

平成22年 5月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19406009

研究課題名（和文） 新規ワクチンのスクリーニングに有用なマラリア防御血清の探索

研究課題名（英文） Selection of malaria protective sera useful for novel vaccine candidate discovery

研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI TAKAFUMI)

愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センター・教授

研究者番号：00188616

研究成果の概要（和文）：高度マラリア流行地には、マラリアに感染しても発熱等の症状が出ない無症候原虫感染者が存在している。これらの人々の血清中にはマラリア原虫の増殖を阻害する抗体が存在することが知られている。そこで本研究は、新規マラリアワクチン候補抗原の探索に用いることの出来る、防御抗体を保有する流行地住民の血清をタイ国において入手することを目的に実施した。3年間にわたるタイ国西部のマラリア流行地調査の結果、マラリア防御抗体を保有する無症候感染者血清、及びその比較対照群となる有症患者血清を入手できた。

研究成果の概要（英文）：The individuals live in malaria endemic area who repeatedly exposed to the malaria parasite gradually develop immunity to the clinical manifestations of infection. This resistance to clinical disease is partly mediated by antibodies against the asexual blood stages of the malaria parasite. To identify such individuals harboring protective antibodies we have screened the human serum specimen useful for the future vaccine candidate discovery. After three-years surveillance in the endemic village in western Thailand, we have successfully obtained both asymptomatic sera and symptomatic patient sera as negative controls.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：感染症、マラリア、ワクチン、ゲノム、タイ

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界的に重要な感染症の一つとして対策が取り組まれているが、1970年頃より薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫が全世

界の流行地に拡散し、患者数、死亡者数ともに増加の一途をたどっている。そこで、これまで20年以上マラリアワクチン開発が精力的に進められてきたが、未だ実用化に至った

ものは一つもない。このような状態を打開する端緒として、2002年にヒトマラリア原虫の中で最も悪性の熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報が公開された。この情報を基に多数のワクチン候補抗原が同定されることが期待されたが、塩基配列が平均70%以上ものA又はTを含むという原虫遺伝子の特殊性などから、大腸菌をはじめとする既存のタンパク質合成系では、原虫由来の遺伝子を用いた組換えタンパク質の合成が13・30%程度の低い効率でしか出来ないことが報告された。その結果、ゲノム情報が公開されて8年目となる現在においても、マラリアワクチン候補抗原は10種類程度にすぎず、それらの研究の進捗状況も大部分が第1相臨床試験のレベルにとどまっていた。

2. 研究の目的

申請者らは、新たなマラリアワクチンの開発をめざし、最近当研究センターで開発されたコムギ胚芽抽出液を用いたハイスループット無細胞タンパク質合成法を用いて、ヒト血流中の原虫の増殖を阻害することの出来る発病阻止ワクチンの研究に着手した。これまでに、熱帯熱マラリア原虫遺伝子から組換えタンパク質を作製したところ、80%を超える効率で組換えタンパク質を合成することに成功した。これらの個別タンパク質からワクチン候補をスクリーニングするためには、各タンパク質を大量に合成・精製し、マウス等に免疫して抗血清を作製し、培養熱帯熱マラリア原虫に対する赤血球侵入阻害活性を測定する必要がある。しかし、この方法では多種のワクチン候補抗原をハイスループットにスクリーニングすることはできない。

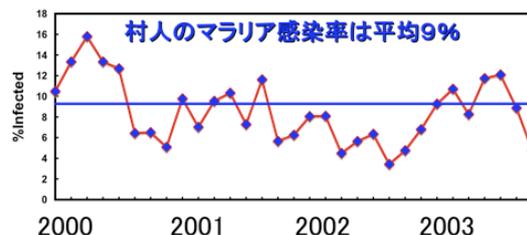
この課題を解決する方策として、我々はタイの高度マラリア流行地に存在するマラリアに感染しても感染赤血球率が上昇せず、発熱等の症状が出ない無症候原虫感染者に着目した。これら住民の血清中には赤血球期マラリア原虫の増殖を阻害する抗体が存在すると考えられる。そのため、このような血清が入手できれば、我々が作製したメロゾイト期原虫タンパク質ライブラリーと組み合わせることにより、新規マラリアワクチン候補抗原のハイスループットなスクリーニングが可能となると考えた。そこで本研究は、新規熱帯熱マラリア発病阻止ワクチン候補抗原のハイスループットスクリーニングに用いる流行地住民の血清を系統的に入手することを目的に実施した。

3. 研究の方法

(1)調査研究実施国・地域の状況及び旅行経路
本研究では、タイ国西部ミャンマーとの国境地帯にあるカンチャナブリ県サンクラブリ近郊のコン・モン・ター村(図1赤丸)を

調査対象地域とする。この村落はタイ国におけるマラリアの高度流行地の一つである。バンコク市(図1青丸)にある在タイ米軍医学研究所が、マラリアの流行と媒介蚊の関連を調べるため、コホート研究を2000年から継続実施していた。これまでの研究では、1から2ヶ月に1度同村を調査チームが訪れ、毎回1歳以上の村民約700名前後からマラリアの感染状況を調査し、その推移を検討してきた。その結果、同村のマラリア感染率は平均9%であった(図2)。また、約半数の村民が年に一度はマラリアに感染していることが判明し、タイの中では非常に感染率が高く、しかも成人のほとんどは無症候原虫感染者(体温37.5度以下)であることが報告されていたことから、これらの住民血清中にはマラリアに対する防御抗体の存在が予測された。また、本申請の海共同研究者である在タイ米軍医学研究所のJetsumon Sattabongkot博士はこのコホート研究の主任研究者である。このような理由で、同村には本研究を開始する最適の条件が整っていると考えられた。また、新規ワクチン抗原スクリーニングには、陰性対照群として防御抗体を保有していない有症マラリア患者(体温37.5度超)血清の入手も必要であったため、海外共同研究者としてバンコク市(図1青丸)マヒドン大学のRachanee Udomsangpetch博士の協力をえて入手した。

図1、調査対象地域



この旅行には、日本からバンコクまでは航空機を使用するが、バンコクから同村までは、陸路を使用し片道約5時間の行程である。

(2) 調査研究方法

インフォームド・コンセントの得られた村民を対象に体温測定、症状等の聞き取り、末梢血液採血を実施した。得られた血液サンプルを用いて、マラリアの診断（顕微鏡法及びPCR法を用いる）、原虫感染率の算定、血清の分離を行った。採取したそれぞれの血清サンプルの一部を用いて、既知の主要マラリア原虫抗原（MSP1, AMA1）に対する抗体価を酵素抗体法で測定した。残りの血清サンプルは超低温フリーザーに保存した。

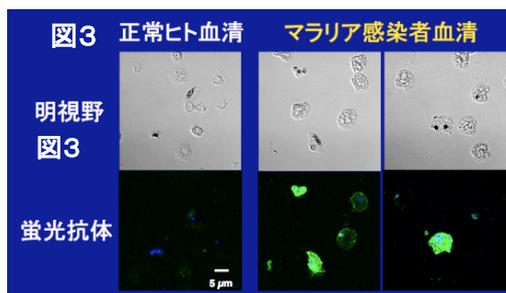
なお、上記の個別情報はコンピュータに記録しデータベース化を行う。なお、すべての記録はコード番号化され、個人の特定は出来ないようにした。

4. 研究成果

流行地住民から血清をサンプリングする際、単発的な横断的研究では、仮に無症状であるが原虫が赤血球内に感染している住民が居ても、防御抗体を保有しているため無症候原虫感染者であるのか、現在無症状でもこれから原虫率が増加して発熱するのか、逆に治癒課程にあるのか不明である。したがって、ある1時点だけの原虫感染の有無と、発熱の有無だけでは、その血清中に防御抗体が存在しているか否か判別不能であった。したがって、我々は防御抗体が誘導されている流行地住民血清を系統的に入手するため、コン・モン・ター村民を全村単位でフォローアップした。その結果、観察した村民のうち、最終的に22名が無症候性原虫感染者と同定され、さらにこれらの村民に感染しているマラリア原虫種のPCR及び顕微鏡診断の結果、全て熱帯熱マラリア原虫の単独感染例であることが明らかとなった。また、陰性対照血清として、マヒドン大学の有症マラリア患者のうち、原虫に対する抗体の誘導が確実に起こっていると考えられる2回目以上の熱帯熱マラリア患者血清も22名分入手できた。これらの患者の情報、及び既知熱帯熱マラリア原虫抗原のMSP1とAMA1に関する抗体価の測定結果を示す（表1）。

表1	無症候感染者	有症患者
人数	22	22
体温(°C)	37.2	38
原虫寄生率(%)	0.0032	0.55
年齢	30	23.5
性別(男/女)	15/7	20/2
抗体価(ELISA OD)		
抗MSP1	1.52	1.15
抗AMA1	0.71	0.59

この結果から、原虫寄生率は有症患者群の0.55%と比較して、無症候感染者群は0.0032%と百分の一であり、熱帯熱マラリア原虫の体内増殖が抑制されていることが明らかとなった。一方、原虫の主要な既知抗原に対する抗体価を酵素抗体法により検討するも、両群間で有意な差は認められなかった。さらにこの無症候感染者血清中に、熱帯熱マラリア原虫に対する抗体が存在していることを確認するため、間接蛍光抗体法を用いて原虫抗原をマラリア感染者血清で染色した。その結果、いずれの血清サンプルにも、熱帯熱マラリア原虫に対する抗体が存在していることが明らかとなった（図3：一例を示す。ヒト抗体で染色された原虫が緑に光る）。



以上より、本研究で得られたヒト血清試料を用いて、新規マラリアワクチン候補抗原の同定を目指したマラリアゲノムワイドな組換え原虫タンパク質ライブラリーのスクリーニング研究の準備は完了したと考えられる。

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21件）

- (1) Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T. Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research. *Expert Opin Drug Discov*. 2009, 4:1191-1199. (査読有)
- (2) Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, Harakuni T, Kohama H, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Tsuboi T. Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission in both passive and active vaccination regimens in a rodent model of malaria infection. *Infect Immun*, 2009, 77: 5496-5500. (査読有)
- (3) Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the

- Congo, west central Africa. *J Infect Dis.* 2009, 200:1465-1469. (査読有)
- (4) Jiang G, Shi M, Conteh S, Richie N, Banania G, Geneshan H, Valencia A, Singh P, Aguiar J, Limbach K, Kamrud KI, Rayner J, Smith J, Bruder JT, King CR, Tsuboi T, Takeo S, Endo Y, Doolan DL, Richie TL, Weiss WR.
Sterile protection against *Plasmodium knowlesi* in rhesus monkeys from a malaria vaccine: comparison of heterologous prime boost strategies. *PLoS ONE.* 2009, 4(8):e6559. (査読有)
- (5) VanBuskirk KM, O'Neill MT, De La Vega P, Maier AG, Krzych U, Williams J, Dowler MG, Sacci, Jr. JB, Kangwanrangsan N, Tsuboi T, Kneteman NM, Heppner, Jr. DG, Murdock BA, Mikolajczak SA, Aly ASI, Cowman AF Kappe SHL.
Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:13004-13009. (査読有)
- (6) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T.
Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. *Parasitol Int.* 2009, 58:243-248. (査読有)
- (7) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.
Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106:7167-7172. (査読有)
- (8) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int.* 2009, 58:196-199. (査読有)
- (9) Maeda T, Saito T, Harb OS, Roos DS, Takeo S, Suzuki H, Tsuboi T, Takeuchi T, Asai T.
Pyruvate kinase type-II isozyme in *Plasmodium falciparum* localizes to the apicoplast. *Parasitol. Int.* 2009, 58:101-105. (査読有)
- (10) Cao J, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M.
Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitol Int.* 2009, 58:29-35. (査読有)
- (11) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.
Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun.* 2008, 76:1702-1708. (査読有)
- (12) Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M.
Diversity and evolution of the rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2008, 158:11-21. (査読有)
- (13) Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T.
Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007, 45:2521-2528. (査読有)
- (14) Mudeppa DG, Pang CKT, Tsuboi T, Endo Y, Buckner FS, Varani G, Rathod PK.
Cell-free production of functional *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *Mol Biochem Parasitol.* 2007, 151:216-219. (査読有)
- (15) Ghoneim A, Kaneko O, Tsuboi T, Torii M.
The *Plasmodium falciparum* RhopH2 promoter and first 24 amino acids are sufficient to target proteins to the rhoptries. *Parasitol Int.* 2007, 56:31-43. (査読有)
- [学会発表] (計 7 9 件)
- (1) Takeo S.
Identification of novel blood-stage vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* by high-throughput immunoscreening. ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- (2) Tachibana M.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*. ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- (3) Aguiar JC.
Discovering novel pre-erythrocytic antigens for malaria vaccines. ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- (4) Tachibana M.
Immunization with N-terminal region of a

- gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2009.
- (5) Tsuboi T.
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a breakthrough for the post-genome malaria vaccine candidate discovery. Vivax malaria research III: 2009 and beyond, Gamboa, Panama, May 24-28, 2009.
- (6) Tsuboi T.
Pfs230: Prefertilization Transmission-blocking Vaccine Candidate. Malaria Transmission Blocking Strategies. Bangkok, Thailand, March 12-13, 2009.
- (7) Tachibana M.
Immunization with recombinant proteins of a gametocyte protein Pfs230 expressed using wheat germ cell-free system successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*. ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- (8) Takeo S.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates. ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- (9) Cao J.
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*. ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- (10) Tsuboi T., Takeo S., Otsuki H, Torii M.
Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine candidate discovery. 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Jeju Island, Korea, September 29 – October 3, 2008.
- (11) Otsuki H.
Erythrocyte- Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*. 19th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, September, 2008.
- (12) Tsuboi T.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2008.
- (13) Tsuboi T.
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. Symposium on Capacity Building for Malaria Vaccine Development, Pune, India, June 21, 2008.
- (14) Tsuboi T.
Genome-wide malaria vaccine candidate discovery using wheat germ cell-free system. JSPS presents Sweden–Japan joint Seminar, Malaria Research – Diversity & Control, Stockholm, Sweden, June 11, 2008.
- (15) Tsuboi T.
Expression of malaria vaccine candidates using a wheat germ cell-free protein synthesis system without codon optimization. Third molecular Approaches to Malaria Meeting, Lorne, Australia, February 3-7, 2008.
- (16) Takeo S.
Functional production of malaria proteins with wheat germ cell-free system. Keystone Symposia, Structural Genomics and its Applications to Chemistry, Biology and Medicine, Steamboat Springs, USA, January 6 - 11, 2008.
- (17) Tsuboi T.
Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human antisera. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
- (18) Takeo S.
Chitinase: active recombinant protein from *Plasmodium vivax*. ASTMH 56th annual meeting, Philadelphia, USA, November 4-8, 2007.
- (19) Cao J.
Plasmodium falciparum rhoptry neck protein (PfRON2) expressed at both erythrocytic and pre-erythrocytic invasive parasites. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.
- (20) Tsuboi T.
Novel sporozoite antigen discovery of *Plasmodium falciparum* screened using human immunesera. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 4-7, 2007.
- (21) Tachibana M.
Transmission-blocking activity of DNA vaccine encoding *Plasmodium vivax*

gametocyte protein Pvs230. ASTMH 56th
annual meeting, Philadelphia, USA,
November 4-8, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI TAKAFUMI)
愛媛大学・無細胞生命科学工学研究
センター・教授
研究者番号：00188616

(2) 研究分担者

竹尾 暁 (TAKEO SATORU)
愛媛大学・無細胞生命科学工学研究
センター・講師
研究者番号：40302666