

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 流行株と抗原性が一致する発育鶏卵インフルエンザワクチンの創出
(英語) Development of egg-based influenza vaccines without HA antigenic changes

研究開発実施期間：令和元年8月19日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 河岡 義裕
(英語) Yoshihiro KAWAOKA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所 特任教授
(英語) Specially Appointed Professor, Institute of Medical Science, University of Tokyo

II 研究開発の概要

● 研究の目的

インフルエンザワクチンは、インフルエンザに対する最も有効な防御手段である。インフルエンザワクチンの多くは、発育鶏卵で培養したワクチン株から製造されているが、近年の季節性 H3N2 インフルエンザウイルスは、発育鶏卵での増殖性が著しく低い。季節性 H3N2 インフルエンザワクチンの製造効率を向上させるためには、ワクチン株を発育鶏卵で継代して馴化させる必要があるが、その過程で主要感染防御抗原であるヘマグルチニン (HA) に変異が入り、ワクチン株の抗原性が大きく変わる (Zost, et al., PNAS. 2017; Wu et al., PLoS Pathog. 2017)。このような卵馴化株を元に製造されるワクチンは、野外の流行株に対して十分な効果を発揮しないため、大きな問題となっている。

本研究では、抗原性が変わらずに発育鶏卵で効率よく増殖できるインフルエンザウイルスを作出する系を確立することを目的に、東京大学は、HA の主要抗原部位に変異が生じることなく季節性 H3N2 インフルエンザウイルスが発育鶏卵で効率よく増殖するのに必要なノイラミニダーゼ (NA) 変異を同定した。さらに、この変異 NA をもつ複数のワクチン候補ウイルスから作出した不活化ワクチンの感染防御効果を解析した。KM バイオロジクス株式会社は、東京大学が作製したワクチン候補ウイルスの中から、ワクチン株として有用な生産性の高い NA 変異ウイルスを選定した。

● 研究成果の概要

研究開発代表者は、A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) 株の NA に 4 か所の変異を導入すると、HA に変異が生じることなく発育鶏卵で増殖することを見出した。更に、別の H3N2 株の NA に、5 つの変異が生じると、同変異を有する H3N2 ウイルスは発育鶏卵で効率よく増殖し、13 回継代した後も HA に変異が生じないことを明らかにした。そこで、上記 2 株で起きた NA 変異を、近年の流行株に様々な組み合わせで導入し、各変異の増殖性への影響を評価した。その結果、6 ヶ所のアミノ酸変異を NA に有するウイルスは、HA が様々なサブクレードの株由来であっても、発育鶏卵で増殖できることを明らかにした。さらに、発育鶏卵での継代等を行うことで、追加で 3 箇所のアミノ酸変異を同定した。このように同定した 9 つの変異を導入した変異 NA (A/Yokohama/147/2017(9M); Y147NA(9M)) を有する H3N2 ウイルスは、発育鶏卵にて効率よく増殖することがわかった。一方、HA の抗原性に影響することなく、そのレセプター結合活性を消失させる 3 つのアミノ酸変異が同定されている。近年のワクチン株 (または類似株) 3 株および Y147 株の HA を用いて、3 つのアミノ酸を置換した変異 HA (以下、HA(3M)) を作製した。その変異 HA とレセプター結合能を持ちうる変異 NA を有するウイルスを作出し、発育鶏卵での 10 回継代過程で HA に変異が生じるかどうか解析を行った。その結果、Y147NA(9M) を有するウイルスについては、その継代過程において、HA の主要抗原部位とは異なる部位のアミノ酸に変異 (228 番目の S が G に変異; S228G) が生じるものの、HA の主要抗原部位に変異は生じていなかった。以上の結果から、HA の主要抗原部位に変異を生ずることなく、発育鶏卵で効率よく増殖するために必要な NA 変異を同定するという目標を達成した。

続いて、インフルエンザウイルスに感染するとヒトに似た臨床症状を示すフェレットモデルを用いて、野生型 HA と Y147NA(9M) を持つウイルス、HA(3M) と Y147NA(9M) を持つウイルス、並びに HA(3M) に S228G の変異を加えた HA (HA(4M)) と Y147NA(9M) を持つウイルスから作出した不活化ワクチンの感染防御効果を調べた。不活化ワクチンによる免疫を行ったフェレットに、ウイルスを接種し、鼻洗浄液中のウイルス量を測定した。非免疫群では感染 1、3、5 日後に全個体の鼻洗浄液中にウイルスが検出された。一方、3 種類の変異ウイルスの不活化ワクチンで免疫した群は、いずれも非免疫群と比べて鼻洗浄液中のウイルス量は有意に少なく、野生型の HA と NA を持つウイルスから作出したワクチンで免疫した群と同程度だった。したがって、親株と同等以上の感染防御能を示すワクチン候補ウイルスを同定できたと判断した。

これら変異ウイルスの生産性をベンチスケール(25 個の発育鶏卵)で評価した結果、HA(3M) または HA(4M) と Y147NA(9M) を持つウイルスの生産性は、ワクチン製造株の 3 分の 2 程度であったが、野生型 HA と Y147NA(9M) を持つウイルスの生産性はワクチン製造株と同程度であることが明らかになった。次に、野生型 HA と Y147NA(9M) を持つウイルスの生産性を、パイロットスケール(発育鶏卵 150 個または 300 個)で評価したところ、野生型 HA と Y147NA(9M) を持つウイルスの生産性はワクチン製造株と同程度であった。したがって、従来のワクチン株と比較して Y147NA(9M) を持つウイルスの増殖性/生産性が同等以上であることを示すことができた。

● 研究開発の意義、今後の展望

本研究課題において、「抗原性が変わらずに発育鶏卵で効率よく増殖できるインフルエンザウイルスを作出する技術」を確立することができた。この研究課題で確立した技術は、新規性が高く、競合する技術は知られていないことから、高い競争優位性を有している。インフルエンザワクチン製造企業と協働することによって、アカデミアでは困難なパイロットスケールでのワクチン候補ウイルスの増殖性/生産性の評価を実施することができた。ワクチン製造企業での評価において、NA 変異を持つウイルスがワクチン製造株と同程度の生産性を有していることが明らかになった。したがって、本研究課題の目標である効果の高いインフルエンザワクチンを市場へ提供するための道筋をつけることができたと考えている。今後、流行株と抗原性の一致したワクチンを市場に提供できるようになれば、インフルエンザワクチンの効果が低いという大きな社

会問題の解決策となり、その社会的貢献度は高いと考えている。引き続き、KM バイオロジクス社と連携・協働して、流行株と抗原性の一致したワクチンの実用化を推進していく予定である。

Background and Aim

Vaccination is an effective strategy to protect against influenza virus infection. Most influenza vaccines are produced in embryonated chicken eggs; however, recent seasonal H3N2 viruses do not replicate well in eggs. Therefore, these viruses are serially passaged in eggs to increase vaccine production efficiency. During the serial passages in eggs, the hemagglutinin (HA) protein, which is the major target of protective antibodies to influenza viruses, acquires egg-adaptive mutations, leading to a change in virus antigenicity (Zost, et al., *PNAS*. 2017; Wu et al., *PLoS Pathog*. 2017). Such egg-adaptive mutations in HA have been shown to reduce the effectiveness of influenza vaccines against circulating strains. In this study, we aimed to generate influenza H3N2 viruses that can efficiently replicate in eggs without antigenic changes in HA. To achieve this aim, we identified several mutations in neuraminidase (NA) that confer efficient replication in eggs without the acquisition of mutations at the major antigenic sites of HA. In addition, we produced inactivated vaccines from viruses possessing these mutations in NA and assessed their protective effectiveness against circulating strains in ferrets. We also evaluated the production efficiency of the inactivated vaccines in a pilot-scale study.

Results and Discussion

We identified nine mutations in NA that facilitate efficient H3N2 replication in eggs without the acquisition of mutations at the major antigenic sites of HA, and designated the NA of A/Yokohama/147/2017 containing the nine mutations Y147NA(9M). A previous study reported that three mutations in HA could abolish the receptor-binding capability of HA without altering the antigenicity of HA. We introduced these three mutations into the HA of a circulating H3N2 strain, and designated H3HA carrying the mutations HA(3M). We generated mutant viruses expressing Y147NA(9M) and HA(3M), and observed that they grew efficiently in eggs. After ten passages in eggs, the mutant viruses possessed an additional mutation (G228S) at a position that is not located in the antigenic sites of HA. Thus, we identified mutations in NA that enable H3N2 virus to replicate efficiently in embryonated chicken eggs without antigenic changes in HA.

Next, we examined the protective efficacy of inactivated vaccines generated from viruses with wild-type HA and Y147NA(9M), HA(3M) and Y147NA(9M), and HA(3M) with the S228G mutation (HA(4M)) and Y147NA(9M) in ferret models, which show human-like clinical symptoms when infected with influenza virus. Ferrets immunized with the inactivated vaccines were inoculated with a circulating H3N2 strain and virus titers in their nasal washes were assessed. At 1-, 3-, and 5-days post-infection, in the non-immunized control groups, high virus titers were detected in the nasal wash of all ferrets. The virus titers in the nasal wash of animals immunized with vaccines from viruses with wild-type HA and Y147NA(9M), HA(3M) and Y147NA(9M), HA(4M) and Y147NA(9M), or the wild-type HA and NA were significantly lower than those in the non-immunized groups; no significant differences in viral titers in the nasal wash were found among these four groups. Overall, our results show that we successfully identified candidate viruses with NA mutations for vaccines that exhibit equal protection against H3N2 influenza virus infection with the parental strains.

We evaluated the vaccine productivity of the mutant viruses in a bench-scale study (25 growing chicken eggs) and a pilot-scale study (150 or 300 growing chicken eggs) and found that the productivity of the virus with wild-type HA and Y147NA(9M) was equal to that of a vaccine strain.

We have no competitors because, to our knowledge, no other groups are approaching the problem of antigenic alteration of influenza vaccines due to egg adaptation. Therefore, our project is highly innovative and possesses competitive advantages.

The vaccines made by using our technology will improve vaccine efficacy. Therefore, we believe our vaccine project is of high significance and will contribute enormously to public health.

III 事後評価総合所見

発育鶏卵インフルエンザワクチン製造過程で起こるヘマグルチニン（HA）変異による抗原性変化とワクチン効果低下の課題に対して、ノイラミニダーゼ（NA）変異でそれを防御するという基礎的検証が行われた。NA9M（9箇所の変異）を同定し、抗原性を変えずに効率よく増殖できるインフルエンザウイルスを作製することに成功した。NA9Mと3種のHA変異体からウイルスを作製し、そのウイルスに対する不活化ワクチンの有効性についてフェレットの感染モデルで野生型ワクチンとの比較を行い、同程度の感染防御機能を確認した。現在のH3N2インフルエンザワクチンの課題を解決できる道筋をつけることができたことは高く評価された。

一方で、コロナ禍でH3N2ウイルス感染患者が少なかったため遅れが生じた流行の臨床分離株の研究への対応や本コンセプト実用化のためのPMDAとの相談、有効性等の更なる検討などが必要である。今後、ワクチン製造企業との協働で効率的な事業化を進めることを期待する。