

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06990

研究課題名（和文）熱帯熱マラリアワクチン候補抗原GAMAの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of malaria vaccine candidate antigen GAMA

研究代表者

長岡 ひかる（NAGAOKA, HIKARU）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト講師

研究者番号：10757222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアワクチン開発は喫緊の課題である。本研究では、近年見出した赤血球期ワクチン候補抗原であるGPI-anchored merozoite antigen (GAMA)の赤血球侵入における分子機能を明らかにすることで、GAMA分子がマラリアワクチン候補になりうるか検討した。まず、1)ヒト赤血球表面タンパク質ライブラリーによるGAMA相互作用分子の探索、2)抗GAMA8モノクローナル抗体（mAb）の作製、3)mAbによる原虫増殖に対する阻害活性の測定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱帯熱マラリアゲノムが解読されて以来、欧米の研究者によりゲノムワイドな原虫組換えタンパク質の合成が試みられた。しかし、熱帯熱マラリア原虫遺伝子は76%ものAT含量でかつ繰り返し配列に富むため、大腸菌等の既存の発現系ではマラリア原虫の組換えタンパク質をほとんど合成できず、ポストゲノム時代のマラリアワクチン研究は大きな技術的障壁に直面していた。本研究は、他の研究機関には無い独自のバイオリソースを駆使することによってのみ実行可能であり、世界に先駆けてマラリア原虫の分子機能を明らかにする手法を確立したことは重要である。

研究成果の概要（英文）：The development of a malaria vaccine is very importance. In this study, we investigated the molecular function of GPI-anchored merozoite antigen (GAMA), this protein was recently discovered as a candidate antigen for blood stage vaccine. We want to clarify molecular function of this protein in erythrocyte invasion.

1) searched for GAMA interacting molecules using a human erythrocyte surface protein library, 2) generated the anti-GAMA monoclonal antibodies (mAb), and 3) measured growth inhibitory activity of the mAbs against Plasmodium falciparum.

研究分野：Parasitlogy

キーワード：Malaria Blood stage GAMA

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、マラリアによる症状を軽減することのできる赤血球期原虫に対するマラリアワクチンの必要性がより一層高まっている (Takashima & Tsuboi, *Lancet Infect Dis.* 2016; WHO, *Eliminating Malaria*, 2019)。これまで、赤血球期ワクチンの候補抗原探索の一環として、また「なぜ、どのように赤血球に侵入するのか?」という寄生虫学の根幹的疑問に答えるため、熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入分子機構に関する研究は数多くの寄生虫学者の興味をそそってきた。そこで申請者らは、赤血球侵入に重要なタンパク質を同定するため、また赤血球期ワクチンの候補抗原探索の一環として、メロゾイト期特異的に発現が予想される148種の分子をコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて発現、ウサギに免疫し、培養熱帯熱マラリア原虫増殖阻害活性を網羅的に比較した。その結果、抗GAMA抗体は、現在ワクチン開発が進められているRh5に対する抗体と遜色ない原虫増殖阻害活性を持つことが明らかになった。さらに我々は、GAMAがメロゾイト表面に局在し、赤血球表面に結合すること (Arumugam, et al. *Infect Immun* 2011)、流行地においてもその遺伝子配列は高度に保存されている事を明らかにした (Ntege, et al, *Vaccine* 2016)。このことから、GAMAは赤血球期ワクチンの有望な候補抗原であると共に、原虫が赤血球表面を認識する機構を理解する上で重要な分子の一つであると考えた。

ではGAMAは、メロゾイトの赤血球侵入にどのような機能を有するのであろうか?

最近申請者は、GAMAがメロゾイト表面タンパク質MSP10と直接結合していることを見出した (Nagaoka et al, *Front Immunol*, 2019)。これは、全て先端部小器官に局在する分子からなる有名なRh5-Ripr-CyRPA複合体 (図1)とは異なる第2のメロゾイトリガンド複合体の発見である。したがって、GAMAに着目することによって新たな切り口でメロゾイトの赤血球侵入分子メカニズムを解析できると考えた。

2. 研究の目的

最近申請者は、GAMA抗原のワクチン最適化を試み、GAMA分子のC末端側に位置するわずか114アミノ酸からなる領域に対する抗体が、抗GAMA全長抗体よりも強い原虫増殖阻害活性を有し (PCT/JP2017/040535; 特願2016-220515)、さらにGAMA8が赤血球に接着することを見出した。そこで本申請では、GAMA8がメロゾイトの赤血球侵入にどのような分子機能を有するのか明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 【GAMA分子の赤血球側受容体の探索】

GAMA分子の赤血球表面レセプターを同定するため、本研究室に保存されている354種ものヒト赤血球表面タンパク質ライブラリーとコムギ無細胞系で発現したGAMAの相互作用を、確立済みのアルファスクリーンでハイスループットに測定する (図3, Nagaoka et al. *Sci Rep* 2019)。

2) 【抗GAMAモノクローナル抗体の作製および特異性の検証】

GAMA8の赤血球侵入阻止抗体のエピトープを同定するため、GAMA8を抗原としてモノクローナル抗体(mAb)を作製する。マウスにGAMA8を免疫し、GAMA8と結合するmAbを確立済みのアルファスクリーン法を用いてクローン化する。これによりmAbをハイスループットに樹立できる。さらに得られたmAbが、原虫のGAMAタンパク質を特異的に認識する事を確認するため、当該mAbによるウエスタンブロッティングおよび免疫蛍光抗体法を実施する。さらに、GAMA8は分子量が小さく、システイン残基も存在しないため、オーバーラッピングペプチドを作製し、得られたmAbのエピトープを決定する。

3) 【mAbを用いた侵入阻害試験】

上記のmAbによるGAMA8-赤血球レセプター相互作用阻害の生理的意義を明らかにするため、培養熱帯熱マラリア原虫に対するmAbの増殖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mAbを添加後、25時間培養し、感染赤血球数をフローサイトメトリーを用いて測定し、原虫増殖阻害活性を計算する。

4. 研究成果

2021年度は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて GST タグ付き GAMA タンパク質および赤血球側タンパク質ライブラリーの発現を行い SDS-PAGE もしくはウェスタンブロッティングを用いて発現の確認を行なった。さらにアルファスクリーンを用いて複数個の相互作用分子を発見した。GAMA8 抗原に対するマウスモノクローナル抗体の作成に関しては、GAMA8 タンパク質をマウスへと免疫した。

2022年度は、免疫後に得られた血清を用いてウェスタンブロットおよび間接蛍光抗体法を用いて原虫への反応性を確認した。さらに GAMA8 抗原に対するラビットモノクローナル抗体を新たに作成し免疫後に得られた血清を用いてウェスタンブロットおよび間接蛍光抗体法を用いて原虫への反応性を確認した。さらに反応が確認された抗体を用いて培養熱帯熱マラリア原虫に対し増殖阻害活性を測定するために抗体の大量合成を試みた。

最終年度である 2023 年度は、数段階の濃度を用いて作成した抗体の増殖阻害活性を測定することにより、GAMA8mAb の中でもワクチン候補領域となりうる抗原の選択を試みた。また原虫の侵入を阻害する mAb と阻害しない mAb を各複数クローン樹立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kohdai Yamada 1, Fumiya Soga 1, Soh Tokunaga 1, Hikaru Nagaoka 2, Tatsuhiko Ozawa 3, Hiroyuki Kishi 3, Eizo Takashima 2, Tatsuya Sawasaki 4	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 GATS tag system is compatible with biotin labelling methods for protein analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 10243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-36858-y.	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 Hamasaki Eriko, Wakita Natsuki, Yasuoka Hiroki, Nagaoka Hikaru, Morita Masayuki, Takashima Eizo, Uchihashi Takayuki, Takeda Tetsuya, Abe Tadashi, Lee Ji-Won, Iimura Tadahiro, Saleem Moin A, Ogo Naohisa, Asai Akira, Narita Akihiro, Takei Kohji, Yamada Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 The Lipid-Binding Defective Dynamins 2 Mutant in Charcot-Marie-Tooth Disease Impairs Proper Actin Bundling and Actin Organization in Glomerular Podocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	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/fcell.2022.884509	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 Takashima Eizo, Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Morita Masayuki, Hassan Ifra, Palacpac Nirianne M. Q., Ewang Thomas G., Horii Toshihiro, Gitaka Jesse, Tsuboi Takafumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Meta-Analysis of Human Antibodies Against Plasmodium falciparum Variable Surface and Merozoite Stage Antigens	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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.2022.887219	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 Correia Ricardo, Fernandes B, Castro Rute, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Tsuboi Takafumi, Fukushima Akihisa, Viebig Nicola K., Depraetere Hilde, Alves Paula M., Roldão António	4. 巻 10
2. 論文標題 Asexual Blood-Stage Malaria Vaccine Candidate PfRipr5: Enhanced Production in Insect Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	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/fbioe.2022.908509	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 Yamada Hiroshi, Abe Tadashi, Nagaoka Hikaru, Takashima Eizo, Nitta Ryo, Yamamoto Masahiro, Takei Kohji	4. 巻 12
2. 論文標題 Recruitment of Irgb6 to the membrane is a direct trigger for membrane deformation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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/fcimb.2022.992198	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 Mazhari Ramin, Takashima Eizo, Longley Rhea J., Ruybal-Pesantez Shazia, White Michael T., Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Kiniboro Benson, Siba Peter, Tsuboi Takafumi, Mueller Ivo	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of novel Plasmodium vivax proteins associated with protection against clinical malaria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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/fcimb.2023.1076150	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 Takashima Eizo, Tachibana Mayumi, Morita Masayuki, Nagaoka Hikaru, Kanoi Bernard N., Tsuboi Takafumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Novel Malaria Transmission-Blocking Vaccine Candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 805482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.805482	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 Muthui Michelle K., Takashima Eizo, Omondi Brian R., Kinya Christine, Muasya William I., Nagaoka Hikaru, Mwai Kennedy W., Orindi Benedict, Wambua Juliana, Bousema Teun, Drakeley Chris, Blagborough Andrew M., Marsh Kevin, Bejon Philip, Kapulu Melissa C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of Naturally Acquired Immunity to a Panel of Antigens Expressed in Mature P. falciparum Gametocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 774537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.774537	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 Yuguchi Takaaki, Kanoi Bernard N., Nagaoka Hikaru, Miura Toyokazu, Ito Daisuke, Takeda Hiroyuki, Tsuboi Takafumi, Takashima Eizo, Otsuki Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasmodium yoelii Erythrocyte Binding Like Protein Interacts With Basigin, an Erythrocyte Surface Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 656620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.656620	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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長岡ひかる
2. 発表標題 Plasmodium falciparum PF3D7_0715200 is a merozoite surface protein that induces antibodies with mild growth inhibitory activity.
3. 学会等名 ASTMH 2022 Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長岡ひかる, カノイ・バーナード, 森田将之, 中田貴敬, 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 赤血球期熱帯熱マラリア原虫PHISTcタンパク質Pf3D7_0801000の性状解析
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長岡ひかる, 小川晃輝, カノイ・バーナード, 坪井敬文, 高島英造
2. 発表標題 三日熱マラリア原虫タンパク質MSP7の生化学的解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hikaru Nagaoka
2. 発表標題 Reverse vaccinology approach for discovery of novel malaria blood-stage vaccine candidates: The case of Ripr5.
3. 学会等名 9th Academic symposium, The Genetics, Biology, and Epidemiology of Diseases of Poverty. (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長岡 ひかる, 福島 晃久, 坪井 敬文, 高島 英造
2. 発表標題 熱帯熱マalaria原虫メロゾイト侵入機構解明に向けた原虫増殖活性を有する抗 Ripr モノクローナル抗体の作出
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022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