

呼吸器系感染症を予防する 気道親和性センダイウイルスベクター型ワクチンの開発

草野 好司¹・島崎竜太郎²・佐伯久美子³

はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は, SARS-CoV-2 ウイルスの鼻粘膜上皮細胞への侵入から始まる。SARS-CoV-2 は鼻粘膜を構成する線毛上皮細胞や粘液分泌細胞に感染し, これらの細胞の中で増幅し, 新たなウイルス粒子を出芽 (バディング) する。一方で, SARS-CoV-2 感染細胞は自然免疫関連遺伝子を発現して炎症反応を惹起する。大量のウイルスが産生され, かつ炎症反応が強く誘導された状態では, 肺胞に流れ込んだ SARS-CoV-2 ウイルスにより肺炎が誘発される。肺胞表面には毛細血管が張り巡らされており, 肺胞内ガスと血液ガスの交換が行われるが, 肺胞細胞が SARS-CoV-2 ウイルスにより強く傷害されると, 肺胞はガス交換の能力を失い呼吸不全に至る。もし, 鼻粘膜上皮細胞への感染の段階で SARS-CoV-2 ウイルスに対する獲得免疫システムが作動すれば, ウイルス増幅は強く抑制され, 過剰な炎症反応も惹起されず, 無症状～軽症のうちに治癒することが期待できる。このように, 獲得免疫システムを稼働することでウイルス拡散を防止し, また個体の治癒能力を向上することが, 新型コロナウイルス感染症ワクチンの主要課題である。上気道 (鼻粘膜～咽頭～喉頭) および下気道 (気管～気管支～肺胞) の上皮細胞に親和性が高く, ヒトでの安全性が示されているセンダイウイルスベクターはこの課題に応えることができる主役ワクチンベクターである。

1. センダイウイルスベクターは 優秀なワクチン抗原の運び屋

1-1 センダイウイルスの特性 センダイウイルスは, パラミクソウイルス科のマウスパラインフルエンザウイルス I 型に属し, マウスやラットを自然宿主とする肺炎ウイルスとして発見されたが, ヒトには病原性を発揮しない。

センダイウイルスは一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA で全長 15,000 塩基程である。この RNA ゲノムには, 3' 端から順に NP, P, M, F, HN, L の 6 個の遺伝子が並んでいる。それぞれ, スクレオカプシドタンパク質 (NP), RNA ポリメラーゼのサブユニットであるリン酸化タンパク質 (P), ウイルス粒子構造を裏打ちするマトリックスタンパク質 (M), 宿主細胞への侵入に関わる膜融合タンパク質 (F), 宿主細胞への結合に関わる赤血球凝集素ノイラミニダーゼ (HN), RNA ポリメラーゼのラージサブユニット (L) をコードする¹⁾。ワクチン抗原遺伝子搭載センダイウイルスベクターにおいては, 特に F, HN タンパク質が本ベクターの気道親和性をもたらす主要因子として機能する (図 1)。

P 遺伝子上の他の読み枠からタンパク質 C が作られる。

また, P 遺伝子上での 1 つのグアニン塩基付加によって生じた他の読み枠からタンパク質 V が作られる。C タンパク質と V タンパク質は, 宿主の自然免疫システムからの攻撃に対する抵抗因子として機能する²⁾。

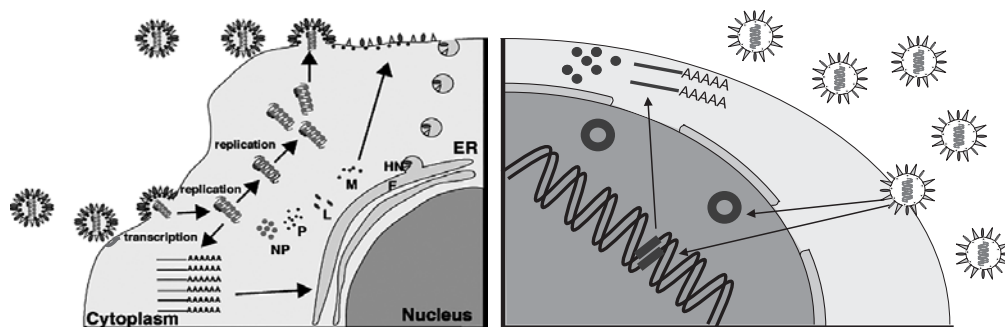


図1. センダイウイルスベクターと既存ウイルスベクターの遺伝子発現様式の違い。左: センダイウイルスベクターは細胞質内で複製と転写を行い, 核内への移行はなく, DNA への変換はない。右: 既存ウイルスベクターは DNA として核内に移行し, 宿主染色体に組み込まれて, 遺伝子はそこから転写される。本図は, 文献3より引用掲載 ((株) シーエムシー出版より引用掲載を許可)。

著者紹介 ¹ 株式会社 ID ファーマ 研究開発センター (執行役員 研究開発センター長) E-mail: kohji-kusano@idpharma.jp

² 株式会社 ID ファーマ (取締役 副社長)

³ 株式会社 ID ファーマ 研究開発センター (取締役 チーフメディカルオフィサー)

宿主細胞にセンダイウイルスが感染すると、宿主細胞の細胞質では、センダイウイルス自身が持ち込んだRNA依存性RNAポリメラーゼによりマイナス鎖RNAからプラス鎖RNAが合成され、プラス鎖RNA分子から各遺伝子のmRNAが転写される。そして、各タンパク質が翻訳されると、マイナス鎖RNAにNPが一定のピッチで結合してRNP複合体が形成される。一方、宿主細胞の細胞膜では、内側はMタンパク質により裏打ちされ、外側はFおよびHNの両タンパク質がアンカーされる。すると、RNP複合体がコアとなり、裏打ちMタンパク質とダブルスパイクF、HNタンパク質によって修飾された細胞膜がエンベロープとなり、バディングによりセンダイウイルス粒子が細胞外に放出される(図1)。センダイウイルスに感染した個体が持つ抗センダイウイルスポリクローナル抗体の中には内部構造タンパク質であるNPを認識する抗体が多く存在することから、2次ウイルス粒子の放出過程で細胞内タンパク質も放出され、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞(APC)に取り込まれると考えられる。同様の機構は、ワクチン抗原遺伝子搭載センダイウイルスベクターの投与に際しても生じること、すなわち、ワクチン抗原分子は細胞外に放出されAPCに貪食されて獲得免疫システムに提示されることが期待される。

1-2 センダイウイルスベクターの実用的特性 センダイウイルスベクター^{3,4)}には、5つの実用的特性がプログラムされている。

1つ目は、宿主細胞の染色体に対する高い安全性である。センダイウイルスと同様に、センダイウイルスベクターにおいても、ゲノム複製、転写が細胞質内でのみ行われる。かつ、DNAへの変換の過程は存在せず、宿主細胞の染色体との相互作用がないため、染色体を傷つけることはない。これがDNAウイルスベクターとの決定的な違いである。

2つ目は、幅広い細胞種に対する感染性である。細胞への感染は、センダイウイルスのHNタンパク質が、細胞膜表面に存在する糖タンパク質N-アセチルシアル酸に結合することによって開始する。シアル酸を保有する糖鎖は、肝細胞を除く多くのヒト細胞において存在するため、感染可能な細胞種の域は広い。特に、高い気道組織指向性を利用して、ワクチンの経鼻投与では高い効果が期待される。

3つ目は、感染効率の高さである。ヒト細胞を用いた*in vitro*の実験からは、10以下の感染多重度で全細胞に感染することを確認している。センダイウイルスベクターの感染効率の高さによりワクチン投与量を抑えることができるため、高用量投与による副作用の危険性を下げることができる。

4つ目は、搭載遺伝子のタンパク質発現までに要する

時間が短いことである。センダイウイルスベクターの感染後すぐに、ゲノムRNAの複製・転写が開始され、各遺伝子の発現は対数的に増加する。なお、センダイウイルス構成遺伝子間に複数の異なったワクチン抗原遺伝子を搭載することも可能である。感染性、病原性、潜伏性に関わる必要最少の抗原をセンダイウイルスベクターに同時搭載することによって、戦略的な予防プログラムを発動することも可能である。

5つ目は、2次感染能のない組織傷害性の低いベクターであることである。センダイウイルス感染時の膜融合に関与するFタンパク質は2次感染にも関与する。特定に組織内で感染が繰り返し生じると組織機能が障害される可能性があるため、ワクチンを含む医療用センダイウイルスベクターではF遺伝子を欠失させている⁵⁾。一方、ベクター製造工程では、Fタンパク質発現パッケージング細胞を用いて細胞培養液中で繰り返して感染させることで大量生産系を稼働している。医療用ベクター生産実績としてFGF-2遺伝子搭載F遺伝子欠失型ベクターを用いて、下肢閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療の臨床試験製剤を製造してきた。ワクチン製造においても本生産施設が稼働される。

2. センダイウイルスベクターによる効果的な粘膜免疫誘導

2-1 ワクチンの経鼻投与による粘膜免疫誘導と全身免疫誘導

センダイウイルスベクターは、気道粘膜上皮細胞に高効率に感染するのみならず、ナイーブT細胞を活性化することができるプロフェッショナルなAPCである樹状細胞にも高効率に感染する。このため合成アジュバントを使用しなくても効果的に免疫を誘導することができる。

経鼻投与したセンダイウイルスベクター型ワクチンは、鼻粘膜上皮細胞に感染すると抗原分子を放出させ、線毛上皮細胞が形成する後方に向かう鼻汁の流れに乗り抗原分子はNasopharynx-Associated Lymphoid Tissue (NALT)と呼ばれる鼻咽頭関連リンパ組織に送られて液性免疫を誘導する。また、NALTを構成する樹状細胞にセンダイウイルスベクターが感染すると、クロスプレゼンテーションにより細胞性免疫が誘導される。NALTで誘導された抗原特異的粘膜免疫細胞は、粘膜免疫循環帰巢(ホーミング)のルートによって、肺・腔・腸管の粘膜関連免疫組織へ移行して分泌型IgA抗体(sIgA)を産生する。また、NALTではIgG産生細胞も誘導され、これらIgA産生細胞・IgG産生細胞が骨髄・胸腺リンパ器官に到達して特異的IgG・IgA抗体産生し全身免疫に寄与する。

2-2 経鼻投与の標的は鼻腔咽頭の免疫システム

鼻腔は、大気中に浮遊する外来病原体防御の最前線に位置している。鼻粘膜上皮細胞はタイトジャンクションにより外来抗原に対する上皮バリア機能を担う一方、それ自体が獲得免疫の重要な役割を担っている。たとえば、抗原提示細胞である樹状細胞およびM細胞がバリア隙間から鼻腔内に突起を伸ばして抗原を捉えることが知られている⁶⁾。これら樹状細胞、M細胞からヘルパーT細胞への抗原提示、ヘルパーT細胞からB細胞、T細胞への抗原特異的活性化、そして、B細胞から抗体産生、抗原特異的細胞傷害性T細胞の増殖へと続くと考えられる。

また、鼻腔や口腔から侵入したウイルスや細菌を認識して排除するために、Waldeyer's ring (ワルダイエル咽頭輪) と呼ばれるリンパ組織集合体があり、これらがヒトでのNALTとして機能する。具体的には、咽頭扁桃、耳管扁桃、口蓋扁桃が配列する(図2)。扁桃にはリンパ球の層に包まれた胚中心があり、ヘルパーT細胞、sIgA⁺細胞、B細胞が存在している。免疫反応が誘導されると、ヘルパーT細胞による抗原特異的B細胞の活性化、B細胞からIgA分泌細胞への分化、抗原特異的メモリーB細胞への分化を伴ったB細胞の活発な増殖が行われる⁷⁾。

ワクチン抗原のこれらの器官への確実な投与法は、鼻粘膜線毛上皮細胞およびNALTを狙って、経鼻投与することが良いと考えられる(図2)。

3. 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 に対する センダイウイルスベクター型ワクチン

3-1 革新的な予防効果 一般に呼吸器ウイルス感染症では気道のsIgA抗体が感染抵抗性(軽症化)に寄与するが、MERSでもそれが確認されている⁸⁾。センダイウイルスベクター粒子は気道の上皮細胞に親和性が高いことから、本ワクチンを経鼻投与することによって、大量のsIgA抗体産生を含む粘膜免疫を惹起することができる。気道粘膜はまさしくSARS-CoV-2の侵入経路であることから、“粘膜免疫の待ち伏せ”によって、革新的に強い予防効果をもたらすと考えられる。

3-2 RBD ワクチン抗原と抗体の誘導 SARS-CoV-2のスパイクタンパク質が感染時に結合する、細胞表面の受容体はアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)であることが明らかにされている。スパイクタンパク質のドメイン構造解析から、S1、S2、TM、ICという領域からなり、S1領域中にACE2に結合する受容体結合ドメイン(RBD)が存在する⁹⁾。SARS-CoV-2に対するワクチン抗原とし

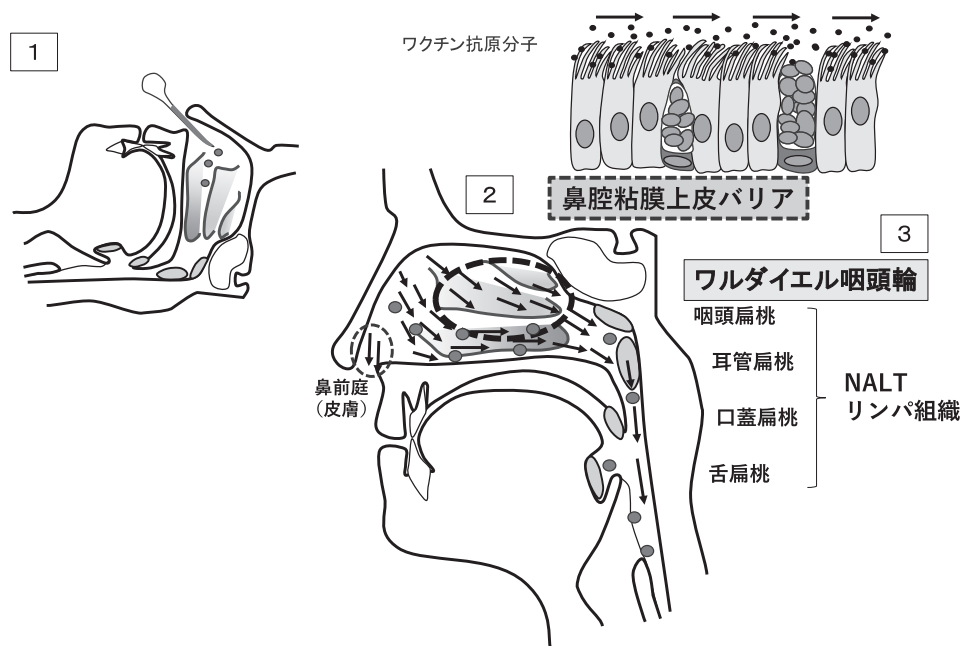


図2. 経鼻投与されたSeVベクターワクチン製剤のダイナミクス。1) 仰臥位でセンダイウイルスベクター液を医療用スポイトで鼻前庭奥の鼻粘膜に滴下すると、後方に向かう鼻汁の流れに乗ってセンダイウイルス粒子はワルダイエル咽頭輪(NALT)まで達する。2) 鼻粘膜上皮に感染したセンダイウイルスベクターが産生する抗原分子もまた鼻汁の流れに乗りNALTに達する。一部のウイルス粒子は嚥下されて喉頭蓋に達し、残りは食道に入り胃内で失活する。3) NALTに達した抗原分子は樹状細胞により貪食されT細胞に提示されて液性免疫を誘導する。NALTの樹状細胞に感染したセンダイウイルス粒子は抗原分子のクロスプレゼンテーションによりCTLを誘導する。本図は、文献17より引用改変した (Reproduced in part with permission from Biol. Pharm. Vol. 38 No. 4 Pages 497-506 Copyright 2015 The Pharmaceutical Society of Japan)。

て、本ウイルスが気道細胞に吸着・侵入する機能を有するスパイクタンパク質が有効である。すなわち、S1領域に含まれるRBD領域をワクチン抗原として、その発現ユニットをセンダイウイルスに搭載することによって、RBDとACE2の結合を阻害する中和抗体の産生、RBD特異的な細胞傷害性T細胞誘導がプログラムされたセンダイウイルス型ワクチンが作製されることが期待される。これまでに筆者らは、RBD領域搭載センダイウイルス型ワクチンを低用量でマウスに経鼻投与することにより、気管支肺胞洗浄液でのRBD特異的sIgA抗体の産生を確認している¹⁰⁾。また、同ワクチンを増量しマウスに経鼻投与することにより、血清でのRBD特異的IgG抗体とRBD特異的IgA抗体の産生を確認している¹¹⁾。

投与されるワクチン抗原に含まれるペプチド配列が多様であればあるほど、感染防御に関与しない抗体（役なし抗体）が産生される。そのような抗体は、抗体依存性感染増強（ADE）を引き起こす可能性があるため、RBD抗原のように最小ユニットをワクチンとすることによって、ADEの危険性は抑制される。その観点からもRBDを抗原としたワクチン開発はメリットが大きいと考えられる。

3-3 センダイウイルスベクターのアジュバント効果
ワクチン抗原の運び屋としてセンダイウイルスベクターは、それ自身がアジュバント効果を発揮する。従来の合成アジュバントは副作用を引き起こすことがあるが、センダイウイルスベクターは合成アジュバントの併用を必要としない。センダイウイルスベクターのアジュバント作用の機序に関しては、以下の2つの報告がある。①センダイウイルスRNAが、自然免疫の中心的役割を果たすRIG-Iタンパク質に認識されることで自然免疫が活性化される。たとえば、不活化ワクチンとSeV RNAとの併用によりインフルエンザウイルスの肺への感染性がより一層弱まることが示されている¹²⁾。②Lewis肺癌細胞をマウス皮下に接種し、同マウスの樹状細胞を腫瘍内に投与して腫瘍容積の増大を測定したところ、あらかじめセンダイウイルスベクターを感染させた樹状細胞の方が、感染なしの樹状細胞よりも腫瘍の増大を強く抑制したことから、本ベクターのアジュバント効果が樹状細胞への感染を介するものであることが示唆される¹³⁾。樹状細胞とは本来、樹状突起によって抗原を取り込む機能を持つが、ワクチンに自ら感染して抗原を発現することで、ワクチン抗原のクロスプレゼンテーションを含めた効率の良い提示が期待される。3-2に既述したRBD搭載センダイウイルスベクターの経鼻投与によるsIgAの上昇は、鼻腔粘膜上皮に存在する樹状細胞（2-2参照）に直接感染した効果であることも想定される。

3-4 センダイウイルスベクター型ワクチンによる細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導
センダイウイルスベクター型ワクチンの経鼻投与はCTLを誘導することで、病原体の持続性感染細胞を排除することが示唆されている。たとえば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）のGag遺伝子をセンダイウイルスベクターに搭載したエイズワクチンを、サル免疫不全ウイルスSIVmac239感染モデルに投与すると、CD8+T細胞が誘導され、SIVの増殖が封じ込められることが示唆された¹⁴⁾。また、結核菌抗原をセンダイウイルスベクターに搭載した結核ワクチンSeV85ABは、マウスモデルに経鼻投与後、マウス肺でメモリーCD8+T細胞の誘導が認められることが報告されている¹⁵⁾。

3-5 センダイウイルスベクターの安全性
HIV Gag遺伝子を搭載したセンダイウイルスベクター型エイズワクチンの第I相試験において、経鼻投与によるセンダイウイルスベクター投与のヒトへの高い安全性が確認されている¹⁶⁾。また、FGF-2遺伝子搭載F遺伝子欠失型ベクターを用いて、慢性動脈硬化症を原因とする虚血下肢に対する遺伝子治療の第I/II相臨床試験において、筋注によるセンダイウイルスベクター投与のヒトへの高い安全性が示されている。

3-6 COVID-19センダイウイルスベクター型ワクチンの科学的・技術的優位性のまとめ

- [1] センダイウイルスベクターのゲノムはRNAであり、細胞の染色体に挿入しないことから染色体安全性が担保されている。
- [2] センダイウイルスベクター製剤による第I相臨床試験で、高い安全性が示されている。
- [3] 投与後感染細胞内でRNA複製が起こり、免疫惹起に十分量のワクチン抗原が速やかに作られる。
- [4] SeV自体がアジュバント効果を持つ。従来の合成アジュバントのように副作用の危険性が少ない。
- [5] 経鼻投与（図2）によってSARS-CoV-2に対して、“粘膜免疫による待ち伏せ防御”が期待される。
- [6] 細胞性免疫の誘導によるウイルス感染細胞駆逐が期待される。
- [7] 経鼻投与のfeasibilityから全世界（含開発途上国）での利用拡大ができる。

おわりに

COVID-19では、これまでの呼吸器系感染症とは異なり、一部の患者に非呼吸器系器官に後遺症を残すことが分かってきた。実際、心疾患、腎疾患、脳炎の病巣部でのSARS-CoV-2の存在が認められている。また、慢性播種性血管内凝固症候群の発症も報告されている。幼

少年期の患者には、川崎病に類似した病状を来すことも報告されている。これらの報告から、肺胞の毛細血管からSARS-CoV-2ウイルスが全身に移行し、ACE2受容体が発現するさまざまな細胞に感染して後遺症を発する臓器障害を誘発することが想定される。実際に、ACE2は血管内皮細胞、心筋細胞、腎臓尿細管上皮細胞、消化管上皮細胞にも発現が認められる^{18,19)}。COVID-19ワクチンの効能として、ウイルス拡散阻止とともに、このような後遺症を回避することが求められている。すなわち、COVID-19に対するワクチンに仕組まれるべき誘導プログラムは、SARS-CoV-2の鼻粘膜上皮細胞への侵入・初期感染を防ぎ、それに続く気道、気管支、肺胞への2次感染を防ぐことができるものであり、粘膜免疫としてのSARS-CoV-2特異的なsIgA抗体、細胞傷害性T細胞の誘導と、全身免疫としての血清IgGおよび細胞傷害性T細胞の誘導を伴うものである。すなわち、前半プログラムによって、SARS-CoV-2の外部への拡散と血流への侵入を抑制し、後半プログラムによって、SARS-CoV-2のウイルス血症の発生を抑制することが、COVID-19ワクチンが目指すべき目標である。

文 献

- 1) 飯田章博, 加藤 篤: ウイルス, **53**, 171 (2003).
- 2) 加藤 篤: ウイルス, **54**, 179 (2004).
- 3) 草野好司ら: バイオ医薬品の開発と市場2019, p. 61, シーエムシー出版 (2018).
- 4) Kato, A. *et al.*: *Genes Cells*, **1**, 569 (1996).
- 5) Li, H.-O. *et al.*: *J. Virol.*, **74**, 6564 (2000).
- 6) Takano, K. *et al.*: *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 611 (2005).
- 7) Wu, H.-Y. *et al.*: *Immunology*, **88**, 493 (1996).
- 8) Min, C.-K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **6**, 25359 (2016).
- 9) Wu, F. *et al.*: *Nature*, **579**, 265 (2020).
- 10) 株式会社アイロムグループ (2020年7月27日付 開示事項の経過): http://www.iromgroup.co.jp/wp/wp-content/uploads/2020/07/20200727_1_186523.pdf
- 11) 株式会社アイロムグループ (2020年9月7日付 開示事項の経過): http://www.iromgroup.co.jp/wp/wp-content/uploads/2020/09/20200907_1_874162.pdf
- 12) Martínez-Gil, L. *et al.*: *J. Virol.*, **87**, 1290 (2013).
- 13) Yoneyama, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 129 (2007).
- 14) Matano, T. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **199**, 1709 (2004).
- 15) Hu, Z. *et al.*: *Mol. Ther.*, **25**, 1222 (2017).
- 16) Nyombayire, J. *et al.*: *J. Infect. Dis.*, **215**, 95 (2017).
- 17) Gizurarson, S.: *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 497 (2015).
- 18) Sungnak, W. *et al.*: *Nat. Med.*, **26**, 681 (2020).
- 19) Varga, Z. *et al.*: *Lancet*, **395**, 1417 (2020).