

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19566

研究課題名（和文）抗原性強化弱毒サルマラリア生ワクチン開発に向けた研究

研究課題名（英文）Development of a live attenuated monkey malaria vaccine with enhanced antigenicity

研究代表者

金子 修（KANEKO, Osamu）

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：東南アジアで流行し、従来のヒトマラリア対策手法でのコントロールが困難な人獣共通感染性マラリアを起こす二日熱マラリア原虫に対して、ヒト用の赤血球期生ワクチンの創出を目指し、抗原性強化技術と赤血球侵入能力の制御技術の確立を試みた。抗原性強化のために、感染赤血球表面抗原の発現を抑制すると考えられるSETVsの遺伝子座破壊を種々の方法で試みたが、期間内に改変原虫を得ることはできなかった。一方、ヒト赤血球認識分子を導入することで、ヒト赤血球への侵入能力が増強した二日熱マラリア原虫の作製に成功し、赤血球侵入能力の制御技術の開発に進展を見た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、二日熱マラリア原虫の赤血球期生ワクチン創出のための技術基盤の一部が整った。また、ヨーロッパなどでは、サル赤血球の入手が困難なため、1年もの年月をかけてヒト赤血球を用いた培養に適應させた二日熱マラリア原虫株が研究に用いられているが、簡便にヒト赤血球で培養ができる株は一株のみである。本研究で開発した技術を応用することで、様々な二日熱マラリア原虫株を、簡便にヒト赤血球を用いた培養に適應させることができるため、高い波及効果を持つと考える。

研究成果の概要（英文）：Monkey malaria parasite *Plasmodium knowlesi* causes zoonotic human malaria in the natural environment in Southeast Asia. Because classical methods to control human malaria cannot efficiently control this zoonosis, we believe that vaccine is crucial to combat *P. knowlesi*. In this study, we aimed to establish methods to control the parasite ability to invade erythrocytes and to increase the parasite antigenicity, which would be used to develop a live attenuated erythrocyte stage *P. knowlesi* malaria vaccine for human usage. To increase the antigenicity, we tried to disrupt SETVs gene locus, which would result to express all repertoires of antigens on the erythrocyte surface, whose expression was otherwise suppressed. However, we could not obtain transgenic parasites so far. On the other hand, we were able to obtain transgenic *P. knowlesi* whose ability to invade human erythrocytes was increased by introducing a *Plasmodium falciparum* ligand recognizing mature human erythrocytes.

研究分野：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア 赤血球侵入 ワクチン サル 遺伝子改変

## 1. 研究開始当初の背景

2004年にマレーシアのボルネオにおいて、サルで流行している二日熱マラリア原虫 *Plasmodium knowlesi* が多くの住民に自然感染していることが報告されて以降、東南アジアの広範囲でこの原虫が人に感染していることがわかった (Singh et al. 2004; Singh and Daneshvar 2013)。地域により感染率が高く重篤化し死に至る例も報告されている (Daneshvar et al. 2009)。そのため世界保健機関 (WHO) は二日熱マラリアを人獣共通感染性の第5番目のヒトマラリアとして認識し、対策の必要性を認めた。このようにサルマラリア原虫のヒト感染例が見つかった背景には、2000-2015年の期間に行われた国連ミレニアム開発目標達成に向けたマラリア対策強化の結果、ヒトの間で感染サイクルが回っているマラリア症例が減少したが、サルからヒトに感染していた二日熱マラリアのヒト症例数が変化せず、全マラリア症例数に対する相対数が増えたことが挙げられる。このことは、また、ヒトの間での伝播を想定した従来のヒトのマラリア対策手法が、サルマラリアのヒト感染への対策には通用しないことを意味する。そのため、人獣共通感染症二日熱マラリアを防御するにはワクチンが必須であると考えられる。

これまでマラリア流行地で評価された多くのマラリア組換えワクチン候補抗原では、抗原型特異的にしか防御効果を示さず、多価ワクチンが必要とされている。また、組換えワクチンの開発が困難であるため、最近では遺伝子改変弱毒マラリア原虫を用いた生ワクチンの開発も進められ (Bijker et al. 2015)、「生きたマラリア原虫を人に投与する」という考え方が世界的に受け入れられてきている。このような背景のもと、最近、ヒトの熱帯熱マラリア原虫で通常はエピジェネティックに発現が抑制されている感染赤血球表面の抗原群を、SETvs と呼ばれるヒストンメチルトランスフェラーゼの遺伝子座を破壊することで、全て発現させることができるようになるとの報告があり、SETvs 遺伝子座を破壊した原虫を多価の生ワクチンとして利用することが提唱された (Jiang et al. 2013)。そこで、研究代表者は二日熱マラリア原虫の SETvs 相同体 (PkSETvs) の破壊により、二日熱マラリア原虫感染赤血球表面に、普段は発現抑制されている抗原分子の全レパートリーを発現させることで、抗原性を強化した二日熱マラリア原虫生ワクチンが開発できると考えた。また、抗原性強化に加えて、原虫の赤血球侵入能力を低下させる等の複数の遺伝子改変により、赤血球期の二日熱マラリア原虫に対するヒト用の安全な抗原性強化遺伝子組換え弱毒生ワクチンを作成することが可能であるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

ヒト用の赤血球期二日熱マラリア原虫生ワクチンの創出を目指し、抗原性強化技術と赤血球侵入能力の制御技術を検証・確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 二日熱マラリア原虫の遺伝子組換え

PkSETvs 遺伝子座に相同組換えにより挿入され、同遺伝子座を破壊するプラスミドは pH4 を基に作製した。PkSETvs 遺伝子座破壊用のプラスミド、PkSETvs の 3' 側に gImS 配列を挿入することで mRNA 量を薬剤により調節できる様に改変するプラスミド、PkSETvs にタグ配列を付与するプラスミドを、二日熱マラリア原虫用に Moon 博士らが作製した CRISPR/Cas9 プラスミドを基にして作製した。DiCre/LoxP 系による PkSETvs の条件下遺伝子座破壊用プラスミドも Moon 博士らが作製したプラスミドを基に作製した。熱帯熱マラリア原虫 EBA175 を発現するプラスミドは、二日熱マラリア原虫と系統的に近縁の三日熱マラリア原虫の赤血球侵入期原虫で活性のあるプロモーターを用いて作製した。プラスミドの二日熱マラリア原虫への遺伝子導入には 4D-Nucleofector 装置 (ロンザジャパン株式会社) を使用し、正の薬剤選択マーカーとしてヒト・ジヒドロ葉酸還元酵素もしくはプラストサイジン S デアミネースを、負の薬剤選択マーカーとして酵母のシトシン・デアミネースとウリジル・ホスホリボシルトランスフェラーゼを組み合わせた yFCU を用いた。PkSETvs 遺伝子座の改変には、ヒト赤血球での培養に適応した原虫株を用い、実験を通じてヒト赤血球を用いた。EBA175 発現プラスミドは、ヒト赤血球での培養に適応していない原虫株に導入し、培養にはアカゲザルの赤血球を用いた。EBA175 の発現と局在は C 末端につけた myc タグ配列に対する抗体によるウェスタンブロット法と間接蛍光抗体法により確認した。

### (2) 赤血球侵入アッセイ

分裂体期に成熟した二日熱マラリア原虫をニコデンツを用いた密度勾配遠心法により精製し、サル赤血球もしくはヒト赤血球と混合し、10 時間培養後に輪状体期に発育した原虫数を計測することで評価した。

### (3) 二日熱マラリア原虫のヒト赤血球による培養への適応手順

サル赤血球を用いて得た EBA175 発現二日熱マラリア原虫の培養に、ヒト赤血球を最終比率が 90% となるよう加えて培養を継続し、増殖率がサル赤血球だけの時とほぼ同程度となると、ヒト

赤血球の比率を上げた。最終的に完全にヒト赤血球だけでの培養となるように、この操作を繰り返した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗原性強化技術

二日熱マラリア原虫 SETvs 相同体の相同組換えによる遺伝子座破壊を試みたが、組換え原虫を得ることができなかった。そのため、ロンドン大学衛生熱帯医学大学院の Rob Moon 博士の協力を得て、CRISPR/Cas9 を用いるプラスミドを基に、PkSETvs 遺伝子座破壊用のプラスミド、PkSETvs の発現を薬剤により調節できる様に改変するプラスミド、および、PkSETvs にタグ配列を付与するプラスミドを作製し、二日熱マラリア原虫へ遺伝子導入した。その結果、タグ配列付与プラスミドでは薬剤耐性原虫を得ることができ、ゲノムへの挿入が PCR により確認できたが、前 2 種のプラスミドでは薬剤耐性原虫を得ることができなかった。ゆえに、二日熱マラリア原虫では SETvs が必須である可能性が高いと考えた。念のため、SET 領域のみ除かれた組換え原虫 (PkSETvs ドメイン KO 原虫) の作製を試みたが、クローン化した原虫はすべて野生型を示し、組換え原虫の割合が低いことが示唆された。そこで、DiCre/LoxP 系による PkSETvs の遺伝子座破壊原虫の作製を試みた。DiCre を発現する二日熱マラリア原虫株において、PkSETvs 遺伝子の 5' 側に loxP 配列が挿入された組換え原虫を得たが、3' 側に loxP 配列が挿入された原虫を得ることは期間中にできなかった。一方、本技術による影響を検討するための背景情報として、二日熱マラリア原虫寄生赤血球内の膜構造を明らかにするとともに (Asare et al. 2018)、PkSETvs の破壊により抗原性を増強させる主要な抗原と想定している分子のうち、ヒト血管内皮細胞への接着能を示す接着分子 SICAvAr を見出した (Chuang et al. 学会発表, 2019)。

##### (2) 赤血球侵入能力の制御技術

サルを用いて生ワクチン効果を検証する概念実証実験に向けて、ヒト赤血球に効率よく侵入するが、サル赤血球に侵入できない原虫の作製に向けた研究を行った。まず、熱帯熱マラリア原虫のヒト成熟赤血球認識リガンド EBA175 を二日熱マラリア原虫で活性があると考えられる赤血球侵入期プロモーターを用いて発現するプラスミドを作製し、ヒト赤血球で増殖できない二日熱マラリア原虫株に遺伝子導入した。得られた組換え原虫はヒト赤血球への侵入能力は向上したものの、侵入後にヒト赤血球内で発育した原虫が感染赤血球から放出され、再度ヒト赤血球に侵入する効率が激減していた (Asare et al. 学会発表, 2019)。しかし、ヒト赤血球とともに培養することで一か月後にはヒト赤血球で効率よく増殖できる二日熱マラリア原虫株を得ることができた。ゆえに、二日熱マラリア原虫がヒト赤血球にて効率よく増殖するために、赤血球侵入以外の機構において、何らかのエピジェネティックな変化が必要であることが示唆された。以上、本原虫を基にヒト赤血球にて効率よく増殖するが、サル赤血球へは侵入できない原虫を作製する準備が整えられた。

##### < 引用文献 >

- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004;363(9414):1017-1024.
- Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(2):165-184.
- Daneshvar C, Davis TM, Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, Singh B. Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection. *Clin Infect Dis* 2009;49(6):852-860.
- Bijker EM, Borrmann S, Kappe SH, Mordmüller B, Sack BK, Khan SM. Novel approaches to whole sporozoite vaccination against malaria. *Vaccine* 2015;33(52):7462-7468.
- Jiang L, Mu J, Zhang Q, Ni T, Srinivasan P, Rayavara K, Yang W, Turner L, Lavstsen T, Theander TG, Peng W, Wei G, Jing Q, Wakabayashi Y, Bansal A, Luo Y, Ribeiro JM, Scherf A, Aravind L, Zhu J, Zhao K, Miller LH. PfSETvs methylation of histone H3K36 represses virulence genes in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2013;499(7457):223-227.
- Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, Yahata K, Kaneko O. The *Plasmodium knowlesi* MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan's clefts in the infected erythrocyte. *Parasitol Int* 2018;67(4):481-492.
- Chuang H, Lucky AB, Yamagishi J, Katakai Y, Kawai S, Kaneko O, Sakaguchi M. Identification of the ligand responsible for the cytoadhesion of *Plasmodium knowlesi*-infected red blood cells. *The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity*. Awaji, Japan. (2019)
- Asare KK, Lucky AB, Kaneko M, Xangsayarath P, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Adams JH, Kaneko O. An exogenously expressed *Plasmodium falciparum* ligand significantly

improved *Plasmodium knowlesi* ability to invade human erythrocytes. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68th annual meeting*. National Harbor, USA. (2019)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, Yahata K, Kaneko O	4. 巻 67
2. 論文標題 The Plasmodium knowlesi MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan's clefts in the infected erythrocyte	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 481-492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2018.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Muh F, Ahmed MA, Han JH, Nyunt MH, Lee SK, Lau YL, Kaneko O, Han ET	4. 巻 8
2. 論文標題 Cross-species analysis of apical asparagine-rich protein of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-23728-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawai S, Annoura T, Araki T, Shiogama Y, Shogo S, Sato MO, Kaneko O, Yasutomi Y, Chigusa Y	4. 巻 76
2. 論文標題 Development of an effective alternative model for in vivo hypnozoite-induced relapse infections: a Japanese macaque (Macaca fuscata) model experimentally infected with Plasmodium cynomolgi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2020.102096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Muh F, Kim N, Nyunt MH, Firdaus ER, Han JH, Hoque MR, Lee SK, Park JH, Moon RW, Lau YL, Kaneko O, Han ET	4. 巻 14
2. 論文標題 Cross-species reactivity of antibodies against Plasmodium vivax blood-stage antigens to P. knowlesi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0008323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0008323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Asare KK, Lucky AB, Sakaguchi M, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, Yahata K, Kaneko O
2. 発表標題 Tether-like structures connect Sinton-Mulligan 's clefts and erythrocyte membrane in Plasmodium knowlesi-infected erythrocyte
3. 学会等名 The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium / Leading Program International Symposium 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sakaguchi M, Lucky AB, Yamagishi J, Katakai Y, Kawai S, Kaneko O
2. 発表標題 Identification of the ligand responsible for the cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, Yahata K, Kaneko O
2. 発表標題 Amorphous structure connects a nascent Golgi-like Sinton Mulligan 's clefts to Plasmodium knowlesi infected erythrocyte membrane
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, Yahata K, Kaneko O
2. 発表標題 The Plasmodium knowlesi MAHRP2 ortholog localizes to structures connecting Sinton Mulligan's clefts in the infected erythrocyte
3. 学会等名 The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 67th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Kaneko O, Asare KK, Sakaguchi M, Lucky AB, Asada M, Miyazaki S, Katakai Y, Kawai S, Song C, Murata K, Yahata K
2. 発表標題	Amorphous structure connects a nascent Golgi-like Sinton Mulligans clefts to Plasmodium knowlesi-infected erythrocyte membrane
3. 学会等名	第59回日本熱帯医学会大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	金子修
2. 発表標題	マラリア原虫の寄生赤血球への分子輸送
3. 学会等名	第59回日本熱帯医学会大会 (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Sakaguchi M, Lucky AB, Yamagishi J, Katakai Y, Kawai S, Kaneko O
2. 発表標題	Cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells to human endothelial cells
3. 学会等名	U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: Parasitic Diseases and Immunology Panel Meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Asare KK, Lucky AB, Kaneko M, Xangsayarath P, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Adams JH, Kaneko O
2. 発表標題	An exogenously expressed Plasmodium falciparum ligand significantly improved Plasmodium knowlesi ability to invade human erythrocytes
3. 学会等名	The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 68th annual meeting (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 Kaneko O, Asare KK, Lucky AB, Kaneko M, Xangsayarath P, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Adams JH
2. 発表標題 An exogenously expressed Plasmodium falciparum EBA-175 enables Plasmodium knowlesi to quickly adapt to human erythrocytes in vitro
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asare KK, Lucky AB, Kaneko M, Xangsayarath P, Katakai Y, Kawai S, Yahata K, Adams JH, Kaneko O
2. 発表標題 An exogenously expressed Plasmodium falciparum ligand enables Plasmodium knowlesi to adapt to human erythrocytes in vitro
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chuang H, Lucky AB, Yamagishi J, Katakai Y, Kawai S, Kaneko O, Sakaguchi M
2. 発表標題 Identification of the ligand responsible for the cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 莊准, Lucky AB, 山岸潤也, 片貝裕子, 川合寛, 金子修, 坂口美亜子
2. 発表標題 Molecular basis of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells to adhere human venous endothelial cells
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川合 覚 (KAWAI Satoru) (70275733)	獨協医科大学・医学部・教授  (32203)	
研究協力者	片貝 裕子 (KATAKAI Yuko)	(社) 予防衛生協会・研究支援企画部感染実験支援室・室長	
研究協力者	矢幡 一英 (YAHATA Kazuhide) (40467965)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教  (17301)	
研究協力者	アサレ クワメ・クミ (ASARE Kwame Kumi) (70854222)	長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員  (17301)	
研究協力者	坂口 美亜子 (SAKAGUCHI Miako) (50400651)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教  (17301)	
研究協力者	荘 淮 (CHUANG Huai)	長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生  (17301)	
研究協力者	ムーン ロバート (MOON Robert)	ロンドン大学衛生熱帯医学大学院・感染症・熱帯病研究科・准教授	

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	チャイヤウォン ナタワット (CHAIYAWONG Nattawat)	長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生  (17301)	
研究協力者	チタマ ベン (CHITAMA Ben)	長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員  (17301)	