

令和 2 年 4 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03917

研究課題名(和文) 獣医療における非哺乳動物免疫系を利用した重要原虫に対する抗体医療の基盤技術の構築

研究課題名(英文) Construction of basic technology for antibody therapy for important protozoa using non-mammalian immune system in veterinary medicine

研究代表者

笹井 和美 (Sasai, Kazumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70211935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：(1) *E. acervulina*に対する鶏型モノクローナル抗体(mAb)の反応性を解析した結果、抗体が認識する抗原は、タンパク質(Elongation factor 1-alpha)であることが分かった。
 (2) マウス寄生性マラリア原虫である*P. vinckei*および*P. yoelii*による解析では、mAbが認識する抗原は他種原虫のものと同様のElongation factor 1-alphaであることが明らかになった。
 (3) 鶏型組み換え体抗体の作製を試みたところ、合計11種の組み換え体鶏型モノクローナル抗体、また2種類のヒト-鶏型モノクローナル抗体とマウス-鶏型モノクローナル抗体を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本抗体が認識する抗原は、幅広くApicomplexa門原虫に存在する共通タンパク質(Elongation factor 1-alpha)を認識する事が分かった。また、マウスのマラリア感染モデルは、今後、抗体治療解析において有用である可能性があり、本蛋白質を抗原とした新規ワクチンの開発が期待できる。鶏型組み換え体抗体の作製を試みたところ、合計11種の組み換え体鶏型モノクローナル抗体、また2種類のヒト-鶏型モノクローナル抗体とマウス-鶏型モノクローナル抗体を得たヒト、マウス型の鶏型モノクローナル抗体は、原虫感染では初となる抗体治療解析において有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：(1) As a result of analyzing the reactivity of the chicken monoclonal antibody (mAb) to *E. acervulina*, it was found that the antigen recognized by the antibody was a protein (Elongation factor 1-alpha).
 (2) Analysis by mouse parasite malaria parasites *P. vinckei* and *P. yoelii* revealed that the antigen recognized by the mAb was Elongation factor 1-alpha, similar to those of other species.
 (3) When an attempt was made to produce a chicken recombinant antibody, a total of 11 recombinant chicken monoclonal antibodies, two human-chicken monoclonal antibodies and a mouse-chicken monoclonal antibody were obtained.

研究分野：獣医内科学

キーワード：apical complex 鶏型モノクローナル抗体 *Eimeria acervulina* 組み換え体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界に広く分布する Apicomplexa 門原虫は、ヒトや家畜に致死性の貧血や下痢症を引き起こす。今なお、予防・治療方法が確立しておらず、社会経済、畜産生産現場に多大な被害をもたらしている。Apicomplexa 門原虫に対しては、いくつかの予防・治療方法が存在する。しかし、原虫の生活環を完全に遮断することはできず、また薬剤耐性株の出現が問題となっている。家畜においては生産物への薬剤残留問題などの弊害から、使用は制限され、限られた効果しか期待できない。他の寄生虫感染症と比して、Apicomplexa 門原虫は、今なお著効を示す予防・治療法が確立されていないのが実情である。

一般に抗原となる物質が体内に侵入した場合、この抗原を特異的に認識する抗体が産生される。非哺乳動物である鶏は、哺乳類とは異なる免疫体系を有する。鳥類の可変領域は哺乳動物より下等であり、ゲノム上には多数の偽遺伝子が存在する。それらがランダムにコンバートされ、遺伝子変換が生じることにより V 領域の多様性の増大が図られている。本研究では、この鳥類の免疫系を新規原虫抗原を探索する強力なツールとして用い、マウスなどの実験動物や哺乳類が認識できない原虫タンパク質を抗原として認識するモノクローナル抗体を作製する。同原虫の先端部分には、Apical complex と呼ばれる侵入に深く関わる共通の複合体が局在する。そこで、鶏を用いて原虫の複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、抗原解析を行う。さらに、抗体の Fc 領域のみ宿主のものに置換しキメラ化することにより、宿主免疫機構による感染阻止や原虫排除を惹起する抗体療法の基盤を構築するのが目的である。

2. 研究の目的

我々は、これまでに鶏の免疫体系を活用した鶏型モノクローナル抗体を作出する系を構築している。この系を用いて宿主細胞への侵入ステージの原虫を鶏に免疫することにより、Apicomplexa 門原虫の先端複合体を認識する複数の鶏型モノクローナル抗体を作製した。その 1 つ 6D-12-G10 は侵入型原虫の conoid を認識し、この抗体処理により、原虫の宿主細胞への侵入が抑止されることが分かっている。また、このモノクローナル抗体が特異的に認識するタンパク質は、原虫の先端に局在する conoid 等の細胞骨格器官の運動を制御する重要タンパク質、モータータンパク質であることが判明した。これらの知見はいずれも、鶏型モノクローナル抗体によりその機能および構成が明らかにされた原虫分子であり、これらの鶏型モノクローナル抗体は Apicomplexa 門原虫防除に向けた、新しい予防・治療法の開発に繋がると考えられる。Apicomplexa 門原虫の侵入型虫体の先端複合体を標的分子とし、鶏型モノクローナル抗体を用いて、獣医学領域における抗体医療に向けた可能性を評価し、新規防除法の開発を行う。抗体医薬とするためには、まず鶏型抗体の可変領域以外について、ヒトおよびマウスなど宿主動物のものに変換したキメラ化抗体の作製技術を構築し、その反応特性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 我々はこれまでに 6 種の鶏型モノクローナル抗体を作出した。そのうち、この抗体はトキシソプラズマ、ネオスポラやクリプトスポリジウム等の Apicomplexa 門原虫にも交差反応性を示す事が分かっている。まずは鶏に寄生するアイメリア原虫の中でも最も病原性の高い *Eimeria tenella* について、交差反応性を解析した。方法は、幼雛に本原虫株を投与し、糞便中に排泄されるオーシストから、生鮮な孢子形成オーシストを得た。塗抹標本を作製し、鶏型モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。また、*E. tenella* の可溶化タンパク質を用いた 2 次元電気泳動によるウェスタンブロッティングを行い、同定した陽性スポットについては LC-MS/MS 解析を実施した。

(2) ヒトのマラリアは、Apicomplex 門に分類される *Plasmodium* 属原虫により引き起こされ、本症に対する有効なワクチンは現在も世界各国において解析中である。*Plasmodium* 属原虫の増殖による貧血は、本原虫の侵入型である merozoite が赤血球へ侵入することにより惹起される。感染機序の詳細は不明ではあるが、原虫の赤血球への接着および侵入には、Apicomplex 門原虫に特有の apical complex とよばれる頂端複合構造の関与が報告されている。そこで、マラリア原虫との交差反応性を確認するため、まずはマウス寄生性マラリア原虫である *P. vinckei* および *P. yoelii* について、感染血液を用いて免疫染色により交差反応性を解析した。

さらに、新たなマラリアワクチンの候補抗原を探索するために、ヒトのマラリアで最も致死率の高い *P. falciparum* における抗原の同定を目指し、特性解析を行った。Pf をヒト赤血球で培養し、免疫蛍光染色法により mAb の反応性と認識される抗原の局在を解析した。また、*P. falciparum* の可溶化抗原を用いて SDS-PAGE を実施し、二次元電気泳動によるウェスタンブロッティングを行い、同定した陽性スポットについては LC-MS/MS 解析を実施した。

(3) 我々が作製した鶏型モノクローナル抗体は、上述したこれまでの解析により、*E. tenella* 以外の Apicomplex 門原虫、つまり *Plasmodium* 属および *Cryptosporidium* 属の複数種の虫体にも交差反応性を示すことを明らかにした。そこで、これらの鶏型抗体を抗体医療として活用すべく、抗原認識部位である可変領域のみを鶏型として活用し、それ以外をマウス型、ヒト型に置換した

抗体の作製を試み、反応性を解析した。まず鶏型の single chain variable fragment の組み換え体を作成するため、mAb を得た鶏型ハイブリドーマ細胞から mRNA を精製し、特異 primer を用いて V_H と V_L 領域を増幅した。これらの増幅産物について、overlap extension PCR にて link させ、さらに single chain variable fragment の全領域を増幅した。この増幅産物を single chain variable fragment expression vector に組み込み、*E. coli* により hexahistidine tag 発現組み換え体抗体を得た。また、同様にマウス型、ヒト型の V_L 領域を増幅し、鶏型の V_H 領域と link させ、マウスおよびヒト-鶏型組み換え体抗体の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) *E. tenella* に対する鶏型モノクローナル抗体の反応性を解析した結果、6D-12-G10 は同原虫の侵入型虫体、つまりスポロゾイトの先端に陽性反応が確認された。可溶性タンパク質の 2 次元電気泳動によるウェスタンブロッティングでは、2 つの陽性スポットが得られ、1 つは分子量 37.8 kDa (pI 7.39) と 39.0 kDa (pI 7.49) であった。これらの陽性スポットの LC-MS/MS 解析の結果、これまでに他種原虫において同定されているタンパク質と同様のアノテーションのタンパク質 (Elongation factor 1- α) であることが分かった。

(2) マウス寄生性マラリア原虫である *P. vinckei* および *P. yoelii* による解析では、侵入ステージおよび発育期により反応性が異なることが分かった。*P. falciparum* を用いた解析では、遊離 merozoite の先端部分に陽性反応を確認した。侵入直後の虫体では反応はみられず、これ以後の発育の全ステージ、trophozoite、schizont、および成熟 merozoite で陽性反応が認められた。*P. falciparum* の可溶性抗原によるウェスタンブロッティングでは、約 50kDa 付近に特異的なバンドが認められた。二次元電気泳動では、50k Da (pI 9.7) 付近に特異的な単一スポットが認められた。このスポットについて LC-MS/MS 解析を行ったところ、mAb が認識する抗原は他種原虫のもと同様の Elongation factor 1- α であることが明らかになった。以上の結果より、本抗体が認識する抗原は、幅広く Apicomplexa 門原虫に存在する共通タンパク質を認識する事が分かった。また、マウスのマラリア感染モデルは、今後、抗体治療解析において有用である可能性がある。さらなる機能解明を進めることにより、マラリア原虫の赤内ステージにおける侵入・増殖を抑制し得る、本蛋白質を抗原とした新規ワクチンの開発が期待できる。

(3) 鶏型組み換え体抗体の作製を試みたところ、合計 11 種の組み換え体鶏型モノクローナル抗体、また 2 種類のヒト-鶏型モノクローナル抗体 とマウス-鶏型モノクローナル抗体を得た。これらの抗体を用いて *C. parvum* について交差反応性を解析したところ、スポロゾイト塗抹標本と感染マウスの組織切片にて諸条件により反応の強弱はあるものの、全ての鶏型組み換え体抗体で、スポロゾイトの apical complex 部に陽性反応が認められた。以上より、ヒト、マウス型の鶏型モノクローナル抗体は、原虫感染では初となる抗体治療解析において有用である可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshimasa Hirashima, Tilusha Manchanayake, Takahisa Yano, Syoei Kitahara, Terunori Koreeda, Syunsuke Kamimura, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi, Tomoyuki Shibahara.	4. 巻 116(7)
2. 論文標題 Development of molecular diagnostic protocols for detecting three types of Entamoeba from diarrheal and asymptomatic pigs and environmental moist soils.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology Research.	6. 最初と最後の頁 2001-2007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-017-5483-1.	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 Terunori Koreeda, Tomo Kawakami, Ayako Okada, Yoshimasa Hirashima, Naoto Imai, Kazumi Sasai, Shogo Tanaka, Makoto Matsubayashi, Tomoyuki Shibahara.	4. 巻 116(11)
2. 論文標題 Pathogenic characteristics of a novel intranuclear coccidia in Japanese black calves and its genetic identification as Eimeria subspherica.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 3243-3247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-017-5629-1.	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 Kanamori K, Manchanayake T, Matsubayashi T, Imai N, Kobayashi Y, Sasai K, Shibahara T.	4. 巻 52(1)
2. 論文標題 Genetic and histopathological identification of Cystoisospora suis in a post-weaned piglet with watery diarrhea.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japan Agricultural Research Quarterly	6. 最初と最後の頁 55-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口浩貴、松林誠、川原 史也、八田岳士、畑生俊光、山岸潤也、磯部尚、寺本勲、金子明、北潔、辻尚利、笹井和美
2. 発表標題 Eimeria tenella 弱毒株の作出および病理組織学的比較解析.
3. 学会等名 第160回日本獣医学会講演要旨集、336.平成29年（2017）9月13-15日 鹿児島市（鹿児島大学）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松林 誠、川原史也、山岸潤也、八田岳士、畑生俊光、寺本 勲、金子 明、磯部 尚、北 潔、辻 尚利、笹井和美
2. 発表標題 Eimeria tenella 弱毒株の作出と比較ゲノム解析による弱毒化分子機構解明の試み.
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集、演題番号1C-13, P25. 平成30年(2018)3月17-18日 東京都新宿区(国立国際医療研究センター)
4. 発表年 2018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
研究分担者	谷 浩行 (Tani Hiroyuki) (00305658)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	
研究分担者	松林 誠 (Matsubayashi Makoto) (00321076)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	
研究分担者	古家 優 (Furuya Masaru) (30500706)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403)	