

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860278

研究課題名(和文) 免疫応答を制御するバキュロウイルスを用いたマラリアワクチンプラットフォームの開発

研究課題名(英文) The development of malaria vaccine platform using baculovirus regulating immune responses

研究代表者

伊従 光洋 (IYORI, MITSUHIRO)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：20608351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアワクチンプラットフォームとして、補体抵抗性バキュロウイルス、樹状細胞指向性バキュロウイルス、デコイレセプター発現型バキュロウイルス、サイトカイン発現型バキュロウイルス、shRNA発現型バキュロウイルスの作製に取り組んだ。うち、補体抵抗性バキュロウイルスならびにサイトカイン発現型バキュロウイルスにおいては当初の目的通りの機能を有することが確認された。これらをマウスに免疫した場合、血中に高いマラリア抗原特異的抗体が確認され、遺伝子組み換えマラリア原虫のチャレンジ感染に対し高い感染防御効果が確認された。

研究成果の概要(英文)：We have developed the malaria-vaccine platform using several kinds of modified baculovirus such as complement resistant baculovirus, dendritic targeting baculovirus, decoy-receptor expressing baculovirus, cytokine expressing baculovirus and shRNA expressing baculovirus. Among them, complement resistant baculovirus and cytokine expressing baculovirus worked very well in functional analyses. When immunized in mice, these baculovirus induced strong anti-malaria antibody response and conferred high protective efficacy against the infection with transgenic rodent malaria.

研究分野：微生物学・免疫学

キーワード：マラリアワクチン

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、結核や AIDS とならぶ世界三大感染症の一つであり、年間 2 億人の患者と 66 万人の死者を出す原虫感染症である。貧困ならびに耐性原虫増加という背景から、マラリアに対する効果的なワクチンの開発が希求されており、グラクソ・スミスクライン (GSK) 社をはじめ製薬メーカーが研究開発を行っているが、現在までに実用化されたマラリアワクチンは存在しない。

バキュロウイルスは昆虫を宿主とする DNA ウイルスであり、近年、種々の哺乳細胞へ遺伝子導入が可能な非感染性ウイルスベクターとして有望視されている。タンパクワクチンや他のウイルスワクチンに比べて、本ウイルスにはワクチンベクターとして下記の優れた特性がある。

(1) 細胞毒性が低く、ヒトへの感染性ならびに病原性がないため、安全性が非常に高い。

(2) 内在 CpG DNA で Toll 様受容体 9 (TLR9) を介し単独で自然免疫を賦活化するため、アジュバントフリーで高い免疫原性を持つ (Yoshida *et al.* Infect Immun 2010; 本研究室業績)。

(3) DNA ウイルスであるため遺伝子組換え操作がやすく、安価で生産性が高い。

我々はバキュロウイルスデュアル発現システム (BDES) という新型マラリアワクチンを開発した (国際特許取得済み)。BDES はコンポーネントワクチンと DNA ワクチンの両者の機能を併せもつ全く新しいタイプのワクチンベクターであり、BDES ワクチンを用いた動物実験で完全感染防御効果を示すことに成功した (Yoshida *et al.* Infect Immun 2009, Iyori *et al.* PLOS ONE 2013)。

2. 研究の目的

本研究の最終ゴールは、BDES マラリアワクチンの臨床応用である。本ワクチンシステムの臨床応用を実現するにあたり、現状では下記の検討すべき課題が存在する。

(1) *In vivo* で遺伝子導入を試みる際、血液中の補体成分に感受性があり不活化する。

(2) 哺乳細胞側の特異的レセプターが不明であり、細胞トロピズムの制御が困難な点。

(3) どのような免疫制御因子を付加すれば感染防御に有効なのか、体系的な研究がない。

本研究では BDES マラリアワクチンに下記の免疫制御因子を搭載することで、これらのデメリットを解消した新型ワクチンの開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

以下の免疫制御因子を発現する組換えバキュロウイルスを作成し、それぞれの機能を解析するとともにワクチンの感染防御に及ぼす効果を検証する。

(1) 補体抵抗性バキュロウイルス：昆虫細胞でのみ機能する p10 プロモーター下流にヒト Decay-accelerating factor (hDAF、補体抵抗

性因子) 遺伝子を組み込んだ遺伝子配列をバキュロウイルスゲノムに挿入し、ウイルス表面への発現を確認する。ヒト補体をウイルス溶液と混合させ、補体活性化試験を行いその抵抗性を確認する。

(2) 樹状細胞指向性バキュロウイルス：樹状細胞の貪食受容体に対する単鎖抗体 scDEC をバキュロウイルス表面に発現させ、樹状細胞への結合能を確認する。

(3) デコイレセプター発現型バキュロウイルス：免疫抑制性サイトカインである TRAIL を中和するため、ウイルス粒子上に TRAIL 受容体である DR5 を発現させる。ワクチン自体を免疫抑制因子のオトリさせることで、アジュバント効果の増強を目指す。

(4) サイトカイン発現型バキュロウイルスの作成：Th1 細胞応答を増強させるサイトカインを発現するウイルスを作成する。細胞株にウイルスを投与し、サイトカインが発現した上清を用いて機能解析を行う。

(5) shRNA 発現型バキュロウイルスの作成：樹状細胞の抗原提示を抑制する種々の因子の発現を減少させる siRNA 配列を有するバキュロウイルスを作成し、その抑制効果を確認する。

上記のように作成した各種バキュロウイルスワクチンならびにヒトマラリア抗原 PfCSP を発現する BDES ワクチンをマウスに接種し、液性免疫応答ならびに細胞性免疫応答を確認する。免疫応答が確認されたマウスに対してヒトマラリア PfCSP 遺伝子を置換変異させた *P. berghei* ネズミマラリア原虫 (PfCSP/Pb) のスポロゾイトを感染させ、感染防御効果を検証する。

4. 研究成果

(1) 補体抵抗性バキュロウイルスの作成：補体抵抗性因子 DAF をウイルス表面上に発現するバキュロウイルスの作成に成功した。補体活性を有するヒト血清とウイルス溶液を混合させたところ、hDAF を発現しないコントロールウイルスではエンベロープが剥がれたのに対し、hDAF 発現型ウイルスは正常の形態を保っていた。ルシフェラーゼ発現型ウイルスを作成し、hDAF 発現の有無でマウスにおける遺伝子導入効果を調べたところ、hDAF 発現型ウイルスで *in vivo* 発現持続効果が上昇することが明らかとなった (Fig. 1)。PfCSP を発現する hDAF ウイルスをマウスに免疫した場合、抗 PfCSP 抗体価が上昇し、PfCSP/Pb 原虫のチャレンジ感染に対して感染防御効果が改善した。

(2) 樹状細胞指向性バキュロウイルスの作成：scDEC をウイルス粒子に発現させることに成功した。本 scDEC 発現ウイルスの脾臓細胞由来樹状細胞ならびに骨髄由来樹状細胞への結合能をフローサイトメトリーで調べたところ、非発現ウイルス (GL3) と比較して scDEC 発現ウイルス (scDEC) の結合能

に変化はなかった (Fig. 2)。単鎖抗体の発現はウイルスの指向性を変えるまでの能力はなかった。

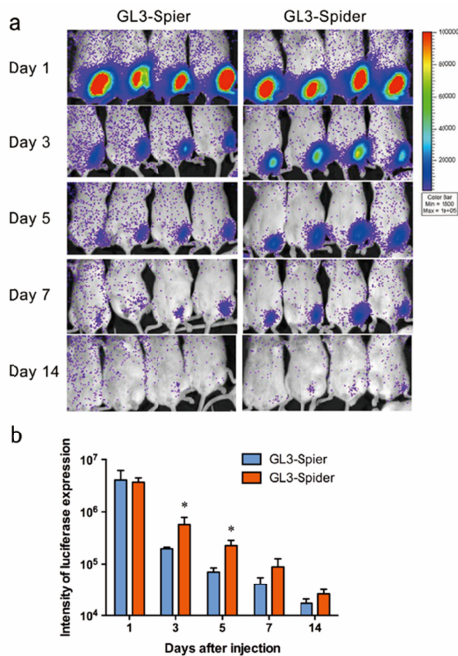


Fig. 1. hDAF含有バキュロウイルス (GL3-Spider) と非含有ウイルス (GL3-Spier) による遺伝子導入効果

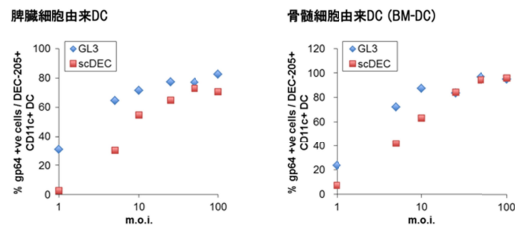


Fig. 2. 樹状細胞 (DC) に対するscDEC発現ウイルスとコントロールウイルス (GL3) の結合能の比較 (gp64陽性細胞=結合細胞)

(3) デコイレセプター発現型バキュロウイルスの作成: DR5 発現型ウイルス (Bac-DR5) はウイルスベクターに対する抗体応答 (抗バキュロウイルス抗体価) が減弱し、感染防御効果が上昇した。Bac-DR5 によるアジュバント効果が DR5 の機能である細胞死に依存するか調べるため、L-929 細胞を用いて細胞生存アッセイを行った。細胞死を引き起こす細胞数は投与した Bac-DR5 の量に依存して有意に上昇した (Fig. 3)。ウイルス表面上の DR5 が単独で細胞死を引き起こしたのかを調べるため、プラスミドの遺伝子導入により DR5 遺伝子を単独で細胞膜に発現させたところ、同細胞では対照群に比べて有意に死細胞数が上昇した (Fig. 3)。Bac-DR5 ではリガンドに依存しない細胞死が引き起こされることにより、アジュバント効果が上昇したものと推測された。

(4) サイトカイン発現型バキュロウイルスの作成: CMV プロモーター下流でサイトカインを発現するバキュロウイルス

(Bac-cytokine) を作成した。Bac-cytokine ならびにワクチン抗原である PfCSP を発現するウイルスベクター (Bac-CSP) を HEK293A 細胞に投与し、間接蛍光抗体法でそれぞれのタンパク質の発現を評価したところ、サイトカインは細胞質内に、PfCSP は細胞膜上に局在していた (Fig. 4)。細胞上清におけるサイトカイン濃度を ELISA で測定したところ、同様のサイトカイン発現型プラスミドを遺伝子導入するよりも 10 倍高くサイトカインが産生されていた (Fig. 4)。Bac-cytokine ならびに Bac-CSP をマウスに共免疫し、抗体価を測定したところ、抗 PfCSP 抗体における IgG2a/IgG1 比が Bac-CSP 単独免疫群において上昇しており、Th1 応答の活性化が示唆された。また、Bac-CSP と Bac-cytokine の共免疫がなされたマウスにおいて、PfCSP/Pb 原虫のチャレンジ感染に対する感染防御効果が改善した。

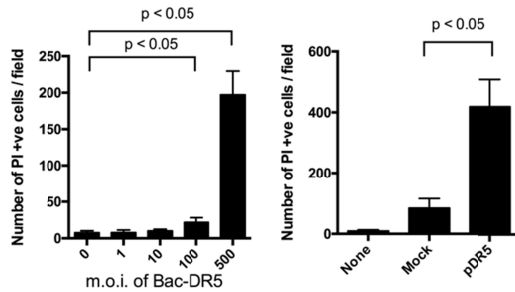


Fig. 3. DR5 発現型バキュロウイルス (Bac-DR5) ならびに DR5 発現プラスミド (pDR5) により誘導される L-929 細胞株の細胞死

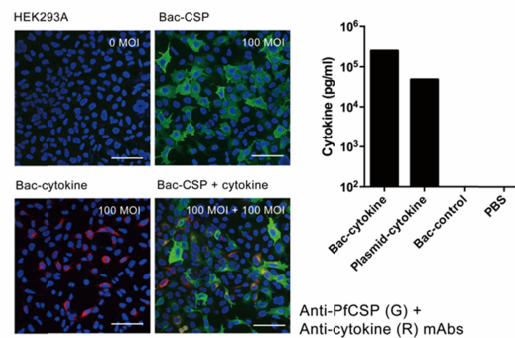


Fig. 4. サイトカイン発現型バキュロウイルス (Bac-cytokine) による遺伝子発現とワクチンベクター

(5) shRNA 発現型バキュロウイルスの作成: コントロール shRNA 発現型バキュロウイルスとして EGFP を標的とするウイルスを 2 クローン作成した。EGFP 安定的発現 HEK293 細胞に対する遺伝子発現抑制効果を蛍光顕微鏡で評価したところ、いずれのウイルスの発現抑制効果も 20%~30% であった。現段階では発現抑制効果に乏しいため、ベクター構築に関し工夫が必要である。

以上の結果から、hDAF 発現型バキュロウイルスならびにサイトカイン発現型バキュロウイルスによるワクチン効果が高いため、両者を組み合わせた免疫方法により、さらなるワクチン効果の改善が期待される。

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4件)

1. Mizutani M, Fukumoto S, Soubeiga AP, Soga A, Iyori M, Yoshida S. Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length Plasmodium vivax circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. *Malar J* 査読有, 2016, 15:251.
2. Sala KA, Nishiura H, Upton LM, Zakutansky SE, Delves MJ, Iyori M, Mizutani M, Sinden RE, Yoshida S, Blagborough AM. The *Plasmodium berghei* sexual stage antigen PSOP12 induces anti-malarial transmission blocking immunity both *in vivo* and *in vitro*. *Vaccine*. 査読有, 2015, 33:437.
3. Mizutani M, Iyori M, Blagborough AM, Fukumoto S, Funatsu T, Sinden RE, Yoshida S. Baculovirus-vectored multistage *Plasmodium vivax* vaccine induces both protective and transmission-blocking immunities against transgenic rodent malaria parasites. *Infect Immun*. 査読有, 2014, 82:4348.
4. Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A, Akashi S, Tame JR, Park SY, Yoshida S. The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem*. 査読有, 2014, 289:16303.

[学会発表](計20件)

1. Kunitaka Yoshida, Mitsuhiro Iyori, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Shigeto Yoshida. *Plasmodium falciparum* CSP vaccine based on a heterologous adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen confers sterile protection against transgenic *P.berghei* sporozoite challenge. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program Presents the 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID). ソウル. 2017年2月7日.
2. 伊従光洋. 超高齢社会に求められる新しいコンセプトの抗血小板薬の開発研究. 日本薬学会北陸支部第128回例会. 金沢. 2016年11月27日.
3. Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Sota Ogata, Hidesato Nishiura, Miako Sakaguchi, Masanori Mizutani, Takahiko Tamura, Kento Genshi, Satoshi Shimada, Daisuke S. Yamamoto, Hiroyuki Matsuoka and Shigeto Yoshida. Vectored PfCSP

Vaccines based on Baculovirus Dual Expression System and AdHu5 induce Strong Protective Efficacy against Transgenic *Plasmodium berghei*. ASTMH 65th Annual Meeting. Atlanta. 2016年11月13日.

4. Kunitaka Yoshida, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Shigeto Yoshida. Enhanced protective efficacy of a *P. falciparum* malaria vaccine using a heterologous prime-boost immunization with a baculoviral vaccine and ChAd63 expressing PfCSP against challenge with a transgenic *P. berghei* sporozoites. ASTMH 65th Annual Meeting. Atlanta. 2016年11月13日.
5. Kunitaka Yoshida, Mitsuhiro Iyori, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, Shigeto Yoshida. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第57回日本熱帯医学会大会. 東京. 2016年11月5日.
6. 吉田邦嵩, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, 所正治, 伊従光洋, Andrew M. Blagborough, Adrian V.S. Hill, 吉田栄人. アデノウイルスベクターとバキュロウイルスベクターを用いた新規ワクチンプラットフォームによる熱帯熱マラリアワクチンの開発. 第72回日本寄生虫学会西日本支部大会. 岐阜. 2016年10月15日.
7. Kunitaka Yoshida, Ahmed M. Salman, Pawan Dulal, Shahid M. Khan, Chris J. Janse, Sumi Biswas, Masaharu Tokoro, Mitsuhiro Iyori, Andrew M. Blagborough, Adrian V. S. Hill, Shigeto Yoshida. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第14回松山国際学術シンポジウム. 愛媛. 2016年9月15日.
8. 伊従光洋, 吉田栄人. 蚊唾液タンパクの能動免疫によるネズミマラリア原虫に対する感染防御効果. 第67回日本衛生動物学会大会. 栃木. 2016年4月16日.
9. 伊従光洋, 藤吉里紗, Syafruddin Din, 吉田栄人. Antibody response against the *Anopheles* salivary gland protein reflects *Plasmodium falciparum* infection during the rainy season in Indonesia. 第84回日本寄生虫学会大会. 宮崎. 2016年3月20日.
10. 伊従光洋. マラリア媒介蚊の唾液タンパクを基盤とした創薬研究. 平成27年度第3回生体応答科学研究セミナー. 弘前. 2015年12月18日.

11. 伊従光洋. 次世代マラリアワクチンの開発と創薬研究. 平成 27 年度 第 2 回大学院活性化講演会. 弘前. 2015 年 12 月 17 日.
12. Mitsuhiro Iyori, Risa Fujiyoshi, Din Syafrudin, Shigeto Yoshida. Differential antibody response to the *Anopheles stephensi* AAPP and *Plasmodium* antigens in individuals naturally exposed to bites of afrotropical malaria vectors. 64th ASTMH Annual meeting. Philadelphia. 2015 年 10 月 25 日.
13. 伊従光洋、中山隆弘、藤吉里紗、吉田栄人. 高速原子間力顕微鏡を用いたハマダラカ由来唾液タンパク観察の試み. 金沢. 2015 年 6 月 13 日.
14. 伊従光洋. マラリア媒介蚊唾液由来 AAPP の抗血小板凝集阻害活性の機能解析. 第 67 回日本衛生動物学会大会. 金沢. 2015 年 3 月 28 日.
15. 伊従光洋、藤吉里紗、Din Syafruddin、吉田栄人. 抗蚊唾液抗体価を用いたマラリア疫学調査の新規評価法の開発 - インドネシア介入試験時の季節的変動-. 第 67 回日本衛生動物学会大会. 金沢. 2015 年 3 月 28 日.
16. 伊従光洋. バキュロウイルスを基盤とした新型マラリアワクチンの開発研究 第 23 回病害動物の生理分子生物談話会. 金沢. 2015 年 3 月 27 日.
17. 伊従光洋、藤吉里紗、Din Syafruddin、吉田栄人. 蚊唾液タンパクに対する抗体価を用いた新規マラリア疫学調査法の開発. 第 84 回日本寄生虫学会大会. 東京. 2015 年 3 月 22 日.
18. 伊従光洋、藤吉里紗、Din Syafruddin、吉田栄人. 抗蚊唾液抗体価を用いたマラリア疫学調査の新規評価法の開発 - インドネシア介入試験前のベースライン抗体価の調査-. 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会 愛知. 2014 年 11 月 8 日.
19. 伊従光洋、水谷征法、舟津知宏、Blagborough AM、福本晋也、Sinden RE、吉田栄人. バキュロウイルスベクターを用いた三日熱マラリアマルチステージワクチンの開発研究. 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 兵庫. 2014 年 10 月 18 日.
20. 伊従光洋、藤吉里紗、舟津知宏、澤口明日香、Din Syafruddin、吉田栄人. インドネシア人血清を用いた蚊唾液タンパクに対する抗体価評価法の開発. 第 32 回北陸病害動物研究会. 富山. 2014 年 6 月 21 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 伊従 光洋 (IYORI, Mitsuhiro)
 金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授
 研究者番号：20608351

(2)研究分担者
 なし

(3)連携研究者
 なし

(4)研究協力者
 なし