

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) LC-Plasma 経鼻接種による自然免疫メモリー誘導ワクチン開発
(英 語) Development of an intranasal *Lactococcus lactis* strain Plasma vaccine
inducing innate memory

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

研究開発代表者 氏名: (日本語) 俣野 哲朗
(英 語) Tetsuro Matano

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 所長
(英 語) Director-General, National Institute of Infectious Diseases (NIID),
Japan Institute for Health Security (JIHS)

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

パンデミックリスクの高い呼吸器ウイルス感染症の流行の制御は、公衆衛生学的観点で重要である。COVID-19 やインフルエンザに対する現行のワクチンは、効率よく中和抗体を誘導し優れた重症化防御効果を有するが、感染防御効果は十分ではなく、流行阻止は困難で、そのため変異株の出現・流行にいたっている。多様性の高い呼吸器ウイルスに対し幅広い交差性を有する感染防御免疫を誘導するワクチンの開発が期待される。ワクチンは一般的に中和抗体反応等の獲得免疫反応誘導を企図しているが、近年、抗原蛋白質を用いない自然免疫誘導ワクチンの可能性も模索されている。インターフェロン (IFN) 等のエフェクター反応の維持だけではなく、何らかの自然免疫メモリー (trained immunity) を誘導することができれば、曝露後反応の迅速性および幅広い交差性により感染防御に結びつくことが期待される。そこで本研究課題では、呼吸器ウイルス感染症に対する自然免疫メモリー誘導ワクチン開発を目指し、形質細胞様樹状細胞 (pDC) の活性化能を有することが報告されている *Lactococcus lactis* strain Plasma (LC-Plasma) を用いた上気道粘膜接種ワクチン開発を進め、臨床試験第 I 相進展に向け非臨床 POC 取得を目指した研究を展開した。

(1) LC-Plasma 経鼻接種の SARS-CoV-2 およびインフルエンザウイルスに対する感染防御効果の検証

マウス実験において、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンの SARS-CoV-2 感染防御効果を検証する目的で、不活化 LC-Plasma 経鼻接種後に SARS-CoV-2 (マウス適合株 QHmusX) 経鼻チャレンジ実験を行って、チャレンジ後の鼻腔洗浄液および鼻咽腔リンパ関連組織 (NALT) 中のウイルス RNA 量を定量した。その結果、LC-Plasma 経鼻接種群では、鼻腔洗浄液および NALT 中のウイルス RNA 量が対照群と比べて有意に低値を示し、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンの SARS-CoV-2 感染防御効果が確認された (非臨床 POC)。

この SARS-CoV-2 に対する感染防御免疫反応は、LC-Plasma 経鼻接種後 1 日目には強力に誘導されているが、このような感染防御免疫誘導の即時性は、従来の mRNA ワクチン等では認められないものである。一方、このように LC-Plasma 経鼻接種によって誘導される SARS-CoV-2 感染防御免疫の持続性についての検討として、マウス実験において維持される期間を調べたところ、一定の期間、維持されることを示す結果が得られた。さらなる実験から、LC-Plasma を繰り返し経鼻接種することによって、SARS-CoV-2 感染防御免疫を維持できると考えられた。

次に、マウス実験において、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンのインフルエンザウイルス感染防御効果を検証する目的で、LC-Plasma 経鼻接種後にインフルエンザウイルス経鼻チャレンジ実験を行って、チャレンジ後の鼻腔洗浄液および NALT 中のウイルス RNA 量を定量した。その結果、SARS-CoV-2 チャレンジ実験と同様、LC-Plasma 経鼻接種群では、鼻腔洗浄液および NALT 中のウイルス RNA 量が対照群と比べて有意に低値を示し、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンのインフルエンザウイルス感染防御効果が確認された (非臨床 POC)。

さらに、カニクイザルにおける SARS-CoV-2 チャレンジ実験においては、LC-Plasma 経鼻粘膜接種のみでは SARS-CoV-2 感染防御効果を示すことが難しかったものの、LC-Plasma の経鼻粘膜接種プラス経口腔粘膜接種により SARS-CoV-2 感染防御効果を示す結果が認められた (非臨床 POC)。そのため、まず LC-Plasma 上気道粘膜接種デバイスの至適化を推進中である。

(2) LC-Plasma 経鼻接種による誘導免疫の解析

マウス実験において、LC-Plasma 経鼻接種誘導免疫プロファイルを調べることにした。LC-Plasma 経鼻接種後 6 時間～1 日間に鼻腔由来細胞 (NP 細胞) を回収し、mRNA 発現レベルを解析した。その結果、接種後 6 時間をピークとする抗ウイルス IFN 誘導性遺伝子 (ISGs) 発現の上昇を確認した。これら Isg15 等の ISG 発現の上昇は、抗ウイルスエフェクター反応として、LC-Plasma 経鼻接種後の即時的な強い感染防御効果に寄与していると考えられた。

LC-Plasma は pDC 活性化能を有することを特徴とすることから、このような pDC 活性化能に乏しい乳酸菌として LGG を用い、マウス実験において、SARS-CoV-2 感染防御効果および誘導される免疫反応に関する比較検討を行った。その結果、LGG 経鼻接種後の SARS-CoV-2 経鼻チャレンジ実験では、感染防御効果は認められなかった。また、LC-Plasma 経鼻接種後にみられたような NP 細胞における即時的な強い ISG 発現上昇についても、LGG 経鼻接種では認められなかった。したがって、本研究で認められたウイルス感染防御免疫反応誘導能は、LC-Plasma 特異的であると考えられた。

次にマウス実験において、LC-Plasma 経鼻接種後の持続的な免疫反応を調べる目的で、NP 細胞の FACS 解析を行った。pDC 頻度については、LC-Plasma 経鼻接種群で、即時的な上昇が認められた後、短期間高値を示したが、経鼻接種後 1 週間の時点での解析では、対照群と同レベルに戻っていた。一方、LC-Plasma 経鼻接種群におけるマクロファージ頻度については、対照群と比較して高値を維持していた。

さらに、マウス実験において、LC-Plasma 経鼻接種後 1 週間の時点で回収した NP 細胞を用い、CpG 刺激培養後に RNA を回収して RNAseq 解析を行った。その結果、LC-Plasma 経鼻接種群由来の NP 細胞では、CpG 刺激培養によって、Isg15 等の抗ウイルス作用を有する ISG 発現が誘導されることが明らかとなった。本研究結果は、LC-Plasma 経鼻接種による抗ウイルス自然免疫メモリー誘導を示唆するものであると考えられる。

(3) LC-Plasma 製造法の検討

本研究では、LC-Plasma 上気道粘膜接種ワクチンの製造に向けて、ラボレベルにおいて、製造条件が品質特性に与える影響に関する基盤データを取得した。これらの知見を踏まえ、将来的な GMP を見据えた製法・管理基準を構築するとともに、構築した製法・管理基準の下、製造検証並びにその品質確認を実施し、大きな問題がないことを確認した。

以上のとおり、本研究課題では、LC-Plasma 上気道粘膜接種ワクチン開発を推進し、非臨床 POC 取得を目指した研究を進めた。まず、マウス実験において、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンの SARS-CoV-2 感染防御効果を確認した（非臨床 POC）。このウイルス感染防御免疫は、LC-Plasma の繰り返し経鼻接種によって維持されることが考えられた。さらに、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンのインフルエンザウイルス感染防御効果を確認した（非臨床 POC）。また、カニクイザル実験においては、LC-Plasma の経鼻粘膜接種プラス経口腔粘膜接種によって SARS-CoV-2 感染防御効果を示す結果が認められた（非臨床 POC）。これらの結果をふまえ、臨床試験進展に向けて、現在、まず LC-Plasma 上気道粘膜接種デバイスの至適化を推進中である。

LC-Plasma 経鼻接種による誘導免疫の解析では、まず、Isg15 等の抗ウイルス ISG の mRNA 発現の即時的な上昇を確認した。これらのエフェクター反応は、LC-Plasma 経鼻接種により即時的に誘導されるウイルス感染防御免疫反応に寄与していると考えられる。一方、LC-Plasma 経鼻接種後の NP 細胞におけるマクロファージ頻度の上昇も確認した。さらに、LC-Plasma 経鼻接種後 1 週間の NP 細胞を用いた CpG 刺激後の RNAseq 解析で、高い抗ウイルス ISG 発現誘導、つまり CpG 刺激に対する高反応性を示す結果を得た。この結果は、自然免疫メモリー誘導を示す新たなコンセプトとして重要であるとともに、LC-Plasma 経鼻接種ワクチンのウイルス感染防御効果に寄与するものと考えられる点でも重要である。

本研究結果から、LC-Plasma 上気道粘膜接種ワクチンは、抗ウイルス自然免疫メモリー誘導能を有し、SARS-CoV-2 およびインフルエンザの流行阻止に結びつくワクチンとして期待される。また、将来的には、呼吸器ウイルス感染症に対するワクチンとしての活用に向けた進展も期待される。

Control of respiratory viral infections is crucial for preventing pandemics. Current COVID-19 and influenza vaccines inducing neutralizing antibodies can inhibit disease progression but fail to prevent variant epidemics. Induction of broadly-reactive mucosal immune responses, particularly in the upper airway, is crucial for prevention of variant epidemics. Immunization for mucosal trained innate immunity cross-reactive to varieties of viruses and variants may be an important strategy for preventing respiratory viral epidemics.

We previously identified a lactic acid bacterial species, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805, also called *Lactococcus lactis* strain Plasma (LC-Plasma), which enhances host immune responses. LC-Plasma, but not other conventional bacterial species, can activate plasmacytoid dendritic cells (pDCs),

resulting in type I and III interferon (IFN) induction. The culture supernatant of pDCs stimulated by LC-Plasma has an inhibitory effect on the replication of viruses, including SARS-CoV-2. The present study investigated the protective efficacy of mucosal immunization with inactivated LC-Plasma against SARS-CoV-2 and influenza virus infections in animal models.

LC-Plasma-immunized mice showed significantly reduced viral loads in nasal washes and nasal-associated lymphoid tissues (NALT) compared to unimmunized mice after intranasal challenge with a mouse-adapted SARS-CoV-2 strain, QHmusX, indicating the protective efficacy of intranasal LC-Plasma immunization against SARS-CoV-2 infection. Further analyses imply that repeated intranasal LC-Plasma immunization can be a protocol for induction of durable protective immune responses. Intranasal LC-Plasma immunization also provided protection against intranasal influenza virus challenge in mice. Cynomolgus macaque experiments suggest the potential of mucosal LC-Plasma immunization in the upper airway to induce protective immune responses against SARS-CoV-2 challenge. Based on these results, we are working to optimize devices for mucosal LC-Plasma immunization in the upper airway towards clinical trials.

Immunological analyses using nasal passage-derived cells (NP cells) in mice revealed rapid induction of interferon-stimulated gene (ISG) expression, indicating innate immune effector induction after intranasal LC-Plasma immunization. pDC frequencies in NP cells increased and returned to the base level in less than a week, while macrophage frequencies were maintained to be higher after LC-Plasma immunization. NP cells from LC-Plasma-immunized mice showed significantly higher induction of anti-virus ISG mRNA expression by CpG stimulation, implying anti-virus innate memory-like immune induction.

Fundamental data were obtained at the laboratory scale on the impact of manufacturing conditions on quality attributes, with the aim of developing an intranasal LC-Plasma vaccine. Based on these findings, manufacturing processes and control standards were established with consideration for future GMP compliance. Furthermore, manufacturing verification and quality assessments were conducted in accordance with the established processes and control standards, and it was confirmed that no significant issues were identified.

In summary, this non-clinical study demonstrated the protective efficacy of intranasal LC-Plasma immunization against both SARS-CoV-2 and influenza virus infections, which would contribute to the control of variant epidemics. Immunological analyses indicate the potential of mucosal LC-Plasma immunization to induce protective innate memory-like immune responses against respiratory viral infections in the upper airway. Because innate immunity has broader cross-reactivity compared to acquired immunity, LC-Plasma immunization may have the potential to induce protective immune responses against infection with a wide variety of respiratory viruses.