

日本医療研究開発機構 ワクチン・新規モダリティ研究開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）新規ウイルス様粒子デザインコンセプトによるフラビウイルス感染症
ワクチンの研究開発
（英 語）Development of Flavivirus vaccines based on the novel VLP design concept

研究開発実施期間：令和 6 年 4 月 1 日～令和 8 年 3 月 31 日（予定）

研究開発代表者 氏名：（日本語）鈴木 忠樹
（英 語）Tadaki Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立健康危機管理研究機構・国立感染症研究所感染病理部・部長
（英 語）Director, Department of Infectious Disease Pathology, National Institute of Infectious
Diseases, Japan Institute for Health Security

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：2 ページ以上

英文：1 ページ程度

【和文】

（1）改変型 VLP のデザインおよび抗原製造と非臨床有効性評価

本研究開発では、重篤なデング出血熱・デングショック症候群の一因となる抗体依存性感染増強（ADE）を惹起する抗体のエピトープを改変した抗原をデザインし、ADE リスクを低減したデングウイルス（DENV）ワクチンの開発を推進するため、改変型ウイルス様粒子（VLP）タンパク質を抗原とするワクチンの開発を試みた。その結果、DENV1 型、2 型、3 型、4 型の改変型 VLP を哺乳類培養細胞で発現するコンストラクトの作製に成功した。さらに、哺乳類培養細胞においてオルソフラビウイルス由来 VLP の発現に関与する宿主因子を探索し、見出した宿主因子を過剰発現させた細胞株を樹立したところ、最大で約 40 倍の VLP 発現量が得られることを明らかにした。中間評価後は、改変した DENV2 由来 VLP タンパク質抗原を、Expi293F 細胞の一過性発現系により大量生産し、培養上清から精製し、マウスを用いた免疫原性試験実施に必要な量の VLP タンパク質抗原の製造に成功した。製造した VLP タンパク質抗原について、BALB/c マウスを用いた免疫原性試験を実施した。アジュバントについては、野生型 VLP タンパク質抗原をモデル抗原としたマウスを用いた免疫原性試験を実施し、最もアジュバント活性が高

く、既に実用化されているアジュバントである AS03 と同一処方である AddaS03 を選択した。また、ADE 活性を有するワクチンとしての対照を設定し、VLP タンパク質を抗原とするワクチンの有効性を他のモダリティのワクチンと比較するために、野生型 VLP 抗原もしくは改変型 VLP 抗原を接種個体内で発現するようにデザインした mRNA ワクチンを製造し、VLP-mRNA ワクチンの免疫原性を比較評価した。その結果、野生型 VLP-mRNA と改変型 VLP-mRNA の比較においては、野生型 VLP-mRNA に比べて改変型 VLP-mRNA の DENV2 に対する中和抗体価と E タンパク質に対する結合抗体が僅かに低い傾向が認められたが、改変型 VLP-mRNA と改変型 VLP タンパク質抗原の間では DENV2 に対する中和抗体価と E タンパク質に対する結合抗体に顕著な差は認められなかった。また、これらの免疫個体の血清を用いて全ての血清型の DENV に対する ADE 活性を評価したところ、改変型 VLP タンパク質抗原免疫個体および改変型 VLP-mRNA 免疫個体は、野生型 VLP-mRNA 免疫群と比較して、免疫抗原とは異なる血清型である DENV1、DENV3、DENV4 に対する ADE 活性が有意に低かった。そこで、本ワクチンの感染防御能を評価するために、ミエロイド系細胞において I 型インターフェロン受容体のみがノックアウトされた $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウスを用い、致死感染を示す DENV2 に対する感染防御試験を実施した。その結果、改変型 VLP タンパク質抗原を免疫したマウスに致死性 DENV2 を感染させたところ致死感染を予防できず、全ての個体が死亡した。一方、野生型 VLP-mRNA および改変型 VLP-mRNA を免疫した $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウスに、同じ条件で DENV2 の感染防御試験（100%致死の条件）を行ったところ、全ての免疫マウスが最残した。興味深いことに、I 型 II 型インターフェロンレセプターが共にノックアウトされた $\text{IFN-}\alpha/\beta/\gamma \text{ RKO}$ マウスに同様の野生型 VLP-mRNA、改変型 VLP-mRNA を免疫し、DENV2 の感染防御試験を実施したところ、いずれのワクチン免疫個体も生残せず、ワクチンの有効性が評価できなかった。 $\text{IFN-}\alpha/\beta/\gamma \text{ RKO}$ マウスでは、試験ワクチン接種による免疫が十分に誘導されなかったと考えられ、ワクチン評価のためには $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウスモデルが有用であると考えられた。次に、感染防御試験の生残 $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウス個体の血清を採取し、試験ワクチン免疫後のブレイクスルー感染に誘導される血清抗体の性状解析を行った。その結果、免疫後未感染個体と同様に、野生型 VLP-mRNA 免疫個体と改変型 VLP-mRNA 免疫個体のブレイクスルー感染血清の中和抗体価に有意な差は認められなかった。一方、ADE 活性については、改変型 VLP-mRNA 免疫個体のブレイクスルー感染血清は、野生型 VLP-mRNA 免疫個体のブレイクスルー感染血清と比較して、全ての血清型 DENV に対して有意に低かった。以上の試験により DENV2 型の単価改変型 VLP-mRNA ワクチンの有効性が示されたことから、中間評価後に四価改変型 VLP-mRNA ワクチンのマウスを用いた免疫原性試験および感染防御試験を実施した。その結果、四価改変型 VLP-mRNA 免疫個体では、全ての血清型 DENV に対して四価野生型 VLP-mRNA 免疫個体と同程度の中和抗体価の誘導が認められる一方で、ADE 活性については四価野生型 VLP-mRNA 免疫個体と比較して有意に低かった。続いて、四価改変型 VLP-mRNA ワクチンの致死性 DENV 感染に対する感染防御能を評価するために、四価改変型 VLP-mRNA を $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウスへ免疫後に、DENV1、DENV2 もしくは DENV3 による攻撃試験を行った。その結果、四価改変型 VLP-mRNA 免疫個体は、いずれの血清型のウイルスに対しても 100%の感染防御能を示し、四価ワクチンでも個々の血清型のデングウイルスに対して高い感染防御能が誘導されることが確認された。試験実施までに用意できた DENV4 のウイルス株の感染は $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウスにおいて致死感染を起こさないことから、本試験系において四価改変型 VLP-mRNA 免疫の DENV4 感染防御能は評価できなかった。しかし、その後、DENV4 のマウスへの馴化を進めた結果、 $\text{LysM Cre}^+ \text{Ifnar}^{\text{flox/flox}}$ マウスにおいて致死感染を起こす DENV4 マウス馴化株を得ることができた。今後、この DENV4 マウス馴化株を用いて、四価改変型 VLP-mRNA の DENV4 感染防御能を評価する必要がある。

以上の結果から、本研究で開発した改変型 VLP のデザインコンセプトは、mRNA ワクチンプラットフォームを用いたワクチンにより ADE 活性を抑制した中和抗体誘導能と感染防御能が確認され、ADE リスクを低減させた新規デングウイルスワクチンの開発に大きく寄与することが期待される。一方で、本研究期間の中では VLP タンパク質を抗原とするワクチンでは非臨床有効性の確認を達成することが出来なかった。本研究では、哺乳類培養細胞系を用いた一過性発現系により改変型 VLP タンパク質抗原を製造したが、マウスを用いた ADE 活性を抑制した中和抗体誘導能は確認できたものの、マウスモデルにおける感染防御効果は確認できなかった。中和抗体が誘導されているにもかかわらず十分な感染防御効果が得られない現象については、その作用機序の解明が必要である。

今後は、アジュバント条件の最適化に加え、mRNA プラットフォームで誘導が強いとされる T 細胞免疫応答の関与についても評価を進める必要がある。また、本研究で用いた一過性発現系により製造した VLP タンパク質抗原の精製レベルは低く、そのことが感染防御能の低下に関係している可能性が考えられた。今後は、高純度の VLP タンパク質抗原製造系の構築が課題となるが、現在、外部企業（TOTO 社）との共同研究により、野生型 VLP タンパク質抗原等の安定発現細胞株樹立の実績がある CHO-T 細胞の提供を受け、VLP タンパク質抗原安定発現 CHO-T 細胞の構築を進めている。

(2) ヒトモノクローナル抗体を用いたエピトープ構造解析系開発と改変型 VLP 抗原評価系の整備

本研究では、ワクチン候補抗原のヒトにおける抗原性および免疫原性を高精度に予測することを目的として、抗 DENV ヒトモノクローナル抗体パネルの整備、結合特性評価、ならびにエピトープ構造解析系の構築を実施した。まず、DENV E タンパク質の Domain I~III に対応する各エピトープを認識する既報の中和抗体 12 種類について発現ベクターを構築し、Expi293F 細胞を用いた発現および精製を行うことで、既知エピトープを網羅する基準抗体パネルを確立した。次に、既報エピトープに限定されない抗体レパートリーを網羅的に取得するため、流行地域由来の末梢血単核細胞から E タンパク質特異的 B 細胞を高感度に検出・単離する系の構築を行った。各血清型 DENV およびジカウイルス（ZIKV）の E タンパク質について、C 末端に Avi-tag を付加するとともに、構造安定化変異を導入することで二量体形成を促進し、発現量および品質の向上を達成した。その結果、Expi293F 細胞 30 mL スケールの発現系において、各抗原あたり 0.3~4.3 mg の収量を安定的に得ることに成功した。これらの抗原を蛍光標識することで、フローサイトメトリーによる抗原特異的 B 細胞の高感度検出系を確立した。本検出系を単一細胞分離および培養系と組み合わせることで、デング熱流行地域由来末梢血検体から計 359 クローンの E タンパク質反応性ヒトモノクローナル抗体を新規に取得した。得られた抗体群について結合特性を網羅的に評価した結果、血清型特異的抗体 76 クローン、2~3 血清型に交差反応性を示す抗体 113 クローン、ならびに全血清型および ZIKV に反応する広域交差抗体 170 クローンに分類された。さらに、既報抗体を用いた競合結合試験系を構築し、広域交差抗体のエピトープ特異性に基づく詳細な解析を行った結果、94 クローンの新規エピトープ認識抗体を同定することに成功した。以上の成果により、実際のヒト感染において誘導される抗体応答を反映した、既知および新規エピトープを網羅する高品質なモノクローナル抗体パネルを整備した。本抗体パネルおよび解析基盤は、ワクチン候補抗原の抗原性評価および免疫原性予測に資する重要な基盤情報を提供するものであり、今後の合理的ワクチン設計の推進に大きく貢献することが期待される。

(3) 改変型 VLP 抗原の構造生物学的評価系の整備

フラビウイルスの外殻を形成するエンベロープ（E）タンパク質エクトドメインおよび pr タンパク質について分泌発現系を確立し、DENV-1~4、ウエストナイルウイルス（WNV）、日本脳炎ウイルス（JEV）について、E タンパク質および pr タンパク質の生産に成功した。E タンパク質は、細胞外領域のドメイン I~III を昆虫細胞で発現し、アフィニティおよびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって精製した。E タンパク質は、モノマーとオリゴマーが混在しており、SEC では 2 つのピークに分離した。収量は 4~24 mg/L であった。天然ウイルス粒子表面では E タンパク質は二量体構造をとり、二量体化 E タンパク質は中和抗体の標的となる。中間評価後に、ジスルフィド結合による架橋で二量体化した E タンパク質を設計し、HEK293 細胞で発現、精製した。SEC では高分子量側に単分散性のピークを示し、収量は 34~57 mg/L と大きく増加した。精製 E タンパク質に対してネガティブ染色を施し、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた構造解析を実施したところ、均一な二量体様粒子を確認することができた。pr タンパク質を HEK293 細胞で発現、精製したところ、モノマー、オリゴマー、凝集体が混在し単量体を分離することが困難であった。また、収量が 0.35 mg/L と非常に少なく改善策が必要となった。そこで、中間評価後に、スキュフォールドを付加した融合タンパク質を設計し、モノマー含有率および収量（3.9~16.5 mg/L）を大きく改善することに成功した。得られた精製タンパク質は VLP 抗原免疫マウス血清における E タンパク質または pr タンパク質結合抗体価の評価に使用し、ELISA 抗原として有用であることが確認できた。

【英文】

In this research and development project, we aimed to develop a Dengue Virus (DENV) vaccine with a reduced risk of antibody-dependent enhancement (ADE)—a phenomenon contributing to severe dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. We designed antigens by modifying epitopes of antibodies that trigger ADE and attempted to develop a vaccine using modified virus-like particle (VLP) proteins. As a result, we successfully constructed plasmids for expressing modified VLPs of DENV serotypes 1, 2, 3, and 4 in mammalian culture cells. Furthermore, by identifying host factors involved in the expression of Orthoflavivirus-derived VLPs and establishing cell lines overexpressing these factors, we achieved a maximum increase in VLP production of approximately 40-fold.

Following the interim evaluation, we mass-produced modified DENV2-derived VLP protein antigens using a transient expression system in Expi293F cells. We successfully purified enough from the culture supernatant to conduct immunogenicity trials in mice. For the immunogenicity tests using BALB/c mice, we selected AddaS03 as the adjuvant. This selection was based on preliminary tests using wild-type VLP antigens, where AddaS03 demonstrated the highest activity. Its formulation is identical to AS03, an adjuvant already in practical use. To compare the efficacy of VLP protein vaccines against other modalities and to set a control for ADE activity, we manufactured mRNA vaccines designed to express either wild-type or modified VLP antigens *in vivo*. Compared to wild-type VLP-mRNA, the modified VLP-mRNA showed a slight trend toward lower neutralizing antibody (nAb) titers against DENV2 and lower binding antibodies against the E protein. However, no significant difference was observed between the modified VLP-mRNA and the modified VLP protein antigen. Evaluation across all DENV serotypes revealed that sera from mice immunized with modified VLP protein or modified VLP-mRNA had significantly lower ADE activity against heterologous serotypes (DENV1, 3, and 4) compared to the wild-type VLP-mRNA group.

To evaluate protective efficacy, we used LysM Cre⁺*Ifnar*^{fllox/fllox} mice (which lack Type I interferon receptors specifically in myeloid cells) for a lethal DENV2 challenge. Mice immunized with modified VLP protein antigens failed to survive the lethal DENV2 challenge; all subjects succumbed to infection. Conversely, 100% of mice immunized with either wild-type or modified VLP-mRNA survived the lethal DENV2 challenge under identical conditions. Interestingly, in IFN- α /B/γRKO mice (lacking both Type I and II receptors), neither vaccine prevented death, likely because these mice could not mount a sufficient immune response. This confirmed that the LysM Cre⁺*Ifnar*^{fllox/fllox} mice model is more appropriate for vaccine evaluation. Analysis of breakthrough infection sera from surviving LysM Cre⁺*Ifnar*^{fllox/fllox} mice showed no significant difference in nAb titers between wild-type and modified VLP-mRNA groups. However, ADE activity was significantly lower in the modified VLP-mRNA group across all serotypes.

Based on these results showing the efficacy of the monovalent DENV2 vaccine, we proceeded to test a tetravalent modified VLP-mRNA vaccine. The tetravalent modified mRNA vaccine induced nAb titers comparable to the tetravalent wild-type mRNA vaccine for all serotypes, while maintaining significantly lower ADE activity. The tetravalent modified vaccine provided 100% protection against lethal challenges with DENV1, 2, and 3. While DENV4 protection could not initially be evaluated due to the lack of a lethal strain, we have since successfully developed a mouse-adapted DENV4 strain that causes lethal infection in this model. Future studies will utilize this strain to confirm protection.

To support rational vaccine design, we also established a comprehensive epitope mapping platform using human monoclonal antibodies. A reference panel of known neutralizing antibodies was generated, and a high-sensitivity system for isolating antigen-specific B cells from endemic-region samples was developed. Using fluorescently labeled recombinant E proteins, we isolated and characterized 359 human monoclonal antibodies, spanning serotype-specific, cross-reactive, and broadly reactive classes. Epitope mapping

identified numerous previously uncharacterized epitopes, providing a high-resolution view of human antibody responses to DENV.

In parallel, structural characterization systems for VLP components were developed. Recombinant E protein ectodomains and pr peptides from multiple flaviviruses were successfully expressed and purified. Stabilization of E protein dimers significantly improved structural homogeneity and yield, while scaffold-based fusion designs enhanced the yield and monomeric quality of pr peptides. These advances enable more precise structural and antigenic analyses of VLPs.

Collectively, our results demonstrate that the design concept of modified VLPs—when delivered via an mRNA platform—successfully induces neutralizing antibodies and provides protective immunity while suppressing ADE activity. This is a significant contribution toward developing a safer DENV vaccine. However, the VLP protein-based vaccine failed to demonstrate protective efficacy in this study, despite inducing neutralizing antibodies. The mechanism behind this discrepancy requires further investigation.