

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：18001
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：23590490
研究課題名(和文) マラリアワクチンプラットフォーム技術基盤研究

研究課題名(英文) Malaria vaccine platform technology

研究代表者

新川 武 (Arakawa, Takeshi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：50305190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアワクチン開発においてワクチン抗原の免疫原性を向上させるための技術開発は極めて重要である。今回、マラリア原虫のヒトから蚊への伝搬を阻止するワクチンの効果を高めるため、三日熱マラリア原虫のオーキネート表層抗原(Pvs25)とデリバリー分子とを融合させた三部構成免疫賦活システムを開発した。このシステムを「Tricomponent immunopotentiating system」と名付け、その効果を検証した。その結果、ワクチン抗原単独では達成できないレベルのワクチン効果が抗原をTIPSに搭載することで達成された。また、このシステムがマラリア以外の感染症へも応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Development of subunit vaccines to prevent malaria infection has been hampered by the intrinsic weak immunogenicity of the recombinant malaria antigens. We have established a novel system called tricomponent immunopotentiating system (TIPS) to increase immune responses by creating genetic protein fusions to target B lymphocytes in the draining lymph nodes of immunized animals. TIPS is composed of the antigen, coiled-coil core and the targeting ligand. We found that integration of vaccine antigens in the TIPS significantly augmented the immunogenicity and vaccine efficacy of the antigens.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：ワクチン 免疫 マラリア 熱帯感染症

1. 研究開始当初の背景

未だ効果的なマラリアワクチンは存在しない。その原因のひとつにマラリアワクチン候補抗原の免疫原性を十分高める技術がないことが挙げられる。マラリアをはじめとする寄生虫疾患に対するワクチン開発は、従来の弱毒生ワクチンや不活化ワクチンなどを開発する方法では難しいとされている。すなわち、ウイルスや細菌性の病原体と異なり、寄生原虫は病原体の培養と精製が困難だからである。よって、組換え技術によって原虫由来の感染防御機能を有する抗原をワクチン抗原とする必要がある。しかし、ほとんどの組換えワクチン抗原は、免疫原性が低いのが特徴である。よって、組換えタンパク質性のワクチン候補抗原の免疫原性を高める技術がマラリアワクチンの成功の鍵を握ると考えられている。

2. 研究の目的

研究の背景で述べたとおり、マラリアワクチンの実用化には組換えタンパク質性ワクチン抗原の免疫原性を高めることが重要である。研究代表者は、抗原の免疫原性を高める方法は、大きく分けて3つあると考えている。すなわち、(1) アラムアジュバントに代表されるような自然免疫を活性化させる物質と併用すること。(2) ワクチン抗原を高分子量化、あるいは、反復整列化するなどして、所属リンパ節のリンパ濾胞へ取り込みやすくすること。(3) B細胞や樹状細胞などの抗原提示細胞を標的化することである。本研究課題では、3番目の抗原提示細胞を標的化することがどの程度マラリアワクチン候補抗原のワクチン機能向上に寄与するかを検証した。

3. 研究の方法

前述のとおり、組換えタンパク質性の抗原の免疫原性を向上させる方法は大きく分け

て3つあるが、本課題ではその中の3番目の方法がマラリアワクチンの開発にどの程度重要であるかを検証した。抗原提示細胞には樹状細胞とB細胞があり、一般的には前者の方が抗原提示機能が格段高いとされている。しかし、B細胞は抗原提示機能をもつだけでなく、ワクチン抗原のB細胞標的化は、その抗原をリンパ濾胞中のB細胞領域へ局在化させることが可能である。よって、B細胞表面レセプターであるイムノグロブリン(Ig)と結合可能なイムノグロブリン結合ドメイン(IGD)をもつタンパク質をマラリアワクチン抗原の標的化に利用することで、その免疫原性が向上するはずだと考えた。具体的には、プロテインA由来のZドメインをはじめ、プロテインLのBドメイン(PpL)やプロテインGのBドメイン(SpG)をB細胞標的化のリガンドとして選択し、それらの分子を束ねるコイルドコイル分子と融合化した。コイルドコイルにはCartilage oligomeric matrix protein (COMP)を用い、COMP-Z、COMP-SpG、COMP-PpLを大腸菌で発現させた。そして、これらの融合分子に三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原(Pvs25)を化学融合法によって搭載し、三部構成免疫賦活複合体(TIPS)を構築した。次に、構築したTIPS複合体でマウスを免疫し、その抗血清をタイ国のマラリア感染患者の血液と混合した後、媒介蚊への原虫の伝搬を阻止できるか、メンブレンフィーディング法によって解析した。

4. 研究成果

Pvs25をTIPS複合体として免疫した場合においてのみ高い抗体価を誘導可能であった。すなわち、Pvs25を単独投与した場合と比較し、Pvs25を搭載したTIPS複合体は、有意に高い特異抗体を誘導した。さらに、このTIPS複合体によって誘導した抗血清は、メンブレンフィーディング法で解析した結果、高い伝搬阻止効果をもつことが分かった。しかし、

Pvs25 の単独投与ではそのようなワクチン効果は認められなかった。

次に、TIPS 複合体の一構成部分であるリガンド (IBD) の重要性を検証するため、リガンドを欠損した複合体 (すなわち、COMP/Pvs25) で免疫した。その結果、TIPS 複合体と比較し、リガンド欠損型複合体のワクチン機能は Pvs25 単独と比較し同程度であった。以上の結果は、ワクチン抗原である Pvs25 は、それ単独では免疫原性が低いが、TIPS 複合体化することで高いワクチン機能を獲得することを示している。また、TIPS には B 細胞標的化のためのリガンドが必須であることも分かった。

TIPS はその構成要素である三部の何れも換装可能であるため、理論上、如何なるタンパク質抗原も搭載可能である。例えば、マラリアワクチン抗原だけでなく、ウイルス由来の抗原に対しても TIPS 技術が応用できることが示されており (発表論文 2 を参照)、本研究で確立した TIPS 技術は汎用性の高いワクチンプラットフォームとして利用できる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件全て査読有り)

1. Arakawa T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Sakao K, Torii M, Miyata T. (2014) Tricomponent complex loaded with a mosquito-stage antigen of the malaria parasite induces potent transmission-blocking immunity. **Clin Vaccine Immunol.** 21:561-569.
2. Arakawa T, Harakuni T, Miyata T, Tafuku S, Tadano M. (2014) Tricomponent fusion complex comprising a viral antigen, a pentameric α -helical coiled-coil, and an immunoglobulin-binding domain as an effective antiviral vaccine. **Vaccine** 32:864-871.
3. Miyata T, Tafuku S, Harakuni T, Tadano M, Yoshimoto N, Iijima M, Matsuo H, Matsuzaki G, Kuroda S, Arakawa T. (2013) A bio-nanocapsule containing envelope protein domain III of Japanese encephalitis virus protects mice against lethal Japanese encephalitis virus infection. **Microbiol Immunol.** 57:470-477.
4. Miyata T, Oshiro S, Harakuni T, Taira T, Matsuzaki G, Arakawa T. (2012) Physicochemically stable cholera toxin B subunit pentamer created by peripheral molecular constraints imposed by de novo-introduced intersubunit disulfide crosslinks. **Vaccine** 30:4225-4232.
5. Miyata T, Harakuni T, Taira T, Matsuzaki G, and Arakawa T. (2012) Merozoite surface protein-1 of *Plasmodium yoelii* fused via an oligosaccharide moiety of cholera toxin B subunit glycoprotein expressed in yeast induced protective immunity against lethal malaria infection in mice. **Vaccine** 30:948-958.
6. Tafuku S, Miyata T, Tadano M, Mitsumata R, Kawakami H, Harakuni T, Sewaki T, Arakawa T. (2012) Japanese encephalitis virus structural and nonstructural proteins expressed in *Escherichia coli* induce protective immunity in mice. **Microbes Infect.** 14:169-176.
7. Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Ikehara A, Tachibana M, Torii M, Matsuzaki G, Arakawa T. (2011) Tricomponent immunopotentiating system (TIPS) as a novel molecular design strategy for malaria vaccine development. **Infect. Immun.** 79:4260-4275.
8. Miyata T, Harakuni T, Sugawa H, Sattabongkot, J, Kato A, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T, Arakawa T. (2011) Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax*

ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine.

Vaccine 29:2720-2726.

[学会発表](計 11 件)

1. 原國哲也、山田清太郎、宮田健、山口類、玉城志博、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 (Pvs25) の反復整列化とそのワクチン効果」第 83 回日本寄生虫学会 平成 26 年 3 月 27-28 日 (愛媛大学)
2. 山口類、新川武、宮田健、原國哲也、田福宣治、只野昌之「日本脳炎ウイルス抗原、コイルドコイル 5 量体、免疫グロブリン結合ドメインから構成される三部構成複合体のワクチン機能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 平成 25 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール)
3. 山田清太郎、田福宣治、只野昌之、新川武「大腸菌発現日本脳炎ウイルス構造タンパク質および非構造タンパク質のウイルス感染防御能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 平成 25 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール)
4. 原國哲也、宮田健、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「コレラトキシン B 鎖と三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン抗原 Pvs25 の融合体構築とそのワクチン機能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 平成 25 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール)
5. 玉城志博、宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「マラリアワクチン抗原搭載三部構成免疫賦活システム (TIPS) のマラリア伝搬阻止ワクチン機能解析」第 54 回日本熱帯医学会大会 平成 25 年 10 月 3-5 日 (長崎ブリックホール)
6. 山田清太郎、宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「リガンドの換装による三部構成免疫賦活システム (TIPS) の三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン機能への影響」第 82 回日本寄生虫学会大会 平成 25 年 3 月 29-31 日 (東京医科歯科大学)
7. 原國哲也、宮田健、山田清太郎、山口類、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、新川武「*Plasmodium yoelii* MSP1 の高分子量化による可溶性凝集体化とそのワクチン機能増強効果」第 82 回日本寄生虫学会大会 平成 25 年 3 月 29-31 日 (東京医科歯科大学)
8. 宮田健、原國哲也、田福宣治、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、只野昌之、新川武「リガンド部分変更による三部構成免疫賦活システム (TIPS) の機能性向上の検討」第 16 回日本ワクチン学会学術集会 平成 24 年 11 月 17-18 日 (パシフィコ横浜)
9. 原國哲也、宮田健、大城聡、平良東紀、新川武「コレラトキシン B 鎖の構造安定化に向けた分子改変」第 16 回日本ワクチン学会学術集会 平成 24 年 11 月 17-18 日 (パシフィコ横浜)
10. 宮田健、原國哲也、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武「三部構成免疫賦活システム (TIPS)」第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会 平成 23 年 7 月 17-18 日 (東京慈恵会医科大学)
11. 原國哲也、宮田健、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武「酵母 *Pichia pastoris* 発現コレラトキシン B 鎖 (CTB) を用いたワクチンプラットフォームの開発」第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会 平成 23 年 7 月 17-18 日 (東京慈恵会医科大学)

〔図書〕(計2件)

1. 最新医学特集「次世代型感染症ワクチン」第69巻 第4号「サブユニットワクチン開発のための分子デザインとアジュバント」最新医学社(2014年)
2. 「アジュバント開発研究の新展開」監修:山西弘一((独)医薬基盤研究所)、石井健((独)医薬基盤研究所)第3章「細菌由来タンパク質成分を利用したアジュバント開発の新展開」新川武、宮田健 シーエムシー出版(2011年)

〔産業財産権〕

取得状況(計2件)

名称:樹状細胞表面タンパク質に対する抗体を有するバイオナノカプセル

発明者:黒田俊一、松尾秀典、良元伸男、飯島益巳、新川武

権利者:名古屋大学、琉球大学

種類:特許

番号:第5458286号

取得年月日:2014年1月24日

国内外の別:国内

名称:薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバントおよびワクチン

発明者:新川武、宮田健、松崎吾朗、坪井敬文

権利者:琉球大学

種類:特許

番号:第8580274号

取得年月日:2013年11月12日

国内外の別:国外(米国)

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

新川 武(Arakawa, Takeshi)

琉球大学熱帯生物圏研究センター 准教授

研究者番号:50305190

(2)研究分担者

宮田 健(Miyata, Takeshi)

鹿児島大学農学部 助教

研究者番号:20448591

(3)連携研究者

愛媛大学プロテオサイエンスセンター 教授

坪井 敬文(Tsuboi, Takafumi)

研究者番号:00188616