

事後評価結果概要

000-006_松本 壮吉（新潟大学）：

組み換え BCG（rBCG）技術を利用した COVID-19 ワクチン開発

【研究概要】

BCG は、結核菌の弱毒株である。生ワクチンとして接種され、生体内に年単位で持続感染し、蛋白質抗原を持続して産生するため、5 年以上、場合によっては終生と、非常に長く効果が持続する特徴がある。また BCG は、「最大」といわれる強いアジュバント活性を有する。このため長期間の、強固な免疫付与が可能である。さらに安全性も高く、安価に生産でき、これまでに最も多くの人類（40 億人以上）に接種されてきた実績がある。

BCG の効果は、結核に限定されない。BCG のアジュバント活性を利用することによって、BCG 注入療法は、抗がん剤を上回り、膀胱癌の手術後の再発を約 80%抑制する。また BCG 接種が寿命を延長させ、小児の呼吸器感染と敗血症を減らすことも多数、報告されている。

COVID-19 のパンデミックが発生し、疫学解析では、BCG の接種と COVID-19 の罹患率や死亡率が、有意差をもって、逆相関することから（Kleinnijenhuis et al. PNAS, 2020. Berg MK et al., Science Advances, 2020）、BCG の非特異的な効果が期待された。さらに、ランダム化二重盲検 BCG 接種試験では、SARS-CoV-2 感染に高感受性の高齢者において、ウイルス原性とおもわれる感染症の罹患率が下がること（Giamarellos-Bourboulis et al., Cell 2020）や、COVID-19 にも効果があること（Tsilika et al., medRxiv preprint 2021）が報告された。このように BCG は、COVID-19 ワクチンにおけるベクターとして、十分に期待できるものがある。

本開発では BCG の中でも、高い抗原性を保持している本邦の BCG の主要ポピュレーション、「BCG Tokyo 172 の 1 型バリエーション」をベクターとして用い、組み換え BCG 技術を利用して、SARS-CoV-2 のスパイク蛋白(S 蛋白質)の受容体結合部位（Receptor binding domain, RBD）を発現させ、COVID-19 に特異的に効果を発揮する、組み換え BCG ワクチンを作成することを目的とした。野生型の結核菌が、人に再感染するように、BCG は再接種も可能で、BCG ベクターには、再接種ができないウイルスベクターにはないメリットもある。

BCG での RBD 発現カセットを 42 種類作成し、BCG Tokyo 172 type1 およびそのウレアーゼ欠失株に導入して、48 種の組み換え体を作成した。BCG への組み込みは、シャトルプラスミドによる形質転換、ファージベクターによるゲノムへのインテグレーション、遺伝子断片の挿入による相同性組換えでのゲノム挿入の 3 法を試験した。BCG で転写量の多い遺伝子のプロモーターを 6 種類選抜して RBD の発現に利用した。分泌シグナルには、主要な分泌蛋白質のシグナルペプチドを 4 種利用した。ウイルス抗原として RBD 単独以外に、BCG 蛋白質をキャリアーとするものを構築し、その中には、RBD 内のヘアピン構造をキャリアー蛋白質中のヘアピン領域に置換したもの、また分子アジュバントとの融合体として発現する構築等を作成した。

48 種類の組み換え BCG のうち、14 種類が RBD を発現し、そのうち 3 種類が、菌体外まで RBD を分泌した。当初 8 ヶ月程を要した組み換え BCG の作成が、ノウハウの蓄積により、3 ヶ月程度でできるようになり、S 蛋白質 N501Y 変異 RBD を分泌する組み換え BCG も作成した。

並行して、中和抗体量の定量系の確立を進めた。SARS-CoV-2-S 蛋白質を外套する組み換えレンチウイルス (S-ウイルス)、SARS-CoV-2 の宿主受容体 ACE2 を発現する ACE2-HEK 細胞を作製した。これらを組み合わせることにより、中和抗体を簡便に検出できる定量系を樹立した。

組み換え RBD を産生する HEK 細胞株を作成して、組み換え RBD 蛋白質を精製して抗原として利用した。ワクチン接種者への組み換え BCG 接種や、新生児への組み換え BCG 接種を想定して、RBD プライム—組み換え BCG ブースター免疫、組み換え BCG 免疫プライム—RBD ブースター免疫による、免疫誘導を検討した。いずれの系においてに、長く高い RBD 抗体産生が維持され、一部の動物では明瞭なシュードウイルス感染に対する中和抗体産生と、RBD に対する細胞性免疫応答の誘導を観察した。

組み換え BCG-COVID-19 ワクチンを製造するための準備として、BCG 製造株式会社において、文科大臣に第二種使用等拡散防止措置確認申請を行ない、令和 2 年 12 月 21 日付で「確認」の回答を得た。組み換え菌の培養はソートン表面培養とし、2 代～3 代継代して増菌し、集菌後グルタミン酸ナトリウムを添加しバルクとする。最終充填容器はバイアルとし、現行の膀胱内用バイアルを想定し、グルタミン酸ナトリウム量と凍結乾燥条件等を検討した。凍結乾燥後の生産量は、現行 BCG ワクチンの毒性試験に関するデータから、6 グラム以上とした。

さらに、組み換え BCG 製剤の製造のために、海外の日本型 BCG を製造している機関と、人接種用の組み換え BCG 製剤の、製造について共同研究契約を結び、同意した。

並行して SARS-CoV-2 流行株のゲノム解析により、RBD の配列が適切であるかをモニターした。2020 年以降、まず現れた S477N は主にオーストラリア地域だけで増加した変異で、のちに減少したため大きな流行には至っていない。その後、2020 年後半から N501Y(アルファ株、ベータ株、ガンマ株)が急上昇した。同時期から E484K(ベータ株、ガンマ株)、K417N(ベータ株)、K417T(ガンマ株)も増加傾向にあった。しかしながら、これらの変異は共に 2021 年春頃から減少に転じた。2021 年春から L452R と T478K(共にデルタ株)が増加し始め、2021 年夏以降の検体のほぼ全てがこの変異を持つような状態に至った。またデルタ株から G446V を持つ検体が発見されたが、この変異については現状では頻度は低いままである。2021 年 9 月において、ワクチン効果を顕著に低下させるような変異は、流行株に生じていないと考えられた。

【配分額】

98 (百万) 円

【総合評価】

本課題での取組みにより、BCG Tokyo1721 型バリエントをベクターとして用いて作製した組み換え BCG のうちに S 蛋白質のレセプター結合領域 (RBD) を発現しさらに菌体外に分泌する組み換え株を見出した。ワクチン抗原を接種した実験動物にこれらの RBD 分泌組み換え BCG を追加接種することにより RBD 特異的細胞性免疫とウイルス抗体の産生が長期に確認されており、概ね目標は達成されている。

一方で感染モデルでの検証がまだであり、今後実用化に向け、非臨床試験 (動物モデル特にサルでの有効性など) での POC 取得が求められる。薬効、安全性など非臨床試験データが不十分で、開発にはまだ時間を要すると思われる。

また、ヒト用の製剤はベトナムでの製造を予定しているが、臨床試験用製剤と製品製造に関して国内にはパートナーがおらず、臨床試験実施に向けた実施体制が十分でない。

本ワクチンは、mRNA ワクチンの懸念点である長期免疫持続性の問題を解決する可能性を有し、社会的ニーズに対応しうるワクチンとなることも期待されることから、非臨床および臨床試験の実施体制を構築し、実用化に向け引き続き取り組んでいただきたい。