

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19590429  
 研究課題名（和文） マラリア強毒株に対する肝臓内型および赤血球内型の両期を標的とした DNA ワクチン  
 研究課題名（英文） DNA vaccine targeting both liver and blood stage of virulent strain *Plasmodium*.  
 研究代表者  
 浜野 真二郎（HAMANO SHINJIRO）  
 九州大学・医学研究院・助教  
 研究者番号： 70294915

## 研究成果の概要：

マウスマラリア *P. yoelii* 強毒株（XL）のスポロゾイト感染系における UB-CSP と UB-MSP1 によるキメラ DNA ワクチンによって、マラリア虫血症および生存率の顕著な延長効果が認められ、*P. yoelii* XL に対する感染防御能の賦与が明らかとなった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：ユビキチン、プロテアソーム、マラリア、DNA ワクチン、CD8<sup>+</sup>T細胞、遺伝子銃

## 1. 研究開始当初の背景

近年、田中らによりペプチド抗原をユビキチン化することによりその抗原がプロテアソームでプロセッシングを受け、必然的に MHC クラス I 分子に提示されることにより抗原特異的 CD8<sup>+</sup>T 細胞が誘導されることが証明された (Immunol. Rev. 163:161-76, 1998)。――この経路はユビキチンプロテアソームシステムと呼称されている。

申請者等はトキソプラズマやクルーズトリパノソームのような細胞内寄生原虫の感染系で「宿主寄生体相互関係」の解析およびそれらの病原体に対する遺伝子ワクチンの解析に携わってきた。その結果それらの病原体に対する防御免疫には CD8<sup>+</sup>T 細胞を中心とした細胞性免疫が必須の関わりを持つこと、その免疫誘導には原虫抗原遺伝子とユビキ

チン遺伝子の融合遺伝子を用いたユビキチンプロテアソーム系の応用による DNA ワクチンが最も効果的であることを報告してきた。更に我々は赤血球内寄生原虫であるマラリア原虫感染においても上記の細胞内寄生原虫と類似した「宿主寄生体相互関係」が存在し、それに対する宿主防御免疫に CD8<sup>+</sup> T 細胞を中心とした細胞性免疫が必須であることを解明してきた。

## 2. 研究の目的

本申請研究はユビキチンプロテアソーム系の応用により CD8<sup>+</sup> T 細胞を中心とした細胞性免疫応答の誘導を目指す。マラリア原虫の肝臓内型のスポロゾイトと赤血球内型のメロゾイトの両者を二段階標的とする全く新規の発想からなるマラリアに対する DNA ワクチンの開発研究であり、マラリアワクチン開発の分野に大きなインパクトを与えることを確信する。

## 3. 研究の方法

### 1) ベクターの構築

ネズミマラリア原虫、*Plasmodium yoelii* よりスポロゾイト抗原 (CSP) およびメロゾイト抗原 (MSP1) をコードする遺伝子をクローニングし、ユビキチン遺伝子とフュージョンして、ワクチンベクターを構築する (それぞれ UB-CSP, UB-MSP1)。またマウスより各種サイトカイン遺伝子をクローニングしサイトカイン発現ベクターを構築する。

2) ネズミマラリア強毒株 (*P. yoelii* XL) 感染に対するワクチン効果の判定

ネズミマラリア *P. yoelii* 強毒株 (XL) のスポロゾイト感染において UB-CSP と UB-MSP1 のキメラ DNA ワクチンによる *P. yoelii* XL に対する感染防御能をマラリア虫血症および生存率の延長効果で判定す

る。

3) ワクチンベクターのユビキチンプロテアソーム経路への関与の検討

作製したワクチンベクターを様々な細胞株に遺伝子導入し、その発現を確認し、抗原蛋白のプロセッシング及び抗原提示機構を解析する。さらに作製したワクチンベクターを用いて細胞株に遺伝子を導入し、プロテアソーム阻害剤である MG-132、エポキシマイシン等を用い、抗原蛋白質のプロセッシングとプロテアソーム阻害剤の影響についてウエスタンブロッティング法により解析を行う。

4) マウスモデルにおけるワクチンベクター導入による免疫応答の検討

マウスに対して、「フュージョンベクター」および「キメラベクター」による DNA ワクチンを行う。ワクチンには生体への遺伝子導入効率に優れた遺伝子銃を用いる。ワクチン後、CSP および MSP1 蛋白に対する特異抗体価、リンパ球の抗原特異的増殖反応・サイトカイン産生及び細胞傷害活性について解析し「フュージョンベクターによる DNA ワクチン」の免疫誘導能並びにその特徴を明らかにする (遺伝子銃: 現有設備)

5) センダイウイルスベクターでは組み込み遺伝子に対応する抗原蛋白質が大量に発現され、かつ CD8<sup>+</sup> T 細胞の活性化が非常に効果的であることが知られている。本研究では priming には naked DNA による DNA ワクチンを、booster にはそれぞれの遺伝子をセンダイウイルスベクターに発現させた prime-boost の系を用いる。

6) マウスモデルにおけるワクチンベクターのユビキチンプロテアソーム経路への関与の検討

マウスに対して、遺伝子銃を用いて「フュージョンベクター」DNA ワクチンを行う。

抗原提示細胞としてマクロファージ細胞等へワクチンベクターの遺伝子導入を行い、ワクチン後マウス脾細胞と共培養し、サイトカイン産生及び細胞傷害活性について解析を行う。その際、プロテアソーム阻害剤である MG-132、エポキシマイシン等を用いることで、抗原提示におけるユビキチン-プロテアソーム経路の重要性について詳細に検討する。

#### 4. 研究成果

マラリア原虫、*Plasmodium yoelii* よりスポロゾイト抗原 (CSP) およびメロゾイト抗原 (MSP1) をコードする遺伝子をクローニングし、ユビキチン遺伝子とフュージョンして (それぞれ UB-CSP, UB-MSP1)、ワクチンベクターを構築し、またマウスより各種サイトカイン遺伝子をクローニングしサイトカイン発現ベクターを構築した。

作製したワクチンベクターを用いて様々な細胞株に遺伝子導入を行い発現の確認を行い、抗原蛋白のプロセッシング及び抗原提示機構を解析した。次いで作製したワクチンベクターを細胞株に遺伝子導入を行い、プロテアソーム阻害剤である MG-132, エポキシマイシン等を用い、抗原蛋白質のプロセッシングとプロテアソーム阻害剤の影響についてウエスタンブロットティング法により解析を行った。

生体への遺伝子導入効率に優れた遺伝子銃を用い、マウスに対して「フュージョンベクター」および「キメラベクター」による DNA ワクチンを行い、CSP および MSP1 蛋白に対する特異抗体価、リンパ球の抗原特異的増殖反応・サイトカイン産生及び細胞傷害活性について解析を行い、「フュージョンベクターによる DNA ワクチン」の免疫誘導能並びにその特徴を明らかにした。

さらにそれぞれの遺伝子をセンダイウイルスベクターに発現させて booster DNA とし

て用い、nakedDNA を priming DNA として、prime-boost DNA ワクチンの実験をおこない、その有効性を確認した。

マウスマラリア *P. yoelii* 強毒株 (XL) のスポロゾイト感染系における UB-CSP と UB-MSP1 によるキメラ DNA ワクチンによって、マラリア虫血症および生存率の顕著な延長効果が認められ、*P. yoelii* XL に対する感染防御能の賦与が明らかとなった。

#### 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 8 件)

1: Tetsutani K, Ishiwata K, Torii M, Hamano S, Hisaeda H, Himeno K. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* modulates murine host response against *Plasmodium berghei* ANKA infection. **Am J Trop Med Hyg.** 査読有 2008; 79(6): 819-22.

2: Chou B, Hisaeda H, Shen J, Duan X, Imai T, Tu L, Murata S, Tanaka K, Himeno K. Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. **Microbes Infect.** 査読有 2008; 10(3):241-50.

3: Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S, Duan X, Chou B, Ishida H, Aramaki A, Shen J, Ishii KJ, Coban C, Akira S, Takeda K, Yasutomo K, Torii M, Himeno K. Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. **J Immunol.** 査読有 2008;180(4):2496-503.

4: Imai T, Duan X, Hisaeda H, Himeno K. Antigen-specific CD8+ T cells induced by the ubiquitin fusion degradation pathway. **Biochem Biophys Res Commun**. 査読有 2008; 365(4):758-63.

5: Shen J, Hisaeda H, Chou B, Yu Q, Tu L, Himeno K. Ubiquitin-fusion degradation pathway: a new strategy for inducing CD8 cells specific for mycobacterial HSP65. **Biochem Biophys Res Commun**. 査読有 2008; 365(4): 621-7.

6: Himeno K, Hisaeda H. [Immune therapy against tumors based on the ubiquitin-proteasome pathway]. **Fukuoka Igaku Zasshi**. 査読無 2007; 98(8): 312-9. Review. Japanese.

7: Tetsutani K, To H, Torii M, Hisaeda H, Himeno K. Malaria parasite induces tryptophan-related immune suppression in mice. **Parasitology**. 査読有 2007;134(Pt7):923-30.

8: Higo H, Miura S, Agatsuma T, Mimori T, Yanagi T, Iwagami M, de Arias AR, Matta V, Hirayama K, Takeuchi T, Tada I, Himeno K. Identification of *Trypanosoma cruzi* sublineages by the simple method of single-stranded conformation DNA polymorphism (SSCP). **Parasitol Res**. 査読有 2007;100(5):1023-31.

[学会発表] (計 11 件)

1. 鉄谷耕平、消化管寄生虫感染が引き起こす免疫修飾の解析 - マラリアとの共感染モデルを用いて、第 77 回日本寄生虫学

会大会、2008.4.4、ブリックホール国際会議場、長崎

2. 濱野真二郎、Genetic control of resistance to intestinal amebiasis in inbred mice、第 77 回日本寄生虫学会大会、2008.4.4、ブリックホール国際会議場、長崎

3. Hisaeda Hajime、Activation of regulatory T cells by dendritic cells in mice infected with malaria parasites、第 37 回日本免疫学会総会、2007.11.20、グランドプリンスホテル新高輪、東京

4. IMAI Takashi、Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine malaria blood-stage infection、第 37 回日本免疫学会総会、2007.11.20、グランドプリンスホテル新高輪、東京

5. Chou Bin、Application of ubiquitin fusion degradation pathway in DNA vaccination against *Trypanosoma cruzi*、第 37 回日本免疫学会総会、2007.11.20、グランドプリンスホテル新高輪、東京

6. 久枝一、マラリア原虫による Toll-like receptor 9 を介した制御性 T 細胞の活性化、第 76 回日本寄生虫学会大会、2007.3.29、大阪大学

7. 鉄谷耕平、Malaria parasite induces tryptophan related immune suppression in mice、第 76 回日本寄生虫学会大会、2007.3.29、大阪大学

8. 守家慈子、マラリアの免疫抑制におけるヘモゾイン関与、第 76 回日本寄生虫学会大会、2007.3.29、大阪大学

9. 今井孝、マウスマラリア赤血球ステージ感染制御における CD8+T 細胞の関与、第 76 回日本寄生虫学会大会、2007.3.29、大阪大学

10. 屠麗萍、トキソプラズマの感染における免疫プロテアソームの関わり、第 76 回日本寄生虫学会大会、2007.3.29、大阪大学コンベンションセンター

11. 肥後廣夫、PCR による *Trypanosoma cruzi* と *T. rangeli* の鑑別、第 76 回日本寄生

虫学会大会、2007. 3. 29、大阪大学

〔図書〕（計1件）

濱野真二郎、保健同人社、寄生虫による病気  
in 家庭の医学 第6版、2008、1523-1535

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜野 真二郎 (HAMANO SHINJIRO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：70294915

### (2) 研究分担者

姫野 國祐 (HIMENO KUNISUKE)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：50112339

久枝 一 (HISAEDA HAJIME)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50243689

肥後 廣夫 (HIGO HIROO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：8011722