

事後評価結果概要

000-008_安井 文彦（東京都医学総合研究所）：

汎コロナウイルス感染症ワクチンへの応用も視野に入れた、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対する即時性と免疫持続性を併せ持つ組換えワクチンの実用化

【研究概要】

本研究の目的は、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対する予防ワクチンとして、天然痘ワクチンであるワクシニアウイルス（VACV）を馴化し高度弱毒化した DI_s 株に SARS-CoV-2 遺伝子を導入する遺伝子組換え生ワクチンを作出し、ヒトでの実用化を目指すことである。

全世界での COVID-19 の収束に向けて、より多くの人々がワクチンを接種し、SARS-CoV-2 及びその変異株に対する免疫を獲得することが重要である。先行して開発された mRNA ワクチン、アデノウイルスベクターワクチンなどの接種が進められ、接種率が上昇するにつれ、重症化率は漸減してきている。一方で、ワクチン接種による発熱、倦怠感といった副反応やウイルス変異株に対する予防効果の減弱、免疫応答の経時的低下などの新たな課題も見えてきた。

本研究グループは、2002 年から 2003 年に流行した重症急性呼吸器症候群（SARS）や 1998 年以降に感染者が報告されている（高病原性）鳥インフルエンザなどの新興ウイルス感染症に対して、日本で開発された天然痘ワクチンである弱毒化ワクシニアウイルス株を母体とした遺伝子組換え SARS ワクチンや鳥インフルエンザワクチンを作製し、動物モデルで有効性を検証してきた。SARS コロナウイルス（SARS-CoV）のスパイク（S）蛋白質遺伝子を導入した組換えワクチンは、接種後一週間で中和抗体を誘導でき、SARS-CoV によるマウスへの攻撃感染を防御した。一方、H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスまたは H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）蛋白質遺伝子を導入した組換えワクチンは、マウス及びカニクイザルといった致死性感染動物モデルにおいて、顕著な肺炎軽減効果を示した。また、ワクチン接種後 1 週間という短期間において発症防御効果を発揮できること、一度付与された免疫はマウスモデルにおいては終生免疫とも言える長期免疫持続効果を示すこと、遺伝子型が異なる複数のクレード・ウイルスに対して幅広い交差反応性を示すことなども明らかにしてきた。更に、これら組換えワクチンは、天然痘ワクチンを接種済みのマウスに対しても、未感作マウスへの接種と同等に中和抗体誘導及び発症防御効果を示すことを確認している。よって、組換え VACV ワクチンは、COVID-19 の重症化リスク・グループであり、天然痘ワクチンの接種歴を持つ高齢者層に対しても有効であり、短期間での免疫低下や変異に伴う抗原性変化に対しても優位性を持つと考えられる。

本研究では、日本で開発された鶏卵馴化株であり、多くの正常哺乳動物細胞では非増殖性

である高度弱毒化 VACV DIIs 株をワクチンベクターに用いて SARS-CoV-2 遺伝子を導入した組換え DIIs ワクチンを複数作出した。それらのうち、S 蛋白質遺伝子を導入した DIIs ワクチン(rDIIs-S ワクチン)を実用化ワクチン候補として開発研究を進めることとした。本研究を遂行するために必要な遺伝子組換え生物等の第二種使用に関する所属機関承認と大臣確認、ならびに動物実験承認を得た上で、ワクチン候補の作出とマウスモデルでのワクチン有効性試験を実施した。また、非ヒト霊長類モデルであるカニクイザルでのワクチン有効性試験を実施した。さらに、治験製剤製造法の確立、各種非臨床試験、治験実施に向けた試験計画立案などを実施した。

SPF 鶏卵から調製した初代鶏線維芽細胞に DIIs を感染した後、SARS-CoV-2 AI/I-004/2020 由来 S 蛋白質遺伝子を挿入した組換えワクチン作製用プラスミドベクターをトランスフェクションすることによって細胞内で遺伝子相同組換えを起こさせ、SARS-CoV-2 S 蛋白質遺伝子がゲノム内に挿入された遺伝子組換え DIIs ワクチン (rDIIs-S) を作出した。rDIIs-S ワクチン感染による S 蛋白質発現をウェスタンブロット法により確認した後、大量調製及び精製を行った。

作製した rDIIs-S ワクチン (1×10^8 PFU) を野生型マウスに 3 週間隔で 2 回皮内接種し、液性免疫及び細胞性免疫誘導能を評価した。対象群には、ワクチン母体に用いた DIIs を同量接種した個体を用いた。ワクチン接種後経時的に採取した血清を用いて、S 蛋白質に対する結合抗体価を ELISA 法により測定した結果、初回ワクチン接種から 1 週間後には S 蛋白質特異的 IgG が検出され、2 週間にかけて抗体価は増加した。また、3 週後に追加免疫することによって、その 1 週間後には結合抗体価の更なる上昇がみられた。SARS-CoV-2 に対する中和抗体価に関しても、初回ワクチン接種 1 週間後から検出され、追加免疫することによって 10 倍以上の増強が認められた。S 蛋白質特異的細胞性免疫に関しては、2 回目のワクチン接種から 1 週間後のマウスを用いて *in vivo* 細胞障害性 T 細胞アッセイとインターフェロン γ (IFN- γ) ELISpot アッセイにより評価した。S 蛋白質特異的細胞障害性 T 細胞は、rDIIs-S 接種個体にのみに見られ、移入した S 蛋白質ペプチドを塗した脾細胞のうち 80%以上を排除できた。一方で、非特異的な細胞障害応答は見られなかった。ELISpot アッセイにおいても、rDIIs-S 接種個体で S 蛋白質由来ペプチド刺激による顕著な IFN- γ 産生の増加が認められた。よって、rDIIs-S は、液性免疫と細胞性免疫の両方を接種後早期から誘導できていることが判明した。そこで、SARS-CoV-2 に対して感染感受性を持つ動物モデルを用いて、rDIIs-S 接種による発症防御効果を検討した。

ヒト ACE2 発現トランスジェニックマウス (hACE2 Tg マウス) に 1×10^8 PFU の rDIIs-S を 3 週間隔で 2 回皮内接種し、その 1 週後に SARS-CoV-2 による攻撃感染を行った。対象群 (ワクチン非接種群) には、ワクチン母体に用いた DIIs を接種した個体を用いた。ワクチン非接種群では、SARS-CoV-2 感染 4 日後から急激に体重が減少し、7 日後の生存率は 25%であった。一方、rDIIs-S 接種群では、SARS-CoV-2 感染後の体重減少はほとんど見られず、100% 生残できた。ワクチン非接種群では、感染 7 日後の肺組織から約 1×10^4 PFU/g 組織重量の

感染性ウイルス量が検出されたが、rDIIs-S 接種群では、全個体検出限界 (1×10^2 PFU/g) 以下であった。また、rDIIs-S 接種群はベータ変異株に対しても防御効果を示し、100%の生存率と肺組織中ウイルスの排除効果が確認された。更に、SARS-CoV-2 に感染したマウス肺を用いたプロテオーム解析を実施し、COVID-19 病態及び rDIIs-S 接種による軽減効果を蛋白質レベルでより詳細に検証した結果、COVID-19 で問題となっている血栓形成の関連蛋白質群の発現が rDIIs-S 接種による非感染個体レベルにまで軽減できていることを立証した。

次に、 1×10^8 PFU の rDIIs-S を 3 週間隔で 2 回皮内接種したカニクイザルにおける SARS-CoV-2 感染に対するワクチン有効性評価試験を行った。rDIIs-S ワクチンの 2 回目接種から 1 週間後には、SARS-CoV-2 初期流行株のみならず、各種変異株（アルファ、ベータ、ガンマ株など）に対しても中和活性を示す抗体が誘導されていることが判明した。この時点で SARS-CoV-2 を感染させた結果、ワクチン非接種群では感染 7 日後においても鼻腔及び気管拭い液から感染性ウイルスが検出されたのに対して、rDIIs-S ワクチン接種群では感染翌日には感染性ウイルス粒子が検出されたものの、3 日後には全個体でウイルスは検出限界以下にまで低下していた。また、感染 7 日後の剖検時に肺組織中ウイルス量を測定した結果、DIIs 接種群では、大部分の肺葉から SARS-CoV-2 RNA が検出された一方で、rDIIs-S 接種群では、ほとんどの肺葉でウイルス RNA は検出限界以下であり、有意に低値であった。更に、X 線検査及び肺病理解析から rDIIs-S 接種群では、肺炎像はほとんど認められなかった。

マウス及びカニクイザルモデルを用いた有効性評価試験の結果、rDIIs-S ワクチンは液性免疫及び細胞性免疫を誘導できること、SARS-CoV-2 を速やかに排除し、発熱や肺炎症状を軽減できること、SARS-CoV-2 の初期流行株に加えて各種変異株に対しても防御効果が期待できることが分かった。

治験製剤製造の取り組みとして、実験室作製ワクチン株を基にマスターウイルスシード (MVS) を作製し、その規格試験・特性解析を進めた。また、大規模製造法を確立する目的で、浮遊細胞株での rDIIs-S ワクチン製造方法の検討、規格試験法確立、製剤処方検討を進めた。非臨床試験として、実験室作製ワクチン株を用いて、生体内分布試験を実施した。これらの状況を踏まえ、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) の新型コロナウイルスワクチン戦略相談を活用し、非臨床試験項目と試験デザイン、治験計画書骨子、治験薬の規格試験項目、カルタヘナ法第一種使用申請書類の内容についての相談を実施した。

以上、高度弱毒化ワクシニアウイルスベクターを用いた SARS-CoV-2 ワクチン候補を作成・選定し、マウス及び非ヒト霊長類モデルを用いて rDIIs-S の有効性と安全性を確認した。現在、進めている治験製剤の大規模製造方法を確立することにより、日本オリジナルのワクシニアウイルスベクター・ワクチンの開発が可能となる。これにより、COVID-19 のみならず、今後の新興感染症ワクチンの製造プラットフォームとして活用することが期待できる。

【配分額】

572 (百万) 円

【総合評価】

本課題では計画通り、マウス、カニクイザルにおいて（短期間での中和抗体誘導、一般症状、肺炎像などで）有効性を示す組換えワクシニアウイルスベクター・ワクチンが作出されている。生体内分布試験、非臨床安全性試験を経て、治験製剤製造法の確立、治験実施に向けた試験計画立案などの準備も進められ、PMDA との戦略相談も実施し、治験計画書骨子に関して概ね同意を得ていることから、実用化に向けて着実に進捗していると思われる。

今後、治験薬の大規模製造方法を確立して、開発コンセプトの確認が Phase1/2 試験で得られることができれば、将来的な新興感染症ワクチンのプラットフォームとして活用することが期待できる。

一方で、大規模 GMP 製剤の製造に関する進捗が明確でないように思われる。また、皮内接種用のデバイスの開発を含めて、後期臨床試験の実施場所、資金調達、商用生産体制についても計画案が策定されていない。我が国におけるワクチン接種率は 1 回目 2 回目とも約 80% となっていることから、2022 年 7 月に予定している国内臨床試験（健康成人に対する安全性、忍容性及び免疫原性の検討）の実施環境が厳しく、ブースター効果についての検討も必要と思われる。

また、ウイルスベクターワクチンは、ベクターであるウイルスに対する免疫による効果の減弱が課題となる。ヒトにおいて天然痘ワクチンの接種、本ワクチンの複数回接種などによって効果が減弱しないかを明らかにする必要がある。一部上市されているものを含め、種々のウイルスベクターワクチン研究がなされているなか、ワクシニアウイルスベクターの優位性の十分な検証が必要であると思われる。