

## 事後評価結果概要

000-007\_佐々木 均（長崎大学）：  
COVID-19 に対する mRNA 吸入ワクチン開発

### 【研究概要】

本研究では、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の抗原タンパク質をコードした mRNA を設計し、新規標的型製剤“ナノボール”に搭載して、感染経路である気管支・肺へ吸入投与することにより、全身・局所で特異的な中和抗体を産生させ、細胞免疫を賦活化できることを実証した。さらに、アジュバントを併用することにより、中和抗体を測定限界まで産生させることに成功し、細胞免疫も顕著に賦活化した。

本研究グループでは、これまでに pDNA や mRNA、siRNA などの遺伝子・核酸医薬を対象に、生体分解性の正電荷物質や負電荷物質を混合し、疎水結合や静電的結合などの柔らかい結合で自己組織化させた微粒子製剤を開発してきた。なかでも、 $\gamma$ -ポリグルタミン酸を含有する微粒子（ナノボール）は、粒子径が 100-200 nm 程度の負電荷粒子にもかかわらず、mRNA の分解を保護し、免疫系細胞へ取り込まれ、タンパク質を発現する。そこで、ホタルルシフェラーゼをコードした mRNA を内包したナノボールを調製し、マウスに経肺投与した。その結果、肺組織内でホタルルシフェラーゼを 48 時間程度持続的に発現させることを確認した。さらに、成分と含量を調整し、遺伝子発現効率が高い最適のナノボールを同定した。

そこで、モデル抗原である卵白アルブミン(OVA)の mRNA を用いて、経肺投与による免疫誘導効果を確認した。その結果、ルシフェラーゼ mRNA を搭載したナノボールおよび単独の OVA mRNA は、経肺投与しても OVA 特異的な IgG 抗体や IgA 抗体は検出されなかった。一方で、OVA の mRNA を搭載したナノボールを投与したマウスでは、血清中および気管支・肺胞洗浄液中の IgG 抗体が有意に上昇した。さらに、粘膜免疫に重要な IgA 抗体が気管支・肺胞洗浄液中で有意に上昇した。すなわち、抗原の mRNA を搭載したナノボールは、経肺投与により、全身免疫と肺の粘膜免疫の両方を顕著に賦活化できることを実証できた。また、ナノボール経肺投与における急性毒性試験を受託企業にて実施し、経肺投与製剤としてのナノボールの高い安全性を確認した。

次に、SARS-CoV-2 に対する抗原の mRNA を設計した。ウイルスの外側に位置するスパイクタンパク質のサブユニット 1(S1)および ACE2 に結合する RBD に注目し数種の mRNA を設計した。mRNA の化学合成は受託企業に依頼し、特殊なキャップ構造を付加し、配列を化学修飾することにより、翻訳活性の高い高品質な mRNA を 5 種入手した。5 種の mRNA を市販の mRNA 導入試薬を用いて培養細胞に導入し、SARS-CoV-2 に対するポリクローナル抗体を用いて、細胞溶解液中のタンパク質発現をウエスタンブロットで評価した。いずれの mRNA からも特異的なバンドが検出され、目的のタンパク質が発現していることが確認

できた。

そこで、5種それぞれの mRNA を搭載したナノボールを調製し、マウスへ2週間おきに計4回経肺投与し、感作を行った。感作後のマウスから血清および気管支・肺胞洗浄液を採取し、試料中の SARS-CoV-2 特異的な IgG 抗体や IgA 抗体の濃度を ELISA により測定した。その結果、特殊なシグナルペプチドを結合した RBD をコードした mRNA (C mRNA) で、血清中および気管支・肺胞洗浄液中の IgG 抗体が上昇した。すなわち、全身と肺の粘膜局所における液性免疫の誘導が実証できた。また、肺や脾臓を摘出し細胞を採取し、SARS-CoV-2 の抗原タンパク質を含んだ培地中で培養したところ、培養上清中にインターフェロン $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) の顕著な分泌が認められ、肺や脾臓における細胞性免疫の活性化が確認された。

さらに、液性免疫 (中和抗体) や細胞性免疫のさらなる活性化を目的に、アジュバント併用を試みた。C mRNA を搭載したナノボールに2種のアジュバント (X and Y) を添加し、マウスへ2週間おきに計4回投与し感作した。その結果、アジュバント Y の併用により、血清中や気管支・肺胞洗浄液中の SARS-CoV-2 特異的な IgG 抗体が20倍以上劇的に増加する事を見出した。この値は既存のワクチンと比較しても極めて高い。さらに気管支・肺胞洗浄液中の IgA 抗体の誘導も確認できた。

長崎大学熱帯医学研究所では、独自に ACE-2 と Fc $\gamma$ R の両方を発現した細胞を作製し、C mRNA を搭載したナノボールにアジュバント Y を併用投与したマウスの血清で、明らかな中和抗体による感染予防効果が確認された。

以上、特別に設計した C mRNA を搭載したナノボールにアジュバント Y を併用して経肺投与することで、感染予防に重要な肺局所における免疫と感染後重症化を抑制する全身の免疫の両方を顕著に誘導できる事を実証した。今後、チャレンジ実験において C mRNA を搭載したナノボールにアジュバント Y を併用投与し、有効性を検証する予定である。

#### 【配分額】

65 (百万) 円

#### 【総合評価】

本研究課題は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の抗原をコードした mRNA を設計し、免疫細胞標的型微粒子製剤「ナノボール」に搭載し、粘膜免疫および全身免疫を賦活化することが期待される吸入型ワクチンを開発するものである。実施期間中の成果として、特殊なシグナルペプチドで修飾した RBD を発現する mRNA を「ナノボール」に搭載し、アジュバントと共に経気道投与することで、肺と全身における新型コロナウイルスに対する液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導することを示した。

本課題への取り組みにより、抗原 mRNA のデザイン・タンパク発現の確認、および分泌型 RBD mRNA ナノボールにアジュバントとして Y を併用することで、気道局所の粘膜免疫と全身の液性免疫を誘導できることが確認されており、本課題のコンセプトにかかわる重

要な目標は、概ね達成されている。一方で、すでに上市されている mRNA ワクチン以上の有効性を示すことができるかどうかは、チャレンジ試験等のデータが十分でなく不明である。

本ワクチンは、筋注 mRNA ワクチンに代わる新たなワクチン開発プラットフォームとなることが期待されるが、感染防御効果や CMC（製剤化、安定性、保管条件、スケールアップ、規格・品質試験法など）に関わるデータが不十分で、実用化には時間がかかると思われる。本研究期間で得られた基礎データより、吸入 mRNA ワクチンは、新たなパンデミックに対するワクチンとして、迅速な開発が期待されることから、企業への導出等を含め実用化にむけた開発への取り組みが望まれる。