

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16629

研究課題名（和文）熱帯熱マラリア原虫Riprによる赤血球表面認識機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of erythrocyte surface recognition mechanism by Plasmodium falciparum Ripr

研究代表者

長岡 ひかる（NAGAOKA, HIKARU）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・研究員

研究者番号：10757222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアは、毎年2億人あまりが罹患し約40万人が死に至る感染症である。本研究ではメロソイトの赤血球侵入過程の一端を明らかにするため、自身が見出した熱帯熱マラリア発病阻止ワクチン候補抗原であるRiprに対するモノクローナル抗体を作出することを目的とした。まずRipr抗原をマウスに免疫し51種の抗体産生クローンを樹立した。その中から原虫分子へ特異的に反応する抗体を培養原虫のIFAによって11種選別した。さらに抗原への反応性をSPRによって検証し最終的に4種のモノクローナル抗体を獲得することに成功した。今後は構造解析などによってRipr分子の赤血球侵入過程を分子レベルで明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは、毎年2億人あまりが罹患し約40万人が死に至る感染症で、マラリアワクチンの実現は喫緊の課題である。近年我々は優れたワクチン候補分子であるRipr、そしてそのワクチン活性責任部位(Ripr1-5)を見出すことに成功し、現在Ripr1-5を抗原としたワクチンを前臨床開発中である。しかし依然として、Ripr1-5抗原のさらなる改良をする必要性は非常に高い。本研究で得られた4種類の抗Ripr1-5モノクローナル抗体の原虫侵入阻害を分子レベルに明らかにすることで、Riprの機能と構造、またRiprに關与するメロソイト侵入メカニズムに立脚したワクチン開発が可能となり、マラリア撲滅を加速できる。

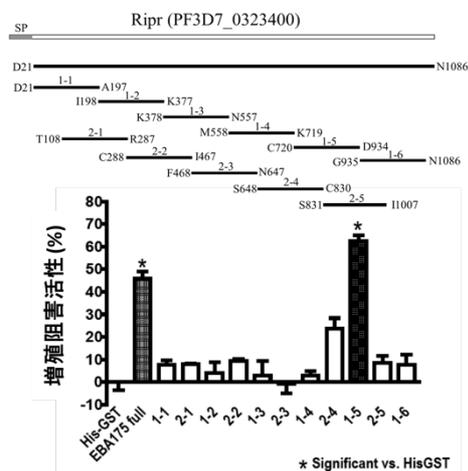
研究成果の概要（英文）：Plasmodium falciparum malaria afflicts an estimated 205-316 million people annually, with an estimated 400,000 deaths. The development of a blood-stage vaccine against the disease is urgently needed. This research aimed to establish mouse monoclonal antibodies against the P. falciparum Ripr 1-5, a promising blood-stage vaccine target preventing merozoite invasion to the erythrocyte. The 11 monoclonal antibodies were selected from 51 clones by the reactivity to the cultured parasites using IFA. Then, we characterized the clones with SPR to reveal the affinity to PfRipr 1-5, and growth inhibition activity to the cultured parasites. In conclusion, we have established 4 monoclonal antibodies. The monoclonal are useful for quality control of PfRipr1-5 antigen in the development of the vaccine. Characterization of structural epitopes is essential for further study, identifying the mode of action of the antibodies and exploring the molecular mechanisms of merozoite invasion.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ワクチン モノクローナル抗体 コムギ無細胞

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、毎年2億人あまりが罹患し約40万人が死に至る感染症であるが、ここ数年でマラリアによる死亡者数は減少傾向に転じ、エリミネーションが視野に入ってきた。しかしマラリア罹患率の減少による集団免疫の低下が問題視されており、そのため赤血球期マラリアワクチンの必要性がより一層高まっている(坪井, 高島, 2015, *Lancet infect Dis*; WHO, 2016, *Eliminating Malaria*)。そこで申請者らは熱帯熱マラリア原虫の赤血球期に発現するタンパク質を抗原とし、148種のウサギ抗体における原虫増殖阻害活性を比較した。その結果抗 Ripr 抗体は、すでにワクチン候補抗原として着目されている抗 Rh5 抗体よりも高い原虫増殖阻害活性を持つことが明らかとなった。Ripr は 1086 アミノ酸からなる巨大分子であるが、驚くことに、マラリア流行地であるウガンダ人患者から分離された原虫株 (n=80) においても大部分が標準株である 3D7 と同一の配列を有していただけでなく、その他の実験室原虫株においても相同性 99% と高度に保存されていた。これらのことから Ripr は有望な赤血球期ワクチン候補抗原である事がわかった (Ntege EH ら, 2016, *Vaccine*)。さらに申請者らは Ripr 全長配列の一部 (C720-D934) が抗 Ripr 全長抗体と同等の原虫増殖阻害活性を有する抗体を誘導することができる事を見出した (右図, マラリアワクチン PCT/JP2017/040532; 特願 2017-164412)。この抗原を「Ripr1-5」と名付け前臨床試験への準備をすすめている。



2. 研究の目的

本研究は、Ripr 分子がマラリア原虫の赤血球侵入時にどのように働いているのかを明らかにするために、原虫増殖阻害活性を持つ抗 Ripr モノクローナル抗体を複数作出し、タンパク質相互作用阻害活性と原虫増殖阻害活性を比較することを目的とする。これにより Ripr 複合体が赤血球侵入にどのように機能するのかを分子レベルで解明することで、赤血球侵入機構の一端を明らかにすることができる。さらに、Ripr によるマラリアワクチン抗原の最適化を加速することができる。

3. 研究の方法

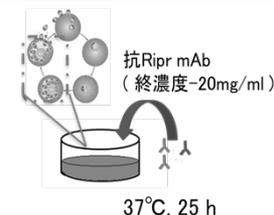
1. 抗 Ripr モノクローナル抗体の作成

マウスに Ripr 抗原を免疫し、常法に則ってハイブリドーマを作製する。ハイブリドーマ培養液に生じるモノクローナル抗体のうち、Ripr1-5 と結合するクローンを、間接蛍光抗体法 (IFA), ELISA および SPR を用いて選別する。これにより Ripr1-5 に結合するクローンを多数得ることができる。

2. モノクローナル抗体を用いた侵入阻害試験

当該モノクローナル抗体による熱帯熱マラリア原虫侵入阻害活性を測定する。同調したシズント期の熱帯熱マラリア原虫に精製した抗体を添加後、25 時間の培養を行い、生じた感染赤血数を陰性対照と比較することで原虫侵入阻害活性を測定する (右図)

マラリア原虫侵入阻害活性方法



3. Biacore による詳細なタンパク質相互作用阻害活性測定

Biacore はタンパク質相互作用を詳細にリアルタイムで観察できる。これを用いて Ripr と他のタンパク質との相互作用を、どのような強さで阻害するのかを、当該モノクローナル抗体の濃度を段階的に変化させることによって明らかにする。また当該モノクローナル抗体が Ripr とどの程度強く結合するのかについても検証する。

4. 研究成果

《抗 Ripr モノクローナル抗体の作成》

まず、全長 Ripr 分子を抗原としてマウスに免疫しハイブリドーマを作成して 51 種の抗 Ripr モノクローナル抗体を作出した。これらの培養上清を用いて免疫蛍光抗体法を行い、熱帯熱マラリア原虫内の Ripr 分子に反応するモノクローナル抗体を 11 種類獲得した(図 1)。

Monoclonal antibody											
1	-	11	+	21	-	31	-	41	-	51	+
2	-	12	-	22	-	32	-	42	+		
3	-	13	-	23	-	33	-	43	-		
4	-	14	-	24	-	34	-	44	+		
5	-	15	-	25	-	35	-	45	-		
6	-	16	+	26	-	36	+	46	+		
7	-	17	-	27	-	37	-	47	+		
8	-	18	+	28	-	38	-	48	-		
9	-	19	+	29	-	39	-	49	+		
10	-	20	-	30	-	40	+	50	-		

＋；反応あり，－；反応なし。

図 1. 間接蛍光抗体法を用いた原虫内 Ripr 分子に反応する特異的抗体の選定

さらに、これら 11 種の抗体の培養上清を用いて Ripr1-5 抗原への反応性を ELISA 法および SPR を用いて検証し 4 種のモノクローナル抗体(#36, 40, 42, 47)を同定した(図 2)。

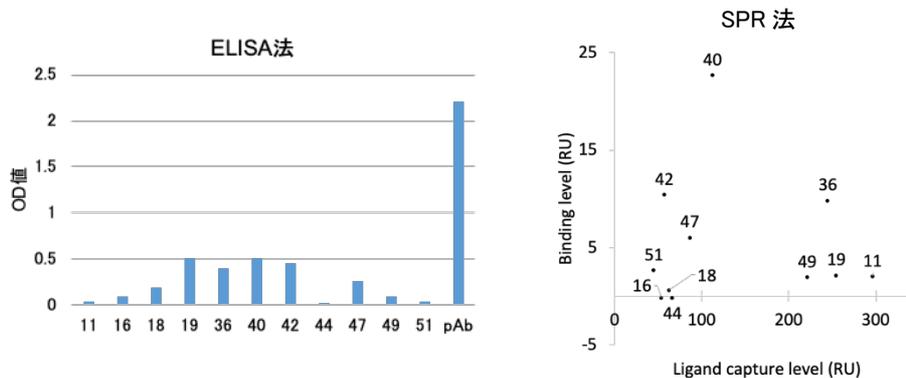


図 2. ELISA 法および SPR 法を用いた Ripr1-5 特異的抗体の選定

《モノクローナル抗体を用いた侵入阻害試験》

原虫の赤血球侵入時に関与するモノクローナル抗体を選出するため、培養熱帯熱マラリア原虫に対する侵入阻害活性を測定した。侵入阻害活性の測定は、培養上清から精製した精製 IgG を用いて行った。まず、大量培養するモノクローナル抗体を選出するため、間接蛍光抗体法で原虫 Ripr に反応したモノクローナル抗体の培養上清から IgG を精製し、侵入阻害活性を測定した(図 3)。その結果、モノクローナル抗体#11, 16, 18, 19, 42, 47, 49 の 7 種類が数%の赤血球侵入阻害活性を示した。

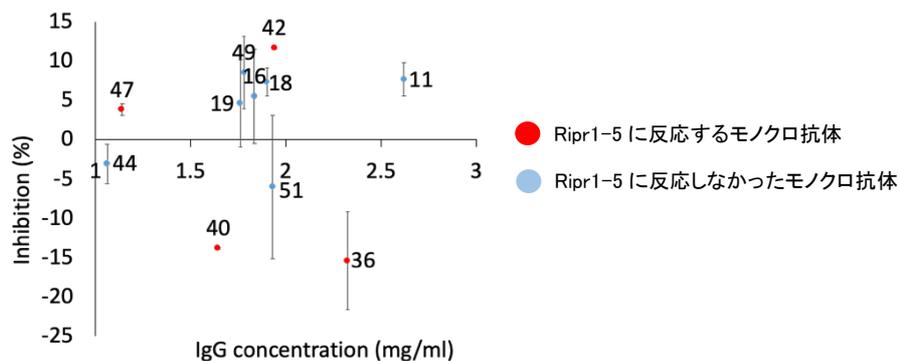


図 3. 培養上清から精製した IgG を使用した侵入阻害活性

続いて、Ripr1-5 に特異的に反応し、赤血球侵入阻害活性を示す可能性のある抗体 2 種 (#42, 47) および阻害活性を示さない可能性のある抗体 2 種 (#36, 40) をそれぞれ大量に作成して、原虫に対する赤血球侵入阻害活性を濃度依存的に測定した。その結果、予想通りモノクローナル抗体#42 および#47 はメロゾイト侵入阻害活性を示し、原虫の赤血球侵入に関与する領域に結合することが考えられた。今後はタンパク質立体構造解析によって、当該 4 種のモノクローナル抗体の立体エピトープを解析し、Ripr 分子を介した赤血球侵入過程のメカニズムを分子レベルで明らかにしていく予定である。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Ntege Edward H., Aoki Masamitsu, Fukushima Akihisa, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibodies against a short region of PfRipr inhibit Plasmodium falciparum merozoite invasion and PfRipr interaction with Rh5 and SEMA7A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63611-6	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 Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Morita Masayuki, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 80
2. 論文標題 Leveraging the wheat germ cell-free protein synthesis system to accelerate malaria vaccine development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102224 - 102224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2020.102224	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 Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, White Michael T., Morita Masayuki, Palacpac Nirianne M. Q., Ntege Edward H., Balikagala Betty, Yeka Adoke, Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 11
2. 論文標題 Global Repertoire of Human Antibodies Against Plasmodium falciparum RIFINs, SURFINs, and STEVORs in a Malaria Exposed Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.00893	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 Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Morita Masayuki, Nakata Takahiro, Palacpac Nirianne M.Q., Egwang Thomas G., Horii Toshihiro, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo	4. 巻 80
2. 論文標題 Characterization of a Plasmodium falciparum PHISTc protein, PF3D7_0801000, in blood-stage malaria parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102240 - 102240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2020.102240	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長岡ひかる, カノイ・バーナード, 神岡花奈, 森田将之, ニリアン・バラクパック, 堀井 俊宏, 坪井敬文, 高島英造
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫MSP10の赤血球侵入におけるメカニズムの解明
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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