

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 気道感染ウイルスに対する次世代型ナノゲル噴霧ワクチンに関する研究開発
(英語) Development of next generation nanogel-based nasal spray vaccine against
airway virus infectious diseases.

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 清野 宏
(英語) Hiroshi Kiyono

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人千葉大学・未来医療教育研究機構・卓越教授
(英語) Future Medicine Education and Research Organization, Chiba University.
Distinguished Professor

II 研究開発の概要

粘膜免疫の観点から、SARS-Cov2 の感染を考えるとウイルス侵入門戸である呼吸器粘膜面における防御システムが必要であるが、現行の注射型ワクチンは基本的には発症・重症化の予防が中心である。すべてのウイルス感染症に対して原理的に感染・伝播・発症・重症化のすべて過程を防御可能な経鼻ワクチンを開発する目的で、我々が開発してきた肺炎球菌等の細菌抗原での有効性と安全性が実証されている精製抗原をカチオン化ナノゲル技術を基盤として、ウイルスワクチン抗原を用いて、多種多様な抗原形状に対応出来る経鼻ワクチンデリバリーシステムを開発する。

新型コロナウイルスウーハン株の RBD をバキューロウイルスシステムで精製し、比率 1 : 1 製剤化を行った。ナノゲル化しても DSL での大きさはナノゲルと比較しても同じであり、またナノゲル化後の RBD の二次構造の CD スペクトルも変化しており、RBD がナノゲルに包埋化されていると考えられました。この RBD ナノゲル化製剤をマウスに、3 週間おきに 3 回経鼻免疫することで、血清中と鼻腔洗浄液中に高い抗原特異的 IgG 及び IgA 抗体が誘導出来ました。その誘導された抗体を、ACE2 レセプター結合阻害 ELISA により、スパイク蛋白に対しての結合阻害活性を検討すると、血清 IgG 抗体にはウーハン株 (WT) 及びオミクロン株 (BA. 5) に対して認められました。また、鼻腔洗浄液の IgA 抗体はウーハン株に対して強い阻害効果が認められました。このことから RBD ナノゲル経鼻ワクチンは、血清中の RBD 特異的 IgG 抗体のみならず、鼻腔洗浄液中の RBD 特異的 IgA 抗体により感染局所での新型コロナウイルスの防御が可能であることを示すことができました。二重蛍光標識されたナノゲル化 RBD のマウス経鼻投与で、ナノゲル化 RBD は 1 時間以内に副鼻腔上皮層に付着し、12 時間以上にわたって上皮細胞内に取り込まれ、そこで RBD はナノゲルから遊離することが示されました。投与 1 2 時間後の副鼻腔上皮層から採取した細胞をフローサイトメトリーで解析することで、遊離された RBD が効果的に、下層の樹状細胞に取り込まれている事も示す事が出来ました。このことからナノゲルはウイルス抗原に対してもアジュバントを加えることなく効果的な経鼻 DDS であることを示すことができました。マウスで有効であったナノゲル化 RBD を、サルに経鼻免疫をする実験を実施しています。mRNA—S 筋注プライム—ナノゲル RBD 経鼻ブーストのほかに、ナノゲル RBD 経鼻のみの群が計画され

ています。これらをmRNAーS 筋注のみ群と比較検討します。マウス免疫試験結果から、新型コロナウイルス由来スパイク RBD 抗原を標的とし、カチオン化ナノゲルと混合することで経鼻ワクチンとした。麻酔下のカニクイザルに、カチオン化ナノゲルシステムに特化した点鼻デバイスを用いて座位で免疫を実施した。経鼻免疫及び mRNA 新型コロナ注射ワクチン後の追加経鼻免疫により、Wuhan 株に対する血清中 IgG 及び鼻腔洗浄液中 IgA が誘導されることが確認され、これらの抗体は ACE2 受容体への結合阻害があったことから、新型コロナウイルスに対する中和活性を持つことが間接的に示唆された。一方で、経鼻ワクチンは投与された抗原又は DDS 自身の嗅球を含む中枢神経系 (CNS) への移行が懸念されています。これまで肺炎球菌等のワクチン抗原である PspA 等の抗原自身のナノゲル DDS システムでの CNS への移行はないことを証明してきました。今回ナノゲル自身の CNS への移行を新規に cHP ナノゲルのアミノ基を[18F]で標識した PET を開発しました。標識体をマウスに経鼻投与し、経時的に組織放射能を直接カウントした結果、[18F]標識ナノゲルは、6 時間まで、尿、糞便、鼻腔、気管、食道、胃、小腸および大腸に分布していましたが、[18F]標識ナノゲルは、マウスの嗅球、大脳、眼、皮膚では 6 時間経っても、検出されませんでした。また経鼻デバイスを用いて、アカゲザル 2 頭に 0.3 ml の[18F]標識ナノゲルを投与しリアルタイム PET 画像解析では、サルの嗅球、大脳、眼の他に標識ナノゲルの中枢神経系 (CNS) への沈着は認められず、鼻腔投与から 6 時間という長い間、サル鼻腔組織内に[18F]標識ナノゲルは残存していました。さらにマウスではより半減期の 67.3 時間と比較的長いインジュウム[111In]標識ナノゲルでも検討し、脳、嗅球、眼球、皮膚への移行が無いことが確認できました。このことから、ナノゲルの経鼻投与での安全性も確認できました。

これらの結果によりウイルスワクチン抗原に対応する、経鼻ワクチンデリバリーシステムを開発する基盤が構築できたと考えています。

From the viewpoint of mucosal immunity, considering SARS-Cov2 infection, a defense system on the mucosal surface of the respiratory tract, which is the gateway for virus entry, is necessary. In order to develop an intranasal vaccine against all viral infections, we will develop an intranasal vaccine delivery system based on the cationic nanogel technology we have developed.

The RBD of a novel coronavirus Wuhan strain was purified by a baculovirus system and formulated into a ratio 1:1 formulation. By intranasal immunization of mice with this RBD nano-gel formulation three times every three weeks, high antigen-specific IgG and IgA antibodies could be induced in the serum and nasal lavage fluid. The induced antibodies were tested for binding inhibition activity against spike proteins by ACE2 receptor binding inhibition ELISA, and were found against Wuhan strain (WT) and Omicron strain (BA.5) in serum IgG antibodies. In addition, IgA antibodies in nasal lavage solution showed strong inhibitory activity against Wuhan strain. Intranasal administration of double fluorescent labeled nanogel RBD in mice showed that nanogel RBD adhered to the paranasal sinus epithelial layer within 1 hour and were incorporated into the epithelial cells over 12 hours, where the RBDs were released from the nanogels. Flow cytometry analysis of cells collected from the sinus epithelial layer 12 hours after administration also showed that the released RBDs were effectively incorporated into the underlying dendritic cells. Intranasal immunization of monkeys with spiked RBD antigens derived from novel coronaviruses after nanogel complex or additional intranasal immunization after mRNA coronavirus vaccine induced IgG in serum and IgA in nasal lavage fluid against the Wuhan strain, and these antibodies had binding inhibitory activity against the human ACE2 receptor. These antibodies had binding and inhibitory activity against the human ACE2 receptor. In addition, real-time PET imaging analysis of 0.3 ml of [18F]-labeled nanogel in two rhesus monkeys by intranasal device showed no deposition of [18F]-labeled nanogel in the central nervous system (CNS) of the monkeys besides the olfactory bulb, cerebrum, and eyes, indicating that [18F]-labeled nanogel remained in the monkey nasal tissue for as long as 6 hours after nasal administration. Labeled nanogels remained in monkey nasal tissues for as long as 6 hours after nasal administration.

These results provide the basis for the development of an intranasal vaccine delivery system for viral vaccine antigens.