

## 研究題目 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)表面タンパク抗原に対する 新規粘膜アジュバントの免疫応答性の検証

### 研究組織

研究代表者：片岡宏介（徳島大学大学院医歯薬学研究部）

共同研究者：木戸博（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：高橋悦久（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：吉松英樹（大阪歯科大学口腔衛生学講座）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

本研究は、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の wild 株および複数の変異株の表面タンパク抗原に対する新規粘膜アジュバントの免疫応答性、特に初感染予防を目的とした唾液 IgA 抗体誘導を比較検討することを目的とした。

我々はこれまで、樹状細胞(DC)の増殖能を有し、活性化を誘導するサイトカイン flt3 ligand (FL)を発現する DNA プラスミド(pFL)と、Toll-like Receptor (TLR)-9 を刺激することで自然免疫を応答を誘導する CpG オリゴデオキシヌクレオチド 1826 (CpG ODN)を併用したダブル DNA アジュバント(DA)と抗原をマウスに経鼻投与した時、抗原特異的免疫応答が唾液腺をはじめとする粘膜部および全身系において誘導されることやその誘導メカニズム、そして誘導抗体の機能についての報告を行ってきた(Kataoka K. et al. *J. Immunol.* 2004, Fukuiwa T. et al. *Vaccine*, 2008, Fukuyama Y. et al. *J. Immunol.* 2010 & 2011, Kataoka K. et al. *Infect. Immun.* 11, Kobuchi K. et al. *BMC Oral Health*, 2019, Kataoka K. et al., *Front Immunol*, 2021, Yoshimatu H. et al., *Vaccine*, 2022, Koyanagi K. et al. *BMC Oral Health*, 2023 他)。

本研究では、まず、上記に示した新たな粘膜アジュバント DA を用い、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)複数株の表面タンパク抗原に対する唾液抗原特異的 IgA 抗体誘導の検証を行った。

#### [1-2]研究の方法・経過

抗原には SARS-CoV-2 武漢株(WT)、デルタ株( $\delta$ )、オミクロン B. 1. 1. 529 株(B. 1)、オミクロン BA. 2 株(BA. 2)由来 Spike S1 タンパク抗原(Acro BYOSYSTEM) (5  $\mu$ g/匹)と DA (pFL 50  $\mu$ g と CpG ODN 10  $\mu$ g/匹)を 8 週齢 C57/BL6N マウス (1 グループ; N= 5) に週 1 回 3 週連続経鼻投与し、最終投与から 1 週間後にマウス唾液サンプルを回収、ELISA 法により抗原特異的 IgA 抗体価測定を行った。

また、現在経鼻投与したマウスからの血漿中 IgG 抗体価を ELISA 法による測定を行っている。さらに ACE2 発現細胞株(Human ACE2 293T Cell Line, #631289, Takara)と SARS-CoV-2 シュードウイルス(Lenti-X SARS-Co-V-2 Packaging Single Shots, WT Spike, Full Length, #Z2668N, Takara)を用い、経鼻ワクチン投与したマウス唾液中 IgA 抗体の中和能測定を行うための準備に取り掛かっている。

### 【2】研究成果

#### [2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

経鼻ワクチン投与後の唾液中抗原特異的 IgA 抗体価については、WT および $\delta$ 株由来 spike S1 タンパク特異的抗体の誘導が認められ、DA のみを投与したネガティブコントロール群マウスの唾液中 IgA と比較し有意な誘導が認められたが、B. 1 および BA. 2 株由来 spike S1 タンパク特異的抗体については誘導が認められなかった。([3-3]成果資料等 Fig.1 参照)

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究で用いられた経鼻アジュバント DA は、感染初期に流行した武漢株やデルタ株に対する表面抗原に対する唾液中抗原特異的 IgA 抗体は誘導することが可能であるが、近年の変異株に対しては誘導する可能性が低く、変異株に対しては、異なる表面抗原を探索する必要がある。また、誘導された唾液中抗原特異的 IgA 抗体によるウイルス中和能を有するデータが蓄積し、本経鼻ワクチンの初感染予防効果を示唆したいと考える。

### [3] 主な発表論文等

[3-1]論文発表

\*corresponding author

1) Koyanagi K., \*Kataoka K., Yoshimatsu H., Fujihashi K., Miyake T. Human salivary protein-derived peptides specific-salivary SIgA antibodies enhanced by nasal double DNA adjuvant in mice play an essential role in preventing *Porphyromonas gingivalis* colonization: an in-vitro study. BMC Oral Health 23:123, 2023.

2) \*片岡宏介, 吉松英樹, 柳沢志津子, 三宅達郎. 「口腔感染症および非感染性疾患予防を目指した粘膜ワクチンの開発」-新たな経鼻ダブル DNA アジュバントシステムによる健康長寿社会への貢献-. 日本口腔衛生学会雑誌 73(1):13-20, 2023.

3) \*片岡宏介. Development of Mucosal Vaccines as Novel Preventive Methods against Infectious and Noncommunicable Diseases (NCDs): Contribution to a Society of Health and Longevity. J Oral Health Biosci 35(1) :27-32, 2022.

4) 葛西礼衣, 福井誠, 柳沢志津子, \*片岡宏介. 1,450 ppm フッ化物配合歯磨剤によるブラッシング後の安静時唾液中フッ化物イオン濃度の残存状況に関する報告. 日本口腔衛生学会雑誌 72(3) :173-177, 2022.

5) Yoshimatsu H., \*Kataoka K., Fujihashi K., Miyake T., Ono Y. A nasal double DNA adjuvant system induces atheroprotective IgM antibodies via dendritic cell-B-1a B cell interactions. Vaccine 40 (8) :1116-1127, 2022.

[3-2]学会発表

1) 李前穎, 片岡宏介, 吉松英樹, 小柳圭代, 黄哲麒, 楊世傑, 北山貴也, 坂本由紀子, 久堀綾子, 河村佳穂里, 土居貴士, 三宅達郎. ダブル DNA アジュバント経鼻投与による脾臓制御性 T 細胞の誘導と血漿中 IL-10 産生. 第 33 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会,

高知, 10月10日, 2022年

2) 楠本豊, 片岡宏介. 特異的光ラベルによる舌下免疫細胞クラスター構成細胞の解明. 第 64 回歯科基礎医学会学術大会, 徳島, 9月19日, 2022年

3) 吉松英樹, 片岡宏介, 小柳圭代, Li QiangYing, 小野圭昭, 河村佳穂里, 土居貴士, 三宅達郎. ダブル DNA アジュバント経鼻投与による歯周病原菌感染動脈硬化モデルマウスの炎症性サイトカイン発現の影響 第 71 回日本口腔衛生学会・総会, 鹿児島, 5月14日, 2022年

[3-3]成果資料等

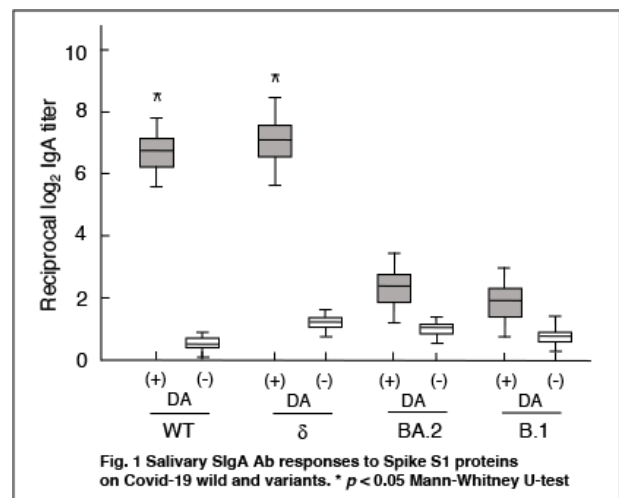


Fig. 1 Salivary SIgA Ab responses to Spike S1 proteins on Covid-19 wild and variants. \*  $p < 0.05$  Mann-Whitney U-test

### [4] 今後の課題等

今後の課題、その他等

今後の課題は、現在 BA.5 株や XBB1.5 変異株への DA のアジュバント活性の確認、そして変異株の新たな表面抗原検索であると考え。また、今後も新たな変異株が出現する可能性が高いことから、正確性と迅速性の高い抗体価測定法を開発することが必要であると考え。そして最終の目標として、ウイルス中和能を有する同ウイルス初感染予防粘膜（経鼻）ワクチン開発を進めたい。