

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04725

研究課題名(和文) Pf75を標的とする新規熱帯熱マラリア伝播阻止ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of novel *P. falciparum* malaria transmission-blocking vaccine targeted against Pf75

研究代表者

鳥居 本美 (TORII, Motomi)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：20164072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫の生殖体表面分子(Pf75)が伝播阻止ワクチン候補抗原である可能性を検定する目的で本研究を実施した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成した組換えPf75を抗原として、ウサギを免疫して12種の抗血清を作製した。間接蛍光抗体法において3種の抗血清が熱帯熱マラリア原虫の生殖体に強い反応性を示した。抗Pf75抗血清を添加した感染血球を吸血させた蚊と抗GST抗血清添加群の蚊の中腸とに形成されたオーシスト数を比較して原虫の発育阻害効果を検定した。6種の抗血清の添加群においてオーシスト数の有意な減少が認められ、抗Pf75抗体が伝播阻止活性を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to investigate the possibility of Plasmodium falciparum gamete surface protein (Pf75) as a transmission-blocking vaccine candidate antigen. Twelve kinds of recombinant Pf75 were synthesized using a wheat germ cell-free protein synthesis system. To produce antiserum, a rabbit was immunized with each recombinant protein as an antigen. Three antisera showed strong reactivity to gametes of Plasmodium falciparum with immunofluorescence assay. Transmission-blocking efficacy was tested using standard membrane-feeding assay. The number of oocysts formed in the midgut of mosquitoes fed with infected erythrocytes mixed with anti-Pf75 antiserum or anti-GST antiserum was measured. A significant decrease in the number of oocysts was observed in the anti-Pf75 antiserum treated group compared to the anti-GST antiserum treated group (control), suggesting that the anti-Pf75 antibody has transmission-blocking activity.

研究分野：寄生虫学

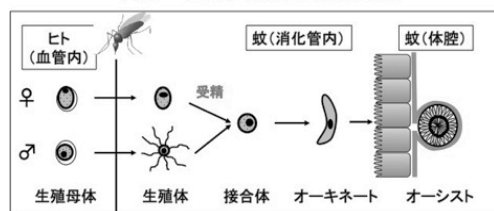
キーワード：マラリア 熱帯熱マラリア原虫 伝播阻止ワクチン 生殖母体 寄生虫学

### 1. 研究開始当初の背景

国際規模のマラリア対策では、死亡数を減少させるという従来の目標から、2007年以降はマラリア撲滅という一段と高い目標を掲げ、新規マラリア治療薬投与と薬剤含浸蚊帳によるベクター対策を用いたグローバルキャンペーンがアフリカを中心に展開されている。一方で、新たな武器として期待されながら開発の遅れているマラリアワクチンは、ヒトへの感染型であるスポロゾイトの表面抗原を標的とするワクチンの実用化を先行させてきたが、期待されたほどの効果があがっていない。また、病態に関わる赤血球ステージ原虫を標的とするワクチンは未だに候補分子の探索に難渋している。その中で近年、マラリアを媒介する蚊体内の原虫を標的とする伝搬阻止ワクチンが着目されている。

吸血によって蚊の中腸に取り込まれたマラリア原虫は、雌雄の生殖体が受精した後、接合体、オーキネートに発育し、中腸上皮を穿通して基底膜でオーシストへと変態する(図1)。

図1 マラリア原虫の有性生殖



伝搬阻止ワクチンは原虫表面抗原を標的とする

この蚊中腸内における各発育段階の原虫表面に発現する分子が伝搬阻止ワクチンの標的抗原となる。現在、これらの候補抗原の中で、オーキネート表面タンパク質のP25が臨床試験まで進んでいる。しかし、P25は人に投与した際の副反応や抗体価の上昇が弱い点が課題となっており、これに代わる新規候補抗原の開発が求められている。

我々は、P25およびP230 (Tachibana et al, 2011, 2012) に次ぐ新たな候補抗原を探索するために、ネズミマラリアをモデルとしたスクリーニングを行った。マラリア原虫のゲノムデータベース (PlasmoDB) を基に、①ヒトのマラリア (熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫) に相同体が存在し、②蚊ステージ原虫に特異的に発現し、③ワクチン標的となるために虫体表面に局在する可能性が高い、という特性を有することを条件として候補分子の選択を行った。最終的に約20のマラリア原虫分子まで絞り込み、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて組換えタンパク質を合成し、これらを抗原として抗血清を作製した。標的分子の局在を観察したところ、生殖体の表面に発現する新規分子 (Py75) を見いだすことができた。

そこで、Py75に対する特異抗体を用いてネズミマラリアにおける伝搬阻止活性を検討したところ、抗血清投与群において原虫数の

著しい減少効果が認められた。以上のネズミマラリアで得られた成果は、本候補分子が熱帯熱マラリアにおいても伝搬阻止ワクチン候補抗原となりうる可能性を強く示唆するものであると考え、熱帯熱マラリアにおける応用性を検討する本研究の実施を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、未だに世界の熱帯地域を中心に多くの住民が罹患し、多数の死亡を生じている熱帯熱マラリアを対象とした。実験室内で培養した生殖母体を含む感染血液を材料に、以下の方法によって熱帯熱マラリア原虫の生殖体の表面抗原 (Pf75) に対する特異抗体を用いて、媒介蚊への人工吸血法による伝搬阻止効果の検定を行い、Pf75の新規伝搬阻止ワクチン候補抗原としての可能性を明らかにすることを目的として実施した。

具体的には、我々がネズミマラリアで同定した伝搬阻止ワクチン候補分子 (Py75) の熱帯熱マラリア原虫の相同分子 (Pf75) の組換えタンパク質を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて作成し、これを抗原として抗Pf75抗体を作製する。この抗体と生殖母体を誘導した熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を混合したものを、人工吸血装置を用いて媒介蚊に吸血させる。十分に吸血した蚊を選択して飼育した後に、蚊体内で発育した原虫数を算定して感染原虫数を測定し、特異抗体による伝搬阻止活性を検定した。

### 3. 研究の方法

申請者らがネズミマラリアにおいて新規に同定した伝搬阻止ワクチン候補分子 (Py75) の熱帯熱マラリア原虫における相同体 (Pf75) の組換えタンパク質を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて作成し、これを抗原として抗Pf75抗体を作製した。この抗体と生殖母体を誘導した熱帯熱マラリア原虫感染赤血球とを混合したものを、人工吸血装置を用いて媒介蚊に吸血させた。十分に吸血した蚊を選択して飼育した後に、蚊体内で発育した原虫数を算定して感染原虫数を測定し、特異抗体による伝搬阻止活性を検定した。

(1) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた組換えタンパク質の大量合成：熱帯熱マラリア原虫のPy75相同体 (オルソログ) であるPf75遺伝子をNF54株 (MR4から入手) の生殖母体含有感染赤血球から抽出したcDNAを鋳型としてPCR増幅した。この際に、C末端側の膜貫通ドメインとN末端側の分泌シグナルを除いたほぼ全長の配列を増幅した。増幅した遺伝子産物をコムギ胚芽無細胞タンパク質発現プラスミドベクター (pEU-E01) に挿入し、組換えタンパク質の発現用コンストラクトを構築した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、His、GST (glutathion-S-transferase)、SUMOの各タグとの融合タンパク質として大量合成したものをアフィニティ精製した。

(2) 組換え Pf75 を用いた特異抗体の作成：精製した各 rPf74 を抗原として、それぞれを Freund's アジュバントと混和して 1 匹ずつのウサギの皮下に投与した。合計 3 回の免疫を行った後に全血を採血して、各抗原に対する抗血清を作製した。各 rPf75 を抗原とする ELISA を実施して、抗血清の抗原反応性を検定した。

(3) 生殖母体・生殖体における Pf75 の発現解析： 熱帯熱マラリア原虫 (NF54 株) を混合ガス (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) を充満した培養フラスコを用いて 37°C にて赤血球期原虫を培養する。生殖母体の培養は 5% ヘマトクリットの非感染赤血球に 0.2% の赤血球期原虫感染赤血球を加え、10ml の complete medium (RPMI-1640 with 6g/L of HEPES, 50mg/L of hypoxanthine, 2.5g/L of NaHCO<sub>3</sub> and 10% human serum) 中で約 18 日間培養するが、培養期間中に 2 日目を除いて新鮮非感染赤血球を添加せずに培養を継続した。形態的に Stage V まで発育し、鞭毛放出活性を有することが確認できたものを実験に用いた。各抗血清の原虫抗原に対する反応の特異性を確認するため、熱帯熱マラリア原虫 (NF54 株) の生殖母体と生殖体を抗原とする間接蛍光抗体法 (IFA) を実施した。培養により誘導した Stage V の生殖母体および鞭毛放出誘導培地を加えて 10 分間培養した生殖体を含む感染赤血球を材料として、薄層塗抹標本を作製し、氷温のアセトンで 5 分間固定した。5% 脱脂粉乳を含む PBS を用いて室温で 1 時間のブロッキング処理をした後に、各抗血清を 37°C で 1 時間反応させた。2 次抗体として Alexa Fluor 488 で標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体を 37°C で 30 分間反応させた。核染色のために 2 次抗体に DAPI を添加した。反応後の標本を ProLong Gold Antifade reagent で封入し、蛍光顕微鏡 (Axio Scope A1; Carl Zeiss) を用いて、原虫における Pf75 の発現と局在部位を観察した。

(4) 抗 Pf75 特異抗体による熱帯熱マラリア伝搬阻止活性の検定： 感染赤血球に抗 Pf75 特異抗体を混合して血液を再構築し、人工吸血装置 (メンブレンフィーダー; 下図を参照) を用いて、マラリア媒介蚊に吸血させた。

図 2：メンブレンフィーディング法による伝搬阻止活性測定



十分に吸血した蚊を選別して、約 8 日間室温

で飼育した後に、蚊を解剖し、中腸壁に形成された原虫 (オーシスト) 数を顕微鏡下で算定し、伝搬阻止活性を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 組換え Pf75 の作製： 熱帯熱マラリア原虫の生殖体表面に共在する分子 (Pf75) をコードする遺伝子の N 末端側のシグナル配列を除くほぼ全長を、熱帯熱マラリア原虫 NF54 株から抽出した遺伝子を鋳型として PCR 増幅した。増幅した遺伝子産物をコムギ胚芽無細胞タンパク質発現プラスミドベクターに挿入してタンパク質発現用コンストラクトを構築し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成を行った。N 末端側の変異領域を有するものと欠損させるものを作製し、各々について付加する His、GST (Glutathion-S-transferase) または SUMO などのタグの組み合わせと位置を代えることによって、12 種類の組換え Pf75 を融合タンパク質として作製した。この際、合成の反応液中に 1~8 は Brij35 を添加し、9~12 は添加しない条件下で合成した。作製した組換えタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって展開したところ、以下の図 3 および 4 に示すように、12 種の組換えタンパク質のすべてが予定通りに合成されていることが確認された。

図 3：組換え蛋白質の発現 (1)

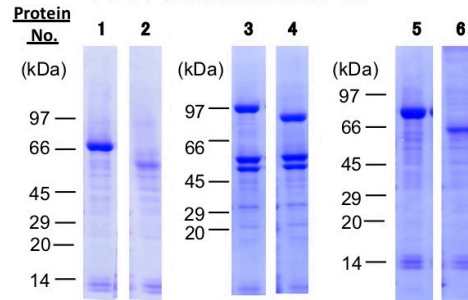
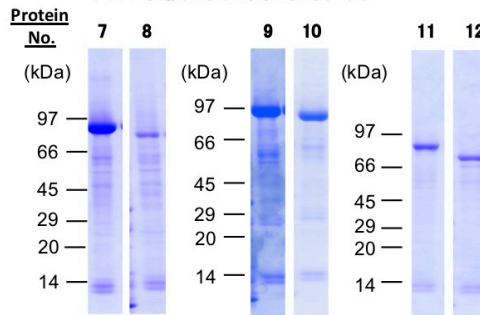
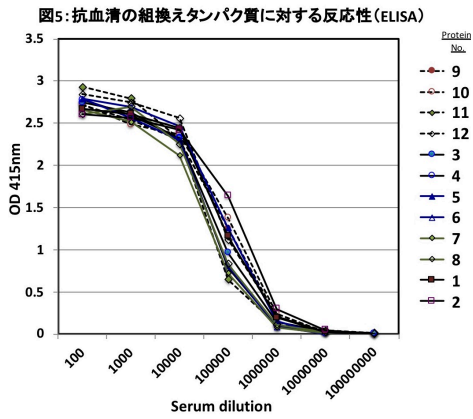


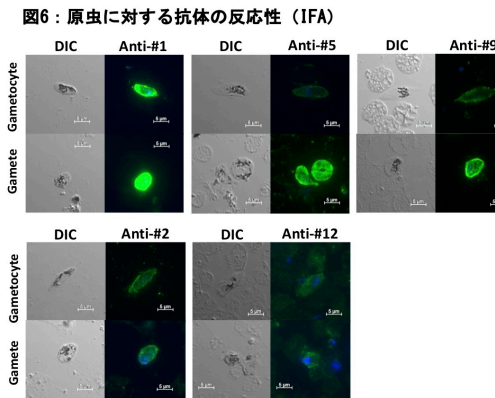
図 4：組換え蛋白質の発現 (2)



(2) 特異抗体の作製： 精製した組換えタンパク質をそれぞれ Freund's アジュバントと混和して 1 匹ずつのウサギの皮下に投与し、合計 3 回の免疫の後に全血を採血して、各抗原に対する抗血清を作製した。免疫抗原とした rPf75 に対する各抗血清の反応性を ELISA 法によって測定した結果、図 5 に示すように、すべての抗血清において免疫抗原とした rPf75 に対する高い反応性が示された。

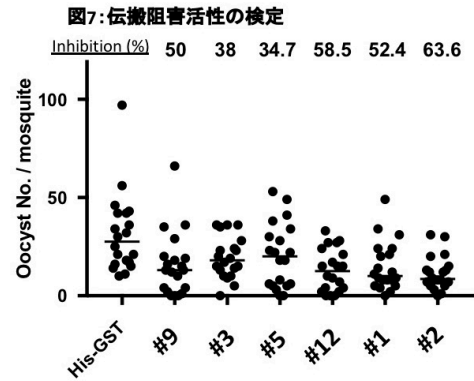


(3) 原虫抗原に対する抗体の反応性の検討: 免疫した組換えタンパク質に特異的に反応する抗体が得られたことが確認されたので、これらの抗体の熱帯熱マラリア原虫の生殖母体および生殖体の原虫抗原 (Pf75) に対する反応性の検討を、IFA によって行った。その結果、図 6 に示すように、#1 に対する抗血清は生殖母体および生殖体に強い反応性を示し、#5, #9 に対する抗血清は生殖体に強い反応を示すが生殖母体への反応性は弱く、#2 と #12 は生殖母体と生殖体に弱い反応性を示した。#3, #4, #6, #7, #8, #10, #11 に対する抗体では明瞭な反応が観察されなかった。



(4) 熱帯熱マラリア伝播阻止活性の検定 (Standard Membrane Feeding Assay) : 熱帯熱マラリア原虫に反応が認められた抗血清と熱帯熱マラリア原虫感染赤血球に混合して再構築した血液を、人工吸血装置 (メンブレンフィーダー) を用いて、マラリア媒介蚊に吸血させた。8 日後に蚊を解剖し、中腸壁に形成された原虫 (オーシスト) 数を顕微鏡下で計測した。使用した 9 種類の抗 Pf75 抗血清の各々についてコントロールの抗 GST 抗血清添加群の蚊の中腸に形成されたオーシスト数との比較検定を行った。その結果、IFA で強い反応性が認められた #1 では 2 回の検定においてコントロールに比較して 52% ( $p=0.007$ ) と 38% ( $p=0.0451$ ) のオーシストの発育阻害が、#5 では 35% ( $p=0.0653$ )、#9 では 50% ( $p=0.001$ ) のオーシストの発育阻害効果が認められた。また、IFA で弱いながらも反応が認められた #2 においては、2 回の検定

で 64% ( $p<0.0001$ ) と 39% ( $p=0.002$ ) のオーシストの発育阻害が、#12 においても同様に 59% ( $p=0.003$ ) と 32% ( $p=0.0011$ ) の発育阻害効果が認められた。これに対し、IFA で反応性が確認できなかった #3 において、38% ( $p=0.0362$ )、#4 でも 38% ( $p=0.0013$ ) のオーシストへの発育阻害効果が認められた。その他の抗血清では有意の発育阻害効果を認めなかった。人工吸血法による伝播阻害活性検定の結果の一部を図 7 に示す。



(5) まとめ: 熱帯熱マラリア原虫の生殖体表面分子 (Pf75) が伝播阻止ワクチン候補抗原である可能性を検定する目的で本研究を実施した。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成した組換え Pf75 を抗原として、ウサギを免疫して 12 種の抗血清を作製した。3 種の抗血清の IFA で熱帯熱マラリア原虫の生殖母体に強い反応性を示した。抗組換え Pf75 抗体添加血液を吸血した蚊とコントロールとした抗 GST 抗体添加群の蚊の中腸に形成されたオーシスト数を比較して伝播阻害効果の検定を行った。9 種の抗血清の多くの抗血清において、これらを添加した吸血実験でオーシスト数の有意な低下が認められた。それにより作製した抗血清が伝播阻止活性を有することが示された。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

① 橘真由美、島居本美、坪井敬文、石野智子. 新規伝播阻止ワクチン候補 PyGiMGS 抗体は、ミクロガメートの動きを止める. 第 87 回日本寄生虫学会大会. 東京, 2018 年

② Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino. PyGM75, a protein in osmiophilic bodies, is dispensable for egress of male gametocytes but important for exflagellation of microgametes. 66th annual meeting of American Society of Tropical Medicine & Hygiene. Baltimore, USA, 2017

③橘真由美、鳥居本美、須藤萌、坪井敬文、石野智子. 雄特異的 osmiophilic body タンパク質 PyGM75 の生殖体・接合体形成過程における役割の解析. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 札幌市、2017 年

④橘真由美、鳥居本美、須藤萌、坪井敬文. 新規伝搬阻止ワクチン候補 PyGM75 の抗原決定領域の決定. 第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎市、2016 年

⑤Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino. C-terminus region of male gamete surface protein, PyGM75 induce malaria transmission-blocking antibody. Molecular approaches to Malaria 2016, Lorne, Australia, 2016.

⑥Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino. Screening for highly immunogenic region of PyGM75, a novel transmission-blocking vaccine candidate. 64th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, USA, 2015.

〔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：<https://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥居 本美 (TORII, Motomi)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授  
研究者番号：20164072

### (2) 研究分担者

橘 真由美 (TACHIBANA, Mayumi)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教  
研究者番号：00301325

石野 智子 (ISHINO, Tomoko)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授  
研究者番号：40402680

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )