

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）感染症ワクチンの細胞性免疫迅速測定系構築と on/off-target 評価に関する研究
（英 語） Study of construction of rapid cell-mediated immunity assay system and
on/off-target evaluation of infectious disease vaccine

研究開発実施期間：令和 5 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）山口照英
（英 語）YAMAGUCHI, Teruhide

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）学校法人都築学園 日本薬科大学・薬学部・客員教授
（英 語）Visiting Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nihon Pharmaceutical University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

研究の背景

感染症ワクチンはウイルス等に対する液性免疫を誘導するのみならず、ウイルスに感染した細胞を傷害して除去する細胞性免疫の誘導により感染防御を行うものもある。生ワクチン・LNP-mRNA ワクチンによる細胞性免疫には、感染細胞を傷害する on-target と、正常細胞・組織を傷害する off-target（交叉細胞性免疫）がある。新型コロナワクチン接種では市販後に様々な有害事象も報告され、その一部は正常組織への免疫学的 off-target によると想定される。

細胞性免疫評価にかかる既存競合技術として、混合リンパ球試験および ELISPOT アッセイがある。それぞれ Targe 細胞傷害や IFN γ 分泌を指標としているため長時間の培養が必要で、ワクチン有効性・安全性の適切な担保の観点から、市販後臨床評価にも展開可能な新規技術の開発が待たれていた。

これら必要性に応えるべく、非臨床・治験・市販後に外挿性のある迅速高感度な細胞性免疫評価技術を開発、その結果を反映した感染症ワクチン細胞性免疫応答評価ガイダンス（案）を提言することが望まれている。

令和 5 年 12 月、COVID-19 に対する mRNA ワクチン 2 製品が承認され、我が国では 4 製品が投与可能となった。新規承認ワクチンでは非増殖型 mRNA が増殖型へとモダリティーが進化、さらに常温保存できる lipid

nanoparticle (LNP)も使用されている。mRNA/LNP ワクチンが off-target (目的外) 毒性を生じ心筋炎など多くの細胞傷害性臓器障害をきたすとの報告もなされている。

研究の成果：

令和5年度においては、ワクチン細胞性免疫 (on-target) 有効性評価法、ならびに抗原の交差提示による細胞性免疫 (off-target) 毒性評価法の開発を中心に行った。有効性評価法の開発に向けては、ポリオ生ワクチン/LNP-mRNA を非臨床投与し、血液から T 細胞を回収、ポリオ感染/LNP-mRNA 投与ヒト細胞に細胞傷害性を発揮するか検討した。具体的に、細胞性免疫を誘導可能なポリオウイルスワクチン/LNP-mRNA 投与動物を用いてリンパ球混合培養 (MLR) にて検証することとし、ポリオ生ワクチン/LNP-mRNA を投与したマウスの血液から CD8 陽性分画、及び各種体細胞、及び樹状細胞 (DC) を用い、on-target を目的にポリオ生ワクチン感染/LNP-mRNA 投与細胞 (抗原提示細胞) と当該 CD8 陽性分画 T 細胞を混合、LDH 放出試験にてリンパ球混合培養 (Mixed Lymphocyte Reaction; MLR) による細胞傷害活性を確認した。細胞性免疫 (off-target) 毒性評価法の開発に向けては、ポリオ生ワクチン/LNP-mRNA を非臨床投与し、血液から T 細胞を回収、ポリオ非感染ヒト細胞に交叉細胞性免疫による細胞傷害性を認めるか検討した。ポリオ非感染ヒト細胞に交叉細胞性免疫による細胞傷害性は、マウス・ヒト間の異種細胞間での細胞傷害を認め、種の壁を超える試験系の検討が必要であることが明らかとなり、細胞融合からヒト細胞から mRNA を抽出、mRNA-LNP としてマウス細胞に loading することで解決可能との結論に至った。次年度以降の MI-FCM 技術の免疫シナプス迅速高感度測定への展開にむけ、細胞性免疫評価のための免疫シナプス形成法の基礎検討を行った。陽性コントロールとして同一動物から DC を分離し、ポリオウイルス感染/LNP-mRNA により免疫シナプスの構築が起ることを確認、細胞性免疫評価のための免疫シナプス形成法の最適化を目指した。免疫シナプスの構築は、effector 細胞と target 細胞の混合の後速やかに形成されることが明らかとなった。ガイダンスに反映させる off-target 毒性評価に資するヒト正常組織・細胞/代替細胞株 panel の構築にむけては、抗体製剤の目的外組織傷害性評価に用いられている FDA organ panel を参考に、ヒト正常組織 panel をリスト化にむけ検討を行った。ヒト正常組織 panel 臓器・組織のうち、約半数の臓器・組織から抽出された mRNA が入手可能であり、代替となる細胞株についても、ATCC に登録されているかの検索を継続してきた。

令和6年度においては、感染症ワクチンの細胞性免疫の迅速高感度 on-target (目的細胞性免疫) と off-target (目的外交叉細胞性免疫) 評価系を構築し、有効性・安全性の適切な担保の視点からガイダンス (案) に展開することを目的とし、(1) ワクチン細胞性免疫 on-target 評価、(2) off-target 毒性評価、(3) MI-FCM 技術の迅速高感度評価系への展開、ならびに (4) off-target 毒性評価に資するヒト正常組織・細胞/代替細胞株 panel の構築を行い、最終年度での (5) 感染症ワクチン細胞性免疫応答評価ガイダンス (案) の作成を目指した。具体的に、(1) on-target 評価、(2) off-target 毒性評価では、生ワクチンではその増殖特性や指向性を理解したうえで、種差・投与経路を考慮したワクチン細胞性免疫評価 (on/off-target 評価) を行うべきとの示唆が得られ、ガイダンス (案) に反映させることとした。ついで、mRNA ワクチン (BNT162b2) において、修飾核酸起因+1 frameshift による想定外タンパクを neoantigen とする off-target の可能性が示されたことから、BNT162b2 に+1 frameshift mRNA-LNP ワクチンを設計、コストイベ®、ダイクロナを対照とし、neoantigen peptide pool を用いて ELISPOT を実施している (3) Molecular Imaging-Flowcytometry (MI-FCM) 技術の迅速高感度評価系への展開として、MI-FCM の機序検討として、コミナティ®接種マウスの PBMC と接着細胞を共培養し、MLR 陽性検体で免疫シナプスを観察した。このことから、MI-FCM は MLR に外挿性があり、検証は可能との成果を得た。(4) では、FDA tissue/organ panel を参考にして off-target 毒性評価に資するヒト正常組織・細胞/代替細胞株 panel の構築を進め、評価すべき 18 臓器・組織とその主要構成細胞種とその絞り込みを完遂、panel 提示を完遂した。

令和7年度においては、これら研究成果並びに収集情報を踏まえ、(5) 感染症ワクチン細胞性免疫応答評価ガイドンス(案)の作成を完遂した。

令和7年度は、これまで確立した MLR 法、MI-FCM 法、細胞パネル技術、および+1 frameshift mRNA モデルを統合し、特に「+1 frameshift」により生じる neoantigen と、それに対する細胞性免疫応答について重点的に検討した。まず、ワクチンの on-target 有効性評価として、mRNA モデルワクチンを投与したマウス由来 T 細胞を用い、mRNA 導入 target 細胞との反応性を解析した。その結果、MLR 法では LDH 放出増加、MI-FCM 法では immuno-capping 形成を認め、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることを確認した。次に、off-target 毒性評価では、+1 frameshift 由来 neoantigen peptide に対する ELISPOT 解析により、+1 frameshift を惹起しうる mRNA モデルワクチンでは、生体内で+1 frameshift が生じ、neoantigen が発現する可能性を示唆する成績が得られた。さらに、MI-FCM 法でも免疫シナプス形成増加や effector-target 細胞接着増加を認め、cross reactive CTL の存在を示唆する結果も得られた。また、+1 frameshift 由来 neoantigen と自己抗原との相同性解析を行った結果、生体タンパク質との部分的相同性が示唆された。

研究成果の意義：

本研究は、mRNA ワクチンにおける frameshift 由来 neoantigen が細胞性免疫系に認識され、off-target 作用を引き起こす可能性を示した点で重要である。今後の感染症ワクチン非臨床評価では、液性免疫だけでなく、on-target および off-target 細胞性免疫評価を含めた新たな安全性評価も必要であると考えられ、感染症ワクチン非臨床評価ガイドンス(案)としてとりまとめた。

This study aimed to establish a comprehensive evaluation platform for cellular immune responses induced by infectious disease vaccines, particularly LNP-mRNA vaccines, focusing on both on-target efficacy and off-target toxicity. Across FY2023-FY2025, mixed lymphocyte reaction (MLR) assays, Molecular Imaging-Flow Cytometry (MI-FCM), human tissue/cell panels, and +1 frameshift mRNA models were integrated to develop a draft guidance for nonclinical cellular immunity evaluation of infectious disease vaccines.

In FY2023, methods for evaluating vaccine-induced cellular immunity were established using live attenuated poliovirus vaccines and LNP-mRNA formulations. CD8-positive T cells collected from immunized mice demonstrated cytotoxic activity against antigen-presenting target cells in MLR assays, confirming induction of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Simultaneously, off-target evaluation systems were explored by assessing cross-reactive cytotoxicity against non-infected human cells. Species barrier-related cytotoxicity observed in mouse-human co-culture systems highlighted the necessity of alternative assay strategies. Fundamental studies of immune synapse formation were also initiated to support future MI-FCM-based rapid cellular immunity analyses.

In FY2024, rapid and highly sensitive systems for evaluating both intended (on-target) and unintended cross-reactive (off-target) cellular immunity were further developed. Studies using live vaccines suggested that cellular immunity evaluation should account for viral tropism, replication characteristics, species differences, and administration routes. Furthermore, investigations of the mRNA vaccine BNT162b2 suggested the possibility that modified nucleic acid-derived +1 frameshifts may generate aberrant proteins functioning as neoantigens. Therefore, +1 frameshift mRNA-LNP model vaccines were designed, and ELISPOT assays using neoantigen peptide pools were performed. MI-FCM analyses demonstrated immune synapse formation in MLR-positive samples, supporting the applicability of MI-FCM as a rapid cellular immunity evaluation platform. In parallel, a human tissue/cell panel comprising 18 major organs and tissues was established based on FDA tissue/organ panels to support off-target toxicity evaluation.

In FY2025, all previously established technologies were integrated to finalize a draft guidance for evaluation of cellular immune responses to infectious disease vaccines. Using +1 frameshift mRNA model vaccines, MLR assays demonstrated increased LDH release, while MI-FCM analyses revealed immuno-capping formation and enhanced immune synapse formation, confirming CTL induction. ELISPOT analyses further suggested that +1 frameshift events occurring in vivo could generate neoantigens recognized by the cellular immune system. Moreover, cross-reactive CTL responses and increased effector-target cell adhesion were observed, suggesting the possibility of off-target cellular immune reactions. Homology analyses additionally indicated partial sequence similarity between +1 frameshift-derived neoantigens and endogenous proteins.

Collectively, these findings suggest that frameshift-derived neoantigens generated by mRNA vaccines may induce off-target cellular immune responses. The study therefore highlights the importance of incorporating both on-target and off-target cellular immunity assessments, in addition to conventional humoral immunity evaluations, into future nonclinical safety assessments of infectious disease vaccines.