

令和 4 年 9 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03458

研究課題名(和文) 肝臓期マラリア原虫に対するバキュロウイルス自然免疫応答による殺傷メカニズム解析

研究課題名(英文) Evaluation of innate immune responses induced by baculovirus against malaria liver-stage parasites

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓期のPlasmodium bergheiが感染したマウスにバキュロウイルス(BV)を筋肉内接種すると、肝臓期原虫は完全に排除される。本研究では、(1)BVによる原虫排除におけるIFNシグナル伝達的重要性、(2)原虫排除に不可欠な新規のエフェクター分子の探索、(3)スポロゾイトに再度暴露された際に感染しうるのか？そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、(1)I型IFNによるシグナル伝達、(2)IFN-stimulated genesのうちTLR9非依存的に発現上昇した39種類遺伝子、(3)CSP以外にも重要な感染防御免疫応答を誘導する標的分子が存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BVは肝臓期マラリア原虫を即効的に排除し得る自然免疫だけではなく、繰り返しの原虫暴露を防御する長期的な獲得免疫応答を誘導する。(1)I型IFNによるシグナル伝達、(2)IFN-stimulated genesのうちTLR9非依存的に発現上昇した39種類遺伝子、(3)CSP以外にも重要な感染防御免疫応答を誘導する標的分子が存在することが明らかとなった。このような治療効果とその後の予防効果を同時に提供できる薬剤の発見は初めてである。マラリアの予防・治療における新しい戦略の立案につながる大きな学術的・社会的意義を持っている。

研究成果の概要(英文)：We have recently found that intramuscular administration of wild-type baculovirus to mice can provide elimination of liver-stage Plasmodium berghei. This study aims to address the importance of IFN signaling for parasite elimination, search for novel molecules involved in parasite elimination and novel mechanism of protection following multiple parasite exposure. We found that 39 candidates of IFN-stimulated genes play important roles in protection and there are novel molecules capable of inducing protection rather than CSP.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア スポロゾイト バキュロウイルス 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界で毎年2億人以上の感染者と50万人以上の死者を出す最悪の寄生虫感染症である。マラリア原虫の一種である三日熱マラリア原虫急性期(赤血球期)にアルテミシニンによる治療を行うことで症状が改善されるが、肝細胞中に原虫の休眠体(ヒプノゾイト)が残存し、数ヶ月~数年の期間を経て80%が再発する。このことが、マラリア撲滅にとって大きな障害となっている。ヒプノゾイトを排除できる唯一の薬剤としてプリマキンが用いられるが、プリマキンの問題点として以下の3つがある。

- 1) G6PD 欠損の患者に投与すると溶血性貧血を起こし死に到る可能性
- 2) 発疹、悪心、嘔吐、腹痛等の副作用があり、大量投与に不適
- 3) 根治治療(14日間)行っても時に再発が見られ、プリマキン低感受性原虫が発生する可能性

このような問題点からプリマキンの使用は慎重に行う必要がある。現在、プリマキンに代わる薬剤の探索が長年続けられてきているが、開発には至っていない。肝臓期原虫に有効な新しい治療薬の開発はマラリアを根絶させるために最も重要な課題である。我々は、肝臓期マラリア原虫に対する宿主自然免疫応答を研究する過程で「肝臓期マラリア原虫が感染しているマウスにバキュロウイルス(BV)を筋注すると、マラリア発症から100%免れる」ことを発見した(Talha et al., *J Immunol.* 2018)。新規三日熱マラリア治療薬としての可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究は、肝臓から遠く離れた大腿部に筋注したBVがどのようにして肝臓期マラリア原虫を殺傷するのか?を解明する。具体的にはBVが誘導する自然免疫応答関連分子群から機能分子を同定し、これら分子がマラリア原虫に感染した肝臓に作用した時に発動される宿主(マウス)由来の抗肝臓期原虫エフェクター分子を網羅的DNAアレイ法(肝臓)およびKOマウスを駆使して解明する。さらに、BV誘導性自然免疫応答による抗肝臓期原虫作用の持続性を感染防御率を指標として調べ、新規の抗マラリア薬あるいはマラリアワクチン用添加物の開発を提案する。

3. 研究の方法

肝臓期の*Plasmodium berghei*(Pb)が感染したBALB/cマウスにバキュロウイルス(BV)を筋肉内接種すると、肝臓期原虫は完全に排除される。BV接種時にはマウス血中にIFN-aやIFN-gが強力に産生誘導される。本研究では、(1)BVによる原虫排除におけるIFNシグナル伝達の重要性を検証、(2)BVが接種されたマウスの肝臓における遺伝子発現解析を網羅的に行い、原虫排除に不可欠な新規のエフェクター分子の探索、(3)排除された個体はその後、スポロゾイトに再度暴露された際に感染しうるのか?これらはマラリアコントロールにおいて重要課題であり、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

- (1) IFNシグナル伝達を欠いたC57BL/6マウスにスポロゾイトを感染させ、BV接種の有無で肝臓期原虫が排除されるか、野生型マウスと比較した。
- (2) 同定されたI型IFNのシグナル伝達経路の下流ではIFN-stimulated genesが発現誘導されるが、その数は300種類以上にのぼり、エフェクター分子の探索を困難とさせる。そこで、原虫排除に関与しないTLR9シグナル伝達経路に着目し、同経路で活性化された遺伝子群を除外することで、原虫排除に関連する遺伝子群の同定を試みた。
- (3) 肝臓期原虫殺傷メカニズムはTLR9非依存的・IFN-a/b依存的でありIFN-gやNK細胞の関与も予想された。抗アシアロGM1抗体を用いてマウスの生体内より完全にNK細胞を除去した後にBV筋注による肝臓期原虫の殺傷効果を調べた。BALB/c体内のNK細胞を枯渇させるために抗アシアロGM1抗体を用いた。抗体を投与してから48時間後にBVを投与し、さらにその24時間後に脾臓を解析してNK細胞の発現量を調べた結果、対照群にBVを投与したものではCD3⁺-DX5⁺NK細胞が脾臓のリンパ球において約4%であるのに対して、抗体によってNK細胞を枯渇したものではBV投与後であっても1%未満であり、マウス体内のNK細胞が枯渇されていることが確認できた。この条件下で実際にPb原虫を用いて感染実験を行った。
- (4) BALB/cマウスにPbのスポロゾイトをチャレンジ感染し、24時間後にBVを筋注して原虫を排除した。その5週間後に、Pb、*P. yoelii*(Py)ならびに、PfCSP置換型遺伝子組換えPb(Pf/Pb)のスポロゾイトをチャレンジ感染させた。各マウスは感染14日後まで血液塗抹標本作製し防御効果を判定した。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウスでは対照群に比べ、BV接種群で原虫血症が3日間遅延し感染を抑制する効果が認められた。一方、IFN- γ R1^{-/-}マウスでは部分的に、IFN- α R1^{-/-}マウスでは完全にBVによる感染抑制効果が消失した。BVによる原虫排除メカニズムにはI型IFNによるシグナル伝達が必要と考えられた。

- (2) 野生型マウスならびに TLR9-/-マウスに BV や TLR9 リガンドである CpG ODN1826 を接種し、6 時間後の肝臓サンプルを DNA マイクロアレイに供した。PBS 対照群に比較して BV 接種した野生型マウスでは 562 種類の遺伝子が 2 倍以上の遺伝子発現上昇を示した。このうち、TLR9 非依存的に発現上昇した遺伝子は 39 種類あり、肝臓期原虫の排除に参与することが予想される。昆虫ウイルスである BV は広範な哺乳類細胞に取り込まれ、複製することなく外来遺伝子を高発現できる。一方、BV には自然免疫応答を賦活するユニークなアジュバント効果があることから我々を含む世界の研究グループは、次世代ワクチンベクター開発に利用している。マラリアワクチンへの応用は我々のグループが世界をリードしている。BV のアジュバント効果は、TLR9 依存的・非依存的な経路が報告されているが、特に TLR9 非依存的な経路として細胞内 DNA センサー STING(stimulator of IFN genes)による認識シグナル経路からの I 型および II 型 IFN の誘導が起こる。この IFNs の誘導が、抗原特異的な細胞性免疫応答(獲得免疫)を惹起するアジュバント効果に起因していると考えられているが証明には至っていない。BV 誘導性自然免疫応答がアジュバント効果のみならず、肝臓期マラリア原虫を即効的かつ完全に殺傷することを発見した。今年度の成果として、BV 誘導性の抗肝臓期原虫エフェクター分子メカニズム・再感染防御メカニズムに参与すると予想される遺伝子 39 種類を同定したことは大きな成果である。
- (3) NK 細胞を枯渇した状態で BV 投与による原虫排除効果が働くのかについて調べた。BV を投与することによって NK 細胞を枯渇したマウスでの原虫排除率が 70%(7/10)、NK 細胞を枯渇していないマウスでは 80%(8/10)であり、NK 細胞に関係なく原虫を排除することができることが明らかとなった。
- (4) Pb 初回感染後、BV 接種により 90%以上のマウスで肝臓期原虫が排除された。再感染実験の結果、Pb に対して 80%のマウスが感染防御したが、Py 再感染群では全て感染した。一方、Pf/Pb 再感染群でも 100%の感染防御効果を示し、逆に Pf/Pb 排除後のマウスに野生型 Pb を再感染させた場合でも 80%が感染防御した。ELISA の結果、防御したマウスでは暴露した原虫種に応じて抗 PfCSP 抗体や抗 PbCSP 抗体が生じていた。BV によって Pb 原虫が排除されたマウスでは、Py 抗原とは異なり、かつ、CSP 以外の抗原に対する獲得免疫応答、特に細胞性免疫応答が重要であることが考えられた。マラリアワクチン肝臓期抗原として CSP 以外にも重要な感染防御免疫応答を誘導する標的分子が存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iyori M, Ogawa R, Bin Emran T, Tanbo S, Yoshida S	4. 巻 20
2. 論文標題 Characterization of the gene expression patterns in the murine liver following intramuscular administration of baculovirus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene Expr	6. 最初と最後の頁 147, 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3727/105221620x16039045978676	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	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 M, 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 Front Immunol	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 Islam A, Emran TB, Yamamoto DS, Iyori M, Amelia F, Yusuf Y, Yamaguchi R, Alam MS, Silveira H, Yoshida S	4. 巻 9(1)
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 Sci Rep	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 該当する

1. 著者名 Amelia F, Iyori M, Emran TB, Yamamoto DS, Genshi K, Otsuka H, Onoue Y, Yusuf Y, Islam A, Yoshida S	4. 巻 41
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 Immunol	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 林 久輝、伊従光洋、吉田栄人
2. 発表標題 感染防御効果向上を目指したマラリアワクチン候補抗原PfCSPの発現メカニズム解析
3. 学会等名 第76回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊従 光洋、井谷慧、新倉 保、辻村聡恵、小林 富美恵、吉田栄人
2. 発表標題 バキュロウイルスによる肝臓期マラリア原虫の排除と感染防御免疫に関する研究
3. 学会等名 第76回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 久輝、伊従 光洋、吉田 栄人
2. 発表標題 臨床応用に向けたマラリアワクチン抗原タンパクのプロセッシングに関する分子機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤 弘明、坂本 明彦、橋本 ひなた、水野 哲志、阿部 優一、小川 良平、伊従 光洋、志田 壽利、吉田 栄人
2. 発表標題 次世代型COVID-19ワクチンの開発 -遺伝子組換えウイルスワクチンは高レベルでの中和抗体を誘導
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原 那実、伊従 光洋、山口 莉理夏、岡 ひかる、湯口 貴聡、吉田 邦嵩、吉井 達也、高島 英造、坪井 敬文、吉田 栄人
2. 発表標題 ハマダラカ唾液タンパクを利用した新規抗血小板薬候補のスクリーニングに関する研究
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤 弘明、坂本 明彦、橋本 ひなた、水野 哲志、阿部 優一、小川 良平、伊従 光洋、志田 壽利、吉田 栄人
2. 発表標題 純国産弱毒生ワクチンをベクターとした新規COVID-19ワクチンはマウスモデルでS-偽型ウイルスに対して中和抗体を誘導する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田栄人
2. 発表標題 A viral-vectored multi-stage malaria vaccine regimen with protective and transmission-blocking efficacies
3. 学会等名 4th Global Conference and Expo on Vaccines Research & Development (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Iyori M、Amelia F、Yusuf Y、Yamamoto DS、Fukumoto S、Yoshida K、Genshi K、Yoshii T、Mizukami H、Yoshida S
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 Islam A、Iyori M、Yamamoto DS、Tuno N、Yamaguchi R、Silveira H、Yoshida S
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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊従光洋、小川 良平、新倉 保、Talha Bin Emran、丹保 秀太、井上 信一、小林富美恵、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 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 Shahnaïj M, Iyori M, Islam A, Syafira I, IYamagoshi I, Kajino M, Yoshida S
2. 発表標題 Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoite challenge
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 Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Yoshida S
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 井谷慧、伊從光洋、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 Iyori M, Amelia F, Genshi K, Onoue Y, Emran TB, Yoshida S
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
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 マラリアワクチン	発明者 吉田 栄人、水上 浩明、伊従 光洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-207373	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

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

〔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	伊従 光洋 (Iyori Mitsuhiro) (20608351)	金沢大学・薬学系・准教授 (13301)	
研究分担者	新倉 保 (Niikura Tamotu) (30407019)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
研究分担者	小川 良平 (Ogawa Ryohei) (60334736)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	

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
---------	---------