

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23406007

研究課題名(和文) 防御免疫を有する感染者血清を用いたマラリアワクチン候補抗原の探索

研究課題名(英文) Screening of novel malaria vaccine candidates with protective immune sera

研究代表者

坪井 敬文 (Tsuboi, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：パプアニューギニアの小児コホートから熱帯熱及び三日熱マラリアの新規ワクチン候補探索に使用出来る血清試料を得た。また本研究で作製したプロテインアレイは熱帯熱マラリアゲノムの3分の1をカバーする大規模なもので他に類を見ない。更に微量な血清試料で高感度なスクリーニングシステムを確立し、フィールド試料が有効活用可能となった。このシステムでスクリーニングを試行し、1900種類中650種類の熱帯熱マラリア原虫タンパク質に対して抗体が検出できたことより、新規発症阻止ワクチン候補探索の技術基盤が確立したと考えられる。今後、熱帯熱及び三日熱マラリアの新規発症阻止ワクチン候補抗原の探索を実施する予定である。

研究成果の概要(英文)：To identify novel malaria vaccine candidates, we first obtained serum samples from the children enrolled in the malaria cohort study in Papua New Guinean. We then established a micro-scale immunoscreening system for high-throughput detection of antigen-antibody reaction. Genome-widely expressed 1,900 parasite proteins by the wheat germ cell-free system covering one-third of the parasite genome were screened by using the immunoscreening system. As a result of the preliminary screening, we identified 650 immunoreactive proteins with the malaria immune serum samples which we previously had enough amount. The result suggests that this screening system would be effective to discover novel malaria vaccine candidate s by using Papua New Guinean serum samples.

研究分野：医歯薬学A

科研費の分科・細目：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：原虫 マラリア ワクチン プロテインアレイ パプアニューギニア 国際研究者交流

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯地域において毎年3～5億人が罹患し、約100万人が死に至っているグローバルな感染症である。薬剤耐性原虫等の出現が大きな脅威となつて以来、新たな対策の切り札としてこれまで30年以上ワクチン開発が精力的に行われてきた。しかし、これまで研究されてきたワクチン候補抗原は10種に満たず未だ実用化に至ったものは一つもない。中でも赤血球期の原虫抗原を標的とする発症阻止ワクチンは流行地住民の防御免疫を強化しうるが、その開発は他種のマラリアワクチン開発と比べて最も遅れている。より有望なワクチン候補の探索のため、2002年以降マラリア原虫のゲノム情報が公開された。しかし、マラリア原虫遺伝子は、AT含量が平均76%と他種の生物と比べて非常に多くしかも繰り返し塩基配列が多いという特徴から、大腸菌等の既存の発現系では10%程度の低い効率でしか組換えタンパク質を合成出来ず、ポストゲノムマラリアワクチン研究は暗礁に乗り上げていた。2007年に再び「マラリア撲滅」が宣言され、その重点対策の一つとしてマラリアワクチン開発の強化、特に新規ワクチン候補抗原の探索の必要性が強調されている現在、ゲノム情報から効率的にワクチン候補を探索することのできる新技術の開発が急務となっていた。また、「マラリア撲滅」を目指す上では、死亡の最大原因である熱帯熱マラリアのみならず、患者数が熱帯熱マラリアと同等あるいはそれ以上である三日熱マラリアに対するワクチン候補探索も視野に入れた取り組みが必須となっている。つまり、この2種で世界のマラリア患者の90%以上を占めている。

2. 研究の目的

新規マラリア発症阻止ワクチン候補抗原の同定を目的に、パプアニューギニアで実施する小児のコホート研究において熱帯熱マラリア及び三日熱マラリアに対する防御免疫保有者及び非保有者を系統的に選別し、血清試料を入手する。さらに、得られた血清試料を用いてコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作製した熱帯熱及び三日熱マラリア原虫プロテインアレイをスクリーニングし、防御免疫と相関する両種の原虫抗原の同定し、新規発症阻止ワクチン候補探索の技術基盤確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 調査研究対象地域

本研究では、パプアニューギニア北西部東セピック州アルピナマ村を調査対象地域とする。マダン市にあるパプアニューギニア医学研究所が、マラリアの流行と診断法の検討、薬物治療及び蚊帳の効果調べるためのコホート研究として、東セピック州アルピナマ村周辺地域の複数のヘルスセンターにおい

て継続的に患者の発生状況調査を実施してきた。これまでの調査において、この地域内では、熱帯熱及び三日熱マラリアの流行が小児期をピークに同程度高度に認められることが判明している。

(2) 調査対象者

上述の調査対象地域においては、年間を通して熱帯熱及び三日熱マラリアの流行が高度に継続していることが知られており、また、両種マラリアの感染率が高く、かつ防御免疫を有している者といない者がいずれも多数存在する可能性の高い5～10歳の小児約400名を調査研究対象とした。

(3) 血清試料の採取

観察期間中の新規のマラリア感染者を正確に把握するため、調査開始前に対象者全員に抗マラリア薬を投与し、原虫を体内から除去した。調査開始時に1回目の採血を行い、得られた血清試料を分注保存した。その後現地スタッフが対象者の家庭を2週間毎に訪問し、発熱等のマラリアを疑わせる症状の有無、指先採血によるマラリア感染の有無、熱帯熱及び三日熱マラリア原虫率、血色素濃度の測定を10ヶ月間行い、対象者別にデータベース化した。それらの結果を解析することにより、対象者を「非感染者」つまり感染の機会がなかったかもしくは感染防御免疫保有しているため感染しなかった者、「感染したが発症無し」つまり発症防御免疫保有者、「発症者」つまり防御免疫非保有者の3群に分類した。今回の研究では、高度流行地で最も有用と考えられている発症阻止ワクチン候補の探索に重点を置くため、後者の2群に該当する血清試料を選別した。

(4) プロテインアレイの完成と免疫スクリーニング

申請者は、熱帯熱マラリア赤血球期原虫タンパク質400種類からなる熱帯熱マラリアプロテインアレイ、及び三日熱マラリア赤血球期原虫タンパク質200種類からなる三日熱マラリアプロテインアレイを作製していた。研究開始当初、申請者らが既に樹立していた抗原吸着マイクロビーズと抗体吸着マイクロビーズを同一反応系に入れ、両者の相互作用に基づく免疫スクリーニングシステムを用いて、それとヒト血清との反応性を解析することにより、それぞれの組換えタンパク質に対する抗体保有状況をハイスループットに測定する予定であった。しかし、出来るだけゲノムワイドに解析出来る技術基盤を樹立するため、免疫スクリーニングに先駆けて、熱帯熱マラリア及び三日熱マラリア原虫の組換えタンパク質の種類を増加させること、また小児から得られる血清試料が少量であるため、使用する血清量を微量で測定できるようにシステムの改良を実施することとした。

4. 研究成果

(1) 研究対象地域の訪問、研究打ち合わせ及び血清試料の入手

平成 23 年度にパプアニューギニア医学研究所を訪問し、研究打ち合わせを実施した。パプアニューギニアの小児コホートから得られた血清を本研究に使用するため、パプアニューギニア医学研究所の倫理委員会に申請し許可された。また、平成 24 年度にパプアニューギニア医学研究所長らが愛媛大学を訪れ、研究打ち合わせを実施した。さらに同年、パプアニューギニア医学研究所を訪問し、研究打ち合わせを実施した後、マリックのフィールドラボおよびフィールドサイトを訪問し、本研究で使用する血清試料の輸送準備を行った。平成 25 年度に合計 600 検体の血清試料を愛媛大学に輸送が完了し、愛媛大学における血清使用の許可が、同倫理委員会で承認された。本血清試料は、横断研究ではなく、熱帯熱及び三日熱マラリアの感染率の高い地域における小児のコホート研究による全対象者の継続的なモニタリング(アクティブケースデテクション)により得られたものである。マラリア流行地におけるこのようなコホート研究の実施は容易ではない。さらに、マラリア感染率の高いアフリカには三日熱マラリアは存在していない。一方、東南アジア諸国には両種のマラリアが存在しているが感染率が低い。そこで、小児期の熱帯熱及び三日熱マラリア原虫感染率がいずれも 30% あまりとなるパプアニューギニアのマラリア流行地から得られた本血清試料は、熱帯熱マラリアのみならず三日熱マラリアに対する新規ワクチン候補探索に使用することの出来る、世界的に見ても貴重なものである。

(2) マラリア原虫ゲノムワイドなプロテインアレイの充実

研究開始当初、熱帯熱マラリア赤血球期原虫タンパク質 400 種類、及び三日熱マラリア赤血球期原虫タンパク質 200 種類からなるプロテインアレイを作製していた。熱帯熱マラリア及び三日熱マラリア原虫いずれに対しても、組換えタンパク質の種類を増加させることによって、ゲノム網羅的な探索を可能とするため、熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイを約 1900 種類にまで増加させた。これは、熱帯熱マラリア原虫ゲノムの 3 分の 1 をカバーするものである。また、三日熱マラリア原虫タンパク質も約 300 種類にまで増加させることが出来た。以上により、熱帯熱マラリア及び三日熱マラリア原虫のプロテインアレイの充実が出来た。これらの非常に多種類のタンパク質を有するプロテインアレイは世界最先端の研究基盤であり、しかも真核型のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成されているため、既存の大腸菌を用いて合成されたタンパク質アレイをしの

ぐ品質を有している。

3) 免疫スクリーニングシステムの至適化

小児から得られる血清試料が少量であるため、使用する血清量を微量で測定できるようにシステムの改良を試行した。すなわち、熱帯熱マラリア原虫で作製した高速免疫スクリーニングシステムの反応条件の最適化を行い、以前確立していた反応系よりも、必要な組換えタンパク質量並びに必要な血清量がいずれも 10 分の 1 で良好な感度が得られるようになった。この改良は、本研究で入手できた研究試料のように、入手の困難なフィールドサンプルの有効利用に大きく貢献するものと考えられる。

4) 熱帯熱マラリア原虫のプロテインアレイの予備的スクリーニングの実施

パプアニューギニア医学研究所から入手した小児血清試料は微量かつ貴重であるため、それを有効に活用して新規ワクチン候補抗原の探索を開始する前に、熱帯熱マラリア原虫の 1900 種のタンパク質からなるプロテインアレイの品質評価を行う必要があった。そこで、既に保有している血清検体の中で比較的量に余裕のあるマラリア流行地試料 50 検体を用いて、熱帯熱マラリアプロテインアレイを用いたハイスループット免疫スクリーニングを実施した。その結果、1900 種類の内、約 650 種類の熱帯熱マラリア原虫タンパク質に対して、流行地住民血清中に抗体が誘導されていることが明らかとなった。したがって、本スクリーニングシステムを用いて、微量な小児血清試料による抗原探索が可能と考えられた。今後、このプロテインアレイとパプアニューギニアの小児血清試料を用いた反応性を解析し、熱帯熱及び三日熱マラリアの新規発症阻止ワクチン候補抗原の探索を実施する予定である。

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 17 件)

Mathias DK, Pastrana-Mena R, Ranucci E, Tao D, Ferruti P, Ortega C, Staples GO, Zaia J, Takashima E, Tsuboi T, Borg NA, Verotta L, Dinglasan RR. A small molecule glycosaminoglycan mimetic blocks *Plasmodium* invasion of the mosquito midgut. **PLoS Pathog.** 2013, 9(11):e1003757. 査読有
DOI: 10.1371/journal.ppat.1003757.

Miura K, Takashima E, Tsuboi T. (他 9 名, 12 番目) Functional comparison of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking vaccine candidates by the standard membrane-feeding assay. **Infect Immun.** 2013, 81(12):4377-82. 査読

有

DOI: 10.1128/IAI.01056-13.

Ito D, Hasegawa T, Takashima E, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. (他 7 名,13 番目) RALP1 is a rhoptry-neck erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum* merozoite and a potential blood-stage vaccine candidate antigen. **Infect Immun.** 2013, 81(11):4290-4298. 査読有

DOI: 10.1128/IAI.00690-13.

Richards JS, Arumugam TU, Takeo S, Torii M, Crabb BS, Cowman AF, Tsuboi T. (他 16 名,22 番目) Identification and prioritization of merozoite antigens as targets of protective human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria for vaccine and biomarker development. **J Immunol.** 2013, 191:795-809. 査読有

DOI: 10.4049/jimmunol.1300778.

Cheng Y, Wang Y, Ito D, Takashima E, Sattabongkot J, Tsuboi T. (他 7 名,12 番目) PvMSP1P, merozoite surface protein 1 paralog, is a novel erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium vivax*. **Infect Immun.** 2013, 81(5):1585-1595. 査読有

DOI: 10.1128/IAI.01117-12.

Fowkes FJ, Tsuboi T. (他 12 名,11 番目) New insights into acquisition, boosting and longevity of immunity to malaria in pregnant women. **J Infect Dis.** 2012, 206:1612-21. 査読有

DOI: 10.1093/infdis/jis566.

Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF, Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. **Vaccine.** 2012, 30:1972-1980. 査読有

DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.01.010.

Tachibana M, Sato C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko O, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. **Vaccine.** 2012, 30:1807-1812. 査読有

DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.01.003.

Volz JC, Tsuboi T. (他 10 名,6 番目) PfSET10, a *Plasmodium falciparum* methyltransferase, maintains the active var gene in a poised state during parasite division. **Cell Host Microbe.** 2012, 11:7-18. 査読有

DOI: 10.1016/j.chom.2011.11.011.

Ord RL, Rodriguez M, Yamasaki T, Takeo S, Tsuboi T, Lobo CA. Targeting sialic acid dependent and independent pathways of invasion in *Plasmodium falciparum*. **PLoS One.** 2012, 7:e30251.

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0030251.

Bullen HE, Torii M, Tsuboi T. (他 11 名,8 番目) Biosynthesis, localisation and macromolecular arrangement of the *Plasmodium falciparum* translocon of exported proteins; PTEX. **J Biol Chem.** 2012, 287:7871-7884. 査読有

DOI: 10.1074/jbc.M111.328591.

Arumugam TU, Takeo S, Torii M, Tsuboi T. (他 13 名,17 番目) Discovery of GAMA, a *Plasmodium falciparum* merozoite micronemal protein, as a novel blood-stage vaccine candidate antigen. **Infect Immun.** 2011, 79:4523-4532. 査読有

DOI: 10.1128/IAI.05412-11.

Rui E, Takeo S, Tsuboi T. (他 4 名,6 番目) *Plasmodium vivax*: comparison of immunogenicity among proteins expressed in the cell-free systems of *Escherichia coli* and wheat germ by suspension array assays. **Malar J.** 2011, 10:192. 査読有

DOI: 10.1186/1475-2875-10-192.

Miyata T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Tachibana M, Torii M (他 4 名,3 番目) Tricomponent immunopotentiating system (TIPS) as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. **Infect Immun.** 2011, 79:4260-4275. 査読有

DOI: 10.1128/IAI.05214-11.

Tachibana M, Iriko H, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. (他 3 名,10 番目) N-terminal pro-domain of Pfs230 synthesized using cell-free system is sufficient to induce the complement dependent malaria transmission-blocking activity. **Clin Vaccine Immunol.** 2011, 18:1343-1350. 査読有

DOI: 10.1128/IAI.05104-11.

Doi M, Tanabe K, Tachibana M, Sattabongkot J, Horii T, Torii M, Tsuboi T. (他 10 名,17 番目) Worldwide sequence conservation of transmission-blocking vaccine candidate Pvs230 in *Plasmodium vivax*. **Vaccine.** 2011, 29:4308-4315. 査読有

DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.028.

Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiattkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Plasmodial ortholog of *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 3 is localized to the rhoptry body. **Parasitol Int.** 2011, 60: 132-138. 査読有

DOI: 10.1016/j.parint.2011.01.001.

〔学会発表〕(計 113 件)

(招待講演) 坪井敬文 ポストゲノムマラリアワクチン研究の最前線、金沢大学薬学シン

ポジウム 2013 (2013.11.26, 金沢市)

(招待講演) 坪井敬文 Discovery of novel blood-stage malaria vaccine candidates of *Plasmodium falciparum* using wheat germ cell-free system. 第 86 回日本生化学会大会 インターナショナルシンポジウム (2013.9.11-13, 横浜市)

(招待講演) 坪井敬文 マラリアワクチン研究の最前線、岡山大学医歯薬学総合研究科第 1 回異分野キャリアを持つ医療系生命科学研究者育成支援事業セミナー (2013.2.14, 岡山市)

(招待講演) Tsuboi T. Identification of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system. The 10th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences (2012.9.25, Matsuyama, Japan)

(招待講演) Tsuboi T. Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system. Special Lecture at the Papua New Guinea Institute of Medical Research (2012.9.13, Madang, Papua New Guinea)

(招待講演) Tsuboi T. Application of cell-free protein synthesis technology for production of malaria protein. Cell-Free Protein Synthesis Workshop (2012.6.25, Bangkok, Thailand)

(招待講演) Tsuboi T. Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system. Special Lecture at the Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (2011.10.27, Ouagadougou, Burkina Faso)

(招待講演) Tsuboi T. Post-genome discovery of novel malaria vaccine candidates using wheat germ cell-free system. Special Lecture at the Papua New Guinea Institute of Medical Research (2011.8.29, Goroka, Papua New Guinea)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pros.ehime-u.ac.jp/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 敬文 (TSUBOI, Takafumi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：00188616

(2) 研究分担者

竹尾 暁 (TAKEO, Satoru)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：40302666

(平成 23 年度)

高島 英造 (TAKASHIMA, Eizo)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：50366762

(平成 24, 25 年度)