様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　９ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０６６５５

研究課題名（和文）ヘテロローガス・プライムブースト免疫法を用いた新規ワクチンプラットフォームの開発

研究課題名（英文）The development of a novel vaccine vector by the heterologous prime-boost immunization regimen

研究代表者
伊従　光洋（IYORI, MITSUHIRO）

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：２０６０８３５１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアは年間２億人の患者と40万人以上の死者を出す世界的な感染症である。効果的なマラリアワクチンの開発が求められる一方、現在までにその実用化には至っていない。本研究では、組換えウイルスを利用したマラリアワクチンの開発を行なった。独自に作製したワクチンを用いて動物実験を行なったところ、２回の接種のみで80%以上のマウスでマラリア感染防御効果（＝全く感染しない）を得ることに成功した。これらのワクチン接種されたマウスでマラリア原虫に対する免疫応答の誘導を確認するとともに、ワクチンの実用化に向け最適な精製方法や保管方法の検討も行われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
（１）2021年においても有効なマラリアワクチンは世界的に実用化されていない。この状況において、有効なワクチン候補を継続して開発していくことは世界の公衆衛生・保健衛生に大きく貢献すると考えられる。（２）日本の感染症用ワクチンの開発研究は世界に比べ遅れをとっている。本分野で世界をリードするべく我が国で有効なワクチンの開発研究を進める意義は大きい。（３）本研究で利用したウイルスは、遺伝子組換えにより他の新興・再興感染症用のワクチンにも迅速に応用可能である。開発が困難とされるマラリアワクチンにおいて非常に強力な感染防御効果を発揮したことから、様々な感染症に対するワクチン開発への期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：Malaria is a global infectious disease that causes 200 million patients and more than 400,000 deaths annually. While the development of an effective malaria vaccine is required, a completely effective vaccine is not yet available. In this study, we developed a malaria vaccine based on recombinant viruses. When animal experiments were conducted using the vaccine that was originally prepared, we obtained sterile protection effect, which means no infection at all, for 80% of mice or more with only two-dose administration. Induction of an immune response against Plasmodium parasites was confirmed in vaccinated animals, and the optimum purification method and storage method for practical use of the vaccine were also examined.

研究分野：微生物学・免疫学

キーワード：ウイルスベクター　マラリア　ワクチン　ハマダラカ

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

マラリアは、結核やAIDSとならぶ世界三大感染症の一つであり、年間２億人の患者と43万人の死者を出す原虫感染症である。マラリアに対する効果的なワクチンの開発が希求されており、グラクソ・スミスクライン社をはじめ製薬メーカーが研究開発を行っているが、研究開始当初から現在までにマラリアワクチンの実用化には至っていない。

申請者は バキュロウイルスを基盤とした非感染性ウイルスナノ粒子ワクチン(BDES-NVP)を開発した。BDES-NVPはコンポーネントワクチンとDNAワクチンの両機能を併せ持ち、液性免疫・細胞性免疫の両応答 を誘導する新しいコンセプトのハイブリッド型ワクチンプラットフォームである。本ワクチンの有効性をさらに改良するため、BDES-NVP を主軸に異種のウイルスベクターによるヘテロローガス・プライムブースト免疫法を開発する研究に進展した。

２．研究の目的

独自に開発した BDES-NVP ならびに組換えアデノウイルスベクター(AdHu5)を基盤としたマラリアワクチンの感染防御効果をマウスモデルで検証することにより、新規のヘテロローガス・プライムブースト免疫法を確立することを研究の目的とした。

３．研究の方法

(1) マウスモデルによるワクチン効果の評価

- ワクチンの作製と精製：マラリア原虫遺伝子を導入したBDES-NVP、AdHu5、ならびに組換えタンパク質（対照群；Alumアジュバント使用）を高純度に精製した。
- マラリアチャレンジ感染実験：上記３種のワクチンを組合せた免疫法で感染防御効果を評価した。交互に２回筋肉内接種し、ワクチン抗原を発現する遺伝子組換え原虫が感染したハマダラカで吸血チャレンジした。感染の有無、肝臓における感染動態、原虫増殖率を観察・測定し、感染防御効果を評価した。

(2) ワクチンが誘導する免疫応答解析

- 免疫応答の解析：液性免疫応答の解析においては、各回の免疫前後に部分採血して、ELISAにより抗体価の変動を測定し、追加免疫効果を調べた。
  細胞免疫応答の解析においては、免疫マウスより脾臓を摘出し、CTL-エピトープと反応してIFN-γを産生するT細胞数をELISPOT assay及び細胞内染色法により測定した。
- 自然免疫応答とアジュバント効果解析：自然免疫応答の解析においては、免疫マウスの肝臓を採取し、DNAマイクロアレイで網羅的に遺伝子発現解析を行った。また、免疫応答の機序を解明するため、自然免疫関連遺伝子（TLR9, IFN-αR, IFN-γR）のノックアウトマウスを用い、免疫応答解析を行った。
- 感染防御と免疫応答の相関：各回の免疫-感染防御実験で得られる血清及び細胞を用いて抗体価ならびに細胞性免疫応答を調べ、ワクチン効果との相関を解析を行った。

(3) 製造プロセスの検討と品質管理

- 製造プロセスの検討：製造プロセスの標準化、コスト低減、閉鎖系での製造のためにイオン交換クロマトグラフィーによる精製法を検討した。BIA セパレーションズ社が開発した次世代型「CIMmultusTM」モノリスカラムを用いてワクチン製造プロセスの検討を行った。
- 品質管理： ウイルスベクターの熱安定性を保持する安定化剤の検討および長期保存に対する品質管理を行うため、電子顕微鏡法を用いて形状の定性化やマラリア抗原の発現量の定量化（免疫電顕）を実施した。長期保存サンプルを用いた動物実験でその安定性を評価した。

４．研究成果

(1) マウスモデルによるワクチン効果の評価

- プライムブーストの最適組合せの同定：BDES-NVPとAdHu5を交互に免疫したマウスに対して、熱帯熱抗原発現型の組換えネズミマラリア原虫のスポロゾイトを用いてチャレンジ感染試験を行った。同一ウイルスベクターを２回接種する方法（BDES-NVP２回もしくは AdHu5　２回）及びBDES-NVP初回免疫／AdHu5追加免疫の順で接種する方法では、感染防御効果は20%以下（免疫群マウスの 80%以上が感染）であった。一方、AdHu5 初回免疫／BDES-NVP 追加免疫の順で接種する方法では、免疫群マウスの約80%が感染防御しマラリアを全く発症しなかった。
- 組換えタンパク質免疫による感染防御メカニズムの解析：ワクチンの標的としている熱帯熱マラリア抗原のどの部分に対する免疫応答が最も感染防御に有効なのか明らかにするため、同タンパク質を３分割して精製を試みた結果、いずれも高純度に精製することに成功した。これらの抗原タンパク質をマウスに３回免疫しチャレンジ感染したところ、タンパク質全長を免疫した時のみ完全に感染が防御された。一方、AdHu5 と各タンパク質の組み合わせ免疫法を行なった場合、同抗原の中央部分の免疫時に最も感染防御効果が高く、迅速な液性免疫

応答の誘導とそれに付随する原虫の中和活性には中央部分が不可欠であることが考えられた。

(2) ワクチンが誘導する免疫応答解析

- 液性免疫応答解析の結果、AdHu5 を２回接種する方法が熱帯熱マラリア抗原に対する抗体価が最も高く、次いで AdHu5 初回免疫／BDES-NVP 追加免疫、その他の順に抗体価が確認された。
- 細胞性免疫応答解析の結果、AdHu5 を２回接種する方法がマラリア特異的 CD8 陽性 T 細胞を最も強力に誘導し、次いで BDES-NVP 初回免疫／AdHu5 追加免疫、AdHu5 初回免疫／BDES-NVP 追加免疫、BDES-NVP２回接種の順に同 T 細胞が誘導された。
- BDES-NVP 接種後の肝臓における遺伝子発現解析を網羅的に行なった結果、BDES-NVP に対するパターン認識受容体として考えられていた TLR9 シグナルの有無に関わらず I 型 IFN シグナル伝達経路が活性化していることが明らかとなった。本経路の活性化により肝臓期原虫を殺傷し得ることが見出されたが、その効果は IFN-γR KO マウスで半減、IFN-αR KO マウスで完全に消失した。
- 感染防御と免疫応答の相関を調べた結果、相関のある免疫学的指標は見出されなかった。唯一、オプソニン化を誘導しやすい cytophilic antibody の IgG2a のみが感染防御マウスで有意に高い値を示した。どの免疫応答をどの程度誘導すればマラリア感染防御に有効か、免疫学的指標を明らかにすることが今後の課題である。

(3) 製造プロセスの検討と品質管理

- アフィニティーカラムによる精製法を各種条件下で検討した。①BDES-NVP 培養液を前処理する段階において、遊離した DNA を分解させるために Benzonase 処理を試みたが、処理前と比べてウイルス力価が半減してしまったため、使用は不適当と考えられた。②イオン交換クロマトグラフィーを行う段階において、カラムに結合させたウイルスを NaCl の濃度を変えて段階的に溶出を試みたところ、1M NaCl で最も良く溶出されたが、収量は投入前に比べ 1/6 に大幅に減少してしまった。③得られた溶出液を電子顕微鏡で観察したところ、高調液のサンプルほどエンベロープの欠損が著しく、浸透圧の上昇がウイルスの破壊につながったものと考えられた。これらの結果をふまえて、ウイルス溶液の pH、カラムへのインジェクション量、カラムのポアサイズ、ならびに溶出条件などを比較検討し、最適条件を明らかとした。
- ワクチンの品質管理においては、保存条件を検討した。PBS バッファー内で４℃保存を続けた場合、およそ半年後にウイルス力価は 1/5 まで減少することがわかった。一方、5%スクロース含有 PBS 中に-80℃で保存した場合、９ヶ月間ウイルス力価は減少しなかった。近年、ウイルス保存用の溶液として利用されている 15%トレハロース含有 PBS 溶液の効果も検証したところ、-80℃で保存した場合、調査した半年間で大幅な力価減少は認められなかった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　6件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 Iyori M, Ogawa R, Emran TB, Tanbo S, Yoshida S.	４．巻 -
２．論文標題 Characterization of the gene expression patterns in the murine liver following intramuscular administration of baculovirus.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Gene expression	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.02412	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 Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Emran TB, Amelia F, Islam A, Syafira I, Yoshida S.	４．巻 10
２．論文標題 A Viral-Vectored Multi-Stage Malaria Vaccine Regimen With Protective and Transmission-Blocking Efficacies	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Front Immunol	６．最初と最後の頁 2412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.02412. eCollection 2019.	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 Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Yoshida K, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Alam A, Emran TB, Amelia F, Islam A, Otsuka H, Takashima E, Tsuboi T, Yoshida S.	４．巻 10
２．論文標題 Adeno-Associated Virus as an Effective Malaria Booster Vaccine Following Adenovirus Priming	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Frontiers in Immunology	６．最初と最後の頁 730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2019.00730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Amelia F, Iyori M, Emran TB, Yamamoto DS, Genshi K, Otsuka H, One Y, Yusuf Y, Islam A, Yoshida S.	４．巻 1
２．論文標題 Down‐selecting circumsporozoite protein‐based malaria vaccine: a comparison of malaria sporozoite challenge model	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Parasite Immunology	６．最初と最後の頁 e12624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pim.12624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

１．著者名 Islam A, Emran TB, Yamamoto DS, Iyori M, Amelia F, Yusuf Y, Yamaguchi R, Alam MS, Silveira H, Yoshida S.	４．巻 9
２．論文標題 Anopheline antiplatelet protein from mosquito saliva regulates blood feeding behavior.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 3129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39960-2	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 Emran TB, Iyori M, Ono Y, Amelia F, Yusuf Y, Islam A, Alam A, Tamura M, Ogawa R, Matsuoka H, Yamaoto DS, Yoshida S.	４．巻 201
２．論文標題 Baculovirus-Induced Fast-Acting Innate Immunity Kills Liver-Stage Plasmodium.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 The Journal of Immunology	６．最初と最後の頁 2441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1800908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

〔学会発表〕　計20件（うち招待講演　2件／うち国際学会　4件）

１．発表者名 ○伊従光洋、Yenni Yusuf、吉井達也、Mohammad Shahnij、水上浩明、福本晋也、吉田栄人
２．発表標題 臨床応用を目指したアデノ随伴ウイルスを用いた熱帯熱マラリア２価ワクチンの開発研究
３．学会等名 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究成果報告会（招待講演）
４．発表年 2020年

１．発表者名 ○Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Yenni Yusuf, Daisuke S. Yamamoto, Shinya Fukumoto, Kunitaka Yoshida, Kento Genshi, Tatsuya Yoshii, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida.
２．発表標題 The mechanism of PfCSP-based malaria vaccines and its application to the viral vectored vaccine platform.
３．学会等名 17th International Congress of Immunology（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名
〇Ashekul Islam, Mitsuhiro Iyori, Daisuke Yamamoto, Nobuko Tuno, Ririka Yamaguchi, Henrique Silveira, Shigeto Yoshida.

２．発表標題
Anopheline anti-platelet protein (AAPP), a novel saliva protein, enables blood acquisition in Anopheles stephensi.

３．学会等名
第75回日本寄生虫学会西日本支部大会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇伊従 光洋，小川 良平，新倉 保，Talha Bin Emran，丹保 秀太，井上 信一，小林富美惠，吉田 栄人

２．発表標題
バキュロウイルス筋肉内接種による肝臓期マラリア原虫の殺傷と遺伝子発現解析

３．学会等名
第75回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇大塚 広夢，伊従 光洋，吉田 栄人

２．発表標題
ウイルスベクターと組換えタンパクを用いたPfCSP マラリアワクチンによる免疫応答の多様性

３．学会等名
第75回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇Mohammad Shahnaij, Mitsuhiro Iyori, Ashekul Islam, Intan Syafira, Iroha Yamagoshi, MayuKajino, Shigeto Yoshida.

２．発表標題
Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoitechallenge.

３．学会等名
第75回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, Mitsuhiro Iyori, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida.

２．発表標題
A two-dose multi-stage malaria vaccine regimen elicits protection and blocks parasite transmission.

３．学会等名
第75回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇井谷慧，伊従光洋，辻村聡恵，吉田栄人

２．発表標題
肝臓期マラリア原虫をバキュロウイルス投与で治療した後に誘導される獲得免疫応答の解析

３．学会等名
第75回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Kento Genshi, Yutaro Onoue, Talha Bin Emran, Shigeto Yoshida.

２．発表標題
Full-length Plasmodium falciparum circumsporozoite protein administrated with Imject Alum elicits complete protection in mice against the transgenic P. berghei sporozoites.

３．学会等名
PROTEIN ISLAND MATSUYAMA 2019（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
〇伊従 光洋, Emran Talha Bin, 小野 祐希, 吉田 栄人

２．発表標題
The impact of baculovirus-induced innate immunity on elimination of the liver-stage Plasmodium through interferon signaling

３．学会等名
第88回日本寄生虫学会大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
○吉井 達也，YusufYenni，伊従 光洋，水上 浩明，坪井 敬文，高島 英造，吉田 栄人

２．発表標題
アデノ随伴ウイルスをもとにした長期間強力な効果が持続する伝播阻止マラリアワクチン

３．学会等名
第88回日本寄生虫学会大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
○辻村聡恵，伊従光洋，Talha Bin Emran，吉井達也，吉田栄人

２．発表標題
バキュロウイルス誘導性自然免疫応答はマラリア再感染を防御する

３．学会等名
第74回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
○堀直人，伊従光洋，吉田邦嵩，Talha Bin Emran，島田 聡，Ashekul Islam，志田壽利，吉田栄人

２．発表標題
組換えワクシニアウイルスLC16m8Δのマラリアワクチンとしての新規アプローチ

３．学会等名
第74回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
○伊従光洋，Talha Bin Emran，小野祐希，松岡裕之，山本大介，吉田栄人

２．発表標題
肝臓期マラリア原虫を完全排除可能な非感染性ウイルスベクターに関する研究

３．学会等名
第74回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
○小野祐希，伊従光洋，Talha Bin Emran，田村めぐみ，尾上裕太郎，小川良平，吉田栄人

２．発表標題
バキュロウイルス投与による肝臓期マラリア原虫の殺傷メカニズムに関する研究

３．学会等名
第74回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
○山越彩葉，伊従光洋，堀直人，Talha Bin Emran，志田壽利，吉田栄人

２．発表標題
組換えワクシニアウイルスLC16m8Δを基盤としたマラリアワクチンの感染防御効果の検討（II）

３．学会等名
第74回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
○山下陽夏，伊従光洋，山口莉理夏，Ashekul Islam，吉井達也，吉田栄人

２．発表標題
感染症媒介蚊由来唾液タンパクの種間比較

３．学会等名
第74回日本寄生虫学会西日本支部大会

４．発表年
2018年

１．発表者名
○Mitsuhiro Iyori, Kunitaka Yoshida, Yenni Yusuf, Talha Bin Emran, Tatsuya Yoshii, Hiroki Hashizume, Satoshi Shimada, Daisuke D. Yamamoto, Shinya Fukumoto, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida

２．発表標題
Development of a novel malaria vaccine based on heterologous prime-boost immunization regimen using adenovirus and adeno-associated virus vectors

３．学会等名
14th International congress of parasitology (ICOPA 2018)（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名 〇Talha Bin Emran, Mitsuhiro Iyori, Shigeto Yoshida
２．発表標題 Baculovirus-induced innate immunity confers complete protection against Plasmodium pre-erythrocytic stage parasites
３．学会等名 14th International congress of parasitology (ICOPA 2018)（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 〇Ashekul Islam，伊従光洋，山本大介，Talha Bin Emran，都野展子，山口莉理夏，Fitri Amelia，Yenni Yusuf，Henrique Silveira，吉田栄人
２．発表標題 唾液タンパクAAPPを欠損したトランスジェニックハマダラカの吸血行動の著しい制約
３．学会等名 第70回日本衛生動物学会大会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計2件

産業財産権の名称	発明者	権利者
マラリア治療剤、マラリア予防剤及び抗マラリア自然免疫賦活剤	吉田栄人、伊従光洋	同左
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、特願2018-057311	2018年	国内

産業財産権の名称	発明者	権利者
組換えアデノ随伴ウイルスを含むマラリアワクチン	吉田栄人、伊従光洋、吉井達也、水上浩明	同左
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、特願2019-019247	2019年	国内

〔取得〕　計0件

〔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

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関