

平成21年 5月11日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710168
 研究課題名（和文）完全長 cDNA ライブラリを利用した新規マラリア DNA ワクチンの開発研究
 研究課題名（英文）Screening of novel malaria DNA vaccine candidates using full-length cDNA library
 研究代表者
 洪井 秋子（SHIBUI AKIKO）
 東京理科大学・生命科学研究所・助教
 研究者番号：50313846

研究成果の概要：マラリアに対し有効な新規ワクチンを開発する目的で、ネズミマラリア原虫から完全長 cDNA ライブラリを作成し DNA ワクチンとしてマウスに免疫し、その後、チャレンジ感染を行った。2000 クローン投与群で有意な生存期間延長効果を認めたため、全クロンの 5'端塩基配列を決定し、遺伝子の特徴別にサブセット化した。それぞれについて免疫効果を評価して絞り込みを行った結果、効率良く免疫応答を誘導する 104 クローンが選択された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：分子免疫学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：感染症、ゲノム、DNA ワクチン、完全長 cDNA ライブラリ、マラリア、GeneGun

1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアワクチン研究の現状

マラリアは、毎年、全世界で 3～5 億人が罹患し、約 270 万人が死亡する深刻な寄生虫疾患である。とりわけ被害者の大多数が 5 歳以下の幼児であるため、人道的見地から対策が求められている。効率のよい方策としてワクチンの開発研究が各国で精力的に進められているが、原虫は複雑な生活環を有し、抗原変異を起こしやすいため研究は難航している。完全防御効果があるのはハマダラカのステージの原虫に放射線照射したもの

けであり、非現実的な代物である。現在、最有力候補とされる RTS,S/AS02A ワクチンは臨床試験で発症リスクが減少（30%）、重症症例が減少（58%）したと報告されているが（Alonso PL *et al.* Lancet 364(9443): 1411-1420, 2004）、より防御効果の高いものが求められている。

(2) アイデア

研究代表者は大学院生時代に日本学術振興会の日欧科学共同研究によりオランダのライデン大学を訪問し、ネズミマラリア原虫

の実験手技を習得した。当時、菅野研においてガンの DNA ワクチンと完全長 cDNA ライブラリの研究に従事していたことから、両者を組み合わせてマラリアワクチンのスクリーニングを行う次の手法を考案した。ネズミマラリア原虫から完全長 cDNA ライブラリを作製し、クローンをまとめて DNA ワクチンとしてネズミに免疫、その後、チャレンジ感染を行う。生存期間の延長を指標として有効群を選択、絞り込みを行う。という方法である。

(3) これまでの研究成果

当初、完全長 cDNA ライブラリを脾臓内に直接注射する方法によって実験を開始したが(平成13~14年度科学研究費・奨励研究A)、予想に反し、本法ではワクチン群が対照群より短命であった(Shibui *et al.* Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 109: 147-157, 2001)。そこで、免疫時の手ぶれが小さく、細胞性免疫と液性免疫の両方が強く誘導される GeneGun (BioRad) を用いて、そけいリンパ節付近の皮内投与による免疫を試みた(平成17~18年度科学研究費・若手研究(B))。その結果、2000 クローン免疫群で有意な生存期間の延長を確認され、同時に、免疫マウスの脾臓細胞で原虫抗原特異的 IL-2 および IFN- γ の産生が確認された(Shibui *et al.* Vaccine 23 (34):4359-4366, 2005)。

2. 研究の目的

(1) 完全長 cDNA ライブラリを用い、ネズミマラリア原虫の感染系を利用して DNA ワクチンをスクリーニングし、生存期間延長効果を指標として新規マラリアワクチン候補を同定する。

(2) スクリーニングの迅速化の目的で、生存期間延長と関連する免疫マウスの生体指標を同定する。

(3) 有効クローン(群)についてマウスの免疫系に与える影響を解析し、ワクチンの作用機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) これまでに延命効果が確認された 2000 クローンから有効群を絞り込むため、ABI 3730 シークエンサーを用いて全クローンの 5' 端塩基配列を決定した。その結果をデータベース Full-Malaria を利用してネズミマラリア原虫のゲノム上にマップした。マップ可能であったものについては、該当遺伝子を同定し、その特徴(シグナルペプチドの有無、タンパクの細胞内局在)にクラスタリングし、サブセット化をおこなった(図1)。

(2) GeneGun を用いて各サブセットを 5 週齢の BALB/c マウス(♀)の腹部皮内に 1 週間おきに 3 回免疫した。陰性対照には空ベクターを用いた。

(3) 最終免疫の 1 週間後、宿主の免疫応答を解析し、DNA ワクチンの効果を評価した。

① 抗体産生

P. berghei 感染 Wistar ラットの赤血球を超音波破碎したものを原虫粗抗原として用い、ELISA 法により免疫マウス血清中の原虫特異的抗体価を測定した。

② サイトカイン産生

免疫マウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞(B細胞、T細胞、抗原提示細胞を含む)を濾過して回収した。また、そこからマグネットビーズを用いて CD4⁺Tリンパ球を精製した。*P. berghei* 感染 BALB/c マウス赤血球を超音波破碎したものを原虫粗抗原として、全脾臓細胞、または、CD4⁺Tリンパ球と抗原提示細胞(CD4⁺Tリンパ球精製時の陰性分画に放射線照射したもの)と共培養し、培養上清中の原虫特異的 IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10 産生を、サンドイッチ ELISA 法により測定した。また、³Hチミジンの取込みにより、原虫特異的に起きる全脾臓細胞、または、CD4⁺Tリンパ球の増殖を測定した。

(4) 上記によって免疫誘導効果が認められたサブセットを、さらに小さなサブセットに分割して同様の作業を繰り返し、スクリーニングを進めた。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 2000 クローンの 5' 端塩基配列を解読した結果、ネズミ遺伝子(369)と空ベクター(295)を除いた計 1518 クローンが原虫由来と考えられた。これらをデータベース(DBJ)に登録・公開した(Accession No. BP113369 - BP114819, BP 539680 - BP539746)。

以後の実験では、1518 クローンをまとめたものを陽性対照に用いた。

次に、これらの塩基配列を sim4 プログラムを用いてネズミマラリア原虫 *P. berghei* (*Pb*) のゲノム塩基配列と比較し、ゲノム上にマップ、公開した(<http://fullmal.hgc.jp/>)。さらに、熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* (*Pf*) ゲノム塩基配列と比較することで、当該遺伝子のアノテーションを行い、下記のように分類した。

i) SP 群: 525 クローン 242 遺伝子

コードするタンパク質のアミノ酸配列の N 末端にシグナルペプチドを有するもの。

ii) NSP 群: 382 クローン 143 遺伝子

シグナルペプチドを有さないもの。リボソームタンパク質や、酵素等。

iii) UK 群: 611 クローン

Pf のゲノム上に相同遺伝子が同定できなかったもの。

② 上記の3群、および、陽性対照（1518 クローン）と陰性対照（空ベクター）を、Gene Gun を用いて、それぞれ、BALB/c マウス皮内に免疫し、全脾臓細胞による原虫粗抗原特異的サイトカイン産生を ELISA 法で測定した。

UK 群では、IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 産生量が、他の群に比べ高値を示した。

抗原刺激に対する細胞増殖能、ならびに、血清中の IgG レベルも UK 群で最も高かった。

NSP 群は陰性対照と同様、いずれのサイトカインも誘導しなかった（5. 学会発表②参照）。

精製した脾臓CD4⁺Tリンパ球を用いてサイトカイン産生および細胞増殖を測定した。

全脾臓細胞の場合と同様の結果が得られた。ただし、いずれもより低値を示したため、以降は、全脾臓細胞の実験のみを行ない、CD4⁺Tリンパ球による評価は省略した。

③ UK 群について BLAST を用いて 5' 端塩基配列の解析を行い、2 回目のサブセット化をおこなった。

iv) HP 群：312 クローン 185 遺伝子

Hypothetical protein にヒットしたもの。

v) NSP2 群：155 クローン 85 遺伝子

それ以外の、リボソームタンパク質や酵素等の遺伝子にヒットしたもの。

vi) NH 群：144 クローン

有為なヒットのなかったもの。

②と同様の解析の結果、HP 群でのみ高い免疫効果が得られた。さらに、本群をランダムに三分割（各 104 クローン）して実験を繰り返したところ、HP3 群が高い免疫応答を誘導した（5. 学会発表①，図 1 参照）。

④ ワクチンの機能は、感染初期において原虫の増殖を阻止することである。マラリア感染初期の宿主の免疫反応の解明が不可欠であるが、この時期の反応は微弱なため解析が技術的に困難で、研究が立ち後れている。BALB/c マウスと C57BL/6 マウスは、*P. berghei* ANKA 株の感染に対し、対照的な反応を示すことが知られている。後者は感染後 1-2 週間で激しい免疫反応を起こし、痙攣や立毛を示して多数が急死するのに反し、前者はその時期を生きながらえ、3 週以降に貧血と衰弱で死亡する。その比較を行うため、それぞれにマラリア原虫を感染させ、経時的に脾臓を採取、マグネットビーズを用いて CD4⁺T リンパ球を分画した。RT-PCR 法を用いて、それぞれの細胞における各種サイトカイン、転写因子のダイナミクスを測定した。CD4⁺T リンパ球によるサイトカイン産生は感染 5 日後から上昇することを明らかにした。また、

BALB/c マウスにおいて IL-4、IL-10 の産生が多いことが初期の生存に係る可能性を示唆した（5. 雑誌論文①参照）。

（2）得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究でワクチン候補群として絞り込まれた 104 クローンには、既知のワクチン候補は含まれておらず、大多数が機能未知のタンパクであった。新規のワクチン候補分子である可能性が示唆された。

本手法は、寄生虫だけでなく、真菌などの真核病原体一般に利用可能なスキームであり、波及効果は甚大と考えられる。

（3）今後の展望

① 104 クローンのワクチン候補遺伝子についてマウスの感染実験で延命効果を検討する。さらに絞り込みを繰返し、最小限の有効クローン群を同定する。

② 得られた最小限有効クローン群について免疫機序を解明し、より有効なワクチン候補遺伝子を発見する。

③ ゲノム情報を利用してヒトマラリアのワクチン開発を行う。最近、各種のマラリア原虫のゲノム解読が急速に進行し、ヒトマラリア原虫とネズミマラリア原虫のゲノムが高い相同性を示すことが判明した。また、それぞれの宿主ゲノム情報も活用して免疫反応を解析しヒトで有効なワクチンを開発する。

5. 主な発表論文等 （研究代表者に下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

① Akiko Shibui, Nobumichi Hozumi, Chiharu Shiraishi, Yoshitaka Sato, Hajime Iida, Sumio Sugano, Junichi Watanabe “CD4⁺ T cell response in early erythrocytic stage malaria: *Plasmodium berghei* infection in BALB/c and C57BL/6 mice.” *Parasitology Research*, 査読有り, in press, 2009.

〔学会発表〕（計 2 件）

① Akiko Shibui “Further screening of novel malaria DNA vaccine candidates using full-length cDNA library reveals new effective subsets.” 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、平成 20 年 12 月 1 日、国立京都国際会館

② Akiko Shibui “Screening of novel malaria DNA vaccine candidates using full-length cDNA library.” 第 37 回日本

免疫学会総会・学術集会、平成 19 年 11 月 22 日、グランドプリンスホテル新高輪

[その他]
ホームページ等
<http://fullmal.hgc.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渋井 秋子 (SHIBUI AKIKO)
東京理科大学・生命科学研究所・助教
研究者番号：50313846

(2) 研究協力者

渡辺 純一 (WATANABE JUNICHI)
東京大学・医科学研究所・助教

菅野 純夫 (SUGANO SUMIO)
東京大学・新領域創成科学研究科・教授

野上 貞雄 (NOGAMI SADA0)
日本大学・生物資源科学部・教授

穂積 信道 (HOZUMI NOBUMICHI)
東京理科大学・生命科学研究所・教授

<図1の凡例>

UK, SP, NSP, HP, NSP2, NH, HP1, HP2, HP3 :
ネズミマラリア原虫由来完全長 cDNA クローンサブセット名。各サブセットの詳細は、4. 研究成果 (1) 研究の主な成果 参照。

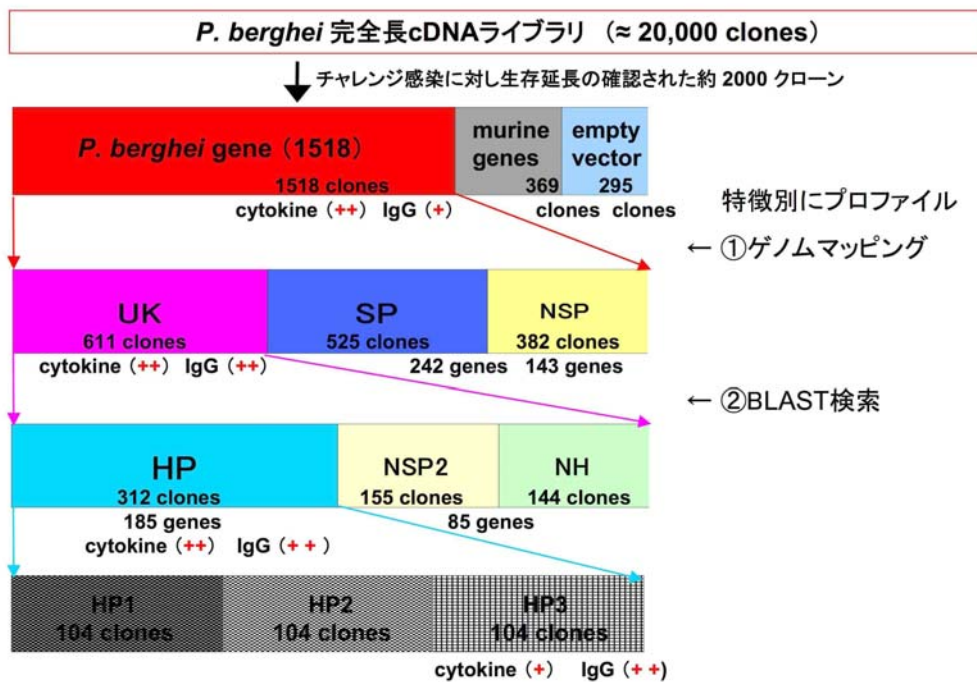


図1. マラリアDNAワクチン候補クローンの絞り込み

