

令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	新型コロナウイルス感染症における抗ウイルス IgA 抗体の役割
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部微生物学講座・角田郁生 共同研究者：薬学部医薬薬学科/薬学研究科・中山隆志、生物理工学部医用工学科・正木秀幸、理工学部生命学科・川下理日人/中村優美和、医学部微生物学講座・尾村誠一/スندگان・カドカ

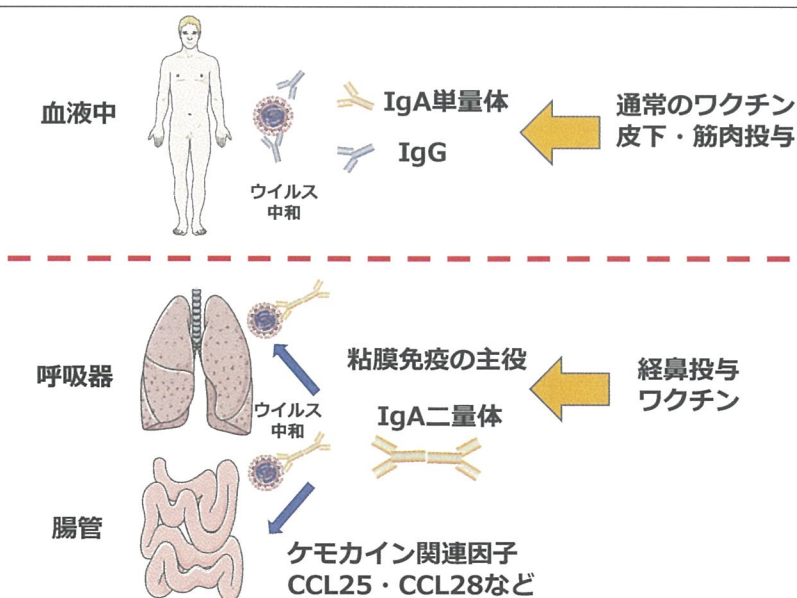
1. 研究、開発・改良、提案目的・内容

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) はプラス鎖 (+) 一本鎖 RNA をゲノムとして持つ RNA ウイルスで、呼吸器粘膜上皮に感染することで肺炎をきたす。SARS-CoV-2 は呼吸器症状以外にも多様な症状をきたすことが報告されており、特に神経症状の併発は重篤である。SARS-CoV-2 感染では、抗ウイルス免疫反応の指標として、血中 IgG 抗体が測定されている。一方、気道粘膜で感染防御に働くものは IgA であるが、粘膜 IgA の SARS-CoV-2 感染制御における役割は十分な研究がなされていない。そこで本研究では、SARS-CoV-2 排除において理論的にもっとも有効な気道粘膜での IgA 産生機構について明らかにし、IgA 誘導ワクチン開発の基礎研究となることを目的とする。

従来のワクチンのほとんどは皮下・筋肉注射などによるため、IgA の有効な誘導ができない。我々は SARS-CoV-2 ワクチンを経鼻投与することにより、呼吸器粘膜および所属リンパ組織で IgA 産生細胞を誘導し、経鼻免疫の有用性を明らかにする。これと並行して、(+) 一本鎖 RNA ウイルスのマウス感染モデルを使用することにより、CNS で IgA が感染防御に働いている可能性を検証する。また、本研究では SARS-CoV-2 の標的臓器 (呼吸器・CNS) に有効に IgA 産生細胞をリクルートする機構を解明する。

2. 研究、開発・改良、提案経過及び成果

SARS-CoV-2 の感染予防を目的に、現在ワクチン開発が試みられているが、そのほとんどは血中の抗 SARS-CoV-2 IgG の誘導を期待するものである (右図)。しかし、SARS-CoV-2 の感染する呼吸器・腸管の粘膜感染防御の主体は IgA であり、IgG ではない。また、過去の SARS-CoV-2 回復者の血中抗 SARS-CoV-2 IgG は数か月しか持続しないと報告されている。気道・唾液中のウイルスに対する感染制御には、従来の皮下・筋肉注射によるワクチンでは粘膜免疫の誘導が不十分であり、理論的には鼻腔免疫が有効である。ところが、実臨床では、ワクチン



として経鼻接種されているのはインフルエンザウイルスに対する弱毒生ワクチンのみというのが現状である。そこで我々は、実験的に、SARS-CoV-2 の S 蛋白を含むナノ粒子を作成し、これをマウスの鼻腔に免疫し、ウイルスに対する粘膜 IgA、特に唾液中の IgA 産生誘導を試みた。

S 蛋白ナノ粒子ワクチンは、単独あるいはアジュバントに混合して、マウスに三回の鼻腔投与による免疫を行った。コントロールとして通常の皮下注射によるワクチン接種も行った。最終免疫後に、唾液、血清、気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid: BALF) を採取し、IgG と IgA の濃度を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) にて定量した。また鼻腔免疫によって、IgA の産生細胞

の誘導が期待される鼻粘膜周囲関連リンパ組織 (Nasopharyngeal-associated Lymphoid Tissue: NALT)も採取し、Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) 法にて IgA 産生細胞の頻度も定量した。我々は、S 蛋白ワクチンの鼻腔免疫により、S 蛋白特異的 IgA および IgA 産生細胞が誘導されることを見出したが、効率の高い IgA 産生にはアジュバントの投与が不可欠であった。

なお、本研究では、マウスの唾液を採取し、これより IgA の定量を行ったが、これはヒト SARS-CoV-2 感染の場合、サンプル採取は唾液が簡便性と感度において優れていることが示されているためである。ところが、マウスの唾液採取は、実験的に頻用されない手技であり、非侵襲的かつ経時的に採取するのに熟練が要するとされていた。そこで我々は既報の手技を改変し、これまでよりも容易に、かつ比較的多量の唾液をマウスから非侵襲的に採取する方法を確立した(右図)。本研究で我々は、動物モデルを用いて唾液中の IgA のモニタリングをするシステムが確立したが、この方法は、有効な鼻腔 SARS-CoV-2 ワクチンの開発に有用な手段となりうる。



簡便なマウスの唾液採集方法

マウスを麻醉下にピロカルピン投与、気道閉塞の防止と体温調節のため傾斜(15°)をつけた恒温プレート(38°C)上に頭を下に向けて仰臥位で静置する(写真左)。5 mm 大の綿球をマウスの口元に据え置き、分泌された唾液を綿球に吸収して回収する(写真右)。

タイラーマウス脳脊髄炎ウイルス (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus: TMEV) は、SARS-CoV-2 と同じくプラス鎖(+)一本鎖 RNA ウィルスで、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis: MS) のウィルスモデルの中で最も歴史があり頻用されている。TMEV モデルは、マウス脳内接種により中枢神経系 (Central Nervous System: CNS) に二相性(急性期と慢性期)の病変を惹起する。ウィルス感染の急性期では灰白質の神経細胞に感染して灰白脳脊髄炎を、慢性期では白質のグリア細胞・マクロファージに持続感染し MS 類似の炎症性脱髄病変 (TMEV-Induced Demyelinating Disease: TMEV-IDD) を引き起こす。

TMEV モデルにおける抗体の役割は、急性期には中和抗体としてウィルス排除に働き、慢性期にはウィルスと髄鞘の分子相同性による脱髄抗体として脱髄増悪に働きうることが報告されている。我々は TMEV モデルにおいて、脊髄におけるアイソタイプ抗体の発現量順位が IgA > IgG2c > IgG2b > IgG1 となり、かつこれらの発現量が血清中の抗 TMEV アイソタイプ抗体価と相関していることを見出した。また、IgA の沈着と IgA 陽性細胞が CNS の脱髄病変部位に局限していたことから、IgA の役割として持続感染しているウィルスの排除に働く善玉、あるいは脱髄の誘導に関与する悪玉の二つの可能性が示唆された。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・改良、提案計画

本研究で、ナノ粒子ワクチンによる鼻腔免疫により、SARS-CoV-2 に対する粘膜免疫の誘導に成功したが、ナノ粒子ワクチンは粘膜免疫のみならず細胞傷害性 T 細胞の誘導も実証されている。現在、SARS-CoV-2 の S 蛋白と N 蛋白の両者を含むナノ粒子ワクチンを開発中で、これにより、IgA と細胞傷害性 T 細胞を効率よく誘導することを試みている。SARS-CoV-2 は、症例によっては感染が長期に持続することが知られ、ひとたび細胞内に侵入したウィルスの排除には、抗体だけでは不十分で、細胞傷害性 T 細胞の誘導が必須である。この SARS-CoV-2 ワクチンの改良により、より有効なウィルス排除が達成できることが期待される。

マウスに TMEV を経口投与することで予め抗 TMEV 免疫を誘導すると、非投与群よりも TMEV 脳内接種後の CNS でのウィルス増殖が抑えられることが報告されている。つまり、粘膜免疫の誘導が CNS 感染防御に役割を果たしている可能性が考えられる。経口免疫と同様に、粘膜免疫の誘導には鼻腔免疫が有用である。そこで我々は、TMEV 脳内接種前にマウスを鼻腔免疫し、感染後に経時的に唾液採取することで、1) 唾液中のウィルス量と TMEV 特異的 IgA 量の定量を行うとともに、2) 鼻腔免疫が CNS からのウィルス排除に影響を及ぼすか検討を行うことで、TMEV モデルにおける IgA の役割を解析している。本研究で確立した唾液採取の方法・鼻腔免疫法を利用し、鼻腔免疫と CNS・唾液中に含まれるウィルス・IgA 量の関連を調べる新規のモデルシステムとして改良していく計画である。

さらに我々は、IgA 単量体(血中に存在)・IgA 二量体(粘膜に存在)と SARS-CoV-2 の S 蛋白質の相互作用を、分子モデリングにより解析し、ウィルス中和機構を *in silico* の系でも併せて解明していく計画である。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
別冊 BIO Clinica 北隆館	雑誌	令和2年12月30日
Emerging Infectious Diseases, CDC	雑誌	令和3年4月(投稿予定)

5. 開発・改良、提案課題の成果発表等

1. 中村優美和, 朴雅美, 角田郁生. 多発性硬化症ウイルスモデルにおける唾液 IgA 検出システムの確立: 新型コロナウイルス・ワクチン開発への応用. 別冊 BIO Clinica 25: 98-102, 2020.
2. Park A-M, Omura S, Tsunoda I. Bacteria and fungus cultures from face masks during the COVID-19 pandemic: Effects of the repeated use and materials of masks in Japan. In preparation for Emerg Infect Dis.