

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253026

研究課題名(和文) 分子機能に立脚した熱帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗原の探索

研究課題名(英文) Discovery of novel blood-stage malaria vaccine candidates based on the molecular function

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) 31,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規赤血球期マラリアワクチン候補タンパク質を同定するため、メロゾイトタンパク質の赤血球表面への結合を機能的指標として候補分子を探索した。その結果、合成した142種類ものタンパク質の内、34種類が赤血球に結合した。それらの内、PfRipr、PfRALP1、PfGAMAおよびPfMSPDBL1に着目し抗原多型解析を行った。その結果、PfRiprは最も多型が少なかった。次に抗原多型のワクチン活性に及ぼす影響を検討した。その結果、抗PfRipr抗体は、抗原多型のある原虫株に対しても強い増殖阻害活性を示した。したがって、PfRiprが多型の少ない新規マラリアワクチン候補抗原であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to identify novel blood-stage malaria vaccine candidates of *Plasmodium falciparum*, we have expressed 142 putative merozoite specific recombinant proteins. Among them, 34 bounded to the RBC surface. We then analyzed extent of polymorphism in four promising RBC-binding proteins, PfRipr, PfRALP1, PfGAMA, and PfMSPDBL1 using clinical isolates from a region of high malaria transmission in Uganda. PfRipr gene was most highly conserved among the four genes investigated. In addition, we expressed recombinant proteins for the four candidates based on *P. falciparum* laboratory strain 3D7 sequences, immunized rabbits to obtain specific antibodies and performed functional growth inhibition assay (GIA) on the heterologous FVO parasite strain. The GIA activity of anti-PfRipr antibody was highest among the four antibodies even on the polymorphic FVO parasite strain. Thus, PfRipr is regarded as a promising blood-stage malaria vaccine against *P. falciparum*.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マラリア 赤血球期ワクチン コムギ無細胞法

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性マラリアの拡散が相次ぐ中、これまで40年以上にわたり欧米を中心にマラリアワクチン開発が注力されてきた。しかし、唯一第3相臨床試験が終了したスポロゾイト表面タンパク質を標的とする感染阻止ワクチンの効果は、30%程度にすぎなかった。一方、血流内のマラリア原虫を標的とする赤血球期ワクチンは、流行地の人々のマラリア発症、及び死亡率の低下に有効であり、感染阻止ワクチンをすり抜けた原虫に対する効果も期待できる。しかし、ワクチン候補として長年研究されてきた赤血球期原虫であるメロゾイト抗原である MSP1 および AMA1 は、第2相臨床試験で効果が認められず、相次いでワクチン候補から除外された。これらの候補抗原が抱える問題点は、抗原多型を有するためワクチンに対して抵抗性の原虫が存在することに加えて、分子機能が未解明であるため抗原を改良する糸口が掴めないことである。また、現在開発中の数種類のワクチン候補抗原も機能が判明しているものは皆無であるため、同様な理由によりワクチン開発が順調には進まない可能性がある。そのため、抗原多型が少なく、さらに分子機能の判明した新規ワクチン候補抗原の探索が喫緊の課題である。2002年に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に合成した原虫タンパク質を用いるワクチン候補の探索が試みられた。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。申請者らはこれまでに、愛媛大学で開発されたコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて、赤血球への侵入型である熱帯熱マラリア原虫メロゾイトのタンパク質を網羅的に合成し、作製した抗体の培養熱帯熱マラリア原虫株 3D7 に対する増殖阻害活性を指標に、新規マラリアワクチン候補抗原を探索してきた。

2. 研究の目的

本研究では、分子機能に立脚した新規赤血球期ワクチン候補タンパク質を同定するために、新たにメロゾイトタンパク質の赤血球表面への結合を機能的指標として候補分子を探索した。さらに上記で同定したメロゾイトタンパク質、PfRipr、PfRALP1、PfGAMA および PfMSPDBL1 を元に新規マラリアワクチンの開発をさらに推進するために、これら4種類の遺伝子のフィールド分離株原虫における抗原多型の有無、ならびに、それらに対する抗体が、抗原多型のある熱帯熱マラリア原虫 FVO 株に対しても *in vitro* でワクチン活性を有するかを検証した。これらにより、分子機能に立脚した次世代マラリアワクチン候補分子を同定し、難渋しているマラリア

ワクチン開発を加速することを目的に、本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 赤血球結合タンパク質の同定

熱帯熱マラリア原虫メロゾイト特異的タンパク質セットをコムギ無細胞法を用いて合成し、赤血球結合アッセイにより赤血球結合タンパク質を同定した。

(2) 新規ワクチン候補抗原の抗原多型解析

熱帯熱マラリア高度流行地であるウガンダから得られた熱帯熱マラリア原虫フィールド分離株 102 人分を用いて、PfRipr、PfRALP1、PfGAMA および PfMSPDBL1 の4種類の遺伝子多型を解析した。その際、PfADSL 遺伝子を多型の少ない陰性対照、遺伝子多型が多い PfAMA1 遺伝子を陽性対照とした。

(3) 抗原多型がワクチン効果に与える影響

熱帯熱マラリア原虫 3D7 株タイプの抗原に対する抗体が、遺伝子多型のある熱帯熱マラリア原虫 FVO 株に対しても原虫増殖阻害活性を有するか、を検証するため、3D7 株に対して原虫増殖阻害活性を示すことが判明している PfRipr、PfRALP1、PfGAMA および PfMSPDBL1 に対する抗体を、熱帯熱マラリア原虫 FVO 株の培養液中に添加し、*in vitro* 原虫増殖阻害活性を測定した。

4. 研究成果

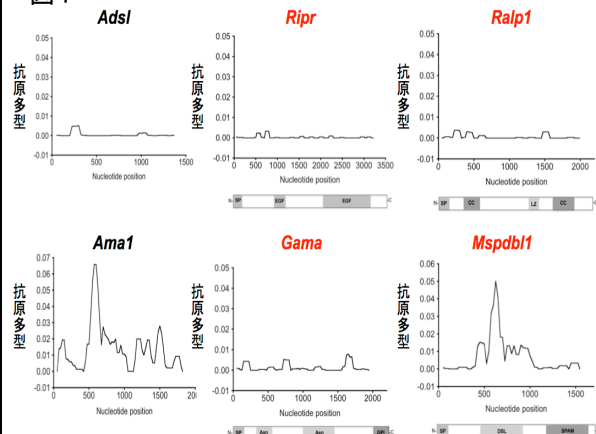
(1) 赤血球結合タンパク質の同定

142 種類のメロゾイト特異的タンパク質の内、34 種類が既知の赤血球結合タンパク質 Rh5 よりも強い結合を示した。それらの内、我々がすでにワクチン候補として同定していた PfRipr、PfRALP1、PfGAMA および PfMSPDBL1 に注力して以下の研究を実施した。

(2) 新規ワクチン候補抗原の抗原多型解析

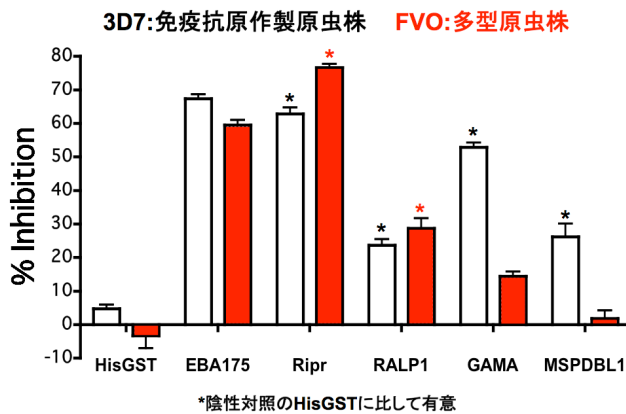
PfGAMA および PfMSPDBL1 遺伝子は PfADSL 遺伝子と比較して多型が多く、中でも PfMSPDBL1 は PfAMA1 と同程度に遺伝子多型が多かった。一方、PfRipr と PfRALP1 遺伝子は多型が少なかった。中でも PfRipr 遺伝子は、PfRALP1 遺伝子に存在する繰り返し配列もなく、今回検討した4種類の新規ワクチン候補遺伝子の中で最も多型が少なかった (図1)。

図1



(3) 抗原多型がワクチン効果に与える影響
PfRipr および PfRALP1 に対する抗体は、遺伝子多型の存在する FVO 株に対しても増殖阻害活性を示すことが明らかになった。中でも PfRipr に対する抗体は PfRALP1 に対する抗体よりも強い増殖阻害活性を示した。一方、比較的遺伝子多型の多かった PfGAMA および PfMSPDBL1 に対する抗体は、FVO 株に対して増殖阻害活性を認めなかった (図2)。

図2



したがって、本研究により、我々は PfRipr が遺伝子多型の少ない新規マラリアワクチン候補抗原であることを世界に先駆けて明らかとした。

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29件)

- (1) Bargieri DY, Triglia T, Tsuboi T, Cowman A, Chitnis C, Alano P, Baum J, Pradel G, Ménard R. (他 11 名,12 番目) *Plasmodium* MTRAP is essential for vacuole membrane disruption and host cell egress by malaria gametes. *Cell Host Microbe*. 2016, 20(5):618-630. doi: 10.1016/j.chom.2016.10.015. 査読有
- (2) Ntege EH, Arisue N, Ito D, Hasegawa T, Palacpac NMQ, Ekwang TG, Horii T, Takashima E, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 5-interacting protein, PfRipr, as a highly conserved blood-stage malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 2016, 34:5612-5622. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.09.028. 査読有
- (3) Cheng Y, Lu F, Ito D, Takashima E, Miller LH, Tsuboi T, Han ET. (他 12 名,18 番目) *Plasmodium vivax* GPI-anchored micronemal antigen

(PvGAMA) binds human erythrocytes independent of Duffy antigen status. *Sci Rep*. 2016, 6:35581. doi: 10.1038/srep35581. 査読有

- (4) Weaver R, Reiling L, Tsuboi T, Richards JS, Fowkes FJI, Beeson JG. (他 4 名,7 番目) The association between naturally acquired IgG subclass specific antibodies to the PfRH5 invasion complex and protection from *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Rep*. 2016, 6:33094. doi: 10.1038/srep33094. 査読有
- (5) McLean ARD, Tsuboi T, Beeson JG, Nosten F, Simpson JA, Fowkes FJI. (他 4 名,6 番目) Antibody responses to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* blood-stage and sporozoite antigens in the postpartum period. *Sci Rep*. 2016, 6:32159. doi: 10.1038/srep32159. 査読有
- (6) Han JH, Lee SK, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET. (他 7 名,11 番目) Identification of a reticulocyte-specific binding domain of *Plasmodium vivax* reticulocyte-binding protein 1 that is homologous to the PfRh4 erythrocyte-binding domain. *Sci Rep*. 2016, 6:26993. doi: 10.1038/srep26993. 査読有
- (7) Duffy MF, Noviyanti R, Tsuboi T, Takashima E, Fowkes FJ, Siba P, Price RN, Anstey NM, Brown GV, Papenfuss AT. (他 10 名,3 番目) Differences in PfEMP1s recognized by antibodies from patients with uncomplicated or severe malaria. *Malar J*. 2016, 15(1):258. doi: 10.1186/s12936-016-1296-4. 査読有
- (8) Zheng W, Tsuboi T, Luo E, Cao Y, Cui L. (他 5 名,6 番目) Identification of three ookinete-specific genes and evaluation of their transmission-blocking potentials in *Plasmodium berghei*. *Vaccine*. 2016, 34(23):2570-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.04.011. 査読有
- (9) Lin CS, Tsuboi T, Czabotar PE, Cowman AF. (他 3 名,5 番目) Multiple *P. falciparum* merozoite surface protein 1 complexes mediate merozoite binding to human erythrocytes. *J Biol Chem*. 2016, 291(14):7703-15. doi: 10.1074/jbc.M115.698282. 査読有
- (10) Changrob S, Tsuboi T, Chootong P, Han ET. (他 5 名,2 番目) Naturally-acquired immune response against *Plasmodium vivax* rhoptry-associated membrane antigen. *PLoS One*. 2016, 11(2):e0148723. doi: 10.1371/journal.pone.0148723. 査読有
- (11) Charnaud, SC, Richards JS, Gilson PR,

- Chotivanich K, **Tsuboi T**, Beeson JG, Nosten F, Fowkes FJI. (他 8 名,10 番目) Maternal-foetal transfer of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antibodies in a low transmission setting. **Sci Rep**. 2016, 6:20859. doi: 10.1038/srep20859. 査読有
- (12) **Takashima E**, Morita M, **Tsuboi T**. Vaccine candidates for malaria: what's new? **Expert Rev Vaccines**. 2016, 15(1):1-3. doi: 10.1586/14760584.2016.1112744. 査読有
- (13) **Tsuboi T**, **Takashima E**. Antibody titre as a surrogate of protection of the first malaria subunit vaccine, RTS,S/AS01. **Lancet Infect Dis**. 2015, 15(12):1371-2. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00300-X. 査読無
- (14) Aguiar JC, Iriko H, Han ET, **Tsuboi T**, Hoffman SL, Carucci D, Hollingdale MR, Villasante ED, Richie TL. (他 8 名,12 番目) Discovery of novel *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic antigens for vaccine development. **PLoS One**. 2015, 10(8):e0136109. doi: 10.1371/journal.pone.0136109. 査読有
- (15) Wang B, Lu F, Cheng Y, Sattabongkot J, **Takashima E**, **Tsuboi T**, Han ET. (他 8 名,14 番目) Immunoprofiling of the tryptophan-rich antigen family in *Plasmodium vivax*. **Infect Immun**. 2015, 83(8):3083-3095. doi: 10.1128/IAI.03067-14. 査読有
- (16) Kapulu MC, Da DF, Miura K, **Tsuboi T**, Gilbert SC, Long CA, Sinden RE, Draper SJ, Hill AVS, Cohuet A, Biswas S. (他 11 名,15 番目) Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep**. 2015, 5:11193. doi: 10.1038/srep11193. 査読有
- (17) Cheng Y, Sattabongkot J, **Tsuboi T**, Han ET. (他 5 名,8 番目) Characterization of *Plasmodium vivax* early transcribed membrane protein 11.2 and exported protein 1. **PLoS One**. 2015, 10(5):e0127500. doi: 10.1371/journal.pone.0127500. 査読有
- (18) Wu Y, Sinden RE, Churcher TS, **Tsuboi T**, Yusibov V. Development of malaria transmission-blocking vaccines: from concept to product. **Adv Parasitol**. 2015, 89:109-152. doi: 10.1016/bs.apar.2015.04.001. 査読有
- (19) Cheng Y, Ito D, Sattabongkot J, Lim CS, **Tsuboi T**, Han ET. (他 5 名,10 番目) Antigenicity and immunogenicity of PvRALP1, a novel *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein. **Malar J**. 2015, 14(1):186. doi: 10.1186/s12936-015-0698-z. 査読有
- (20) Changrob S, **Tsuboi T**, Han ET. (他 4 名,3 番目) Naturally-acquired cellular immune response against *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 paralog antigen. **Malar J**. 2015, 14(1):159. doi: 10.1186/s12936-015-0681-8. 査読有
- (21) Hayakawa E, Tokumasu F, Usukura J, Matsuoka H, **Tsuboi T**, Wellem TE. Imaging of the subsurface structures of "unroofed" *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Exp Parasitol**. 2015, 153:174-179. doi: 10.1016/j.exppara.2015.03.021. 査読有
- (22) Tachibana M, Suwanabun N, Kaneko O, Iriko H, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko A, Herrera S, Torii M, **Tsuboi T**. *Plasmodium vivax* gametocyte proteins, Pvs48/45 and Pvs47, induce transmission-reducing antibodies by DNA immunization. **Vaccine**. 2015, 33:1901-1908. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.008. 査読有
- (23) Tanabe K, Honma H, Mita T, **Tsuboi T**, Coleman R. (他 4 名,8 番目) *Plasmodium falciparum*: Genetic diversity and complexity of infections in an isolated village in western Thailand. **Parasitol Int**. 2015, 64:260-266. doi: 10.1016/j.parint.2013.09.011. 査読有
- (24) Otsuki H, Yokouchi Y, Iyoku N, Tachibana M, **Tsuboi T**, Torii M. Rodent malaria lactate dehydrogenase assay provides a high throughput solution for in vivo vaccine studies. **Parasitol Int**. 2015, 64:60-63. doi: 10.1016/j.parint.2015.02.001. 査読有
- (25) Fujii Y, Kaneko S, **Tsuboi T**, Hirayama K. (他 24 名,18 番目) Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014, 8(7): e3040. doi: 10.1371/journal.pntd.0003040. 査読有
- (26) Cheng Y, Shin EH, Lu F, Wang B, Choe J, **Tsuboi T**, Han ET. Antigenicity studies in humans and immunogenicity studies in mice: an MSP1P subdomain as a candidate for malaria vaccine development. **Microbes Infect**. 2014, 16(5):419-28. doi: 10.1016/j.micinf.2014.02.002. 査読有
- (27) Sattabongkot J, **Tsuboi T**. (他 3 名,2 番目) Loop-mediated isothermal

- amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2014, 52(5):1471-1477. doi: 10.1128/JCM.03313-13. 査読有
- (28) Lu F, Ha KS, Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET. (他 5 名, 9 番目) Profiling the humoral immune responses to *Plasmodium vivax* infection and identification of candidate immunogenic rhoptry-associated membrane antigen (RAMA). *J Proteomics.* 2014, 102:66-82. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.029. 査読有
- (29) Arakawa T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Sakao K, Torii M, Miyata T. Tricomponent complex loaded with a mosquito-stage antigen of malaria parasite induces potent transmission-blocking immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2014, 21(4):561-569. doi: 10.1128/CVI.00053-14. 査読有
- [学会発表] (計 1 2 3 件)
- (1) Morita M, Takashima E, Kanoi BN, Ito D, Miura K, Thongkukiatkul A, Diouf A, Fairhurst RM, Diakite M, Long CA, Torii M, Tsuboi T. Immunoscreening with *Plasmodium falciparum* protein library expressed by a wheat germ cell-free system identified a novel blood-stage malaria vaccine candidate. Japan-Brazil Malaria Research Workshop: fostering new partnerships, São Paulo (Brazil), 3/15-17, 2017.
- (2) Tsuboi T. <Invited Lecture> Post-genome malaria vaccine research. Japan-Brazil Malaria Research Workshop: fostering new partnerships, São Paulo (Brazil), 3/15-17, 2017.
- (3) Nagaoka H, Takashima E, Ntege EH, Tsuboi T. Characterization of the protein-protein interactions between PfRipr, Rh5 and CyRPA for logical design of blood-stage malaria vaccine. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), and 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Seoul (Korea), 2/7-9, 2017.
- (4) Nakata T, Takashima E, Morita M, Kanoi BN, Tsuboi T. Biochemical analysis of *Plasmodium falciparum* FJ180, a PHIST protein secreted into infected red blood cells. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), and 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Seoul (Korea), 2/7-9, 2017.
- (5) Kanoi BN, Takashima E, Morita M, White MT, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria: profiling antibody responses for novel vaccine antigen discovery. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), and 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Seoul (Korea), 2/7-9, 2017.
- (6) Tsuboi T <Invited speaker>, Takashima E, Morita M, Ntege EH, Nagaoka H. Post-genome malaria vaccine candidate discovery by wheat germ cell-free system. Joint International Tropical Medicine Meeting 2016, Bangkok (Thailand), 12/7-9, 2016.
- (7) 坪井敬文、高島英造、森田将之 (フォーラム招待講演)
ポストゲノム生化学研究: マラリアワクチン研究の突破口. 第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター (宮城県・仙台市)、9/25-27, 2016。
- (8) Tsuboi T, Ntege EH, Takashima E, Morita M, Ito D, Cowman A. Reverse vaccinology approach: Postgenome malaria blood-stage vaccine candidate discovery. International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2016, Brisbane (Australia), 9/18-22, 2016.
- (9) Takashima E, Morita M, Ito D, Miura K, Thongkukiatkul A, Long C, Torii M, Tsuboi T. LSA3 was identified as a novel blood-stage vaccine candidate by immunoscreening of *Plasmodium falciparum* protein library expressed in wheat germ cell-free system. International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2016, Brisbane (Australia), 9/18-22, 2016.
- (10) Tsuboi T <Invited speaker> Approaches to malaria vaccine development. Workshop on Tools for

Malaria Eradication, 理研横浜キャンパス (神奈川県・横浜市), 6/6, 2016.

- (11) 坪井敬文 (ワークショップ招待講演)
ポストゲノムマラリアワクチン研究は宿主寄生体関係の総体的理解につながる
第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会 合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)、12/1-4, 2015。
- (12) Tsuboi T <Invited speaker>
Pre-erythrocytic vaccines for malaria elimination. Malaria R&D in a Time of Global Partnerships, 東京大学 (東京都), 6/26, 2015.
- (13) Tsuboi T, Kanoi BN, Egwang TG, Horii T <Invited speaker>
An integrated approach to tackling malaria in Uganda with special reference to novel malaria vaccine candidate discovery. E-JUST 2nd International Conference on Innovative Engineering, Alexandria (Egypt), 5/19-21, 2015.
- (14) Tsuboi T <Invited speaker>
WGCFS: an innovative technology for post-genome malaria vaccine research. 25th Annual Molecular Parasitology/Vector Biology Symposium, University of Georgia, Athens (USA), 4/28-29, 2015.
- (15) Tsuboi T (招待シンポジスト)
Global Health Innovation through Partnership. 第 55 回日本熱帯医学会大会・第 29 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、東京女子医科大学 (東京都)、11/1-3, 2014。
- (16) Tsuboi T (招待講演)
Wheat germ cell-free protein synthesis system: an innovative technology for post-genome malaria vaccine candidate discovery. 第 157 回日本獣医学会学術集会、日本獣医寄生虫学会国際シンポジウム、北海道大学 (北海道・札幌市)、9/9-12, 2014。
- (17) Tsuboi T, Takashima E, Ito D, Feng Lu, Cheng Y, Han ET. <Invited Symposist>
Wheat germ cell-free protein synthesis system (WGCFS): a breakthrough for the post-genome vivax malaria research. 13th International Congress of Parasitology, Mexico City (Mexico), 8/10-15, 2014.

[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/malaria/?page_id=43

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

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

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

森田 将之 (MORITA, Masayuki)
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：60709632