

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05276

研究課題名(和文) マラリア流行ホットスポットのサーベイランス技術の開発

研究課題名(英文) Development of a malaria hot-spot surveillance system

研究代表者

坪井 敬文 (Tsuboi, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近の対策の強化により世界的なマラリア死亡者数は減少傾向に転じた。そこで、アジア太平洋地域の流行国においては、マラリアエリミネーションを目指した施策が検討されている。本研究では、三日熱マラリア原虫の赤血球期タンパク質を網羅する307種類の組換えタンパク質からなるプロテインアレイを合成し、三日熱マラリア患者治療後の抗体価の推移を、タイ・ブラジル・パプアニューギニアの計96名の流行地住民で9ヶ月間追跡した。その結果、ホットスポットのサーベイランスに利用できる55種類の原虫抗原タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have recently identified and validated a panel of serological markers able to detect recent exposure to *P. vivax* infection, thereby indirectly identifying malaria hot-spots. We screened 307 *P. vivax* proteins for their ability to induce IgG responses in *P. vivax*-exposed individuals in Thailand, Brazil, and Papua New Guinea. Kinetic profiles of these responses over 9-months in the absence of any recurrent infections. Candidate markers were down-selected based on high immunogenicity at the time of infection, comparable antibody longevity between the three sites and low levels of individual variation in IgG responses. Finally, 55 down-selected proteins are the sero-marker candidates for the malaria hot-spot surveillance.

研究分野：寄生虫学

キーワード：原虫 マラリア サーベイランス プロテインアレイ タイ

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、熱帯・亜熱帯地域において毎年2億人余りが罹患し、約50万人が死に至る感染症であるが、ここ数年来世界的にマラリア死亡者数が減少傾向に転じた(WHO:World Malaria Report 2013:以下WMR2013)。特にアジア地域においては、その傾向が顕著であり、タイを含む52カ国においてはマラリアエリミネーションを目指した目標が設定された(WMR2013)。しかし、このような国々においても、局地的かつ季節的な流行は持続しており、これらマラリア流行ホットスポットが、マラリア流行再拡大の火種となっている。そこで、マラリア流行ホットスポットを同定しその地域に重点的に対策を講ずることが、マラリアエリミネーションへの効率的アプローチとされた(Alonsoら:PLoS Med. 2011)。また、マラリアエリミネーションを目指す上では、死亡の最大原因である熱帯熱マラリアのみならず、患者数がそれと同等で、再発のため完治が困難な三日熱マラリアも視野に入れた対策が必須である(WMR2013)。

そのためには、マラリア感染者が存在するホットスポットを効率的に把握することの出来るサーベイランス技術の確立が必要である。現在流行地の診療所では、顕微鏡や迅速診断キットで診断するが、マラリア流行ホットスポットの探索に重要な低レベルの感染者の発見は困難である。また、PCR診断は高感度だが一般的でない。また、上記いずれの方法でも、蚊への感染源となった最近の感染既往者の発見は不可能である。そこで、現在だけでなく感染の既往も同時に検出できる方法として、マラリア原虫抗原に対する抗体測定がホットスポットの探索に用いられた。しかし、これまでに用いられた抗原はMSP1等のマラリアワクチン抗原のみであり、これらに対する抗体価は、治癒後も長期にわたって高く維持されることから、最近の流行の指標とはならず(Cookら:Malar J. 2010)、マラリア流行ホットスポットのサーベイランスには使えないことが判明した。そこで、季節的流行も検出可能な抗原、すなわち感染後早期に抗体が誘導されるが、9ヶ月後には抗体が検出されなくなるような、ホットスポットのサーベイランスに適した抗原の探索が急務となっている。

2. 研究の目的

本研究では、三日熱マラリアが流行しているタイにおいて三日熱マラリア患者の追跡研究を実施し、マラリア流行ホットスポットの検出に必須な三日熱マラリアサーベイランス用抗原タンパク質をシステムティックに探索することを目的に実施した。

3. 研究の方法

(1) 三日熱マラリアタンパク質ライブラリの構築

三日熱マラリア赤血球期原虫に発現するタ

ンパク質を網羅する307種類のタンパク質をコムギ無細胞法で発現した。

(2) タイ、ブラジル、パプアニューギニアにおける三日熱マラリア患者追跡研究

解析の精度を上げるため、タイの32名に加えて、ブラジル、パプアニューギニアにおいてそれぞれ、36名、31名の三日熱マラリア患者をプリマキンを用いて根治し、治療後9ヶ月まで3ヶ月おきに血清を採取した。この間、再感染がないことは確認している。

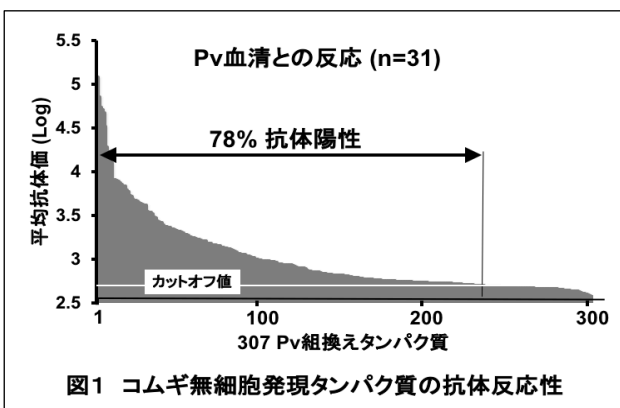
(3) 抗体価の測定

307種類のタンパク質に対して、350検体以上の血清中の抗体価を測定するため、ハイスループットなアルファスクリーンシステムを用いた。

4. 研究成果

(1) 三日熱マラリアプロテインアレイの抗原性

血清試料との反応性を検証した結果、78%のタンパク質が患者抗体と反応した(図1)。この結果は、コムギ無細胞法で合成した三日熱マラリア原虫組換えタンパク質のフォールディングが、原虫のそれと近いことを意味しており、このプロテインアレイの品質が担保されたと考えられる。



(2) 抗体価の減衰パターン

これらの抗原抗体反応性をもとにフォローアップ血清試料中の抗体価の半減期を解析したところ、半減期が測定可能な抗原が、55種類同定された。短いもので、1ヶ月、長いもので10ヶ月となっており、抗体価の半減期は抗原によって規定されていることが判明した。

しかし、これらの半減期は、地域差は認められず(図2)、同じ抗原がユニバーサルに使用可能であることが示唆された。このことは、今後のマラリアホットスポットサーベイランス技術開発に朗報であった。

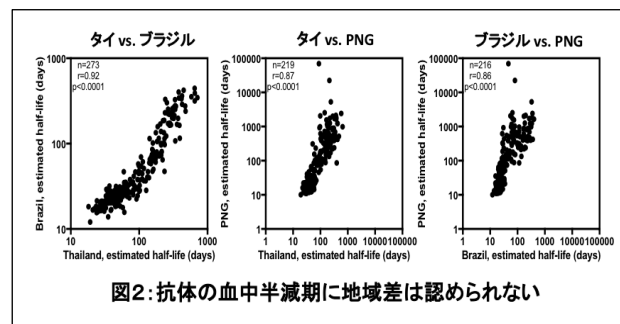


図2: 抗体の血中半減期に地域差は認められない

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 35 件)

- (1) Miura T, Takeo S, Ntege EH, Otsuki H, Sawasaki T, Ishino T, Takashima E, Tsuboi T. The malaria parasite RhopH protein complex interacts with erythrocyte calmyrin identified from a comprehensive erythrocyte protein library. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 500(2):261-267. 査読有
- (2) Tachibana M, Ishino T, Takashima E, Tsuboi T, Torii M. A male gametocyte osmiophilic body and microgamete surface protein of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* (PyMiGS) plays a critical role in male osmiophilic body formation and exflagellation. *Cell Microbiol*. 2018, e12821. 査読有
- (3) Morita M, Nagaoka H, Ntege EH, Kanoi BN, Ito D, Nakata T, Lee J-W, Tokunaga K, Iimura T, Torii M, Tsuboi T, Takashima E. PV1, a novel *Plasmodium falciparum* merozoite dense granule protein, interacts with exported protein in infected erythrocytes. *Sci Rep*. 2018, 8(1):3696. 査読有
- (4) Sakamoto H, Takeo S, Takashima E, Miura K, Kanoi BN, Ishino T, Tsuboi T (他 6 名, 13 番目). Identification of target proteins of clinical immunity to *Plasmodium falciparum* in a region of low malaria transmission. *Parasitol Int*. 2018, 67(2):203-208. 査読有
- (5) Saito F, Hirayasu K, Takashima E, Tsuboi T (他 14 名, 12 番目), Arase H. Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature*. 2017, 552(7683):101-105. 査読有
- (6) França CT, Takashima E, Tsuboi T (他 21 名, 19 番目), Mueller I. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *eLife*. 2017, 6: e28673. 査読有
- (7) Longley RJ, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Sattabongkot J, Tsuboi T (他 9 名 15 番目), Mueller I. Naturally acquired antibody responses to more than 300 *Plasmodium vivax* proteins in three geographic regions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017, 11: e0005888. 査読有
- (8) Ntege EH, Takashima E, Morita M, Nagaoka H, Ishino T, Tsuboi T. Blood-stage malaria vaccines: Post-genome strategies to the identification of novel vaccine candidates. *Expert Rev Vaccines*. 2017, 16:769-779. 査読有
- (9) Morita M, Takashima E, Ito D, Miura K, Thongkukiatkul A, Diouf A, Fairhurst RM, Diakite M, Long CA, Torii M, Tsuboi T. Immunoscreening of *Plasmodium falciparum* proteins expressed in a wheat germ cell-free system reveals a novel malaria vaccine candidate. *Sci Rep*. 2017, 7:46086. 査読有
- (10) Ataide R, Takashima E, Tsuboi T (他 17 名, 9 番目), Beeson JG, Nosten F, Simpson JA, White NJ, Fowkes FJI. Host immunity and the assessment of emerging artemisinin resistance in malaria: a multinational cohort study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017, 114:3515-3520. 査読有
- (11) Kanoi BN, Takashima E, Morita M, Horii T, Tsuboi T (他 6 名, 11 番目). Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized *Plasmodium falciparum* proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. *Vaccine*. 2017, 35:873-881. 査読有
- (12) Bargieri DY, Tsuboi T (他 18 名, 12 番目). *Plasmodium* MTRAP is essential for vacuole membrane disruption and host cell egress by malaria gametes. *Cell Host Microbe*. 2016, 20:618-630. 査読有
- (13) Ntege EH, Arisue N, Ito D, Hasegawa T, Palacpac NMQ, Egwang TG, Horii T, Takashima E, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 5-interacting protein, PfRipr, as a highly conserved blood-stage malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2016, 34:5612-5622. 査読有
- (14) Cheng Y, Ito D, Takashima E, Sattabongkot J, Miller LH, Tsuboi T (他 12 名, 18 番目), Han ET. *Plasmodium vivax* GPI-anchored micronemal antigen (PvGAMA) binds human erythrocytes independent of Duffy antigen status. *Sci Rep*. 2016, 6:35581. 査読有
- (15) Weaver R, Reiling L, Mueller I, Tsuboi T (他 4 名, 7 番目), Fowkes FJI, Beeson JG. The association between naturally acquired IgG subclass specific antibodies to the PFRH5 invasion complex and protection from *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Rep*. 2016, 6:33094. 査読有
- (16) McLean ARD, Tsuboi T (他 7 名, 6 番目), Fowkes FJI. Antibody responses to

- Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* blood-stage and sporozoite antigens in the postpartum period. *Sci Rep.* 2016, 6:32159. 査読有
- (17) Charnaud, SC, Tsuboi T(他 14 名, 10 番目). Maternal-foetal transfer of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antibodies in a low transmission setting. *Sci Rep.* 2016, 6:20859. 査読有
- (18) Takashima E, Morita M, Tsuboi T. Vaccine candidates for malaria: what's new? *Expert Rev Vaccines.* 2016, 15(1):1-3. 査読有
- (19) Tsuboi T, Takashima E. Antibody titre as a surrogate of protection of the first malaria subunit vaccine, RTS,S/AS01. *Lancet Infect Dis.* 2015, 15:1371-2. 査読無
- (20) Aguiar JC, Iriko H, Han ET, Tsuboi T(他 12 名, 12 番目), Richie TL. Discovery of novel *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic antigens for vaccine development. *PLoS One.* 2015, 10:e0136109. 査読有

[学会発表] (計 109 件)

- (1) (招待講演) 坪井敬文、ポストゲノムのマラリアワクチン研究。第 30 回日本動物細胞工学会 2017 年度大会、(2017. 7. 20-21, 松山市)
- (2) (招待講演) Tsuboi T. Post-genome malaria vaccine research. Japan-Brazil Malaria Research Workshop: fostering new partnerships (2017. 3. 15-17, São Paulo, Brazil)
- (3) (招待講演) Tsuboi T, Takashima E, Morita M, Ntege EH, Nagaoka H. Post-genome malaria vaccine candidate discovery by wheat germ cell-free system. Joint International Tropical Medicine Meeting 2016 (2016. 12. 7-9, Bangkok, Thailand)
- (4) (招待講演) 坪井敬文、高島英造、森田将之。ポストゲノム生化学研究：マラリアワクチン研究の突破口。第 89 回日本生化学会大会 (2016. 9. 25-27, 仙台市)
- (5) (招待講演) 坪井敬文。ポストゲノムマラリアワクチン研究は宿主寄生体関係の総体的理解につながる。第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会 (2015. 12. 1-4, 神戸市)
- (6) (招待講演) Tsuboi T. WGCFS: an innovative technology for post-genome malaria vaccine research. 25th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium (2015. 4. 28-29, Athens, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/malaria/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

(2) 研究分担者

高島 英造 (TAKASHIMA, Eizo)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：50366762

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

SATTABONGKOT, Jetsumon

マヒドン大学・熱帯医学部・教授