

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15121

研究課題名（和文）ハマダラカ唾液成分ワクチンによるマラリア感染防御効果および吸血行動の解析

研究課題名（英文）Anopheline anti-platelet protein, AAPP, regulates probing time and blood feeding success in the malaria vector mosquito, Anopheles stephensi

研究代表者

吉田 栄人 (Yoshida, Shigeto)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：感染地域住民には、吸血だけではマラリア感染防御あるいは吸血行動阻害をもたらすような強い宿主免疫応答は誘導されていない。この理由として、(1)唾液に含まれる様々なアレルゲンによって宿主免疫応答は攪乱・脆弱化を強いられ、さらに(2)機能性唾液タンパクの活性部位は宿主免疫応答を巧妙に回避するようにマスクされているため、無関係な部位にのみ抗体は産生されると考えている（仮説）。前述の仮説に立ち、独自に発見した唾液タンパクをワクチン抗原分子としてアレルギー反応や“デコイ”障害を乗り越える全く新しいコンセプトのマラリアワクチン開発に挑戦する。

研究成果の概要（英文）：People living in a malaria endemic area cannot induce either protective immunity against malaria infection or inhibitory immunity against mosquito behavior following mosquito blood feeding. We hypothesize that (1) allergens containing saliva components disrupt and/or weaken host immune system, (2) functional domains of saliva proteins are hidden from host immune attack, resulting in induction of antibodies to non-functional domains of those proteins. We aim to develop a new concept malaria vaccine based on the hypothesis. The vaccine consisting of mosquito saliva proteins will overcome those allergy and decoy.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア ハマダラカ 唾液タンパク質 ワクチン

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 吸血昆虫の唾液には病原体の伝播・感染を促進する物質が含まれている。

リーシュマニア症はリーシュマニア原虫を唾液腺に保有しているサシチョウバエによる吸血で感染するが、唾液腺から抽出した原虫では著しく感染率が低下する(Belkaid et al., J Exp Med 1998)。興味あることに、感染地域では頻回吸血を受けていることによりリーシュマニア感染抵抗性を獲得している住民がいる。ライム病はボレリアを唾液腺に保有しているマダニに刺咬されると感染するが、非保有マダニにあらかじめ頻回刺咬されていると感染率は減少する(Wikel et al., Infect Immun 1997)。一方、イエカの唾液には宿主の免疫を攪乱する物質が含まれており、これにより西ナイル熱ウイルスの感染が促進される(Styer et al., J Virol 2011)。吸血昆虫の唾液には病原体の感染を促進する重要な物質が含まれているが、この唾液物質に対する宿主の免疫応答が時には病原体の感染を阻止したり、助長したりを示している。

(2) 吸血昆虫の唾液タンパクをワクチンとする。

マダニの唾液タンパク L2 を接種したモルモットはダニ吸血に対する抵抗性を獲得し、ダニは死ぬ(Kotsyfakis et al., J Immuno 2008)。サシチョウバエの唾液タンパク SP15 を接種したマウスはサシチョウバエ吸血に対しては抵抗性を示さないが、リーシュマニア原虫に対する感染を防御する(Valenzuela et al., J Exp Med 2001)。これらの報告は、吸血昆虫媒介性の感染症に対して吸血昆虫唾液タンパクをワクチン成分とするワクチン開発戦略を提案している。

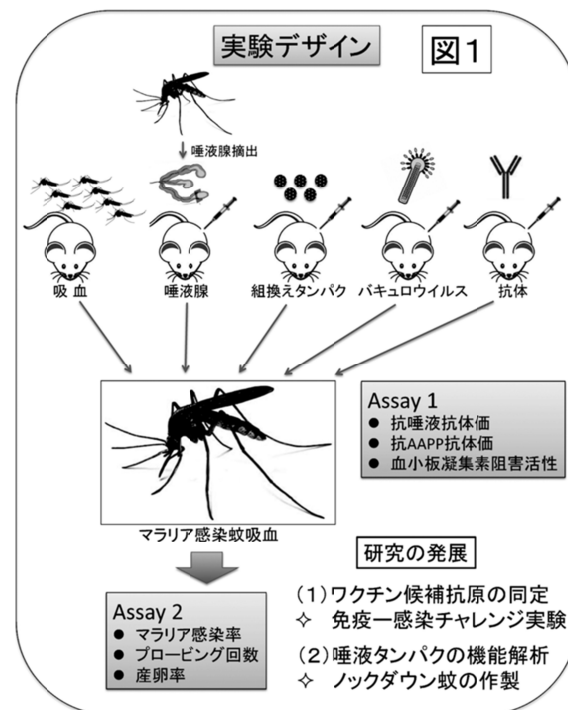
### 2. 研究の目的

「ハマダラカ唾液に対する宿主免疫応答がハマダラカの吸血行動およびマラリア感染を制御する」との仮説に立ち、動物モデルにおいてそれを検証し、ハマダラカ唾液タンパクをワクチン成分とする新たなマラリアワクチン開発戦略を提案する。具体的には、組換え唾液タンパクを免疫後、マラリア感染蚊の吸血チャレンジ感染を実施し、感染防御効果および吸血行動を評価する。

### 3. 研究の方法

マウスを用いた実験モデルを構築する(図1)。吸血あるいは唾液腺ホモジネート、組換え唾液タンパク、バキュロウイルス粒子ワクチン等の能動免疫、抗唾液タンパクモノクローナル抗体の受動免疫を行った後、マラリア感染蚊の吸血チャレンジ感染を実施する。解析は、血清の抗 AAPP 抗体価および血小板凝集阻害活性の測定 (Assay 1) と マラリア感染率、プロービング回数、産卵数を指標に唾液成分に対する宿主免疫応答が与えるマラリア感染およびハマダラカ吸血行動に対する

影響の解析 (Assay 2) よりなる。



### 4. 研究成果

ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) 50 匹を 1 週おきに計 20 回マウスに吸血させ、尾静脈から部分採血して、AAPP に対する抗体価を測定したところ 31 匹中 1 匹に AAPP に対する抗体価の上昇が確認された。

唾液腺ホモジネートをマウスに 4 回能動免疫し、ネズミマラリア原虫のスポロゾイトのチャレンジ感染を行った。コントロール群ではいずれのマウスもマラリアに感染したが、唾液腺免疫群では 5 匹中 3 匹が完全感染防御し感染したマウスも原虫血症が抑制された(図2)。

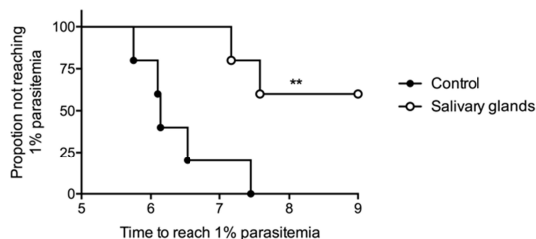


図2. 唾液腺免疫マウスのスポロゾイトに対する感染防御効果

AAPP による血小板凝集阻害機序はコラーゲンへの結合による競合阻害である。そこで、唾液腺ホモジネートを免疫したマウスを全採血し、抗 AAPP 抗体のコラーゲン相互作用に及ぼす影響を調査した。免疫した 3 匹のマウスにおいて、それぞれ値の異なる抗 AAPP 抗体価が観察された(図3A)。欠失変異体を用いた ELISA の結果、いずれのマウスにおいても抗 AAPP 抗体はコラーゲン結合部位と同一である C 末端側の exon3-4 領域に生じ

ていた(図3B)。抗体存在下における AAPP-コラーゲン相互作用の解析を行った。AAPP 全長のコラーゲン結合能は抗体の濃度依存的に阻害された(図3C)。活性中心である AAPP exon3-4 領域のコラーゲン結合能も抗体の濃度依存的に阻害された(図3D)。

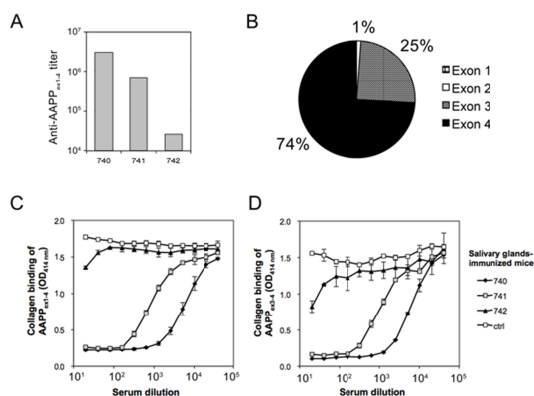


図3. 唾液腺免疫マウス由来抗体の機能解析

大腸菌を用いて精製したリコンビナント AAPP exon3-4 領域をマウスに3回能動免疫し、ネズミマラリア原虫のスポロゾイトのチャレンジ感染を行った。いずれのマウスもマラリアに感染したが、AAPP 免疫群はコントロール群より感染が20時間遅延し、有意な感染抑制効果が確認された(図4)。

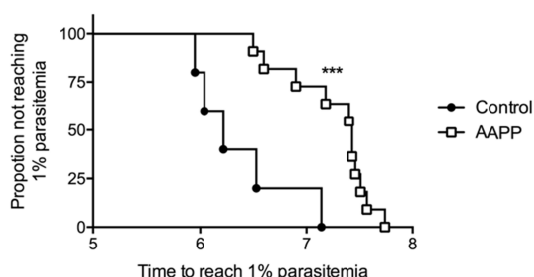


図3. AAPP免疫マウスのスポロゾイトに対する感染防御効果

Assay 1 における研究成果から、ハマダラカ唾液成分に対する宿主免疫応答はマラリア感染を抑制するという可能性が見出された。その機序として抗 AAPP 抗体による AAPP-コラーゲン相互作用が重要だと考えられた。ハマダラカ吸血行動の解析を目的とする Assay 2 に関しては平成 27 年 5 月現在研究続行中である。

## 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 1 件)

Mizutani, M., Fukumoto, S., Soubeiga, A.P., Soga, A., Iyori, M., Yoshida, S. Development of a *Plasmodium berghei*

transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. *Malar J* 2016, 15, 251. (査読有り)

[学会発表](計 8 件)

Kunitaka Yoshida, Mitsuhiro Iyori, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Shigeto Yoshida. *Plasmodium falciparum* CSP vaccine based on a heterologous adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen confers sterile protection against transgenic *P. berghei* sporozoite challenge, The U.S. Japan Cooperative Medical Sciences Program Presents the 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID), 2017年2月7日, Seoul (韓国)

伊従光洋. 超高齢社会に求められる新しいコンセプトの抗血小板薬の開発研究, 日本薬学会北陸支部第 128 回例会, 2016 年 11 月 27 日, 北陸大学(石川)

Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Sota Ogata, Hidesato Nishiura, Miako Sakaguchi, Masanori Mizutani, Takahiko Tamura, Kento Genshi, Satoshi Shimada, Daisuke S. Yamamoto, Hiroyuki Matsuoka and Shigeto Yoshida. Vectored PfCSP Vaccines based on Baculovirus Dual Expression System and AdHu5 induce Strong Protective Efficacy against Transgenic *Plasmodium berghei*, 65th ASTMH 2016年11月13日, Atlanta(US)

Kunitaka Yoshida, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Shigeto Yoshida. Enhanced protective efficacy of a *P. falciparum* malaria vaccine using a heterologous prime-boost immunization with a baculoviral vaccine and ChAd63 expressing PfCSP against challenge with a transgenic *P. berghei* sporozoites, 65th ASTMH, 2016 年 11 月 13 日, Atlanta (US)

Kunitaka Yoshida, Mitsuhiro Iyori, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Shigeto Yoshida. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen, 第 57 回日本熱帯医学会大会, 2016 年 11 月 5 日, 一橋大学(東京)

吉田邦嵩, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal,

Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, 所正治, 伊従光洋, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, 吉田栄人. アデノウイルスベクターとバキュロウイルスベクターを用いた新規ワクチンプラットフォームによる熱帯熱マラリアワクチンの開発, 第 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2016 年 10 月 16 日, 岐阜大学 (岐阜)

Kunitaka Yoshida, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Shigeto Yoshida. A hybrid Plasmodium falciparum malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen, 第 14 回松山国際学術シンポジウム, 2016 年 9 月 15 日, 愛媛大学 (愛媛)

伊従光洋, 吉田栄人. 蚊唾液タンパクの能動免疫によるネズミマラリア原虫に対する感染防御効果, 第 68 回日本衛生動物学会, 2016 年 4 月 16 日, 栃木県総合文化センター (栃木)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 栄人 (YOSHIDA SHIGETO)  
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授  
研究者番号 : 10296121

### (2) 研究分担者

都野 展子 (TUNO NOBUKO)  
金沢大学・自然システム系・准教授

研究者番号 : 60295102

### (2) 研究分担者

伊従 光洋 (IYORI MITSUHIRO)  
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授  
研究者番号 : 20608351