

日本医療研究開発機構 SCARDA 事業 事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）無細胞合成技術とマイクロ流路技術によるウイルス様粒子作製法の開発
（英語）Construction of virus-like particles by cell-free system and microfluidics technology

研究開発実施期間：令和 6 年 4 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日（予定）

研究開発代表者 氏名：（日本語）車 愈澈
（英語）Kuruma, Yutetsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立研究開発法人海洋研究開発機構・生命地球科学研究部門・主任研究員
（英語）Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology・Institute for Extra-cutting-edge Science and Technology Avant-garde Research・Senior Researcher

II 研究開発の概要

本研究計画では、無細胞タンパク質合成系（無細胞系）とマイクロ流体デバイス技術を応用してウイルス様粒子（VLP）を作製し、これを感染症ワクチンとして利用する新しい感染症モダリティを開発する。

ウイルス性感染症の予防と治療にはワクチン接種が重要であるが、一般的に感染性ウイルスの同定からワクチンの開発までは一定時間を要する。またワクチン作製において生細胞や生物個体を使用する場合、細胞由来のコンタミネーションのリスクが払拭できない。そのため、ウイルスの同定からワクチン生産までを迅速かつ安全に実行できる新たなモダリティの開発が強く望まれている。

無細胞タンパク質合成系（無細胞系）は試験管内で転写翻訳をおこなうことで迅速に、安全に目的のタンパク質を合成する人工系である。この無細胞系で抗原となるウイルスタンパク質を、人工脂質膜小胞（リポソーム）の膜上に合成させることでウイルス様粒子（VLP）を作製し、ワクチンとして利用可能であることを示す非臨床 PoC を取得することが本研究の目標である（図 1）。さらにマイクロ流体デバイスによる VLP 作製技術の開発もおこない、短時間で高品質の VLP が形成できる作製条件の最適化と VLP の性状解析をおこなう。そのモデルとして、狂犬病ウイルス（RABV）の G タンパク質を提示した VLP を作製し、そのワクチン活性についてマウスを用いて評価する。さらに両者の技術を組み合わせて、無細胞系で合成した G タンパク質を材料として、マイクロ流体デバイスによ

る VLP 作製技術の開発にも挑戦する。本研究開発により得られる技術は感染症ワクチンのみならず、mRNA ワクチンやがんワクチン、人工エクソソーム、DDS などに広く応用できるものである。

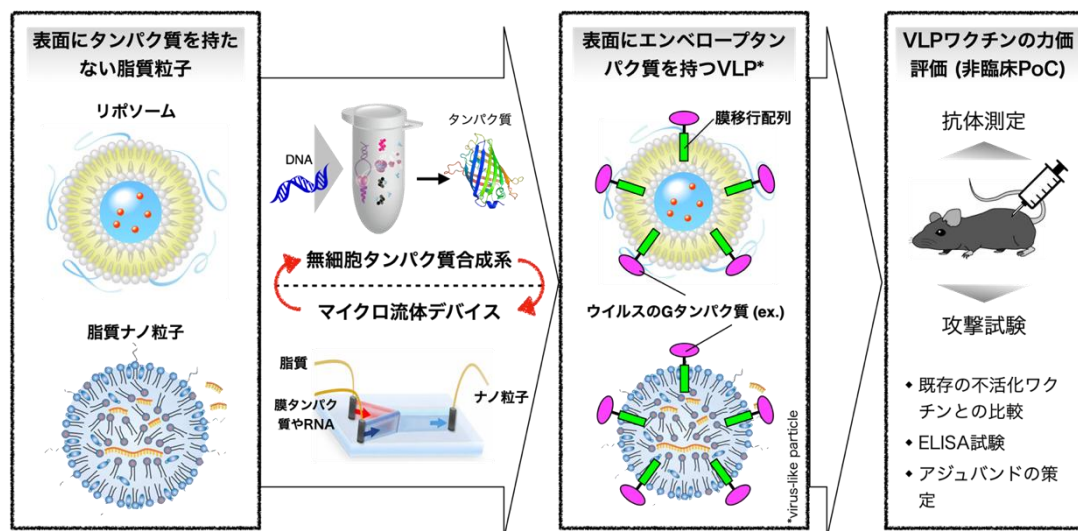


図 1. 無細胞形とマイクロデバイス技術によるウイルス様人工ワクチン作製のアプローチ.

III 研究開発の成果およびその意義等

本研究開発は、無細胞系で VLP 作製する車班（海洋研究開発機構）、マイクロ流路で VLP を作製する真栄城班（北海道大学）、VLP のワクチン効果を評価する伊藤班（国立健康危機管理研究機構）の 3 班体制でおこなった。

まず、車班で無細胞系により RABV の G タンパク質を合成したところ、約 1mg/mL のタンパク質が合成されたことを示す定量結果が得られた。合成時にリボソームを投入したところ、約 80% の G タンパク質が co-translational にリボソーム膜に局在した。一方で可溶性は低かったためシャペロンを投入することで可溶化率の上昇を図った。また G タンパク質は 7 つの S-S 結合を持つため、S-S 結合の形成を促す因子を反応液中にくわえた。反応後のリボソームをショ糖密度勾配遠心法により分離解析したところ、リボソーム画分に無細胞合成した G タンパク質の存在が確認された。しかし同時にシャペロンタンパク質の局在も観察されたため、一部の G タンパク質がシャペロンと結合したままの状態になっていることが示唆された。

分離したリボソームサンプルを VLP とし ELISA により解析したところ、Anti-Gprotein 抗体への結合が観察された。しかしマウス実験による中和抗体化の上昇は見られなかった。その後リボソームの脂質組成の検討を行った。その結果 POPC を主成分とした組成では中和抗体価の上昇が見られなかったが、多種類の脂質成分からなる組成では 0.5IU/mL を超える中和抗体価の上昇が確認された。さらにシャペロンを加えずに合成した VLP においては一部攻撃試験をパスする個体も観察された (1/4 匹)。この時、水酸化アルミニウムのアジュバント効果は観察されなかった。さらに G タンパク質の投与量を増加し再試したところ、32IU/mL を超える中和抗体価の上昇が観察された。さらに同個体群による攻撃試験では、シャペロンを使用しないケースにおいて全頭生存するという結果を得た (5/5 匹)。しかしこれは酸化アルミニウムとは異なるアジュバント X の添加に強く依存した結果であった。またシャペロンを使用したケースでは 1/5 匹のみが生存 (+アジュバント) した。興味深いことに、リボソームの脂質組成にイオン化脂質を加えたところ、アジュバント非使用下で 3/5 匹生存する結果を得ることができた。

これらの結果から、G タンパク質の抗原性の維持に糖鎖修飾は必須ではないが S-S 結合の形成は必須であること、シャペロンの使用はマウス試験（中和抗体価測定と攻撃試験）ではネガティブに働くこと、リボソームの脂質組成が VLP のワクチン活性につよく影響すること、油滴成分のアジュバントが VLP の活性を大きく上げることが示された。これらの成果は無細胞系を基盤とした VLP の作製とそのワクチン利用が可能であることを示す意義を持つものである。一方で、タンパク質凝集による VLP の凝集化とそれによる試料の画一性の問題や、従来ワクチンと比較して投与する G タンパク質あたりの効率が低いことが課題として残った。また Cryo-TEM による VLP の可

視化を試みたところ、リポソーム膜上の G タンパク質までは観察することができなかったためこの点についても課題を残した。

一方、マイクロ流路を使用した VLP 形成については良好な結果を得ることができた。真栄城が設計したマイクロ流路では、水溶液に溶解した RNA とエタノールに溶解した脂質を流路内で急速に混合することで、自発的に LNP の形成するものであり、この水溶液中に G タンパク質を加えることで VLP の形成をうながすものである。しかし、エタノールにより G タンパク質が変性するリスクがあるため、エタノールではなく界面活性剤を使用した方法を採用した。その結果、多分散指数 (PDI) が約 0.2 の粒径のそろった均一な VLP の形成が確認できた。また、ポテンシャルは 3-4mV とほぼ中性を示した。さらに水溶液中に G タンパク質の mRNA も加えたところ、80%以上の高い効率で VLP 内部に封入された。この mRNA 封入型 VLP を用いてマウス実験をおこなったところ、中和抗体価が 1024IU/mL まで上昇し攻撃試験においてもほぼ全てのマウスが生存した。しかしこの系では内封した mRNA が支配的に働いているため、次に mRNA を含まない VLP のワクチン活性を検証した。検証に際して 4 パターンの脂質組成と水酸化アルミニウムアジュバントを試した。その結果、SM-102 を使用した脂質組成において、中和抗体価の値が 9-243IU/mL を示し攻撃試験においても全頭生存する結果が得られた (3/3 匹)。一方でアジュバントの効果は見られなかった。その他の脂質組成に関しては、一部中和抗体価 27IU/mL を示すものの攻撃試験の結果は芳しくなかった。これらの結果は、上記のクルマ班の結果と同じよう、脂質組成が VLP のワクチン活性に大きく影響することを示している。マイクロ流路を使用した VLP 形成は、粒径のそろった高品質の VLP を短時間で多数調整することが可能であり、またそれらは高いワクチン活性を示すことが証明できた。一方で、今回使用した G タンパク質は昆虫培養細胞を使用して発現精製した購入品タンパク質を使用しているため、コスト面で課題が残った。

この問題を解決するひとつのアイデアとして、無細胞系で合成した G タンパク質を基材としてマイクロ流路で VLP を作製する方法を考案した。具体的には、マイナスの表面電荷をもつリポソームに G タンパク質を無細胞系で合成する。これにプラスの表面電荷を持つ LNP とマイクロ流路内で混合することで両者の融合をうながし、G タンパク質を保持した融合 VLP を形成する方法である。これまでに、融合をうながす流路のパラメータ探索をおこない、無細胞合成した VLP との融合を試みた。その結果、ショ糖密度勾配遠心法による解析により VLP 画分に G タンパク質が局在していることがわかった。この融合 VLP がワクチン活性を持つ結果が得られれば、全く生細胞を使用せずに VLP ワクチンが作製できることが期待できる。これらの結果は契約延長 MS 審議後に、得られた結果である。