

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) 脂質ナノ粒子を基盤としたワクチンプラットフォームの構築  
(英語) Rational design of lipid nanoparticle-based vaccines

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) 吉岡靖雄  
(英語) Yasuo Yoshioka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人大阪大学 微生物病研究所 特任教授 (常勤)  
(英語) Osaka University, Research Institute for Microbial Diseases, Specially-Appointed Professor

## II 研究開発の概要

### 課題概要

粒子径 100 nm 以下の脂質ナノ粒子 (LNP) は、新型コロナウイルスに対する mRNA ワクチン (mRNA-LNP ワクチン) に適用されるなど、新たなワクチン送達担体として注目されている。一方で、新型コロナウイルスに対する mRNA-LNP ワクチンにおいて、強力にワクチン効果を誘導するものの、炎症性サイトカインの産生等に起因する発熱・投与局所の腫れ・倦怠感などの副反応が高頻度で観察されており、ワクチン忌避の引き金になりかねない状況にある。そのため、平時にも適用可能なモダリティとして進化させるためには、ワクチン効果は維持しつつ、副反応を低減することが不可欠である。一方で、感染症有事でのワクチン開発においては、mRNA-LNP ワクチンのみならず、組換え蛋白質によるサブユニットワクチンなど、様々なワクチンの速やかな開発が望まれる。一方でサブユニットワクチンにおいては、免疫活性化剤 (アジュバント) を用いたとしても、ウイルス特異的 T 細胞を誘導することが困難な状態にある。従って、サブユニットワクチン開発において、従来のアジュバントよりも起炎性に乏しく、強力に抗体産生を誘導しつつ、Th1 型免疫などの T 細胞応答をも誘導可能なワクチンプラットフォームの構築が急務となっている。

H5N1 鳥インフルエンザウイルス (H5N1 ウイルス) は、1997 年に鳥からヒトへの感染が初めて報告されて以来、世界十数カ国で約 1000 人の感染者、500 人程度の死亡者が報告されている。これまでに、ヒトからヒトへ H5N1 ウイルスが効率よく伝播する例は報告されていないものの、ヒトで増殖しやすい変異 H5N1 ウイルスの出現も危惧され、未だに警戒体制下にあると言える。事実、令和 3 年以降、H5N1 の世界的な感染拡大に伴い、野生の哺乳類や農場の家畜等などでの発生報告が多数報告されている。そのため、令和 6 年 5 月 1 日の厚生科学審議会感染症部会において、今年度のプレパンデミック備蓄ワクチンは H5N1 にする方向が決定している。

本研究では、独自の LNP を用いた mRNA-LNP ワクチン、LNP-サブユニットワクチンを最適化し、H5N1 ウイルスに対象を絞り、パンデミックに対応可能な、2 種類の新規ワクチン開発を図った。mRNA-LNP ワクチンについては、既存の mRNA-LNP ワクチンの致命的課題である副反応の低減を達成し得る mRNA-LNP ワクチン開発を第一目標に、LNP-サブユニットワクチンについては、Th1 型免疫応答を増強し得る LNP の開発を第一目標に設定した。

### 成果概要

#### mRNA-LNP ワクチン

我々は、各種イオン性脂質を評価する中で最終的に、Y (特許などの都合で、正式名称ではなく Y と記載した) をイオン性脂質として用いた LNP<lipid-Y>の有用性を見出したため、H5N1 ウイルスに対する mRNA-LNP<lipid-Y>ワクチンの開発を図った。mRNA として、H5N1 ウイルスのベトナム株 (A/Viet Nam/1203/2004) 由来ヘマグルチニン (HA)、ノイラミニダーゼ (NA) を用いた。陽性コントロールとして、既存の mRNA-LNP ワクチンに使用される LNP と類似組成の LNP (LNP<SM102>) を使用した。マウスにワクチン後、抗原特異的抗体価および T 細胞応答を評価した。その結果、HA および NA 由来 mRNA を用いた場合、LNP<lipid-Y>、LNP<SM102>いずれにおいても、抗原特異的 IgG、IgG1、IgG2 が同等に誘導されていた。さらに、組換え HA、NA 蛋白質をアジュバントと共に投与した群と比較しても抗体価が高いことが確認された。次に誘導された抗体の中和活性を評価するため、hemagglutination inhibition (HI) アッセイにより HI タイターを測定した。ワクチン株と同じベトナム株に対しては、LNP<lipid-Y>、LNP<SM102>のいずれにおいても、同等の強い HI タイターが観察された。一方で、ワクチン株とは異なる H5N1 ウイルスである北海道株 (A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022) に対しては、抗原性の違いから、いずれの群も全く HI タイターを示さなかった。T 細胞応答については、HA および NA において、LNP<lipid-Y>では LNP<SM102>よりも強力に IFN- $\gamma$ 産生 CD4 陽

性 T 細胞が誘導されていた。そこでワクチン後に、ワクチン株と同じベトナム株を経鼻感染させ、経日的に体重を観察した。その結果、非ワクチン群では顕著な体重減少が観察され 14 日以内に全てのマウスが死亡した一方で、いずれの LNP においても、全く体重減少が観察されず全例生存することを見いだした。また感染防御について、HA および NA で違いはなく、いずれの抗原でも、全く体重減少が観察されず全例生存した。そこで、ワクチン株とは異なる北海道株 (A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022) を感染株に用いて交差防御能を評価した。その結果、HA を抗原に用いた結果、LNP<SM102>は非ワクチン群と比較すると、生存率が延長する傾向にあったものの、感染 14 日以内に全例死亡した。一方で LNP<lipid-Y>では、HI タイターを示さなかったにも関わらず生存率が 60%であり、LNP<lipid-Y>は LNP<SM102>と比較して、交差防御能に優れる可能性が示された。

次に、LNP を投与した後、6、24、72 時間後に血液を回収し、サイトカイン量を測定することで、副反応を評価した。その結果、LNP<SM102>では、IL-6、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IP-10、MCP-1 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの顕著な発現が観察された。一方で LNP<lipid-Y>では、いずれのサイトカイン・ケモカインも、LNP<SM102>と比較して有意に低下していた。なお本結果は、ワクチン 1 回目および 2 回目で同様の結果であった。さらに種々事情により詳細は割愛するが、副反応についても、LNP<lipid-Y>ですこぶる良好な結果が得られた。以上の結果から、LNP<lipid-Y>は LNP<SM102>と比較して、同等にワクチン効果を誘導しつつ、副反応を低減可能な新規 LNP である可能性が示された。

### LNP-サブユニットワクチン

代表者の吉岡はこれまで、インフルエンザウイルス由来スプリットワクチンなどを用い、LNP の蛋白質抗原送達担体としての有用性を評価してきた。その結果、正電荷脂質 DOTMA を主成分とした LNP (LNP<DOTMA>) を蛋白質抗原と共にマウスにワクチンすることで、アラムと同等以上の抗体産生のみならず、Th1 型免疫を、CpG 核酸の 100 倍以上もの強度で誘導可能であることを明らかとしている。そこで本研究ではまず、H1N1 由来 HA、NA の組換え蛋白質を抗原として用い、LNP<DOTMA>の有用性を評価した。なお陽性コントロールとしては、アラムおよび CpG 核酸を使用した。その結果、LNP<DOTMA>群で、HA、NA のいずれについても、アラムや CpG 核酸と同等の抗体産生を誘導することを見出した。Th1 型免疫応答について、HA では、LNP<DOTMA>群と CpG 核酸で同等であった。一方で、NA においては、LNP<DOTMA>により、CpG 核酸と比較しても圧倒的に強く Th1 型免疫応答を誘導可能であることを見出した。また、Th1 型免疫応答の有用性を評価すべく、ワクチン後に H1N1 の感染実験を実施したところ、ワクチン抗原と同じ株を感染させるホモ感染を完全に防御するのみならず、ワクチン抗原とは異なる株の H1N1 についても、LNP<DOTMA>ワクチン群で強力に感染防御することを見出した。さらに、この強力な感染防御には、Th1 由来の IFN- $\gamma$ が必須であることを見出し、Th1 型免疫応答を強力に誘導可能な LNP<DOTMA>の有用性を実証した。そこで、H5N1 (ベトナム株) 由来組換え NA 蛋白質を抗原として用い、LNP<DOTMA>の有用性を評価した。その結果、H1N1 由来 NA 蛋白質を用いた結果と同様に、LNP<DOTMA>群で、アラムや CpG 核酸と同等の抗体産生を誘導することを見出した。Th1 型免疫応答についても、LNP<DOTMA>により、CpG 核酸と比較しても圧倒的に強く誘導可能であることを見出した。

次に、LNP<DOTMA>をサブユニットワクチンに適用するにあたり汎用性を評価した。本検討では、新型コロナウイルス由来 S 蛋白質、肺炎球菌由来 PspA 蛋白質の組換え蛋白質を抗原として用い、これまでと同様に、抗原特異的抗体産生および T 細胞応答を評価した。その結果、いずれの抗原においても、LNP<DOTMA>群でアラムや CpG 核酸と同等の抗体産生を誘導することを見出した。さらに Th1 型免疫応答について、LNP<DOTMA>により、CpG 核酸と比較しても圧倒的に強く誘導可能であることを見出した。以上の結果より、LNP<DOTMA>は汎用性に優れ、様々な抗原において、強力に Th1 免疫を誘導し得ることが明らかとなった。

LNP<DOTMA>について、マウスに投与後の血中サイトカイン量を経時的に評価した。コントロールとしては、CpG 核酸を用いた。その結果、CpG 核酸では、IL-6 や IL-12 p40 の上昇が観察された一方で、LNP<DOTMA>では認められなかった。さらに頻回投与後に、脾臓重量を測定したところ、CpG 核酸では脾腫が観察されたものの、LNP<DOTMA>では認められなかった。以上の結果から LNP<DOTMA>は CpG 核酸よりも強力に免疫誘導しつつ副反応も低いことから、優れたアジュバントになり得るものと考えられた。

### **研究成果の今後の展開**

本研究事業で見いだした mRNA-LNP<lipid-Y>ワクチンの有用性を臨床試験で実証するため、大阪大学ワクチン開発拠点が中核となり、令和 5 年度「ワクチン・新規モダリティ研究開発事業（一般公募）」において研究推進中である（令和 5 年 11 月より開始）。現在、国内の CDMO・ワクチンメーカー・原料メーカーなどとの強固な産学官連携体制で推進しており、mRNA-LNP<lipid-Y>の非臨床試験、第 I 相医師主導治験を実施する予定である。

In this study, our original lipid nanoparticles were optimized as mRNA and protein antigen delivery vehicles, from which vaccines against highly pathogenic avian influenza viruses were developed.

#### mRNA-LNP vaccine

Messenger RNA vaccines encapsulated in lipid nanoparticles (mRNA-LNPs) are an emerging and promising vaccine technology. Nonetheless, some mRNA-LNP vaccines can trigger adverse reactions in humans, including swelling and fever. This is in part due to the inflammatory properties of lipid nanoparticles. Modifying the ionizable lipid used in LNPs represents one strategy to mitigate these adverse effects. In this study, mRNA-LNP vaccines that offer enhanced protective immunity and fewer adverse reactions were developed by utilizing LNPs with a unique ionizable lipid (LNP<lipid-Y>). As a result, mRNA-LNP vaccines for H5N1 influenza were created using mRNA encoding hemagglutinin or neuraminidase from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. Compared to traditional mRNA-LNP, mRNA-LNP<lipid-Y> elicited a similar level of antigen expression at the injection site and comparable antigen-specific antibody responses, as well as a higher number of antigen-specific IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells in mice. Both mRNA-LNP<lipid-Y> and conventional mRNA-LNP provided strong protection against the homologous H5N1 virus challenge. Additionally, mRNA-LNP<lipid-Y> demonstrated superior cross-protection against heterologous H5N1 virus challenges compared to conventional mRNA-LNP. Moreover, mRNA-LNP<lipid-Y> was associated with a reduced production of inflammatory cytokines and fewer local and systemic adverse reactions compared to conventional mRNA-LNP. These findings indicate that mRNA-LNP<lipid-Y> shows significant potential in addressing the challenges associated with mRNA-LNP vaccines.

#### Subunit vaccine

Adjuvants are a powerful means of boosting vaccine effectiveness, steering the immune response towards either a Th1 or Th2 type. While research has highlighted the importance of IFN- $\gamma$  producing Th1 cells in combating infections by intracellular bacteria and viruses, few adjuvants are capable of inducing Th1 cells. Recent studies have indicated that lipid nanoparticles (LNPs) are promising vaccine adjuvants, with each LNP exhibiting distinct properties. In this study, various LNPs were screened to identify a novel adjuvant that can stimulate both Th1 cells and antibody production using antigens from influenza virus in mice. As a result, LNP containing 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propane (DOTMA) as a lipid component (DOTMA-LNP) was found to significantly enhance the antigen-specific IgG1 and IgG2 responses compared to antigen alone, and performed as well as antigen combined with other adjuvants in mice. Moreover, DOTMA-LNP effectively induced strong IFN- $\gamma$ -producing Th1 cells without causing inflammatory reactions, leading to strong cross-protection in mice. We further demonstrated the versatility of DOTMA-LNPs as Th1 cell-inducing adjuvant using antigens from SARS-CoV-2 and *Streptococcus pneumoniae*. These findings suggest that DOTMA-LNPs are a promising, safe, and effective adjuvant for inducing Th1 cells, and that LNP formulations can serve as potent adjuvants to enhance the efficacy of subunit vaccines.