

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「新興・再興感染症のリスク評価と危機管理機能の実装のための研究」
分担研究報告書

SARS-CoV-2を標的としたDNAワクチンに関する研究

研究分担者 森下竜一 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学
中神啓徳・林宏樹 同健康発達医学講座

研究要旨

COVID-19の感染拡大に対峙し、SARS-CoV-2表面のスパイク蛋白を標的としたDNAワクチンの迅速開発を行った。プラスミドDNAの構築を行い、培養細胞でその蛋白発現を確認した後に、ラットに筋肉内投与・皮内投与を行った。初回投与4週後（最終投与2週後）より、スパイク蛋白および受容体結合部位に対する抗体価の上昇を認め、半年以上抗体価は持続していた。また、抗体の中和活性を確認し、細胞性免疫の評価として、エリスポットアッセイでのIFN- γ 発現の上昇を確認した。これらの予備的な検討をもとにして、その後の非臨床試験・製剤開発・臨床試験を実施中である。

A. 研究目的

- COVID-19の世界的な感染拡大により、我々は常に新規ウイルスの脅威に晒されていることが明確となった。世界中の人が急速に行き来する現代社会では、公衆衛生的な初期対策としての検疫強化による水際作成、患者の隔離による封じ込めだけでは感染のコントロールは難しい。未知の感染症の感染力・重篤度・潜伏期間などの情報が分からない中で、迅速にワクチンを供給することが出来れば、医療の最前線の従事者、ハイリスクの患者の罹患率を少しでも低下させることが可能となる。ウイルス拡散のスピードを抑え、流行の規模を小さくすることで医療・社会機能の破綻を防ぎ、全体の被害をかなりの程度抑えられる可能性がある。
- DNAワクチンは遺伝子配列が特定されれば迅速な製造が可能であり、いち早くワクチン製造を開始できる長所がある。今回のCOVID-19の場合、ワクチンで変異した部位に特異的な

抗体産生を惹起するには分析が必要であるが、コロナウイルスに共通したスパイク蛋白の部位に対する抗体産生誘導を目指したDNAワクチンは迅速に合成可能である。

- プラスミドDNAによる遺伝子導入はゲノムへの挿入がほとんどなく安全性が高い遺伝子治療であるが、遺伝子導入効率が低いことが課題である。この課題に対し、株式会社ダイセルとの共同開発で火薬を駆動力とした無針注射器を開発することで、免疫担当細胞が多く局在する比内への高効率な遺伝子導入が可能となった。DNAワクチンは遺伝子を細胞内で発現させて自己蛋白として抗原配列を発現させることができることから、ペプチドワクチンや組み換え型蛋白を用いたワクチンに比べてT細胞活性化能が優れていることが報告されている。
- SARSやCOVID-19などの新しいウイルス感染のパンデミックに対して、迅速に予防ワクチンを提供するためのDNAワクチン基盤技術を開発する必要がある。

確立することを目的とする。

B. 研究方法

- SARS-CoV-2 はスパイク蛋白の S1 の部位で細胞と結合することが知られており、感染防御のためにスパイク蛋白に対する抗体を産生することを旨とした。そこで、この S1 配列を含むスパイク蛋白全長の遺伝子発現をプラスミドに挿入し発現ベクターを構築した。
- 国立感染研究所から SARS-CoV-2 のウイルス RNA を入手し、RT-PCR で必要な遺伝子をクローニングし、さらにコドン最適化などの改良した配列を発現ベクター (pVAX) に組み込み、同時並行でヒト用の GMP での原薬・製剤合成に着手した。
- 今回用いる予定の新規デバイス (無針注射器) は動物実験においてはすでに (株) ダイセルから発売が開始されており、その経験を元にヒト用デバイスを開発した。火薬による短時間での強力な駆動力により針を用いることなく薬液が皮膚を通過できることに加えて、免疫担当細胞が豊富な皮内に高効率な遺伝子導入が可能となった。
- ラットに SARS-CoV-2 を標的とした DNA ワクチンを筋肉内・皮内に投与し、抗体価・シールドウイルスを用いた中和活性・SARS-CoV-2 を用いた中和活性・ACE2 (受容体) とリコンビナント SARS-CoV-2 との結合阻害活性・エリスポットアッセイ (IFN- γ) など、免疫応答に関する初期検討を行った。

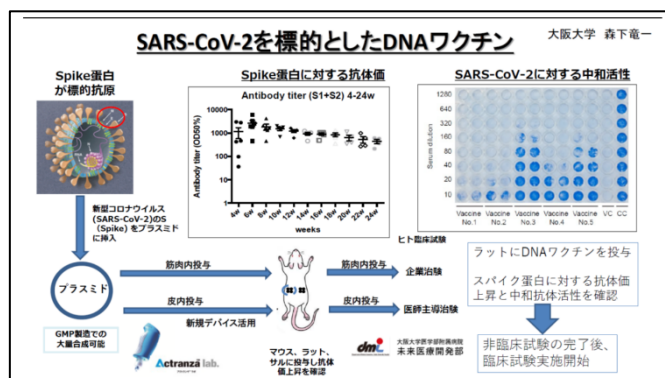
(倫理面への配慮)

- 基礎研究は組み替えDNAおよび動物実験プロトコルの大阪大学大学院医学系研究科での承認をうけている。組み換えDNA実験に関しては文科省大臣確認も行った。加えて本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施する。「動物の愛護および管理に

関する法律」(昭和48年法律第105号)「研究機関などにおける動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年度厚生労働省告示第71号)

C. 研究結果

- プラスミド DNA を 293 細胞で一過性に発現させ、蛋白発現を western blot および免疫染色で確認した。
- SD ラットに 2 週間隔で 3 回プラスミド DNA を投与した。筋肉内投与はアジュバント製剤を同時投与したが、皮内投与は新規デバイスを用いてアジュバント無しで DNA ワクチンのみを投与した。
- 筋肉内投与および皮内投与において、初回投与 4 週後 (最終投与 2 週後) からスパイク蛋白および受容体結合領域 (RBD) に対する抗体価の上昇を確認した。その後、半年以上効果は持続した。
- 抗体の中和活性を検討するために、VSV シュ



ールドウイルスおよび SARS-CoV-2 を用いて検討を行ったが、抗体価と比例した中和抗体活性が確認できた。

- また、ワクチン投与後の脾臓細胞を用いてエリスポットアッセイを実施した結果、SARS-CoV-2 蛋白反応性の IFN- γ の発現上昇が確認できた。
- 上記の薬効評価試験と並行して、非臨床試験の予備試験として、反復投与毒性試験および局所刺激性試験を実施した。主たる所見は、投与部位の発赤・腫脹であったが、数日で改善が認められる可逆的な変化であった。

- 上記の結果をもとに、別途 AMED からの助成金を活用しながら、臨床試験に向けた非臨床試験、製剤準備、臨床試験を進めた。

D. 考察

- 本研究では、COVID-19 に対する迅速ワクチンの開発を目指し、遺伝子配列を元にプロトタイプ DNA ワクチンを合成し、抗体価の上昇および中和抗体を動物実験で確認することが出来た。
- 情報収集が充分でなく、実験試薬などの物流に不自由がある中では、比較的迅速な初期検討が出来たと思われるが、ファイザーや Moderna の RNA ワクチンやアストラゼネカのアデノウイルスワクチンの開発スピードには大きく後れを取る結果となったのは残念である。
- 産学連携体制で、製剤の開発・合成はタカラバイオ株式会社とアンジェス株式会社が担当、新規デバイス開発は株式会社ダイセルが担当し、薬効評価試験は大阪大学で担当する共同作業で進められた。また、ウイルスおよびデュードウイルスを用いたウイルス感染に関する評価は、大阪大学微生物学研究所の協力を得て進めることが出来た。
- 新興感染症に対する迅速ワクチン開発に対峙するには、研究室単位では開発スピードにも限界があり、迅速ワクチンの開発は早期からのチーム開発体制が必要であることを実感した。

E. 結論

- COVID-19 に対する迅速ワクチンの開発を目指し、遺伝子配列を元にプロトタイプ DNA ワクチンを合成し、抗体価の上昇および中和抗体を動物実験で確認した。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

「新型コロナウイルス感染症に対するワクチン開発」
中神 啓徳 第41回日本臨床薬理学会学術総会、2020/12/3、国内、Web<口頭>

「Development of DNA vaccines targeting SARS-CoV-2」Hironori Nakagami第49回日本免疫学会学術集会、2020/12/8、国内、Web<口頭>

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし