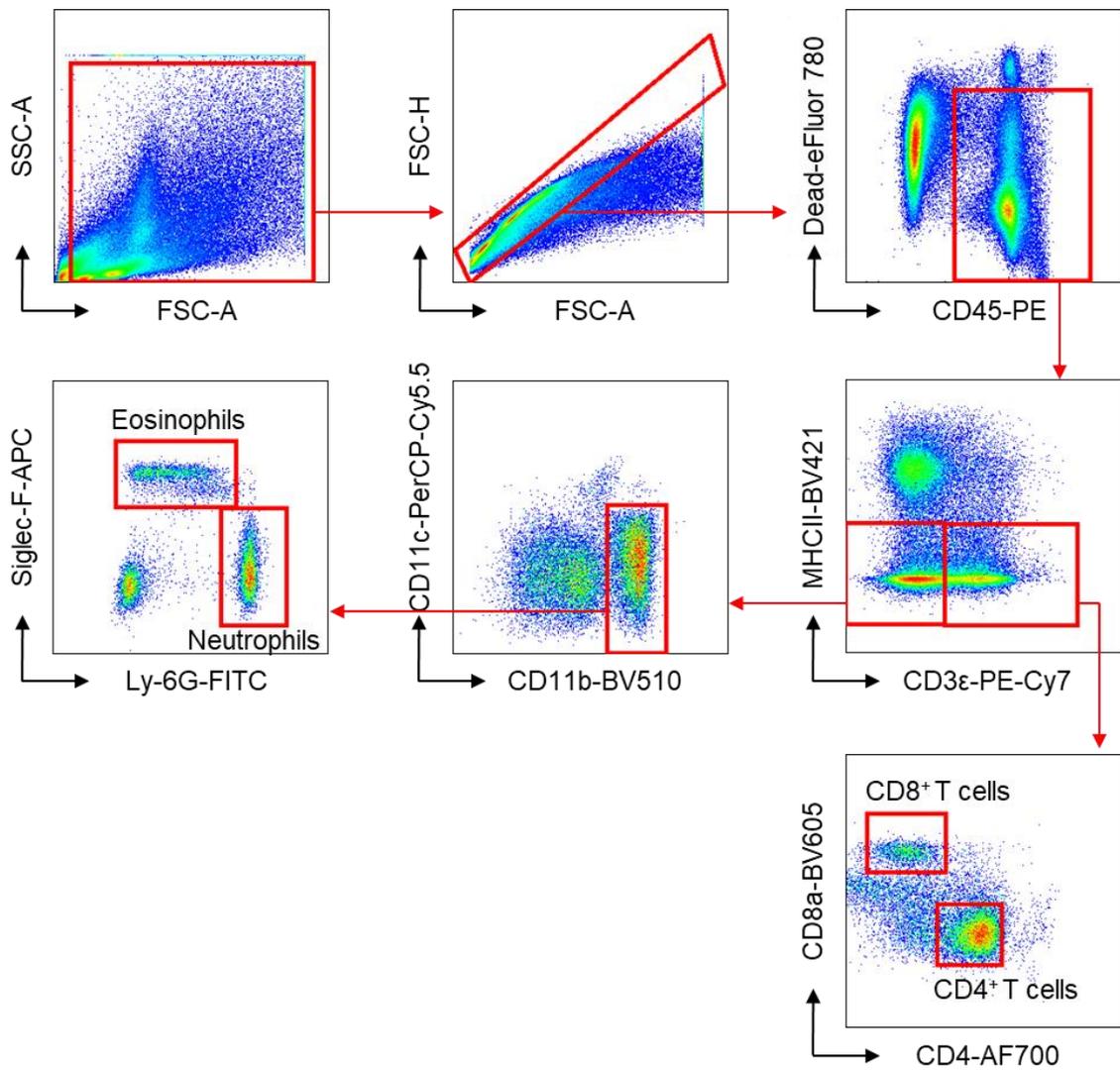
### **mG ワクチンによる RSV 感染後の副反応の解析**

次に、マウスに mG ワクチンを接種後、RSV を経鼻感染させ、経日的に気道炎症を評価した。まず、肺におけるウイルス量をリアルタイム RT-PCR を用いて測定した (Figure 2b)。その結果、非ワクチン群では特に感染後 3 日目から 5 日目にかけてウイルス量が増加した一方で、ワクチン群では感染後 2 日目をピークに 7 日目にかけてウイルス量が減少した (Figure 2b)。次に、主な副反応項目を評価した。その結果、RSV 感染後にマウスの体重は、ワクチン群では非ワクチン群と同程度であり、有意な差は認められなかった (Figure 2c)。一方で、肺重量を測定すると、非ワクチン群では経日変化が認められなかった一方で、ワクチン群では非ワクチン群と比較して感染後 3 日目から 7 日目まで有意に増加した (Figure 2d)。また、ワクチン群では、非ワクチン群と比較して、感染後 5 日目および 7 日目に肺胞洗浄液 (BALF) 中の乳酸脱水素酵素 (LDH) が有意に増加したことから、細胞傷害が亢進していることが示された (Figure 2e)。さらに、Periodic Acid Schiff (PAS) 染色を用いて肺の組織切片を解析すると、非ワクチン群の未感染および感染群と比較して、ワクチン群ではムチン産生が亢進しており、粘膜面の炎症が促進していることが確認された (Figure 2f)。次に、フローサイトメトリーを用いて肺への浸潤細胞を解析した (Figure 2g, 3)。その結果、ワクチン群では、非ワクチン群と比較して、感染後 5 日目および 7 日目に CD45 陽性の白血球が有意に増加した (Figure 2g)。また、白血球のうち、好酸球が、感染後 5 日目および 7 日目に、非ワクチン群と比較してワクチン群で有意に増加した。加えて、好中球は感染後 7 日目に、非ワクチン群と比較してワクチン群で有意に増加していた (Figure 2g)。さらに、非ワクチン群と比較してワクチン群で CD8<sup>+</sup> T 細胞に差が認められなかった一方で、CD4<sup>+</sup> T 細胞が感染後 5 日目および 7 日目で有意に増加した (Figure 2g)。以上の結果より、mG ワクチンは RSV 感染を防御する一方で、好酸球や好中球、CD4<sup>+</sup> T 細胞などの肺への浸潤および気道炎症、肺重量増加を促進することが明らかとなった。



**Figure 2. Antibody production and RSV-induced pulmonary inflammation in mG-vaccinated mice.** (a-g) Mice were immunized subcutaneously with 1  $\mu$ g mG, +50  $\mu$ g alum,

or PBS as a control on days 0 and 21. (a) Plasma was collected on day 28 and the levels of G-specific total IgG were evaluated using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). (b-e) Mice were challenged intranasally with  $1.0 \times 10^5$  plaque-forming units (PFU) of RSV on day 31 and sacrificed under anesthesia on the indicated day post challenge. (b) The viral loads in the right lungs were determined using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from the mRNA levels of RSV nucleoprotein (RSV N). (c) Body weight. (d) Right lung weight. (e) The levels of lactate dehydrogenase (LDH) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). (f) Images of periodic acid-Schiff-stained lung sections. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . (g) Number of lung infiltrating cells in the left lung was analyzed using flow cytometry. (a-g) Each experiment was performed twice. (a, c)  $n = 5$  per group. (b, d, g)  $n = 4$  per group. (e)  $n = 3$  per group. (a-e, g) Data are presented as (a, c-e, g) the mean  $\pm$  SD or (b) median. (a-e, g)  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$  as indicated using two-way ANOVA and (a) Tukey's test or (b-e, g) Sidak's test. ns, not statistically significant.

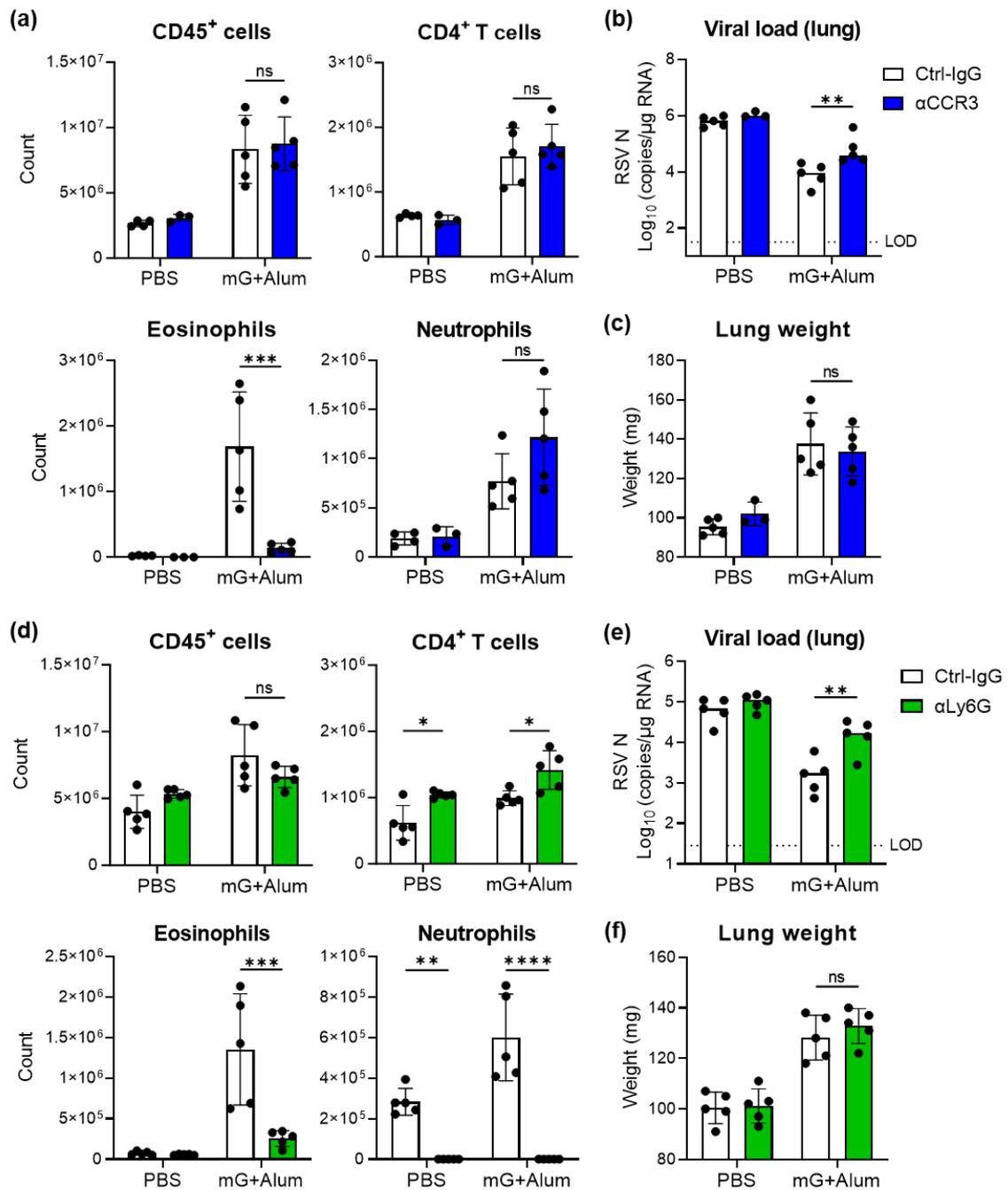


**Figure 3. Gating strategy for infiltrating cells into the lungs following RSV challenge in mG-vaccinated mice.**

### 好酸球および好中球による肺重量増加への影響評価

そこで、肺重量の増加を副反応のエンドポイントとし、肺重量が最大となる感染後 5 日目における各浸潤細胞の肺重量増加に及ぼす影響を解析した。まず、好酸球が肺重量増加に及ぼす影響について解析した。ワクチン接種後に抗 CCR3 抗体を投与することで好酸球を除去した後、RSV を経鼻投与して感染後 5 日目に肺を解析した。その結果、ワクチン群では、抗 CCR3 抗体を投与すると、コントロール抗体投与群と比較して、好酸球が顕著に減少したことが確認されたが、CD45<sup>+</sup> 細胞および好中球、CD4<sup>+</sup> T 細胞は変化しなかった (Figure 4a)。また、ワクチン群の抗 CCR3 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、ウイルス量が有意に増加した一方で、肺重量は変化が認められなかった (Figure 4b, c)。したがって、G 蛋白質ワクチンにおいて好酸球はウイルス排除に関与する一方で、肺重量増加に関与しないことが示された。

次に、ワクチン群の RSV 感染後の肺で増加が認められた好中球が肺重量増加に及ぼす影響について解析した。ワクチン接種後に抗 Ly6G 抗体を投与することで好中球を除去した後、RSV を経鼻投与して感染後 5 日目に肺を解析した。その結果、ワクチン群では、抗 Ly6G 抗体を投与すると、コントロール抗体投与群と比較して、好中球とともに好酸球も顕著に減少し、CD45<sup>+</sup> 細胞は変化しなかった。一方で、CD4<sup>+</sup> T 細胞は、非ワクチン群およびワクチン群の両方の抗 Ly6G 抗体投与群において、コントロール抗体投与群と比較して有意に増加した (Figure 4d)。また、ワクチン群では、抗 Ly6G 抗体を投与すると、コントロール抗体投与群と比較して、ウイルス量が有意に増加した一方で、肺重量は変化が認められなかった (Figure 4e, f)。したがって、G 蛋白質ワクチンにおいて、好中球は、好酸球の誘導やウイルス排除に関与する一方で、肺重量増加に関与しないことが示された。



**Figure 4. Effect of eosinophils and neutrophils on RSV-induced lung weight increase.**

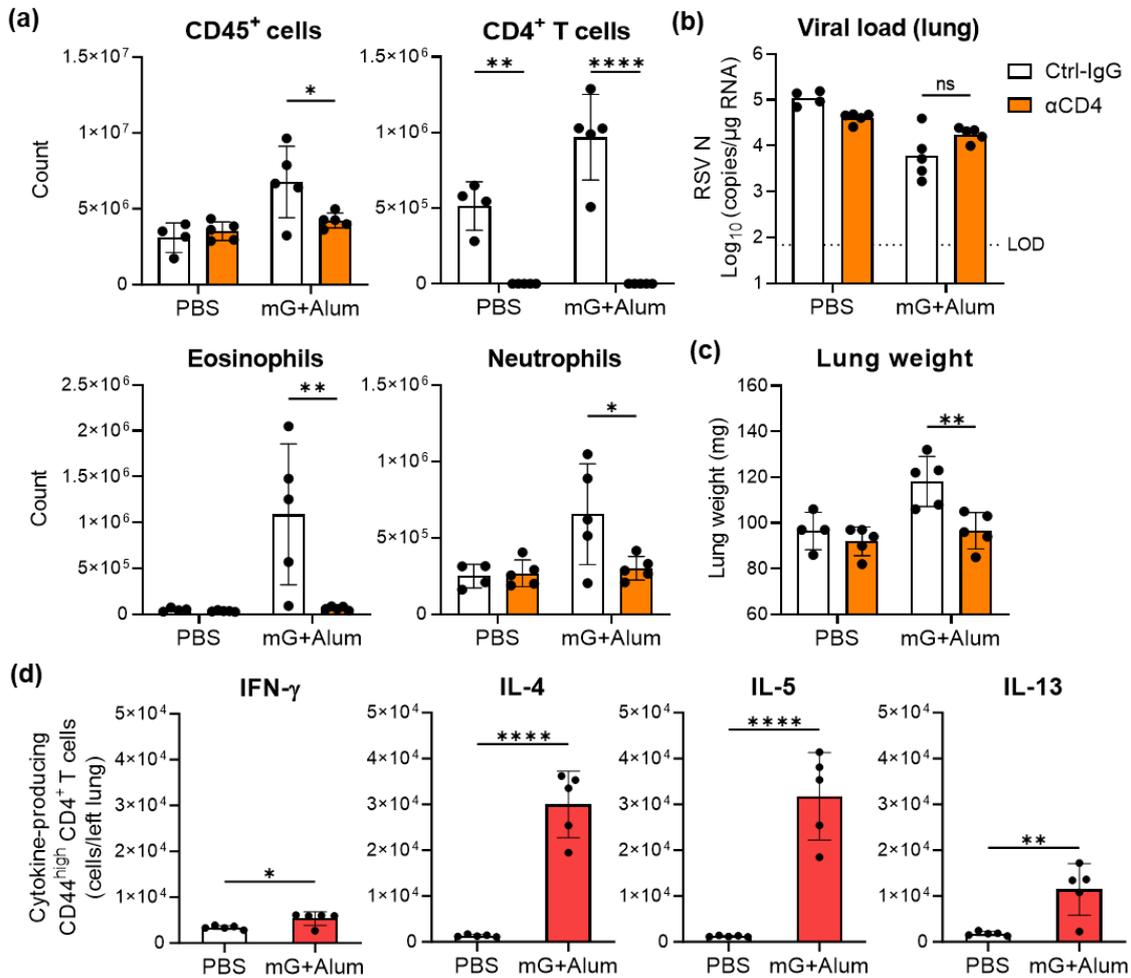
(a-f) mG+alum-vaccinated mice were challenged intranasally with RSV on day 31 and sacrificed under anesthesia on day 36. (a-c) Mice were intraperitoneally injected on day 30 and 33 with 50  $\mu$ g of anti-mouse CCR3 antibody ( $\alpha$ CCR3) or IgG2b isotype control (ctrl-IgG). (a) Number of infiltrating cells in the left lungs was analyzed using flow cytometry. (b) The viral loads in the right lungs measured using real-time RT-PCR from the mRNA levels of RSV

nucleoprotein. (c) The right lung weight was measured. (d-f) Mice were intraperitoneally injected on day 30, 32 and 34 with 50  $\mu$ g of anti-mouse Ly6G antibody ( $\alpha$ Ly6G) or IgG2a isotype control (ctrl-IgG). (d) Number of infiltrating cells in the left lungs was analyzed using flow cytometry. (e) The viral loads in the right lungs measured using real-time RT-PCR from the mRNA levels of RSV nucleoprotein. (c) The right lung weight was measured. (a-f) Each experiment was performed twice.  $n = 5$  per group. Data are presented as (a, c, d, f) the mean  $\pm$  SD or (b, e) median. (a-e) **\*\***  $P < 0.01$ , **\*\*\***  $P < 0.001$ , **\*\*\*\***  $P < 0.0001$  as indicated using two-way ANOVA and Tukey's test. ns, not statistically significant.

### CD4<sup>+</sup> T 細胞による肺重量増加への影響評価

次に、CD4<sup>+</sup> T 細胞が肺重量増加に及ぼす影響について解析した。ワクチン接種後に抗 CD4 抗体を投与することで CD4<sup>+</sup> T 細胞を除去した後、RSV を経鼻投与して感染後 5 日目に肺を解析した。その結果、ワクチン群では、抗 CD4 抗体を投与すると、コントロール抗体投与群と比較して、CD4<sup>+</sup> T 細胞とともに CD45<sup>+</sup> 細胞および好酸球、好中球も顕著に減少した (Figure 5a)。また、ワクチン群の抗 CD4 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、ウイルス量に変化は認められなかった一方で、肺重量は非ワクチン群と同程度まで有意に減少した (Figure 5b, c)。したがって、G 蛋白質ワクチンにおいて、CD4<sup>+</sup> T 細胞は肺重量増加に関与することが示された。また、CD4<sup>+</sup> T 細胞は好酸球および好中球の浸潤を促進することが示された。

最後に、肺重量の増加に関与する CD4<sup>+</sup> T 細胞のフェノタイプを解析するために、RSV 感染後の肺組織中の Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) あるいは Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) を産生する CD4<sup>+</sup> T 細胞を、Th1 あるいは Th2 細胞として、フローサイトメトリーを用いて解析した (Figure 5d, 6)。その結果、Th1 細胞は非ワクチン群で約  $3 \times 10^3$  個、ワクチン群では約  $5 \times 10^3$  個で非ワクチン群と比較して有意に増加したものの、その増加量は  $2 \times 10^3$  個程度だった (Figure 5d)。一方で、IL-4、IL-5、IL-13 を産生する Th2 細胞は非ワクチン群でいずれも  $1 \times 10^3$  個程度であったのに対し、ワクチン群でそれぞれ約  $3 \times 10^4$  個、 $3 \times 10^4$  個、 $1 \times 10^4$  個と非ワクチン群と比較して有意に増加しており、増加量はいずれも約  $10^4$  個以上であった (Figure 5d)。したがって、G 蛋白質ワクチンにおける RSV 感染後の肺重量の増加には Th1 細胞よりも Th2 細胞が関与していることが示唆された。



**Figure 5. Effect of CD4<sup>+</sup> T cells on RSV-induced lung weight increase.**

(a-d) mG+alum-vaccinated mice were challenged intranasally with RSV on day 31 and sacrificed under anesthesia on day 36. (a-c) Mice were intraperitoneally injected on day 30 with 100 μg of anti-mouse CD4 antibody (αCD4) or IgG2b isotype control (ctrl-IgG). (a) Number of infiltrating cells in the left lungs was analyzed using flow cytometry. (b) The viral loads in the right lungs measured using real-time RT-PCR from the mRNA levels of RSV nucleoprotein. (c) The right lung weight was measured. (d) The number of cytokine-producing CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells was analyzed using flow cytometry after stimulation of cells in the left lung with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin in the presence of transport inhibitors for 4 h. (a-d) Each experiment was performed twice. (a-c) n = 4-5, (d) n = 5 per group. (a-d) Data are presented (a, c, d) as the mean ± SD or (b) median. (a-d) \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 as indicated using (a-c) two-way ANOVA and Tukey's test or (d) unpaired Student *t* test. ns, not statistically significant.

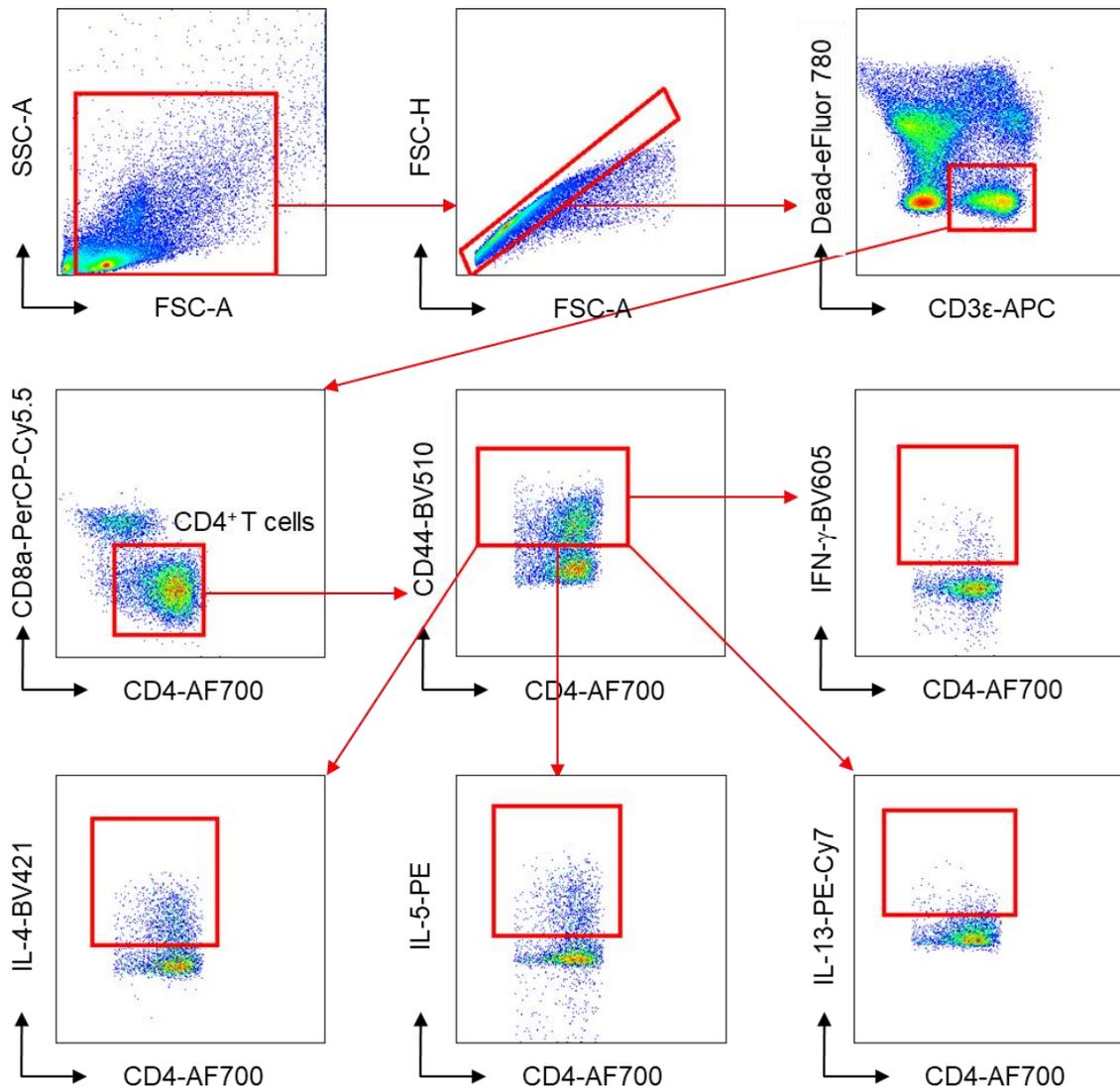


Figure 6. Gating strategy for cytokines producing CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the lungs.

## 【考察】

本研究結果より、G 蛋白質ワクチンは RSV 感染後に肺重量の増加を促進することが示された。本事象は、過去の G 蛋白質ワクチンに関する論文では報告されていない。一般的に、肺重量は肺水腫の指標となっている<sup>28</sup>。肺水腫は、組織障害あるいは血管透過性が亢進し、肺胞内に水分が漏出する疾患であり、水分量の滞留によって肺重量が増加する<sup>28</sup>。しかし、予備知見より、ワクチン群では、肺重量が増加した一方で、肺の水分量は非ワクチン群と同程度であり、血管透過性の亢進も認められなかった。したがって、G 蛋白質ワクチンにおける肺重量の増加は肺水腫が原因ではないと推察される。

一方で、肺重量の増加には Th2 細胞が関与することが示唆された。そのため、Th2 細胞が関連する気道炎症の特徴の一つであるコラーゲンの蓄積が肺重量の増加に関与する可能性が高いと考えている。過去の報告より、Th2 サイトカインの中でも IL-13 は、肺胞上皮細胞やマクロファージに作用して TGF- $\beta$  を誘導し、肺重量の増加に関与することが示唆されている<sup>29-31</sup>。また、予備知見からも、ワクチン群で RSV 感染後に IL-13 を中和すると肺重量が減少したことから、IL-13 は G 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の肺重量の増加に関与することが強く示唆された。さらに、現在、RSV 感染あるいは未感染マウスに、IL-13 単独あるいは IL-4、IL-5 を共添加して経鼻投与することで、肺重量増加を再現可能かどうかについても検証を進めている。また、肺重量の増加には、静脈血栓の蓄積が関与している可能性もある。予備知見として、エバンスブルーを用いて静脈を染色すると、ワクチン群では非ワクチン群と比較して肺の血管が染色されずにうっ血が観察された。また、過去の報告より、IL-4 はマクロファージに作用し Gas6 の産生を介して血栓の形成を促進する可能性がある<sup>32,33</sup>。したがって、現在、G 蛋白質ワクチンとコラーゲンの蓄積および血栓の形成との関与について、組織染色を用いて検証するとともに、Th2 サイトカインによるこれらの病態形成メカニズムの解析を進めている。これらの肺重量増加の原因解明は、G 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の気道炎症のより詳細な理解につながるものであり、G 蛋白質ワクチンの安全性を議論するうえで極めて重要な知見になり得ると考えられる。

G 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の気道炎症が呼吸機能に及ぼす影響は不明である。予備知見より、喘息の指標である気道過敏性を測定した結果、非ワクチン群の感染群では未感染群と比較して有意に気道過敏性が亢進したものの、ワクチン群では非ワクチン群の未感染群と同程度で、気道過敏性は亢進していなかった。そのため、G 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の気道炎症は、喘息とは異なる病態であることが示唆された。また、今後は、

肺のガス交換機能の指標である血中酸素濃度を測定することで、呼吸機能が障害されているかどうかも評価する予定である。

好酸球および好中球は、感染防御に寄与するものの、肺重量に影響を及ぼさなかった。過去の報告より、好酸球は I 型 IFN や一酸化窒素の産生を介して RSV の排除に関与することが示唆されている<sup>34,35</sup>。そのため、本結果は、好酸球が RSV の感染防御に寄与することを支持する。一方で、好中球は RSV の感染防御に寄与するかは不明であるものの、インフルエンザウイルスの感染防御に寄与することが報告されている<sup>36,37</sup>。また、ワクチン群では好中球を除去すると好酸球数が顕著に減少した。一般的に、好酸球は Th2 細胞が産生する IL-5 や IL-13 によって組織に遊走されるが<sup>38</sup>、過去の報告より、*in vitro* において好中球も好酸球の遊走に関与することが示唆されている<sup>38,39</sup>。したがって、好中球は直接的、あるいは肺への好酸球の遊走を促進することで間接的に RSV の排除を促進することが推察される。また、好酸球あるいは好中球の除去によってウイルス量が増加したものの、肺重量に影響を及ぼさなかったことから、肺重量はウイルス量に依存しないことが示唆された。さらに、好酸球は、FI-RSV ワクチンにおいて VAED の重症度と相関することからも<sup>12</sup>、これまで G 蛋白質ワクチンにおいても副反応の指標として用いられてきた。しかし、近年の報告では、FI-RSV ワクチンによる RSV 感染後の気道炎症の増悪や呼吸機能の低下が好酸球欠損マウスでは誘発されないことから、好酸球は VAED の誘発には関与しないことが示唆されている<sup>40</sup>。したがって、本結果は、好酸球が G 蛋白質ワクチンの副反応の指標として適切でないことを支持すると考えられる。

G 蛋白質ワクチン接種マウスでは、CD4<sup>+</sup>T 細胞の除去により、好酸球および好中球の浸潤が有意に減少した一方で、肺のウイルス量は増加傾向にあったものの有意な差が認められなかった。本事象は、好酸球および好中球がウイルス排除に寄与するという結果と矛盾する。しかし、ワクチン群では、抗 CD4 抗体の投与による好中球の減少量は、抗 Ly6G 抗体と比較してわずかであった。そのため、CD4<sup>+</sup>T 細胞の除去によるウイルス量の増加が大きく観察されなかったと推察される。また、非ワクチン群では CD4<sup>+</sup>T 細胞を除去するとウイルス量の僅かな減少が観察されたことから、CD4<sup>+</sup>T 細胞がウイルスの増加に寄与している可能性が考えられた。その理由として、抗 CD4 抗体は、Th2 細胞だけでなく、制御性 T 細胞を含む全ての CD4<sup>+</sup>T 細胞を除去したと推察される。特に、制御性 T 細胞は、抗ウイルス応答の抑制にも関与するため<sup>41,42</sup>、ウイルスの増殖を促進する可能性がある。したがって、CD4<sup>+</sup>T 細胞全体としてはウイルス排除にほとんど寄与しない一方で、Th2 細胞は好酸球および好中球を誘導することでウイルス排除を促進すると考えられる。

結論として、G 蛋白質ワクチンによって誘導された Th2 細胞は、RSV 感染後に肺に集積し、好酸球や好中球の増加に関与するとともに、肺重量の増加に関連することが示された。一方で、肺に浸潤する好酸球や好中球は肺重量の増加に関与しないことが明らかとなった。したがって、安全性の高い G 蛋白質ワクチンの開発には、ウイルス中和抗体の誘導に加え、Th2 細胞を誘導しないワクチン設計が重要であると考えられる。一方で、VAED は、RSV ワクチンだけでなく、SARS-Cov-2 の組換え蛋白質ワクチンでも報告されているが、詳細な原因は不明である<sup>43</sup>。そのため、本研究結果は G 蛋白質ワクチンに限らず、FI-RSV ワクチンを含む他の RSV ワクチンおよび SARS-Cov-2 ワクチンの VAED の原因解明および臨床応用に有益な知見をもたらすものと期待される。

## 第二節 有効かつ安全な新規 G 蛋白質ワクチンの開発

第一節で示したように、哺乳類細胞を用いて作製した精製組換え G 蛋白質 (mG) ワクチンは、感染を防御する一方で、Th2 細胞を起因とする気道炎症を誘発する。また、mG はアミノ酸配列からの推定分子量が約 30 kDa であるのに対して、大量の糖鎖が付加され約 90 kDa まで増大する。しかし、近年、糖鎖付加機構をもたない大腸菌 (*E.coli*) を用いて作製した精製組換え G 蛋白質 (eG) にアジュバントを添加したワクチンが、マウスやラットにおいて、mG ワクチンよりも感染防御効果に優れ、Th2 応答を誘導しにくいことが報告された<sup>26,44</sup>。しかし、mG および eG の有効性および安全性が、アジュバントの添加の有無に関わらず普遍的であるかどうかは不明である。

また、アジュバントは通常、免疫原性を高め、Th1/Th2 バランスを制御するために使用される<sup>45</sup>。臨床において、ワクチン使用実績のある代表的なアジュバントには、Alum、Toll 様受容体 (TLR) 9 リガンドである非メチル化 cytosine-phosphate-guanine (CpG) を有する一本鎖 DNA (CpG ODN)<sup>46</sup>、スクアレンベースの oil-in-water 型エマルジョンである MF-59 などが挙げられる<sup>45,47,48</sup>。前節より、mG ワクチンによる副反応の原因が Th2 細胞であることが示されたことから、mG および eG ワクチンにおいて、これらのアジュバントを併用することで Th1/Th2 バランスを制御して副反応を抑制し得る可能性がある。

本節では、有効性と安全性を向上させた G 蛋白質ワクチンを探索することを目的とし、異なるアジュバントを添加した mG と eG ワクチンの感染防御効果および副反応を比較した。

### 【実験材料と方法】

#### 実験動物

6-10 週齢の BALB/c マウス (雌) を日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスは 12 時間の明暗サイクル (点灯 : 8 時、消灯 : 20 時) 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 (プロトコル番号 : BIKEN-AP-R01-15-2、BIKEN-AP-R02-14-5)。

#### 組換え蛋白質の作製と精製

mG 発現プラスミドについては、前節に記載した。F 蛋白質発現プラスミドは、国立感染症研究所の鈴木忠樹先生にご提供いただいた。F 蛋白質は、RSV-A2 株 (GenBank accession number : AAB59858.1) に由来する F 蛋白質の細胞外ドメイン (1-513) に、DS-Cav1 をベースとした P102A, S155C, S190F, V207L, S290C, I379V, M447V のアミノ酸変異を加え、C 末端側に T4 バクテリアファージ由来の 3 量体形成ドメインである foldon (GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL) および His タグが付加されたものを使用した<sup>15,49</sup>。また、上記のアミノ酸配列を哺乳類細胞発現のために最適化した cDNA をプラスミドに組み込んだ。mG および F 蛋白質は、Expi293 Expression System を用いて発現させた。プラスミド (30  $\mu$ g) と ExpiFectamine 293 (80  $\mu$ L) を混合し、室温で 10 分間静置した後、 $7.5 \times 10^7$  cells/25 mL に調整した Expi293F 細胞に混合溶液を添加し、37  $^{\circ}$ C、8% CO<sub>2</sub> の条件下で、18 時間振盪培養 (120 rpm) した。その後、ExpiFectamine 293 transfection enhancer 1 を 150  $\mu$ L、ExpiFectamine 293 transfection enhancer 2 を 1.5 mL、100 $\times$ ペニシリン/ストレプトマイシン溶液を 250  $\mu$ L 添加した。トランスフェクションから 6 日後に、培養上清を 5,000  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心して回収した。eG 発現プラスミドは、N 末端に His タグを付加した G 蛋白質のエクトドメインを大腸菌発現用に最適化したものを pCold3 vector (Takara Bio, Kusatsu, Shiga, Japan) に組み込むことで作製した。eG は、eG 発現プラスミドを BL21 (DE3) に導入し、0.2 mM isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside を添加し、15  $^{\circ}$ C で 24 時間振盪培養することで作製した。培養後、大腸菌を 8,000  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心して回収し、20 mM イミダゾールおよび Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を含んだ 20 mM リン酸ナトリウム溶液に懸濁した。その後、超音波処理で大腸菌を溶解し、8,000  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で 60 分間遠心して上清を回収した。mG、eG、および F 蛋白質は、Ni-Sepharose HisTrap FF column を取り付けられた Akta explorer chromatography system 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、0.5 M イミダゾールを含んだ 20 mM リン酸ナトリウム溶液で蛋白質を溶出した。次に、溶出された蛋白質溶液を、Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off, 10 kDa, Merck Millipore) に加え、7,500  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で遠心して 500  $\mu$ L まで濃縮し、ゲル濾過カラム Superose 6 Increase 10/300 GL column に流した。その後、A high-molecular-weight standard kit を用いて、溶出プロファイルから目的の蛋白質画分と推定される画分のみを Amicon Ultra centrifugal filters で濃縮した。eG は EndoTrap HD 5/1 (LIONEX, Braunschweig, Germany) を用いてエンドトキシンを除去し、エンドトキシン量を

Limulus Color KY Test (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて 0.05 endotoxin unit (EU) 以下であることを確認した。各蛋白質の精製度は、SDS-PAGE および Coomassie Brilliant Blue 染色によって確認した。SDS-PAGE は、蛋白質溶液を 5% メルカプトエタノールを含む 2 × sample buffer と混合し、95 °C で 5 分間熱処理をした後、10% Extra PAGE One Precast Gel にアプライし、200 mV (定電圧) で 45 分間電気泳動した。その後、ゲルを EzStain Aqua で染色し、ChemiDoc Touch Imaging System で撮影した。また、蛋白質の濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて決定した。

### **RSV の培養と濃縮**

第一節の実験材料と方法に準じた。

### **マウスへのワクチンおよび RSV 感染**

6 週齢の BALB/c マウス (雌) の尾根皮下に、0 日目および 21 日目に、mG、eG、および F 蛋白質 (1 μg/mouse) を単独あるいは Alum (50 μg/mouse)、CpG ODN K3 (5'-atcgactctcgagcgttctc-3') (10 μg/mouse), or AddaVax (InvivoGen) (25 μL/mouse) とともに投与した。投与試料は PBS (-) で調製し、BD ロードーズ™ インスリン皮下投与用針付注射筒を用いて 50 μL/mouse で投与した。最終免疫から 7 日後に、頬静脈より血清を回収、または頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、脾臓を回収した。31 日目に、麻酔下において  $1.0 \times 10^5$  PFU/30 μL PBS の RSV を片鼻 15 μL でマウスに経鼻投与することで感染させ、感染 5 日後 (36 日目) に麻酔下で下大静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、肺 (気道を除く) を回収した。また、上顎および鼻の先端を切除し、ピンセットを用いて鼻甲介内の鼻腔組織を掻き出し回収した。

### **ELISA を用いた血漿中抗体価の評価**

第一節の実験材料と方法に準じ、最後に、OD<sub>450-570</sub> が 0.1 以上となる最大希釈倍率をエンドポイントタイターとして算出した。

### **脾臓細胞の再刺激による T 細胞応答の解析**

マウスの脾臓を 5 mL の細胞懸濁用メディウム (5% FBS、20 mM HEPES を添加した L-グルタミン含有 RPMI 1640 培地 (Nacalai Tesque)) が入った 15 mL チューブに回収し、セルストレーナー上でプランジャーを用いて脾臓をすりつぶし、単一細胞懸濁液を得た。

400 × *g*、4 °C で 5 分間遠心し、上清を除去した後、2 mL の ACT lysis buffer 加え、室温で 5 分間インキュベートすることで、溶血処理を行った。その後、5 mL の細胞懸濁用メディアウムを追加し、400 × *g*、4 °C で 5 分間遠心した。上清を除去し、1 mL の細胞培養用メディアウム (10% FBS、1% ペニシリン、1% ストレプトマイシン、28.5 μM 2-メルカプトエタノールを添加した L-グルタミン含有 RPMI 1640 培地) に再懸濁した後、20 分の 1 量 (50 μL) を 96 well U-bottom plate (Thermo Fisher Scientific) に播種した。その後、細胞培養用メディアウムで希釈した 10 μg/mL の F 蛋白質を 50 μL/well で添加し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 19 時間培養した。その後、protein transport inhibitor cocktail を加え、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 5 時間培養した。800 × *g*、4 °C で 4 分間遠心し、培養上清を除去した後、細胞表面染色を行った。染色用メディアウムで、Fixable Viability Dye eFluor 780 および Table 2 (Analysis of cytokine-producing T cells, Cell surface antigen staining) に示す抗体を希釈し、50 μL/well で加えて、暗所、4 °C で 15 分間インキュベートした。その後、200 μL の染色用メディアウムを加え、800 × *g*、4 °C で 4 分間遠心し、細胞を洗浄した。100 μL の BD Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences, Sparks, MO, USA) を加え、暗所、4 °C で 20 分間インキュベートして細胞を固定した後、100 μL の BD Perm/Wash Buffer を加え、800 × *g*、4 °C で 4 分間遠心し、上清を除去した。その後、200 μL の BD Perm/Wash Buffer で 2 回洗浄および膜透過処理を行った。BD Perm/Wash Buffer で Table 2 (Analysis of cytokine-producing T cells, Intracellular cytokine staining) に示す抗体を希釈し、50 μL/well で加えて、暗所、4 °C で 30 分間インキュベートした。200 μL の BD Perm/Wash Buffer で 2 回洗浄した後、200 μL の染色用メディアウムに細胞を懸濁し、メッシュに通して、96 well U-bottom plate (Violamo) に移した。その後、Attune NxT Flow Cytometer を用いてデータを取得し、FlowJo software version 10.9 を用いてデータ解析を行った。

### **RNA 抽出・リアルタイム RT-PCR**

第一節の実験材料と方法に準じた。また、肺におけるサイトカインの mRNA 発現解析では、サイトカインの mRNA 発現量を内在性コントロールである *Gapdh* の mRNA 発現量で除して評価した。

### **血清中抗体による感染防御効果の評価**

最終免疫から 7 日後に麻酔下でマウスの心臓から回収した血清を室温で 2 時間放置した後、

3,000 × g、4 °C で 20 分間遠心し、上清の血清を回収した。血清は 56 °C で 30 分間インキュベートすることで非働化した後、-30 °C で保管した。その後、ナイーブマウス由来の非働化済み血清を用いて希釈した血清サンプルを  $1.0 \times 10^5$  PFU の RSV と *in vitro* で混合し、30 μL の PBS 中に懸濁し、麻酔下で 7 週齢のナイーブマウスに経鼻投与した。感染後 5 日目にマウスを麻酔して安楽死させ、上記のように、右肺および鼻甲介を回収し、組織中のウイルス量をリアルタイム RT-PCR にて定量した。

### **肺への浸潤細胞の解析**

第一節の実験材料と方法に準じた。

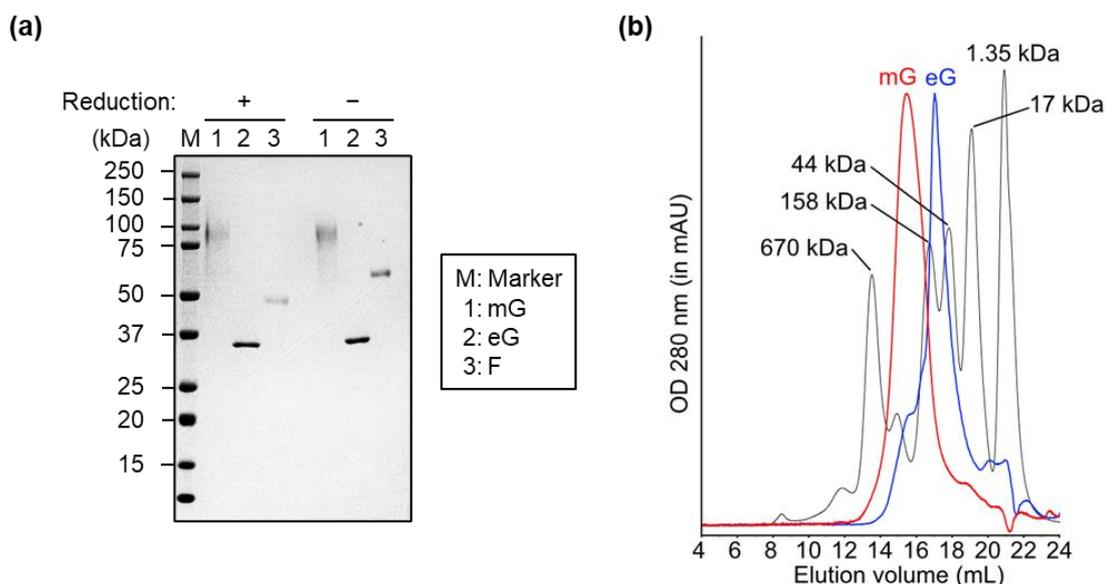
### **統計解析**

第一節の実験材料と方法に準じた。

## 【結果】

### mG および eG ワクチンの抗体誘導能の評価

まず、糖鎖の有無による G 蛋白質の免疫原性を比較するため、哺乳類細胞あるいは大腸菌を用いて G 蛋白質の細胞外ドメイン mG あるいは eG を作製し、精製した。Figure 7 の mG のゲル濾過クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE の結果は、Figure 1 と同一の結果である (Figure 7a, b)。また eG は、ゲル濾過クロマトグラフィー後の SDS-PAGE により、約 30 kDa の位置に単一バンドで観察され、高純度に精製されたことが確認された (Figure 7a)。本結果より、mG は大量の糖鎖が修飾されていることが示唆された。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出プロファイルより、mG と同様に eG も多量体を形成していることが推察された (Figure 7b)。

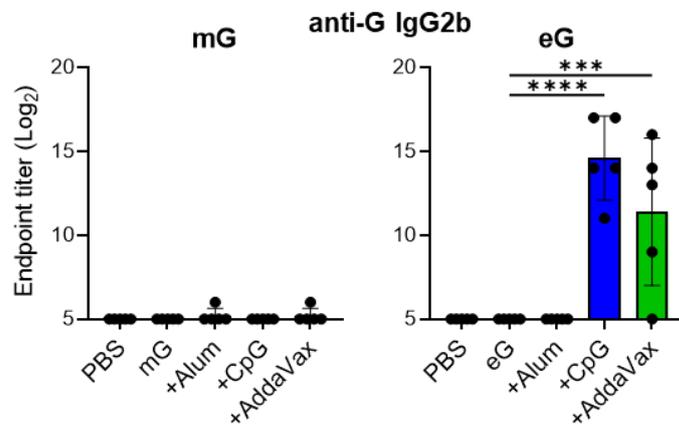
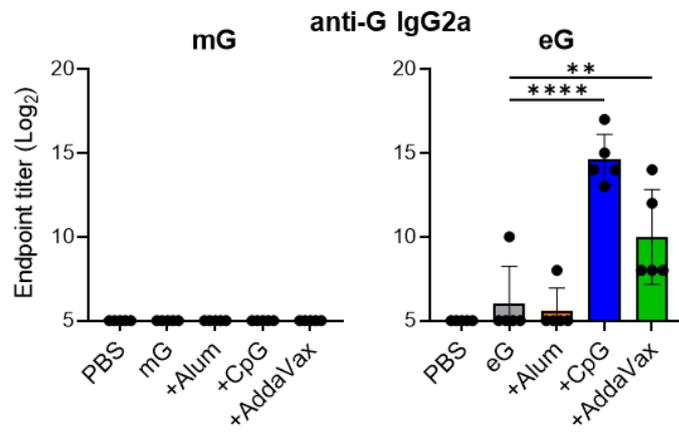
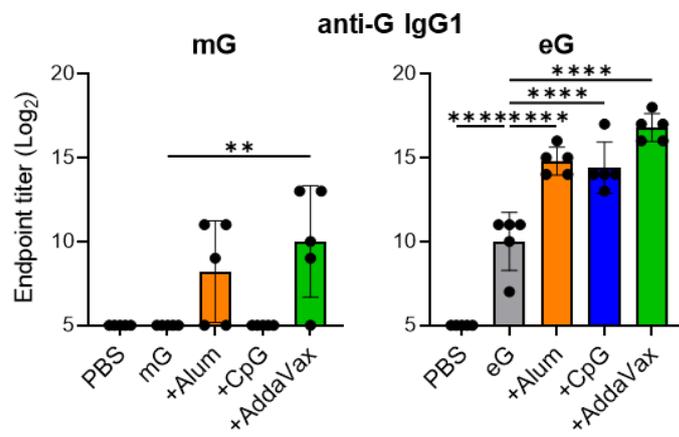
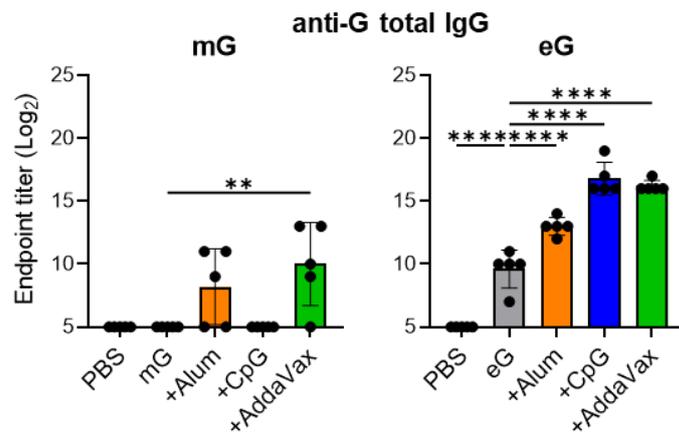


**Figure 7. Purity of vaccine antigens.**

(a) 1  $\mu$ g of the indicated protein was reduced (+) with or (-) without  $\beta$ -mercaptoethanol and analyzed through sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by Coomassie Brilliant Blue staining. (b) mG or recombinant G protein expressed in *Escherichia coli* (eG) were purified using immobilized metal ion affinity chromatography followed by size exclusion gel filtration chromatography. The elution profiles of mG (red line) or eG (blue line) in size exclusion gel filtration chromatography were overlaid with the elution profile of the standard proteins (black line). This experiment was performed twice.

次に、Alum、CpG ODN、MF-59 様アジュバントである AddaVax などの代表的なアジュバントを用いて、mG および eG ワクチンの有効性を比較した。mG または eG 単独、あ

るいは各アジュバントを添加して 0 日目と 21 日目にマウスに皮下投与し、28 日目の血漿中の G 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 量を ELISA にて評価した (Figure 8)。RSV 表面の G 蛋白質は糖鎖修飾されているため、ELISA では mG を固相化し、検出される抗体を G 特異的抗体として評価した。その結果、mG 単独群では、非ワクチン群と比較して、いずれの G 特異的 IgG も検出されなかった一方で、eG 単独群では、非ワクチン群と比較して、G 特異的 total IgG および IgG1 が有意に誘導された (Figure 8)。また、mG ワクチンにおいて、CpG および Alum 添加群では、mG 単独群と比較して、いずれの G 特異的 IgG 産生も促進されなかった一方で、AddaVax 添加群では G 特異的 total IgG および IgG1 産生が有意に促進された (Figure 8)。さらに、eG ワクチンにおいて、CpG および AddaVax は、G 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b の全てにおいて、eG の免疫原性を有意に増強したが、Alum は G 特異的 total IgG および IgG1 産生のみ有意に増強した (Figure 8)。以上の結果より、eG ワクチンは mG ワクチンと比較して抗体誘導能に優れている傾向にあり、特に CpG または AddaVax は eG ワクチンの G 特異的 IgG 産生を顕著に促進することが示された。

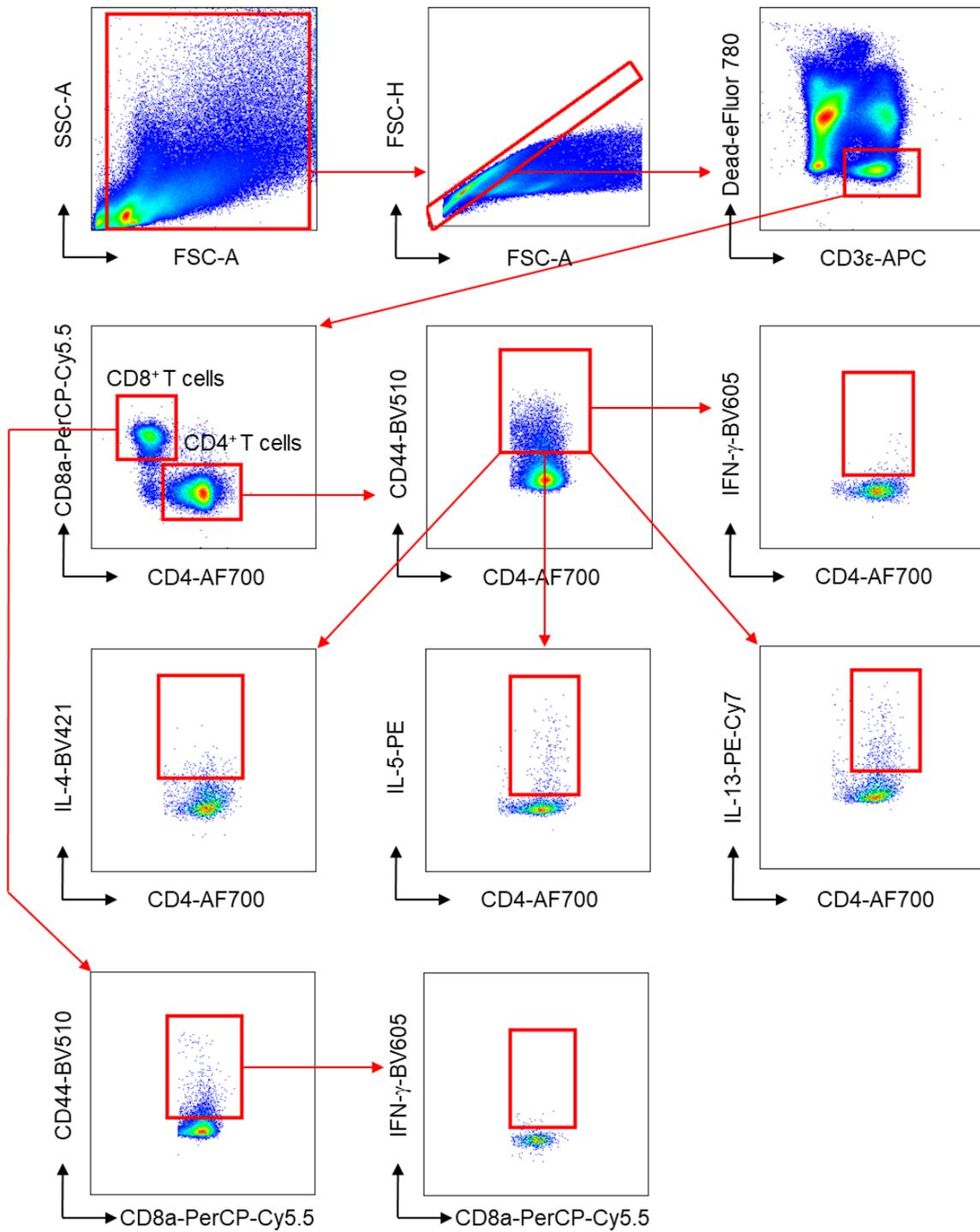


## Figure 8. Antibody responses to mG or eG vaccines

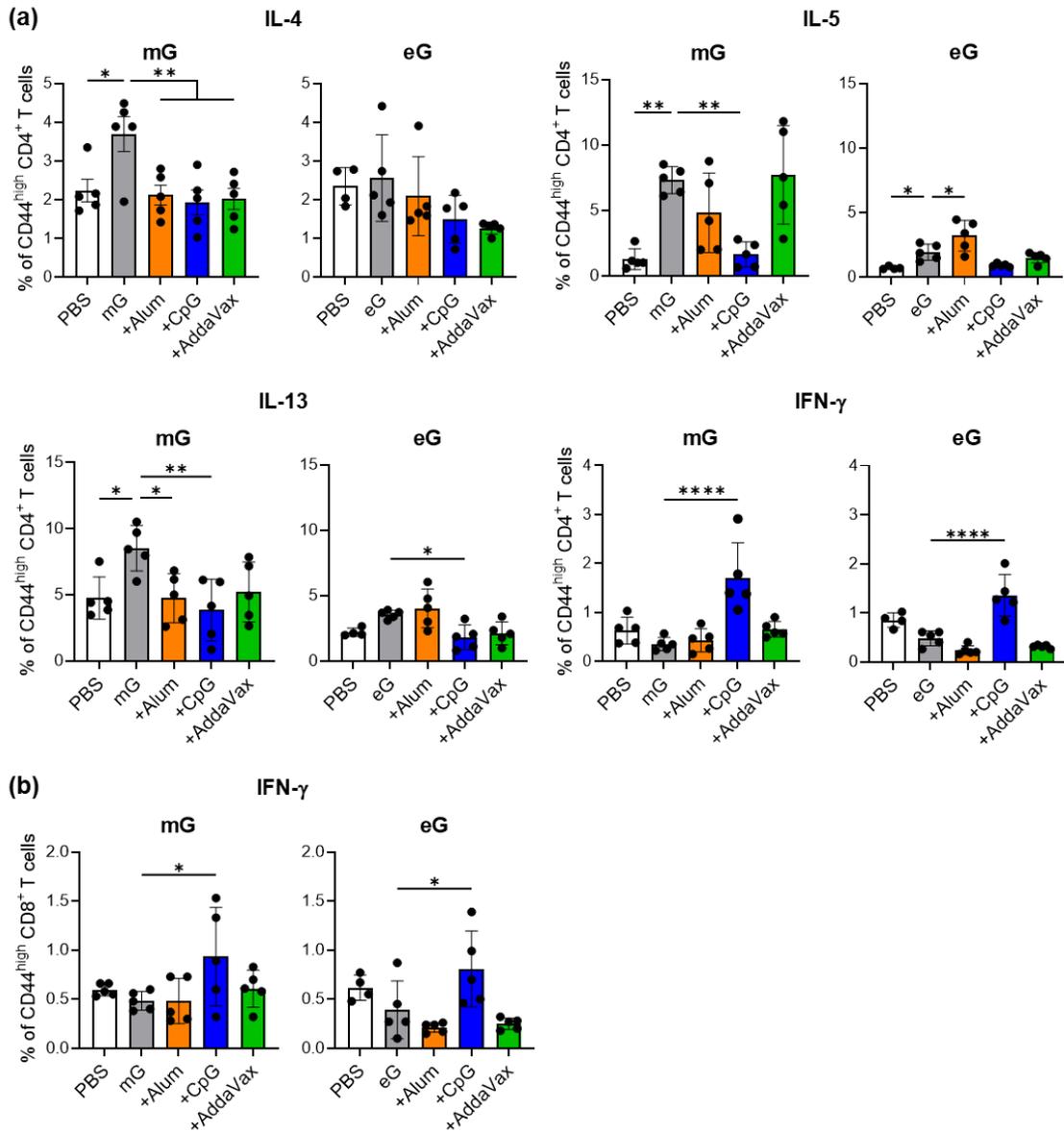
Mice were immunized subcutaneously with 1  $\mu$ g mG or eG alone, +50  $\mu$ g alum, +10  $\mu$ g CpG ODN, or +50% AddaVax, or PBS as a control on days 0 and 21. Plasma was collected 7 days after the second immunization. The endpoint titers of G-specific total IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b in plasma were evaluated using ELISA 7 days after the second immunization with mG or eG vaccines. Each experiment was performed twice.  $n = 5$  per group. Data are presented as the means  $\pm$  SD. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$  as indicated using Dunnett's test compared with mG alone or eG alone.

## mG および eG ワクチンの T 細胞誘導能の評価

次に、mG および eG ワクチンによって誘導された T 細胞応答を評価するために、ワクチン接種後の脾臓細胞を mG で再刺激し、フローサイトメトリーを用いて、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-13) あるいは Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) を産生する G 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞を Th2 あるいは Th1 細胞として解析した (Figure 9、10)。その結果、mG 単独群では、非ワクチン群と比較して、IL-4、IL-5、あるいは IL-13 産生 Th2 細胞が有意に誘導されたが、Th1 細胞を誘導しなかった (Figure 10a)。一方で、eG 単独群では IL-5 産生 Th2 細胞のみが有意に誘導された (Figure 10a)。また、mG および eG ワクチンの両方で、抗原単独群と比較して、CpG ODN を添加することによって Th1 細胞が有意に増加したが、Th2 細胞は変動しなかった (Figure 10a)。Alum の添加は、mG ワクチンでは mG 単独群と比較して Th1 および Th2 細胞を増強しなかったが、eG ワクチンでは eG 単独群と比較して IL-5 産生 CD4<sup>+</sup> T 細胞を有意に増加させた (Figure 10a)。AddaVax の添加は、mG ワクチンでも eG ワクチンでも抗原単独群と比較して Th1 および Th2 細胞を増強しなかった (Figure 10a)。また、同様に脾臓細胞中の IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup> T 細胞を G 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞として解析した結果、非ワクチン群と比較して、mG 単独および eG 単独ワクチン群は G 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導しなかった (Figure 10b)。一方で、CpG ODN を添加することで、mG および eG ワクチンの両方で、抗原単独群と比較して IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup> T 細胞が有意に誘導された (Figure 10b)。Alum または AddaVax の添加では、この効果は認められなかった (Figure 10b)。以上をまとめると、①eG ワクチンは mG ワクチンと比較して Th2 細胞を誘導しにくいこと、②mG、eG に関わらず単独では Th1 および CD8<sup>+</sup> T 細胞をほとんど誘導できないこと、③一方で、CpG ODN を添加すると Th1 および CD8<sup>+</sup> T 細胞の誘導を促進できることが明らかとなった。



**Figure 9. Gating strategy for cytokines producing CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells or CD44<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in the splenocytes.**



**Figure 10. T cell responses to mG or eG vaccines**

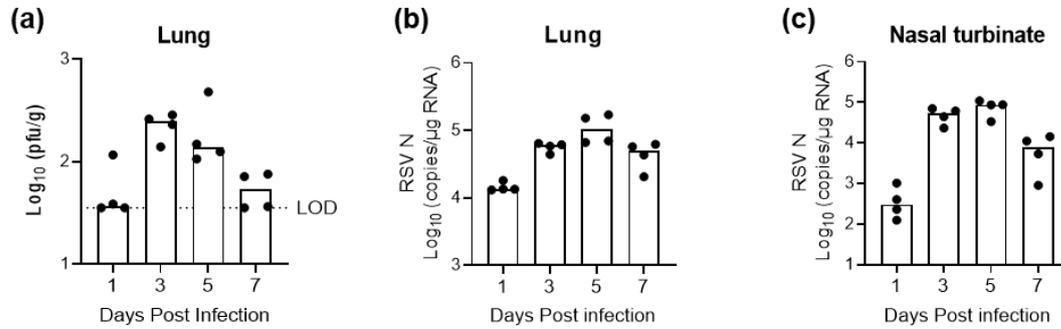
(a, b) Splenocytes from mice immunized with mG or eG vaccines were incubated in the presence of mG for 3 days and with a transport inhibitor for the final 5 h of culture. The intracellular cytokine levels in (a) CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells and (b) CD44<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> T cells were evaluated using flow cytometry. (a, b) Each experiment was performed twice. n = 4–5 per group. Data are presented as the mean ± SD. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\*\**P* < 0.0001 as indicated using Dunnett's test compared with mG alone or eG alone. IL, interleukin; IFN, interferon.

## mG および eG ワクチンの感染防御効果の比較

次に、mG および eG ワクチンの感染防御効果を評価するため、ワクチン接種したマウスに RSV を経鼻感染させ、肺および鼻甲介におけるウイルス量を測定した。本実験を行うにあたり、当初、プラークアッセイを用いてウイルス量を測定した際、検出感度が低い故に、ほとんどのワクチン接種群でウイルスが定量不可能であり、各ワクチンの有効性を比較困難であった。そのため、本実験ではウイルスを高感度に測定可能である real-time RT-PCR を用いて、組織中の RSV の N 蛋白質のコピー数を定量した。なお、ナীবマウスに RSV を感染させた際の肺のウイルス量は、real-time RT-PCR およびプラークアッセイでおおよそ相関することを確認している (Figure 11a, b)。さらに、ナীবマウスでは RSV 感染後 5 日目に肺と鼻甲介でウイルス量が最大となったため (Figure 11b, c)、ワクチン接種マウスでは RSV 感染後 5 日目のウイルス量を比較することとした。その結果、肺では、非ワクチン群と比較して、mG および eG 単独群ではウイルス量が有意に減少した (Figure 12a)。また、mG ワクチンでは、AddaVax を添加することによってウイルス量がさらに有意に減少した (Figure 12a)。一方で、mG に Alum あるいは CpG を添加してもウイルス量のさらなる減少は観察されなかった。eG ワクチンでは、eG 単独群と比較して、Alum、CpG および AddaVax のいずれのアジュバントを添加してもウイルス量が有意に減少した (Figure 12a)。また、鼻甲介では、非ワクチン群と比較して、mG 単独群は感染を防御しなかったものの、eG 単独群は有意に感染を防御した (Figure 12b)。一方で、mG および eG ワクチンの両方において、抗原単独群と比較して、どのアジュバント添加群でも鼻甲介のウイルス量は有意な減少が認められなかった (Figure 12b)。以上の結果より、mG+AddaVax および eG+Alum、eG+CpG、eG+AddaVax ワクチンは、抗原単独ワクチンと比較して LRT における RSV 感染を顕著に防御可能であることが示された。

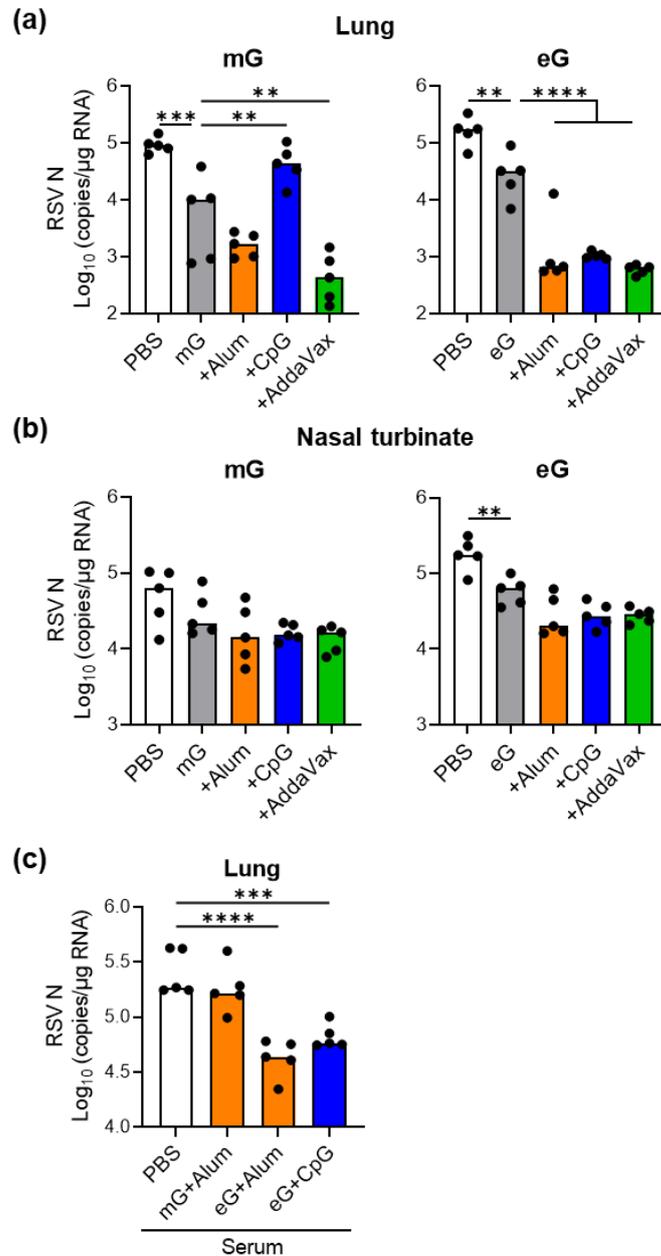
次に、ワクチンによる感染防御における抗体の役割を検証するために、ワクチン接種後のマウスの血清を RSV と混合し、ナীবマウスに経鼻投与した。本実験では、RSV 感染を防御したワクチンのうち、mG+Alum、eG+Alum、eG+CpG を接種したマウスの血清、あるいはネガティブコントロールとして PBS を接種したマウスの血清を用いて感染防御効果を比較した (Figure 12c)。その結果、eG+Alum あるいは eG+CpG を接種したマウスの血清は、コントロールと比較して肺のウイルス量を有意に減少させた (Figure 12c)。一方で、Figure 7 より、mG+Alum 群では G 特異的抗体がほとんど検出されなかったことと相関して、mG+Alum を接種したマウスの血清では、ウイルス量の減少は認められなかった (Figure 12c)。したがって、mG+Alum ワクチンによる感染防御は抗体非依存性である

一方で、eG+Alum および eG+CpG ワクチンは抗体依存的に感染を防御し得ることが示された。



**Figure 11. RSV progression in the lungs and nasal turbinates of naive mice.**

(a-c) Naive 10-week-old mice were infected intranasally with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV, and lungs and nasal turbinates were collected 1, 3, 5, or 7 days post infection. (a) The viral loads in the left lungs were determined using plaque assay. (b, c) The viral loads were determined using real-time RT-PCR for the mRNA levels of RSV nucleoprotein in (b) the right lungs and (c) nasal turbinates. (a-c) Each experiment was performed twice.  $n = 4$  per group. Data are presented as the median. Limits of detection are indicated.



**Figure 12. Protective effect of eG or mG vaccines against RSV challenge**

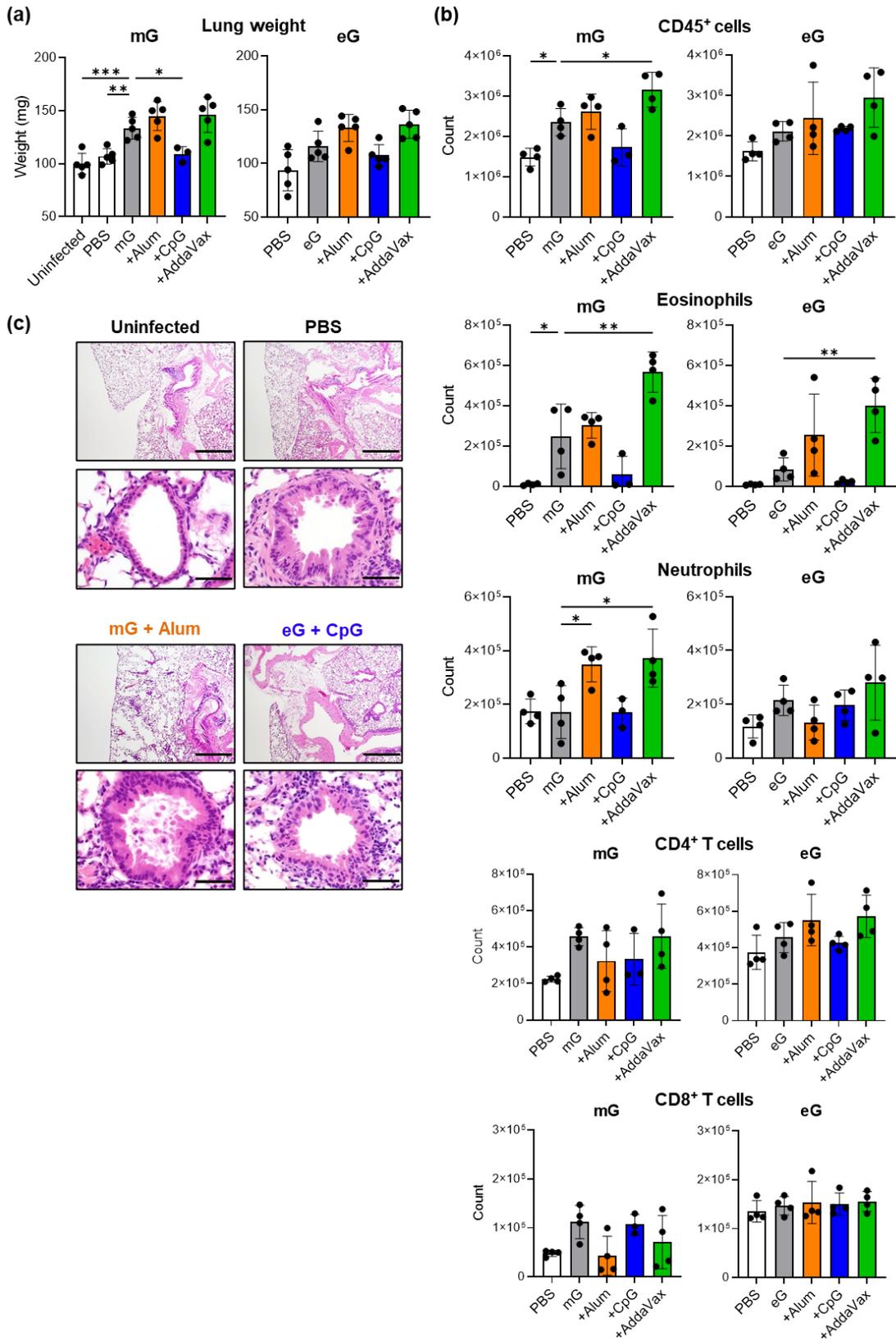
(a, b) Mice immunized with mG or eG vaccines were challenged intranasally with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV 10 days after the second immunization. At 5 days post infection, (a) the lungs and (b) nasal turbinates were collected, and viral loads were determined using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from the mRNA levels of RSV nucleoprotein. (c) Mixture of  $1.0 \times 10^5$  PFU RSV and 4-fold diluted serum from PBS-treated control mice or immunized mice was administered intranasally into naive mice. At 5 days post infection, right lungs were collected, and viral loads were determined using real-time RT-PCR for the mRNA levels of RSV nucleoprotein. (a-c) Each experiment was performed

twice. n = 5 per group. Data are presented as the median. \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*  
\*  $P < 0.0001$  as indicated using Dunnett's test compared with (a, b) mG alone, eG alone, or  
(c) PBS.

### mG および eG ワクチンの RSV 感染後の気道炎症評価

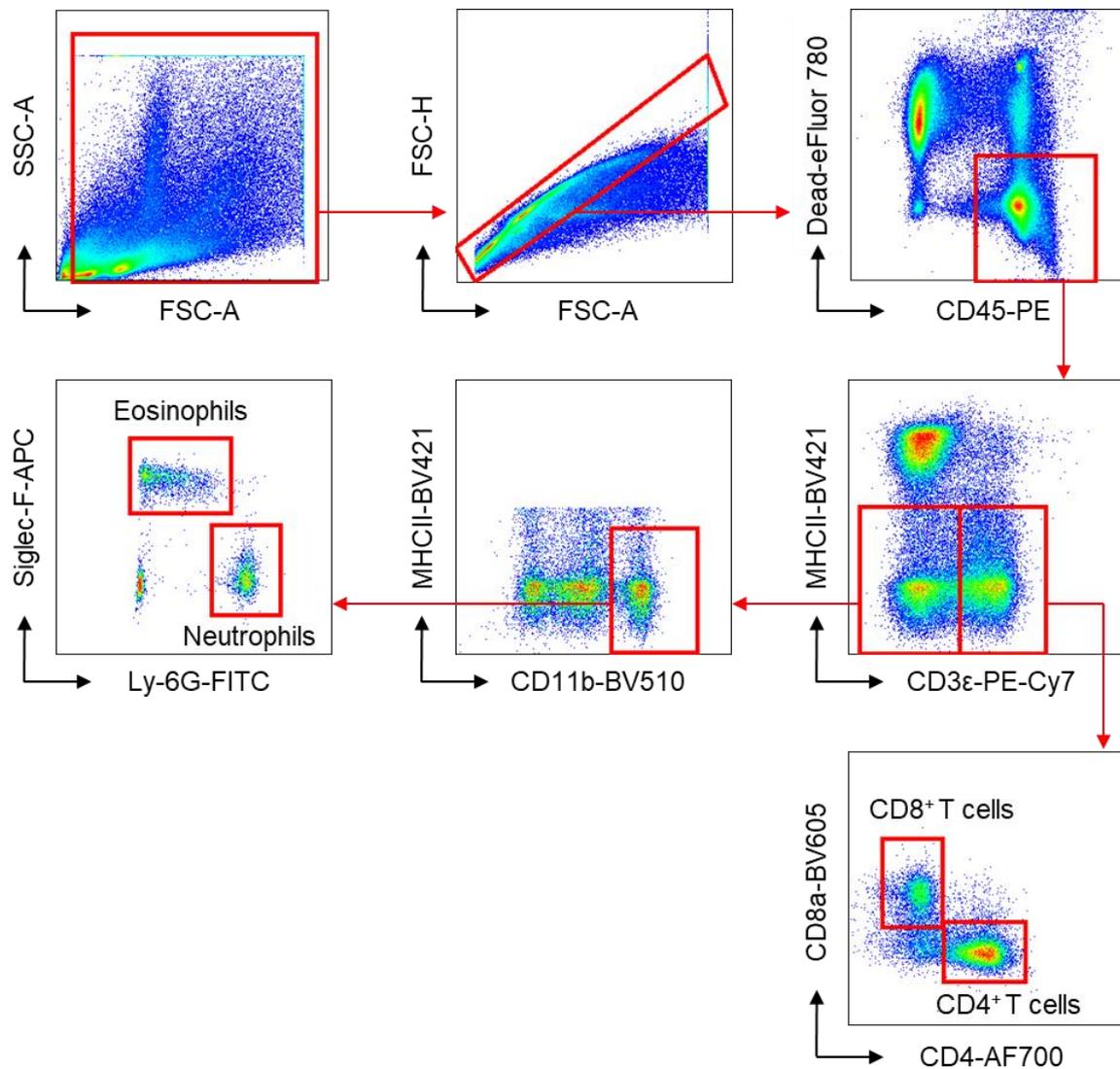
次に、mG および eG ワクチンを接種したマウスにおける RSV 感染後の気道炎症を比較するために、感染後 5 日目の肺重量および肺への浸潤細胞を解析した (Figure 13, 14)。その結果、非ワクチン群の未感染群 (Uninfected) および感染群 (PBS) では肺重量が同程度であったことから、RSV 感染だけでは肺重量が変化しないことが確認された。しかし、mG 単独群では、非ワクチン群と比較して、肺重量が有意に増加し、CD45<sup>+</sup> 細胞および好酸球が有意に増加した (Figure 13a, b)。一方で、eG 単独群では、肺重量およびいずれの細胞も非ワクチン群と同程度だった (Figure 13a, b)。続いて、アジュバント添加群を比較すると、mG ワクチンでは、CpG 添加群で、mG 単独群と比較して、肺重量が有意に減少し、肺への浸潤細胞は同程度だった (Figure 13a, b)。しかし、Alum 添加群では、mG 単独群と比較して、肺重量は同程度だったものの、好中球のみが有意に増加した (Figure 13a)。また、AddaVax 添加群では、mG 単独群と比較して、肺重量は同程度だったものの、CD45<sup>+</sup> 細胞、好酸球および好中球が有意に増加した。一方で、eG ワクチンでは、CpG および Alum 添加群で、eG 単独群と比較して、肺重量および肺への浸潤細胞は有意な差が認められなかった。しかし、Alum 添加群では、mG 単独群と比較して、肺重量および好酸球が増加傾向にあった。また、AddaVax 添加群では、eG 単独群と比較して、肺重量は有意な差が認められなかったものの増加傾向であり、好酸球のみが有意に増加した (Figure 13b)。一方で、CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞は、いずれのワクチン群においても非ワクチン群と同程度であった (Figure 13b)。したがって、eG+CpG は、他のワクチンと比較して、肺重量や肺への浸潤細胞を増加させずに RSV 感染を防御した。次に、eG+CpG ワクチンの RSV 感染後の気道炎症をさらに解析するために、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色) を用いて、RSV 感染後の肺の組織切片を観察した (Figure 13c)。なお、対照群には、RSV 感染を防御した一方で RSV 感染後に肺重量および肺への浸潤細胞を顕著に増加させた mG+Alum 群を用いた (Figure 13c)。その結果、mG+Alum 群では、非ワクチン群の未感染群 (Uninfected) および感染群 (PBS) と比較して、リンパ球浸潤の亢進が認められた (Figure 13c)。一方で、eG+CpG 群は、mG+Alum 群よりもリンパ球浸潤が少なく、非ワクチン群 (PBS) と同程度だった (Figure 13c)。以上の結果より、eG ワクチンは mG

ワクチンよりも RSV 感染後の肺重量の増加および肺への CD45<sup>+</sup> 細胞と好酸球の浸潤を誘導しにくい傾向があった。また、eG+CpG は気道炎症を誘発せずに RSV 感染を防御する一方で、mG+Alum および mG+AddaVax、eG+AddaVax は、RSV 感染を防御するものの気道炎症を増悪することが明らかとなった。



**Figure 13. Evaluation of lung inflammation after RSV challenge following mG or eG vaccines**

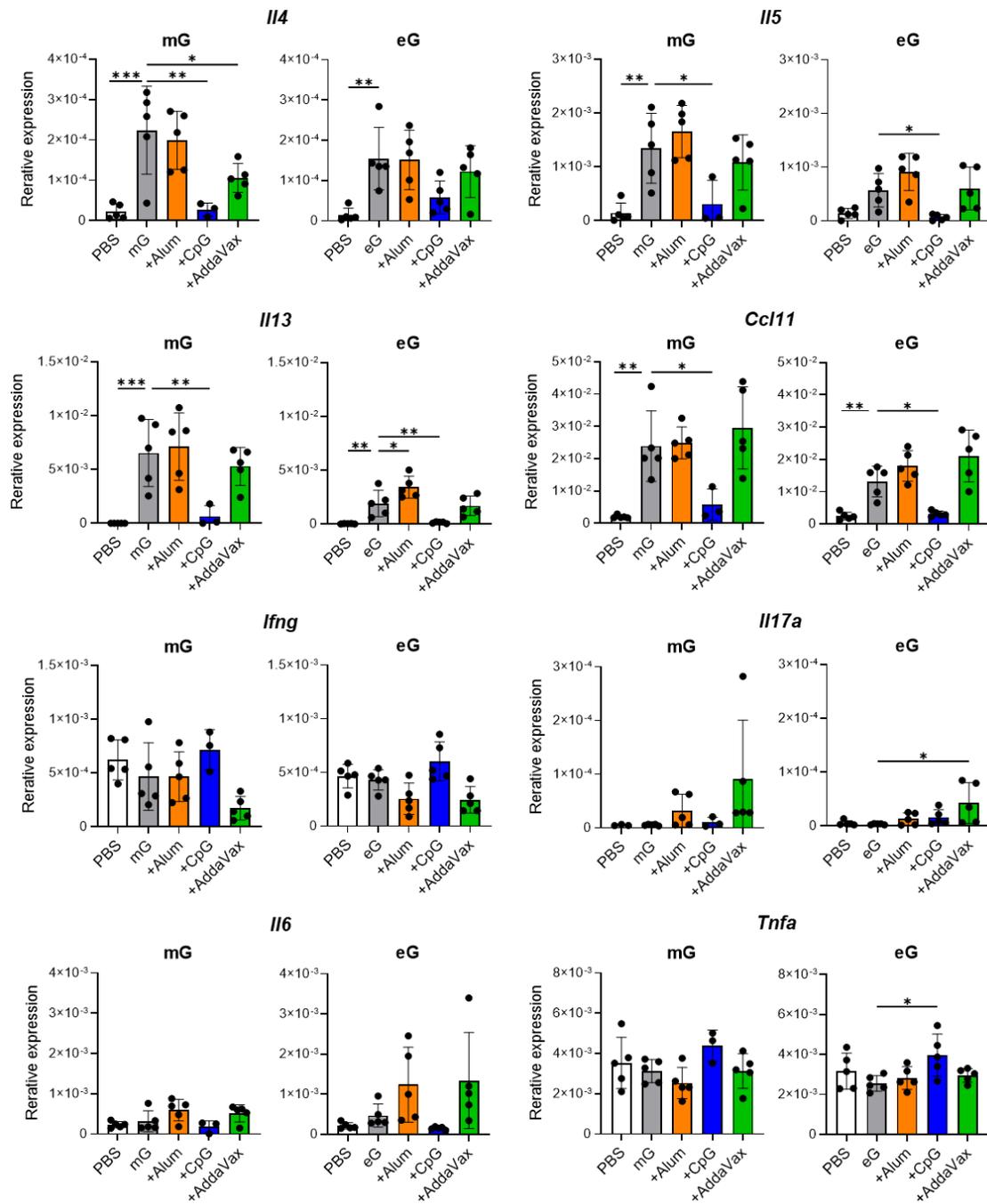
(a-c) Mice immunized with mG or eG vaccines were challenged intranasally with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV 10 days after the second immunization. At 5 days post infection, lungs were collected. (a) Right lung weight. (b) Flow cytometry analysis of infiltrating cells in the left lungs. (c) Images of hematoxylin-and-eosin-stained lung sections. Scale bars, 200  $\mu\text{m}$  (upper), 50  $\mu\text{m}$  (lower). (a-c) Each experiment was performed twice. (a)  $n = 3-5$  per group. (b)  $n = 3-4$  per group. (a, b) Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  as indicated using Dunnett's test compared with mG alone or eG alone.



**Figure 14. Gating strategy for infiltrating cells into the lungs following RSV challenge in mice vaccinated with mG or eG vaccines.**

### **mG および eG ワクチンの RSV 感染後の肺における炎症性サイトカインの発現評価**

次に、real-time RT-PCR を用いて、ワクチン接種マウスの RSV 感染後の肺における Th1 サイトカイン (*Ifng*) あるいは Th2 サイトカイン (*Il4*、*Il5*、*Il13*)、好酸球の遊走を誘導するケモカイン *Ccl11* (eotaxin-1)<sup>50,51</sup> の mRNA 発現を比較した (Figure 15)。その結果、mG 単独群および eG 単独群では、非ワクチン群と比較して、Th2 サイトカインおよび *Ccl11* の mRNA 発現量が有意に増加した一方で、Th1 サイトカインの mRNA 発現量は変化が認められなかった (Figure 15)。一方で、CpG 添加群では、mG および eG ワクチンの両方において、抗原単独と比較して Th2 サイトカインおよび *Ccl11* の mRNA 発現量が有意に減少したが、Th1 サイトカインの mRNA 発現量は変化しなかった (Figure 15)。Alum 添加群では、mG ワクチンで Th1 および Th2 サイトカイン、*Ccl11* の mRNA 発現量が変化しなかった一方で、eG ワクチンで *Il5* の mRNA 発現量のみが有意に増加した (Figure 15)。AddaVax 添加群では、mG および eG ワクチンの両方で、Th1 および Th2 サイトカイン、*Ccl11* の mRNA 発現量が増加しなかった (Figure 15)。これらの結果は、脾臓における Th2、Th1 の誘導と相関していた (Figure 9a)。また、ワクチン接種マウスの肺において、炎症性サイトカイン (*Il6*、*Tnfa*、*Il17a*) の mRNA 発現量に顕著な差は認められなかった (Figure 15)。したがって、eG+CpG は Th2 応答および気道炎症を誘導せずに RSV 感染を防御可能であることが示された。また、eG ワクチンは、RSV 感染後の肺において、mG ワクチンよりも Th2 応答が低い傾向にあった。



**Figure 15. Gene expression in the lungs after RSV challenge following mG or eG vaccines**

Mice immunized with mG or eG vaccines were challenged intranasally with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV 10 days after the second immunization. At 5 days post-infection, the right lungs were excised, and the relative expression levels of *Il4*, *Il5*, *Il13*, *Ccl11*, *Ifng*, *Il17a*, *Il6*, and *Tnfa* mRNA normalized to *Gapdh* were using real-time RT-PCR. This experiment was performed

twice. n = 3–5 per group. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 as indicated using Dunnett's test compared with mG alone or eG alone.

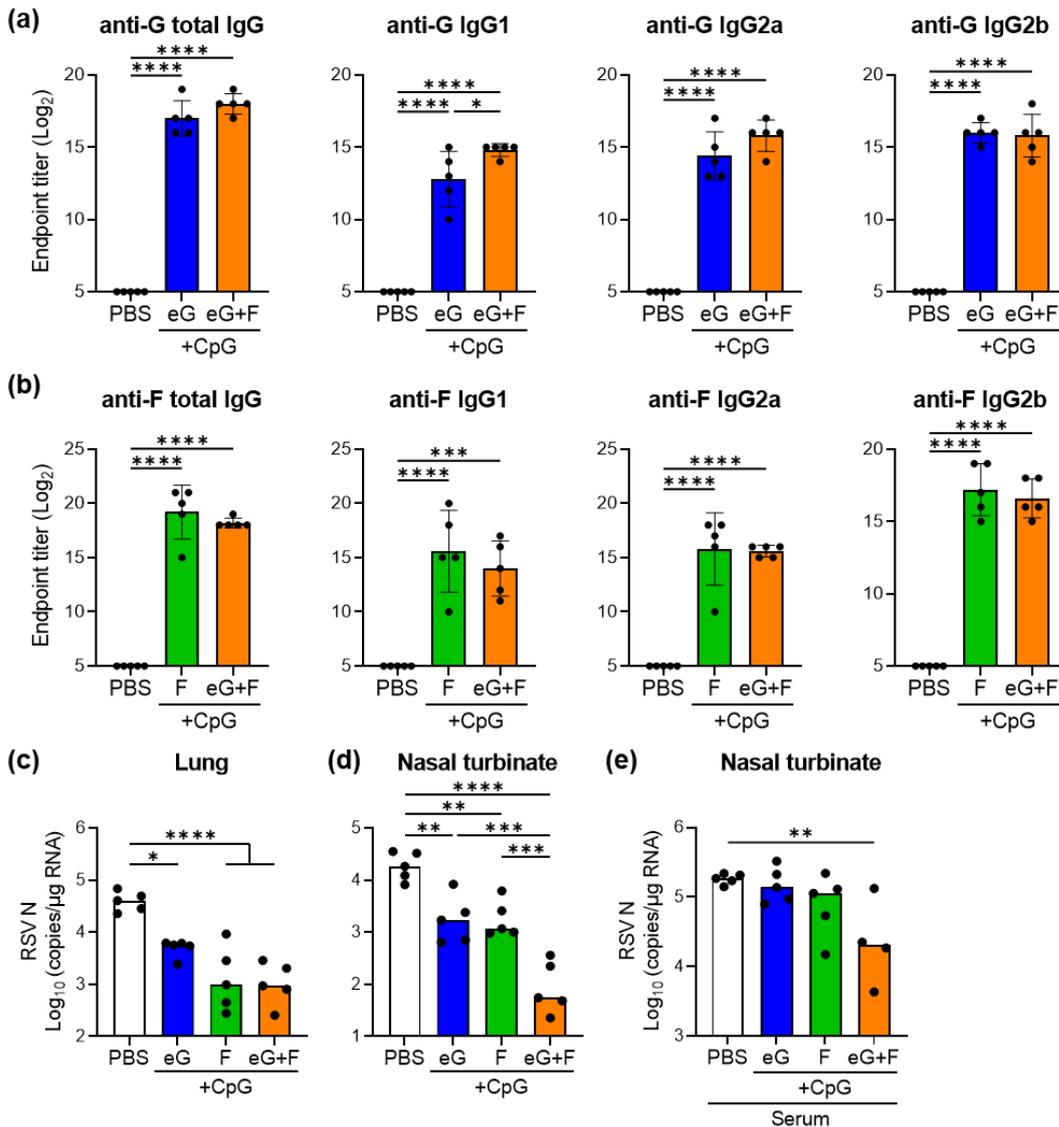
### eG+F+CpG 混合ワクチンの有効性評価

次に、安全性および有効性が示された eG+CpG ワクチンのさらなる有用性を評価するために、F 蛋白質と組み合わせた eG+F+CpG 混合ワクチンの感染防御効果を eG+CpG および F+CpG ワクチンと比較した。まず、哺乳類細胞を用いて DS-Cav1 をベースとした F 蛋白質を作製した。本実験に用いた F 蛋白質は、C 末端の foldon および His タグを含む F1 サブユニット (約 50 kDa) と F2 サブユニット (約 10 kDa) がジスルフィド結合により結合した構造を有する (11)。SDS-PAGE の結果より、非還元条件下では F1 および F2 サブユニットを含む F 蛋白質が約 60 kDa の位置に、還元条件下では F1 サブユニットが約 50 kDa の位置に単一バンドとして確認された (Figure 7b)。

次に、eG+CpG、F+CpG、あるいは eG+F+CpG を 0 および 21 日目にマウスに皮下投与し、28 日目に血漿中の G および F 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b を測定した (Figure 16a, b)。その結果、eG+CpG 群および F+CpG 群では、非ワクチン群と比較してそれぞれ G および F 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b が有意に増加した (Figure 16a, b)。また、eG+F+CpG 群でも、非ワクチン群と比較して、G および F 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b が有意に増加した (Figure 16a, b)。特に、eG+F+CpG 群では、eG+CpG 群と比較して、G 特異的 IgG1 が有意に増加した (Figure 16a)。次に、eG+F+CpG ワクチンの感染防御効果を評価した (Figure 16c, d)。その結果、eG+CpG 群、F+CpG 群、eG+F+CpG 群ではいずれにおいても、非ワクチン群と比較して、肺および鼻甲介におけるウイルス量が有意に減少した (Figure 16c, d)。また、eG+CpG 群では肺および鼻甲介において F+CpG 群と同程度に感染を防御した (Figure 16c, d)。さらに、eG+F+CpG 群では、eG+CpG 群および F+CpG 群と比較して肺のウイルス量に差が認められなかったものの、鼻甲介のウイルス量が有意に減少した (Figure 16c, d)。また、いずれのワクチンも RSV 感染後の肺の浸潤細胞数に顕著な差は認められなかった (Figure 17)。したがって、eG+F+CpG は、eG+CpG および F+CpG と比較して、肺での感染防御効果が同程度である一方で、鼻甲介での感染防御効果を顕著に増強することが明らかになった。

次に、eG+F+CpG ワクチンの鼻甲介における感染防御が抗体依存的であるかどうかを検証するために、PBS、eG+CpG、F+CpG を接種したマウスの血清を RSV と混合し、ナイー

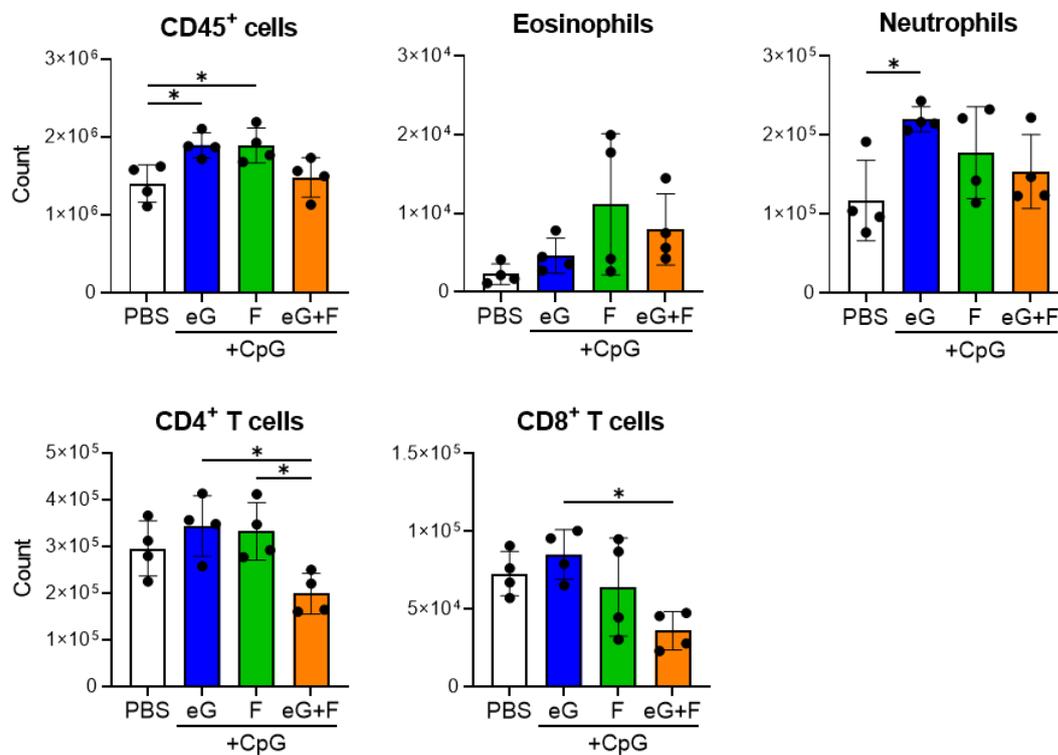
ブマウスに経鼻投与した (Figure 16e) 。その結果、eG+CpG 群または F+CpG 群の血清では、非ワクチン群の血清と比較して、鼻甲介のウイルス量が減少しなかった一方で、eG+CpG 群および F+CpG 群の混合血清では有意に減少した (Figure 16e) 。したがって、eG+F+CpG は、鼻甲介において、G および F 特異的抗体の両方が相加的に感染防御に寄与することが示された。



**Figure 16. The protective effect of eG+F vaccine against RSV challenge**

(a, b) The endpoint titers of (a) mG- or (b) F-specific total IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b in plasma were evaluated using ELISA, 7 days after second immunization with eG, F protein, or eG+F+CpG ODN. (c, d) Mice were challenged intranasally with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV 10

days after the second immunization. At 5 days post-infection, (c) the lungs and (d) nasal turbinates were collected, and viral loads were determined using real-time RT-PCR for the mRNA levels of RSV nucleoprotein. (e) Mixture of  $1.0 \times 10^5$  PFU RSV and 4-fold diluted serum from PBS-treated control mice or eG- or F-immunized mice was administered intranasally into naive mice. At 5 days post-infection, the right lungs were excised, and viral loads were determined using real-time RT-PCR for the mRNA levels of RSV nucleoprotein. (a-e) Each experiment was performed (a-d) three times or (e) twice. (a-d)  $n = 5$  per group. (e)  $n = 4-5$  per group. Data are presented as (a, b) the mean  $\pm$  SD or (c-e) the median. (a-e) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  as indicated using Tukey's test.



**Figure 17. Analysis of infiltrating cells into the lungs after RSV challenge in mice vaccinated with eG, F, or eG+F.**

Mice immunized with eG, F, or eG+F were challenged intranasally with  $10^5$  PFU of RSV 10 days after the second immunization. Number of infiltrating cells into the left lung 5 days post challenge. Each experiment was performed twice.  $n = 4$  per group. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  as indicated using Tukey's test.

**Table 3. Comparison of the efficacy and adverse reactions in mG or eG vaccines**

<b>mG vaccine</b>	<b>mG alone</b>	<b>+Alum</b>	<b>+CpG</b>	<b>+AddaVax</b>
<b>Antibody</b> <sup>*1</sup>	-	-	-	+
<b>T cell</b> <sup>*2</sup> Th1	-	-	++	-
Th2	++	+	-	+
<b>Protection</b> <sup>*3</sup>	+	+	-	++
<b>Lung inflammation</b> <sup>*4</sup>	++	++	-	++

<b>eG vaccine</b>	<b>eG alone</b>	<b>+Alum</b>	<b>+CpG</b>	<b>+AddaVax</b>
<b>Antibody</b> <sup>*1</sup>	+	++	++	++
<b>T cell</b> <sup>*2</sup> Th1	-	-	++	-
Th2	+	+	-	-
<b>Protection</b> <sup>*3</sup>	+	++	++	++
<b>Lung inflammation</b> <sup>*4</sup>	-	-	-	+

<sup>\*1</sup>Relative antibody levels were scored on a three-point scale based on the plasma levels of G-specific total IgG: -: not detected, +: moderate levels, ++: high levels. <sup>\*2</sup>The relative degree of T cell responses was scored on a three-point scale based on the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells producing Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ ) or Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13): -: not induced, +: moderately induced, ++: highly induced. <sup>\*3</sup>Relative protection against RSV challenge was scored on a three-point scale based on lung viral load: -: little or no protection, +: moderate protection, ++: superior protection. <sup>\*4</sup>Relative lung inflammation was scored on a three-point scale based on lung weight and lung infiltrating cell levels: -: little or no inflammation, +: moderate inflammation, ++: severe inflammation.

## 【考察】

本節の研究結果を Table 3 にまとめた。本節では、eG ワクチンが、アジュバントの有無にかかわらず、mG ワクチンと比較して、G 特異的抗体を誘導しやすい一方で、Th2 応答および RSV 感染後の副反応を誘導しにくいことが示された (Table 3)。また、第一節の結果より、G 蛋白質ワクチンの副反応は Th2 細胞の誘導と相関する。本節でも、mG および eG ワクチンの両方において、Alum および AddaVax の添加は Th2 細胞を誘導し、副反応を増強する傾向にあったものの、CpG ODN の添加は Th1 細胞を誘導し、副反応を誘発しなかった (Table 3)。中でも、eG+CpG は、G 特異的抗体および Th1 細胞の両方を強力に誘導し、気道炎症を誘発せずに RSV 感染を顕著に防御可能であることが明らかとなった (Table 3)。さらに、eG+F+CpG の混合ワクチンは、eG+CpG および F+CpG と比較して URT 感染をより防御可能であることが示された。以上の結果は、eG が RSV ワクチンの抗原として有用である可能性を示しており、CpG ODN のような Th1 型アジュバントを添加することで有効性・安全性・有用性をさらに向上し得ることが明らかとなった。

eG ワクチンは mG ワクチンよりも G 特異的抗体を誘導しやすい一方で、Th2 応答を誘導しにくい傾向であった。本結果は、oil-in-water 型ナノエマルジョンである Emulsigen を用いて mG と eG のワクチン効果を比較した過去の報告と類似している<sup>26,44</sup>。eG と比較して、mG が抗体誘導能に乏しく、Th2 細胞を誘導する原因として、mG が大量の O 結合型糖鎖によって修飾されていることが考えられる。過去に、*in vitro* において、糖鎖修飾された可溶性 G 蛋白質が、糖鎖認識受容体である DC-SIGN および L-SIGN への結合を介して、ヒトの樹状細胞の活性化を阻害することが報告されている<sup>52</sup>。また、DC-SIGN へのリガンドの結合は Th2 応答を促進することが示唆されている<sup>53-55</sup>。したがって、mG の糖鎖は、抗体の誘導を阻害する、および Th2 応答を促進する可能性がある。また、他の原因として、翻訳後修飾やフォールディングなどによる mG と eG の立体構造の違いが免疫応答に影響を及ぼすことが推察される。G 蛋白質は CX3CR1 やヘパラン硫酸と結合することが知られている<sup>20</sup>。そのため、mG および eG は、立体構造の違いによって、CX3CR1 およびヘパラン硫酸との結合様式が異なり、体内動態や細胞遊走活性などが変化することで、その後の抗体産生や T 細胞応答に影響を与える可能性がある。したがって、今後、G 蛋白質ワクチンの更なる有効性および安全性の向上に向けて、mG および eG の立体構造および糖鎖がどのように免疫抑制や T 細胞分化に関与しているかについて詳細な解析が必要である。

mG および eG ワクチンにおける G 特異的抗体の産生量と脾臓中の T 細胞応答は相関しなかった。特に、eG ワクチンでは mG ワクチンと比較して抗体量が顕著に増加したにも関

ならず、脾臓中の T 細胞応答はほとんど誘導されていなかった。一般的に、抗体反応には濾胞性ヘルパーT (T follicular helper, Tfh) 細胞を介した胚中心における B 細胞の活性化およびクラススイッチが重要である<sup>56</sup>。しかし、本研究では Tfh 細胞のような詳細な T 細胞サブセットの応答を評価できていないため、Tfh 細胞の応答は本研究で示した T 細胞応答とは異なる可能性がある。上述したように、mG と eG では糖鎖あるいは立体構造の違いにより体内動態や細胞遊走活性が異なると考えられるため、両者は胚中心への移行性や Tfh 細胞の誘導能も異なると推察される。

eG ワクチンによって誘導された抗体は RSV 感染を防御可能であることが示された。しかし、感染防御が中和抗体あるいは非中和抗体のどちらに依存しているかは明らかにできていない。G 蛋白質の central conserved domain (CCD) に対する抗体は、*in vitro* で中和活性を有する<sup>18,19,21,57</sup>。一方、CCD 以外の領域に対する抗体は、中和活性を有さないものの、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) や抗体依存性細胞貪食 (ADCP) など、非中和的にウイルス排除に寄与する<sup>58</sup>。過去の報告では、哺乳類細胞を用いて作製した G 蛋白質ワクチンによって誘導された抗体のほとんどが CCD に対する抗体であった一方で、大腸菌を用いて作製した G 蛋白質ワクチンは、CCD に対する抗体および CCD 以外の領域に対する抗体の両方を顕著に誘導し得ることが示されている<sup>26</sup>。したがって、eG ワクチンでは、中和抗体と非中和抗体の両方が RSV の感染防御に寄与していると考えられる。また、eG+CpG は G 特異的 IgG2 を強力に誘導した。IgG2 はマウスにおいて高い ADCC 活性を示すことから<sup>59,60</sup>、eG+CpG は非中和抗体による感染防御により優れている可能性がある。

CpG ODN は TLR9 への結合を介して Tumor Necrosis Factor (TNF)  $-\alpha$ 、IL-6、IL-12 等の炎症性サイトカインを誘導することが知られている。マウスでは CpG ODN の投与量依存的に脾腫を誘導することが報告されている<sup>61</sup>。本研究では初期検討において、mG に異なる量の CpG ODN 添加してマウスにワクチンした結果、50  $\mu$ g の CpG ODN の添加は非ワクチン群と比較して脾腫を誘導したものの、本研究で採用した 10  $\mu$ g の CpG ODN の添加では脾腫が誘導されなかった。したがって、CpG ODN の過剰接種は脾腫を誘導する一方で、投与量を最適化することで脾腫を誘導せずにワクチンの有効性を向上させることが可能であると考えられる。

mG+CpG 以外の mG ワクチンは、抗体価が低いにもかかわらず、肺での RSV 感染を防御した。一方で、これらのワクチン接種マウスでは、いずれも RSV 感染後に肺への好酸球浸潤が確認された。したがって、第一節の結果にも鑑みると、これらの mG ワクチンでは、抗体以外にも、好酸球がウイルス排除に寄与している可能性がある。

RSV 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞は RSV 感染を防御することが知られている<sup>62</sup>。一般的に、CpG ODN は、抗原と共にマウスに投与した際、抗原特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導することが報告されており<sup>63</sup>、本研究結果からも、mG+CpG および eG+CpG は同程度の G 特異的 IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導した。しかし、eG+CpG は肺における RSV 感染を防御した一方で、mG+CpG は感染防御能をほとんど有していなかった。したがって、eG+CpG ワクチンによって誘導された G 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、RSV の感染防御にほとんど寄与していないと考えられる。

eG+F+CpG ワクチンは、eG+CpG および F+CpG ワクチンと比較して、URT 感染を顕著に防御可能であることが示された。現行の F 蛋白質ワクチンは RSV の LRT 感染による重症下気道炎の予防に有効なものの、URT 感染を主とする RSV 感染自体の防御効果の向上が望まれている<sup>7,16</sup>。そのため、本研究結果は、eG+F+CpG ワクチンが現行の F 蛋白質ワクチンの URT 感染に対する予防効果を強化し得ることを示した。また、近年の SARS-CoV-2 のパンデミックの事例に鑑みても、ワクチンが重症化予防に対して十分に効果を発揮したものの、URT 感染を介した感染伝播の抑制には不十分であった。対して、本ワクチンは、URT における感染防御に優れることから、RSV の感染伝播も抑制することが大いに期待される。一方で、eG+F+CpG ワクチンにおいて、eG+CpG および F+CpG ワクチンと比較して、LRT ではなく URT で感染防御効果が向上した原因として、RSV の感染様式が URT と LRT で異なっている可能性が考えられた。これまで、URT および LRT における RSV の感染様式の差異や、CX3CR1 や TLR4、ヌクレオリンなどの G 蛋白質および F 蛋白質の結合受容体の発現分布の差異はほとんど明らかになっていない。しかし、本研究結果より、eG+F+CpG ワクチンによる URT の感染防御は抗体依存的であり、G 特異的抗体および F 特異的抗体の両方が感染防御に寄与することが示された。したがって、URT では、G 蛋白質および F 蛋白質の両方の結合受容体が発現しており、それぞれの蛋白質の結合受容体が RSV 感染に重要であることが示唆される。一方で、LRT では、eG+F+CpG ワクチンは F+CpG ワクチンと比較して感染防御効果が向上しなかったことから、G 蛋白質よりも F 蛋白質の結合受容体が高発現しており、RSV はほとんど F 蛋白質の結合受容体に依存して感染している可能性がある。したがって、本結果は、G 蛋白質ワクチンが、F 蛋白質ワクチンの URT における感染防御効果を向上し得る、有用なワクチン候補であることを示したとともに、URT および LRT における RSV の感染機構の解明にもつながるものと期待される。

結論として、eG+CpG ワクチンは、G 特異的抗体および Th1 細胞を誘導し、気道炎症を誘発せずに RSV 感染を防御することが示された。したがって、CpG ODN のような Th1 型

アジュバントの使用は、G 蛋白質ワクチンの副反応を回避する有効な戦略であることが支持された。一方で、本研究で得られた知見にはいくつかの制約がある。ヒトではマウスと比較して CpG ODN の受容体である TLR9 を発現する免疫細胞の種類が少ないことが知られている<sup>64</sup>。そのため、本研究ではマウスを用いて評価していることから、eG+CpG ワクチンの有効性および安全性を過大評価している可能性がある<sup>64</sup>。したがって、今後、MPLA のような他の Th1 型アジュバントを添加した eG ワクチンの有用性についても評価していく必要があると考えられる。また、本研究ではワクチン対象としてナイーブな成体マウスを用いた。しかし、実際の RSV ワクチンの接種対象であるヒトは過去に感染歴を有している。したがって、今後、RSV を事前感染させたマウスを用いても、同様の有効性および安全性が取得できるかについて検討する必要があるだろう。最後に、本研究結果は、適切な抗原とアジュバントを用いることで、G 蛋白質ワクチンの問題点である副反応を誘発することなく、有効性を増強可能であることを示しており、G 蛋白質ワクチンの臨床応用に向けた有益な情報になり得ると考えられる。

### 第三節 F 蛋白質ワクチンの URT および LRT における 感染防御機構の解明

緒論で述べた通り、現行の F 蛋白質ワクチンのうち、アジュバントを添加していない F 蛋白質単独ワクチンは、RSV の LRT 感染による重症化に対して高い予防効果を発揮するものの、感染予防効果が高齢者で約 60%、生後 180 日未満の乳児で 40%未満と未だ改善の余地がある<sup>7,16</sup>。したがって、F 蛋白質ワクチンは RSV の初感染部位である URT における感染防御効果の向上が望まれている。しかし、RSV の URT 感染に対して、F 蛋白質ワクチンによって誘導された抗体や T 細胞が、感染防御にどの程度寄与しているのかはほとんど明らかになっていない。

そこで本節では、マウスを用いて F 蛋白質ワクチンによって誘導された抗体や T 細胞を解析し、それらが URT および LRT の感染防御効果に及ぼす影響を評価した。

#### 【実験材料と方法】

##### 実験動物

6-7 週齢の BALB/c マウス（雌）を日本エスエルシー株式会社より購入した。マウスは 12 時間の明暗サイクル（点灯：8 時、消灯：20 時）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（プロトコル番号：BIKEN-AP-R01-15-2、BIKEN-AP-R02-14-5）。

##### 組換え F 蛋白質の作製と精製

第二節の実験材料と方法に準じた。

##### RSV の培養と濃縮

第一節の実験材料と方法に準じた。

##### マウスへのワクチンおよび RSV 感染

6 週齢の BALB/c マウス（雌）の尾根皮下に、0 日目および 21 日目に、F 蛋白質（1  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ）を単独あるいは CpG ODN K3（5'-atcgactctcgagcgttctc-3'）（GeneDesign）（10

μg/mouse) とともに投与した。投与試料は PBS (-) で調製し、BD ロードーズ™ インスリン皮下投与用針付注射筒を用いて 50 μL/mouse で投与した。最終免疫から 7 日後に、頬静脈より血清を回収、または頸椎脱臼によりマウスを安楽死させた後、脾臓を回収した。31 日目に、麻酔下において  $1.0 \times 10^5$  PFU/30 μL PBS の RSV を片鼻 15 μL でマウスに経鼻投与することで感染させ、感染 5 日後 (36 日目) に麻酔下で下大静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、肺 (気道を除く) を回収した。また、上顎および鼻の先端を切除し、ピンセットを用いて鼻甲介内の鼻腔組織を掻き出し回収した。

### **ELISA を用いた血漿中抗体価の評価**

第二節の実験材料と方法に準じた。

### **血清中抗体によるウイルス中和活性の評価**

マウスの頬静脈から採血した血液を室温で 2 時間放置した後、 $3,000 \times g$ 、4 °C で 20 分間遠心し、上清の血清を回収した。血清は 56 °C で 30 分間インキュベートすることで非働化した後、-30 °C で保管した。-1 日目に HEp-2 細胞を 24 well plate (Thermo Fisher Scientific) に  $2 \times 10^5$  cells/well で播種し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で一晩培養した。0 日目に、50-100 PFU/well の RSV と段階希釈した非働化済み血清を混合し、37 °C で 1 時間インキュベートした。その後、RSV と血清の混合液をプレートに添加し、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 2 時間インキュベートした。その後、上清を除去し、0.6% カルボキシメチルセルロースナトリウムを添加した DMEM 培地を 1 mL 加え、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 3 日間培養した。以降は、上記のプラークアッセイの手順にしたがって遂行した。

### **脾臓細胞の再刺激による T 細胞応答の解析**

第一節の実験材料と方法に準じた。

### **RNA 抽出・リアルタイム RT-PCR**

第一節の実験材料と方法に準じた。

### **肺への浸潤細胞の解析**

第一節の実験材料と方法に準じた。

### **CD4<sup>+</sup> T 細胞の除去**

最終免疫から 9 日後 (RSV 感染前日) に、100  $\mu$ g の Anti-mouse CD4 antibody あるいは IgG2b isotype control を 200  $\mu$ L PBS に加え、マウスに腹腔内投与した。CD4<sup>+</sup> T 細胞が除去されたかどうかを確認するために、RSV 感染後 5 日目に、頬静脈から血液を回収し、血中の CD4<sup>+</sup> T 細胞をフローサイトメトリーで計測した。100  $\mu$ L の血液を 96 well U-bottom plate (Violamo) に移し、200  $\mu$ L の ACT lysis buffer を加え、室温で 5 分間インキュベートすることで、溶血処理を行った。その後、400  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、追加で 2 回溶血処理を行い、細胞表面染色を行った。染色用メディウムで、Fixable Viability Dye eFluor 780 および Table 2 (CD4<sup>+</sup> T cell depletion) に示す抗体を希釈し、50  $\mu$ L/well で加えて、暗所、4  $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。200  $\mu$ L の染色用メディウムを加え、800  $\times$  g、4  $^{\circ}$ C で 4 分間遠心し、細胞を洗浄した後、200  $\mu$ L の染色用メディウムに細胞を懸濁し、メッシュに通して、新しい 96 well U-bottom plate (Violamo) に移した。その後、Attune NxT Flow Cytometer を用いてデータを取得し、FlowJo software version 10.9 を用いてデータ解析を行った。

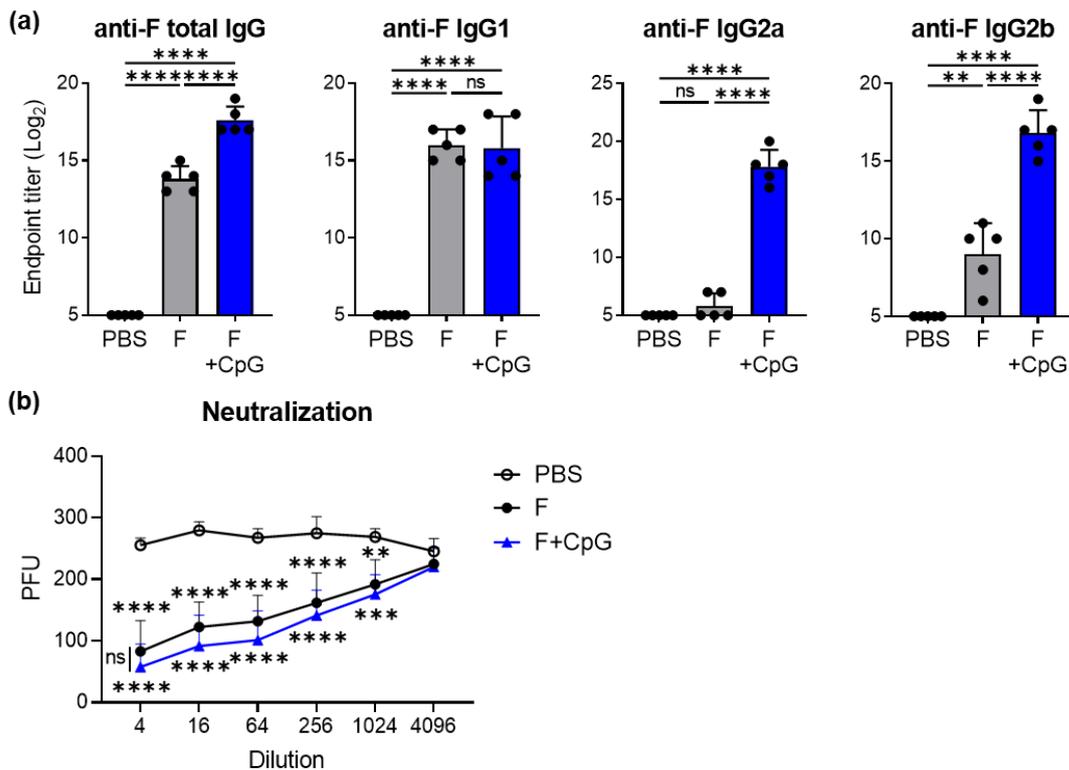
### **統計解析**

第一節の実験材料と方法に準じた。

**【結果】**

**F 単独および F+CpG ワクチンの抗体誘導能の評価**

まず、F 単独および F+CpG ワクチンを 0 日目と 21 日目にマウスに皮下投与し、28 日目の血漿中の F 特異的抗体価を評価した。その結果、F 単独群では、非ワクチン群と比較して、F 特異的 total IgG および IgG1、IgG2b が有意に誘導された (Figure 18a)。また、F+CpG 群では、非ワクチン群と比較して、F 特異的 total IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b のいずれともが有意に誘導された。さらに、F+CpG 群では、F 単独群と比較して、F 特異的 total IgG、IgG2a、IgG2b が有意に増加した一方で、IgG1 は増加が認められなかった (Figure 18a)。次に、ワクチンによって誘導された血清中抗体のウイルス中和活性を評価した (Figure 18b)。その結果、F 単独群または F+CpG 群の血清は、1024 倍希釈以下で有意に中和活性を示した (Figure 18b)。一方で、F+CpG 群の中和活性は F 単独群と比較して高い傾向にあるが、両者で有意な差は認められなかった (Figure 18b)。したがって、F+CpG ワクチンは、F 単独ワクチンと比較して、抗体の中和活性を増強しなかったものの、F 特異的 IgG2 産生を促進した。

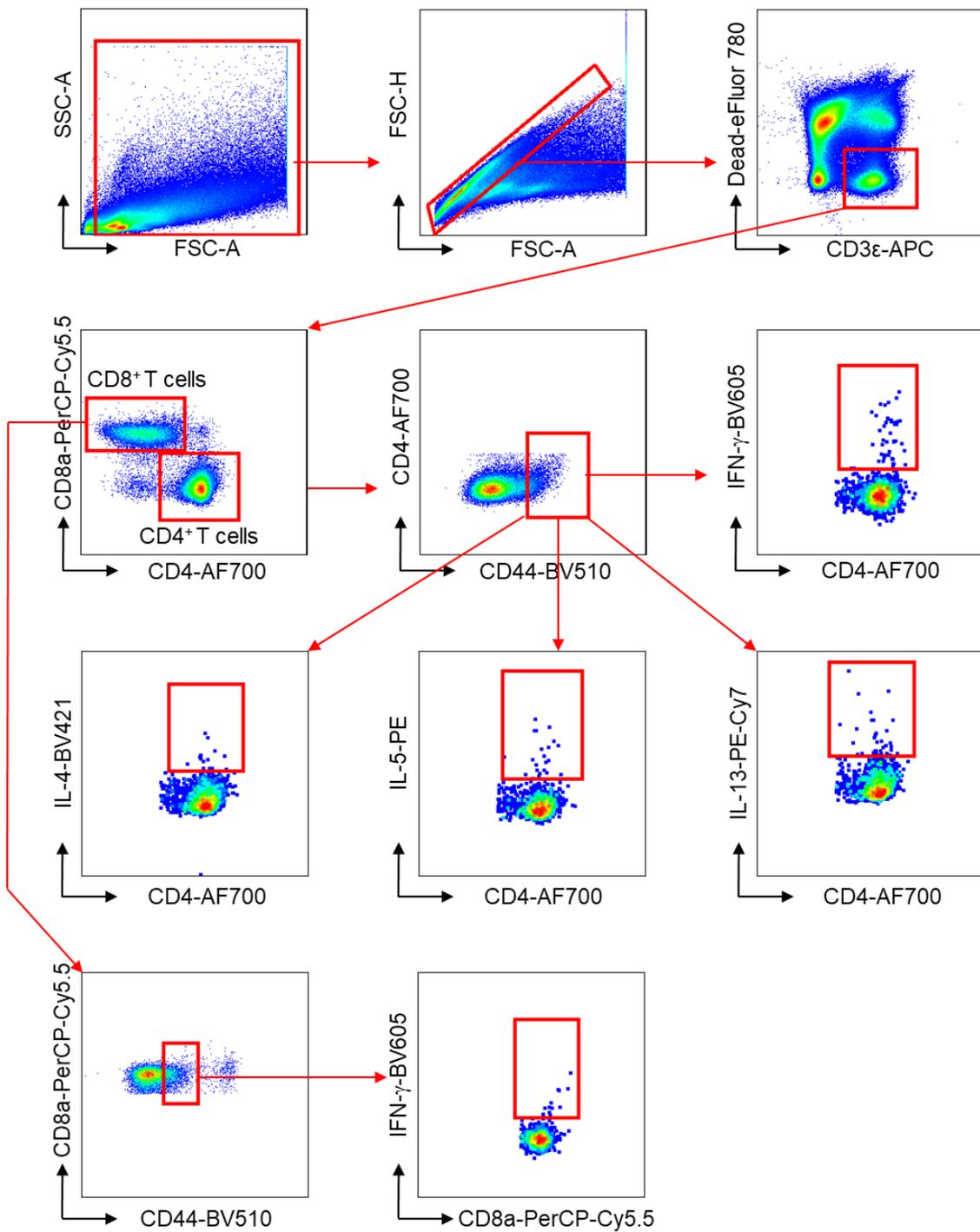


### Figure 18. Antibody responses to F protein vaccines.

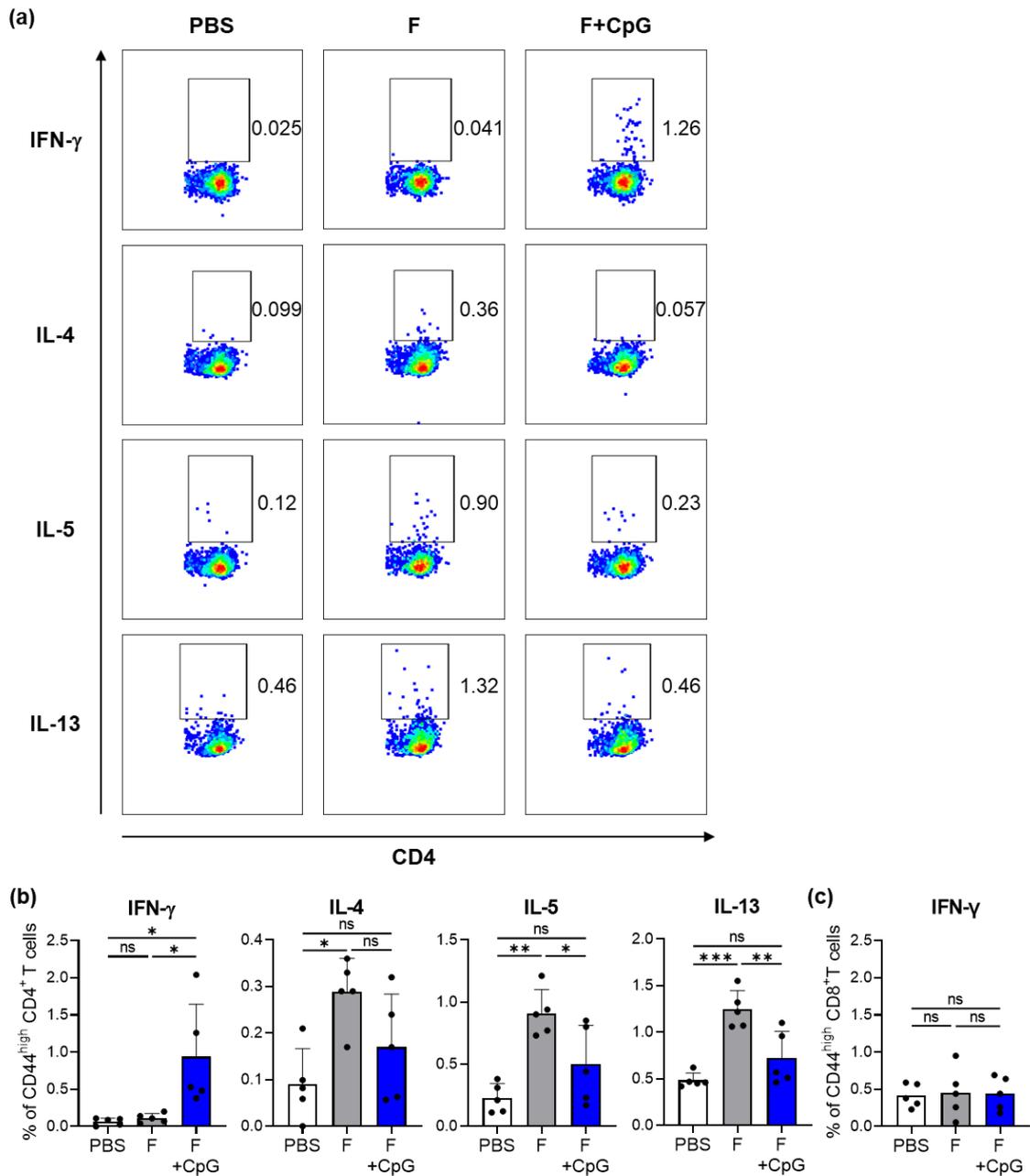
(a, b) Mice were subcutaneously immunized with 1  $\mu$ g F with or without 10  $\mu$ g CpG ODN or PBS as the control on days 0 and 21. Blood was collected 7 days after the second immunization. (a) Endpoint titers of F-specific IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b in plasma were evaluated using ELISA. (b) Neutralizing serum activity was measured in HEp-2 cells. (a, b) Each experiment was performed three times.  $n = 5$  per group. Data are presented as the means  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  as indicated using Tukey's test. ns, not statistically significant.

### F 単独および F+CpG ワクチンの T 細胞誘導能の評価

次に、ワクチン投与後の脾臓細胞を F 蛋白質で再刺激し、T 細胞応答を解析した。T 細胞応答は、Th1 サイトカインとして IFN- $\gamma$ 、または Th2 サイトカインとして IL-4、IL-5、IL-13 を産生する F 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞をそれぞれ Th1 細胞、Th2 細胞として、または IFN- $\gamma$  を産生する F 特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞をフローサイトメトリーで評価した (Figure 19, 20)。その結果、F 単独群は、非ワクチン群と比較して、Th2 細胞を有意に誘導した (Figure 20a, b)。一方で、F+CpG 群では Th2 細胞は非ワクチン群と同程度であり、F 単独群と比較して IL-5 または IL-13 産生 Th2 細胞を有意に減少させた (Figure 20a, b)。また、F+CpG 群では、非ワクチン群および F 単独ワクチン群と比較して、Th1 細胞が強く誘導された (Figure 20a, b)。一方で、IFN- $\gamma$  産生 CD8<sup>+</sup> T 細胞は、F 単独および F+CpG 群の両方で、非ワクチン群と同程度であり、誘導されいないことが確認された (Figure 20c)。したがって、F+CpG ワクチンは Th1 細胞を強く誘導する一方で、Th2 細胞を誘導しないことが示された。



**Figure 19. Gating strategy for cytokine-producing CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the splenocytes of mice vaccinated with F protein vaccines.**

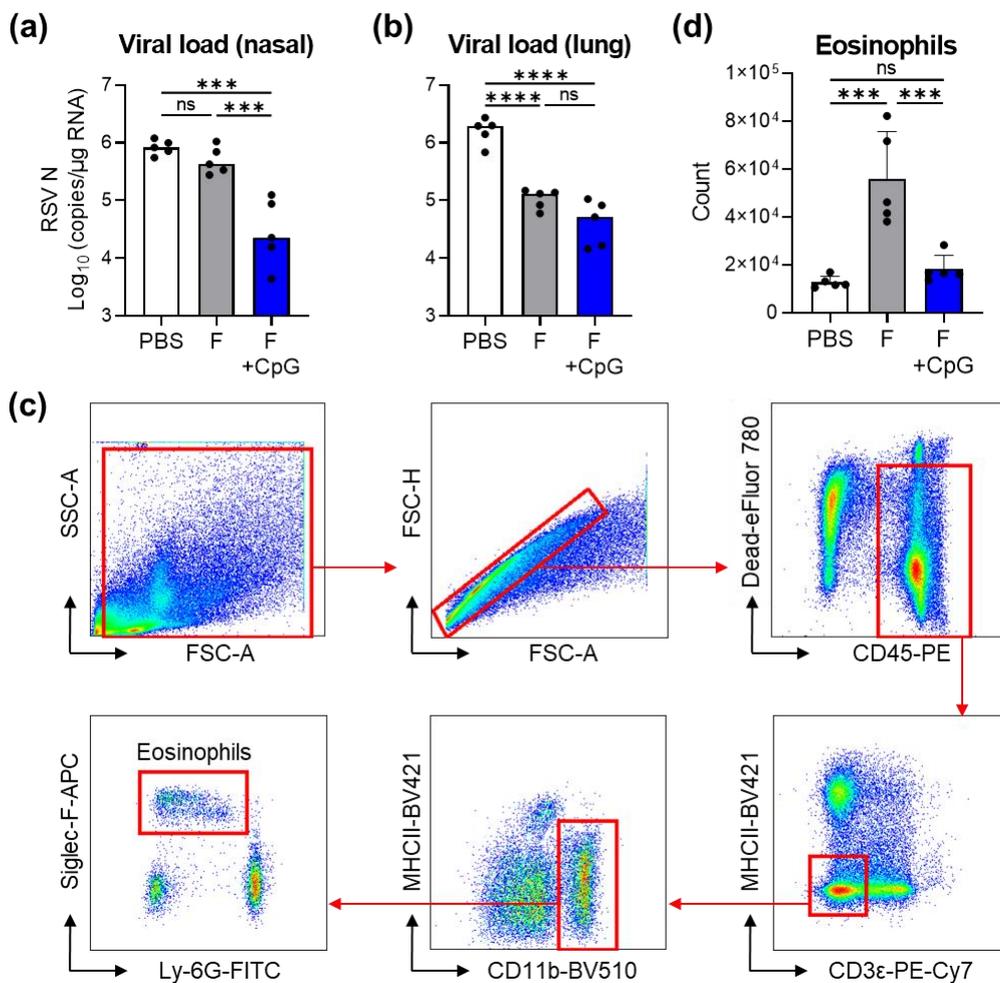


**Figure 20: T cell responses to F protein vaccines**

(a-c) Splenocytes from immunized mice with F protein vaccines were restimulated with F protein. Intracellular cytokine levels were evaluated using flow cytometry. (a) Representative dot plots of cytokine expression in CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. (b) Percentage of CD44<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, or IL-13. (c) Percentage of IFN- $\gamma$ -producing CD44<sup>high</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. (a-c) Each experiment was performed three times. (b, c)  $n = 5$  per group. Data are presented as the means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  as indicated using Tukey's test. ns, not statistically significant.

## F 単独および F+CpG ワクチンの感染防御能の評価

次に、F 蛋白質ワクチンの感染防御効果を評価した。ワクチン接種マウスに RSV を感染させ、感染後 5 日目にリアルタイム RT-PCR を用いて鼻甲介および肺のウイルス量を測定した (Figure 21a, b)。鼻甲介では、非ワクチン群と比較して、F 単独群でウイルス量が減少しなかった一方で、F+CpG 群で有意に減少した (Figure 21a)。また、肺では、F 単独群および F+CpG 群で、非ワクチン群と比較してウイルス量が有意に減少したが、両ワクチン群のウイルス量は同程度であった (Figure 21b)。次に、F 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の肺への好酸球浸潤をフローサイトメトリーで解析した (Figure 21c, d)。その結果、F 単独群では、非ワクチン群と比較して好酸球が有意に増加した (Figure 21d)。一方で、F+CpG 群では、F 単独群と比較して好酸球が有意に減少しており、非ワクチン群と同程度であった (Figure 21d)。したがって、F+CpG ワクチンは、F 単独ワクチンと比較して、肺に好酸球を誘導せず、LRT 感染を同程度に防御し、URT における感染防御効果を顕著に増強した。

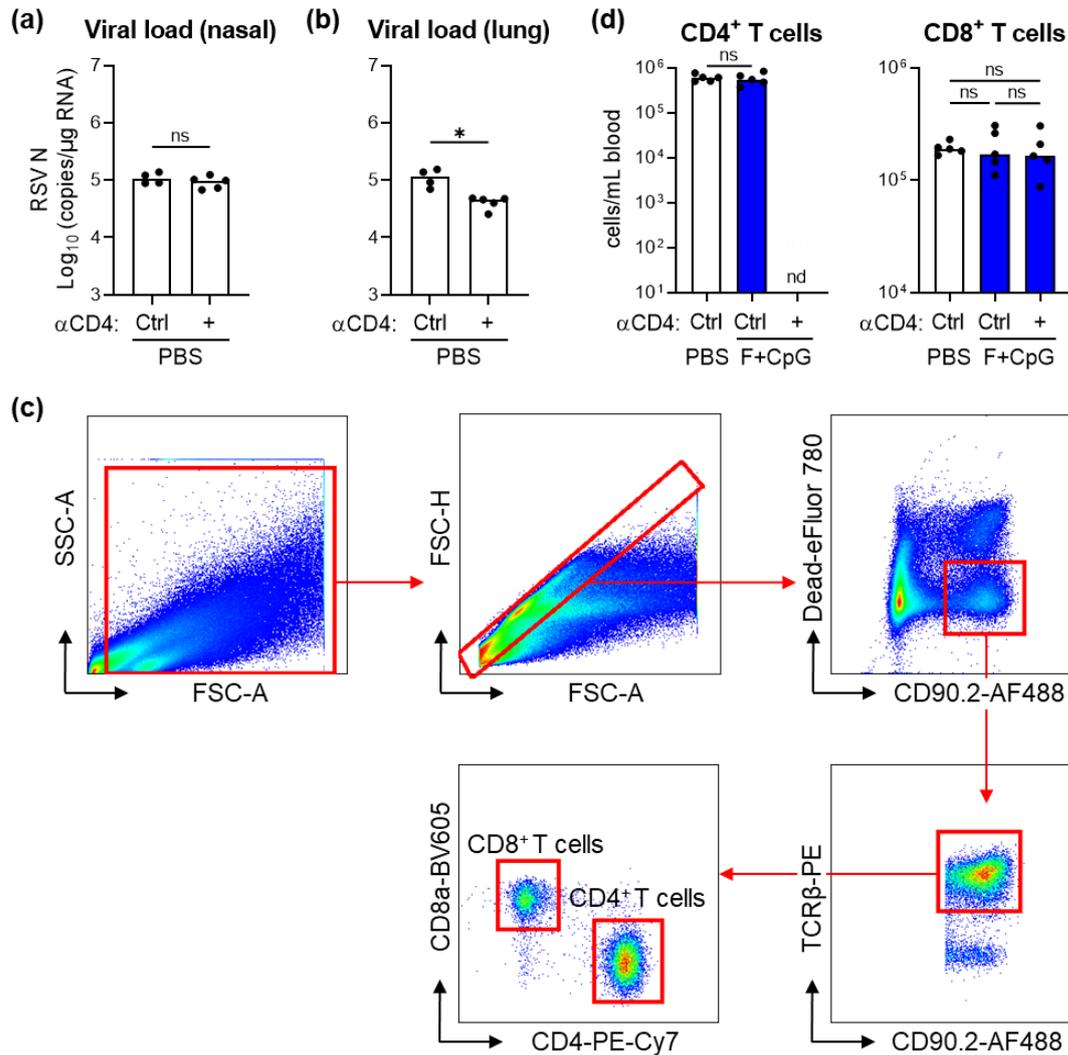


### Figure 21: The protective effect of F protein vaccines following RSV challenge

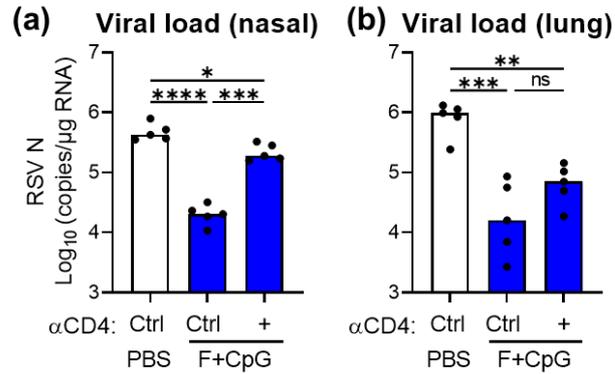
(a-c) Mice immunized with F protein vaccines were intranasally challenged with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV 10 days after the second immunization. Nasal turbinate and lungs were collected 5 days post infection. (a, b) Viral loads in the (a) nasal turbinate and (b) right lung were determined using real-time RT-PCR for mRNA levels of RSV nucleoprotein. (c, d) Flow cytometry analysis of infiltrating eosinophils into the left lungs. (c) Gating strategy for lung-infiltrating eosinophils. (d) Number of eosinophils per left lungs. (a-c) Each experiment was performed three times.  $n = 5$  per group. Data are presented as (a, b) the medians or (c) means  $\pm$  SD. (a-c) \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  as indicated using Tukey's test. ns, not statistically significant.

### F+CpG ワクチンによって誘導された CD4<sup>+</sup> T 細胞の感染防御能の評価

上記の結果より、F+CpG ワクチンは、F 単独ワクチンと比較して、中和抗体価に差がなかった一方で、Th1 細胞を誘導し、URT における感染防御効果が向上したことから、Th1 細胞が URT における感染防御に寄与している可能性が考えられた。そこで、F+CpG によって誘導された CD4<sup>+</sup> T 細胞の URT における感染防御能を評価した。本実験では、ワクチン後のマウスにコントロール抗体あるいは抗 CD4 抗体を投与することで、CD4<sup>+</sup> T 細胞の存在あるいは非存在下で、RSV を感染させ、CD4<sup>+</sup> T 細胞の有無による感染防御効果を比較した。まず、非ワクチン群の抗 CD4 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、鼻甲介のウイルス量は変化せず、肺のウイルス量がわずかに減少することを確認した (Figure 22a-d)。しかし、F+CpG 群の抗 CD4 抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、肺のウイルス量に変化がなかった一方で、鼻甲介のウイルス量が有意に増加した (Figure 23a, b)。したがって、F+CpG ワクチンによって誘導された CD4<sup>+</sup> T 細胞は、URT 感染防御に寄与しない一方で、URT 感染を強力に防御可能であることが示された。



**Figure 22. Analysis of the effect of protection against RSV challenge after CD4<sup>+</sup> T-cell depletion.** (a-d) Mice immunized with PBS or F protein-vaccines were intraperitoneally treated with anti-CD4 antibody or isotype control IgG on day 30 and intranasally challenged with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV on day 31. (a, b) At 5 days post infection, viral loads in (a) nasal turbinate and (b) right lung were determined using real-time RT-PCR for mRNA levels of RSV N. (c) Gating strategy for T cells in the blood from vaccinated mice at 5 days post infection. (d) Number of T cells in the blood 5 days post challenge. (a-d) Each experiment was performed twice. (a, b)  $n = 4-5$  (d)  $n = 5$  per group. (a, b, d) Data are presented as the medians. (a, b) \* $P < 0.05$ , as indicated using Student's t test. (a, b, d) ns, not statistically significant. nd, not detected. Ctrl, isotype control IgG.



**Figure 23. Analysis of the effect of protection against RSV challenge after CD4<sup>+</sup> T-cell depletion.**

(a-d) Mice immunized with PBS or F protein-vaccines were intraperitoneally treated with anti-CD4 antibody or isotype control IgG on day 30 and intranasally challenged with  $1.0 \times 10^5$  PFU of RSV on day 31. (a, b) At 5 days post infection, viral loads in (a) nasal turbinate and (b) right lung were determined using real-time RT-PCR for mRNA levels of RSV N. (c) Gating strategy for T cells in the blood from vaccinated mice at 5 days post infection. (d) Number of T cells in the blood 5 days post challenge. (a-d) Each experiment was performed twice. (a, b)  $n = 4-5$  (d)  $n = 5$  per group. (a, b, d) Data are presented as the medians. (a, b) \* $P < 0.05$ , as indicated using Student's t test. (a, b, d) ns, not statistically significant. nd, not detected. Ctrl, isotype control IgG.

## 【考察】

本研究結果より、F+CpG ワクチンは、F 単独ワクチンと比較して、F 特異的抗体を有意に増加した一方で、中和抗体に変化は認められなかった。この結果は、F 蛋白質に CpG ODN を添加しても中和抗体が増加しないという過去の報告と一致している<sup>65,66</sup>。これらの中和抗体が増加しなかった原因は、CpG ODN が TLR9 を介して B 細胞の増殖と形質細胞への分化を促進する一方で抗体の親和性成熟を阻害するためであると考えられる<sup>67</sup>。したがって、Th1 細胞の誘導に加えて、中和抗体の誘導も促進するためには、MPLA や poly (I: C) などの他の Th1 型アジュバントの併用も検討する必要がある。

F+CpG ワクチンは、F 特異的 Th1 細胞を誘導し、URT において CD4<sup>+</sup> T 細胞依存的に RSV 感染を防御した。一方で、F 単独ワクチンは、F 特異的 Th2 細胞を誘導したものの、URT ではほとんど感染防御効果が認められなかった。そのため、F+CpG ワクチンによる URT 感染防御は Th1 細胞依存的である可能性が高い。また、その可能性を裏付ける事象として、過去の報告より、RSV の自然感染や完全フロイントアジュバント (CFA) を添加した組換え G 蛋白質ワクチンにおいて、IFN- $\gamma$  が URT 感染防御に寄与することが示唆されている<sup>68,69</sup>。一方で、Th1 細胞による URT の感染防御機構は、IFN- $\gamma$  が感染細胞や貪食細胞に作用して抗ウイルス応答を促進する直接的経路と<sup>70</sup>、IFN- $\gamma$  が ADCC などの抗体を介したウイルス排除を促進する間接的経路が推察される<sup>71</sup>。特に、間接的経路では、マウスにおいて IgG2 は高い ADCC 活性を有するため<sup>72</sup>、F 特異的 IgG2 を強力に誘導し得る F+CpG ワクチンは、ADCC を介した感染防御に優れる可能性がある。また、IFN- $\gamma$  が血管透過性を亢進させる可能性があり<sup>73</sup>、URT では通常鼻腔組織への血中抗体の漏出が少ない一方で、IFN- $\gamma$  によって血中抗体の鼻腔組織への分泌量が増加していることも考えられる。したがって、今後、これらの Th1 細胞による URT の感染防御機構を明らかにすることで、RSV ワクチンだけでなく他の呼吸器感染症ワクチンにおいても URT の感染防御における Th1 細胞の重要性がさらに周知され、感染防御効果の高いワクチンの開発につながると考えている。

LRT では、F 単独および F+CpG ワクチンの感染防御効果は同程度だったうえ、両ワクチンともに CD4<sup>+</sup> T 細胞非依存的に感染防御した。一方で、F 単独および F+CpG ワクチンによって誘導された抗体の中和活性も同程度だったことから、LRT における感染防御は中和抗体の量に依存することが示唆された。したがって、本実験結果より、URT と LRT では、感染防御機構が異なっており、URT では主に CD4<sup>+</sup> T 細胞が、LRT では主に中和抗体が感染防御に寄与している可能性がある。その理由として、F 単独および F+CpG ワクチンともに、CD4<sup>+</sup> T 細胞の非存在下では URT でほとんど感染防御しなかったことから示される

ように、URT では血中抗体の鼻腔組織中への分泌量が少ないため、多くの RSV は細胞に感染した後、CD4<sup>+</sup> T 細胞を起因とする細胞性免疫によって排除されると考えられる。一方で、LRT では、血中抗体の管腔側への分泌量が多いことから、ほとんどの RSV が中和抗体によって感染を阻害されるため、その後の細胞性免疫が感染防御にほとんど寄与していないと推察される。しかし、ワクチンによる長期的な感染防御においては、血中抗体が減少していくにつれて、LRT で、中和抗体による感染防御が減弱し、細胞性免疫による感染防御が促進される可能性がある。

F+CpG ワクチンは F 単独ワクチンと比較して RSV 感染後に肺への好酸球浸潤を誘導しなかった。前節より、F 蛋白質ワクチンにおいて RSV 感染後に好酸球が気道炎症を誘発するかどうかは定かではないものの、好酸球を誘導せずに感染防御可能であることはより安全性を担保すると考えられる。一方で、F 単独ワクチン接種マウスでは、非ワクチン群と比較して、RSV 感染後に肺への好酸球浸潤が増加したものの、予備知見より、肺重量の増加は認められなかった。また、現状では臨床試験において、F 単独ワクチンによる RSV 感染後の肺への好酸球浸潤は評価されていない<sup>74</sup>。したがって、本研究で F 単独ワクチンにより誘導された好酸球は、ヒトにおいて VAED を誘発するかどうかは不明である一方で、F+CpG ワクチンは安全性にも優れる可能性がある。

結論として、F+CpG ワクチンによって誘導された CD4<sup>+</sup> T 細胞は、マウスの URT における感染防御効果を顕著に増強可能であることが証明された。本研究結果は、URT の感染防御における CD4<sup>+</sup> T 細胞の重要性を顕示するものであり、F 蛋白質ワクチンの課題克服だけでなく、RSV に対する他の新規ワクチン開発にも有益な知見をもたらすと考えられる。

## 結論

本研究では、G 蛋白質ワクチンの副反応の解析と機序解明、および有効かつ安全な新規 G 蛋白質ワクチンの開発、F 蛋白質ワクチンの URT および LRT における感染防御機構の解明を図り、以下の結論を得た。

1. G 蛋白質ワクチンによる RSV 感染後の肺重量の増加は、好酸球や好中球ではなく、Th2 細胞が原因である。
2. G 蛋白質ワクチンにおいて、Alum および AddaVax の添加は Th2 細胞や副反応を誘導する一方で、CpG 核酸の添加は Th1 細胞の誘導を促進し副反応を低減し得る。
3. eG+CpG ワクチンは、Th2 細胞および副反応を誘導することなく、G 特異的抗体および Th1 細胞を強力に誘導し、LRT における RSV 感染を防御可能である。
4. eG+F+CpG 混合ワクチンは、eG+CpG あるいは F+CpG ワクチンと比較して、URT における RSV 感染に対して優れた防御効果を発揮する。
5. F+CpG により誘導された CD4<sup>+</sup>T 細胞は LRT における感染の防御にほとんど寄与しない一方で、URT での感染を強力に防御し得る。

以上、本結果は、RSV ワクチンにおいて G 蛋白質ワクチンの有用性および URT 感染を標的としたワクチン開発における指針を示す重要な知見であると考えている。

## 謝辞

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、衷心より厚く御礼申し上げます。

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、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 清水太郎先生には、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。

加えて、本研究に際し、様々な専門的技術指導と共に、温かいサポートをいただきました東京医科大学 微生物学分野 准教授 柴田岳彦先生、国立感染症研究所 感染病理部 鈴木忠樹先生、兵庫医科大学 免疫学講座 教授 黒田悦史先生、兵庫医科大学 免疫学講座 准教授 安田好文先生、京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 講師 高山和雄先生、近畿大学 化学療法学研究室 准教授 松尾一彦先生に心より御礼申し上げます。

本稿を纏めるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 ヘルス・メディカル微生物研究センター 國澤純先生、大阪大学大学院薬学研究科 教授 齊藤達哉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、昼夜共に汗を流しました、一般財団法人 阪大微生物病研究会 山本真也様に厚く御礼申し上げます。

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と共に、研究生活を送るにあたり、終始共に励まし合い、支え合った民谷繁幸博士、河合惇志博士、松田鉄平博士、千福航太学士、橋本壮一郎様、平田陽暉様をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科 創薬ナノデザイン学分野の大学院生、学生の皆様、徳島大学大学院薬科学教育部 薬物動態制御学分野 川口桂乃学士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、日本学生支援機構 (JASSO)、次世代研究者挑戦的研究プログラム、また、常に温かく見守り支えてくれた家族に心から感謝いたします。

## 引用文献

- 1 Battles, M. B. & McLellan, J. S. Respiratory syncytial virus entry and how to block it. *Nat Rev Microbiol* **17**, 233-245, doi:10.1038/s41579-019-0149-x (2019).
- 2 Langedijk, A. C. & Bont, L. J. Respiratory syncytial virus infection and novel interventions. *Nat Rev Microbiol*, doi:10.1038/s41579-023-00919-w (2023).
- 3 Nam, H. H. & Ison, M. G. Respiratory syncytial virus infection in adults. *BMJ* **366**, l5021, doi:10.1136/bmj.l5021 (2019).
- 4 Hijano, D. R. *et al.* Role of Type I Interferon (IFN) in the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Immune Response and Disease Severity. *Front Immunol* **10**, 566, doi:10.3389/fimmu.2019.00566 (2019).
- 5 Li, Y. *et al.* Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in children younger than 5 years in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 2047-2064, doi:10.1016/S0140-6736(22)00478-0 (2022).
- 6 Mazur, N. I. *et al.* Respiratory syncytial virus prevention within reach: the vaccine and monoclonal antibody landscape. *Lancet Infect Dis* **23**, e2-e21, doi:10.1016/S1473-3099(22)00291-2 (2023).
- 7 Walsh, E. E. *et al.* Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* **388**, 1465-1477, doi:10.1056/NEJMoa2213836 (2023).
- 8 Drysdale, S. B. *et al.* Priorities for developing respiratory syncytial virus vaccines in different target populations. *Sci Transl Med* **12**, doi:10.1126/scitranslmed.aax2466 (2020).
- 9 Bigay, J., Le Grand, R., Martinon, F. & Maisonnasse, P. Vaccine-associated enhanced disease in humans and animal models: Lessons and challenges for vaccine development. *Front Microbiol* **13**, 932408, doi:10.3389/fmicb.2022.932408 (2022).
- 10 Kim, H. W. *et al.* Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* **89**, 422-434, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120955 (1969).
- 11 Ruckwardt, T. J. The road to approved vaccines for respiratory syncytial virus.

- NPJ Vaccines* **8**, 138, doi:10.1038/s41541-023-00734-7 (2023).
- 12 Polack, F. P. *et al.* Fatal enhanced respiratory syncytial virus disease in toddlers. *Sci Transl Med* **13**, eabj7843, doi:10.1126/scitranslmed.abj7843 (2021).
- 13 Waris, M. E., Tsou, C., Erdman, D. D., Zaki, S. R. & Anderson, L. J. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol* **70**, 2852-2860, doi:10.1128/JVI.70.5.2852-2860.1996 (1996).
- 14 Chang, L. A. *et al.* A prefusion-stabilized RSV F subunit vaccine elicits B cell responses with greater breadth and potency than a postfusion F vaccine. *Sci Transl Med* **14**, eade0424, doi:10.1126/scitranslmed.ade0424 (2022).
- 15 McLellan, J. S. *et al.* Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science* **342**, 592-598, doi:10.1126/science.1243283 (2013).
- 16 Kampmann, B. *et al.* Bivalent Prefusion F Vaccine in Pregnancy to Prevent RSV Illness in Infants. *N Engl J Med* **388**, 1451-1464, doi:10.1056/NEJMoa2216480 (2023).
- 17 Papi, A. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Prefusion F Protein Vaccine in Older Adults. *N Engl J Med* **388**, 595-608, doi:10.1056/NEJMoa2209604 (2023).
- 18 Johnson, S. M. *et al.* Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. *PLoS Pathog* **11**, e1005318, doi:10.1371/journal.ppat.1005318 (2015).
- 19 Fedechkin, S. O., George, N. L., Wolff, J. T., Kauvar, L. M. & DuBois, R. M. Structures of respiratory syncytial virus G antigen bound to broadly neutralizing antibodies. *Sci Immunol* **3**, doi:10.1126/sciimmunol.aar3534 (2018).
- 20 Anderson, L. J., Jadhao, S. J., Paden, C. R. & Tong, S. Functional Features of the Respiratory Syncytial Virus G Protein. *Viruses* **13**, doi:10.3390/v13071214 (2021).
- 21 Rainho-Tomko, J. N. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of RSV G central conserved domain vaccine with a prefusion nanoparticle. *NPJ Vaccines* **7**, 74, doi:10.1038/s41541-022-00487-9 (2022).
- 22 Hancock, G. E., Heers, K. M., Pryharski, K. S., Smith, J. D. & Tiberio, L. Adjuvants recognized by toll-like receptors inhibit the induction of polarized type 2 T cell

- responses by natural attachment (G) protein of respiratory syncytial virus. *Vaccine* **21**, 4348-4358, doi:10.1016/s0264-410x(03)00482-1 (2003).
- 23 Su, C. *et al.* RSV pre-fusion F protein enhances the G protein antibody and anti-infectious responses. *NPJ Vaccines* **7**, 168, doi:10.1038/s41541-022-00591-w (2022).
- 24 Adams, O. *et al.* Palivizumab-resistant human respiratory syncytial virus infection in infancy. *Clin Infect Dis* **51**, 185-188, doi:10.1086/653534 (2010).
- 25 Hancock, G. E. *et al.* Generation of atypical pulmonary inflammatory responses in BALB/c mice after immunization with the native attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* **70**, 7783-7791, doi:10.1128/JVI.70.11.7783-7791.1996 (1996).
- 26 Fuentes, S., Coyle, E. M., Golding, H. & Khurana, S. Nonglycosylated G-Protein Vaccine Protects against Homologous and Heterologous Respiratory Syncytial Virus (RSV) Challenge, while Glycosylated G Enhances RSV Lung Pathology and Cytokine Levels. *J Virol* **89**, 8193-8205, doi:10.1128/JVI.00133-15 (2015).
- 27 Sparer, T. E. *et al.* Eliminating a region of respiratory syncytial virus attachment protein allows induction of protective immunity without vaccine-enhanced lung eosinophilia. *J Exp Med* **187**, 1921-1926, doi:10.1084/jem.187.11.1921 (1998).
- 28 Beretta, E. *et al.* Pulmonary Interstitial Matrix and Lung Fluid Balance From Normal to the Acutely Injured Lung. *Front Physiol* **12**, 781874, doi:10.3389/fphys.2021.781874 (2021).
- 29 Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R. K. & Kitani, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* **12**, 99-106, doi:10.1038/nm1332 (2006).
- 30 Strobel, B. *et al.* Modeling Pulmonary Disease Pathways Using Recombinant Adeno-Associated Virus 6.2. *Am J Respir Cell Mol Biol* **53**, 291-302, doi:10.1165/rcmb.2014-0338MA (2015).
- 31 Gieseck, R. L., 3rd, Wilson, M. S. & Wynn, T. A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol* **18**, 62-76, doi:10.1038/nri.2017.90 (2018).
- 32 Aghourian, M. N., Lemarie, C. A., Bertin, F. R. & Blostein, M. D. Prostaglandin E synthase is upregulated by Gas6 during cancer-induced venous thrombosis. *Blood* **127**, 769-777, doi:10.1182/blood-2015-02-628867 (2016).
- 33 Nepal, S. *et al.* STAT6 induces expression of Gas6 in macrophages to clear

- apoptotic neutrophils and resolve inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 16513-16518, doi:10.1073/pnas.1821601116 (2019).
- 34 Phipps, S. *et al.* Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood* **110**, 1578-1586, doi:10.1182/blood-2007-01-071340 (2007).
- 35 Agac, A. *et al.* Host Responses to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Viruses* **15**, doi:10.3390/v15101999 (2023).
- 36 Johansson, C. & Kirsebom, F. C. M. Neutrophils in respiratory viral infections. *Mucosal Immunol* **14**, 815-827, doi:10.1038/s41385-021-00397-4 (2021).
- 37 George, S. T. *et al.* Neutrophils and Influenza: A Thin Line between Helpful and Harmful. *Vaccines (Basel)* **9**, doi:10.3390/vaccines9060597 (2021).
- 38 Nakagome, K. & Nagata, M. Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation. *Front Immunol* **9**, 2220, doi:10.3389/fimmu.2018.02220 (2018).
- 39 Kikuchi, I. *et al.* Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 760-765, doi:10.1165/rcmb.2005-0303OC (2006).
- 40 Knudson, C. J., Hartwig, S. M., Meyerholz, D. K. & Varga, S. M. RSV vaccine-enhanced disease is orchestrated by the combined actions of distinct CD4 T cell subsets. *PLoS Pathog* **11**, e1004757, doi:10.1371/journal.ppat.1004757 (2015).
- 41 Boer, M. C., Joosten, S. A. & Ottenhoff, T. H. Regulatory T-Cells at the Interface between Human Host and Pathogens in Infectious Diseases and Vaccination. *Front Immunol* **6**, 217, doi:10.3389/fimmu.2015.00217 (2015).
- 42 Li, J., Tan, J., Martino, M. M. & Lui, K. O. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol* **9**, 585, doi:10.3389/fimmu.2018.00585 (2018).
- 43 Iwata-Yoshikawa, N. *et al.* A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection. *Sci Adv* **8**, eabh3827, doi:10.1126/sciadv.abh3827 (2022).
- 44 Fuentes, S., Klenow, L., Golding, H. & Khurana, S. Preclinical evaluation of bacterially produced RSV-G protein vaccine: Strong protection against RSV challenge in cotton rat model. *Sci Rep* **7**, 42428, doi:10.1038/srep42428 (2017).
- 45 Zhao, T. *et al.* Vaccine adjuvants: mechanisms and platforms. *Signal Transduct*

- Target Ther* **8**, 283, doi:10.1038/s41392-023-01557-7 (2023).
- 46 Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V. & Harding, C. V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* **186**, 1623-1631, doi:10.1084/jem.186.10.1623 (1997).
- 47 Pulendran, B., P, S. A. & O'Hagan, D. T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* **20**, 454-475, doi:10.1038/s41573-021-00163-y (2021).
- 48 Verma, S. K. *et al.* New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. *Front Immunol* **14**, 1043109, doi:10.3389/fimmu.2023.1043109 (2023).
- 49 McLellan, J. S., Yang, Y., Graham, B. S. & Kwong, P. D. Structure of respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in the postfusion conformation reveals preservation of neutralizing epitopes. *J Virol* **85**, 7788-7796, doi:10.1128/JVI.00555-11 (2011).
- 50 Jose, P. J. *et al.* Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med* **179**, 881-887, doi:10.1084/jem.179.3.881 (1994).
- 51 Matthews, S. P., Tregoning, J. S., Coyle, A. J., Hussell, T. & Openshaw, P. J. Role of CCL11 in eosinophilic lung disease during respiratory syncytial virus infection. *J Virol* **79**, 2050-2057, doi:10.1128/JVI.79.4.2050-2057.2005 (2005).
- 52 Johnson, T. R., McLellan, J. S. & Graham, B. S. Respiratory syncytial virus glycoprotein G interacts with DC-SIGN and L-SIGN to activate ERK1 and ERK2. *J Virol* **86**, 1339-1347, doi:10.1128/JVI.06096-11 (2012).
- 53 Bergman, M. P. *et al.* Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* **200**, 979-990, doi:10.1084/jem.20041061 (2004).
- 54 Anthony, R. M., Kobayashi, T., Wermeling, F. & Ravetch, J. V. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* **475**, 110-113, doi:10.1038/nature10134 (2011).
- 55 Angelina, A., Martin-Cruz, L., de la Rocha-Munoz, A., Lavin-Plaza, B. & Palomares, O. C-Type Lectin Receptor Mediated Modulation of T2 Immune Responses to Allergens. *Curr Allergy Asthma Rep* **23**, 141-151, doi:10.1007/s11882-023-01067-0 (2023).

- 56 Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132-1148, doi:10.1016/j.immuni.2019.04.011 (2019).
- 57 Cortjens, B. *et al.* Broadly Reactive Anti-Respiratory Syncytial Virus G Antibodies from Exposed Individuals Effectively Inhibit Infection of Primary Airway Epithelial Cells. *J Virol* **91**, doi:10.1128/JVI.02357-16 (2017).
- 58 Lee, J., Klenow, L., Coyle, E. M., Golding, H. & Khurana, S. Protective antigenic sites in respiratory syncytial virus G attachment protein outside the central conserved and cysteine noose domains. *PLoS Pathog* **14**, e1007262, doi:10.1371/journal.ppat.1007262 (2018).
- 59 Fridman, W. H. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *FASEB J* **5**, 2684-2690, doi:10.1096/fasebj.5.12.1916092 (1991).
- 60 Barnhart, B. C. & Quigley, M. Role of Fc-FcγR interactions in the antitumor activity of therapeutic antibodies. *Immunol Cell Biol* **95**, 340-346, doi:10.1038/icb.2016.121 (2017).
- 61 Sparwasser, T. *et al.* Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol* **162**, 2368-2374 (1999).
- 62 Schmidt, M. E. & Varga, S. M. The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections. *Front Immunol* **9**, 678, doi:10.3389/fimmu.2018.00678 (2018).
- 63 Rapaka, R. R., Cross, A. S. & McArthur, M. A. Using Adjuvants to Drive T Cell Responses for Next-Generation Infectious Disease Vaccines. *Vaccines (Basel)* **9**, doi:10.3390/vaccines9080820 (2021).
- 64 Lind, N. A., Rael, V. E., Pestal, K., Liu, B. & Barton, G. M. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Nat Rev Immunol* **22**, 224-235, doi:10.1038/s41577-021-00577-0 (2022).
- 65 Hancock, G. E. *et al.* CpG containing oligodeoxynucleotides are potent adjuvants for parenteral vaccination with the fusion (F) protein of respiratory syncytial virus (RSV). *Vaccine* **19**, 4874-4882, doi:10.1016/s0264-410x(01)00228-6 (2001).
- 66 Lee, Y. *et al.* A unique combination adjuvant modulates immune responses preventing vaccine-enhanced pulmonary histopathology after a single dose vaccination with fusion protein and challenge with respiratory syncytial virus. *Virology* **534**, 1-13, doi:10.1016/j.virol.2019.05.010 (2019).
- 67 Kwak, K., Akkaya, M. & Pierce, S. K. B cell signaling in context. *Nat Immunol* **20**, 963-969, doi:10.1038/s41590-019-0427-9 (2019).

- 68 Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Bukreyeva, N., Murphy, B. R. & Collins, P. L. Interferon gamma expressed by a recombinant respiratory syncytial virus attenuates virus replication in mice without compromising immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2367-2372, doi:10.1073/pnas.96.5.2367 (1999).
- 69 Plotnicky-Gilquin, H. *et al.* Gamma interferon-dependent protection of the mouse upper respiratory tract following parenteral immunization with a respiratory syncytial virus G protein fragment. *J Virol* **76**, 10203-10210, doi:10.1128/jvi.76.20.10203-10210.2002 (2002).
- 70 Lee, A. J. & Ashkar, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol* **9**, 2061, doi:10.3389/fimmu.2018.02061 (2018).
- 71 van Erp, E. A., Luytjes, W., Ferwerda, G. & van Kasteren, P. B. Fc-Mediated Antibody Effector Functions During Respiratory Syncytial Virus Infection and Disease. *Front Immunol* **10**, 548, doi:10.3389/fimmu.2019.00548 (2019).
- 72 Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**, 1510-1512, doi:10.1126/science.1118948 (2005).
- 73 Ng, C. T., Fong, L. Y. & Abdullah, M. N. H. Interferon-gamma (IFN-gamma): Reviewing its mechanisms and signaling pathways on the regulation of endothelial barrier function. *Cytokine* **166**, 156208, doi:10.1016/j.cyto.2023.156208 (2023).
- 74 Schmoele-Thoma, B. *et al.* Vaccine Efficacy in Adults in a Respiratory Syncytial Virus Challenge Study. *N Engl J Med* **386**, 2377-2386, doi:10.1056/NEJMoa2116154 (2022).