

3. 選択的に中和抗体産生を誘導する新型コロナウイルス感染症ワクチンの開発

日本大学 歯学部 客員教授 鏑田 武志

概要

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の流行は、世界的な免疫の獲得により脅威は減弱したものの、今後もワクチンによる感染防御が必要であり、とりわけ変異株にも有効なワクチンの開発が希求されている。本研究では、SARS-CoV-2の種々の変異株および近縁のサルベコウイルスに幅広く反応する広範交差反応性中和抗体が結合するSARS-CoV-2スパイクタンパク質の結合部位のうち、短い部分ペプチドでもスパイクタンパク質内と同じ構造をとることが予測されるstem helixおよびfusion peptideの約10アミノ酸からなるペプチドを高免疫原性キャリアに化学的に結合したワクチンを作製しマウスに免疫したところ、スパイクタンパク質に結合する特異抗体産生を誘導された。用いたペプチドの配列がSARS-CoV-2の変異株や近縁のウイルスで保存された配列を用いたため、このワクチンによって誘導されるスパイクタンパク質への抗体は広範交差反応性中和抗体であることが示唆される。このような広範交差反応性中和抗体を誘導するワクチンは感染防御や変異株の出現抑制に重要と考えられる。本研究の主要部分は財団からの助成金によって行われた。

背景および目的

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の感染やワクチンによる免疫が人口の大半で成立したことで、その公衆衛生上の脅威は減弱してきたが、COVID-19は小規模な感染が繰り返すとともに、免疫を逃れる可能性のある変異株の出現が報告されている。このため、今後もCOVID-19に対するワクチンによる感染予防や重症化予防、さらに変異株へのワクチンの開発などが必要と想定される。また、変異株にも有効なワクチンの開発が希求される。

COVID-19の病原体であるSARS-CoV-2のヒト細胞への感染は、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質がヒト細胞のACE2分子に結合することによりはじまる。本研究では、スパイクタンパク質の部分ペプチドを高免疫原性キャリアにコンジュゲートすることで、スパイクタンパク質の特定の部位への抗体産生を誘導するワクチンの開発を行う。このようなワクチンは、SARS-CoV-2のヒト細胞への感染を阻害する中和抗体を効率的に産生誘導する。変異株が出現すると、それまでに獲得していた免疫の効果が減弱する。これは、もっぱら感染や通常のワクチンによって誘導される中和抗体がウイルス型特異的で変異株に反応しないためである。しかし、種々の変異株や類縁のウイルスにも反応し、感染防御効果を持つような広範交差反応性中和抗体が感染の際にごく少量産生されることも知られている。感染や通常のワクチンでは、型特異的な抗体産生が優先的に起こるため、広範交差反応性中和抗体の産生がごく少量しか起こらない。そこで、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質の広範交差反応性中和抗体が結合する部位の部分ペプチドからなり、型特異的な抗体の結合部位を含まないワクチンが作製できれば、このようなワクチンは広範交差反応性中和抗体を優先的に産生することが期待される。

部分ペプチドの免疫により、抗原の特定の部位に対する抗体産生を誘導するには、部分ペプチドを免疫原性の高いキャリアにコンジュゲートする必要がある。我々の研究グループではこれまでに、プルランやコレステリルプルランといった物理化学的な性質が異なる多糖にタンパク質をコンジュゲートすると、個体に投与された際に

T細胞に抗原を提示する樹状細胞での抗原タンパク質の分解を遅延し、タンパク質への顕著な抗体産生がおこることを明らかにした。さらに、この結果から種々の多糖をキャリアに用いることで免疫原性を顕著に増強することができることを明らかにした。一方、多糖に部分ペプチドのみを結合したワクチンはT細胞活性化能が低いために効率的な記憶免疫誘導ができない。そこで、トキシイドタンパク質と多糖のコンジュゲートをキャリアとして用い、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質の部分ペプチドをコンジュゲートしたワクチンの開発と最適化を行う。

方法

ワクチンの作製とマウスの免疫

アミノデキストランと破傷風トキシイドタンパク質をクロスリンカーを用いて結合させ、キャリアとして用いた。このキャリアに標的タンパク質由来の部分ペプチドをクロスリンカーを用いて結合させた。このコンジュゲートにアジュバントとしてサポニンを加え、8週齢のC57BL/6マウスの側腹部に皮下注射した。実験によっては、アミノデキストランと破傷風トキシイドそれぞれに部分ペプチドをコンジュゲートし、混合したものに、アジュバントとしてサポニンを加えてものをワクチンとして用いた。初回免疫後2週後に同じ組成のワクチンをマウスに注射し、ブーストを行なった。初回免疫2週後およびブースト1週間後にマウスから採血した。

特異抗体のアッセイ

タンパク質への特異抗体量はELISAで測定した。標的タンパク質をコートしたELISAプレートに希釈した免疫マウス血清を加えてインキュベートし、洗浄後にアルカリホスファターゼ結合抗マウス抗体を加えてインキュベーションを行なった。プレートを洗浄後、アルカリホスファターゼ基質を用いて発色させ、プレートリーダーで吸光度を測定した。標的タンパク質へのモノクローナルIgG抗体をスタンダードとして吸光度を比較し、これらタンパク質への特異抗体量を定量した。

結果および考察

これまで高免疫原性のキャリアとしては、スカシガイ由来のタンパク質KLHや微生物内でウイルスの構造タンパク質を発現させて作成するウイルス様粒子(virus-like particle, VLP)などが用いられている。そこで、今回新たに作製した多糖を含むキャリアがより優れた免疫原性を示すかを検討した。安定的に標的タンパク質への特異抗体を産生する自己タンパク質X由来の短い部分ペプチドをKLHまたは多糖キャリアにコンジュゲートしたワクチンを作製し、サポニンをアジュバントとして加え、マウスの皮下に免疫した。免疫後、2週ごとに、同じ組成のワクチンをマウス(n=3)にブーストし、初回免疫1週間後、およびブースト1週間後に採血し、血清中のタンパク質Xに特異的に結合するIgG抗体の量をELISAで測定した。全てのマウスで1 μ g/mLの特異IgG抗体を産生するのに、KLHを用いたワクチンでは2回のブーストが必要であったが、多糖キャリアを用いたワクチンでは1回のブーストで抗体産生が得られた。この結果から多糖キャリアがKLHよりも高い免疫原性を持つことが明らかとなった。

SARS-CoV-2の広範交差反応性中和抗体として知られるS2P6や76E1はそれぞれスパイクタンパク質のstem helixおよびfusion peptideを認識する。これらの抗体の認識する配列は、SARS-CoV-2の変異株や近縁の種々のサルベコウイルスでよく保存されている。また、これらの抗体が認識する配列は α ヘリックス構造をとっている。 α ヘリックスは短いペプチドでもその構造をとるため、短いペプチドであってもタンパク質内と同じ三次構造をとることが予想される。このため、このような部分ペプチドを免疫することで、スパイクタンパク質内でのstem helixおよびfusion peptide領域への抗体産生が期待される。そこで、これらの抗体が認識するstem helixおよびfusion proteinの約10アミノ酸からなる部分ペプチドを合成し、アミノデキストランおよび破傷風トキシイドに化学的にコンジュゲートし、サポニンと共にマウスを免疫した。マウスの血清中のSpikeタンパク質への抗体量を測定したところ、stem helixのペプチド、fusion proteinのペプチドを含むワクチンの両方で、スパイクタンパク質への特異抗体の産生を認めた(図)。この抗体は、スパイクタンパク質のstem helixおよびfusion peptideに結合

し、中和活性を示すことが強く示唆される。免疫に用いた stem helix および fusion peptide のアミノ酸配列は、SARS-CoV-2 の変異株や近縁の種々のサルベコウイルスで保存されているので、これらのペプチドを免疫することで誘導される SARS-CoV-2 Spike タンパク質への抗体は変異株や近縁のウイルスにも幅広く結合する広範交差反応性中和抗体であることが示唆される。このような広範交差反応性中和抗体を誘導するワクチンは感染防御や変異株の出現抑制に重要と考えられる。今後は、これらのワクチンで誘導される抗体の近縁のウイルスの Spike タンパク質への結合性や、SARS-CoV-2 の種々の変異株への感染防御能などを調べることで、この点を実際に検証する予定である。

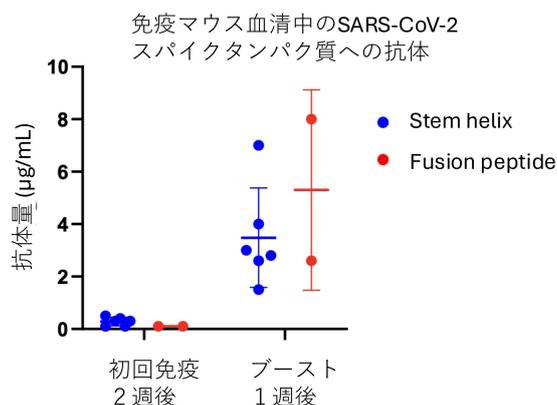


図 1. ワクチンによる SARS-CoV-2 広範交差反応性中和抗体エпитープへの抗体産生

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 stem helix および fusion peptide の広範交差反応性中和抗体の結合部位 (エピトープ) の短い部分ペプチドを含むワクチンを作製し、このワクチンで免疫したマウス血清中の SARS-CoV-2 スパイクタンパク質への抗体(IgG)量を測定した。

(完)