

2024 年度北里大学大学院感染制御科学府

博士論文

RNA ウイルス感染制御に資する研究

北里大学大村智記念研究所 ウイルス学

戸高 玲子

目次

序論	2
第一章 ノロウイルス粒子の突起部位の動的回転による感染制御機構	4
【緒言】	4
【材料と方法】	6
【結果】	9
【考察】	15
【引用文献】	19
第二章 シングルドメイン抗体の経鼻投与は SARS-CoV-2 感染モデル動物の症状を改善する	47
【緒言】	47
【材料と方法】	49
【結果】	58
【考察】	62
【引用文献】	64
第三章 2 種類の mRNA ワクチンによる免疫後応答	82
【緒言】	82
【材料と方法】	84
【結果】	87
【考察】	91
【引用文献】	94
総合考察	109
謝辞	111

序論

感染症とは、環境中に存在するウイルスや細菌、寄生虫などの病原体が宿主の体内に侵入後増殖し、さまざまな症状を引き起こす疾患の総称である。ヒトの感染症には、人から人へ感染する伝染性のものと、他の動物や昆虫を介して、または汚染された土壌などから感染する非伝染性のものがある。病原体が体内に侵入しても症状がほとんど現れず、自然に病原体が排除される場合もあるが、感染後に重篤な症状を引き起こし死に至る感染症も多く存在する。現在までに人類は幾度となく大規模な感染症流行に見舞われ、その都度多くの命が失われてきた[1]。紀元前に埋葬されたとされるエジプトのミイラに天然痘の痕跡が見られたことから、古くからこの感染症が人々の間で流行していたことが考えられる。また中世のヨーロッパではペストの流行により全人口の 1/4 から 1/3 が失われたとされている。ペストはもともとネズミの感染症であり、ペスト菌に感染したネズミの血を吸ったノミからヒトへの感染が起り、大規模な爆発的流行（パンデミック）となったとされていたが、最近では人々の間で蔓延していたシラミもその原因の一旦ではないかという説[2]も考えられており、中世の衛生環境の悪さも感染症流行の一因であった。インフルエンザは毎年多くの感染者を出すウイルス感染症であり、1918 年のスペイン風邪（H1N1 型インフルエンザウイルスによる感染症）は全世界で 2000 万人以上の死者を出した。その後も 10~40 年の周期で新型インフルエンザとして大流行を繰り返している。2019 年に初めて報告された原因不明の肺炎は瞬間に世界に広がり、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）と名付けられ、その原因ウイルスとして SARS-CoV-2 が同定された。

人類は感染症の脅威にさらされ続けているが、一方でこれらに打ち勝つためにその原因を探り、治療法の確立を目指してきた。感染症の原因となる病原体との戦いの歴史としては、18 世紀にジェンナーによる天然痘ワクチンの開発、19 世紀以降の病原体を同定する微生物学の発展、そして最大の功績の一つである 20 世紀のイギリスの細菌学者フレミングによる抗生物質（ペニシリン）の発見が主なものとして挙げられる。感染制御という考えは、病原体から身体を守り、その感染拡大を最小限に止めるために非常に重要である。感染症は(1)病原体、(2)感染経路、(3)宿主の 3 つの要因が揃うことで成立し、よってその対策としてはそれぞれ(1)病原体の排除、(2)感染経路の遮断(3)宿主の抵抗力向上が挙げられる[3]。

ウイルス感染症の場合、病原体の排除となるウイルスの不活化は、ウイルスに対する直接的な攻撃となり、抗ウイルス薬や消毒剤の開発は重要な課題である。しかしながら、自身の細胞を持つ細菌とは異なり、ウイルスは宿主細胞の持つ機能を利用して増殖し感染症を引き起こすことから、ウイルスのみを標的とし、宿主側に影響を及ぼさない薬剤を開発することは容易ではない。ウイルスの不活化にはエタノールや次亜塩素酸ナトリウムなどの消毒剤、抗体によるウイルス中和、ウイルス増殖機構に作用しウイルスの増殖を阻害する抗ウイルス薬などが用いられる。感染経路の遮断のためには、病原体であるウイルスの宿主細胞への侵入機構や、細胞内での複製機構の解明は必須である。さらにウイルス粒子の構造を詳細に

解析することは、抗ウイルス剤や消毒剤の探索や開発につながり、感染制御の一端を担うこととなる。宿主の抵抗力向上には、病原体に対する免疫応答を活性化し、感染予防や発症阻止、重症化阻止の効果を持つワクチンが重要なツールとなる。本論文では、ウイルス感染症についてこれら3つの視点を踏まえ、①ウイルス増殖機構の解明②抗体による感染防御③宿主側免疫応答による防御、というテーマに沿って RNA ウイルスの感染制御に関わる研究を述べる。

第一章では、ウイルスの構造解析による感染増殖機構解明を目指した。ウイルスの構造解析はウイルスがいかにして宿主に感染し、複製増殖するかを解明することの手がかりとなり、抗ウイルス薬やワクチン開発の上で重要である。ヒトノロウイルス (Human Norovirus: HuNoV) は主に冬季に流行し、ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして知られている。継代培養が難しい HuNoV に代わり、培養細胞で容易に増殖可能なネズミノロウイルス (Mouse Norovirus: MNoV) を代替ウイルスとして用い、ウイルスの構造解析をおこなった。第二章では、近年新たな抗体薬として注目されているシングルドメイン抗体を用いた抗ウイルス活性評価について述べた。cDNA ディスプレイ法により得られた SARS-CoV-2 の S タンパク質に特異的に結合する VHH (Variable domain of Heavy chain of Heavy chain antibody) 抗体を選別し、*in vitro* および *in vivo* での抗ウイルス活性評価をおこない、経鼻投与可能な新規の COVID-19 治療薬開発に向けた研究をおこなった。第三章では、ワクチンによる宿主側免疫応答によるウイルス感染制御について述べた。COVID-19 の大流行により今までにない速度で開発・承認された2つの mRNA ワクチン (BNT162b2 と mRNA-1273) について、一次免疫およびブースター免疫後の血清を用いて、SARS-CoV-2 各変異株に対する中和抗体価を測定するとともに SARS-CoV-2 スパイク抗原で刺激した全血培養におけるサイトカイン産生の解析を行い、それぞれのワクチンが誘導する免疫応答の違いについて考察した。

参考資料

1. 歴史から読み解くワクチンのはなし
中山哲夫 2023 年 3 月 朝倉書店
2. Barbieri, R., M. Drancourt, and D. Raoult, *Plague, camels, and lice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(16): p. 7620-7621.
3. 感染制御の基礎知識 厚生労働省 <https://www.mhlw.go.jp/content/000501121.pdf>

第一章 ノロウイルス粒子の突起部位の動的回転による感染制御機構

【緒言】

カリシウイルス科 (*Caliciviridae*)、ノロウイルス属 (*Norovirus*)、ノーウォークウイルス種 (*Norwalk viruses*) に属するウイルスは、世界中で流行がみられる非細菌性胃腸炎、冬季ウイルス性食中毒の原因ウイルスとして知られ[1]、一般には、ノロウイルスと呼称されている。しかし、分類学上ノーウォークウイルス種には、GI~GX までの 10 種類の遺伝子グループがあり、I, II, IV, VIII, IX がヒトに感染する遺伝子グループであり、その他は、それぞれイヌ、ネコ、ウシ、コウモリ、ネズミに感染する遺伝子グループである。本章では、ヒトに感染するノーウォークウイルス種のウイルスをまとめてヒトノロウイルス (Human norovirus: HuNoV) と表記する。

HuNoV は、株化培養細胞で培養増殖させることができず、小動物モデルも存在しないことから、効果的な治療法やワクチンの開発が遅れている[2]。2003 年に発見された遺伝子グループ V (GV) のネズミノロウイルス (Murine norovirus: MNV) は、株化細胞で培養可能であり[3, 4]、HuNoV とウイルス学的に極めて類似した性質を持つと考えられている[5]。そのため、MNV は HuNoV の複製増殖機構を研究する際、代替ウイルスとして利用されている。

ノーウォークウイルス種は、エンベロープを持たないプラス一本鎖 RNA をゲノムとして有するウイルスであり、ゲノム上に非構造タンパク質をコードするオープンリーディングフレーム 1 (ORF1)、構造タンパク質(キャプシドタンパク質 VP1)をコードする ORF2、同じく構造タンパク質 (粒子内部に含まれるキャプシドタンパク質 VP2) をコードする ORF3 が存在する[6]。1999 年、バキュロウイルス発現系によってリコンビナント VP1 を大量に発現させて作製した HuNoV のプロトタイプである GI.1 のウイルス様中空粒子

(Virus like Particle: VLP) の構造解析が初めて報告された。VLP は、VP1 のダイマーが 90 個集合して T=3 の正二十面体構造をとり、ウイルス粒子の外殻を形成した中空粒子である [7]。VP1 は、A、B、C モノマーが非対称に配置され、A/B ダイマーと C/C ダイマーとなる。60 個の A/B ダイマーが正二十面体の五回転軸上に、30 個の C/C ダイマーが二回転軸上に位置する[8]。VP1 は粒子外殻領域 (Shell domain: S-domain: S 領域) と突起部位 (Protruding domain: P-domain: P 領域) から構成され、フレキシビリティの高いヒンジ領域でつながっている。8 本鎖の β サンドイッチ構造からなる S 領域は、連続した正二十面体の骨格を形成して内包するウイルスゲノムを保護し、カリシウイルス科内で高いアミノ酸配列相同性を有する[9]。一方、P 領域はアーチ状の突起を形成し、P1 サブドメインと P2 サブドメインと呼ばれる領域に細分される。P2 サブドメインは P 領域の上部に露出しており、主要な抗原部位である[10]。

カリシウイルスの P 領域は 2 つの構造（コンフォメーション）を取ることが報告されている[11]。一つは MNV-1 [12]、HuNoV GI.10 [13]、ウサギ出血熱ウイルス(RHDV) [14, 15]に見られる Rising conformation（上昇型）であり、P 領域が S 領域の表面から立ち上がって外側に第二の殻を形成している。二つ目は HuNoV GI.1 [7]、サポウイルス[9]、サンミゲルアシカウイルス(SMSV) [16]およびネコカリシウイルス(FCV) [17, 18]に見られる Resting conformation（静止型）で、P 領域が S 領域の上に載って S 領域と一体化した殻を形成している。ウイルスのキャプシドタンパク質の動的な構造変化について、ウイルス感染とその複製に関わる可能性が議論されてきたが、これまでのところ直接的な報告はない[11]。Snowden らは MNV-1 を用いて熱処理等を施したいくつかのサンプルを解析し、単一ウイルスにおけるコンフォメーション変化の可能性を述べているがそのメカニズムは未だ解明されていない[19]。

本研究では、クライオ電子顕微鏡（cryo-electron microscopy : cryo-EM）を用いて、MNV 感染性粒子の P 領域が水溶液条件に応じて可逆的に約 70° 回転し、上昇型と静止型という 2 つの異なるコンフォメーションをとることを示した。さらに感染感受性細胞を用いた感染実験を行ったところ、P 領域のコンフォメーションの違いによってウイルス増殖に有意な差が認められた。また MNV 感染性粒子および VLP を用いた高分解能構造解析により、MNV の感染性粒子と VLP の構造的類似性が明らかになり、P 領域の回転の分子メカニズムが解明された。今回の研究成果は、非エンベロープ型ウイルスの感染メカニズムに新たな知見を与えるものである。

【材料と方法】

細胞

RAW264.7 細胞および HEK293T 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。また、HEK293T 細胞に MNV 受容体タンパク質である CD300lf 遺伝子を導入して恒常的に CD300lf を発現する HEK293T/CD300lf 細胞を作製した[20]。

ノロウイルス感染性粒子と VLP の作製

ネズミノロウイルス S7 株 (MNV-S7) の感染性粒子は既報[21]に従いリバーズジェネティックスにより作製した。ネズミノロウイルス 1 型 (MNV-1) の感染性粒子は MNV-S7 のインフュクシャスクローン上の MNV-S7 配列を MNV-1 に載せ変えたプラスミドを構築、リバーズジェネティックスにより同様に作製した。MNV-1 の cDNA プラスミドは Goodfellow 博士より分与された[22]。MNV-S7 および MNV-1 感染性粒子は RAW264.7 細胞を用いて増殖させた。培養上清は感染 2 日後に回収し、30 %ショ糖クッション法によりペレット化し、その後塩化セシウム(CsCl) 平衡密度勾配遠心法により精製した。その後 CsCl を除くため、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium、ナカライテスク)で希釈し超遠心分離して再度ペレット化した。ペレット化した MNV 粒子は DMEM または Ca および Mg を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered saline (-): PBS(-)) に 20 mM EDTA を加え pH 8.0 に調整した PBS(-)+EDTA(pH 8.0)に再懸濁し、 10^7 粒子/ μ L になるよう調整した。MNV-1、MNV-S7 および HuNoV GIL3 (TCH04-577 株)の VLP はバキュロウイルス発現系によって作製し[23, 24]、感染性粒子と同様にして CsCl 平衡超遠心分離法により精製した。

MNV の増殖曲線の解析

48 穴マルチウェルプレートに RAW264.7 細胞を 10^6 細胞/ウェルの密度で単層化培養し、精製した MNV-1 または MNV-S7 感染性粒子を感染多重度 (Multiplicity of Infection: MOI) 2 以上で感染させ、37 °C で 30 分間培養した。細胞を DMEM で 3 回洗浄し未吸着のウイルスを除去した。その後 10 % ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) を含む DMEM (10 % DMEM)を加え、プレートを 37 °C で規定の時間培養した。0、3、6、9、12、15、18、24 時間培養後、培地 20 μ L をサンプリングし、10,000 $\times g$ 、10 分間、4 °C で遠心分離し、細胞および細胞デブリを除去した。15 μ L の上清を回収し、RNA 抽出まで -80 °C で保存した。10 μ L の上清を Kitajima らの方法に従って RNA 抽出と定量的 PCR (qPCR) に使用した[25]。これらのアッセイは独立して 3 回行い、各測定ポイントで幾何平均値、標準偏差 (SD) を算出し、MNV の増殖曲線をグラフ化した。

フローサイトメトリーを用いた MNV と細胞の結合評価

MNV の宿主細胞への結合は FACS (fluorescence activated cell sorter) を用いて解析した。

1×10⁶個の HEK293T/CD300lf 細胞は、10 %DMEM または PBS(-)+EDTA(pH 8.0)に懸濁した感染性 MNV-1 粒子 (1 x 10⁷ TCID₅₀) と 4 °C で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、Dylight 488 Conjugation Kit (Bio-Rad) で標識したウサギ抗 MNV VP1 ポリクローナル抗体を加え、4 °C で 30 分間反応させた。各ステップに用いた溶液には、細胞がウイルスを取り込まないように、3 % FBS および 20 mM アジ化ナトリウム (NaN₃) を添加した。その後細胞を再度洗浄し、BD FACSMelody セルソーター (BD Bioscience) を用いて解析を行った。得られたデータは FlowJo 解析用ソフトウェア (BD Bioscience) を用いて解析した。

宿主細胞における MNV の細胞結合および初期ゲノム複製量解析

96 穴マルチウェルプレートに RAW264.7 細胞または HEK293T/CD300lf 細胞を 10⁵ 細胞/ウェルの密度で単層化培養し、精製した MNV-1 または MNV-S7 感染性粒子を MOI =10 で感染させた。37 °C で 30 分間培養後、細胞を DMEM で 2 回洗浄し、未吸着のウイルスを除去した。上清を全て取り除いた後、全 RNA を NucleoSpin RNA (タカラバイオ) を用いて抽出し、細胞表面に付着したウイルス粒子のゲノム量を定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) で測定した。また感染後 0、2、4、6、8、10、12 時間培養した各細胞における初期ゲノム複製量の解析には、各タイムポイントの細胞から、RNA を上記と同じ手順で抽出し RT-qPCR に用いた[25]。これらのアッセイは独立して 3 回行い、標準偏差 (SD) 値を算出し、各ポイントでプロットした。

クライオ電子顕微鏡(クライオ EM)による解析と画像処理

精製した MNV 感染性粒子と HuNoV GII.3 VLP (2.5 μL) をカーボングリッドに載せ、湿度 95 %、4 °C の条件下で急速冷凍し、顕微鏡観察試料とした。クライオ EM データは JEM2200FS 電子顕微鏡 (200 kV、日本電子株式会社) と直接検出 CMOS カメラ (DE20, Direct Electron, LP) で、公称倍率 40,000 倍で取得した。3D マップの構築は RELION 2.0 再構築ソフトウェアを用い、取得した画像から選択・抽出した粒子の二次元 (2D) 平均化イメージを作製、アライメントと分類を行った後再構築した。以下の表にサンプル条件を示した。

サンプル	溶媒	conformation	取得画像数	選択粒子数	解像度
MNV-1	DMEM	静止型	1,046	6,708	5.3 Å
	PBS(-)+EDTA(pH 8.0)	上昇型	2,188	4,704	7.3 Å
MNV-S7	DMEM	静止型	2,049	17,820	5.2 Å
	PBS(-)+EDTA(pH 8.0)	上昇型	2,739	5,063	7.2 Å
HuNoV	DMEM	静止型	106	279	9.3 Å
GII.3 VLP	PBS(-)+EDTA(pH 8.0)	上昇型	1,917	1,482	12.9 Å

DMEM および PBS(-)+EDTA(pH 8.0)に懸濁した MNV-1 感染性粒子について静止型と上昇型それぞれ、1,046 および 2,188 の画像から 6,708 および 4,704 の粒子を選択し、CTFFIND4[26]でコントラスト伝達関数(CTF)を決定した後、RELION 2.0 [27]を用いて抽出した。抽出された粒子のアライメントと分類を行い、EMAN1 [28]によって正二十面体対称で生成された初期モデルを用いて、RELION 2.0 で三次元 (3D) マップを再構成し、3D 画像を得た。3D 再構成の際、密度マップの最終解像度は、2つの異なる独立に生成された再構成間の GS-FSC(Gold standard-Fourier shell correlation、カットオフ 0.143)を用いて算出し、静止型は 5.3 Å、上昇型は 7.3 Å の解像度となった[29]。マップの 3D レンダリングは UCSF Chimera [30]で作製した。

DMEM と PBS(-)+EDTA(pH 8.0)に懸濁した MNV-S7 感染性粒子については、それぞれ 2,049 枚と 2,739 枚の画像を収集し、3D 再構成はそれぞれ 17,820 個の粒子と 5,063 個の粒子から行われ、5.2 Å と 7.2 Å の解像度の 3D 画像を得た。静止型および上昇型 P 領域を含む HuNoV GII.3 VLP では、それぞれ 106 枚と 1,917 枚の画像が収集され、3D 再構成はそれぞれ 279 個の粒子と 1,482 個の粒子から行い、9.3 Å と 12.9 Å の解像度の 3D 画像を得た。データ収集と画像処理の詳細は表 1 にまとめた。

MNV-S7 VP1 の原子モデル構築のための超高分解能構造解析

MNV-S7 VLP の原子モデル構築のための超高分解能構造解析には、Titan Krios (300kV、Thermo Fisher Scientific) と Falcon II カメラを用い、公称倍率 75,000 倍 (試料の 1 ピクセルあたり 0.86 Å に相当) で画像を取得した。2,746 枚の取得画像から 41,847 個の粒子を抽出、最終的な 3D マップの分解能は 3.5 Å となった。

MNV-S7 VP1 の P 領域と S 領域のホモロジーモデル構築には、それぞれ MNV-1 の P 領域原子モデル (PDB ID: 3LQE) と HuNoV の S 領域原子モデル (PDB ID: 1IHM) をテンプレートとして用いた。MNV-S7、MNV-1 および HuNoV の VP1 の多重配列アラインメントは PROMALS3D プログラム[31]を用いて行った。P 領域と S 領域の配列アラインメントは、MODELLER ソフトウェア[32]の入力として使用し、比較モデルを作成した。MNV-S7 と MNV-1 の VP1 については、それぞれ UCSF Chimera [30]を用いて A、B、C モノマーを含むマップを抽出した。モデルは、COOT [33]を使用して、上記のホモロジーモデルから個々のマップに手作業で再構築し、PHENIX [34]を使用して精密化した。クライオ EM 像に適合させたモデルは、UCSF Chimera [30]の "Fit in Map"を用いて、モデルとクライオ EM 像の間の相互相関係数をそれぞれ評価した。データ収集、画像処理、モデル統計の詳細は表 2 にまとめた。

【結果】

MNV 粒子の重金属分子依存的な可逆的形状変化

MNV-1 感染性粒子をリバーシブルなジェネティックスシステム[21]により作製し、MNV 感染感受性細胞である RAW264.7 細胞で増殖させ、DMEM 中に保存した。このウイルス粒子を 200 kV の透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた単粒子クライオ EM で解析し、3D モデルを 5.3 Å の分解能で再構築した (図 1 A、C、図 2 A-D)。その結果、P 領域が粒子外側の P2 サブドメインの位置で隣接する P 領域ダイマーと相互作用し安定化され、S 領域上に載っていた (静止型)。PBS に懸濁させた MNV-1 の 8 Å クライオ EM 構造に関する以前の報告[14]では、P 領域は、時計回りに約 70 ° 回転し、内側の P1 領域との相互作用によって安定化され、S 領域から離れて伸びていた (上昇型)。この違いを調べるため、感染性粒子をさまざまな水溶液に懸濁しクライオ EM で観察した。ウイルス粒子を pH 8.0 の 20 mM EDTA を含む PBS (-) 溶液 (PBS(-)+EDTA (pH8.0)) に懸濁すると、報告されている MNV-1 キャプシド構造を 7.3 Å の分解能で再現することができた (図 1 B、D および E、図 2 E-H)。以前に報告された MNV-1 の構造[14]は、pH が 7 以上で、EDTA によるキレート化で溶液から金属イオンが除去されたときに現れることがわかった (図 1 E)。また、MNV-1 感染性粒子の P 領域の動的な回転は、水溶液の条件に依って可逆的に起こり、pH が 7 より低くなると、上昇型から静止型への変化が引き起こされた (図 1 E)。

異なるコンフォメーションを持つ粒子のウイルス学的性状解析

P 領域が取るコンフォメーションの違いによってウイルスとしての性質が異なるのかどうかを調べるため、RAW264.7 細胞に両ウイルスを感染させた。PBS(-)+EDTA (pH 8.0) で前処理した MNV-1 感染性粒子を DMEM (pH7.2-7.4) で培養した RAW264.7 細胞に感染させたところ、DMEM で前処理した場合よりも有意に増殖が遅くなった (〜3 時間) (図 3 A)。増殖が遅くなった原因を調べるために、感染後 30 分における RAW264.7 細胞表面へのウイルス吸着量を RT-qPCR を用いて比較した。その結果、PBS(-)+EDTA (pH 8.0) で前処理した MNV-1 粒子と DMEM で前処理した MNV-1 粒子との間で、RAW264.7 細胞への結合量に有意な差は認められなかった (図 3 B、左のバー)。実験に用いた RAW264.7 細胞は、MNV 粒子の吸着に関与するいくつかの分子を発現していることが知られており[35]、粒子のコンフォメーションの違いはそれらの分子との結合には影響を与えない可能性が考えられた。そこで、MNV のレセプター分子である CD300lf との結合を検証した。MNV 非感受性細胞である HEK293T 細胞に MNV 感染レセプターである CD300lf を発現させた HEK293T/CD300lf 細胞は MNV 感受性になり、CD300lf 分子を介した細胞表面への MNV 粒子の吸着を評価することができる[20, 36]。この細胞を用いて、2 つの異なるコンフォメーションによる MNV-1 の細胞への吸着について評価した。HEK293T/CD300lf 細胞では、PBS(-)+EDTA (pH 8.0) で前処理した MNV-1 粒子は、DMEM で前処理した粒子と比較して、細胞結合の有意な減少を示した (図 3 B、右のバー)。次に、感染多重度 (Multiplicity

of Infection; MOI) =10 でウイルス粒子と細胞を混合し、フローサイトメトリーを用いて細胞との結合を解析した。PBS(-)+EDTA (pH 8.0) で前処理した MNV-1 粒子は、DMEM で前処理した MNV-1 粒子 (図 3 C、水色：中央値=357、CV=275) よりも細胞への結合が低い (図 3 C、オレンジ：中央値=268、CV=157) ことが示された。さらに、RAW264.7 細胞における感染後 30 分から 12 時間までの初期ゲノム複製を比較した結果、PBS(-)+EDTA (pH 8.0) で前処理した MNV-1 のウイルスゲノムは 3.6 倍しか増加しなかったが、DMEM で前処理した MNV-1 のゲノムは 26.4 倍増加した (図 3 D)。これらの結果より、MNV-1 の P 領域の動的回転がウイルス感染を制御していることが示唆され、DMEM 前処理によって P 領域が静止型へと構造変化しレセプター分子を介した標的細胞への結合あるいは細胞への侵入が高まることが考えられた。

HuNoV GII.3 VLP の P 領域構造解析

次に、ヒトノロウイルスについて、同様の構造をもつ粒子が観察されるかを調べるため、HuNoV GII.3 (TCH04-577 株) の VLP を用いて、P 領域のクライオ EM 観察を行った。その結果 2 つのコンフォメーションが観察され、単粒子解析では、MNV-1 で見られた静止型および上昇型と似た構造を示していた (図 4 A、B)。

DMEM に懸濁した HuNoV GII.3 VLP は、全体の 16% が上昇型で、残りは静止型をとっており、この割合は PBS(-) + EDTA (pH 8.0) 中でも変わらなかった。MNV-1 と HuNoV GII.3 では、P 領域の 2 つのコンフォメーションの回転角度は約 70° で一致しており、P 領域のダイマーは、静止型は P2 サブドメインの位置、上昇型は P1 サブドメインの位置でそれぞれ相互作用することで形成されていた (図 4 C、D)。しかし、P 領域の高さは MNV-1 と HuNoV GII.3 で異なっており、MNV-1 に比べて HuNoV GII.3 では 4 Å 低かった (図 5 B)。ノロウイルス間で S 領域と P 領域を繋ぐヒンジ領域の長さは同じであるので、この高さの違いは MNV-1 と HuNoV ではヒンジループの保持方法が異なることによると考えられた (図 6)。

MNV-1 における P 領域の動的回転

PBS(-) + EDTA (pH 8.0) で前処理した MNV-1 粒子を DMEM (pH 7.2-7.4) に懸濁し、クライオ EM で観察したところ、上昇型を取っていた粒子は 2-8 時間をかけて徐々に静止型に変化することがわかった (図 7 A)。興味深いことに、2-6 時間の間に一つの粒子の中で 2 つのコンフォメーションが混在するものも観察され (図 7 B)、粒子中の個々の P 領域の構造変化が急速にであったとしても、粒子全体のコンフォメーション変化には時間がかかることが考えられた。さらに、pH の異なる溶液を用いた観察を行った結果、静止型と上昇型の変換は高 pH または低 pH で加速され、それぞれ最速では 5 分以内で起こっていた。図 3 A で見られた PBS(-)+EDTA (pH 8.0) で前処理したウイルスゲノム増殖速度の低下は、おそらく DMEM (pH 7.2-7.4) でのウイルス粒子の全体的な P 領域構造変化の時間に対応してい

と考えられた。

以上より、P 領域が立ち上がり上昇型となると、CD300lf を介した宿主細胞表面へのウイルス吸着（結合）が妨げられるが、キャプシド全体の P 領域が上昇型から静止型へ変化することに伴い、感染性の回復が起こると考えられた。このコンフォメーションの変化にはある程度時間を要し、P 領域の動的な回転によって MNV-1 の感染性が制御されていることが示唆された。

MNV-S7 感染性粒子の P 領域の動的回転

MNV-S7 は 2007 年に日本のマウスの糞便中より単離された株であり [37]、MNV-1 と同様の病原性を示す。VP1 のアミノ酸配列は MNV-1 と 97 %の相同性を示し、P 領域に非相同アミノ酸 18 個が集中している（図 6）。先行研究[21]において、感染性粒子と VLP が共に作製されていたため、元々は MNV-S7 を用いて構造解析を行っていた。しかし、[14]で報告された MNV-1 のクライオ電子顕微鏡像と異なっていたため、同株である MNV-1 を用いて水溶液条件の検討を前項で行った。サンプル調整条件が整ったところで、次に MNV-S7 感染性粒子を用いて同様の構造解析を行なった。その結果、MNV-S7 においても P 領域の動的回転が確認された（図 8）。興味深いことに、MNV-S7 の上昇型への変化は pH 8.0 以上の PBS(-)+EDTA 溶液中でしか起こらず、MNV-1 の場合（pH 7 以上、図 1 E）よりもわずかに高い値であった（図 8 K）。また、上昇型から静止型への可逆的な回転は pH が 8 より低い場合でも起きていた。

次に RAW264.7 細胞を用いて感染実験を行なった。PBS(-)+EDTA(pH8.0)で前処理した MNV-S7 は、DMEM で前処理したウイルスと比べて増殖速度が低下したが、その差は MNV-1 の場合よりも小さかった（図 3 A および図 9 A）。このことから、DMEM(pH 7.2-7.4)中の MNV-S7 は MNV-1 よりも容易に静止型に変化すると考えられた。一方で、MNV-1 と異なり、PBS(-)+EDTA(pH8.0)で前処理したウイルス粒子と RAW264.7 細胞および HEK293T/CD300lf 細胞との結合は、DMEM で前処理したものと有意な差が認められた（図 9 B）。また、RAW264.7 細胞における感染後 30 分から 12 時間までの初期ゲノム複製では、PBS (-) +EDTA (pH8.0) で前処理したウイルスの RNA 量は 7.4 倍にしか増加しなかったのに対し、DMEM で前処理したウイルスでは 17.2 倍に増加した（図 9 C）。MNV-S7 の宿主細胞への結合機構は MNV-1 と異なる可能性があり、ヒトノロウイルス粒子は高い pH（アルカリ性）では不安定であることがしばしば報告されている [38]。アルカリ性に対する感受性は遺伝子型によって大きく異なり、わずかな配列の違いによっても影響を受けることが示されており、2 つの MNV 株間の pH 感受性の違いも同様のメカニズムによる可能性がある。

MNV-S7 ウイルス中空粒子のキャプシド構造解析

MNV キャプシドタンパク質の P 領域の動的回転の分子メカニズムを解明するため、300kV

の TEM (Titan Krios)を用いた単粒子クライオ EM 解析をおこない、高解像度の MNV キャプシド全体の原子モデルの構築を試みた。ウイルスゲノム（ヌクレオチド）を含む感染性粒子よりもキャプシドタンパク質のみから構成される VLP を用いた方が高分解能のモデルが得やすく[39]、また電顕室のバイオセーフティレベルの制限のため、この解析には MNV の VLP を用いて行った。MNV-S7 と MNV-1 の VLP をそれぞれバキュロウイルス発現系で作製し[23, 24]、DMEM 中に保存した。解析の結果、MNV-1 の VLP は、直径 40-50 nm の複数の大きさを示す正二十面体の粒子を形成していたのに対し（図 10）、MNV-S7 の VLP は、直径～40 nm の正二十面体の粒子を形成していた（図 11A、B）。そこで、高分解能クライオ EM 解析には MNV-S7 の VLP を使い、3D モデルを 3.5 Å の分解能で決定した（図 12A、図 11C）。キャプシド内の局所分解能は 3.3～3.7 Å の範囲であった（図 12B）。最も解像度が高いのは S 領域で 3.3 Å であり、解像度が低いのは主に P 領域の周辺領域であった。

MNV-S7 の VLP キャプシドの原子モデルは、VP1 の A、B、C モノマーについてそれぞれ構築し（表 2）、MNV-S7 VLP の C α backbone 構造を図 12C に示した。また、S および P 領域、VP1-C モノマーの C α backbone 構造を図 12D、E、F に示した。VP1 の A および B モノマーのモデル化には、それぞれ Gln19 から Gly531 までの 513 個のアミノ酸と、Ala16 から Gly531 までの 516 個のアミノ酸を使用した（図 6）。VP1 の C モノマーのモデル化には、Val30 から Gly531 までの 502 個のアミノ酸を用いた（図 6）。得られたモデルは、MNV-S7 感染性粒子（図 8 E）および MNV-1 感染性粒子（図 2 C）の 5.2Å および 5.3 Å 解像度のクライオ EM マップにも適合し、それぞれ 0.92 および 0.91 という高い相互相関係数を示した。以上より、MNV-S7 の VLP キャプシド構造は、MNV-S7 および MNV-1 感染性粒子の両方と非常によく似ていることがわかった。

得られた MNV-S7 の原子モデルと上昇型の条件下で解析したと予測される MNV-1 の P 領域結晶学的解析モデル（PDB ID: 3LQ6 と 3LQE）を比較した[40]。静止型となる条件下で得られた MNV-S7 の P 領域モデルは 3LQ6 よりも 3LQE と類似性が高く、今回得られたクライオ EM モデルは P2 サブドメイン中で角状構造を形成する β A''- β B''ループと β E''- β F''ループの間が閉じている状態を観察していることを示唆していた（図 6、図 12B、E および図 13 の三重アスタリスク）。

また、今回得られたクライオ EM 像では、 β C''- β D''ループ（図 6）はキャプシド表面に対して上方に伸びており（図 12E の*、図 13 の桃色部分*）、隣接する P 領域の β C''- β D''ループ（図 13 桃色部分*）と相互作用しダイマーを形成するが、MNV-1 の結晶構造モデル（3LQE）では β C''- β D''ループはキャプシド表面に対して下方に伸びており（図 13 灰色部分*）、隣接するダイマーとは P 領域の β C'- β D'ループ（図 13 灰色部分**）で相互作用していると考えられた。Kilic らが報告した MNV の細胞内受容体である CD300lf の可溶性領域と構築した MNV-1 の P 領域ダイマーの結晶構造モデル（PDF ID: 5OR7）では、この 2 つのループは安定した形状を取っていなかった[41]。これは、P 領域がダイナミックに回転して受容体と結合する際に、P 領域にアロステリック効果[42]が存在するため 2 つのループ

が変形し、結晶構造に揺らぎが生じることが考えられた。

VP1 間の分子間相互作用

これまでの解析で、静止型の P 領域を持つ粒子は上昇型よりも高い感染性を示した。そこで DMEM に懸濁し静止型となった MNV-S7 VLP について、P 領域ダイマー間の分子間相互作用を解析した。クライオ EM 像から P2 サブドメインの位置で隣接する A/B および C/C ダイマー間にいくつかの疎水性および極性相互作用が確認された (図 14)。P 領域表面の残基間の化学的相互作用は以下の通りである。

C/C ダイマー	P2 サブドメイン	$\beta F''$ - $\beta B'$ ループ	Asn409	Gly411	Leu412	Pro415
			↓	↓	↓	↓
A/B ダイマー	P2 サブドメイン	$\beta B''$ - $\beta C''$ ループ				Pro319
	P2 サブドメイン	$\beta D''$ - $\beta E''$ ループ	Gln371	Arg373	Val368	

図 6 に示す配列の相同性から予測すると、MNV の S 領域は局所的な歪みはあるものの、HuNoV GL1 VLP(PDB ID: 1IHM)[7]と類似していた。今回の解析で、A モノマーの Gln19、B モノマーの Ala16、C モノマーの Val30 残基のモデリングに成功し、S 領域の隣接する N 末端間のいくつかの精巧な相互作用が示された (図 15A)。A、B および C モノマーから伸長した柔軟な N 末端は、それぞれ 2 倍軸、3 倍軸、擬 3 倍軸、5 倍軸で隣接する S 領域間で互いに様々な相互作用を形成していた (図 15B-F)。今回の解析で MNV では、A モノマーの N 末端アーム (NTA) が隣接する A モノマーまで伸びており、5 回軸の複合体を形成していた (図 15E)。一方、B モノマーの NTA は隣接する C モノマーまで伸びており、3 回軸の複合体を形成していた (図 15F)。最終的に、これらの NTA は安定な正二十面体の内殻を形成した。

図 15G、H に示すように、これまでに報告されているカリシウイルスの NTA は、構造的に 2 つのグループに分けられる。1 つは、HuNoV GL1 [7]や RHDV [15]に示されているノロウイルスやラゴウイルスに属するグループで、NTA は自身の S 領域の下端に沿って走っており、隣接する S 領域と相互作用している (図 15G、H の青と水色)。もう一つのグループは、SMSV [16]と FCV [17]に示されるベジウイルスに属し、NTA は隣接するモノマーの S 領域の下端に沿って走り、隣接する S 領域と相互作用する (図 15 G、H の黄色と緑色)。MNV の NTA は最初のグループと同様のコンフォメーションをしており (図 15 G、H の赤)、A モノマーにおける NTA の機能が明らかになった。結果として MNV の硬いキャプシドは、これらの外側の P 領域間の相互作用と内側の S 領域間の相互作用によって維持されていることが示唆された。

P 領域ダイマーの可逆的回転の分子機構の解析

P 領域が見せる動的回転の分子機構を解明するため、上昇型の MNV のキャプシド構造を解析した。DMEM 中の MNV-S7 VLP（静止型）の原子リボンモデルを修正し、PBS(-)+EDTA(pH 8.0)中の MNV-S7 感染性粒子（上昇型）の 7.2 Å クライオ EM 像にフィッティングした（図 8I および J、図 16A）。原子リボンモデルの FSC 曲線は、上昇型感染性粒子の GS-FSC プロットの曲線（図 16B、灰色線）と同様の曲線を示し、0.5 基準で 8.5Å の分解能であった（図 16B、黒線）。このことから、静止型 P 領域を持つ VLP の原子モデルが、この分解能での上昇型 P 領域と非常によく似ていることが示唆された。PBS(-)+EDTA (pH 8.0) 中のモデルは、DMEM 中のオリジナルモデルと比較して、P 領域が時計回りに $\sim 70^\circ$ 回転し、S 領域表面から ~ 13 Å 上昇することを示した（図 17、図 16A、図 18A、B）。

上昇型のクライオ EM 像に原子モデルを当てたところ、疎水性および極性相互作用を介して C/C ダイマーの P1 サブドメインと A/B ダイマーの隣接する P1 サブドメインが結ばれていることが示唆された（図 6、図 18C）。P 領域表面の残基間の化学的相互作用は以下の通りである。

C/C ダイマー	P1 サブドメイン	$\beta F''$ - $\beta B'$ ループ	Pro425			
	P1 サブドメイン	$\beta F'$ - αG ループ		Ser504	Leu524	Gln526
			↓	↓	↓	↓
A/B ダイマー	P1 サブドメイン	$\beta F''$ - $\beta B'$ ループ	Phe423			
	P1 サブドメイン			Gln263		
	P1 サブドメイン	C 末端側			Leu524	Arg523

DMEM 中では P 領域は S 領域の上に存在し、P2 サブドメインの位置で（図 17A、C および E）、PBS(-)+EDTA (pH 8.0)中では P 領域は S 領域から立ち上がり、P1 サブドメインで隣接する P 領域間の相互作用によって安定化される（図 17B、D および F）。P 領域の振れを伴う上下（ ~ 13 Å）の動きには P 領域と S 領域を繋ぐヒンジ部分の柔軟性（図 19A）が重要であることが示され、さらに P 領域が上昇すると A/B ダイマーは 5 回転軸の方向に 10° 傾いていた（図 20A および B）。

【考察】

本研究では、MNV キャプシドタンパク質の P 領域が可逆的な動的回転して、2つのコンフォメーションをとることを報告した。また、HuNoV GII.3 VLP においても P 領域が2つのコンフォメーションを取ることを初めて同定した。これまでヒトノロウイルス VLP（静止型: GI.1 (pH4.8)、GI.7、GII.2 上昇型: GII.4、GII.10) や他のカリシウイルスの解析では2つのコンフォメーションのうち1つのみが報告されていた[11, 13, 43]。MNV の場合、この形態変化は主に溶媒となる溶液の pH が引き金となっており（高 pH : P 領域は上昇＝上昇型 低 pH : P 領域は静止＝静止型）、興味深いことにウイルス株によって pH の閾値は異なっており、MNV-1 では pH 7、MNV-S7 では pH 8 であった（図 1 E および図 8 K）。しかし、この形態変化の閾値を何が決めるのかは不明であり、ウイルス株または遺伝子型間に見られる P 領域と S 領域の間（ヒンジ部分）にあるアミノ酸の違いで表面電荷が変化している可能性が考えられた。また、高 pH に加え、金属イオンをキレートする EDTA も上昇型への変換に寄与することから、この領域に結合する金属イオンも静止型を安定化させる要因かもしれない。候補として、静止型の折り畳まれた柔軟なヒンジに存在する2つのアミノ酸（Glu223 と Asp231）の間に、金属イオンを介した相互作用の可能性を見いだされた（図 19B および C）。このことから、P 領域と S 領域の間の柔軟なヒンジは、DMEM 中で金属イオンを結合させることによって折り畳まれ、PBS (-) + EDTA (pH8) 中で金属イオンを放出させることによってアンフォールディングされる可能性が示唆された。静止型のクライオ EM 像上で S 領域と P 領域を繋ぐ相互作用部位と考えられるアミノ酸がいくつかあり（S 領域 Glu66-P 領域 Ser519、S 領域 Glu176-P 領域 Tyr227、S 領域 Asp174-P 領域 Gln469）（図 6）、これらの残基は CaCl_2 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、 MgSO_4 、 KCl 、 NaHCO_3 、 NaCl 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ などの無機塩を含む DMEM 中の金属イオンを介して静止型を安定化するために機能していると考えられた[44]。本研究では、領域間に関与する金属イオンは同定されていないため、金属イオン濃度を変化させて P 領域の動的回転を制御することはできない。よって P 領域と S 領域に直接結合するすべての金属イオンの局在を解析する必要がある。

本研究で、HuNoV のキャプシドについて解析を行なった結果、2つの可逆的なコンフォメーション変化が示唆されたが、動的回転の観察は MNV 粒子のみで確認された。HuNoV の P 領域の配向を制御する因子を明らかにするためにはさらに詳細な解析が必要である。これまでに HuNoV VLP を用いた解析で静止型と上昇型がそれぞれ報告されている[43]。しかし、可逆的な状態で2つのコンフォメーションを同じ粒子で同時に示したのは、この報告が初めてである（図 4 E）。Koromyslova らによる、クエン酸存在下での HuNoV GII.10 VLP 構造変化 [45]は、図 2E と図 8 G における上昇型の顕微鏡写真と非常に類似したが、HuNoV GII.10 VLP は元々水溶液中で上昇型を示しており、静止型はまだ同定されていない。そのためクエン酸による VLP の構造変化は異なるメカニズムによるものと考えられる[13]。

MNV-1 粒子は、中性に近い pH 溶液中で静止型から上昇型の間でゆっくり P 領域の形態が変化することが観察された (図 7)。HuNoV GII.4 では、脱アミド化による Asp373 の翻訳後修飾により、組織血液型抗原(HBGA)との結合が減弱し、半減期は数日と推定されることが報告されている[46]。しかし、糖鎖結合は MNV の感染に必須ではなく、また P 領域に Asp373 に相当する残基が見られないこと (図 6) から、今回観察された MNV の P 領域の回転とは異なるメカニズムによるものと思われた。メカニズムが異なるものの、感染性を制御するための調整機構は MNV と HuNoV で共通して見られ、宿主消化管における劇的な環境変化の中での感染成立に不可欠なのかもしれない。

感染感受性細胞を用いた細胞への吸着・感染実験を行った結果、静止型を持つウイルス粒子は上昇型を持つ粒子よりも宿主細胞に容易に吸着・感染することが示唆された (図 3 B、D)。宿主細胞表面への親和性の違いを構造的に確認するため、CD300lf 可溶性領域 (sCD300lf, PDB ID: 5 OR7) の結晶学的モデルをコンフォメーションの異なる MNV-1 のクライオ EM 像と合わせた (図 21)。P 領域上の sCD300lf 結合部位は粒子表面の 1 つの C/C ダイマーと 2 つの A/B ダイマー間を結ぶ三角形 (白点線) 上にある。静止型では、三角形が若干歪んでおり、sCD300lf 分子はより柔軟に結合部位に近づくことができる (図 21A)。一方で上昇型では、三角形が小さくなり、sCD300lf 分子が結合部位に近づくスペースが制限されている (図 21B)。これまでの報告では、CD300lf 分子の立体障害は P 領域のダイマー間で起こり、ダイマー間に空間があることが示唆されていた[11, 19, 41, 42]。図 21 で示したように、CD300lf 分子の P 領域へのアクセス性は静止型と上昇型で変化していることが明らかになった。このことから P 領域の動的回転が細胞レセプターへのアクセス性を変化させ、ウイルスの感染性を調節している可能性が考えられた。

静止型は上昇型よりも CD300lf に接近しやすくなり、ウイルスの感染性が高まる。なぜノロウイルスがこの可逆的な変形を可能にする P 領域構造を持っているのかは不明である。一つの可能性としてあげられるのは、宿主細胞内でのウイルス粒子構築または分解の際に構造変化が重要であるということである。タバコモザイクウイルス(TMV)はその構造的・生理学的特性について多くの研究がなされているが、細胞内で準安定構造を形成し、低い金属イオン濃度と高 pH がウイルスの分解の引き金となると報告されている[47]。また最近のクライオ EM 解析で、TMV の Ca イオン依存的な構造変化も報告されており、この Ca イオンが関与する化学結合が TMV の分解を妨げていることが示された[48]。デングウイルスやジカウイルスも、ウイルス複製に伴う pH 依存的な構造変化を示している[49, 50]。

今回、クライオ EM 像で解析した MNV で、上昇型 P 領域を持つ粒子 (~ 7.2 Å) は静止型 P 領域を持つ粒子 (~ 5.2 Å) より約 2 Å 低い分解能を示した (図 2 D および H、図 8 F および J)。3D 再構成時には、上昇型と静止型が混在したもの、正二十面体の対称性から逸脱および壊れた粒子はデータとして除かれる。選択したデータセットにおいて、選んだ上昇型粒子は 23-28 %であったのに対し、静止型粒子は 91-95 %であった (表 1)。これらのことは上昇型を持つ MNV は静止型と比べて柔軟で壊れやすいことを示唆しており、この構造

の柔軟性と壊れやすさがウイルス粒子形成と分解に寄与する可能性がある。HuNoV GII.3 VLP の解析でも、サンプル調整時に上昇型を持つ粒子は簡単に崩壊してしまい (図 22)、静止型粒子のみが氷膜に残された。HuNoV GII.3 VLP の場合、最終的に 3D 再構成に寄与した粒子は、上昇型データセットでは最初に収集した粒子の 29%であったのに対し、静止型データセットでは 50%であった (表 1)。ノロウイルスが宿主細胞に侵入すると、その構造を準安定型に変化させ、比較的低い金属イオン濃度および高 pH の細胞質内で脱殻する。逆に宿主細胞内で複製、形成されたウイルス粒子は遊離金属イオンが豊富で低 pH の消化管のような厳しい環境下で最終的な安定型に変化するのかもしれない。もう一つの可能性は、柔軟で壊れやすい P 領域がウイルスに対する抗体から逃避するのに機能する、または標的とする宿主細胞への結合を促進するというものである[11]。これらの可能性についてはさらなる解析・研究が必要である。

最近 FCV において、キャプシドタンパク質の動的な特徴が報告された。細胞受容体との結合後、マイナーキャプシドタンパク質である VP2 が 12 分子キャプシド表面でポータル状の集合体を形成し、ウイルスゲノムの送達チャンネルとして機能していることが示唆された[18]。FCV と同様、ノロウイルスの対称性を付与したクライオ EM 像では、VP2 の密度は見られなかった。その理由の一つは、コピー数が限られており、対称性の付与により成分が消失する正二十面体の対称性に合致していないことである。ノロウイルスが FCV と同じメカニズムを持つと仮定すると、粒子内部に分散していた VP2 は細胞レセプターへの結合などの構造変化に従って集合し、組み立てられた集合体を形成する可能性がある。MNV が VP2 からなる FCV と同様のポータル構造を持つかは不明であるが、ポータルを形成しウイルスゲノムを放出するためには、受容体結合に加えて P 領域の動的回転などのキャプシド構造の変化が必要だと考えられる。

キャプシドタンパク質表面の P 領域ダイマー間の相互作用はヒトノロウイルスでも観察されているが、より複雑で多様性を示す。HuNoV GI.1 VLP では、C/C ダイマーの P2 サブドメインが隣接する 4 つの A/B ダイマー全てとリンクし、S 領域の上に P 領域が載っている P2 サブドメインレベルの相互作用が観察され[7]、対照的に HuNoV GII.10 VLP ではダイマー間の相互作用は P1 サブドメインレベルで見られ、P 領域は MNV の上昇型のように S 領域から ~16 Å 上昇している。2 つの HuNoV 株における P 領域の異なるコンフォメーションは、P1 または P2 レベルでという相互作用部位の違いによるものであり、これは MNV の観察で見られた P 領域の動的回転によって構造的に説明ができる。HuNoV GII.10 VLP に対するユニークな中和抗体が以前報告され、この抗体はウイルスキャプシドの P 領域と S 領域の間の閉塞部位に結合し、宿主細胞への結合を阻害した[13]。このことから、抗体によって P 領域の上昇型から静止型への回転を阻害することで、ウイルスの細胞への吸着や侵入を阻害し、感染を防ぐことができると思われた。現在のところ、P 領域の動的な回転は MNV の感染性粒子でのみ確認されている。今後さらなる研究により、エンベロープを持たないカリシウイルス感染の全メカニズムが明らかにされ、治療薬やワクチンの開発につな

がることが期待される。

【引用文献】

1. Koo, H.L., et al., *Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide*. Discov Med, 2010. **10**(50): p. 61-70.
2. Ettayebi, K., et al., *Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids*. Science, 2016. **353**(6306): p. 1387-1393.
3. Karst, S.M., et al., *STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1575-8.
4. Wobus, C.E., et al., *Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e432.
5. Wobus, C.E., L.B. Thackray, and H.W.t. Virgin, *Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5104-12.
6. Green, K.Y., *Fields Virology*. 6th edition ed. 2013.
7. Prasad, B.V., et al., *X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid*. Science, 1999. **286**(5438): p. 287-90.
8. Harrison, S.C., *The familiar and the unexpected in structures of icosahedral viruses*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(2): p. 195-9.
9. Miyazaki, N., et al., *Antigenic and Cryo-Electron Microscopy Structure Analysis of a Chimeric Sapovirus Capsid*. J Virol, 2015. **90**(5): p. 2664-75.
10. White, L.J., et al., *Attachment and entry of recombinant Norwalk virus capsids to cultured human and animal cell lines*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 6589-97.
11. Smith, H.Q. and T.J. Smith, *The Dynamic Capsid Structures of the Noroviruses*. Viruses, 2019. **11**(3).
12. Katpally, U., et al., *Structure of antibody-neutralized murine norovirus and unexpected differences from viruslike particles*. J Virol, 2008. **82**(5): p. 2079-88.
13. Hansman, G.S., et al., *Structural basis for broad detection of genogroup II noroviruses by a monoclonal antibody that binds to a site occluded in the viral particle*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3635-46.
14. Katpally, U., et al., *High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5836-41.
15. Wang, X., et al., *Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography*. PLoS Pathog, 2013. **9**(1): p. e1003132.
16. Chen, R., et al., *X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8048-53.
17. Ossiboff, R.J., et al., *Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5550-64.

18. Conley, M.J., et al., *Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement*. Nature, 2019. **565**(7739): p. 377-381.
19. Joseph S. Snowden, D.L.H., Oluwapelumi O. Adeyemi, Neil A. Ranson, Morgan R. Herod, Nicola J. Stonehouse, *High-Resolution Cryo-EM Reveals Dynamics in the Murine Norovirus Capsid*. bioRxiv, 2019.
20. Haga, K., et al., *Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(41): p. E6248-e6255.
21. Katayama, K., et al., *Plasmid-based human norovirus reverse genetics system produces reporter-tagged progeny virus containing infectious genomic RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(38): p. E4043-52.
22. Yunus, M.A., et al., *Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system*. J Virol Methods, 2010. **169**(1): p. 112-8.
23. Jiang, X., et al., *Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6527-32.
24. Prasad, B.V., et al., *Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5117-25.
25. Kitajima, M., et al., *Development and application of a broadly reactive real-time reverse transcription-PCR assay for detection of murine noroviruses*. J Virol Methods, 2010. **169**(2): p. 269-73.
26. Rohou, A. and N. Grigorieff, *CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs*. J Struct Biol, 2015. **192**(2): p. 216-21.
27. Kimanius, D., et al., *Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2*. Elife, 2016. **5**.
28. Ludtke, S.J., P.R. Baldwin, and W. Chiu, *EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions*. J Struct Biol, 1999. **128**(1): p. 82-97.
29. Rosenthal, P.B. and R. Henderson, *Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy*. J Mol Biol, 2003. **333**(4): p. 721-45.
30. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
31. Pei, J., B.H. Kim, and N.V. Grishin, *PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(7): p. 2295-300.
32. Sali, A. and T.L. Blundell, *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 779-815.
33. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,

2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
34. Adams, P.D., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 213-21.
 35. Bragazzi Cunha, J. and C.E. Wobus, *Select membrane proteins modulate MNV-1 infection of macrophages and dendritic cells in a cell type-specific manner*. Virus Res, 2016. **222**: p. 64-70.
 36. Orchard, R.C., et al., *Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus*. Science, 2016. **353**(6302): p. 933-6.
 37. Kitagawa, Y., et al., *Indirect ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay for detecting the antibody against murine norovirus S7 in mice*. Exp Anim, 2010. **59**(1): p. 47-55.
 38. Pogan, R., et al., *Norovirus-like VP1 particles exhibit isolate dependent stability profiles*. J Phys Condens Matter, 2018. **30**(6): p. 064006.
 39. Cui, Z., et al., *Structures of Q β virions, virus-like particles, and the Q β -MurA complex reveal internal coat proteins and the mechanism of host lysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(44): p. 11697-11702.
 40. Taube, S., et al., *High-resolution x-ray structure and functional analysis of the murine norovirus 1 capsid protein protruding domain*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5695-705.
 41. Kilic, T., et al., *Atomic Structure of the Murine Norovirus Protruding Domain and Soluble CD300lf Receptor Complex*. J Virol, 2018. **92**(11).
 42. Nelson, C.A., et al., *Structural basis for murine norovirus engagement of bile acids and the CD300lf receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(39): p. E9201-e9210.
 43. Jung, J., et al., *High-resolution cryo-EM structures of outbreak strain human norovirus shells reveal size variations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(26): p. 12828-12832.
 44. Dulbecco, R. and G. Freeman, *Plaque production by the polyoma virus*. Virology, 1959. **8**(3): p. 396-7.
 45. Koromyslova, A.D., P.A. White, and G.S. Hansman, *Treatment of norovirus particles with citrate*. Virology, 2015. **485**: p. 199-204.
 46. Mallagaray, A., et al., *A post-translational modification of human Norovirus capsid protein attenuates glycan binding*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1320.
 47. Namba, K., R. Pattanayek, and G. Stubbs, *Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction*. J Mol Biol, 1989. **208**(2): p. 307-25.
 48. Ge, P. and Z.H. Zhou, *Hydrogen-bonding networks and RNA bases revealed by cryo electron microscopy suggest a triggering mechanism for calcium switches*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9637-42.

49. Yu, I.M., et al., *Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation*. Science, 2008. **319**(5871): p. 1834-7.
50. Heinz, F.X. and K. Stiasny, *The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2017. **81**(1).

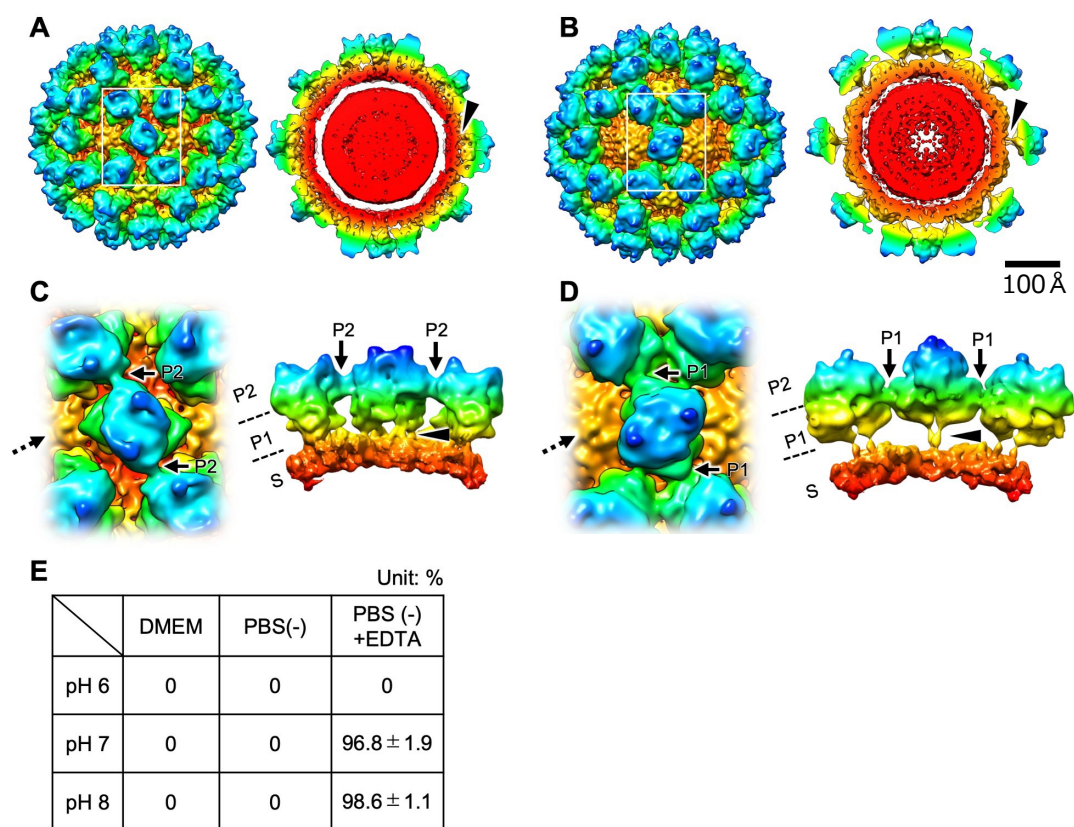


図1 MNV-1感染性粒子のクライオEMによる構造解析

- (A)・(B) 静止型(A)および上昇型(B)のクライオEM像
 (C)・(D) 左図：(A)および(B)の四角部分拡大図
 右図：点線矢印の方向からみた像
 アローヘッドはS領域とP領域のギャップを表す
 (E) 各水溶液中で観察された上昇型P領域を持つ粒子数の割合
 (それぞれ1,000個の粒子をカウントした)

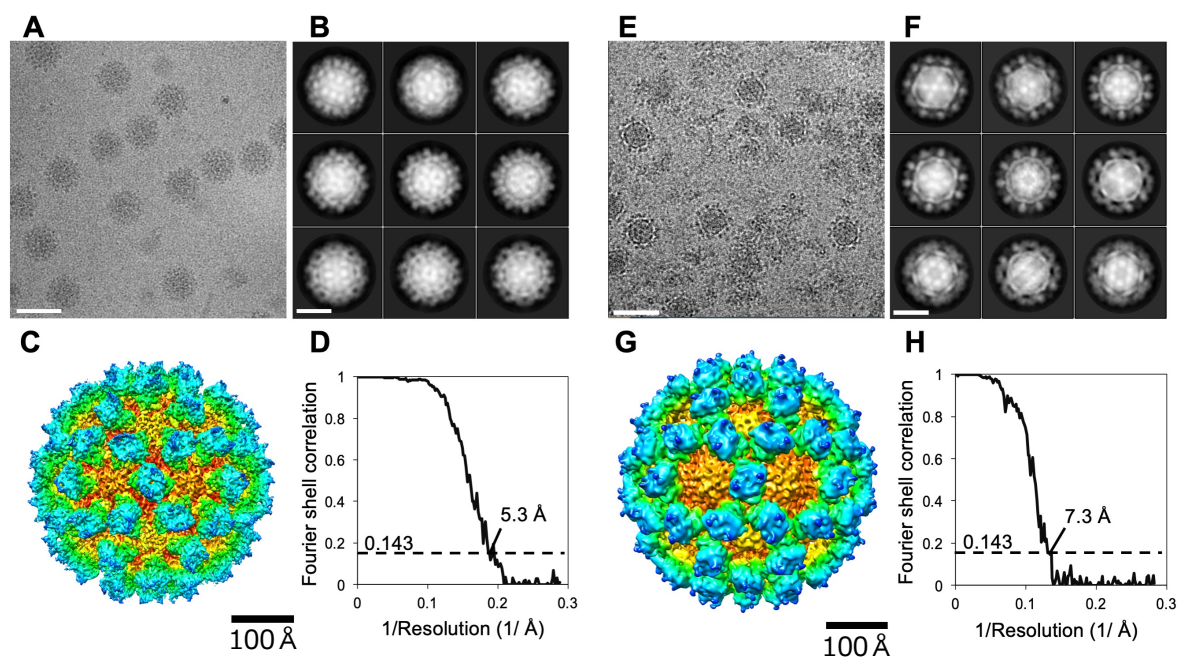


図2 MNV-1感染性粒子のクライオEM像

- (A)・(E) 静止型(A)及び上昇型(E)粒子の電子顕微鏡写真 スケールバー500 Å
 (B)・(F) 静止型(B)および上昇型(F)の2次元平均化 イメージスケールバー200 Å
 (C)・(G) 静止型(C)および上昇型(G)のクライオEM像
 (D)・(H) 静止型(D)および上昇型(H)のGS-FSCプロット
 基準0.143に基づく解像度は、5.3(静止型) および7.3(上昇型) Å

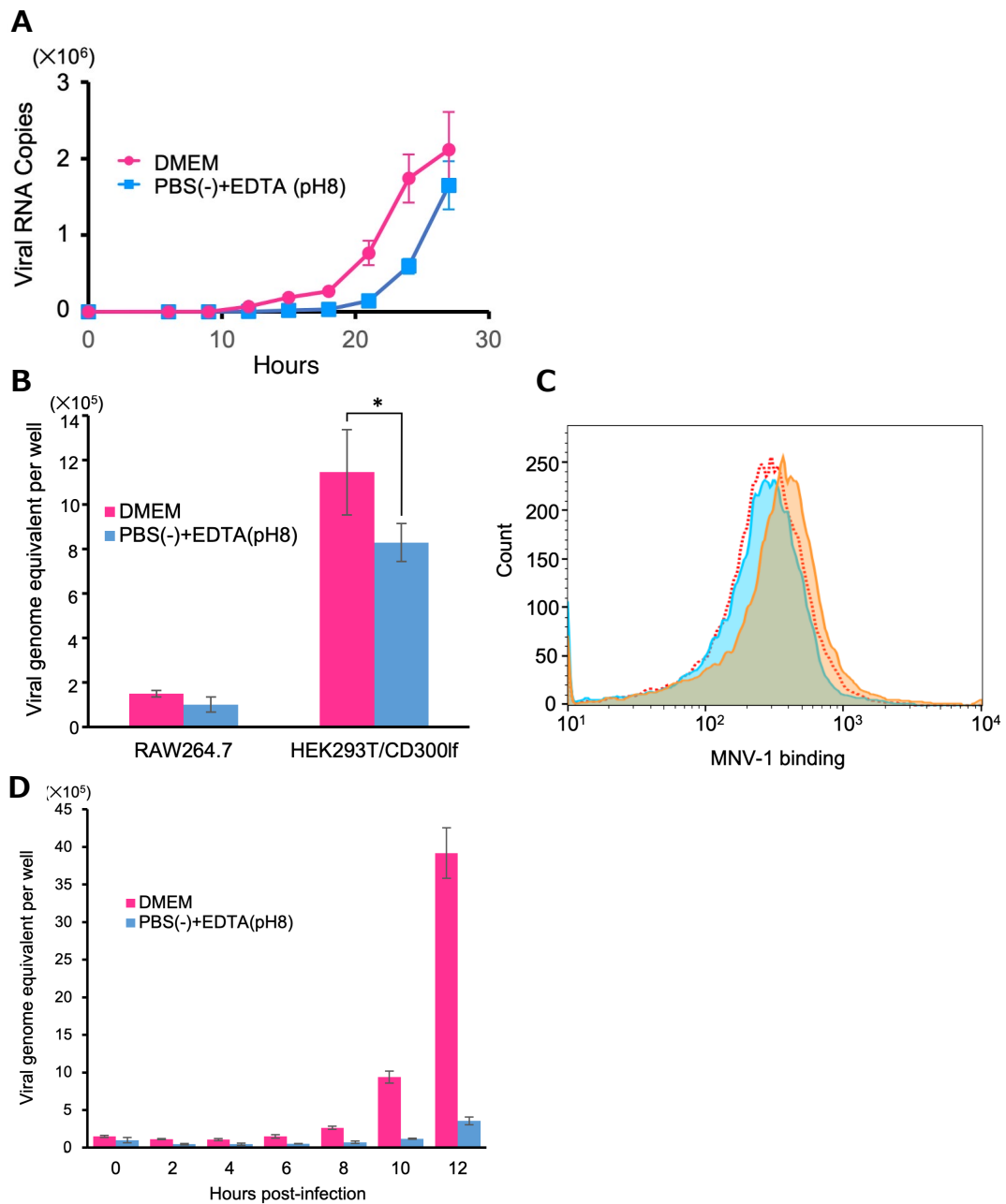


図3 静止型及び上昇型MNV-1感染性粒子の性状解析

- (A) 静止型および上昇型MNV-1粒子の (one-step) 増殖曲線
 ● 静止型 ■ 上昇型
- (B) RAW264.7細胞およびHEK293T/CD300lf細胞におけるウイルス吸着量
 ● 静止型 ■ 上昇型 (* $P < 0.05$, t-test)
- (C) フローサイトメトリーによる細胞への結合量解析
 オレンジ: DMEM処理粒子 水色: PBS(-)+EDTA(pH 8.0)処理粒子
- (D) RAW264.7細胞における感染初期ゲノム複製量
 ● 静止型 ■ 上昇型

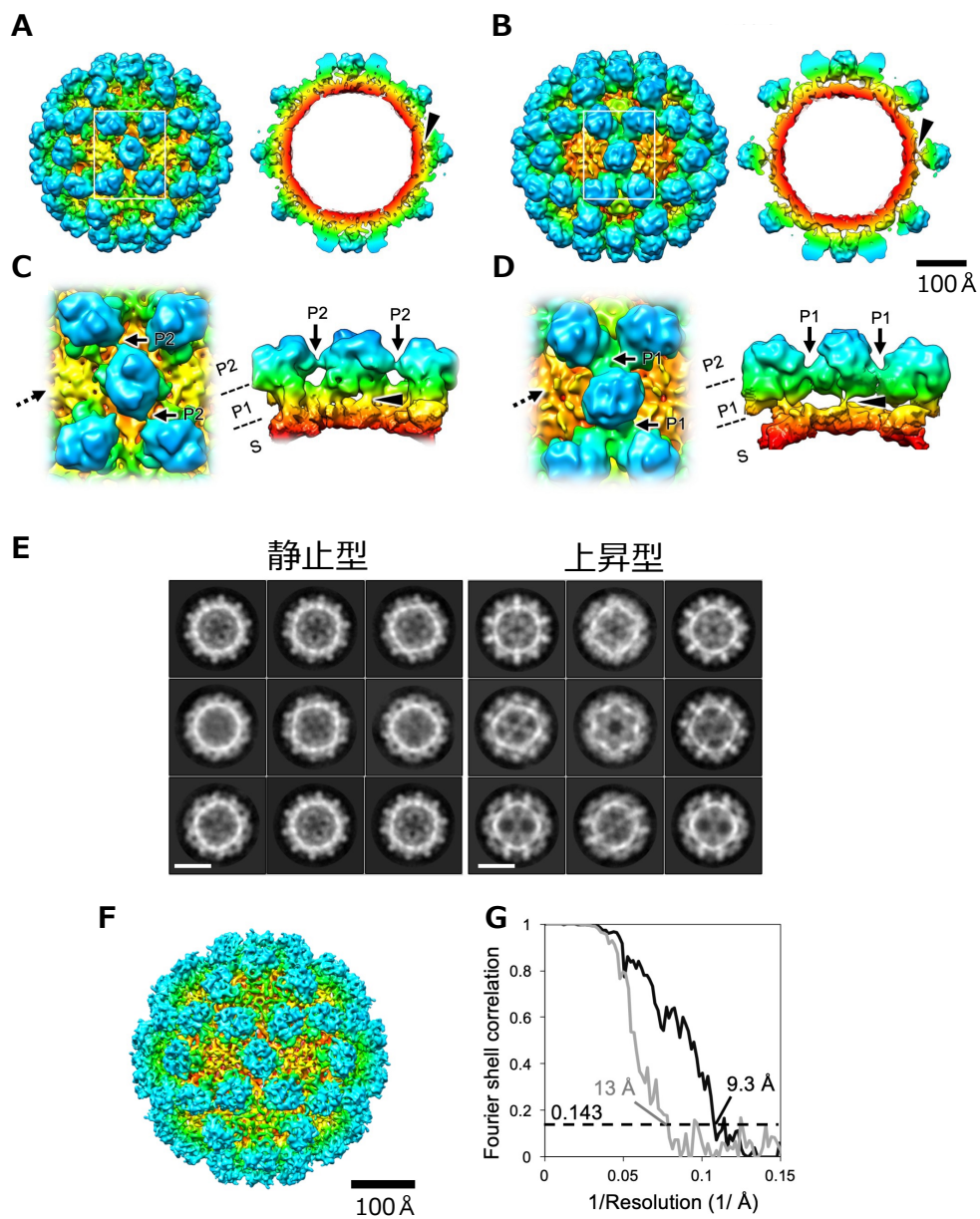


図4 HuNoV GII.3 VLPのクライオEMによる構造解析

- (A)・(B) 静止型(A)および上昇型(B)のクライオEM像
 (C)・(D) 左図：(A)および(B)の拡大図
 右図：点線矢印の方向からみた像
 アローヘッドはS領域とP領域のギャップを表す
 (E) 静止型および上昇型に分類した二次元平均化イメージ スケールバー200 Å
 (F) 9.3 Å解像度の静止型HuNoV GII.3 VLP
 (G) GS-FSCプロット 黒線：静止型 灰色線：上昇型

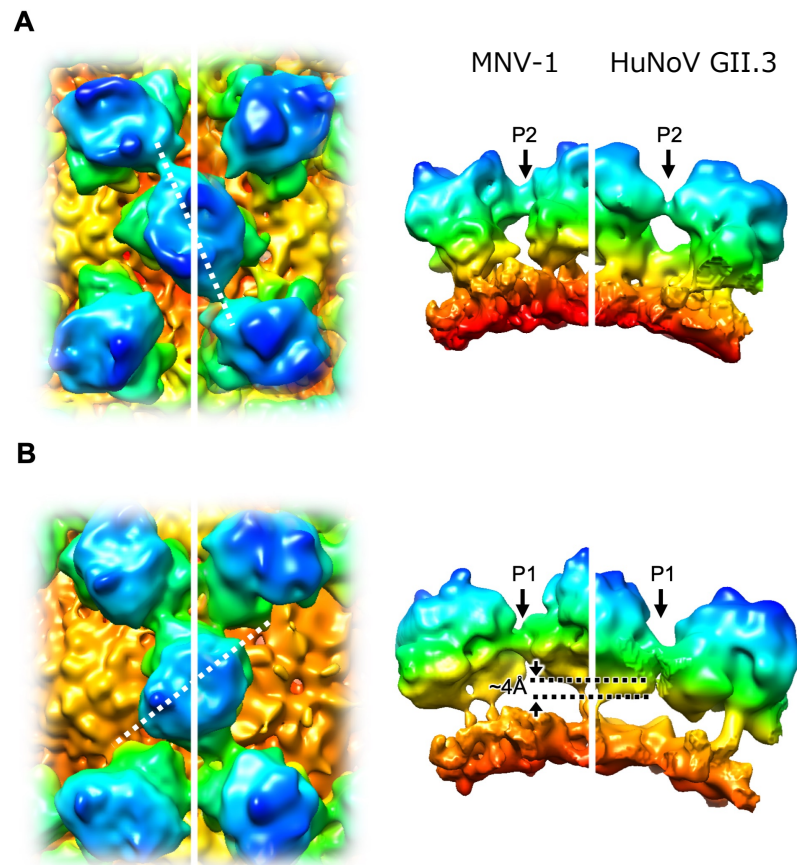


図5 MNV-1とHuNoV GII.3のキャプシド構造比較

(A) 静止型MNV-1およびHuNoV GII.3 VLPのキャプシド構造比較

(B) 上昇型MNV-1およびHuNoV GII.3 VLPのキャプシド構造比較

どちらも静止型と上昇型でP領域が時計回りに70°回転していた隣接するP領域ダイマーと相互作用する位置を黒矢印で示した

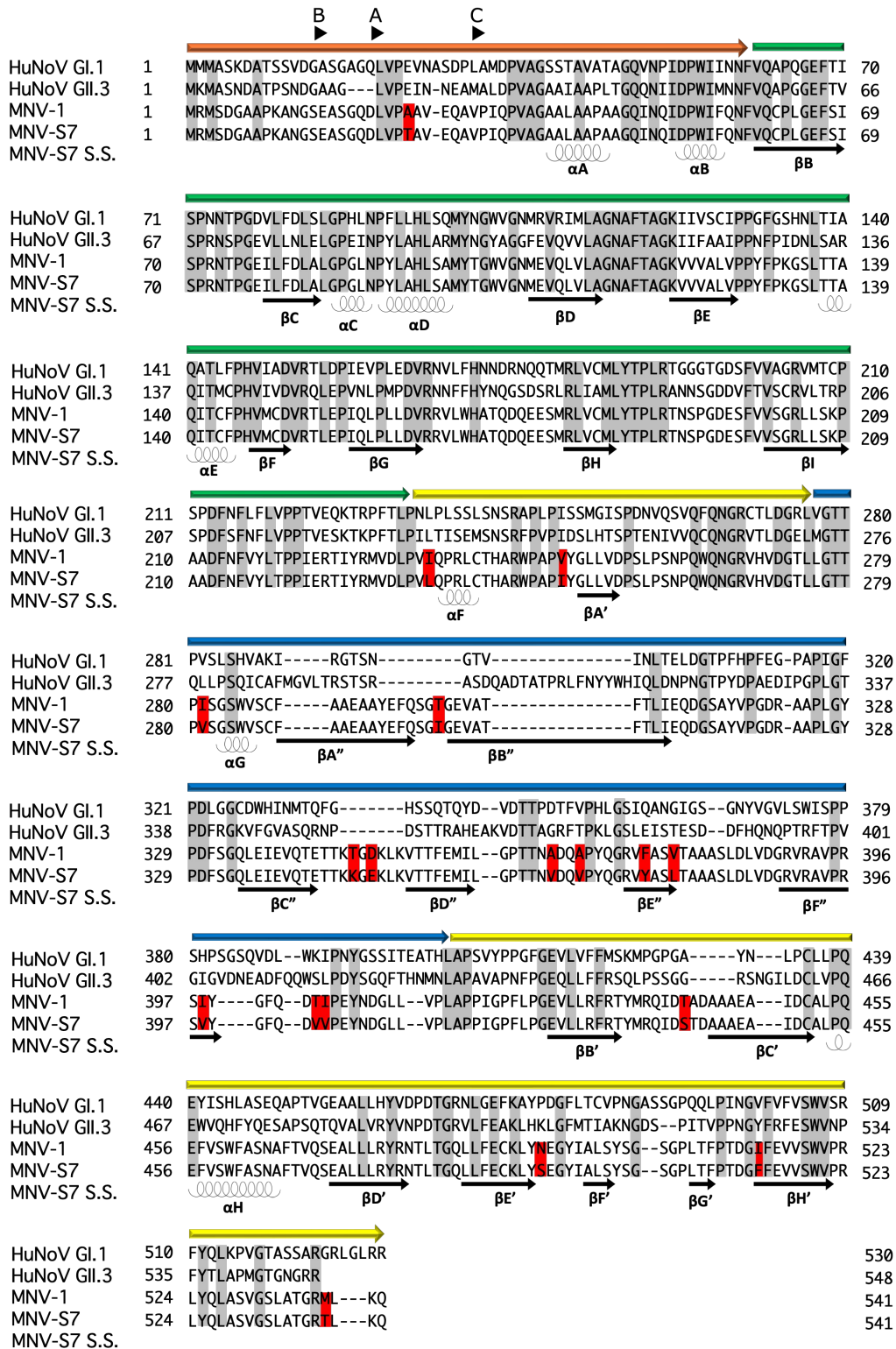


図6 HuNoV (GI.1、GII.3)、MNV-1およびMNV-S7のVP1配列アライメント
アライメントの上にあるオレンジ、緑、黄、青の矢印はそれぞれN末端、S領域、
P1サブドメイン、P2サブドメイン領域を表す

S.S. : 予想される二次構造

アローヘッド : A、BおよびCモノマーの開始及び終了残基

矢印 : キャプシドの主要βストランド構造

灰色ハイライト : HuNoVとMNVで保存されている配列 (46%)

赤色ハイライト : MNV-1とMNV-S7で異なる配列 (6%)

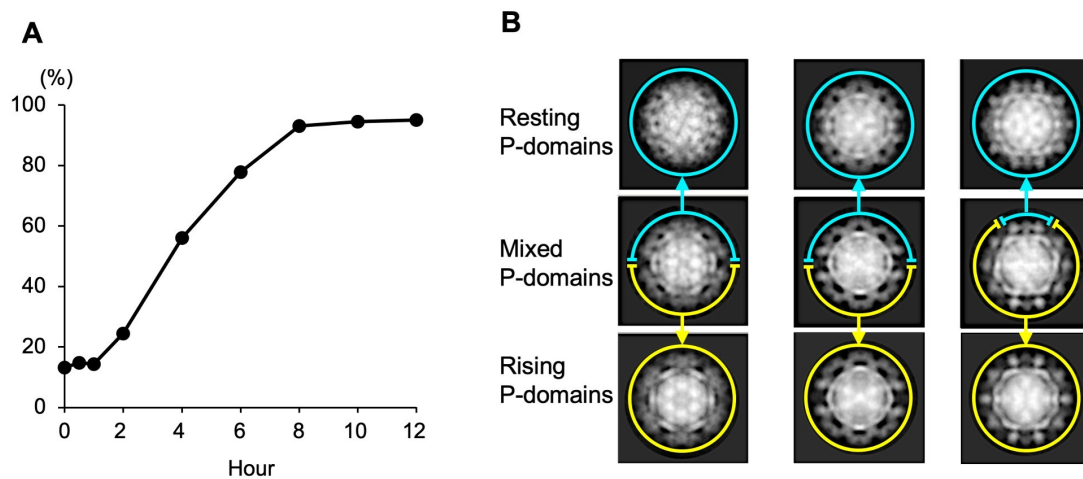


図 7 MNV-1感染性粒子の変形過程

- (A) 静止型P領域をもつ感染性粒子の割合
PBS(-)+EDTA(pH=8.0)に懸濁し、上昇型となった粒子をDMEMに再懸濁し、
各時間のP領域の構造を解析した
全てのP領域が静止型となったものをカウントし、その割合を示した
- (B) DMEMに再懸濁後2-6時間で撮影された粒子の2次元平均化イメージ
青丸：静止型P領域をもつ粒子 黄色丸：上昇型P領域をもつ粒子

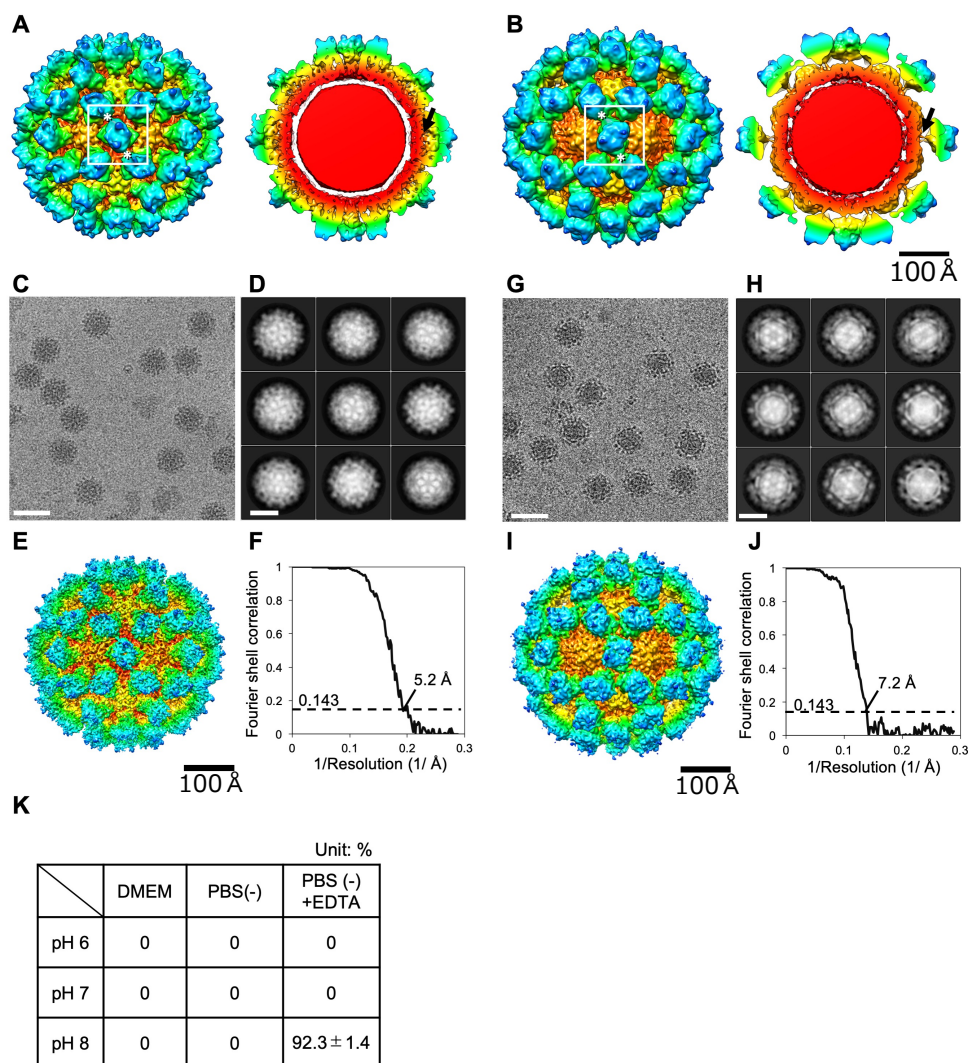


図8 MNV-S7感染性粒子のクライオEM構造解析

- (A) 静止型MNV-S7感染性粒子のクライオEM像
 (B) 上昇型MNV-S7感染性粒子のクライオEM像
 (C)・(G) 静止型(C)及び上昇型(G)粒子の電子顕微鏡写真 スケールバー500 Å
 (D)・(H) 静止型(D)および上昇型(H)の2次元平均化 イメージスケールバー200 Å
 (E)・(I) 静止型(E)および上昇型(I)のクライオ電顕マップ 3Dモデル
 (F)・(J) 静止型(F)および上昇型(J)のGS-FSCプロット
 (K) 各水溶液中で観察された上昇型P領域を持つ粒子数の割合
 (それぞれランダムに選んだ1,000個の粒子をカウントした)

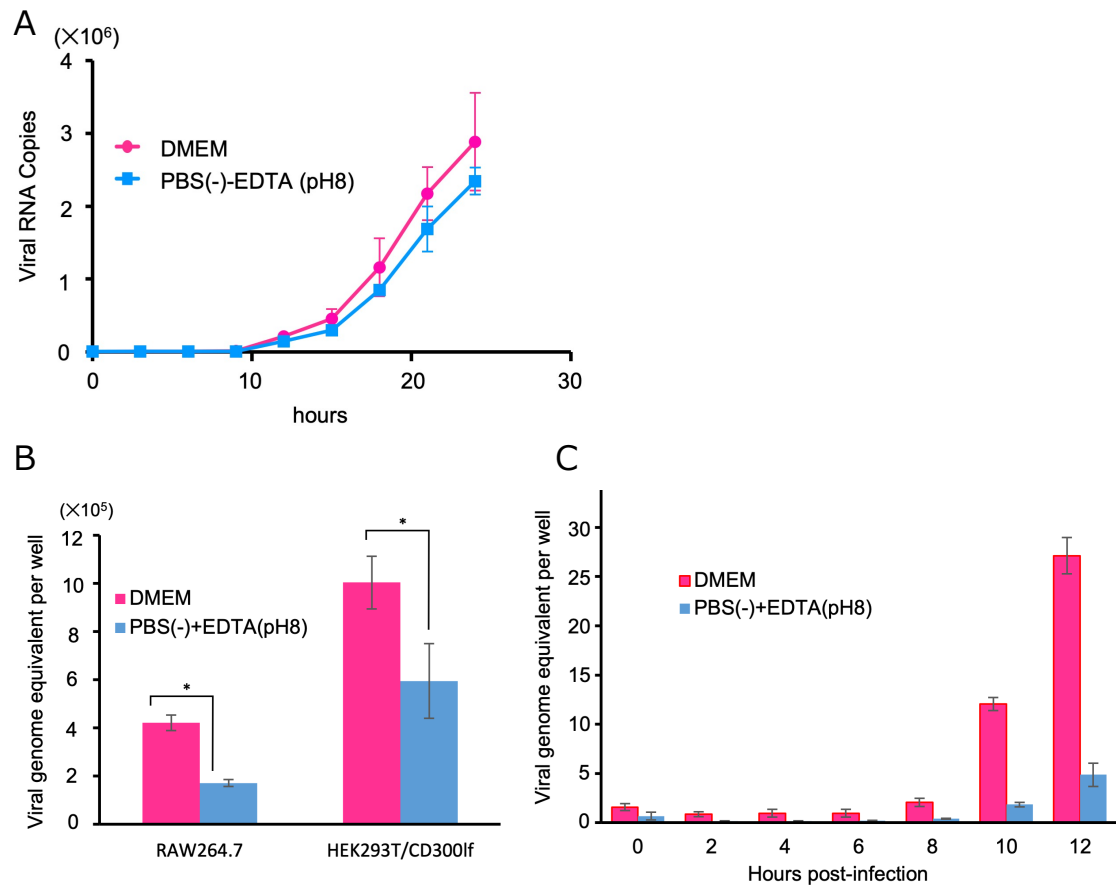


図9 静止型および上昇型MNV-S7感染性粒子の性状解析

(A) 各コンフォメーションを持つ感染粒子の増殖曲線
 ● 静止型 ■ 上昇型

(B) RAW264.7細胞およびHEK293T/CD300lf細胞におけるウイルス吸着量
 (*P<0.05、t-test)

(C) RAW264.7細胞における感染初期ゲノム複製量

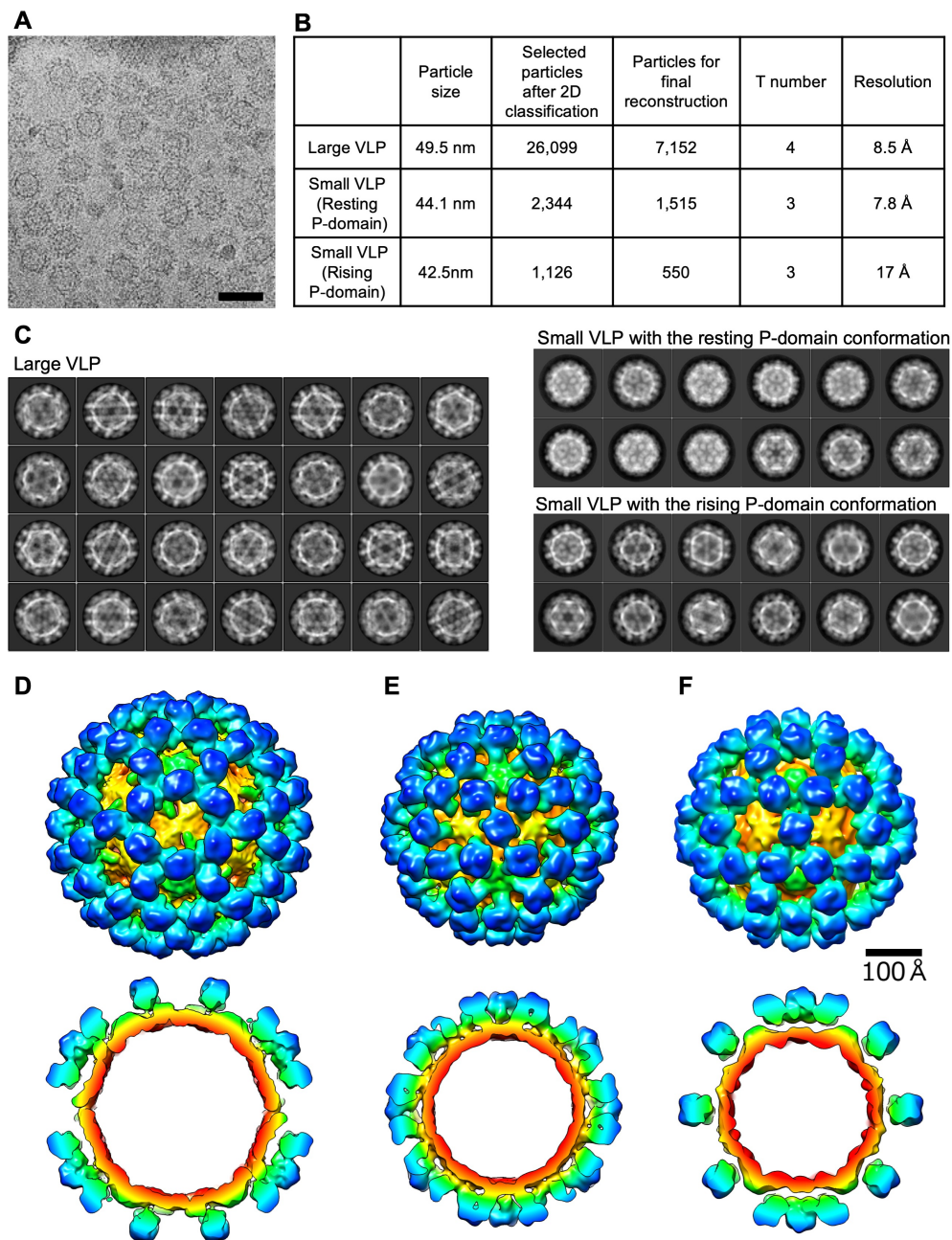


図10 MNV-1 VLPのキャプシド構造解析

- (A) MNV-1 VLPの電子顕微鏡写真 スケールバーは500 Å
- (B) 観察されたVLPのタイプ分け
Large VLP(T=4)と静止型small VLPおよび上昇型small VLP(T=3)
- (C) 3つのタイプ別二次元平均化イメージ
- (D) 3D再構成されたLarge VLP
- (E) 3D再構成されたSmall VLP (静止型)
- (F) 3D再構成されたSmall VLP (上昇型)

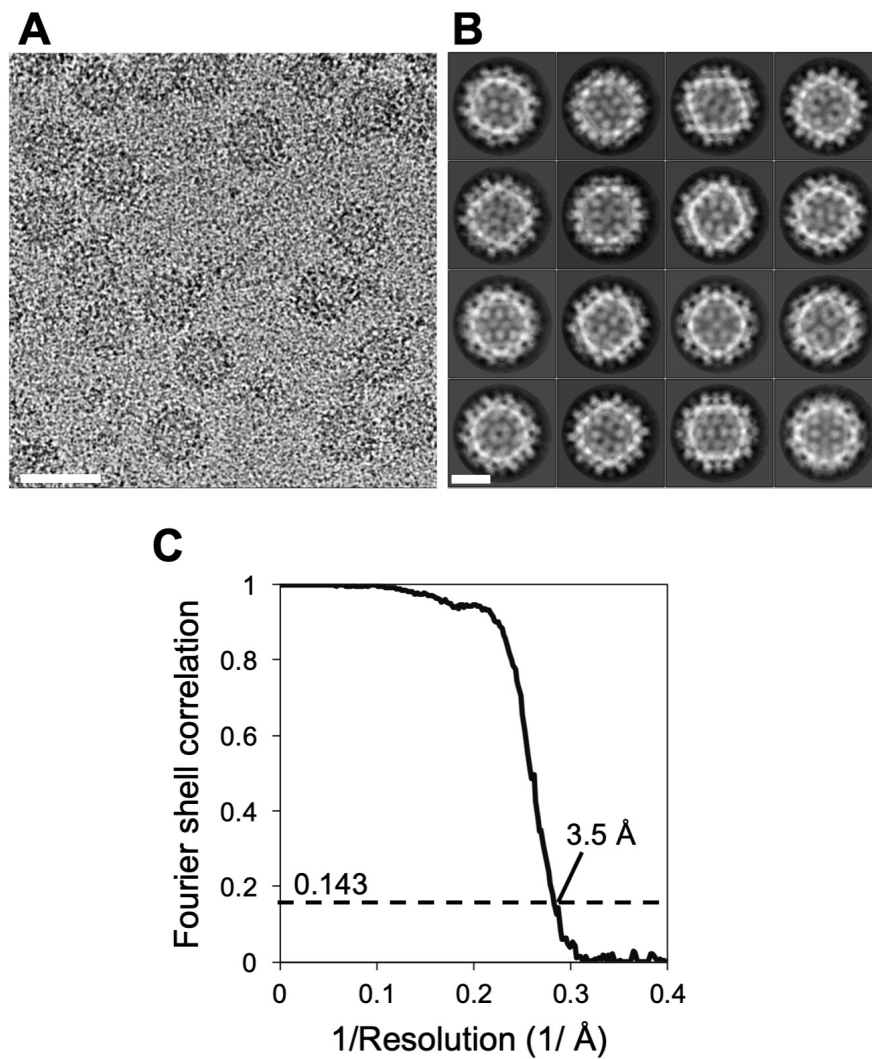


図11 DMEM中MNV-S7 VLPの高解像度クライオEM像再構成

- (A) MNV-S7 VLPの電子顕微鏡写真 スケールバー500 Å
- (B) 二次元平均化イメージ スケールバー200 Å
- (C) GS-FSCプロット 解像度3.5 Åで再構成された

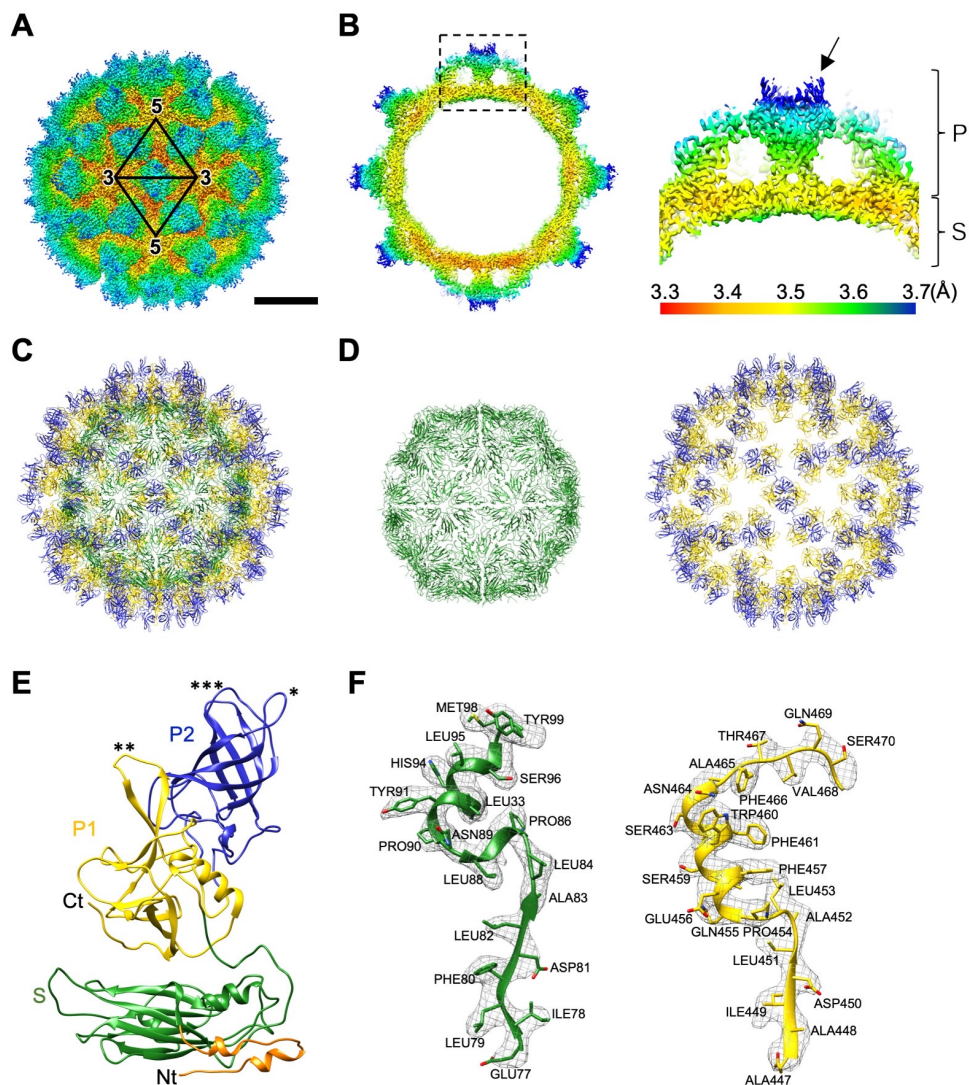


図12 MNV-S7 VLPの高解像度クライオEM像 (3.5 Å)

- (A) DMEM中のMNV-S7 VLPのクライオEM像
- (B) (A)の断面 右図は黒点線枠内の拡大図 カラースケールは局所分解能を示す 矢印は角状構造 ($\beta A''$ - $\beta B''$ ループと $\beta E''$ - $\beta F''$ ループ)
- (C) Ca backbone図 (S領域 + P領域)
- (D) (C)を分割 (緑: S領域 黄: P1サブドメイン 青: P2サブドメイン)
- (E) VP1モノマーのリボンモデル
 および: P領域ダイマーの安定化に機能するループ
 ***: $\beta A''$ - $\beta B''$ ループと $\beta E''$ - $\beta F''$ ループ
- (F) S領域 (緑) およびP1サブドメイン (黄色) における主要アミノ酸の電子密度分布とフィッティング原子モデル

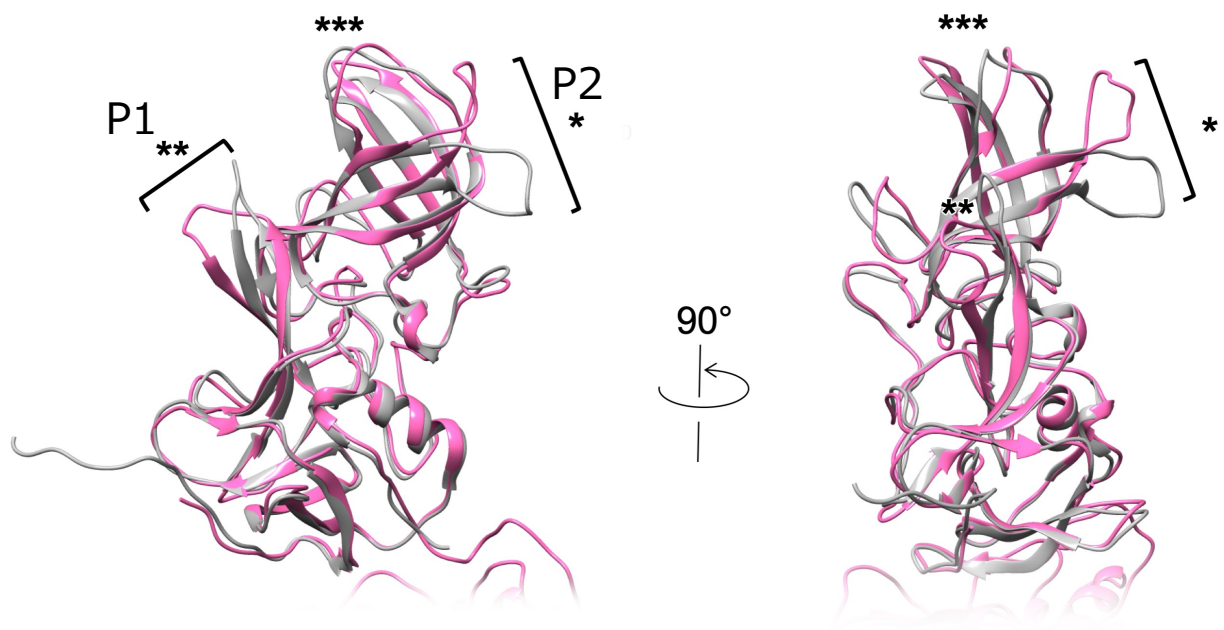


図13 クライオEMによるMNV-S7 PドメインとX線結晶構造解析による
MNV-1 Pドメインの構造比較

MNV-S7のP領域クライオマップ：桃色 → 静止型
MNV-1のP領域結晶構造リボンモデル：灰色 → 上昇型

*: $\beta C''$ - $\beta D''$ ループ
*: $\beta C'$ - $\beta D'$ ループ
***: $\beta A''$ - $\beta B''$ - $\beta E''$ - $\beta F''$

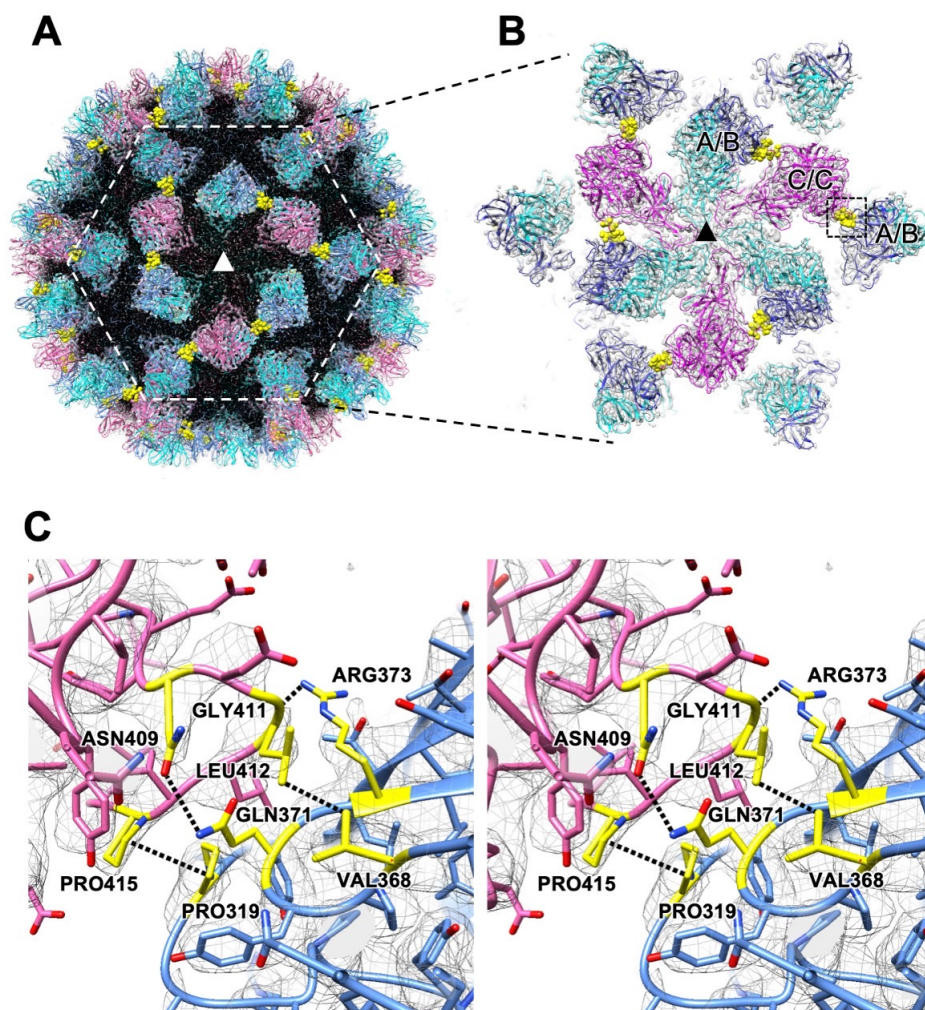


図14 MNV-S7 VLP(静止型)のP領域ダイマーの相互作用

- (A) 上昇型Pドメインを持つMNV-S7のクライオEM像に原子モデルを重ねた
中央の三角形は3回転軸、黒部分はS領域を表す
- (B) (A)の六角形内拡大図
紫：C/Cダイマー（2回転軸上） 青：A/Bダイマー（5回転軸の周囲）
隣接するP領域ダイマーと相互作用する残基は黄色で表した
- (C) 化学的相互作用に関与すると予想されるアミノ酸残基ステレオ図
紫：C/Cダイマー 青：A/Bダイマー
隣接するP領域ダイマーと相互作用する残基は黄色で表した

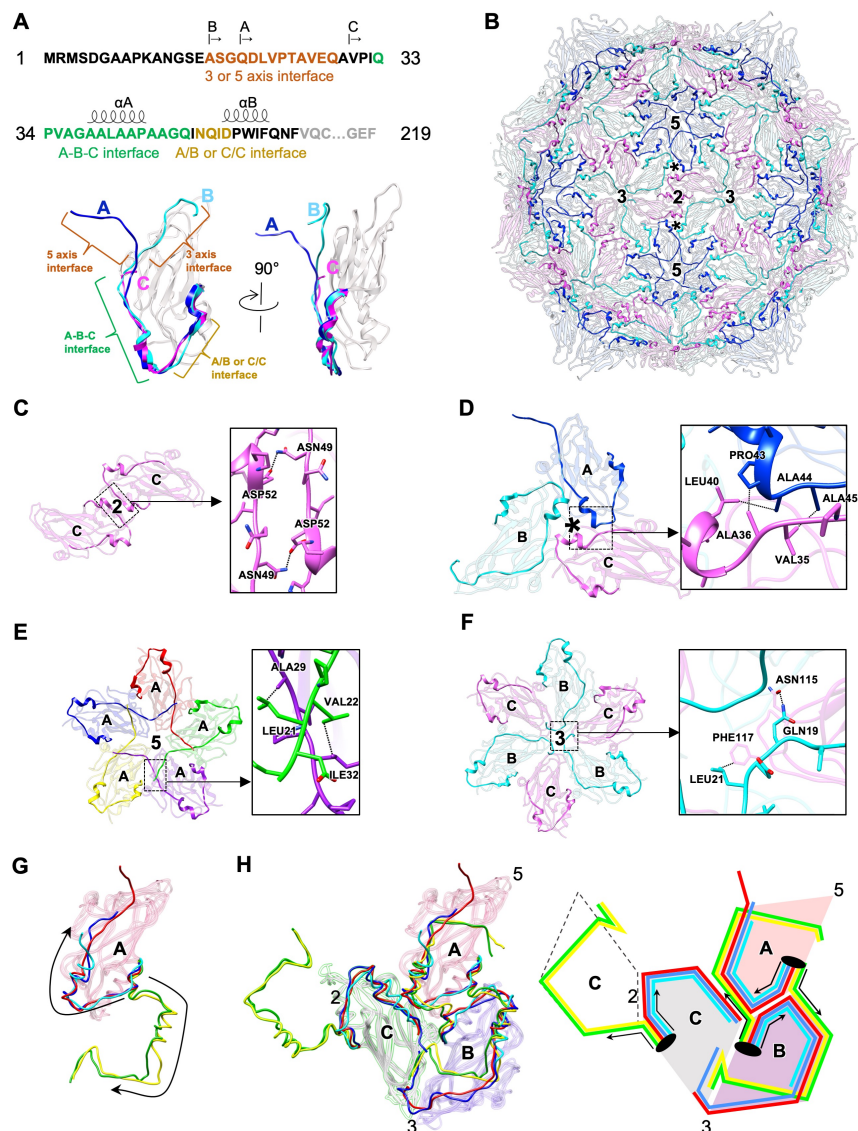


図15 MNV-S7 VLPのVP1 S領域の相互作用

- (A) S領域のN末端側アミノ酸配列（上段）およびモノマーリボンモデル（下段）
矢印はA、BおよびCモノマーの開始残基
αヘリックス構造（αAおよびαB）をらせんで示した
青：Aモノマー 水色：Bモノマー 紫：Cモノマー
- (B) S領域上のN末端
- (C) 2回転軸上のS領域上のN末端（Cモノマー）相互作用
- (D) 擬3回転軸上のS領域上のN末端（A、BおよびCモノマー）相互作用
- (E) 5回転軸上のS領域上のN末端（Aモノマー）相互作用
- (F) 3回転軸上のS領域上のN末端（BおよびCモノマー）相互作用
- (G) カリシウイルス科のAモノマーにおけるS領域N末端アームの比較
赤：MNV 青：HuNoV GI.1 水色：RHDV 黄色：SMSV 緑：FCV
- (H) (G)に隣接するBおよびCモノマーを加えた模式図

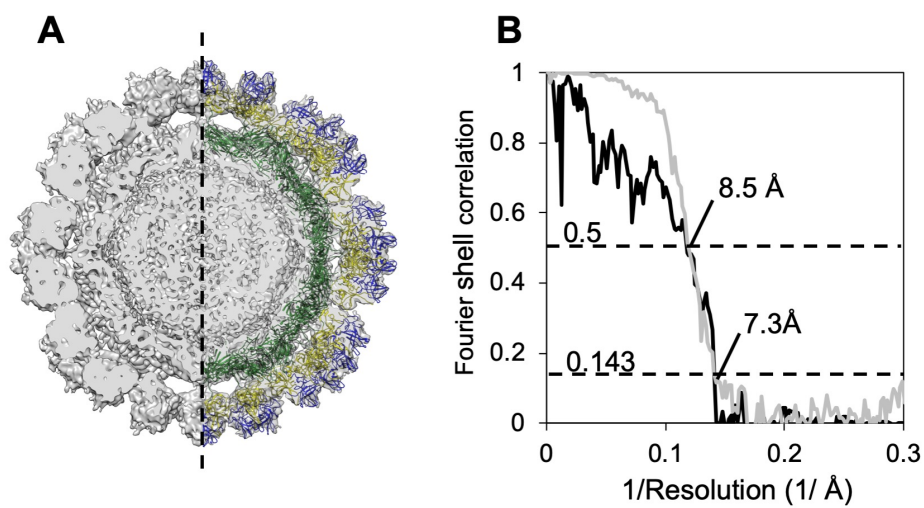


図16 上昇型MNV-S7感染性粒子の原子モデル

- (A) 上昇型MNV-S7感染性粒子の7.2 ÅのクライオEM像に静止型の原子リボンモデルをフィッティング
- (B) GS-FSCプロット
 黒線：原子リボンモデルのFSC曲線（上昇型にフィッティング）
 灰色線：上昇型感染性粒子のGS-FSC曲線

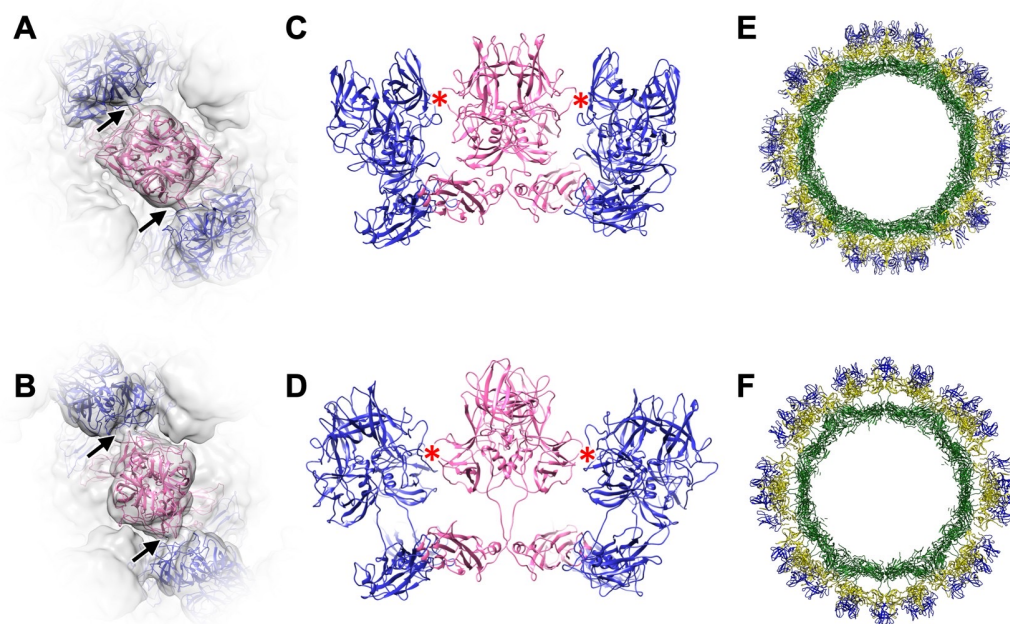


図17 P領域ダイマーの可逆的回転の分子メカニズム

- (A)・(B) 静止型(A)および上昇型(B)のC/CダイマーのリボンモデルをクライオEM像に重ねたモデル図
 紫：C/Cダイマー 青：A/Bダイマー
 矢印は隣接するダイマーと相互作用する箇所
- (C)・(D) (A)および(B)を横から見た図
 *の位置で隣接するダイマーと相互作用する
- (E)・(F) 静止型 (E)および上昇型 (F)のリボンモデル断面図

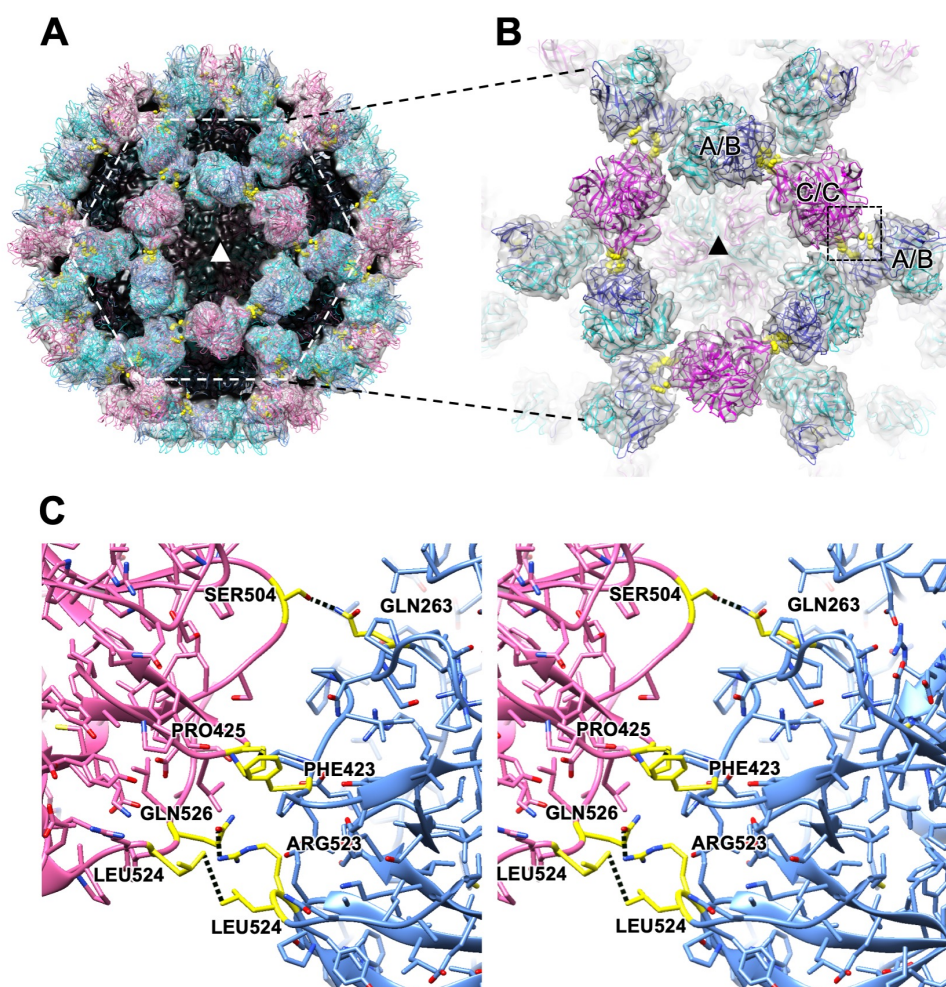


図18 MNV-S7 VLP(上昇型)のP領域ダイマーの相互作用

- (A) 上昇型Pドメインを持つMNV-S7のクライオEMマップに原子モデルを重ねた
中央の三角形は3回転軸、黒部分はS領域を表す
- (B) (A)の六角形内拡大図
紫：C/Cダイマー（2回転軸上） 青：A/Bダイマー（5回転軸の周囲）
隣接するP領域ダイマーと相互作用する残基は黄色で表した
- (C) 化学的相互作用に関与すると予想されるアミノ酸残基ステレオ図
紫：C/Cダイマー 青：A/Bダイマー
隣接するP領域ダイマーと相互作用する残基は黄色で表した

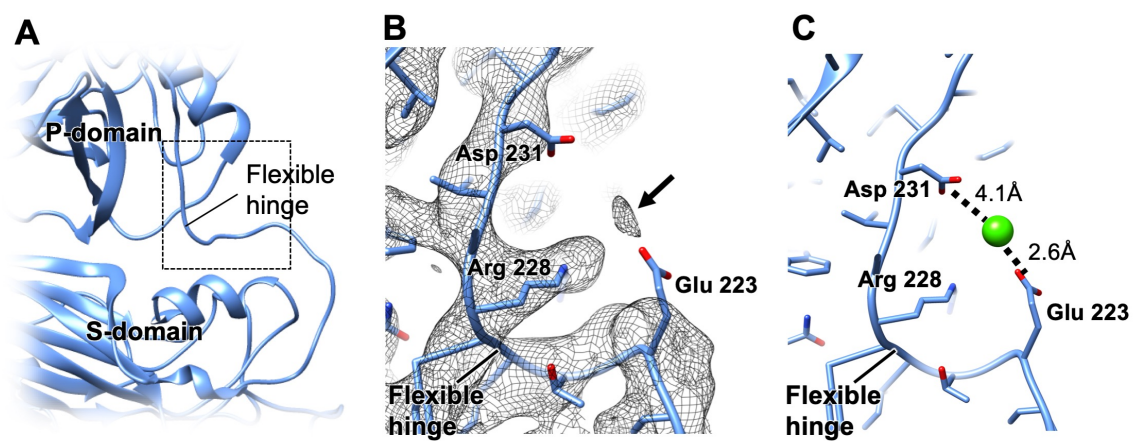


図19 静止型MNV-S7 VLPにおけるS領域とP領域を繋ぐフレキシブルヒンジの分子モデル

- (A) S領域とP領域の境界部 フレキシブルヒンジ
- (B) (A)の四角部分の原子モデル
矢印はGlu223とAsp231の間に存在した密度を示した
- (C) 可能性のある金属イオンとして Ca^{2+} をBに示した密度に当てはめ、負に帯電した残基からの距離を示した

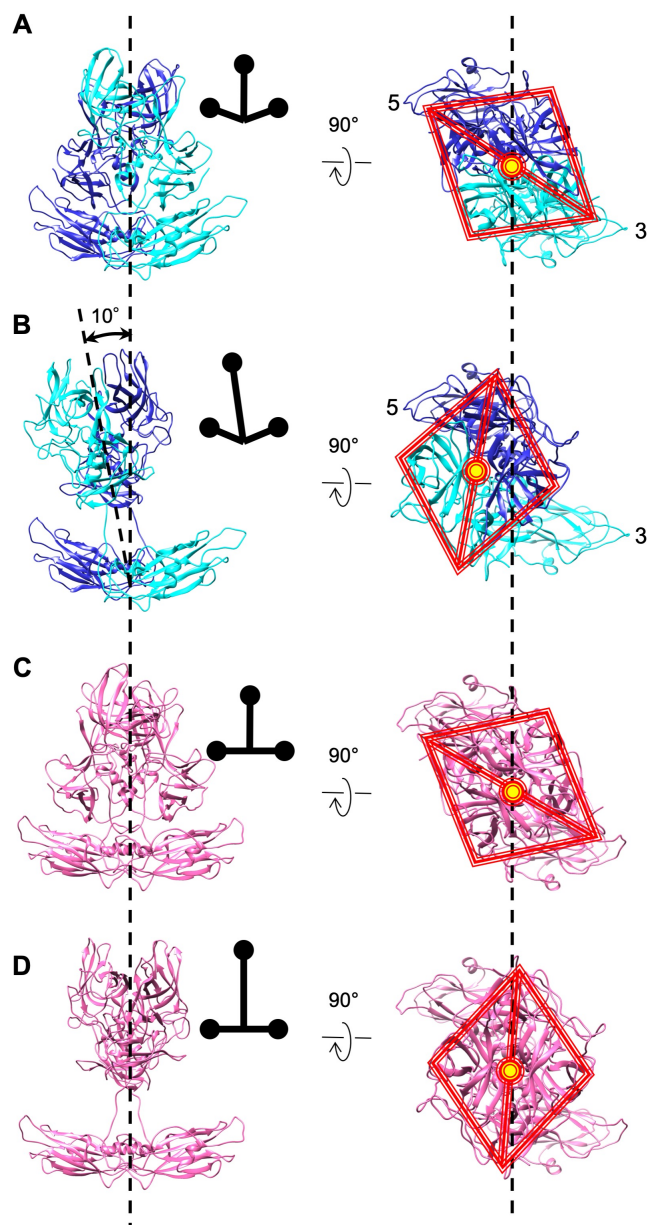


図20 MNV-S7のA/BダイマーおよびC/Cダイマーのリボンモデル

- (A) 静止型A/Bダイマー
- (B) 上昇型A/Bダイマー
上昇型では5回転軸に対して10°傾いている
- (C) 静止型C/Cダイマー
- (D) 上昇型C/Cダイマー
静止状態のダイマーは傾くことなく上昇状態へと変化

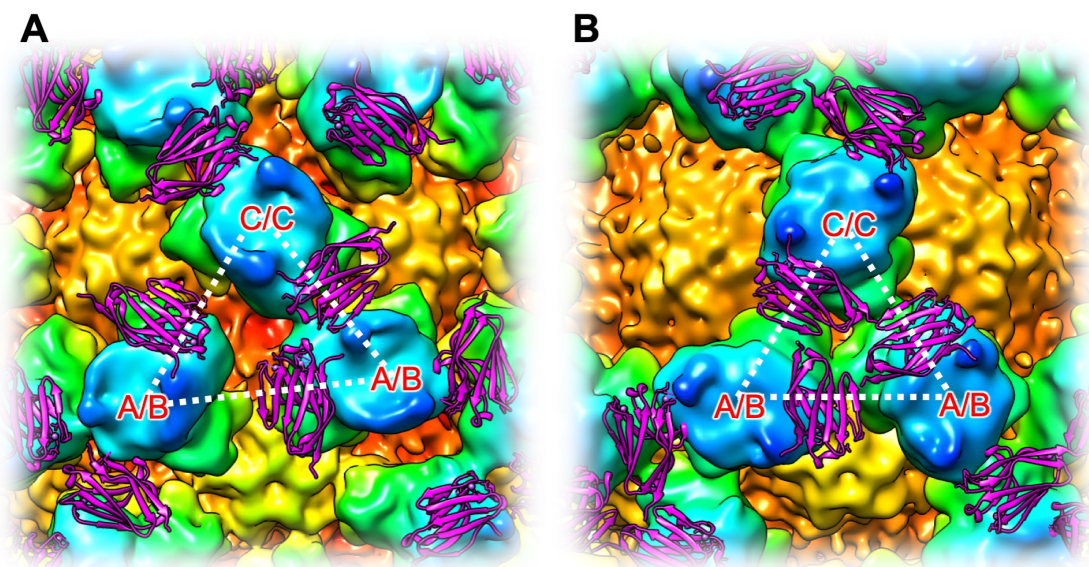


図21 P領域と細胞レセプター分子CD300lfとの相互作用

- (A) 静止型MNV-1のクライオEM像上のP領域-CD300lf結晶モデル
 - (B) 上昇型MNV-1のクライオEM像上のP領域-CD300lf結晶モデル
- マゼンダ：CD300lf分子
白線で結ばれた三角形の中にCD300lf分子は3つ結合可能

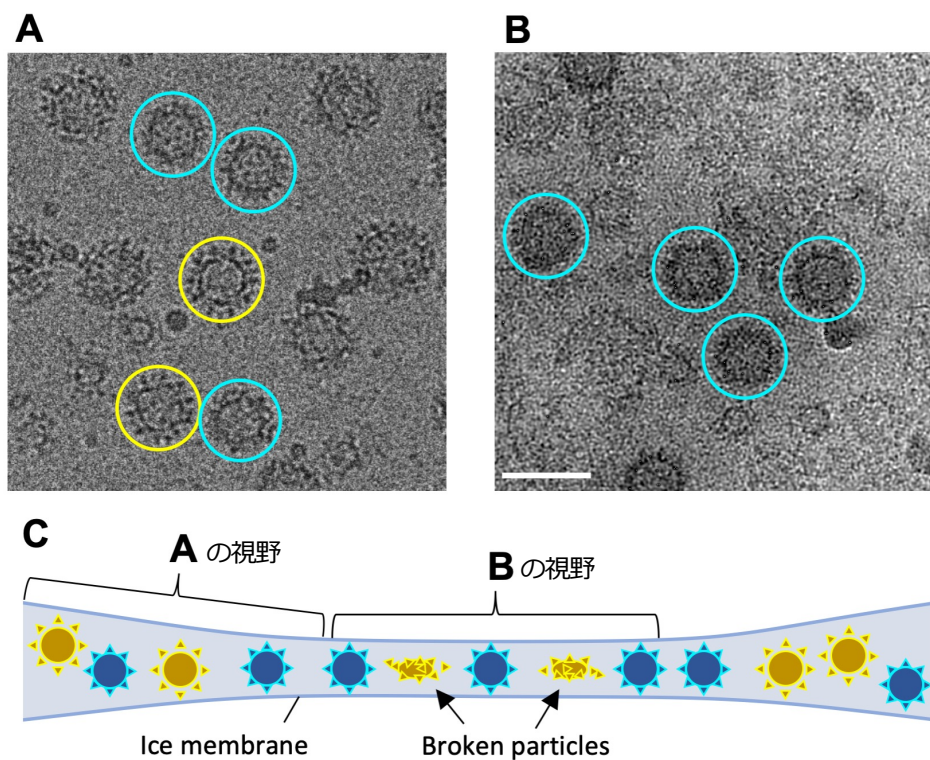


図22 静止型および上昇型HuNoV GII.3VLPの構造安定性

- (A) 静止型（青丸）および上昇型（黄色丸）HuNoV GII.3 VLPの電子顕微鏡図
- (B) 薄氷層中では上昇型VLPは表面張力によって壊れ容易に崩壊した
- (C) 氷埋されたクライオEM用グリッド
グリッドの穴周辺に比べ、中央部分の氷は薄く上昇型は中央部で崩壊するか縁部分に移動

Data Collection		
Electron microscopy	JEM-2200FS	
Camera	DE20	
Voltage	200 kV	
Magnification	40,000	
Calculated pixel size	1.422 Å	
Exposure time	3 s	
Electron dose	15 electron/Å ²	
Number of frames	75	
Defocus range	2.0 - 4.0 μm	
Image Processing		
Frame alignment	Script provided by DE manufacturer	
CTF estimation software	CTFFIND 4.1.5	
Number of micrographs	1,046 ^{*1}	2,188 ^{*2}
	2,049 ^{*3}	2,739 ^{*4}
	106 ^{*5}	1,917 ^{*6}
Reconstruction software	Relion 2.0	
Initial number of particles	7,372 ^{*1}	20,590 ^{*2}
	18,706 ^{*3}	17,820 ^{*4}
	560 ^{*5}	5,097 ^{*6}
Particles contributing to final map	6,708 ^{*1}	4,704 ^{*2}
	17,820 ^{*3}	5,063 ^{*4}
	279 ^{*5}	1,482 ^{*6}
Applied symmetry	I1	
Applied B-factor	-371 Å ² ^{*1}	-695 Å ² ^{*2}
	- 400 Å ² ^{*3}	-612 Å ² ^{*4}
	- 1000Å ² ^{*5}	-1900 Å ² ^{*6}
Global resolution (FSC = 0.143)	5.3 Å ^{*1}	7.3 Å ^{*2}
	5.2 Å ^{*3}	7.2 Å ^{*4}
	9.3 Å ^{*5}	13 Å ^{*6}
EMDB number	EMD-9737 ^{*1}	EMD-9738 ^{*2}
	EMD-9735 ^{*3}	EMD-9736 ^{*4}
	EMD-9739 ^{*5}	EMD-9740 ^{*6}

*1 静止型 MNV-1

*2 上昇型 MNV-1

*3 静止型 MNV-S7

*4 上昇型 MNV-S7

*5 静止型 HuNoV GIL3 VLP

*6 上昇型 HuNoV GIL3 VLP

表1 MNV 感染性粒子および HuNoV GIL3 VLP のクライオ EM 取得データ

Data Collection	
Electron microscopy	Titan Krios
Camera	Falcon II camera
Voltage	300 kV
Magnification	75,000
Calculated pixel size	0.86 Å
Exposure time	2 s
Electron dose	40 electron/Å ²
Number of frames	32
Defocus range	1.0 - 2.5 µm
Image Processing	
Frame alignment	MotionCor2
CTF estimation software	CTFFIND 4.1.5
Number of micrographs	2,746
3D map reconstruction software	Relion 2.0
Initial number of particles	44,626
Particles contributing to final map	41,847
Applied symmetry	I1
Applied B-factor	-157 Å ²
Global resolution (FSC = 0.143)	3.53 Å
EMDB number	EMD-9741
Model Building	
Modeling software	Coot, Phenix
Number of residues built	513 (A), 516 (B), 502 (C)
R.m.s. deviation (bonds)	0.007
R.m.s. deviation (angles)	1.192
Ramachandran outliers	0 %
Rotamer outliers	0.47 %
Clash score, all atoms	7.97
PDB ID	6IUK

表2 MNV-S7 VLP のクライオ EM 像取得データ

第二章 シングルドメイン抗体の経鼻投与は SARS-CoV-2 感染モデル動物の症状を改善する

【緒言】

コロナウイルスはエンベロープを持つプラス一本鎖 RNA ウイルスで、アルファ、ベータ、デルタおよびガンマの 4 つの属に分類される。過去に流行した重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome: SARS) と中東呼吸器症候群 (middle eastern respiratory syndrome: MERS)、そして世界的流行を見せた新型コロナウイルス感染症 (coronavirus disease 2019: COVID-19) の原因ウイルスはベータコロナウイルス属に属する。これらのウイルスは軽度から重度の気道感染症を引き起こし、重症化し死に至る可能性がある。ベータコロナウイルス属の特徴として、ウイルス粒子表面に細胞侵入の際に機能するスパイク (S) タンパク質を持つ。S タンパク質には、S1 と S2 の 2 つの異なるサブユニットがあり、S1 サブユニットの受容体結合ドメイン (receptor binding domain: RBD) は宿主細胞の受容体と相互作用する。SARS の原因ウイルスである SARS-CoV-1 と COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 の S タンパク質はどちらも同じ宿主細胞受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (angiotensin-converting enzyme 2: ACE2) に結合する。ウイルス粒子が RBD を介して ACE2 に結合した後、宿主細胞表面に存在するプロテアーゼが S タンパク質を切断して活性化し、ウイルス膜が宿主細胞膜と融合、細胞内への侵入を果たす。よって、この融合の阻止は治療薬開発の重要なターゲット過程となる [1, 2]。また、SARS-CoV-2 は ACE2 が発現している鼻粘膜や肺に感染するため [3]、抗ウイルス薬を直接呼吸器系に送達することができれば、その薬効の向上が期待できる。

ラクダ科動物は、重鎖 (H 鎖) と軽鎖 (L 鎖) からなるヘテロダイマーから構成される IgG 抗体の他に、重鎖のみからなる抗体 (heavy chain antibody: HCAb) を持つことが知られている。この HCAb の可変領域 (Variable domain of Heavy chain of Heavy chain: VHH) は、単一のアミノ酸鎖で構成されており、特定の抗原に高い親和性と特異性で結合することが知られている。約 150 kDa の分子量を有するヒトの IgG 分子と異なり、VHH は、約 15 kDa の分子量の単一のアミノ酸鎖からなるため、微生物を用いて容易にアミノ酸配列を改変し、新たなモノクローナルな VHH 抗体を作製することが可能である。これまでにインフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス (HIV-1)、RS ウイルス (RSV) などのウイルス粒子と結合し、感染力を失わせること (中和すること) が可能な VHH が報告されている [4]。さらに VHH は、熱や pH に対して安定で長期保存性にも優れているため、感染症流行に備える医薬品に適用すれば長期備蓄が可能な素材である。また、その安定性ゆえ、噴霧吸入器 (ネブライザー) を用いて感染した肺に直接投与することが可能で、ネブライザーで肺に直接投与する ALX-0171 の RS 感染症治療の臨床試験が行われている [5]。In vitro の研究では、ALX-0171 は、RSV 治療薬として承認されているヒトモノクローナル抗体製剤であるパリ

ビズマブよりも高い親和性で RSV の F タンパク質に結合することが示され、コottonラットを用いた経鼻投与試験では肺と鼻腔での RSV を減少させた[5, 6]。最近 SARS-CoV-1 または SARS-CoV-2 に対する VHH とシングルドメイン抗体も同定され、ACE2 への結合を阻害し、感染を防ぐことが報告されている[7-12]。VHH-72 は、SARS-CoV-1 を中和するが、SARS-CoV-2 の中和にはヒト抗体の Fc ドメインとの融合が必要であった[7]。また Ty1 [9]、Sb23 [10]、H11-H4 [11]といった VHH も Fc ドメインとの融合により中和効果は増強されたが、n3088、n3130 [8]および Nb11-59 [12]の中和効果は増強されなかった。以上のように *in vitro* における VHH によるウイルス中和の有効性について幾つかの報告があるが、*in vivo* でどのような作用をするかまだ不明である。

本研究では、SARS-CoV-2 の S タンパク質を抗原として用いた VHH-cDNA ディスプレイ法により、SARS-CoV-2 に特異的な VHH を見出した。この VHH (K-874A) は、SARS-CoV-2 に対して既報の VHH[7, 8]よりも高い親和性を示し、*in vitro* 試験において、K-874A は SARS-CoV-2 に対して中和活性を示した。また、モデル動物であるシリアンハムスターを用いた実験では、SARS-CoV-2 に感染したハムスターに K-874A を鼻腔投与したところ、SARS-CoV-2 感染で特徴的に見られる体重減少の抑制と、肺組織におけるウイルス複製の減少およびサイトカイン誘導の抑制が観察された。以上より K-874A は、Fc ドメインなどの修飾をしなくても高い活性を示したことから、COVID-19 に対する治療薬開発へつながる可能性が示された。

【材料と方法】

cDNA ディスプレイライブラリーの作製

第1ラウンド (R1) の cDNA ライブラリー (200 pmol スケール) は、Epsilon Molecular Engineering (EME) 株式会社より提供された VHH コード DNA ライブラリー (予測多様性 1×10^{13} 種類) から合成した。第2ラウンド (R2) および第3ラウンド (R3) の cDNA ディスプレイライブラリー (6 pmol スケール) はそれぞれ前段階のライブラリーから合成した。DNA ライブラリーの mRNA への翻訳は T7 RiboMAX Express Large-Scale RNA Production System (プロメガ) を用いて行った。DNase 処理した mRNA は Agencourt RNAClean XP beads (Beckman Coulter Genomics) を用いて精製を行った。精製した mRNA は cnvK リンカー (光架橋ピューロマイシンリンカー) と 200 mM NaCl を加えた 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中で以下のアニーリング条件で連結させた: 90 °C で 2 分間加熱した後、0.1 °C/秒の速度で 70 °C に温度を下げ、1 分間インキュベートした後、0.1 °C/秒の速度で 25 °C に冷却し、30 秒間インキュベートした後、使用するまで 4 °C で保存した。この混合物に、UV ランプ (6 W、UVGL-58、254/365 nm、100 V) を 5 分間照射し、mRNA-リンカー複合体を得た。mRNA-リンカー複合体の翻訳には無細胞タンパク質発現系の Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease-Treated (Promega) を用いた。mRNA-リンカー複合体とウサギ網状赤血球ライセートを混合し、37 °C で 15 分反応させた。混合物に KCl および $MgCl_2$ をそれぞれ終濃度 900 および 75 mM になるように添加し、37 °C で 20 分間反応させ mRNA-リンカー-VHH 複合体を得た。

作製した mRNA-リンカー-VHH 複合体に EDTA (終濃度 70 mM) と、2 mM EDTA、2 M NaCl および 0.2 % Tween 20 を含む等量の 20 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.0) を加え、Dynabeads MyOne ストレプトアビジン C1 磁気ビーズ (Thermo Fisher Scientific) 60 μ L に 25 °C で 30 分間固定化した。ビーズを 60 μ L の洗浄バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、1 M NaCl、0.1 % Tween 20) で 2 回洗浄した。その後、ReverTra Ace (東洋紡) を用いて、42 °C で 30 分間逆転写を行い、cDNA-リンカー-VHH 複合体を得た。ビーズを 200 μ L の洗浄バッファー (20 mM リン酸ナトリウムバッファー、0.5 M NaCl、5 mM イミダゾール、0.05 % Tween 20 (pH 7.4)) で 2 回洗浄した後、洗浄バッファーで調製した RNase T1 (Thermo Fisher Scientific) 30 μ L をビーズに加えた。この混合物を 37 °C で 15 分間インキュベートし、cDNA-リンカー-VHH 複合体をビーズから遊離させた。cDNA-リンカー-VHH 複合体を含む上清は His Mag Sepharose Ni ビーズ (GE ヘルスケア) を用いて精製した。上清を 20 μ L のビーズに加え、25 °C で 30 分間インキュベートした。ビーズを 200 μ L の洗浄バッファー (20 mM リン酸ナトリウムバッファー、0.5 M NaCl、20 mM イミダゾール (pH 7.4)) で洗浄し、10 μ L の溶出バッファー (20 mM リン酸ナトリウムバッファー、0.5 M NaCl、250 mM イミダゾール、0.05 % Tween 20 (pH 7.4)) で 25 °C、15 分間インキュベートした。回収した溶出液は、使用するまで 16 °C で保存した。

cDNA ディスプレイ法を用いた VHH スクリーニング

スクリーニングの標的タンパク質として、C 末端ポリヒスチジンタグ付き SARS-CoV-2 S1 サブユニット (Val16-Arg685) (YP_009724390.1) (#40591-V08H, Sino Biological) を用いた。マイクロタイタープレートにリン酸緩衝液 (Phosphate Buffer Saline: PBS) で調整した S1 サブユニットを 100(R1)、10 (R2)、1 µg/mL (R3)を 100 µL ずつ加え 4 °C一晩固相化した。コーティングしたウェルは、200 µL の 3 %ウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) を含む PBST (0.1 % Tween20 を含む PBS) を用いて室温で 2 時間ブロッキングした後、200 µL の HBST (50 mM HEPES、150 mM NaCl、0.1 % Tween20) で 3 回洗浄した。VHH-cDNA 複合体ライブラリー100 µL (R1 の VHH-cDNA 複合体ライブラリー50 µL +1 % BSA を含む HEPES 50 µL、R2 または R3 の VHH-cDNA 複合体ライブラリー50 µL +1 % BSA を含む HBST 50 µL)を固相化したウェルに添加し、室温で 1 時間インキュベートした。未反応の VHH-cDNA 複合体ライブラリーは 200 µL の HBST で 10 回洗浄することにより除去した。標的タンパク質に結合した VHH-cDNA 複合体は 100 µL の 100 mM Tris(pH 11.0)を添加し、静かにピペッティングした後、37 °Cで 10 分間インキュベートすることにより溶出した。溶出液を鋳型として、後述のプライマーと KAPA HiFi HS ReadyMix (2x) (Kapa Biosystems)を用いて PCR を行った。

PCR 産物は、Agencourt AMPure XP ビーズ(Beckman Coulter Genomics)を使用して精製し、精製した DNA ライブラリーは、先述の方法で翻訳に用い、次の選別ラウンドで使用する cDNA ディスプレイライブラリーを調製した。

プライマー配列

Forward (5'-3')	GATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAAGTATTTTTACAACAATTACCAACA
Reverse (5'-3')	TTTCCACGCCGCCCCCGTCCT

PCR 条件

95 °C、2 分	
98 °C、20 秒	x 22 サイクル (R1) x 24 サイクル(R2、R3)
68 °C、15 秒	
72 °C、20 秒	
72 °C、5 分	

次世代シーケンサー(NGS)を用いた DNA ライブラリーの配列確認

R2 および R3 で得られた DNA ライブラリーは PicoGreen dsDNA Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いて 100 ng/mL の濃度に調整した。これらを鋳型とし、KAPA HiFi HS ReadyMix を用いて以下のプライマーと反応条件で PCR を行った。

プライマー配列

Forward (5'-3')	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNATGGCTGAGGTGCAGCTCGTG
Reverse (5'-3')	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNTGATGATGATGGCTACCACCTCCCG

PCR 条件

95 °C、3 分	
98 °C、20 秒	x 16 サイクル
62 °C、15 秒	
72 °C、20 秒	
72 °C、5 分	

PCR 産物の精製は Agencourt AMPure XP beads を用いた。続いて、この PCR 産物を鋳型とし、Nextera XT Index Kit v2 (Illumina) に添付の Forward および Reverse プライマーと、KAPA HiFi HS ReadyMix を用いて以下の反応条件でインデックス PCR を実施した。

PCR 条件

95 °C、3 分	
98 °C、20 秒	x 8 サイクル
55 °C、15 秒	
72 °C、30 秒	
72 °C、5 分	

PCR 産物は Agencourt AMPure XP beads で精製後、ライブラリー濃度を PicoGreen dsDNA Assay Kits を用いて 4 nM に調整した。その後、ライブラリーを終濃度 7 pM に希釈、シーケンスランコントロールとして PhiX DNA(Illumina)を 5 %加えた。シーケンシングは Miseq Reagent Nano kit V2 500 cycle を用い、MiSeq 2000 (Illumina) を用いて行った。

NGS データ解析

NGS シーケンスデータの解析は、PEAR ソフトウェアを用いて、得られたリアルデータのペアエンドリードをマージして行った[13]。VHH をコードするヌクレオチド配列は、VHH のフレーム領域に保存された典型的な塩基配列を指定する基本的な Linux コマンドラインの組み合わせを使用して抽出した。VHH をコードする配列は、MEGA X ソフトウェアを使用して遺伝コードに基づいて翻訳した[14]。

VHH の精製

第 3 ラウンド終了後、選別された VHH 配列に His タグまたは FLAG タグをつけた目的遺伝子を VHH 発現用プラスミドに組み込んだ。構築したプラスミドは、9 種類のプロテアーゼ (*epv*, *wprA*, *mpr*, *nprB*, *bpr*, *nprE*, *vpr*, *aprE*, *aprX*) [15]を欠損し、胞子形成シグマ因子 (*sigF*) 欠損変異体を含む枯草菌 168 (JP4336082B2) に導入した。枯草菌を LB 培地 (1 %トリプトン、0.5 %酵母エキス、0.5 %NaCl) で前培養し、15 μ g/mL のテトラサイクリンを添加した 2 x L-Mal 培地 (2 %トリプトン、1 %酵母エキス、1 %NaCl、7.5 %マルトース水和物、7.5 μ g/mL MnSO₄) で 30 °C 72 時間培養した。培養上清中に分泌された発現タ

ソパク質 (His タグ K-874A) は Ni-NTA アガロースビーズ (富士フィルム和光純薬) を用いて精製し、30 mM イミダゾールを含む PBS に再懸濁した。K-874A-FLAG 画分は Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit (Merck) を用いて上清から回収し、30mM のイミダゾールを加えた PBS に再懸濁した。精製した VHH は使用するまで 4 °C で保存した。

バイオレイヤー干渉 (BLI) 法

K-874A と S1 タンパク質の結合親和性は、Octet RED 384 (Pall Life Sciences, USA) を用いたバイオレイヤー干渉 (BLI) 法で測定した。Kinetic buffer として PBST を用い、温度は 25 °C に固定した。各測定溶液 50 μ L を 384 ウェルブラックプレート (Fortebio) に加え、以下のように測定を行った。

- 1) kinetic buffer を用いてローディングベースラインを 30 秒間測定
- 2) HIS1K バイオセンサー (Fortebio) に His タグ付き K-874A (リガンド) を固定化
- 3) 測定ベースラインを kinetic buffer 中で 30 秒間測定
- 4) SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike S1-Fc Recombinant Protein (Sino Biological) をアナライトとし、245.8 nM からの 2 倍段階希釈液を作製、ロードしたセンサーを浸漬し特異的結合を 180 秒間測定
- 5) kinetic buffer にバイオセンサーを浸漬、240 秒間測定しアナライト解離を測定

得られたデータは Fortebio Octet 解析ソフトウェア (Date Analysis HT Version 11.1.2.48) を用いて解析し、1 : 1 の一価結合モデルを用いて動力学パラメータを決定した。

酵素結合免疫吸着法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) を用いた K-874A の結合特異性評価

Nunc-Immuno Plate II (Thermo Fisher Scientific) のマイクロタイターウェルに PBS で希釈した His タグ付き組換え HCoV-HKU1、HCoV-OC43、SARS-CoV-2 (Sino Biological) および SARS-CoV-1 S1 サブユニット (The Native Antigen Company) 100 μ L を 4 °C で一晩固相化した。5 % スキムミルクを含む PBS を 200 μ L / ウェル加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った後、PBST 200 μ L で 3 回洗浄した。PBST で 20 μ g/mL に調整した K-874A-FLAG を 100 μ L / ウェルになるよう加え、1 時間反応させた後 PBST 200 μ L で 3 回洗浄した。PBST で希釈したマウス抗 FLAG M2-peroxidase モノクローナル抗体 (Merck) を加え、室温で 1 時間反応後 PBST 200 μ L で 3 回洗浄した。o-フェニレンジアミン二塩酸塩基質タブレット (Thermo Fisher Scientific) を希釈した 10 x Stable Peroxide Substrate Buffer (Thermo Fisher Scientific) で溶解したものを基質液として 100 μ L / ウェルになるよう加えた。室温で 30 分間インキュベートした後、直ちに 450nm の吸光度を Microplate Reader Infinite M1000 PRO (TECAN) で測定した。

細胞およびウイルス

VeroE6/TMPRSS2 細胞は JCRB 細胞バンク（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所）より購入し、当研究室で保存した。Calu3 細胞は国立感染症研究所の松山州徳博士から分与された。SARS-CoV-2 の各株である 2019-nCoV JPN/TY/ WK-521、B.1.1.7(Alpha)、B.1.351(Beta)、P.1(Gamma)および B.1.617.2(Delta)は国立感染症研究所から分与されたものを当研究室で増殖培養したものを用いた。D614G 変異を持つ KUH003 (Accession number LC630936) [16]は北里大学病院に入院した COVID-19 患者の鼻腔ぬぐい液から当研究室で分離、増殖させたものを使用した。

ウイルス感染力価（50 % tissue culture infectious dose）の測定

対象とするウイルス液を用いて 2 倍段階希釈系列を作製し、96 ウェルマイクロプレートに単層化した Vero/TMPRSS2 細胞に 100 μ L/ウェルになるように加え、37 °C で 5 日間培養した。感染 5 日後のプレートを検鏡し細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を確認した後、上清を除き冷メタノール 200 μ L を各ウェルに加え細胞を固定した。固定後のプレートに 0.2 % メチレンブルー溶液を加え細胞を染色し、最終判定を行った。50 % tissue culture infectious dose: TCID₅₀ は、Reed - Muench 法で算出した。

K-874A による KUH003 中和試験

KUH003 を 2.5×10^3 TCID₅₀ に調整、段階希釈した VHH(K-874A)と 37 °C で 2 時間反応させた（感染多重度: multiplicity of infection: MOI = 0.05）。その後さらに 4 °C で 24 時間培養し、ウイルス-VHH 混合液を 96 ウェルマルチプレートに単層化した Vero/TMPRSS2 細胞に添加、37 °C で 1 時間反応させた後、未吸着のウイルスを除去するために培地でウェルを洗浄した。感染後 24 時間の培養上清を回収し、SARS-CoV-2 Detection Kit (東洋紡)を用いて定量的逆転写 PCR(qRT-PCR)をおこない、上清中のウイルス RNA コピー数を測定した。また TCID₅₀ は、K-874A の濃度 (log) に対して感染 24 時間後の上清中 RNA コピー数をプロットし算出した。

Vero/TMPRSS2 細胞におけるウイルス吸着と早期複製量の解析

SARS-CoV-2 を 2.5×10^4 TCID₅₀ に調整、PBS で 150 μ g/mL に調整した K-874A と 37 °C で 2 時間反応させた (MOI = 0.5)。その後さらに 4 °C で 24 時間培養し、ウイルス-VHH 混合液を 96 ウェルマルチプレートに単層化した Vero/TMPRSS2 細胞に添加、37 °C で 1 時間反応させた。感染細胞における初期の RNA 複製量を比較するため、感染後 3 時間または 6 時間の細胞を回収した。細胞からのトータル RNA は Nucleospin RNA(タカラバイオ)を用いて抽出した。含まれるウイルス RNA コピー数は、SARS-CoV-2 Detection Kit (東洋紡)を用いた RT-qPCR により算出した。

免疫蛍光染色法

VeroE6/TMPRSS2 細胞に SARS-CoV-2 を感染させ、感染 24 時間後に冷メタノールで固定した。固定した細胞を 0.05 % Triton-X および 3 % BSA/PBS で処理し透過化およびブロッキングした後、PBST で洗浄した。マウス抗 SARS-CoV-2 NSP8 モノクローナル抗体(5A10、GeneTex) またはマウス抗 SARS-CoV-2 dsRNA モノクローナル抗体 (rJ2、Merck) と 1 時間させ、PBST でウェルを洗浄した。2 次抗体として Alexa 568 標識ヤギ抗マウス IgG (Thermo Fisher Scientific) と Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific) を加え、室温で 1 時間反応後に PBST でウェルを洗浄し蛍光顕微鏡で観察を行った。画像は BZX800 (キーエンス) で撮影した。

HiBit システムを用いた細胞融合活性測定

S タンパク質による細胞融合活性を定量するため、HiBiT システムを用いた。ZsGreen (タカラバイオ) の C 末端に HiBiT を連結し、レンチウイルスベクター (LVSIN-IRES-puro) に導入した。また、LgBiT は異なる選択用抗生物質耐性遺伝子を持つレンチウイルスベクター (LVSIN-IRES-Hyg) に導入した。それぞれのレンチウイルスベクターを用いて Vero/TMPRSS2 細胞に形質導入を行い、ZsGreen-HiBiT 発現細胞および LgBiT 発現細胞を作製した。96 ウェルマルチウェルプレートに各細胞を同数播種し、レンチウイルスベクターを用いて S タンパク質を導入、14 時間培養した。培養後、上清を Opti-MEM(Thermo Fisher Scientific)に交換し、基質を加え希釈調整した Nano-Glo live cell reagent (Promega) 25 μ L を各ウェルに添加した。混合後、相対発光値を Ensign(Perkin Elmer)で測定した。

ELISA 法による組換え ACE2 と S タンパク質の直接結合解析

S タンパク質と ACE2 の結合を解析するため、Maxisorp plate (Thermo Fisher Scientific)に PBS で 2 μ g/mL に希釈した組換え S タンパク質 (ABclonal) を 4 °C で一晩固相化した。1 % BSA を含む PBS(1 % BSA/PBS)を 200 μ L/ウェル加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った後、PBST 200 μ L で 3 回洗浄した。1 % BSA/PBS で希釈した S タンパク質 1 μ g を加え室温で 1 時間反応させた。PBST 200 μ L で 3 回洗浄後、1 から 0.06 μ g/mL まで段階希釈した組換え ACE2 を加えて反応を行った。洗浄後、ウサギ抗 ACE2 抗体 (Atlas Antibody)、ヤギ抗ウサギ IgG-HRP 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて結合した S タンパク質の検出を行った。

固相化した S タンパク質と K-874A の結合を解析するため、1 % BSA/PBS を用いて 1 から 0.002 μ g/mL まで段階希釈した K-874A を加えて反応を行った。洗浄後、ヤギ抗アルパカ IgG VHH-HRP 抗体 (Jackson Immuno Research) を用いて結合した K-874A を検出した。o-フェニレンジアミン二塩酸塩(Merck)を基質として使用し、2 M H₂SO₄ で反応を停止後 450 nm の吸光度を Ensign(Perkin Elmer)で測定した。

Calu3 細胞を用いた K-874A の各変異株に対する中和活性測定

SARS-CoV-2 各変異株を 2.5×10^3 TCID₅₀ に調整、96 ウェルマイクロプレートに単層化した Calu3 細胞に添加し、37 °C で 1 時間感染させた後、未吸着のウイルスを除くために培地でウェルを洗浄した。洗浄後のウェルに 150 µg/mL の K-874A を添加し 2 日間培養した。感染後に K-874A を含まない培地を添加したウェルをコントロールとして同様に培養した。感染後 2 日目に上清を回収し、SARS-CoV-2 Detection Kit (東洋紡)を用いて上清中のウイルス RNA コピー数を測定した。K-874A 添加およびコントロールウェルの培養上清中ウイルスを 1×10^4 コピーになるように調整し、TCID₅₀ 法を用いてそれぞれの上清に含まれるウイルスの感染力価を測定した。

ELISA 法による K-874A と各変異株の特異的結合解析

Pierce Nickle Coated Plates, Clear, 96-well (Thermo Fisher Scientific) に PBS で 20 µg/ml に希釈した K-874A を 4 °C で一晩固相化した。5 % スキムミルクを含む PBST を 200 µL/ウェル加え、室温で 1 時間ブロッキングを行った後、PBST 200 µL で 3 回洗浄した。HEK293 細胞によって産生された各変異株の組換え Roh1D4 タグ S タンパク質 (BioServe) を 5、50、または 500 ng/ml に希釈した。希釈した S タンパク質 100 µl を洗浄後のウェルに加え、室温で 1 時間反応させた後、PBST 200 µL で 3 回洗浄した。K-874A と結合した S タンパク質の検出は、マウス抗ロドプシン[1D4] (Abcam) モノクローナル抗体およびヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体-HRP (Abcam) を用いて行った。o-フェニレンジアミン二塩酸塩基質タブレットを希釈した 10 x Stable Peroxide Substrate Buffer で溶解したものを基質液として 100 µL/ウェルになるよう加えた。室温で 30 分間インキュベートした後、450 nm の吸光度を GloMax Explorer System (Promega)で測定した。

肺オルガノイドを用いた感染実験

Ebisudani らによって樹立されたヒト肺オルガノイドを感染実験に用いた[16]。マトリジェルに包埋し 3 D 培養した肺オルガノイドから cell recovery solution(Thermo Fisher Scientific)を用いてマトリジェルを除いた。この細胞に SARS-CoV-2 を MOI=5 になるように感染させ、37 °C で 1 時間培養した。未吸着のウイルスを除くため培地で細胞を洗浄し、マトリジェルに再懸濁後、包埋した。マトリジェルが完全にゲル化した後、K-874A (15 µg/mL)を含む、または不含の培地を加え、37 °C で 3 日間培養した。上清を回収し、解析までは -80 °C で保存した。上清中の RNA コピー数は SARS-CoV-2 Detection Kit (東洋紡)を用いて測定した。

シリアンハムスターを用いた感染実験

2×10^3 TCID₅₀ に調整した SARS-CoV-2 をオス 6 週齢のシリアンハムスターに経鼻接種し感染させた。K-874A は 30 mg/kg でウイルス接種前、1 日後、1 日後と 2 日後に経鼻投与

した。感染ハムスターは4日間の試験期間中毎日体重を測定し、感染後4日の肺組織をホモジナイズし Nucleospin RNA を用いて RNA を抽出し肺中ウイルス RNA 量を測定した。同様に、K-872A の投与量を 1.2、6、または 30 mg/kg に設定し、感染後1日および2日後に経鼻投与した。4日間の体重変化、および感染4日後の肺中ウイルス RNA を測定した。

ハムスター肺組織の炎症性サイトカイン解析

ハムスター肺組織中のサイトカイン量解析は、Zivcec らのプライマーとプローブを用いておこなった[17]。50 ng の RNA を鋳型とし、Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (NEB)を用いて以下のプライマーとプローブと反応条件で RT-qPCR を行った。

プライマー配列

		Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
Interleukin-1 β	IL-1 β	GGCTGATGCTCCCATTCG	CACGAGGCATTTCTGTTGTTC
Interleukin 6	IL-6	CCTGAAAGCACTGAAGAATTCC	GGTATGCTAAGGCACAGCACACT
Interleukin 10	IL-10	GTTGCCAAACCTTATCAGAAATGA	TTCTGGCCCGTGGTTCTCT
Tumor Necrosis Factor- α	TNF- α	GGAGTGGCTGAGCCATCGT	AGCTGGTTGTCTTTGAGAGACATG
β -actin	β -actin	ACTGCCGCATCCTCTTCCT	TCGTTGCCAATGGTGATGAC

プローブ配列

		Probe
Interleukin-1 β	IL-1 β	FAM-CAGCTGCACTGCAGGCTCCGAG-BHQ1
Interleukin 6	IL-6	FAM-AGAAGTCACCATGAGGTCTACTCGCAAAA-BHQ1
Interleukin 10	IL-10	FAM-CAGTTTACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGG-BHQ1
Tumor Necrosis Factor- α	TNF- α	FAM-CCAATGCCCTCCTGGCCAACG-BHQ1
β -actin	β -actin	Cy5-CCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGATG-BHQ2

反応条件

50 °C、10 分	逆転写反応
95 °C、20 秒	不活化、変性
95 °C、3 秒	x 40 サイクル
60 °C、60 秒	

クライオ電子顕微鏡による構造解析

SARS-CoV-2 S タンパク質三量体 (Acrobiosystems) は 600 μ g/mL に調整し、K-874A (11 mg/mL) と 10:1 の割合で混合し室温で1日反応させた。混合物(2.5 μ L)をカーボングリッ

ドに載せ、湿度 95 %、温度 4 °C の条件下で急速冷凍し、顕微鏡観察試料とした。クライオ EM データは、Titan Krios (300kV、Thermo Fisher Scientific) および Gatan K3 カメラ (Gatan) を用いて、公称倍率 64,000 倍 (試料の 1 ピクセルあたり 1.11Å に相当) で取得した。二次元および三次元(3D)分類、3D 精密化、局所分解能計算は RELION3.1 ソフトウェア[18]を用いて行った。6,552 枚の顕微鏡写真から合計 2,252,622 個の粒子が自動的に選択された。選択された粒子は 3D 分類により構造の異なる 2 つのクラス (タイプ 1 およびタイプ 2) に分けられた。タイプ 1 に分類されたすべての粒子に対してさらに 3D 分類を行い、選択された良好なクラスのみを用いて 3D 精密化を行った。最終的な 3D 再構成は 115,297 粒子で計算した。タイプ 2 については、分類された 51,305 個の粒子から 3D マップを再構成した。

取得データの詳細は表 1 および補足図 1 に示した。

3D モデルの構築

VHH-72 (PDBID: 6WAQ) および 2019-nCoV S タンパク質 (PDB ID: 6VSB) の原子モデルを鋳型として、SWISS-MODEL[19]を用いて、K-874A および SARS-CoV-2 の S タンパク質単量体 (SPN-C52H9) の相同性モデルをそれぞれ構築した。SPN-C52H9 と 6VSB 間のアミノ酸配列比較、および K-874A と VHH-72 間のアミノ酸配列比較を補足図 2 に示した。これらのタンパク質の多重配列アラインメントは PROMALS3D プログラム[20]を用いて行った。相同性モデルは、COOT [21]を用いて個々のマップを手動で修正し、PHENIX [22]を用いて精密化した。K-874A と S タンパク質の三量体からなるタイプ 1 とタイプ 2 の構造体は、K-874A と RBD の間の同じアミノ酸残基とほぼ同様の相互作用を示したが、モデルは別々に構築された。タイプ 1 とタイプ 2 のアミノ酸残基を図 4 C と図 5 C に示した。その他の取得データ詳細は表 1 にまとめた。

研究の倫理にかかる情報

動物実験は、北里大学動物実験委員会を通じて北里大学学長が承認(#20-031)し、北里大学動物実験ガイドラインに則って実施した。SARS-CoV-2 感染に対するヒト正常肺オルガノイド実験は、慶應義塾大学医学部および北里研究所病院の倫理委員会によって承認された(#17014)。

【結果】

SARS-CoV-2 S1 タンパク質に対する VHH スクリーニング

SARS-CoV-2 の S1 タンパク質に結合する VHH を *in vitro* スクリーニングするため VHH-cDNA ディスプレイ法を用いた (図 1 A)。cDNA ディスプレイ法では、 10^{13-14} 種類の多様性を持つ cDNA ライブラリーから *in vitro* で VHH を合成し、目的のタンパク質に対して高い親和性を持つ VHH を選択する [26]。合成された VHH は、それをコードしていた RNA とピューロマイシンリンカーを介して結合しており [23-25]、その VHH の配列情報を得ることができる。SARS-CoV-2 の S1 タンパク質を標的タンパク質とし、初期ライブラリーを用いた第 1 ラウンド (R1) で候補 VHH 配列を選択、引き続き第 2 ラウンド (R2)、第 3 ラウンド (R3) と合計 3 回の選択を行って DNA ライブラリーの塩基配列を決定し、候補となる抗 SARS-CoV-2 VHH の配列を翻訳した。3 ラウンドの *in vitro* 選択の後のライブラリー中の VHH クローンの頻度分布から、クローン K-874A が最も頻繁に出現し (39.5 %)、S1 タンパク質に対して高い親和性を持つことが示された (図 1 B)。BLI 法を用いて測定した K874A と S1 タンパク質の結合親和性は 1.4 nM ($K_{on}(1/Ms) = 6.72E + 04$, $K_{off}(1/s) = 9.42E-05$) であった (図 1 C)。次に FLAG タグを付加した K-874A と His タグ付加 S1 タンパク質を用いた直接酵素結合免疫吸着法 (direct antigen enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) を行った。その結果、K-874A は SARS-CoV-2 の S1 タンパク質に高い親和性で結合するが、ヒトコロナウイルス (HCoV-HKU1、HCoV-OC43) や SARS-CoV-1 など他のコロナウイルスには結合しないことがわかった (図 1 D)。以上より、K-874A は SARS-CoV-2 の S1 タンパク質に特異的かつ強く結合することが示された。

SARS-CoV-2 に対する K-874A のウイルス中和活性

SARS-CoV-2 に高い親和性と特異性を持つ VHH である K-874A が COVID-19 の治療薬候補となるかを調べた。アフリカミドリザル腎臓由来細胞である Vero E6 細胞に膜貫通型セリンプロテアーゼ 2 (TMPRSS2) を強制発現させた Vero/TMPRSS2 細胞に K-874A で前処理した SARS-CoV-2 KUH003 株を感染させ、RT-qPCR を用いて細胞内の SARS-CoV-2 RNA コピー数を調べた。その結果、K-874A 濃度依存的に細胞内 RNA コピー数の減少が見られた。RNA コピー数から算出した IC_{50} は $5.74 \pm 2.6 \mu g/mL$ であり、K-874A のウイルス増殖抑制効果 (ウイルス中和) が確認された (図 2 A)。次に K-874A 処理または未処理のウイルスを Vero/TMPRSS2 細胞に感染させ、1 時間の培養後、細胞に吸着または細胞内に取り込まれた RNA 量を RT-qPCR で測定した。その結果、吸着量または細胞内への初期取り込み量は K-874A 処理の有無によって変化しなかった (図 2 B)。感染後 6 時間では、未処理のウイルスを感染させた細胞のウイルス RNA コピー数は 400 倍以上に増加したが、K-874A を処理したウイルスを感染させた細胞では、そのコピー数は著しく抑制された (図 2 C)。さらに免疫染色法を用いて、ウイルス感染後のウイルスタンパク質である NSP8 と二本鎖 RNA (dsRNA) を検出したところ、K-874A 処理したウイルスを感染させた細胞では NSP8 と

dsRNA の発現が抑制された (図 2 D)。これらの結果から、K-874A は細胞へのウイルス吸着は阻害しないが、ウイルス増殖は抑制することが示唆された。

K-874A による宿主細胞と SARS-CoV-2 の膜融合阻害

次に K-874A が宿主細胞とウイルスの膜融合を阻害するかどうか調べた。Vero/TMPRSS2 細胞は細胞表面に ACE2 と TMPRSS2 を発現している。この Vero/TMPRSS2 細胞にレンチウイルスベクターを用いて SARS-CoV-2 の S タンパク質を発現させた。Vero/TMPRSS2 細胞表面に発現した S タンパク質に、隣接した Vero/TMPRSS2 細胞の ACE2 が結合すると、TMPRSS2 によって S タンパク質は切断され活性化し、膜融合を誘導する。この膜融合を定量化するために、HiBiT アッセイを用いた。HiBiT アッセイとは、HiBiT (11 アミノ酸からなるペプチドタグ) とそれに結合するルシフェラーゼ断片 LgBiT (Large Bit) および基質を用いた発光法を利用した検出システムである。HiBiT または LgBiT を発現させた Vero/TMPRSS2 細胞を作製し、共培養した。一方の細胞の S タンパク質が隣接する細胞の ACE2 に結合し両者の膜が融合したときにのみ HiBiT-LgBiT 複合体が形成され、ルシフェラーゼ活性が検出される。S タンパク質を発現していない VeroE6/TMPRSS2 細胞 (S-) は融合が見られなかったが、S タンパク質を発現させた細胞 (S+) では膜融合が起こり、ルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。一方、この細胞を K-874A で処理した場合、その濃度依存的に細胞融合が抑制され、ルシフェラーゼ活性の上昇は抑制された (図 2 E)。K-874A による膜融合の抑制は、光学顕微鏡写真でも確認された (図 2 F)。

次に K-874A または ACE2 と S タンパク質の結合を調べた。組換え S タンパク質をプレートに固相化し、K-874A または組換え ACE2 タンパク質と反応させ、抗 VHH 抗体または抗 ACE2 抗体で検出した。その結果、K-874A (図 2 G 左) と ACE2 (図 2 G 右青線) はともに濃度依存的に S タンパク質に結合した。次に、K-874A を S タンパク質に結合させることで、ACE2 と S タンパク質の結合が阻害されるか検証した。その結果、K-874A は ACE2 と S タンパク質の結合を阻害しなかった (図 2 G 右赤線)。以上より、K-874A はウイルスが細胞表面の ACE2 に結合することは阻止せず、ウイルスと宿主細胞の膜融合を阻止することによって、ウイルスが細胞内に侵入するのを防いでいると考えられた。

クライオ電子顕微鏡を用いた K-874A と SARS-CoV-2 S タンパク質の結合モデル解析

K-874A の S タンパク質の結合領域を調べるために、クライオ電子顕微鏡を用いて組換え S タンパク質三量体 (補足図 1) と S タンパク質-K-874A 複合体 (補足図 3) の構造を解析し、各分子モデルをマッピングした (図 3 G-I)。2つの様式 (タイプ 1、タイプ 2 とする) のモデルが得られ、タイプ 1 とタイプ 2 の存在比は約 9:1 であった (補足図 3)。タイプ 1 構造は、K-874A が S タンパク質の N-terminal domain (NTD) と RBD の間の隙間にあった (図 3 B、E および H、図 4 A-D)。膜融合前 (プレフュージョン) の状態では S タンパク質は、RBD が上方に立ち上がり ACE2 に結合する [27, 28]。しかしタイプ 1 構造では K-874A と

結合後 RBD は立ち上がっておらず、S タンパク質三量体の外側に横移動していた(図 6 A)。NTD は K-874A 結合後に下降しており、K-874A の CDR1、CDR2 及び N 末端のアミノ酸残基は NTD と極性結合を、CDR2 と CDR3 のアミノ酸残基は RBD に疎水結合していた(図 4 B-D)。一方で、タイプ 2 構造では、K-874A は NTD には結合せず RBD のみに結合し(図 3 C、F および I、図 5)、S タンパク質三量体は RBD が全て上方に移動したプレフュージョン型を示していた(図 6 B)。RBD が K-874A に結合した状態でも、ACE2 と相互作用するすべてのアミノ酸残基が RBD の上向きの状態に置かれ、K-874A が結合していても ACE2 は RBD に結合した(図 4 E および F)。これらの結果から、K-874A は S タンパク質と ACE2 の結合を阻害するのではなく別の作用機序により中和能を示すと考えられた。

SARS-CoV-2 各変異株に対する K-874A の中和活性

K-874A の SARS-CoV-2 変異株に対する親和性と中和活性を調べた。ヒト肺由来細胞株である Calu3 細胞に各変異株を一時間感染させ、未吸着ウイルスを除くため洗浄した後、新たな K-874A を含む培地を加えて 2 日間培養した。培養上清中の RNA コピー数を RT-qPCR を用いて測定したところ、武漢株、KUHO03 (D614G)および B.1.1.7(アルファ株)の RNA 量はわずかに減少した(図 7 A 上段)。また B.1.351 (ベータ株)、P.1 (ガンマ株)および B.1.617.2 (デルタ株)については、K-874A の有無に関わらず RNA コピー数の変化は見られなかった(図 7 A 下段)。さらに Calu3 細胞培養上清中の子孫ウイルスの感染力価を調べるため、K-874A 処理と未処理の培養上清中に含まれるウイルス RNA コピー数を 1×10^4 に調整し、Vero/TMPRSS2 細胞に感染させ TCID₅₀ を算出した。その結果、武漢株、KUHO03 およびアルファ株の感染力価は著しく低下し、一方でベータ、ガンマおよびデルタ株については感染力価の低下は見られなかった(図 7 B)。以上より、武漢株、KUHO03 およびアルファ株の上清中に放出される新生(子孫)ウイルスは K-874A と結合し捕捉されたために再度細胞に感染することができず、結果として感染力価の低下を示したと考えられた。さらに、K-874A の各変異株の S タンパク質に対する結合親和性を ELISA 法により評価した。その結果、K-874A は武漢株とアルファ株の S タンパク質に結合するが、ベータ、ガンマ、イブシロン、イータおよびカッパ株の S タンパク質には結合しなかった(図 7 C)。

K-874A によって中和された変異株は、K-874A の結合部位と思われる S タンパク質のアミノ酸 450-490 番目に変異を持たなかったが、中和されない株にはいくつかの変異があった。これらの結果から、K-874A が S タンパク質に強く結合した場合にウイルスは中和することが示唆された。また、中和できなかった変異株の S タンパク質における結合該当部位を標的として VHH を作製した場合、その VHH が変異株に対する中和活性を示す可能性がある。

K-874A VHH によるヒト肺胞オルガノイドでのウイルス複製阻止

SARS-CoV-2 は肺組織に感染し、重篤な呼吸器疾患を誘導することから、ヒト肺胞由来の

オルガノイドを用いて、K-874A の評価を行った。肺胞オルガノイドは SARS-CoV-2 感受性を持ち、ウイルス感染後培養上清中の新生ウイルスを放出する[16, 29]。肺胞オルガノイドに KUH003 株を感染させて 1 時間培養を行った。洗浄後、K-874A 含有または非含有培地で 3 日間培養した。K-874A 未処理のオルガノイド培養上清中のウイルスコピー数が 1×10^7 コピー/ μL であったのに対し、処理したオルガノイドでは 1×10^4 コピー/ μL であった (図 8 A)。これら子孫ウイルスの感染力価測定のため、各ウイルス RNA コピー数を 1×10^4 に調整し、Vero/TMPRSS2 細胞に感染させ TCID₅₀ を算出した。その結果、K-874A 未処理と処理の子孫ウイルスは、それぞれ 565 TCID₅₀/mL と 10 TCID₅₀/mL 未満であった (図 8 B)。以上から、K-874A が新生ウイルスの S タンパク質に結合することにより、新たな細胞への再感染を妨いだことで、K-874A 処理群は未処理群と比較して低い TCID₅₀ 値を示したと考えられた。

シリアンハムスターを用いた K-874A 評価

COVID-19 治療薬としての可能性を評価するため、COVID-19 の病態モデル動物であるシリアンハムスターを用いた感染実験を行った。シリアンハムスターは SARS-CoV-2 に感染すると体重減少が見られるが感染後 14 日後で自然回復していく[30]。K-874A 投与によって COVID-19 の症状が改善されるかを調べるため、オスの 6 週齢シリアンハムスターに SARS-CoV-2 (2×10^3 TCID₅₀) を感染させ、異なる投与計画に基づき経鼻接種を行った。感染前または感染 1 日後に K-874A 一回投与、または感染後 1 日目と 2 日目に複数回投与で、一回の K-874A 投与量は経鼻接種できる最大用量の 30 mg/kg で行った (図 9 A)。K-874A 投与したすべての感染群で体重減少が抑えられたが、BSA/PBS を投与したコントロール群では感染 3 日後に体重減少した (図 9 B)。次に、感染 4 日後の肺組織を回収し、ウイルス RNA を抽出後 RT-qPCR でウイルス RNA コピー数を測定した。その結果、コントロール群と比較して、投与回数に依存せず、K-874A 投与群で肺内ウイルス RNA コピー数の減少が見られた (図 9 C)。

血中サイトカインは病原体感染後に発現が上昇するため[31, 32]、K-874A 投与群、非投与群の感染 4 日後の肺組織におけるサイトカインの mRNA 量を比較した。非投与群では、IL-6 と IL-10 の上昇が見られ、IL-1 β と TNF- α は変化がなかった一方、K-874A 投与群では、非感染群と同程度のサイトカインレベルを示した (図 9 D)。

K-874A の用量を変えて (1.2、6、または 30 mg/kg) 2 回投与 (感染後 1 日目と 2 日目) した場合 (図 10 A)、K-874A の最低用量 (1.2 mg/kg) 投与群は、BSA/PBS 投与群に比べ、緩やかではあるが、感染後 3 日目まで体重減少が認められた (図 10 B)。しかし 6.0 mg/kg および 30.0 mg/kg 投与群では、体重減少が認められず体重増加が観察され、肺中のウイルス RNA コピー数もコントロール群に比べ低下した (図 10 B、C)。またその IL-6 および IL-10 のレベルも、非感染群と同程度に抑えられていた (図 10 D)。以上の結果より、K-874A が COVID-19 感染の症状を用量依存的に改善することが示された。

【考察】

2020年初めに発生した新型コロナウイルス感染症は世界的な流行を見せ、制圧のためにワクチン以外の治療薬開発が切望された。VHHは、ヒトモノクローナル抗体製剤よりも安定性が高く、製造コストも低いため有力な治療薬候補となり得る。また経鼻投与に適しており、高濃度の薬剤を直接感染した肺に届けることができ、より長い効果を持続させることが可能である。実際、RSVに対してVHHを経鼻で投与する場合の効果持続期間は3日間である[6]。しかし、VHHモノマーは、静注や筋肉内注射など血流を介して患部へ投与する場合、低分子量であるため血流中の半減期が非常に短く、血中有効濃度を維持できず効果持続時間が短くなることが知られている[4]。血中半減期を通常の抗体に近づけるため、抗ウイルス薬として開発中のVHHは多価化による分子量の増大、またはFcドメインなどのヒト抗体断片による修飾を行う場合がある。また、VHHによっては、このような分子デザインによりVHH自体の抗ウイルス効果が向上する例が報告されている。Wrappらは、彼らの作出したSARS-CoV-2のSタンパク質に結合するVHHは、ヒト抗体Fcドメインと融合させた場合にのみウイルス中和活性を示すと報告した[7]。

本研究では、*in vitro* セレクションを用いて、既報[7-12]のVHHやシングルドメイン抗体よりも高い親和性を持つSARS-CoV-2のSタンパク質に結合するVHH(K-874A)を同定した。またK-874AはVero/TMPRSS2細胞とヒト肺胞オルガノイドを用いた感染実験において優れたウイルス中和活性を示した。K-874Aの親和性は $KD=1.4\text{ nM}$ 、中和活性(IC_{50})は $5.74\pm 2.6\text{ }\mu\text{g/ml}$ であった。既報のVHHのSタンパク質に対する親和性と IC_{50} を列挙すると、VHH-72では $KD=38.6\text{ nM}$ 、 $IC_{50}=0.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ [7]、n3088では $KD=3.7\text{ nM}$ 、 $IC_{50}=3.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ [8]、Ty1では $KD=5\text{--}10\text{ nM}$ 、 $IC_{50}=0.77\text{ }\mu\text{g/ml}$ [9]、Sb23では $KD=10\text{ nM}$ 、 $IC_{50}=0.6\text{ }\mu\text{g/ml}$ [10]、H11-H4では $KD=5\text{ nM}$ 、 $IC_{50}=61\text{ nM}$ [11]、Nb11-59では $KD=20\text{ nM}$ 、 $IC_{50}<1\text{ }\mu\text{g/ml}$ [12]であり、 KD は $3.7\text{--}38.6\text{ nM}$ に分布、K-874AはこれらのVHHに比べても高い親和性が示された。K-874Aの IC_{50} は他のVHHに比べ高値だが、非修飾の状態での測定値である。n3088とNb11-59を除くVHHは中和活性の向上にFcフラグメント修飾が必要であり、K-874Aについても今後の改良で向上することは充分期待できる。

K-874Aは、宿主側細胞膜とウイルス膜の融合を阻害することでSARS-CoV-2を中和していた。Sタンパク質-VHH複合体のクライオEM解析では、K-874AはRBDに結合することにより、RBDとACE2との結合を阻害するのではなく、Sタンパク質のRBDとNTDの間隙に入り込み両者と結合してRBDとNTDを接合させていることが示された。NTDに結合してSARS-CoV-2を中和するヒト抗体の報告があるが[33]、VHHでは過去に報告された例はない(図11)。また、K-874Aの結合は、Sタンパク質の立体構造変化を誘導していたが(図6)、RBDとACE2の結合は阻害していなかった(図4F)。K-874AがRBDとNTDを接合させることによって、どのように宿主側細胞膜とウイルス膜の融合を阻害し、SARS-CoV-2を中和しているのか、より詳細な中和機序を明らかにするためにはさらなる

研究・解析が必要だと考えられる。

ヒト肺由来オルガノイドを用いた実験では、K-874A によって子孫ウイルスの産生が減少した。さらに K-874A 処理したウイルスを感染させた細胞から産生された子孫ウイルスは、未処理のものに比べて感染力価が低かった。SARS-CoV-2 に感染したシリアンハムスターに K-874A を経鼻投与したところ、感染に伴う体重減少、肺中ウイルスの子孫ウイルスの増殖および子孫ウイルスの感染によって引き起こされるサイトカインの上昇が抑えられ、*in vivo* モデルにおける治療効果が得られた。これらの結果から、K-874A はウイルスが肺内で非感染細胞に感染を広げることや、感染者の肺内で効率良く増殖した子孫ウイルスが、感染者から非感染者へと伝播し、感染を拡大させていくヒト-ヒト感染を防ぐことができる経鼻投与可能な COVID-19 の治療薬としての可能性を示した。

K-874A は中和効果を示さなかった変異株の S タンパク質には結合しなかった。SARS-CoV-2 の変異株は RBD に多くの変異が集中するが、RBD-NTD 領域を標的として結合する VHH は、変異株を効果的に中和する可能性があり、異なるエピトープを標的とする VHH の組み合わせ（例えば、RBD-NTD 結合 VHH と RBD 結合 VHH の組み合わせ）はカクテル療法の開発につながると考えられる。今後新たに出現する変異株に対応するために、S タンパク質（RBD を含む）の高度にアミノ酸配列が保存された領域を標的にした中和 VHH の新規開発が必要である。

Piepenbrink らは SARS-CoV-2 に対するヒトモノクローナル抗体を吸入すると、肺および鼻粘膜でのウイルス複製を阻害することができると報告した[34]。このことから K-874A も噴霧吸入器（ネブライザー）を用いて肺に直接送達させ、治療効果を示す可能性がある。ネブライザーによる経鼻投与は、血流に入る VHH の量を減少させることができるので、VHH を繰り返し使用した場合に考えられる VHH に対する免疫反応のリスクを低減できると考えられた。また、Gai らは VHH の Fc ドメインによるヒト化修飾および噴霧化によって、中和能や安定性を損なうことがないと報告している[12]が、K-874A は修飾をしなくても顕著な抗ウイルス活性を示した。このことは Fc ドメインに関連する抗体依存性感染増強（antibody-dependent enhancement: ADE）のリスク軽減につながる。

免疫応答によるサイトカインの異常分泌は、COVID-19 の重篤な症状である[35]が、なぜこのようなサイトカインストームが起こるかは不明である。Ziegler らは ACE2 がインターフェロン刺激遺伝子であり、感染時のインターフェロン増加に応答し発現がアップレギュレートされ、これを SARS-CoV-2 が感染促進するのに利用していると報告している[3]。K-874A はウイルスの融合を阻止するので、ウイルス感染を減少させ、結果としてインターフェロンのアップレギュレーションを抑制するという副次的な効果を有する可能性があり、ACE2-RBD の結合を阻害する VHH や抗体薬と併用することで、K-874A の有効性を向上させることが可能かもしれない。

【引用文献】

1. Tang, T., et al., *Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development*. Antiviral Research, 2020. **178**: p. 104792.
2. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor*. Cell, 2020. **181**(2): p. 271-280.e8.
3. Ziegler, C.G.K., et al., *SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues*. Cell, 2020. **181**(5): p. 1016-1035.e19.
4. De Vlieger, D., et al. *Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections*. Antibodies, 2019. **8**, DOI: 10.3390/antib8010001.
5. Detalle, L., et al., *Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015. **60**(1): p. 6-13.
6. Schepens, B., et al., *Nanobodies® Specific for Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Protect Against Infection by Inhibition of Fusion*. The Journal of Infectious Diseases, 2011. **204**(11): p. 1692-1701.
7. Wrapp, D., et al., *Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies*. Cell, 2020. **181**(5): p. 1004-1015.e15.
8. Wu, Y., et al., *Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2*. Cell Host & Microbe, 2020. **27**(6): p. 891-898.e5.
9. Hanke, L., et al., *An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 4420.
10. Custódio, T.F., et al., *Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2*. Nature Communications, 2020. **11**(1): p. 5588.
11. Huo, J., et al., *Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2*. Nature Structural & Molecular Biology, 2020. **27**(9): p. 846-854.
12. Gai, J., et al., *A potent neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 with inhaled delivery potential*. MedComm, 2021. **2**(1): p. 101-113.
13. Zhang, J., et al., *PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR*. Bioinformatics, 2013. **30**(5): p. 614-620.
14. Kumar, S., et al., *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. Molecular Biology and Evolution, 2018. **35**(6): p. 1547-1549.
15. Kodama, T., et al., *Bacillus subtilis AprX involved in degradation of a heterologous protein during the late stationary growth phase*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007. **104**(2): p. 135-143.
16. Ebisudani, T., et al., *Direct derivation of human alveolospheres for SARS-CoV-2 infection*

- modeling and drug screening*. Cell Reports, 2021. **35**(10): p. 109218.
17. Zivcec, M., et al., *Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (Mesocricetus auratus)*. Journal of Immunological Methods, 2011. **368**(1): p. 24-35.
 18. Zivanov, J., et al., *New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3*. eLife, 2018. **7**: p. e42166.
 19. Waterhouse, A., et al., *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**(W1): p. W296-W303.
 20. Pei, J., B.-H. Kim, and N.V. Grishin, *PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments*. Nucleic Acids Research, 2008. **36**(7): p. 2295-2300.
 21. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D, 2010. **66**(4): p. 486-501.
 22. Adams, P.D., et al., *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallographica Section D, 2010. **66**(2): p. 213-221.
 23. Nemoto, N., S. Kumachi, and H. Arai, *In Vitro Selection of Single-Domain Antibody (VHH) Using cDNA Display*. Methods Mol Biol, 2018. **1827**: p. 269-285.
 24. Roberts, R.W. and J.W. Szostak, *RNA-peptide fusions for the *in vitro* selection of peptides and proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(23): p. 12297-12302.
 25. Yamaguchi, J., et al., *cDNA display: a novel screening method for functional disulfide-rich peptides by solid-phase synthesis and stabilization of mRNA-protein fusions*. Nucleic Acids Research, 2009. **37**(16): p. e108-e108.
 26. Suzuki, T., et al., *Anti-survivin single-domain antibodies derived from an artificial library including three synthetic random regions by in vitro selection using cDNA display*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018. **503**(3): p. 2054-2060.
 27. Walls, A.C., et al., *Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein*. Cell, 2020. **181**(2): p. 281-292.e6.
 28. Ke, Z., et al., *Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions*. Nature, 2020. **588**(7838): p. 498-502.
 29. Youk, J., et al., *Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2*. Cell Stem Cell, 2020. **27**(6): p. 905-919.e10.
 30. Chan, J.F.-W., et al., *Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility*. Clinical Infectious Diseases, 2020. **71**(9): p. 2428-2446.
 31. Castilletti, C., et al., *Coordinate induction of IFN- α and - γ by SARS-CoV also in the*

- absence of virus replication*. Virology, 2005. **341**(1): p. 163-169.
32. Kumaki, Y., et al., *Induction of Interferon- γ -Inducible Protein 10 by SARS-CoV Infection, Interferon Alfacon 1 and Interferon Inducer in Human Bronchial Epithelial Calu-3 Cells and BALB/c Mice*. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 2010. **20**(4): p. 169-177.
33. Chi, X., et al., *A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2*. Science, 2020. **369**(6504): p. 650-655.
34. Piepenbrink, M.S., Park J-G, Oladunni FS, Deshpande A, Basu M Sarkar S, et al., *Therapeutic activity of an inhaled potent SARS-CoV-2 neutralizing human monoclonal antibody in hamsters*. bioRxiv., 2020.
35. Song, P., et al., *Cytokine storm induced by SARS-CoV-2*. Clinica Chimica Acta, 2020. **509**: p. 280-287.

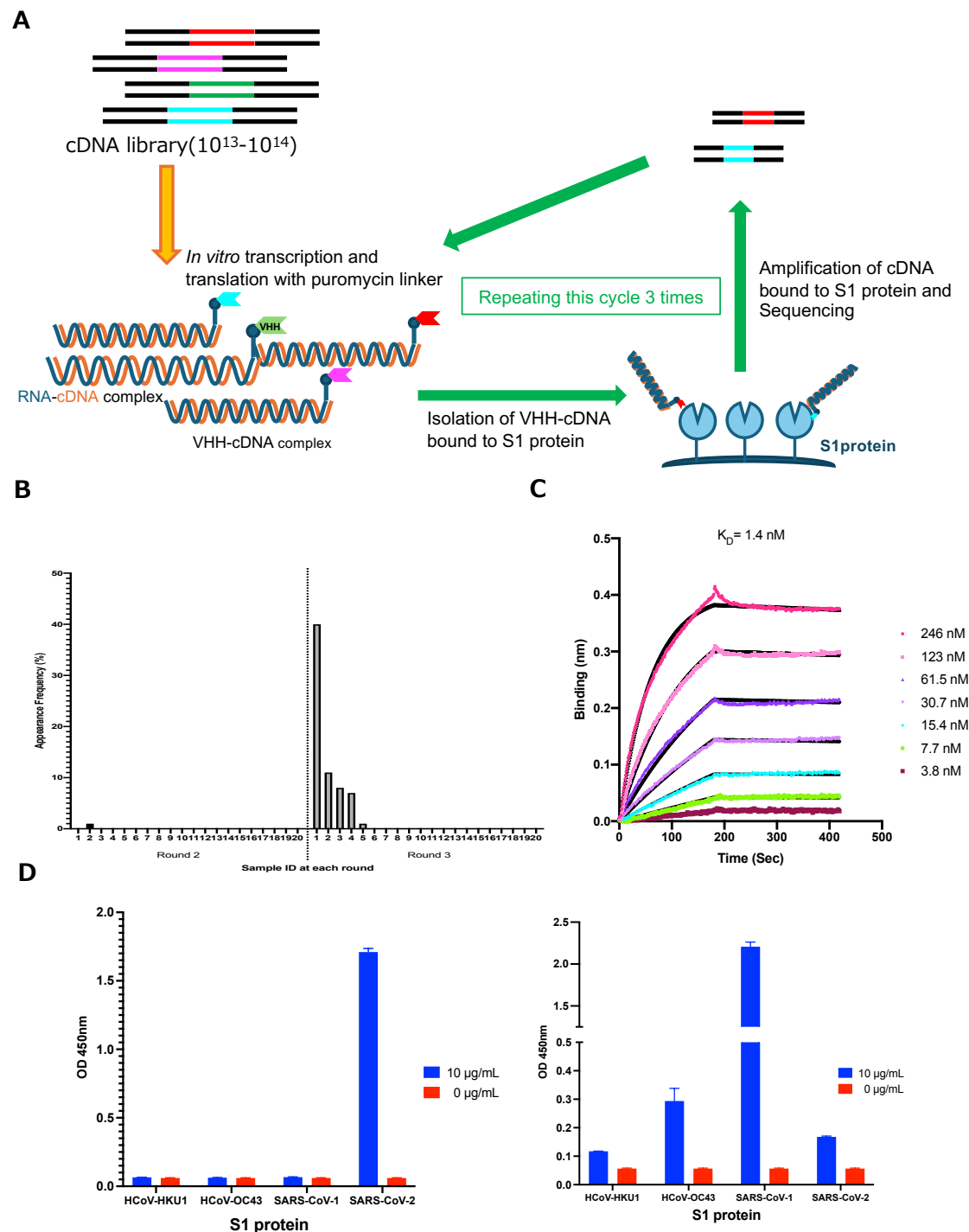


図1 cDNAディスプレイ法を用いた候補VHH配列の取得

- (A) cDNAディスプレイ法の模式図
 (B) 第2ラウンドおよび第3ラウンド後に得られたクローンの出現頻度
 (C) BLI法によるK-874AとSタンパク質の親和性解析
 (D) ELISAによる特異的結合解析
 左：抗FLAG抗体による固相化各コロナウイルスS1タンパク質の検出
 右：抗His抗体による固相化各コロナウイルスS1タンパク質の検出

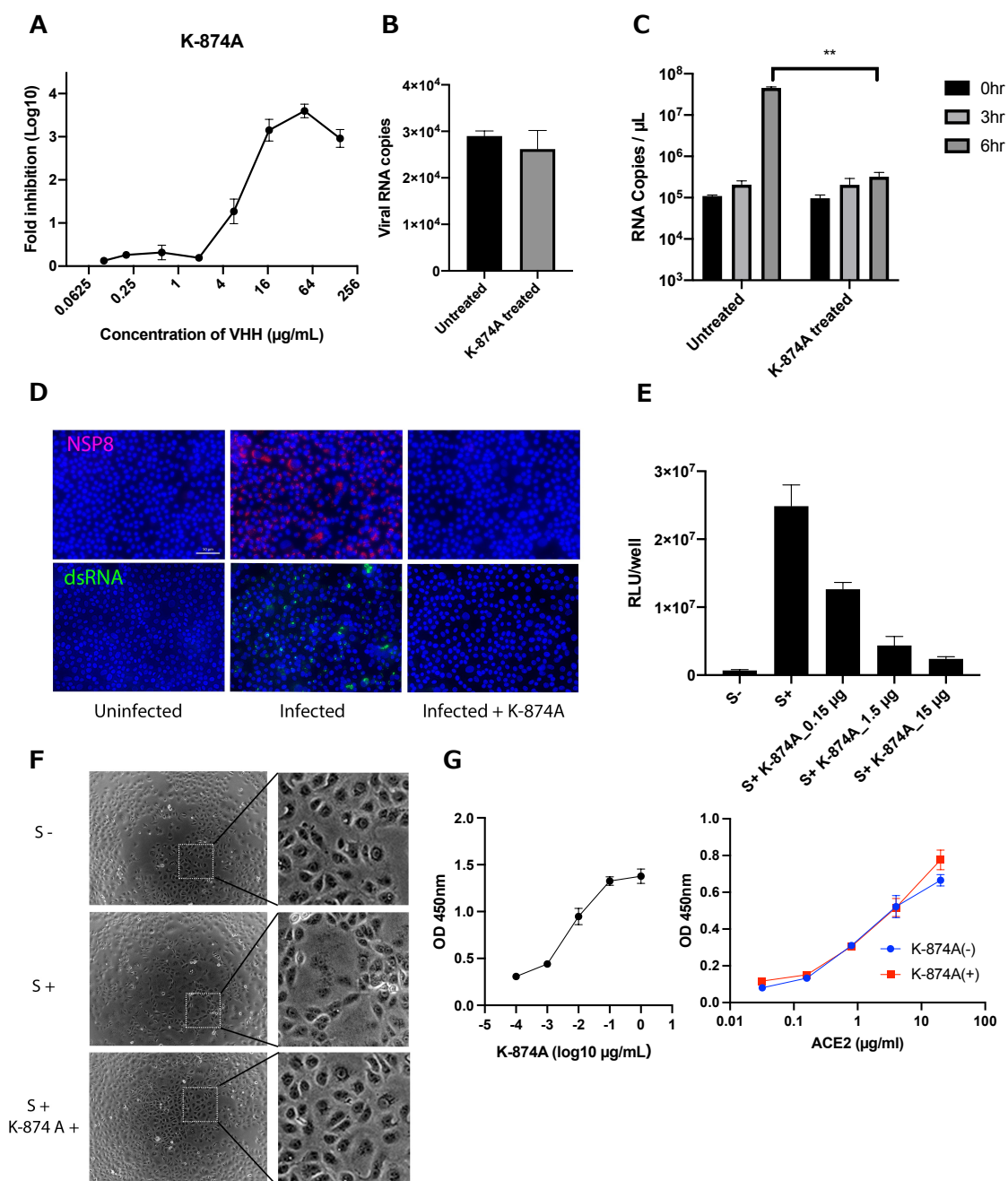


図2 SARS-CoV-2に対するK-874Aの中和活性

- (A) Vero/TMPRSS2細胞におけるK-874Aのウイルス中和活性
 (B) Vero/TMPRSS2細胞への吸着または細胞内取り込み量
 (C) 感染後3時間および6時間のVero/TMPRSS2細胞内ウイルスRNA量
 (** $P < 0.005$, Welch's t-test)
 (D) 蛍光免疫染色法によるウイルスタンパク質の検出
 (E) HiBiT法による細胞融合阻害測定
 (F) K-874Aによるウイルス感染後細胞融合阻害
 (G) ELISAによるSタンパク質とK-874A (左) およびACE2 (右) の結合解析

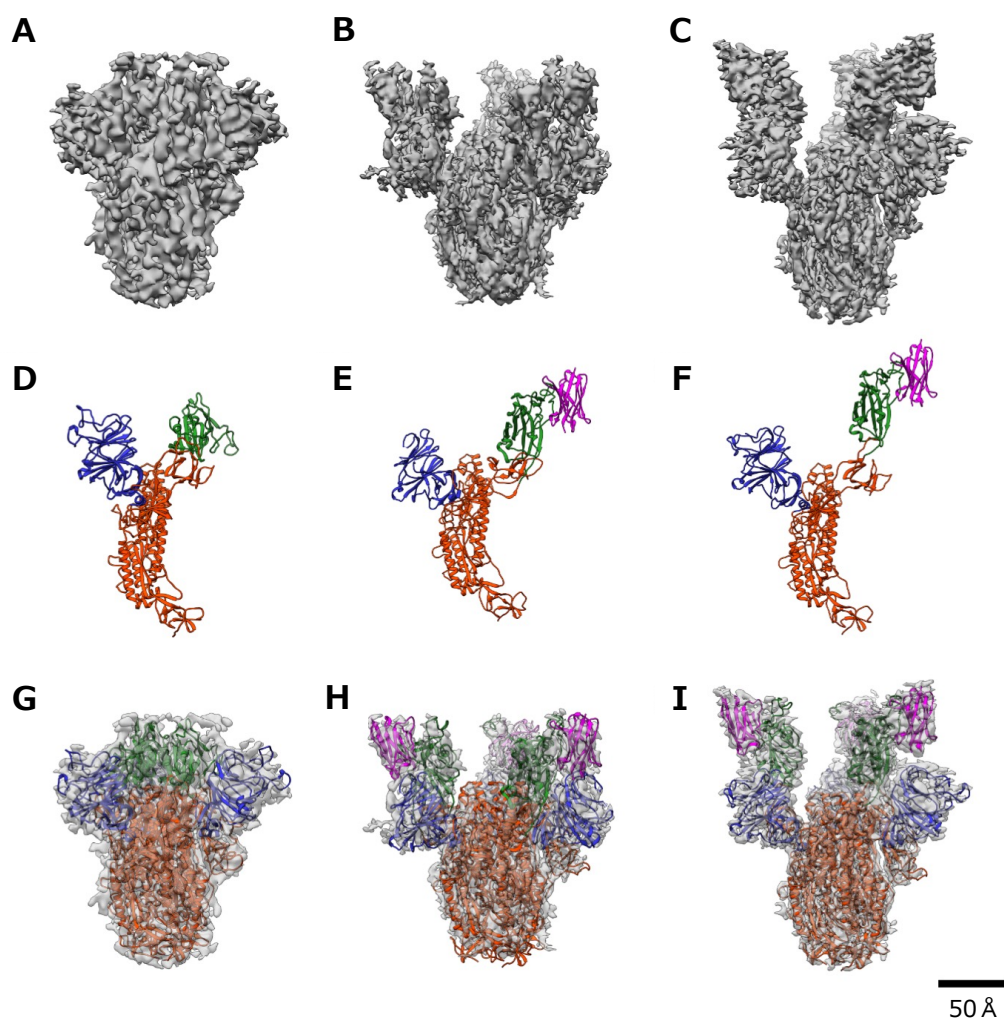


図3 Sタンパク質三量体-K-874AのクライオEM像と原子モデル

- (A) Sタンパク質三量体のクライオEM像 (密度図)
- (B) (A)とK-874Aとの複合体 (タイプ1)
- (C) (A)とK-874Aとの複合体 (タイプ2)
- (D) Sタンパク質単量体の原子モデル
- (E) (D)とK-874Aとの複合体 (タイプ1)
- (F) (D)とK-874Aとの複合体 (タイプ2)
- (G) クライオEM像とSタンパク質三量体の原子モデル
- (H) (G)とK-874Aとの複合体 (タイプ1)
- (I) (G)とK-874Aとの複合体 (タイプ2)

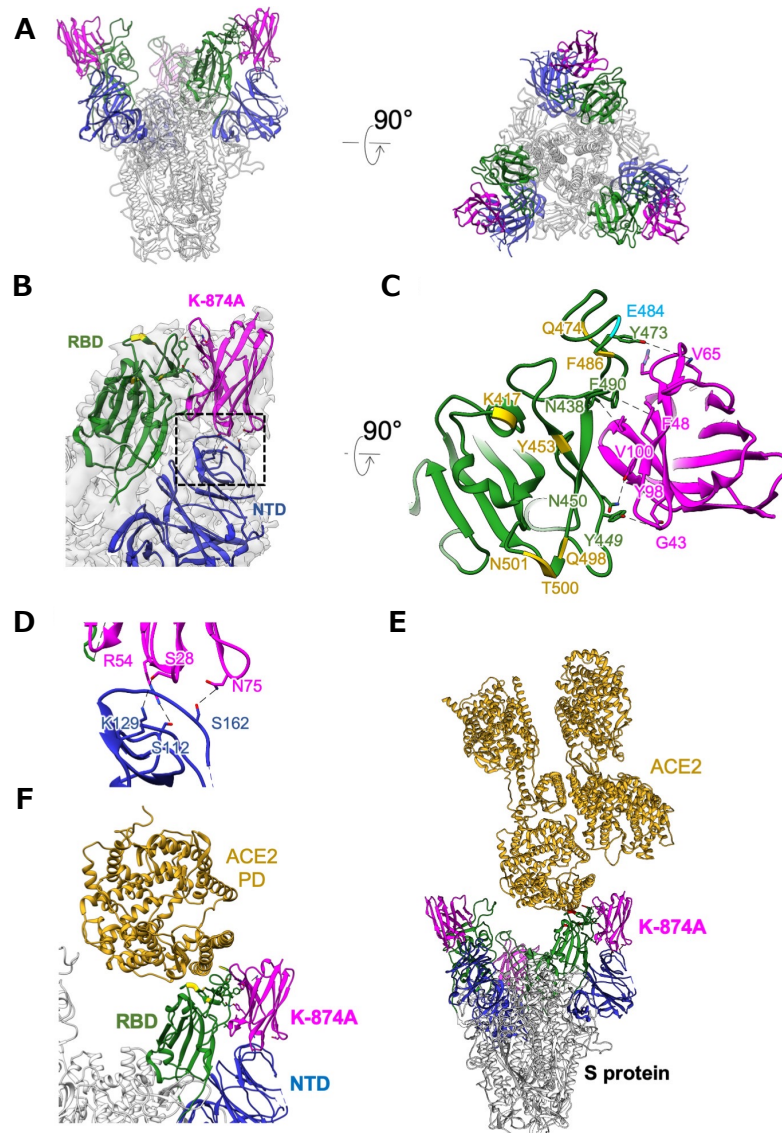
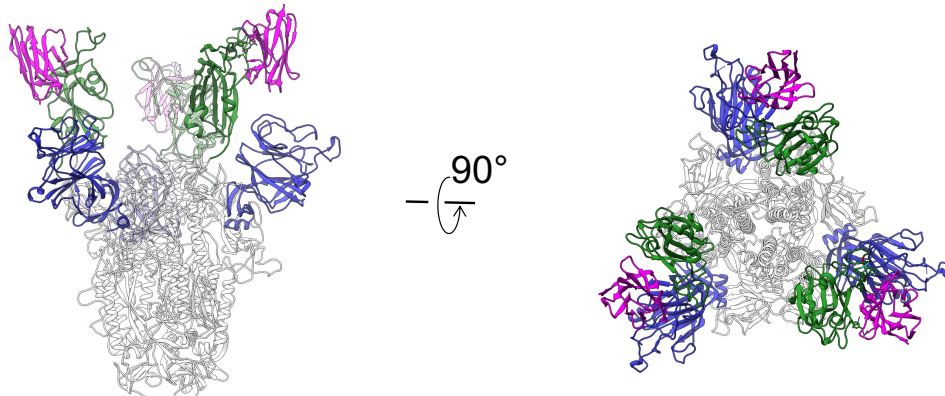


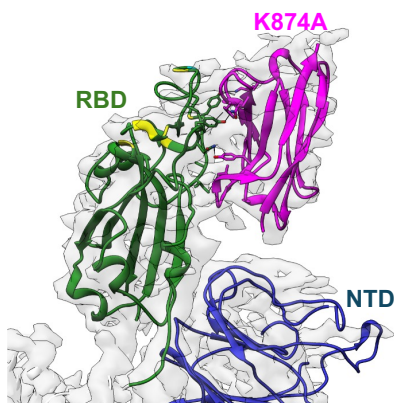
図4 クライオ電子顕微鏡によるモデル構築（タイプ1）

- (A) Sタンパク質三量体とK-874Aの結合リボンモデル
マゼンダ：K-874A 青：NTD 緑：RBD
- (B) (A)の拡大図
- (C) (B)を90度回転、ACE2と相互作用を示す残基を黄色で示した
N501とE484（水色）はRBD上変異がよく見られるアミノ酸
- (D) 予測されるK-874AとNTDの相互作用（黒点線）
- (E) RBD上におけるK-874AとACE2の結合
- (F) (E)の拡大図

A



B



C

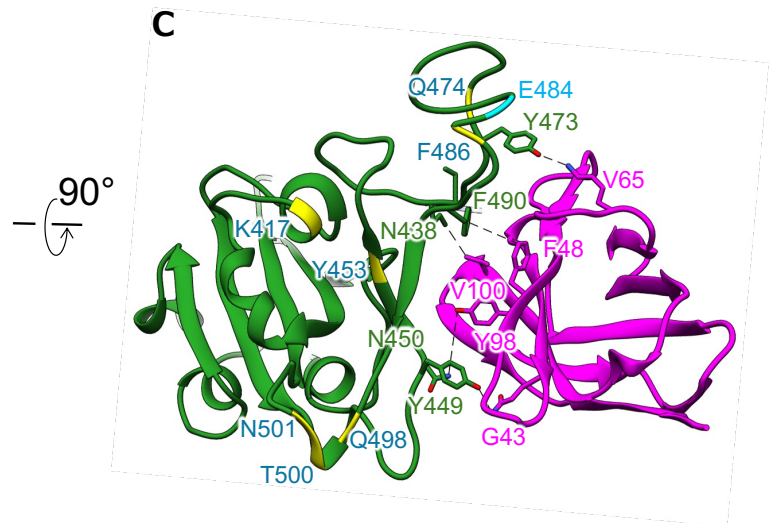


図5 クライオEMによる原子モデル構築（タイプ2）

- (A) Sタンパク質とK-874Aの結合リボンモデル
マゼンダ：K-874A 青：NTD 緑：RBD
- (B) (A)の拡大図
- (C) (B)を90°回転 ACE2と相互作用を示す残基を黄色で示した
N501とE484（水色）はRBD上変異がよく見られるアミノ酸

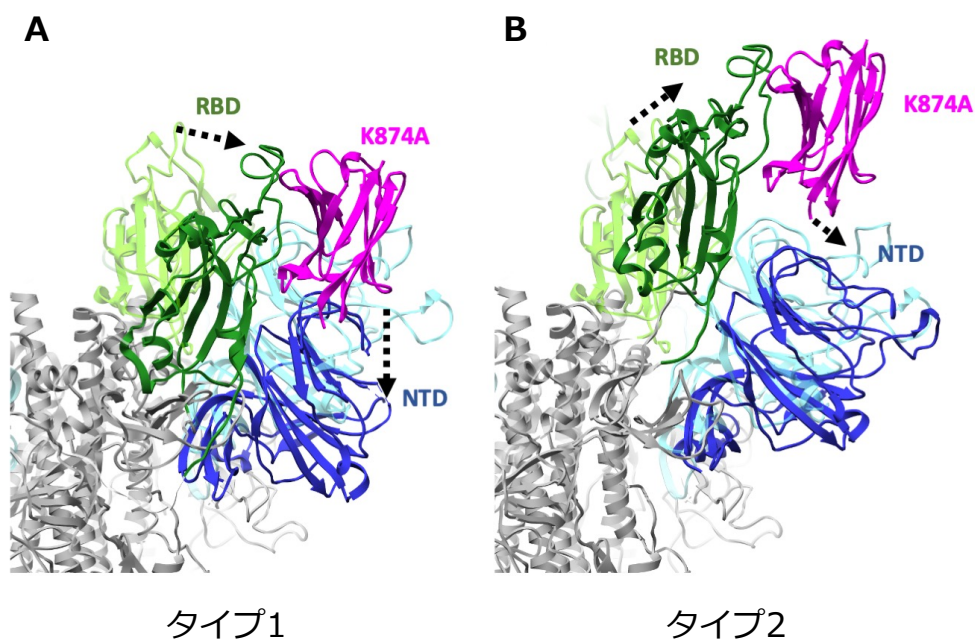
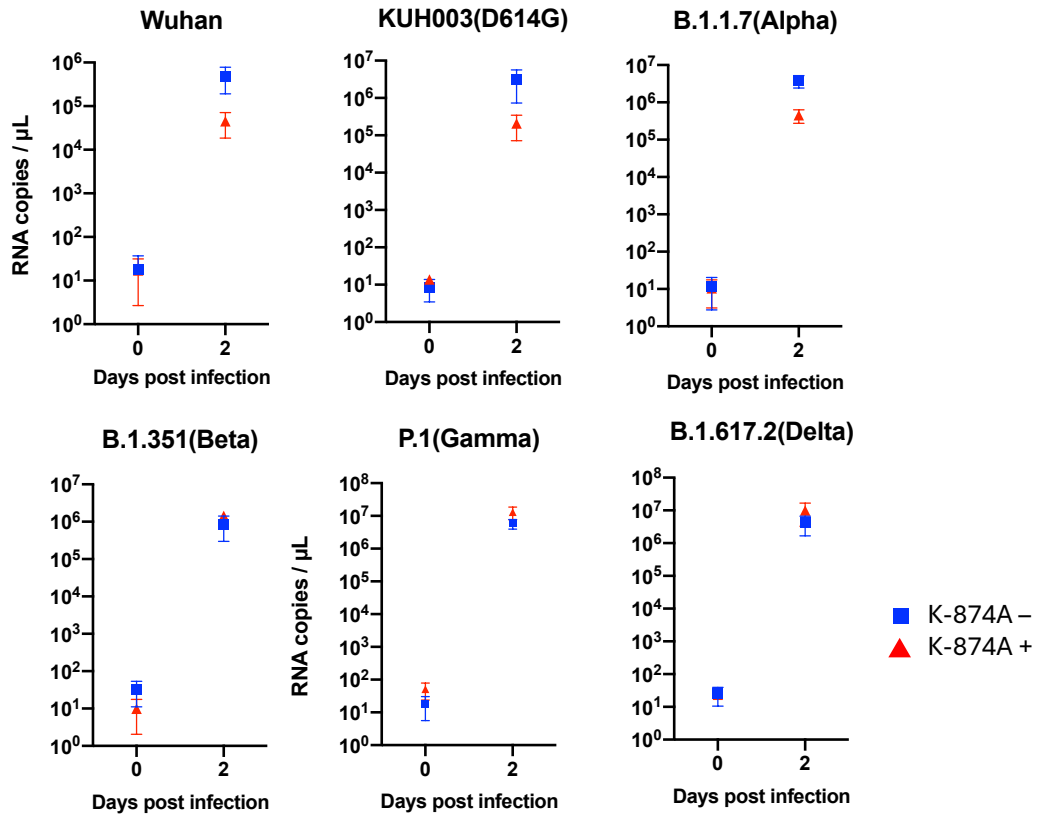


図6 K-874A結合によるSタンパク質の形状変化

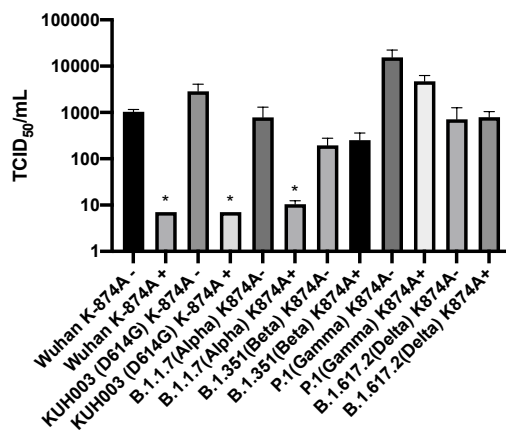
K-874Aが結合していない場合のRBDとNTDの位置をそれぞれ黄緑と水色で示した
K-874Aの結合により

- (A) タイプ1では、RBDは横方向に移動、NTDは下降する
- (B) タイプ2では、RBDは上昇し、NTDはわずかに横移動するが
K-874Aと直接相互作用しない

A



B



C

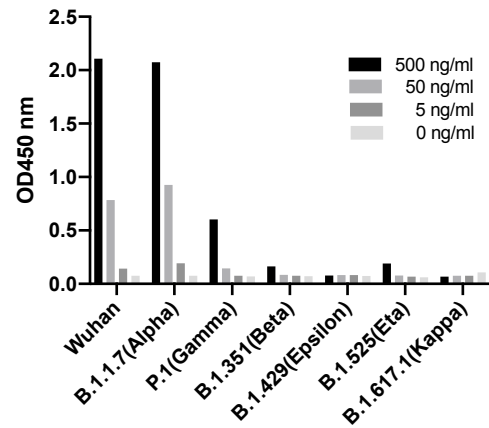


図7 SARS-CoV-2各変異株に対するK-874Aの抗ウイルス活性評価

- (A) 各変異株における感染2日後のRNAコピー量比較
 ■ K-874A未処理 ▲ K-874A処理
- (B) 感染2日後の上清中ウイルスの感染力価 (TCID₅₀)
 (N=5, *p<0.05 検定はWelch's t-testで行った)
- (C) K-874Aと各変異株の組換えSタンパク質結合解析

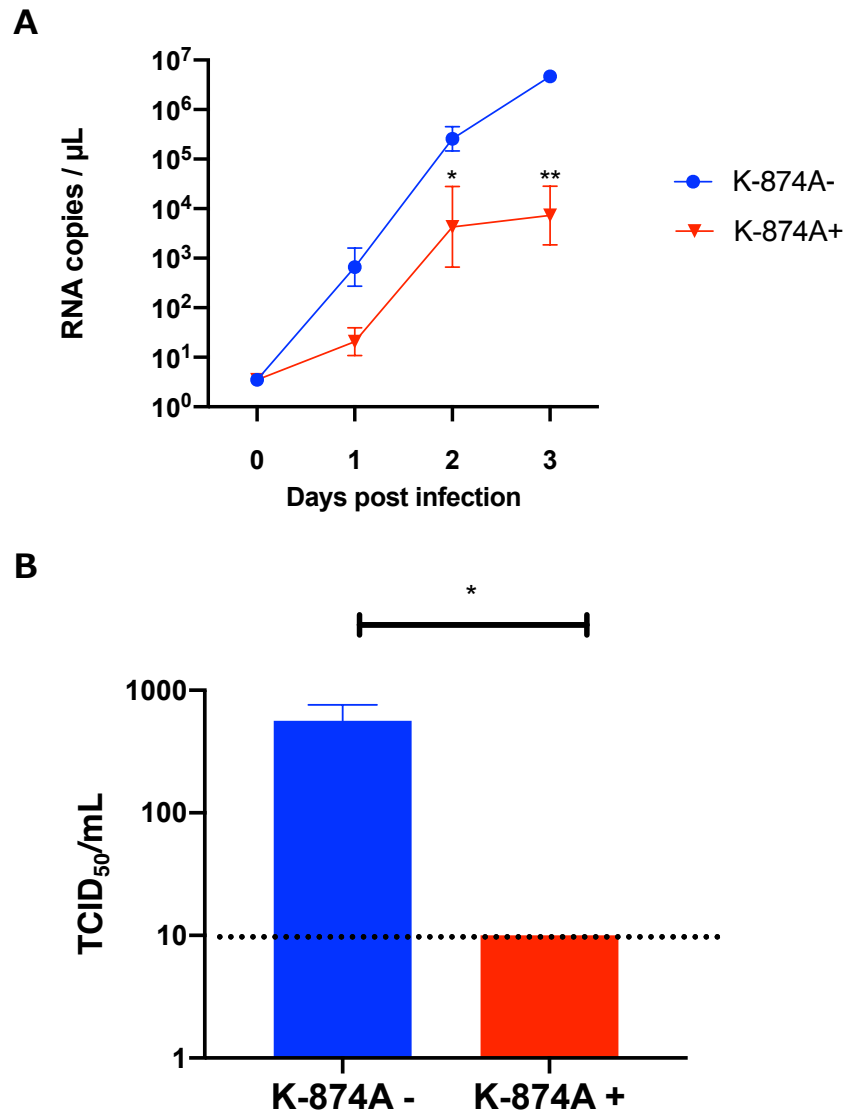


図8 肺オルガノイドにおけるK -874Aの抗ウイルス活性

- (A) 感染3日後の肺オルガノイド上清中ウイルスのRNAコピー量
 ● K-874Aなし ▼ K-874Aあり
 (N=5、*P<0.05、**P<0.005 Welch's t-test)
- (B) 感染3日後の肺オルガノイド上清中ウイルスの感染力価
 (N=5、*P<0.05 Welch's test)

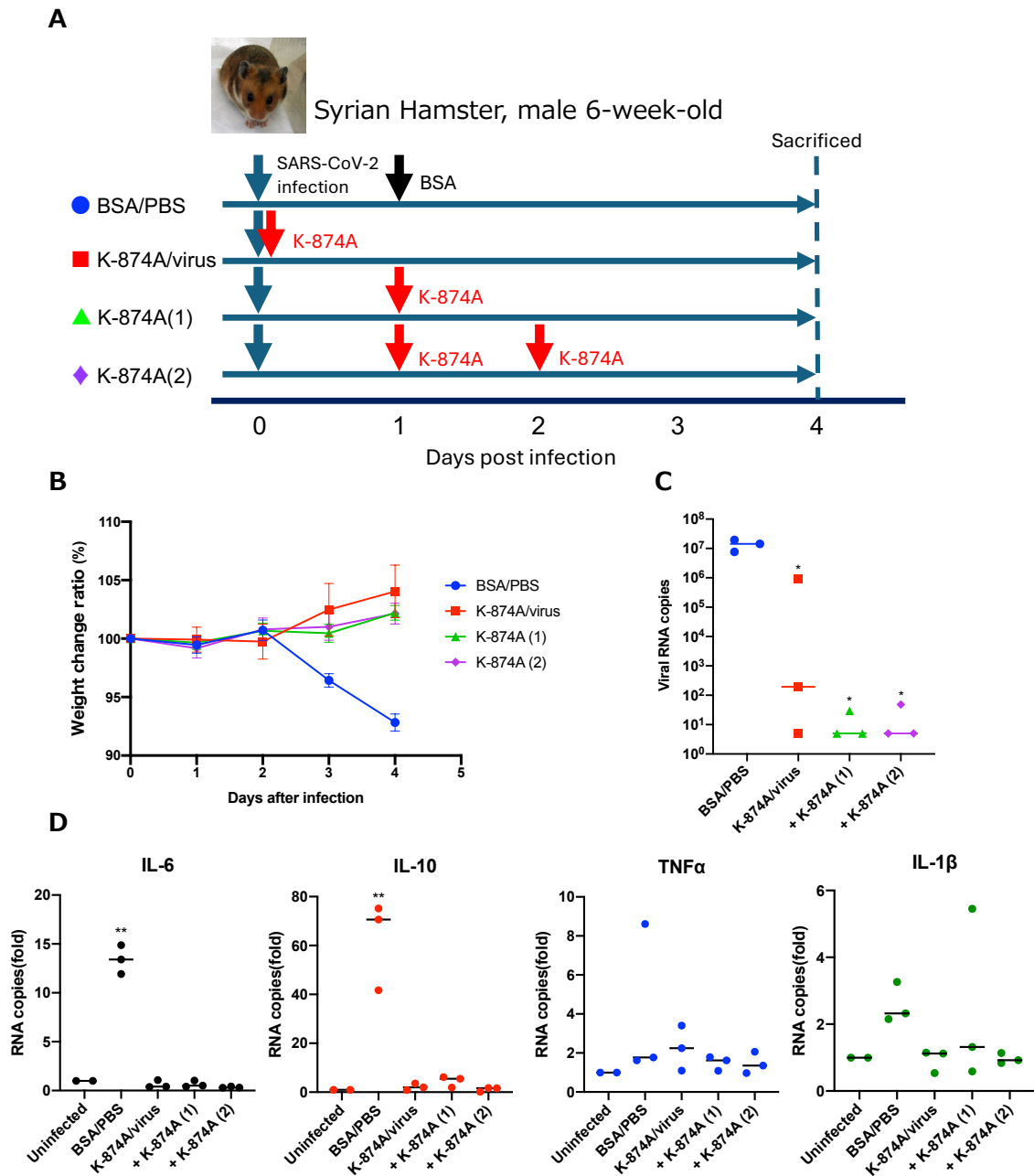


図9 シリアンハムスターを用いたin vivo におけるK-874Aの抗ウイルス活性評価

- (A) シリアンハムスターへの投与計画
- (B) 感染4日後の体重変化
- (C) 肺組織中のウイルスRNA量
N=3 (感染群)、N=2(非感染群)
(* $p<0.05$ Dunnett's multiple comparison test)
- (D) 肺組織中サイトカインの定量
N=3 (感染群)、N=2(非感染群)
(** $p<0.01$ Dunnett's multiple comparison test)

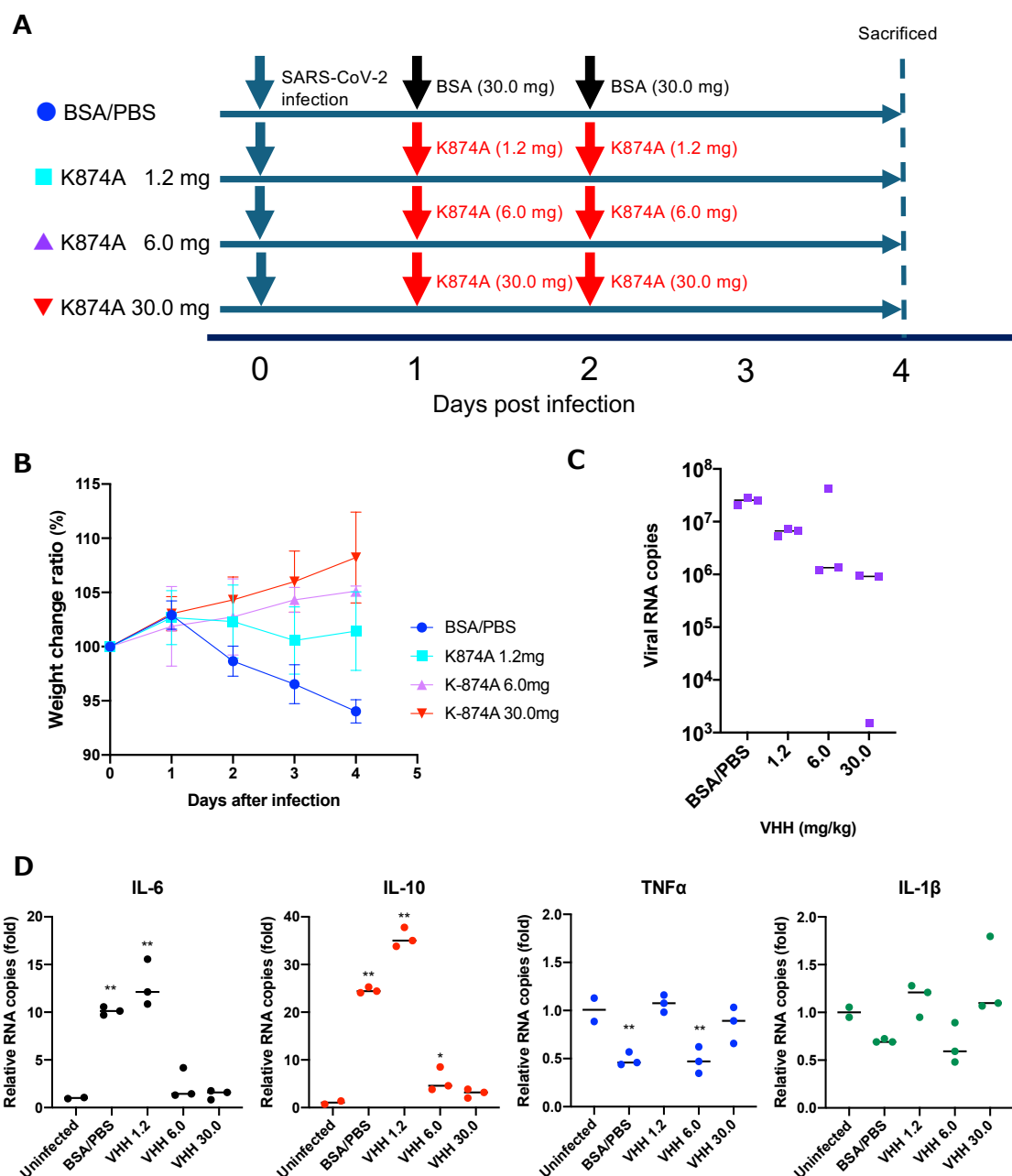


図10 異なる容量を投与したシリアンハムスターにおけるK-874Aの抗ウイルス活性評価

- (A) シリアンハムスターへの投与計画
 (B) 感染4日後の体重変化
 (C) 肺組織中のウイルスRNA量
 N=3 (感染群)、N=2(非感染群)
 (* $p < 0.05$ Dunnett's multiple comparison test)
 (D) 肺組織中サイトカインの定量
 N=3 (感染群)、N=2(非感染群)
 (** $p < 0.01$ Dunnett's multiple comparison test)

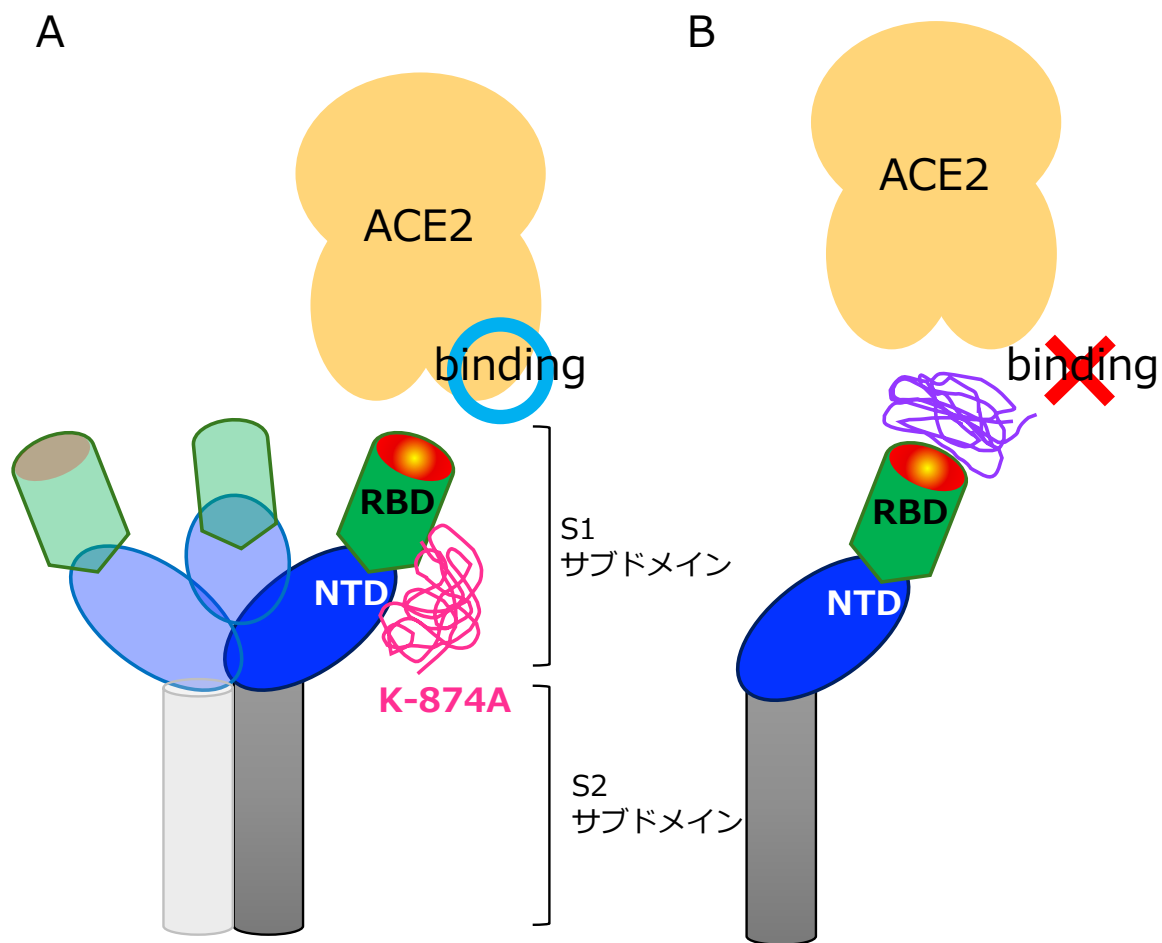


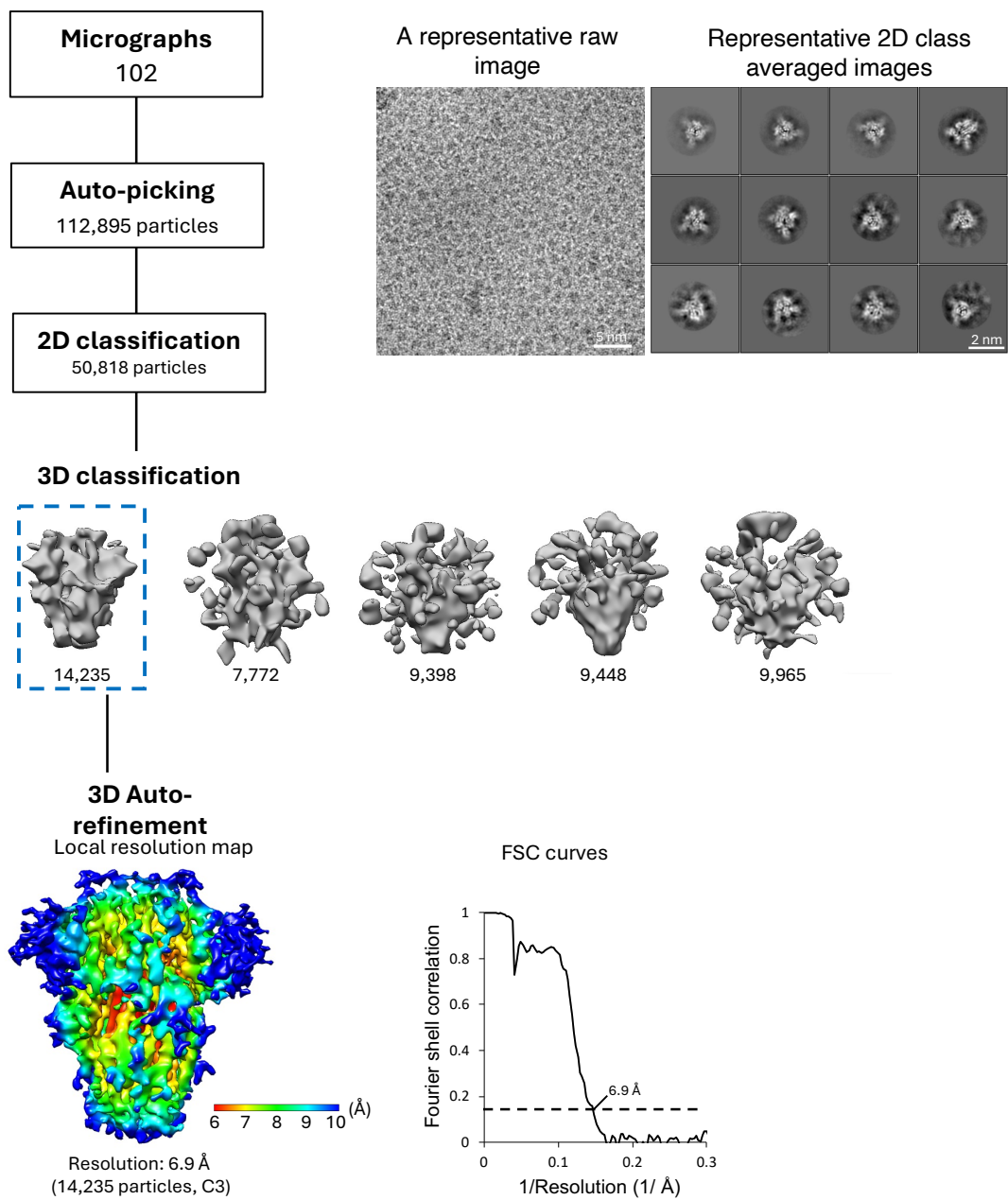
図11 Sタンパク質三量体とK-874Aの結合の模式図

- (A) K-874Aは、RBDとNTDの間に結合するため、RBDとACE2の結合阻害はしない
- (B) 既報のVHHはRBD表面に結合するため、ACE2との結合を阻害する

Data collection and image processing

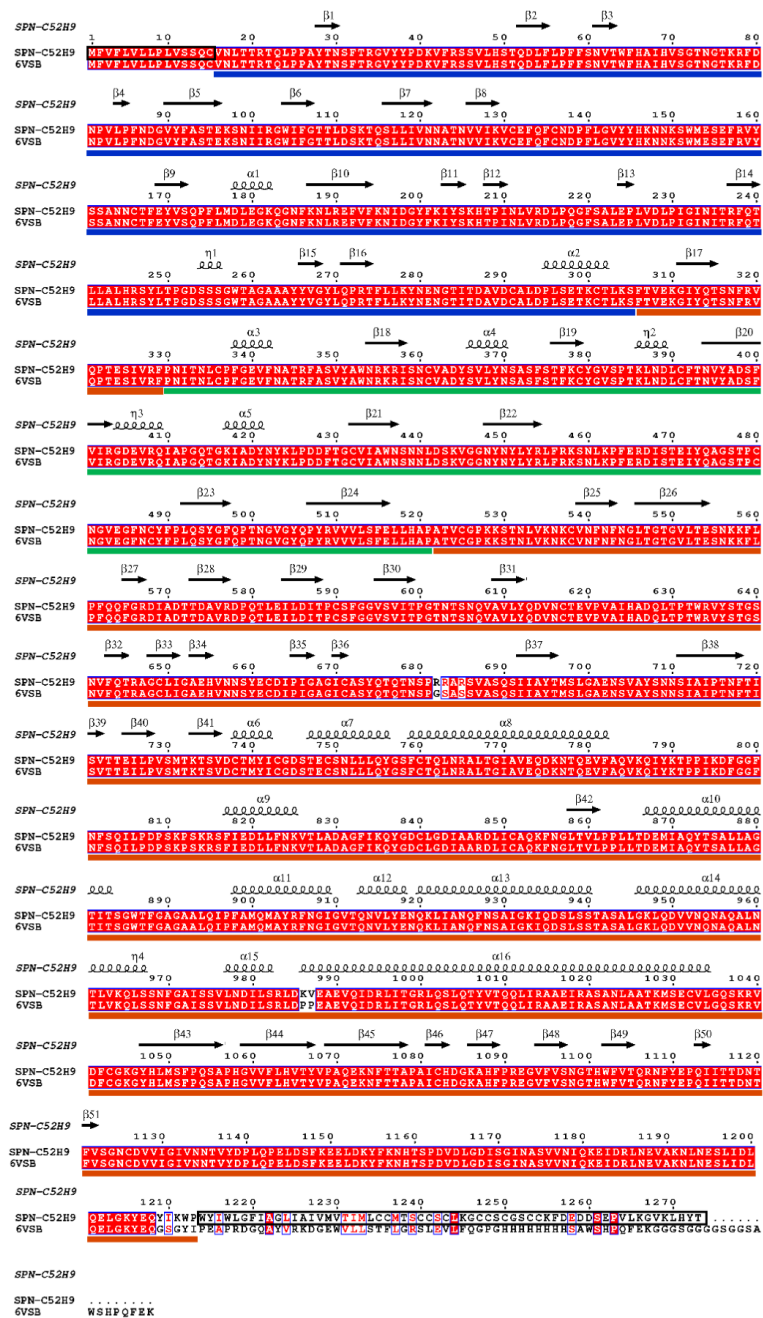
	S protein (SPN-C52H9) + K-874A		S protein (SPN-C52H9)
	Type1	Type2	
Data Collection			
Electron microscopy	Titan Krios		JEM-2200FS
Camera	Gatan K3		DE20
Voltage	300 kV		200 kV
Magnification	64,000		40,000
Calculated pixel size	1.11 Å		1.42 Å
Exposure time (s)	5.6		5
Dose per second (e-/Å²/s)	7.14		6.3
Electron dose	40 electron/Å²		31.5 electron/Å²
Number of frames	58		25
Defocus range	0.5 - 2.5 µm		1.0 - 3.0 µm
Image Processing: Whole structure of S protein trimer and K-874A			
Frame alignment	MotionCor2		
CTF estimation software	CTFFIND 4.1.5		
3D map reconstruction software	Relion 3.1		
Applied symmetry	C3		
Number of micrographs	6,552		102
Initial number of particles	800,000	2252,622	112,895
Particles contributing to final map	115,297	51,305	14,235
Applied B-factor	-146 Å²	-153 Å²	-415 Å²
Global resolution (FSC = 0.143)	3.9 Å	4.4 Å	6.9 Å
EMDB number	EMD-31576	EMD-31573	EMD-31578
Image Processing: Focused 3D refinement on K-874A, RBD and NTD			
3D map reconstruction software	Relion 3.1		
Applied symmetry	C1		
Initial number of particles	345,891	153,915	
Particles contributing to final map	143,647	27,864	
Applied B-factor	-457 Å²	-149 Å²	
Global resolution (FSC = 0.143)	5.0 Å	5.0 Å	
EMDB number	EMD-31575	EMD-31572	
Composite map	EMD-31577	EMD-31574	
Model Building			
Homology model generation software	SWISS-MODEL		
Rigid body fitting software	COOT		
Auto-refinement software	Phenix		
Number of residues built	S protein: 1050 (27-69, 80-139,159-243, 259-834, 853-1138) K-874A:116	S protein: 1086 (27-142,151-834, 853-1138) K-874A:116	S protein: 1114 (27-1140)
R.m.s. deviation (bonds)	0.005	0.007	0.008
R.m.s. deviation (angles)	1.107	1.132	1.07
Ramachandran favored	80.47 %	81.28 %	83.27 %
Ramachandran allowed	18.89 %	18.32 %	16.28 %
Ramachandran outliers	0.65 %	0.41 %	0.45 %
Rotamer outliers	0 %	0.19 %	0 %
C-beta outliers	0	0	0
Clash score, all atomsC-beta	37.34	33.62	52.27
PDB ID	7FG3	7FG2	7FG7

表1 クライオEM取得データ

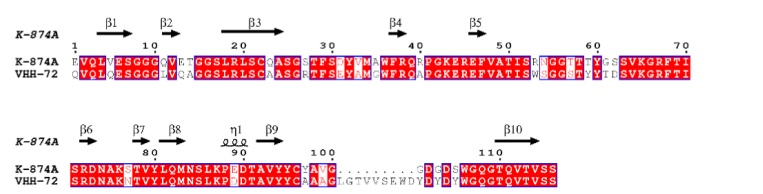


補足図 1 SARS-CoV-2 Sタンパク質三量体のクライオEM解析
ワークフロー

A

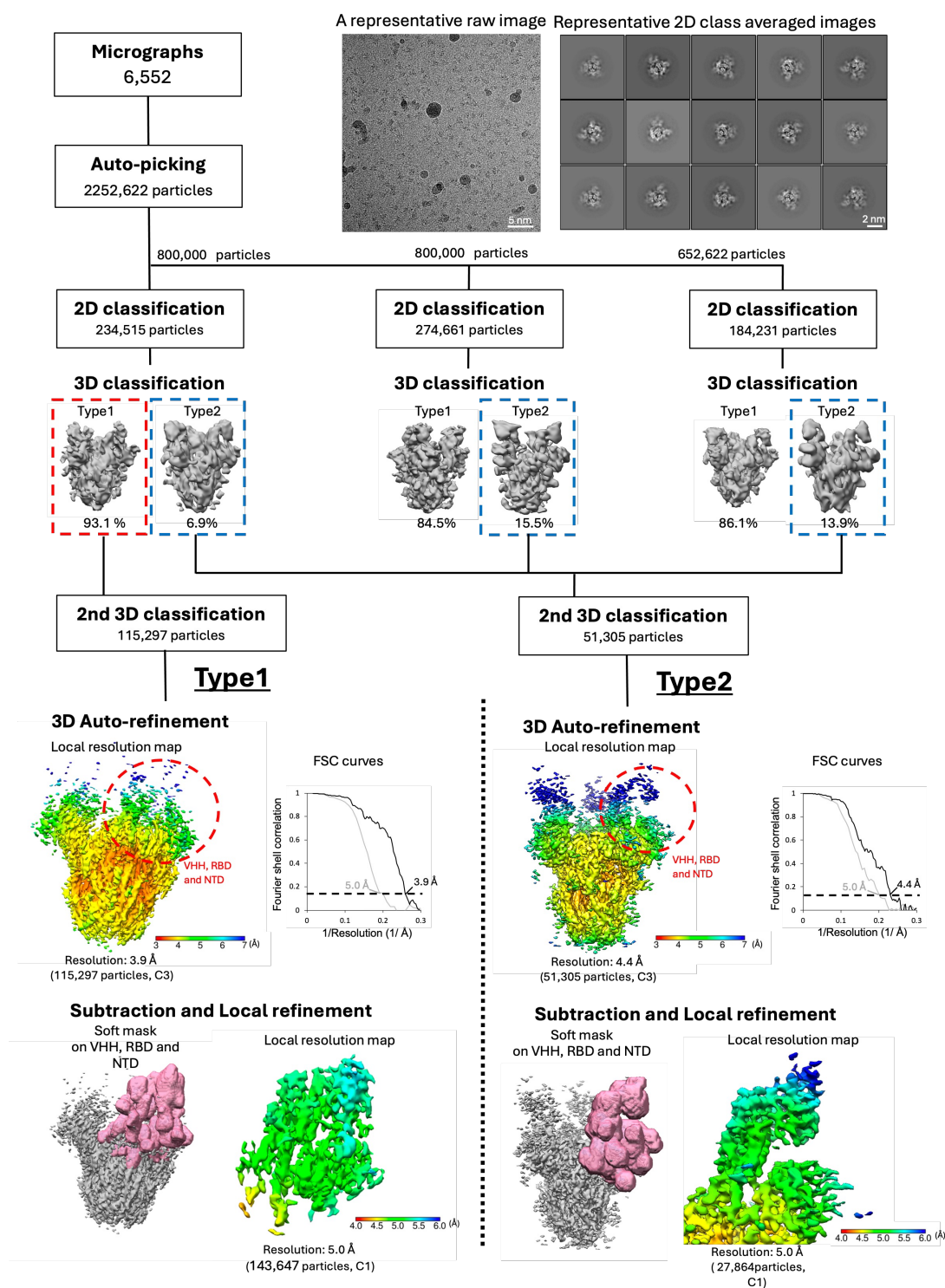


B



補足図2 3Dモデル構築に用いたVHHおよびSタンパク質のアミノ酸配列

(A) SPN-C52H9と6VSBのアミノ酸配列比較
(B) K-874AとVHH-72のアミノ酸配列比較



補足図3 Sタンパク質三量体-K-874A複合体のクライオEM解析ワークフロー

第三章 2 種類の mRNA ワクチンによる免疫後応答

【緒言】

2019 年 12 月 31 日、世界保健機関 (WHO) は中国の武漢市で未知の肺炎アウトブレイクを発表した。原因とされるウイルスの全塩基配列はその数日後に開示され、2002 年に発生した重症急性呼吸器症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS) の原因ウイルスである SARS コロナウイルスと 96 % の相同性を示したことから SARS コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) と命名された[1, 2]。このウイルスは、数ヶ月後には主に中国で感染した旅行者を通じてヨーロッパ、アメリカ合衆国に広がり、多くの国で爆発的な国内感染を引き起こした[3, 4]。SARS-CoV-2 の症例致死率は 2.3 % と SARS や中東呼吸器症候群 (Middle east Respiratory Syndrome; MERS) に比べ低いものであるが、その感染伝播率は非常に高く、無症候性感染者が感染拡大の一因となっている[1, 5, 6]。2020 年 3 月 11 日、WHO は緊急事態宣言を発表、SARS-CoV-2 を原因とする新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) に対する効果的なワクチンの迅速な開発が求められた[7]。いくつかのワクチン候補の中で、2 つの mRNA ワクチンが 1 年のうちに開発された[8, 9]。BNT162b2 (Comirnaty®; Pfizer-BioNTech) と mRNA-1273 (Spikevax®; Moderna) は、大規模な第 III 相試験の結果に基づいて、2020 年 12 月に米国で緊急用として認可され、両 mRNA ワクチンを 3-4 週間間隔で 2 回投与したところ、95 % を超える予想外の高い有効性を示した[10, 11]。

mRNA ワクチンは抗原をコードする mRNA を脂質 (Lipid nano particle; LNP) で包んだ構成となっている[12, 13]。mRNA は、それ自体がアジュバント活性を有し、RNA センサーである Toll like receptor (TLR) 3、7、8 を介して、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を活性化する IFN- α/β を誘導する。また LNP は、感染初期の自然免疫応答においてインフラマソームを刺激することで炎症性サイトカインを産生させ、ヘルパー T 細胞 (Th1、Th2) による抗体応答の制御に寄与する。これらのワクチンは、自然感染して発症した COVID-19 患者の回復期の中和抗体よりも高値の中和抗体価と Th1 細胞応答を誘導した[14, 15]。しかし、接種後の全身性副反応として接種者の約 80 % に局所痛、40-60 % に倦怠感と頭痛、20 % 未満に発熱が認められるとの報告がされた[10, 11]。

SARS-CoV-2 の世界的な感染拡大に伴い、発生のオリジナルである武漢株は変異を重ね、アルファ、ベータ、デルタ、そしてオミクロン株といった後続の変異株への置き換えが生じた[16-18]。オリジナル株由来の配列から開発された mRNA ワクチンの有効性は、ワクチン標的領域である S タンパク質のアミノ酸変異が生じ、抗原性の異なる変異株が出現したため、2 回接種の 1 次免疫 (初回免疫) から 3~6 ヶ月後に低下したが[19-21]、COVID-19 に関連した入院症例の発生予防には依然として有効であった[22]。

ワクチンの有効性に関連する重要な要素として、スパイク (S) タンパク質に対する中和抗体の誘導が挙げられる。mRNA ワクチン接種後、変異株に対する中和抗体価レベルは低下

するが、ワクチンによって誘導された CD8+細胞の傷害性 T リンパ球 (CTL) が感染細胞を排除する、いわゆる細胞性免疫によってウイルスのさらなる増殖を防ぐことでワクチン有効性が維持されると考えられている [23, 24]。ワクチン評価として細胞性および液性免疫応答の解析は非常に重要である。しかし、CTL アッセイは、スパイク抗原やペプチドで刺激したリンパ球培養液から CD8+細胞と IFN- γ +細胞を検出する解析方法であり、フローサイトメトリーを用いる複雑な手法で、熟練した経験が必要となるため臨床現場には適さない。従って、症候性あるいは無症候性感染の有無にかかわらず、mRNA ワクチン接種後の細胞性免疫応答について連続した期間で解析を行なったという研究報告はない。一方で、インターフェロン- γ 遊離試験 (Interferon γ releasing assay; IGRA) または酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイは、いくつかの抗原に対する特異的な細胞性免疫を評価するために採用されている。COVID-19 患者およびワクチン接種者を対象として、SARS-CoV-2 スパイク抗原で刺激した全血培養を用いた IGRA による細胞性免疫応答が報告されている [25-30]。mRNA ワクチンは、Th1 および Th2 サイトカインを介して細胞性および液性免疫応答を誘導するが [14, 23, 24]、抗体の持続性や有害事象の発生率は、2 つの mRNA ワクチン間で異なると考えられる。本研究では、mRNA-1273 ワクチンと BNT162b2 ワクチンの初回および追加 (ブースター) 免疫後の血清を用いて、アルファ、デルタおよびオミクロン変異株に対する中和抗体価と S タンパク質に対する IgG 量を試験期間中にモニターしその持続性を評価した。また、SARS-CoV-2 スパイク抗原で刺激した全血培養におけるサイトカイン産生を比較した。

【材料と方法】

試験対象者

感染症の流行下での研究では、臨床検査データと臨床的背景を正しく把握して解析を進めることが重要であり、被験者には全員詳細な臨床情報を得られる状況にあるメンバーを選出した。試験開始時は 18 名を被験者として登録し、詳細を表 1 に示した。

表 1 被験者（グループ A：mRNA-1273 接種群、グループ B：BNT162b2 接種群）

	mRNA-1273	BNT162b2	
	グループ A	グループ B-1	グループ B-2
参加人数（性別）	男性 4 名、女性 2 名	男性 1 名、女性 7 名	男性 1 名、女性 3 名
年齢（中央値）	30-65 歳（44 歳）	30-65 歳（59 歳）	30-65 歳（48 歳）
COVID-19 発症	なし	2 名	なし

グループ A は、当研究室の健常者 6 名で、職域接種で地方自治体より配布された mRNA-1273 を接種した。

グループ B は、BNT162b2 を接種した被験者 12 名である。

B-1 群は内科外来の医療スタッフ 8 名であった。2 人は 2 回目の接種直後に SARS-CoV-2 に感染した。残りの 6 人はのうち 1 名が 3 回目接種後 1 ヶ月、採血直前に COVID-19 を発症していた。B-2 群は東京都済生会中央病院で BNT162b2 を接種した小児科医師 4 名であった。

A 群と B-2 群の被験者には COVID-19 を疑う臨床症状はなかった。本研究は、参加者全員から文書によるインフォームド・コンセントを、また北里大学病院倫理委員会から研究計画書の承認を 2021 年 5 月 14 日付けで受け行われた（承認番号 21032）。

採血スケジュール

グループ A の被験者は接種前、2 回目接種（初回免疫）後 2 週間、3 ヶ月および 6 ヶ月に採血を行った。3 回目接種（追加免疫）は初回免疫の 6 ヶ月後になされ、接種後 2 または 4 週間後、3 ヶ月および 6 ヶ月後に採血を行った。

グループ B-1 と B-2 は 2 回目接種後 3 ヶ月および 6 ヶ月後に採血、2 回目接種後の 8 ヶ月後に 3 回目接種を行った。その後、1 ヶ月、3 ヶ月および 6 ヶ月後に採血を行った。

使用細胞とウイルス

VeroE6/TMPRSS2 (JCRB1819) は JCRB 細胞バンクより購入し、当研究室で維持しているものを使用した。細胞は非働化したウシ胎児血清 (FBS) を終濃度 5 %、ペニシリンストレプトマイシンを 100 U/mL 加えた DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を用いて、

5 %CO₂存在下の 37 °Cで培養した[31]。SARS-CoV-2 は国立感染症研究所より分与された以下の 3 株を用いた。

アルファ (α) 株 (Pango lineage B.1.1.7 : hCoV19/Japan/QK002/2020, GISAID ID: EPI_ISL_768526)

デルタ (δ) 株 (Pango lineage B.1.617.2:hCoV-19/Japan/TY11-927/2021, GISAID ID: EPI_ISL_2158617)

オミクロン (O) 株 (Pango lineage BA.1.18 : hCoV-19/Japan/TY38-873/2021, GISAID ID: EPI_ISL_7418017)

中和抗体価測定

中和抗体価測定は、国立感染症研究所が定める「COVID-19 血清学的検査マニュアル (令和 2 年 6 月)」に基づき行った。被験血清は 4 倍から 512 倍まで 2 倍段階希釈した。チャレンジウイルスは 100 TCID₅₀/50 μL の濃度になるように調整した。段階希釈した被験血清 50 μL に対しウイルス液を 50 μL になるようにウイルスを接種し、37 °C、2 時間、その後 4 °C で 24 時間中和反応を行った。反応後、96 穴ウェルプレートに単層培養した Vero/TMPRSS2 細胞に 100 μL のウイルス-血清混合液を添加し、5 %CO₂ 存在下の 37 °C で 5 日間培養した。各ウェルの細胞変性効果 (Cytopathic effect: CPE) を確認後、冷メタノールで細胞を固定し、0.2 %メチレンブルー溶液で細胞を染色し、判定を行った。判定は CPE が抑えられた場合に中和抗体陽性と判定し、100 %CPE 阻止の最高希釈倍数を中和抗体価とした[32]。

酵素抗体法 (Enzyme Immunoassay: EIA)

SARS-CoV-2 の S および N タンパク質に対する IgG 量はそれぞれデンカ株式会社の間接酵素免疫測定キット (試作品; #DK20-COV4E-S and #DK20-COV4E-N) を用いて測定した。オリジナル株の S または N タンパク質を抗原として固相化した 96 ウェルプレートに 200 倍希釈した被験血清を加え、室温で 1 時間反応させた。洗浄バッファーで 3 回洗浄し、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を加えてさらに室温で 1 時間反応させた。洗浄バッファーで 3 回洗浄し、基質液を加え、室温で 30 分反応させた。反応停止液を 1 ウェルあたり 0.1 mL ずつ加えて反応を停止し、Ensign (パーキンエルマー) のプレートリーダーを用いて吸光度 (波長 450 nm) を測定した[33]。得られた測定値は国際単位 (Binding Antibody Units; BAU/mL) に換算した。

SARS-CoV-2 S タンパク質刺激による産生サイトカインの測定

S タンパク質 (10 ng/ウェル) を固相化した 96 ウェルプレートにヘパリン処理した被験者全血 100 μL と同量の DMEM を混合し、5 %CO₂ 存在下の 37 °C で 24 時間培養した。コントロールとして、S タンパク質で刺激しない被験者全血群も同時に培養を行った。培養液はアッセイまで -70 °C で保存し、BioPlex human cytokine 17 plex (BIO-RAD) を用いて、G-

CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、MCP-1、MIP-1 β 、TNF- α を測定した。刺激培養したサイトカイン濃度からコントロール培養のサイトカイン濃度を差し引き、産生サイトカイン濃度とした。

統計処理

サイトカイン濃度は、中央値、下限値、上限値の範囲を 5-95 %として箱ひげ図に示した。有意差検定 ($p < 0.05$) は、BellCurve for Excel (株式会社社会情報サービス) を用いて、Mann-Whitney U 検定により行った。

【結果】

各変異株に対する中和抗体価の測定

mRNA-1273 で免疫したグループ A における中和抗体価の結果を図 1 に示した。1 名の被験者が 3 回目の投与後 6 ヶ月で他施設に異動したため本研究の対象者から除外した。アルファ、デルタおよびオミクロン(BA.1)株に対する中和抗体を調べたところ、接種前血清は全員が陰性で、2 回目接種の 2 週間後に血清変換（抗体陽転）（ ≥ 512 倍）していた。グループ A の 5 名全員が、アルファ株に対して 2 回目接種の 6 ヶ月後まで ≥ 256 倍の高い中和抗体価を維持していた。3 回目接種後に再度 ≥ 512 倍まで上昇し、6 ヶ月まで低下は見られなかった。デルタ株に対する中和抗体価は、2 回目接種 2 週間後に ≥ 256 倍を示した。その後 3-6 ヶ月で低下し、1 名の被験者は 8 倍まで低下していた。3 回目接種後は全員が ≥ 512 倍まで上昇した。オミクロン株に対する中和抗体価は、2 回目接種後 3-6 ヶ月で ≥ 32 倍を示し、3 回目の接種後に ≥ 64 倍まで上昇した。途中離脱した被験者を含む 4 名について、各株に対する中和抗体価は接種後 3-6 ヶ月後に低下していったが、2 名の被験者は高い中和抗体価を維持していた。どちらも COVID-19 の明らかな症状は認められなかったが、うち 1 名は期間中に同居家族に COVID-19 発症者がいた。残りの 1 名は感染者との接触の報告はなかった。

BNT162b2 を接種したグループ B-1 および B-2 群の結果を図 2 に示した。B-1 群の 2 名は 2 回目接種後すぐに SARS-CoV-2 に感染したため、残り 6 名について経過観察をおこなった。アルファ株に対する中和抗体価は、2 回目接種後 3 ヶ月で平均 $2^{6.90 \pm 1.20}$ （標準偏差 ± 1.0 ）、6 ヶ月で平均 $2^{6.10 \pm 0.74}$ （標準偏差 ± 1.0 ）で、mRNA-1273 を接種したグループ A 群の平均 $2^{8.67 \pm 0.82}$ （3 ヶ月後）、平均 $2^{8.0 \pm 1.55}$ （6 ヶ月後）と比べ有意に低かった（それぞれ $p < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ）。3 回目接種 1 ヶ月後、B-1 すべての被験者で ≥ 512 倍まで中和抗体価は増加した。B-1 群では、1 名が 3 回目接種後 1 ヶ月に COVID-19 に罹患しており、残る 5 名には COVID-19 の臨床症状なかったが、中和抗体価は低下することなく高レベルを維持していた。B-2 群のアルファ株に対する中和抗体価は、2 回目接種後 3-6 ヶ月で低下したが、3 回目接種後 1 ヶ月で再び増加した。3 ヶ月後に中和抗体価は 64 または 128 倍と 3 回目接種前と同程度まで減少し、6 ヶ月後に再び増加したことから、B-2 群は無症候性感染したことが示唆された。

グループ B 群のデルタ株に対する中和抗体価は、2 回接種後 6 ヶ月で 8 から 128 倍まで低下、これは同時期におけるグループ A 群の結果と同様であった。B-1 群では 3 回目接種後抗体価は増加し、その後は減少せず維持された。一方で B-2 群は 3 回目接種後に増加した抗体価は 3 ヶ月後に減少し、アルファ株と同様に 6 ヶ月後に再び上昇した。

グループ B 群のオミクロン株に対する中和抗体価は 2 回目接種後 3-6 ヶ月で非常に低く、16 倍以下であったが、3 回目接種 1 ヶ月後では 32 倍以上に増加した。B-1 群では、COVID-19 有症者の中和抗体価は ≥ 512 倍まで増加した。1 名が 3 回目接種 3 ヶ月後に 32 倍まで減少していたが、残りの 4 名は 3 回目接種 3 ヶ月後で中和抗体価の上昇が見られ、この 4 名は

無症候性感染していたと考えられた。B-2 群では、3 回目接種 1 ヶ月後に一過性の中和抗体価上昇が見られ、その後 3 回目接種前と同レベルにまで低下していた。また、COVID-19 の診療を担当した 3 名の被験者は 3 回目接種の 3 ヶ月と 6 ヶ月の間に大幅な中和抗体価上昇が見られた。この 3 名は明らかな COVID-19 臨床症状は示しておらず、感染者との接触から起きた無症候性感染によるブースター効果と考えられた。東京都による COVID-19 サーベイランスデータでは、2022 年 1～2 月と 7～8 月との 2 回に大規模な集団発生のピークがあった（図 3）。B-1 群では 1 名が 3 回目接種の 1 ヶ月後（2022 年 1 月）に COVID-19 に罹患し、同クリニックに勤務する 5 名のうち 4 名でオミクロン株に対する中和抗体価が上昇していた。また、B-2 群では、3 回目接種後 6 ヶ月の採血 2 週間前（2022 年 6 月末）に COVID-19 患者と濃厚接触した被験者 3 名が有症状なしにオミクロン株に対する中和抗体価の増加を認めた。B-1、B-2 のケースともサーベイランスデータのピークと一致しており、以上の事から無症候性感染が強く示唆された。

SARS-CoV-2 に対する IgG 抗体量解析

被験者の自然感染を確認するために、各グループの SARS-CoV-2 の N タンパク質に対する IgG 量を EIA 法により測定した。その結果、グループ B-1 群の COVID-19 有症者は N タンパク質の EIA 陽性を示した。一方で無症候性感染が考えられたグループ A の 2 名、B-1 の 4 名および B-2 の 3 名については EIA 陰性であった（データは示さない）。

同様に各グループの SARS-CoV-2 の S タンパク質に対する IgG 量を EIA 法により測定した（図 4）。S タンパク質に対する IgG 量は 3 回目接種後に増強され、3 回目接種の高いブースター効果が認められた。BNT162b2 を接種したグループ B よりも、mRNA-1273 を接種したグループ A の被験者でより高い値を示した。

mRNA1273 接種者の血中サイトカイン濃度の測定

被験者の血清について、全血培養で産生されるサイトカイン濃度について解析をおこなった。図 5 にグループ A の Th1 サイトカインの IFN- γ 、IL-2 および TNF- α の結果を示した（平均 \pm 1 標準偏差）。IFN- γ は 2 回目接種 2 週間後の測定で 24.39 ± 19.80 pg/mL であり、その後減少した。3 回目接種 2 週間後では、 12.62 ± 15.55 pg/mL となり、産生量は増強されず、2 回目接種 2 週間後よりも低下した。これは 3 回目接種（ブースター免疫）では製剤に含まれる mRNA 量が 50 μ g と 1、2 回目接種の製剤より半量になっているためと考えられたが 3 回目接種 3-6 ヶ月後で増加していた。IL-2 と TNF- α については 2 回目接種後 2 週間で増加していた。その後は 3 ヶ月後まで同レベルを維持するが 6 ヶ月で減少、3 回目接種後に再び増加した。

次に Th2 サイトカインである IL-4、IL-5 および IL-10 の測定結果を図 6 に示した。IL-4 は 2 回目接種後 2 週間で増加し（ 3.22 ± 2.37 pg/mL）、3 ヶ月後まで維持された（ 2.76 ± 0.59 pg/mL）。6 ヶ月後に減少したが 3 回目接種 2 週間後で再び増加（ 3.43 ± 1.20 pg/mL）、その

まま減少しなかった。IL-5 および IL-10 については IL-4 と同様の産生プロファイルを示した。

炎症性サイトカインである G-CSF、IL-6 および IL-17 の結果を図 7 に示した。G-CSF の産生量は 2 回目接種 2 週間から 3 ヶ月にかけて増加し (179.83 ± 147.29 pg/mL)、6 ヶ月後に減少した (29.18 ± 50.07 pg/mL) したが、3 回目接種 2 週間後に 323.14 ± 302.80 pg/mL の高い値を示した。IL-6 は 2 回目接種 2 週間後で 1283.76 ± 534.70 pg/mL、その後 3 ヶ月後まで同レベル (263.91 ± 318.75 pg/mL) で維持された。6 ヶ月後に 346.24 ± 260.36 pg/mL まで減少したが、3 回目接種 2 週間後では 1668.92 ± 548.62 pg/mL と増加していた。IL-17 についても同様の産生プロファイルを示した。

2 つの mRNA ワクチンによる産生サイトカイン量の比較

mRNA ワクチンによる Th1 細胞応答サイトカイン (IFN- γ 、IL-2 および TNF- α) 産生誘導性の比較を図 8 に示した。グループ A と B にどちらも 3 回目接種後に無症候性感染が疑われる被験者が含まれていたため、IL-2 と TNF- α の比較は 3 回目接種前の血清を用いて比較を行った。

IFN- γ の産生量は 3 回目接種後 2 週間または 1 ヶ月の mRNA1273 群 (12.62 ± 15.55 pg/mL) よりも BNT162b2 群 (42.60 ± 30.31 pg/mL) の方が有意に高かった ($p < 0.05$)。これは 3 回目ブースター接種の mRNA1273 では抗原の mRNA 量が減らされたことと LNP の組成が異なることに起因すると考えられた。2 回目接種 3 ヶ月後の IL-2 については、mRNA1273 接種群は 23.63 ± 20.13 pg/mL で、BNT162b2 の 3.50 ± 1.99 pg/mL より高かったが有意差はなかった。TNF- α については、mRNA-1273 群で 207.16 ± 77.76 pg/mL であり、BNT162b2 群の 56.96 ± 77.76 pg/mL よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。

Th2 細胞応答サイトカイン (IL-4、IL-5 および IL-10) 産生についての比較を図 9 に示した。mRNA-1273 は、2 回目接種 3 ヶ月後に、BNT162b2 (0.93 ± 0.54 pg/mL) よりも高いレベルの IL-4 (2.76 ± 0.59 pg/mL) を誘導した ($p < 0.01$)。同様に、mRNA-1273 は、BNT162b2 (13.08 ± 10.25 pg/mL) よりも高いレベルの IL-5 (47.18 ± 11.10 pg/mL) を誘導したが ($p < 0.01$)、IL-10 の産生には有意差はなかった。

同様に炎症性サイトカイン (G-CSF、IL-6 および IL-17) の結果を図 10 に示した。2 回目接種 3 ヶ月後の比較において、mRNA-1273 は G-CSF (179.84 ± 147.29 pg/mL)、IL-6 (1263.91 ± 318.75 pg/mL)、IL-17 (18.08 ± 8.98 pg/mL) であり、BNT162b2 の G-CSF (30.42 ± 70.11 pg/mL)、IL-6 (314.98 ± 273.67 pg/mL)、IL-17 (2.51 ± 1.71 pg/mL) よりも高いレベルの誘導性を示した (有意差はそれぞれ IL-6 $p < 0.01$ 、G-CSF $p < 0.05$ 、IL-17 $p < 0.01$)。

BNT162b2 による免疫後の B-1 群と B-2 群のサイトカイン産生の比較

グループ B-1 群では、3 回目接種後 1 ヶ月で 1 名が COVID-19 に罹患し、4 名が無症候性感染の疑いが考えられた。また B-2 群は試験期間を通じて明らかな COVID-19 の臨床症状

は無かったが、うち3名は3回目接種6ヶ月後に無症候性感染が疑われた（図2）。そこで Th1、Th2 および炎症性サイトカインを代表する IFN- γ 、IL-4 および IL-6 について B-1 群と B-2 群で比較を行った（図11）。どちらのグループも2回目接種後3-6ヶ月後では IFN- γ のレベルは低かったが、3回目接種1ヶ月後に上昇、その後低下したことがわかった。IL-4 についても同様のプロファイルを示し、3回目接種後3ヶ月で減少したが6ヶ月後に再び増加していた。IL-6 について、3回目接種後ほどなく無症候性感染が発生したと考えられる B-1 群では3ヶ月後でも産生量は低下しなかった。しかし B-2 群では、無症候性感染が認められなかった3回目接種後3ヶ月の時点では IL-6 が減少し、無症候性感染の発生が示唆された3回目接種後6ヶ月で IL-6 の増加が確認された。

【考察】

ワクチンによって誘導される病原体に対する防御効果には、T 細胞（CD4+細胞、CD8+細胞）が関わる長期持続性の記憶免疫が関わっている。CD4+ヘルパーT 細胞は、免疫応答を制御するために、機能的に異なる複数のサブセットを有している [34, 35]。濾胞性 CD4+細胞は、IL-4、IL-5 および IL-12 といったサイトカインと協調し、B 細胞のクラススイッチや高い親和性を持つ抗原特異的抗体の分泌を促進し、また長期持続型メモリーB 細胞への分化を誘導する [36]。ナイーブ CD4+細胞（Th0）は抗原提示細胞が産生する IL-12 および IFN- γ の刺激を受けると、Th1 細胞となり CTL を活性化することで細胞性免疫を担う [37-39]。Th1 によって活性化された CTL (CD8+) はウイルスに感染した細胞を死滅させ、さらなる感染拡大を防ぐ。病原体が侵入した場合、最初に自然免疫によって抗原の排除が行われるが、次段階としてサイトカインやケモカインを介した適応免疫が活性化される。

COVID-19 ワクチンとして開発された新規 mRNA ワクチンは、自然感染による抗体応答を上回る優れた免疫応答を引き起こして、CD4+および CD8+T 細胞を誘導した [23, 24]。ワクチンの有効性を評価するためには細胞性および液性免疫の持続性を解析する必要がある。

SARS-CoV-2 は武漢株から変異を繰り返し、アルファ、ベータ、デルタおよびオミクロン株といった変異株が出現している [40]。本研究では mRNA-1273（接種グループ A）および BNT162b2（接種グループ B）による初回免疫および3 回目接種（追加免疫）後の被験者血清を用いて、約一年間の長期免疫応答の比較検討を行った。3 回目接種後のグループ A、B-1 および B-2 において、中和抗体価の解析により 2022 年の 1 月～2 月（omicron BA.1/2）と 7 月～8 月（omicron BA.4/5）の 2 つの大規模な集団発生のパークに一致して無症候性感染が実証された [41]。

グループ A では、アルファ株に対する中和抗体価の大幅な低下は見られなかった。デルタ株に対する中和抗体価はアルファ株に比べて 1/2 から 1/4 に、オミクロン株に対する中和抗体価は 1/16 程度に減少しており、既報と同程度であった [42, 43]。グループ B ではオミクロン株に対する中和抗体価が 3 回目接種前に ≥ 16 倍と著しく低下し、追加免疫後に上昇するも B-2 群では 3 ヶ月後にブースター接種前レベルにまで低下した。mRNA-1273 は広範囲の交差反応性を持つ抗体をより強力に誘導するが、デルタおよびオミクロン株に対する中和抗体価は COVID-19 患者と濃厚接触がない場合では徐々に低下していた。グループ A と B-2 の各 1 名（それぞれ 41 歳、65 歳）は中和抗体応答が低く、特にオミクロン株に対しては顕著であった。この 2 人についてはサイトカイン応答も他の被験者と比べて低かった。

自然免疫は、生体が病原体にさらされたときに病原体関連分子パターン（PAMPs）および損傷関連分子パターン（DAMPs）が察知されることで初期に機能する。また、細胞性免疫は機能の異なる Th1、Th2 および炎症性サイトカインによって修飾や制御、誘導される [37-39]。季節性インフルエンザワクチンの接種後の全血培養中の Th1、Th2 および炎症性サイ

トカインの産生について調査した研究では、血清変換した被験者では初回接種1ヶ月後から有意な量の IL-2、IL-12、IL-13、MCP-1、MIP-1 β 、TNF- α が検出された[44]。mRNA ワクチンの構成成分である mRNA は TLR3/7/8 のリガンドとして機能し、IFN- α/β を誘導し、LNP は炎症性サイトカインを産生するためにインフラマソームを刺激する [45, 46]。COVID-19 感染患者では一年以上にわたって Th1、Th2、炎症性サイトカインが産生され、液性免疫および T 細胞応答が維持されていた[47]。Bonnet らは、IGRA 法を用いて T 細胞応答を測定し、BNT162b2 接種者では3および6ヶ月後に低下したと報告した[28]。しかし、これまでに細胞性免疫応答としての連続的なサイトカイン産生や、2つの mRNA ワクチンによる免疫後の中和抗体応答の比較について解析を行った報告はない。マウスモデルでは、mRNA-1273 を接種した場合に BNT162b2 に比べて Th1、Th2 サイトカインが高いレベルで誘導された[48]。

近年、自然免疫の記憶として訓練免疫 (trained immunity) が注目されている[49]。本研究では、訓練免疫の持続性を評価するために、スパイク抗原でワクチン接種後の全血培養を刺激し、Th1、Th2 および炎症性サイトカインを検出した。サイトカイン産生は mRNA-1273 および BNT162b2 接種後の 2-4 週間後に増加した。しかし、2つのワクチンでは異なるプロファイルが観察され、BNT162b2 では接種3ヶ月後にサイトカイン産生の減少が見られた。一方で、mRNA-1273 接種後では、IFN- γ 産生は2回接種後3ヶ月で減少したが、TNF- α 、IL-4、IL-5、G-CSF、IL-6 および IL-7 の産生は3ヶ月維持されていた。これらの違いについては、mRNA-1273 の mRNA 量は1回目および2回目接種 (初回免疫) 時は 100 μ g、3回目 (追加免疫) 接種時は 50 μ g であり、BNT162b2 の 30 μ g (初回免疫、追加免疫とも) よりも高濃度となっていること[10, 11]や、自然免疫を刺激する DAMP の起因となる LNP 形成の違いから起因することが考えられる。

炎症性サイトカインである IL-6 の増加は、CD4+ Th0 細胞が抗原提示細胞の MHC クラス II 上に結合した抗原ペプチドを認識するのを促進する[37, 38]。CD4+ Th0 細胞は、Th1、Th2 および Th17 細胞へと分化する。その後 IL-4 は Th2 細胞を活性化して抗体を産生させ、IL-5 は抗体産生を担う B 細胞の活性化を誘導する。mRNA-1273 による免疫後に見られた高い液性免疫応答は、初回免疫において自然免疫をより強く刺激され、これらのサイトカインネットワークが増強され誘導されたことによると考えられた。

Le Bert らは、重症 COVID-19 患者の全血培養中には TNF- α 、IL-6、IL-1 β および IL-10 は顕著に分泌されたが、IFN- γ と IL-2 はそれらに比べ分泌量が少なかったと報告している[50]。無症候性 SARS-CoV-2 感染者では炎症性サイトカインと Th1 サイトカインである IFN- γ と IL-2 が比例して高かった。本研究の調査期間中、3回接種後にグループ B-1 で1人が SARS-CoV-2 に感染、4人が無症候性感染、グループ B-2 で3人に無症候性感染が疑われ、IFN- γ 、IL-2 について既報と同様の結果が得られた。IFN- γ に顕著な変化は見られなかったが、無症候性感染者では IL-6 の上昇が見られた。IL-6 は CD4+ヘルパー細胞を活性化する炎症性サイトカインで、IL-5 は抗体産生を制御している。無症候性感染者におけ

る中和抗体力価の上昇は、Th2 および炎症性サイトカイン応答によるものと考えられた。

本研究は被験者数が少ないため、考察に限界があるが、各被験者の実験データはそれぞれの臨床的背景と複雑に関連づけられた。無症候性感染については、各被験者の臨床情報とその時期に流行しているウイルス株に対する中和抗体力価によって判断した。

ワクチンによる獲得免疫応答は、各個人の自然免疫の次段階で引き起こる細胞性および液性免疫応答に依存するところが多い。今回解析した Th1、Th2 および炎症性サイトカイン産生のプロファイルは中和抗体産生の結果と整合性の取れた結果であった。

本研究の結果をまとめると、BNT162b2 による免疫後、中和抗体力価と細胞性免疫は初回免疫およびブースター免疫の3ヶ月後に低下した。一方で mRNA-1273 では、BNT162b2 よりも高いレベルの Th1、Th2 および炎症性サイトカインを誘導し、その結果変異株に対する中和抗体力価レベルを維持していたと考えられた。mRNA-1273 接種群では TNF- α 、IL-4、IL-5、G-CSF、IL-6 および IL-17 がワクチン接種後3ヶ月は維持されていたが、BNT162b2 では維持されなかった。細胞性免疫応答は両ワクチンとも初回免疫6ヶ月後には減少していた。本研究でも見られたように、被験者の無症候性感染を避けることはできない。中和抗体価およびサイトカイン産生のデータ解析は、複雑な臨床的背景情報を考慮して評価されるべきである。

【引用文献】

1. Wu, Z. and J.M. McGoogan, *Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention*. JAMA, 2020. **323**(13): p. 1239-1242.
2. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding*. Lancet, 2020. **395**(10224): p. 565-574.
3. Wu, J.T., K. Leung, and G.M. Leung, *Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study*. Lancet, 2020. **395**(10225): p. 689-697.
4. Zhou, F., et al., *Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study*. Lancet, 2020. **395**(10229): p. 1054-1062.
5. You, Y., et al., *Asymptomatic COVID-19 infection: diagnosis, transmission, population characteristics*. BMJ Support Palliat Care, 2021.
6. Pei, Y., et al., *Quantifying the dynamic transmission of COVID-19 asymptomatic and symptomatic infections: Evidence from four Chinese regions*. Front Public Health, 2022. **10**: p. 925492.
7. Corey, L., et al., *A strategic approach to COVID-19 vaccine R&D*. Science, 2020. **368**(6494): p. 948-950.
8. Lurie, N., et al., *Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed*. N Engl J Med, 2020. **382**(21): p. 1969-1973.
9. Cohen, J., *Vaccine designers take first shots at COVID-19*. Science, 2020. **368**(6486): p. 14-16.
10. Polack, F.P., et al., *Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine*. N Engl J Med, 2020. **383**(27): p. 2603-2615.
11. Baden, L.R., et al., *Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine*. N Engl J Med, 2021. **384**(5): p. 403-416.
12. Chaudhary, N., D. Weissman, and K.A. Whitehead, *mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation*. Nat Rev Drug Discov, 2021. **20**(11): p. 817-838.
13. Pardi, N., et al., *mRNA vaccines - a new era in vaccinology*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(4): p. 261-279.
14. Sahin, U., et al., *COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T(H)1 T cell responses*. Nature, 2020. **586**(7830): p. 594-599.
15. Walsh, E.E., et al., *Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine*

- Candidates*. N Engl J Med, 2020. **383**(25): p. 2439-2450.
16. Greaney, A.J., et al., *Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition*. Cell Host Microbe, 2021. **29**(1): p. 44-57.e9.
 17. Tegally, H., et al., *Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa*. Nature, 2021. **592**(7854): p. 438-443.
 18. Meng, B., et al., *Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity*. Nature, 2022. **603**(7902): p. 706-714.
 19. Liu, C., et al., *Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum*. Cell, 2021. **184**(16): p. 4220-4236.e13.
 20. Garcia-Beltran, W.F., et al., *mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant*. Cell, 2022. **185**(3): p. 457-466.e4.
 21. Muik, A., et al., *Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron by BNT162b2 mRNA vaccine-elicited human sera*. Science, 2022. **375**(6581): p. 678-680.
 22. Lauring, A.S., et al., *Clinical severity of, and effectiveness of mRNA vaccines against, covid-19 from omicron, delta, and alpha SARS-CoV-2 variants in the United States: prospective observational study*. Bmj, 2022. **376**: p. e069761.
 23. Keeton, R., et al., *T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron*. Nature, 2022. **603**(7901): p. 488-492.
 24. Liu, J., et al., *Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron*. Nature, 2022. **603**(7901): p. 493-496.
 25. Bergami, F., et al., *Performance of Whole Blood Stimulation Assays for the Quantification of SARS-CoV-2 Specific T-Cell Response: A Cross-Sectional Study*. Diagnostics, 2022. **12**(6): p. 1509.
 26. Barreiro, P., et al., *A Pilot Study for the Evaluation of an Interferon Gamma Release Assay (IGRA) To Measure T-Cell Immune Responses after SARS-CoV-2 Infection or Vaccination in a Unique Cloistered Cohort*. J Clin Microbiol, 2022. **60**(3): p. e0219921.
 27. Jaganathan, S., et al., *Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals*. Infect Dis Ther, 2021. **10**(4): p. 2765-2776.
 28. Bonnet, B., et al., *Decline of Humoral and Cellular Immune Responses Against SARS-CoV-2 6 Months After Full BNT162b2 Vaccination in Hospital Healthcare Workers*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 842912.
 29. Kurteva, E., et al., *Interferon-gamma release assays outcomes in healthy subjects following BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination*. Rheumatol Int, 2022. **42**(3): p. 449-456.

30. Huzly, D., et al., *Accuracy and real life performance of a novel interferon- γ release assay for the detection of SARS-CoV2 specific T cell response*. Journal of Clinical Virology, 2022. **148**: p. 105098.
31. Matsuyama, S., et al., *Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(13): p. 7001-7003.
32. National Institute of Infectious Diseases *COVID-19 serological examination manual*. 2020.
33. Higashimoto, Y., et al., *Correlation between anti-S IgG and neutralizing antibody titers against three live SARS-CoV-2 variants in BNT162b2 vaccine recipients*. Hum Vaccin Immunother, 2022: p. 2105611.
34. DiPiazza, A.T., B.S. Graham, and T.J. Ruckwardt, *T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021. **538**: p. 211-217.
35. Jordan, S.C., *Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses*. Clinical and Experimental Immunology, 2021. **204**(3): p. 310-320.
36. Duan, L., et al., *Follicular dendritic cells restrict interleukin-4 availability in germinal centers and foster memory B cell generation*. Immunity, 2021. **54**(10): p. 2256-2272.e6.
37. Nakayama, T., *An inflammatory response is essential for the development of adaptive immunity-immunogenicity and immunotoxicity*. Vaccine, 2016. **34**(47): p. 5815-5818.
38. Pollard, A.J. and E.M. Bijker, *A guide to vaccinology: from basic principles to new developments*. Nature Reviews Immunology, 2021. **21**(2): p. 83-100.
39. Bryant, C. and K.A. Fitzgerald, *Molecular mechanisms involved in inflammasome activation*. Trends in Cell Biology, 2009. **19**(9): p. 455-464.
40. Gómez, C.E., B. Perdiguero, and M. Esteban, *Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19*. Vaccines, 2021. **9**(3): p. 243.
41. Uwamino, Y., et al., *Dynamics of antibody titers and cellular immunity among Japanese healthcare workers during the 6 months after receiving two doses of BNT162b2 mRNA vaccine*. Vaccine, 2022. **40**(32): p. 4538-4543.
42. Chen, Z., et al., *Humoral and Cellular Immune Responses of COVID-19 vaccines against SARS-Cov-2 Omicron variant: a systemic review*. Int J Biol Sci, 2022. **18**(12): p. 4629-4641.
43. Desmecht, S., et al., *Kinetics and Persistence of the Cellular and Humoral Immune Responses to BNT162b2 mRNA Vaccine in SARS-CoV-2-Naive and -Experienced Subjects: Impact of Booster Dose and Breakthrough Infections*. Front Immunol, 2022. **13**:

- p. 863554.
44. Nakayama, T., et al., *Cytokine production in whole-blood cultures following immunization with an influenza vaccine*. Hum Vaccin Immunother, 2018. **14**(12): p. 2990-2998.
 45. Verbeke, R., et al., *Innate immune mechanisms of mRNA vaccines*. Immunity, 2022. **55**(11): p. 1993-2005.
 46. Kobiyama, K. and K.J. Ishii, *Making innate sense of mRNA vaccine adjuvanticity*. Nature Immunology, 2022. **23**(4): p. 474-476.
 47. Guo, L., et al., *SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study*. The Lancet Microbe, 2022. **3**(5): p. e348-e356.
 48. Nakayama, T., A. Sawada, and T. Ito, *Comparison of cytokine production in mice inoculated with messenger RNA vaccines BNT162b2 and mRNA-1273*. Microbiol Immunol, 2023. **67**(3): p. 120-128.
 49. Brueggeman, J.M., et al., *Trained Immunity: An Overview and the Impact on COVID-19*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 837524.
 50. Le Bert, N., et al., *Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection*. Journal of Experimental Medicine, 2021. **218**(5).

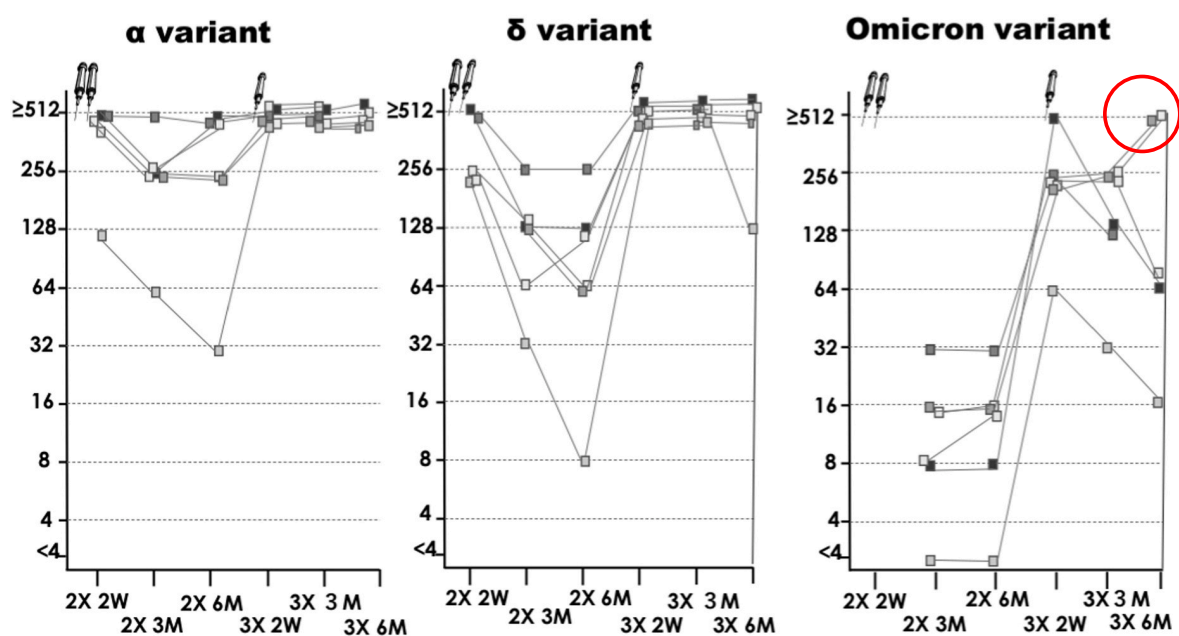


図1 mRNA-1273接種群（グループA）におけるアルファ、デルタ
およびオミクロン株に対する中和抗体価

赤丸で示す2名について、3回目6ヶ月後にオミクロン株に対する
中和抗体価が上昇、無症候性感染が疑われた

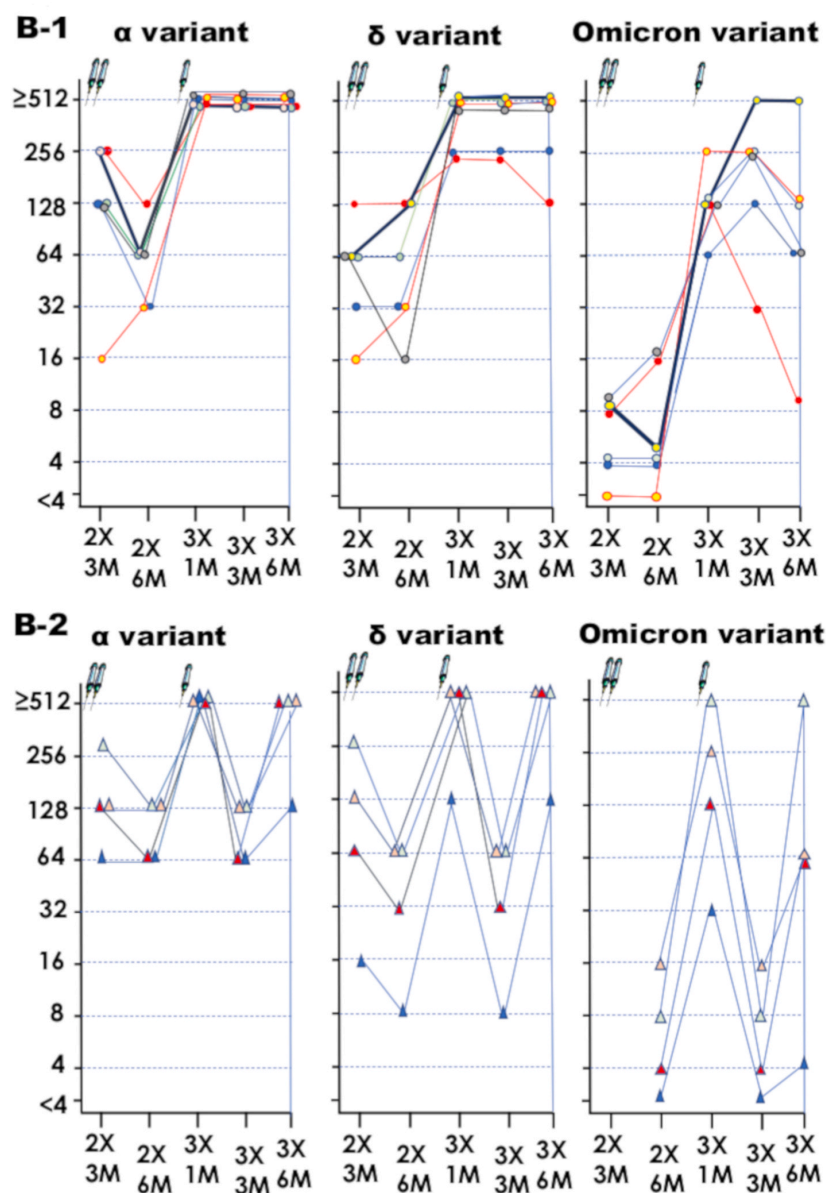


図2 BNT162b2接種群（グループB）におけるアルファ、デルタおよびオミクロン株に対する中和抗体価

上図：グループB-1 内科外来スタッフ6名

このうち1名は3回目接種1カ月後にCOVID-19を認めた（太い青線）

赤丸赤線で示した1名は非感染者と考えられた

下図：グループB-2 小児科医4名

3回目接種6カ月後の2週間前に院内でCOVID-19が発生した

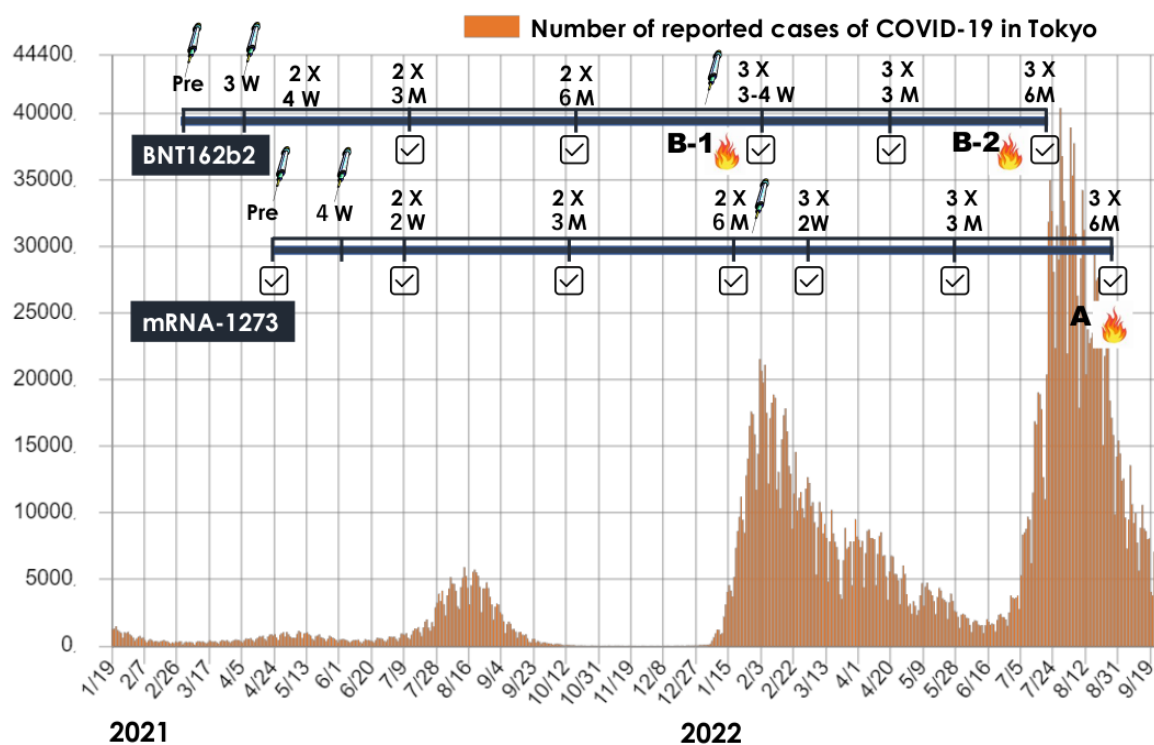


図3 東京都におけるCOVID-19サーベイランスデータと採血スケジュール

- : ワクチン接種
- ☒ : 採血
- : 無症候性感染疑い例発生

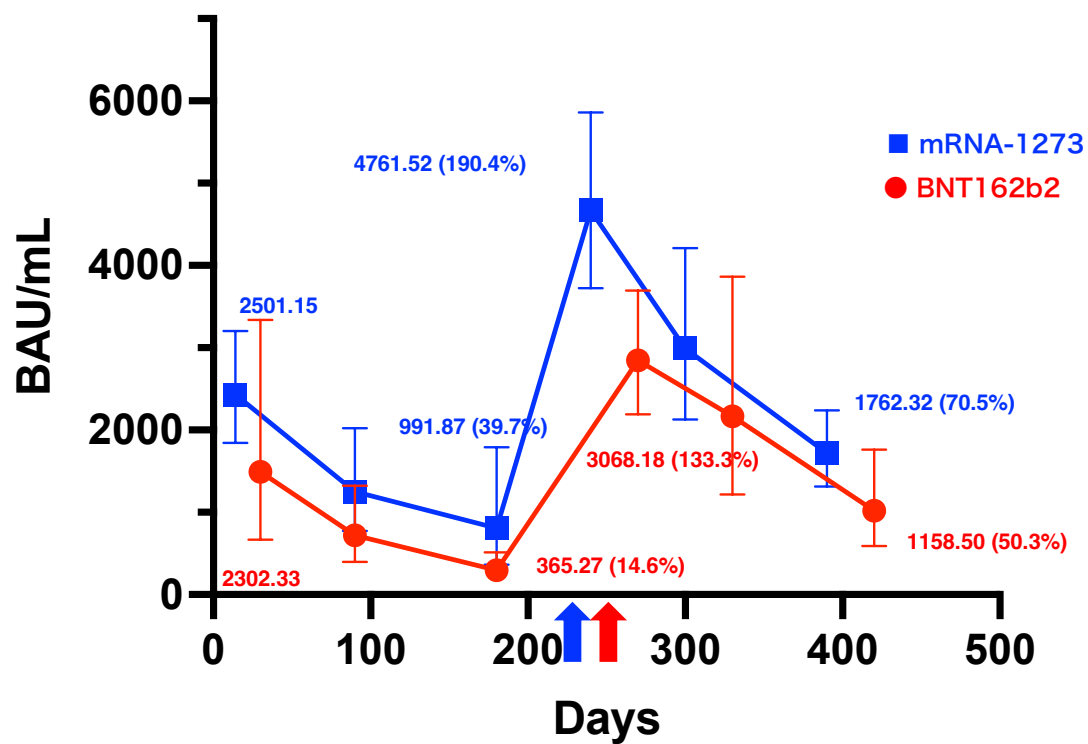


図4 mRNA-1273接種群（グループA）およびBNT162b2接種群（グループB）の血清中Sタンパク質に対するIgG量

矢印は3回目接種ポイントを示す

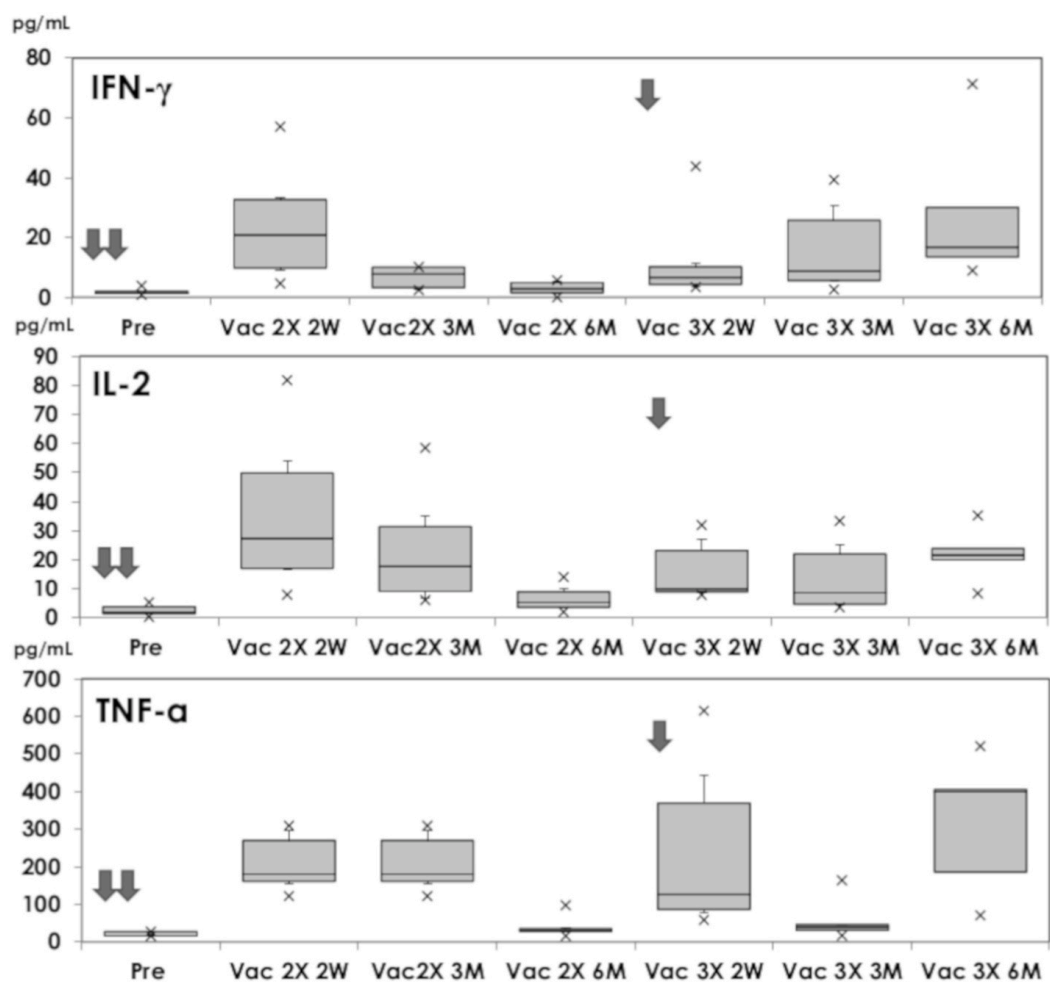


図5 mRNA-1273接種群（グループA）のTh1サイトカイン量（IFN- γ 、IL-2およびTNF- α ）

矢印はワクチン接種ポイントを示す

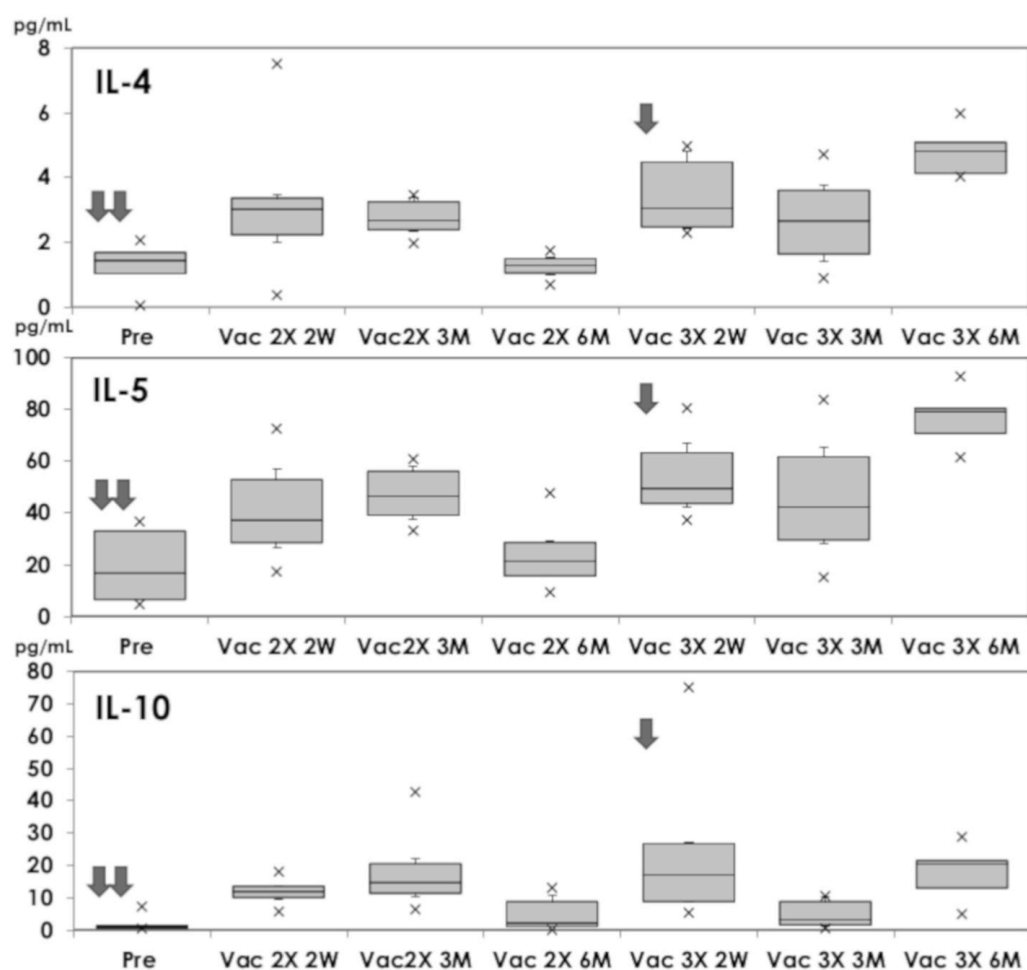


図6 mRNA-1273接種群（グループA）のTh2サイトカイン量（IL-4、IL-5およびIL-10）

矢印はワクチン接種ポイントを示す

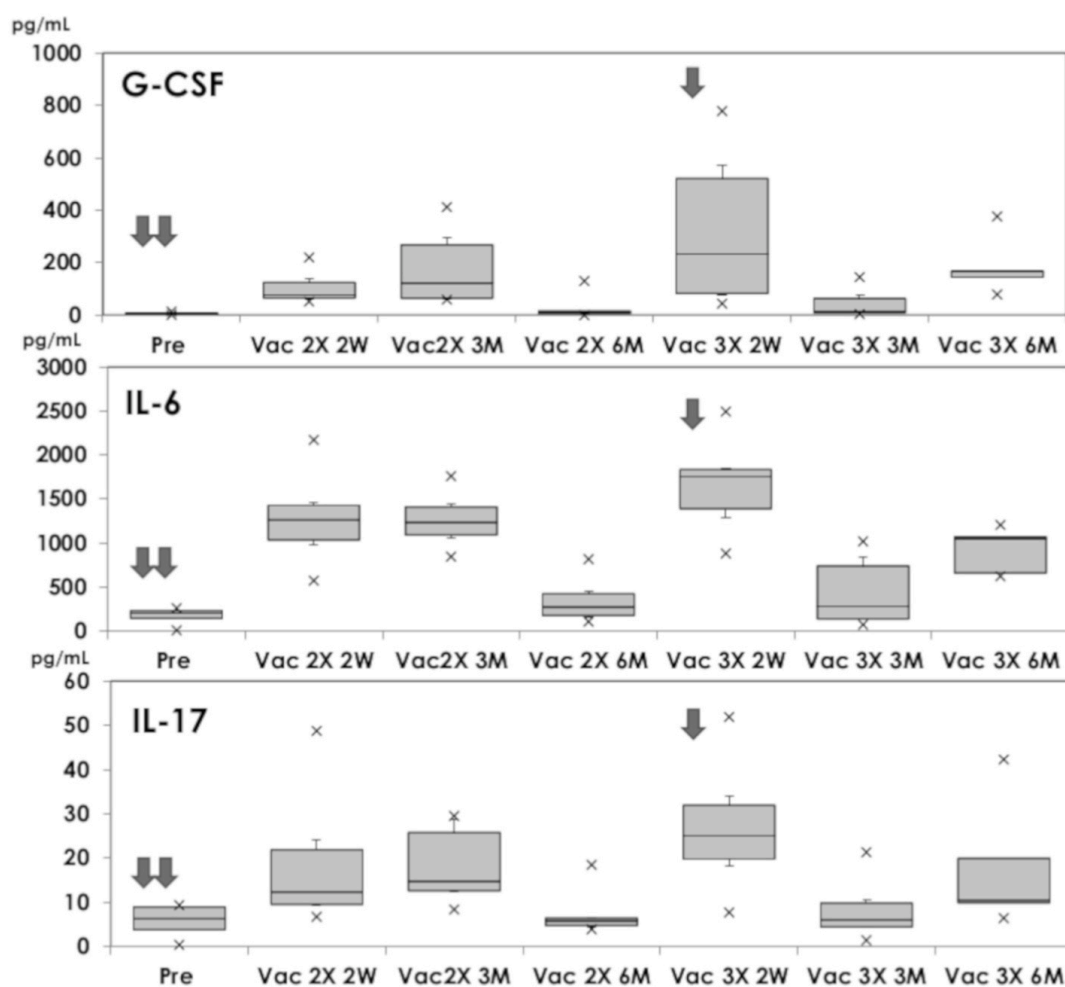


図7 mRNA-1273接種群（グループA）の炎症性サイトカイン量（G-CSF、IL-6およびIL-17）

矢印はワクチン接種ポイントを示す

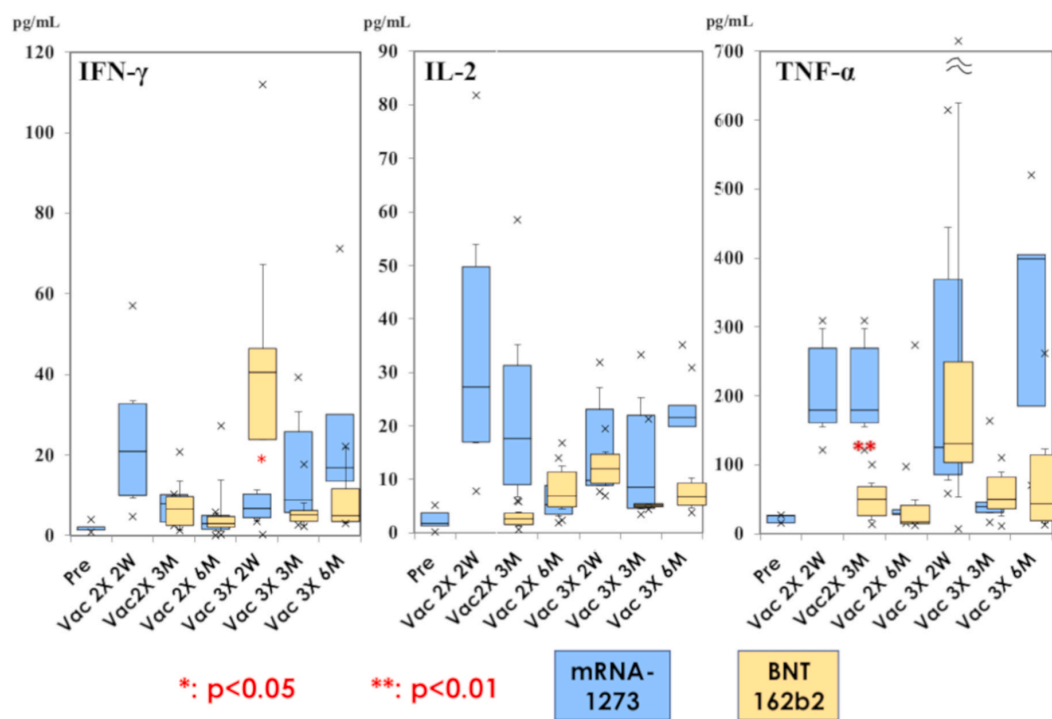


図8 mRNA-1273接種群（グループA）およびBNT162b2接種群（グループB）の血清中Th1サイトカイン量比較

中央値と上限、下限は5-95% * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

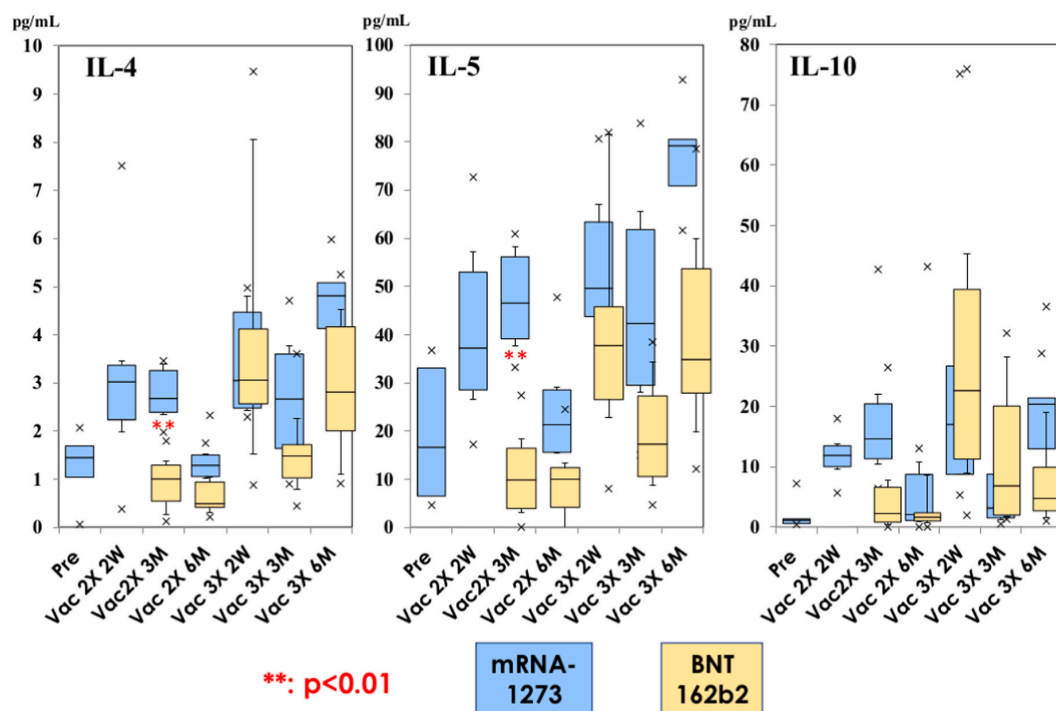


図9 mRNA-1273接種群（グループA）およびBNT162b2接種群（グループB）の血清中Th2サイトカイン量比較

中央値と上限、下限は5-95% **p<0.01

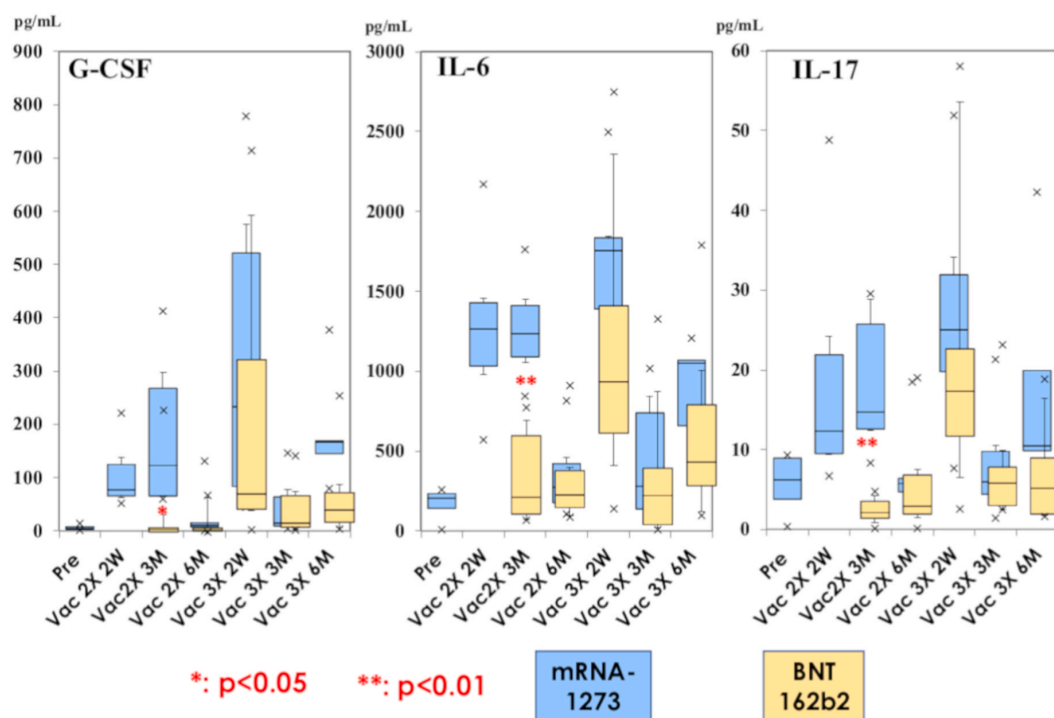


図10 mRNA-1273接種群（グループA）およびBNT162b2接種群（グループB）の血清中炎症性サイトカイン量比較

中央値と上限、下限は5-95% *p<0.05, **p<0.01

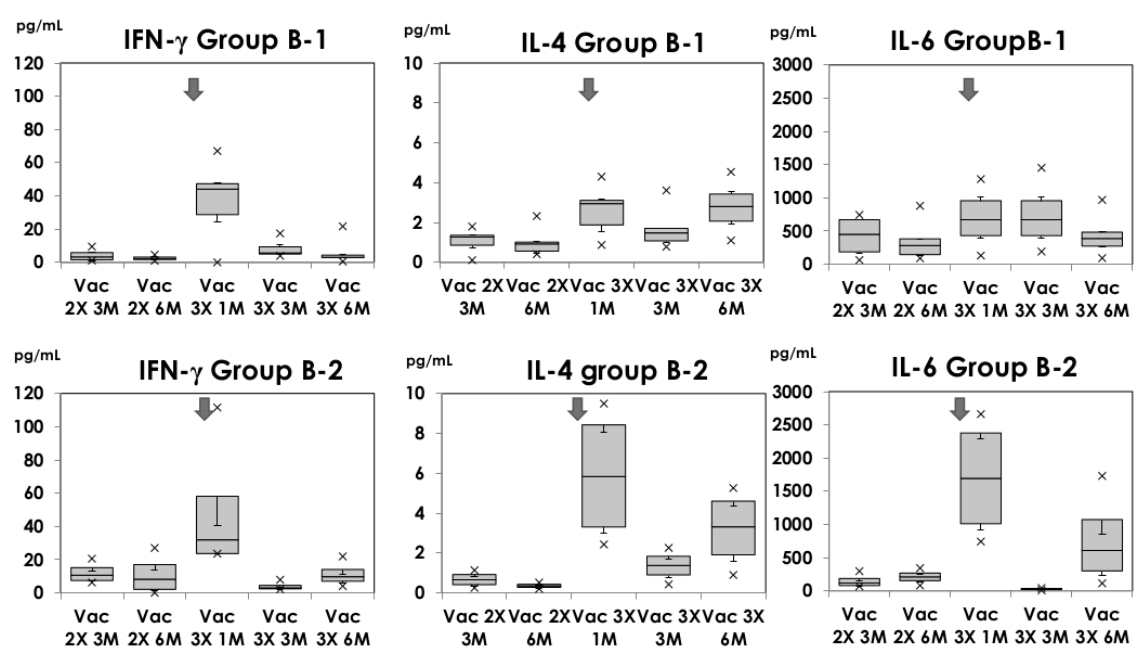


図11 BNT162β2接種群（B-1およびB-2）における免疫後血清中IFN-γ、IL-4およびIL-6量の比較

矢印は3回目接種ポイントを示す

総合考察

第一章から第三章に分けてウイルスの感染制御に関わる研究について述べた。第一章では、クライオ電子顕微鏡を用いたノロウイルスの構造解析をおこない、キャプシドタンパク質で粒子が形成されている非エンベロープウイルスが、環境に応じて表面構造を柔軟かつ可逆的に変形させることで、その感染性を変化させていることを初めて報告した。ノロウイルスの P 領域が上昇型のコンフォメーションを取る意義については推測の域を出ないが、本研究によって、P 領域の構造が感染性に関与することが明らかとなったことから、P 領域の構造変化を阻害するような化合物の探索、抗体の作製が新たな抗ウイルス薬開発につながる可能性がある。

第二章では、ラクダ科動物の持つ重鎖抗体の可変領域である VHH について、SARS-CoV-2 に特異的に結合かつ中和可能なクローンの作出に成功した。今回作製された VHH は、経鼻投与でウイルス増殖を抑制したことから新たな新型コロナウイルス感染症治療薬候補の可能性を示した。一方で、VHH はラクダ科動物由来 HCAb の可変領域であることから、ヒトの体内には本来存在しないタンパク質である。そのためヒトに投与した場合、ラクダ科由来である VHH に対する抗体が誘導され副反応となる懸念がある。そのため抗原と直接結合し、特異性を決定している相補性決定領域（CDR: complementarity determining region、VHH には 3 つ存在する）以外の配列をヒト由来の配列に置き換えることでヒト化し、ヒトに対する抗原性を低減する工夫が必要である。今後は実用化に向け、ヒトに対する抗原性を可能な限りなくす方法の研究や、各変異株に対してより高い中和活性を持つ VHH の選別、多価化、多量体化などの改良と工夫を重ねていくことが重要である。

第三章では、2 種類の mRNA ワクチン接種後の宿主側免疫後応答を解析し、ワクチンの評価を行った。BNT162b2 と mRNA-1273 接種した成人の一次およびブースター免疫後の血清を用いて、SARS-CoV-2 各変異株に対する中和抗体価および SARS-CoV-2 スパイク抗原で刺激した全血培養におけるサイトカイン産生量について解析をおこない、どちらのワクチンを接種した場合にもブースター免疫の高い効果が認められた。mRNA ワクチンは mRNA が臨床において初めて利用された新しいモダリティワクチンである。そのため、これまで用いられてきた歴史の長い既存のワクチンとは異なり、長期の安全性を評価した積み上げたデータは存在しない。今後どのような事象が発生するか、継続的な安全性の検証は必須である。今回、2 つの mRNA ワクチンによって効果的に細胞性免疫応答および液性免疫応答の誘導が認められた。今後出現する変異株や新たなウイルス感染症に対しても、それら病原体の持つ mRNA をワクチンの成分とすることで対応が可能であり、新たな感染拡大防止に大きく貢献できるモダリティワクチンであるといえる。

ウイルスの特性は、構造解析や宿主への感染様式、細胞内複製機構の解明といった基礎研究によって明らかとなる。その情報をもとに宿主細胞への結合や細胞内での複製を阻害する抗ウイルス薬や、構造を破壊しウイルス自体を直接不活化する消毒剤の開発が行われ

ている。また宿主側の免疫応答を誘導し、安全かつ効果的なワクチンの開発も世界中で日々進行中である。このようにウイルス学だけでなく、異分野を含めた多分野融合研究によって病原体であるウイルスにアプローチすることが、最終的にウイルス感染症の制圧につながると考えている。

謝辞

本研究にあたり、終始変わらぬご指導をいただきました北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学の片山和彦教授に心より感謝いたします。

また、本研究の遂行ならびに論文の執筆にあたり、自然科学研究機構生理学研究所の宋致弘博士、花王株式会社の松村佑太博士、北里大学大村智記念研究所ウイルス感染制御学の中山哲夫名誉教授、同所属の芳賀慧講師には多大なるご指導・ご協力をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

構造解析におきましては、自然科学研究機構生理学研究所生体分子構造研究部門の村田和義特任教授にも多大なるご指導・ご助言を賜りましたことを深謝いたします。

日々の研究活動をおこなうにあたり、ご指導ならびにご助言をいただきました北里大学大村智記念研究所の森川裕子名誉教授ならびに同研究所ウイルス感染制御学の皆様にも厚く御礼申し上げます。