

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05816

研究課題名(和文)新規三日熱マラリアワクチン候補抗原(PvGs24)の伝搬阻止効果の解析

研究課題名(英文)Assessment of *P. vivax* transmission-blocking activity of novel vaccine candidate (PvGs24)

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：新規の三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原であるPvGs24を標的とする伝搬阻止効果の検討を、タイとミャンマーの国境地域をフィールドとして実施した。作成した組換えPvGs24を用いてウサギを免疫して抗PvGs24抗体を作成した。タイの三日熱マラリア患者から同意を得たうえで採血した感染赤血球と持参した抗PvGs24抗血清を混合したものを人工吸血法によって媒介蚊に吸血させた。約10日後に蚊体内の中腸表面に形成される原虫(オーシスト)の数を計測して伝搬阻止活性の検定を行なった。その結果、一部ではあるが抗PvGs24抗体により有意な伝搬阻止活性を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは熱帯地方の開発途上国において医療・経済の両面で重大なインパクトを与える疾病として国際的に注目されている。新規抗マラリア薬の開発と並んでマラリアワクチンの開発が望まれているが、現在まで有効なワクチン抗原は見いだされていない。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注目されている。我々の基礎研究から、アジア地域で広く蔓延している三日熱マラリアの伝搬阻止ワクチン候補抗原としてPvGs24を見出した。本研究によりPvGs24が伝搬阻止ワクチン抗原として有効であることが確認できれば、新たな三日熱伝搬阻止ワクチンの実用化への道が開かれる。

研究成果の概要(英文)：Development of a malaria vaccine along with a new antimalarial drug is desired. However, at present, no effective vaccine target has been found. We conducted a study on the transmission-blocking vaccine development targeting PvGs24, which is a novel transmission-blocking vaccine candidate against vivax malaria, in the border area between Thailand and Myanmar. Rabbits were immunized with the recombinant PvGs24 to prepare anti-PvGs24 antibody. A mixture of infected red blood cells collected from a vivax malaria patient in Thailand and anti-PvGs24 antiserum was fed to vector mosquitoes by an artificial blood-feeding method. Approximately 10 days later, the number of oocysts formed on the midgut surface of the mosquito was counted to evaluate the transmission-blocking efficacy of the antiserum. As a result, it was shown that the anti-PvGs24 antibody has a significant transmission-reducing effect in a part of the blood-feeding experiments using anti-PvGs24 antiserum.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア 三日熱マラリア ワクチン 伝搬阻止ワクチン 寄生虫学

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界各地の熱帯地方を中心に年間 40 万人以上の死亡を起こす重要な感染症である。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が掲げられ、新規マラリア治療薬投与レジメと薬剤含浸蚊帳によるベクター対策による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、新たな武器になると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報告されていない。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。

吸血によって蚊に取り込まれたマラリア原虫は、中腸腔内で雌雄の生殖体が受精した後、接合体、オーキネートへと発育し、中腸上皮を穿通して基底膜でオーシストに変態する(図 1)。以上の蚊中腸内で発育する原虫の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十分な抗体価上昇が見られな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。

申請者らは、研究が先行している P25 および P230 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新規候補分子のスクリーニングを行ってきた。蚊ステージ原虫に特異的な分子の遺伝子発現およびタンパク質発現のデータベースを基に、①主要なヒトマラリア(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蚊ステージ原虫に発現が認められ、③ワクチン標的として虫体表面に局在する可能性が高い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に候補を絞り込み、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。間接蛍光抗体法を用いて標的分子の局在を解析した結果、生殖母体の表面に局在する新規分子である PyGs24 (*Plasmodium yoelii* Gametocyte surface protein 24) を見いだした。そこで、PyGs24 に対する抗血清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減少効果が認められるという結果を得た。ネズミマラリアで得られた成果は、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) における相同体 (PvGs24) が伝搬阻止ワクチン候補抗原となる可能性を示唆するものであった。そこで、PvGs24 の三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原としての有用性を検証するために、抗 PvGs24 抗体を作出し、三日熱マラリアの流行地であるタイ王国において本研究を実施することを計画した。

## 2. 研究の目的

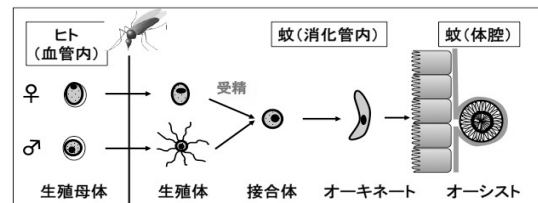
本研究では、アジア地域を中心に患者数が多いにもかかわらず、対策が進んでいないために「忘れられた感染症」として新たな感染制御法の樹立が期待される三日熱マラリアを対象として実施した。流行地であるタイ王国の患者から採取した感染赤血球を材料に、以下の方法により PvGs24 の伝搬阻止ワクチン候補抗原としての有用性を検討した。

(1) 申請者らが先行研究において見いだした新規伝搬阻止ワクチン候補分子 (PvGs24) 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により作成する。これを抗原としてウサギを免疫して抗血清を作製し、以下の伝搬阻止活性の検定に供する。(2) タイ王国内の流行地において、三日熱マラリア患者から採取した赤血球に作製した抗血清を混合して、抗 PvGs24 抗体を含むものとして患者血液を再構築し、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を評価し、候補抗原に対する抗血清添加群とコントロール血清添加群間の差を検定して伝搬阻止効果を評価する。

## 3. 研究の方法

我々が、新規の伝搬阻止ワクチン候補分子として同定した分子 PyGs24 の三日熱マラリア原虫における相同体 (PvGs24) 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 PvGs24 に対する抗血清を作製した。この抗血清の伝搬阻止効果を評価するために、三日熱マラリアの流行地であるタイ王国において、PvGs24 に対する抗血清と三日熱マラリア患者から得た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飼育した後に、抗血清投与群とコントロール血清投与群の蚊体内で発育した原虫数を比較して、抗血清による伝搬阻止活性を検定した。

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に発現する抗原を標的とし、蚊の体内で原虫の発育を止めることで、伝搬を阻害する。

### (1) 調査・研究を実施した地域

本研究は、図 2 に示すタイ王国西部でミャンマーとの国境地帯に位置するターソンヤ (Tha Song Yang) およびカンチャナブリ (Kanchanaburi) 地域内の各 3 カ所のマラリア診療所を訪れたマラリア患者から採取した感染血液を用いて実施した。この地域はタイ王国におけるマラリアの代表的な高度流行地であり、年間を通じて三日熱マラリア患者が診療所を受診している。本研究の海外共同研究者である Sattabongkot 博士は、ターソンヤおよびカンチャナブリ地域にある診療所を拠点として、年間を通してマラリアの流行に関する疫学調査を実施すると共に、申請者らと共同してマラリア伝搬阻止ワクチン開発の基礎研究を継続して実施している。この地域におけるマラリアを媒介する主要なハマダラ蚊は *Anopheles dirus* である。



図 2. 調査地域の位置を示す地図

*A. dirus* の大量飼育を行っている Sattabongkot 博士らの研究施設から、媒介蚊の提供を受けて本研究に使用した。我々は両地域を計 4 回訪問し、それぞれ約 8～9 日の滞在期間で本研究を実施した。

### (2) 組換えタンパク質 (rPvGs24) の大量合成と特異抗体の作成

伝搬阻止ワクチン候補抗原 (PvGs24) の遺伝子を、流行地患者株の生殖母体を含む感染血液から抽出した cDNA から N 末端側の分泌シグナル部分を除くほぼ全長の配列を 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、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、GST (glutathion-S-transferase) 融合組換えタンパク質 (rPvGs24) として大量合成したものをアフィニティ精製した。

特異抗体を作成するため、精製した rPvGs24 を抗原として、Freund's アジュバントと混和して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、抗血清を作製した。rPvGs24 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) 抗 PvGs24 抗体の原虫タンパク質への反応性の検定

三日熱マラリア患者から採血した血液の厚層塗抹標本をギムザ染色したものを顕微鏡診断し、生殖母体を有することが確認された患者血液を western-blot 法および間接蛍光抗体法の抗原として用いた。

生殖母体を含む患者血液からの原虫タンパク質を、非還元条件の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) ローディングバッファーで抽出し、97°C で 5 分間煮沸した後、12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分離した。これをポリフッ化ビニリデン膜に転写し、Blocking One で 1 時間インキュベートした後、抗 PvGs24 抗体を 1 時間反応させた。次に転写膜を HRP 結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体に 30 分間反応させ、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate を用い、LAS 4000 発光画像分析装置で可視化した。

間接蛍光抗体法では、生殖母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、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 PvGs24 の発現と局在部位を観察した。

### (4) 抗血清による伝搬阻止効果の測定 (メンブレンフィーディング法)

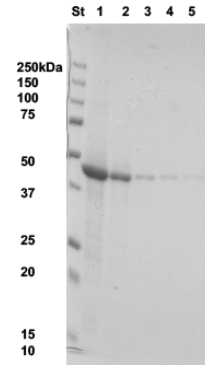
作製した特異抗体を含む抗血清をフィールドに持参して以下の研究を行った。タイ王国のターソンヤおよびカンチャナブリのマラリア診療所において、三日熱マラリアと診断された患者に対して現地スタッフがインフォームドコンセントを得た後に、肘静脈から採血した患者血液を材料として、三日熱マラリア原虫の感染赤血球を調製した。この感染赤血球に、持参した抗血清を等量の正常ヒト血清と混合したものを加えて、抗 PvGs24 抗体を含む血液として再構築し、人工吸血装置 (メンブレンフィーダー) を用いて、其々につき 100 匹のマラリア媒介蚊 (*A. dirus*) に吸血させた。十分に吸血した蚊を選別して、室温で約 10 日間飼育した後、蚊を解剖して中腸を摘出し、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た。抗 PvGs24 吸血群とコントロール血清吸血群の蚊のオーシスト数を比較して伝搬阻止活性の評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 組換え PvGs24 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 (PvGs24) 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、三日熱マラリア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。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、図 3 に示すように、予想される分子量で組換えタンパク質 (rPvGs24) が合成されていることが確認された。

図 3. 組換えタンパク質の発現



##### (2) 特異抗体の作製 :

精製 rPvGs24 を Freund's アジュバントと混和してウサギの皮下に合計 3 回投与して免疫した後、全血を採血して、PvGs24 に対する抗血清を作製した。免疫抗原とした rPvGs24 に対する抗血清の反応性を ELISA 法によって測定した結果、表 1 に示すように、抗血清は rPvGs24 に対して十分な反応性を示したが、陽性コントロールとして用いた抗 Pvs230 抗体の rPvs230 抗原に対する反応に比較するとやや低値であった。

表 1. ELISA による抗体価の評価

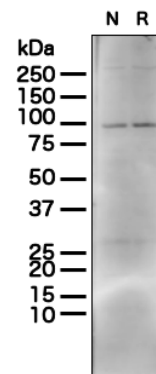
抗原	rPvs230D1	rPvs230D9	rPvGs24
抗体	RMAL538	RMAL65	RMAL447
ELISA titer (OD=0.5)	6.05	5.81	5.29

##### (3) 原虫由来 PvGs24 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、これらの抗体の三日熱マラリア原虫の生殖母体および生殖体の原虫由来抗原に対する反応性の検討を行った。

生殖母体を含む三日熱マラリア患者血液を材料とする Western-blot 解析を行ったところ、図 4 に示す様に PvGs24 に相当する 25kDa 付近に弱いバンドが認められる一方で、100kDa 辺りに強い反応が認められた。また、患者血液を材料とした間接蛍光抗体法による抗原分子の局在の確認を行った。その結果、図 5 に示すように抗血清は蛍光強度がやや弱いものの、生殖母体に特異的な反応を示した。

図 4. Western-blot

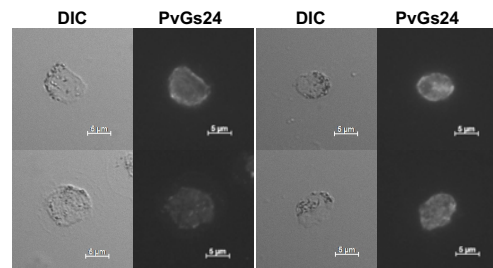


N. 非還元条件  
R. 還元条件

##### (4) 抗 PvGs24 抗体による伝搬阻止活性の検定

抗 PvGs24 抗体を含む抗血清と三日熱マラリア原虫感染赤血球とを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、媒介蚊 (*A. dirus*) に吸血させた。10 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。抗 PvGs24 血清添加群とコントロールの抗 GST 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。コントロール群が陽性の感染を示した患者血液を用いた人工吸血実験の結果を図 6 に示す。

図 5. 蛍光抗体法による抗体の反応性



DIC, 位相差顕微鏡像  
PvGs24, 蛍光顕微鏡像

図 6a 患者 A の血液を用いた結果

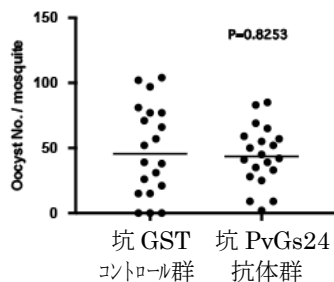


図 6b 患者 B の血液を用いた結果

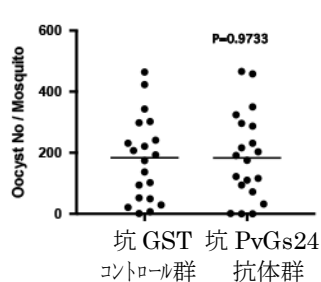


図 6c 患者 C の血液を用いた結果

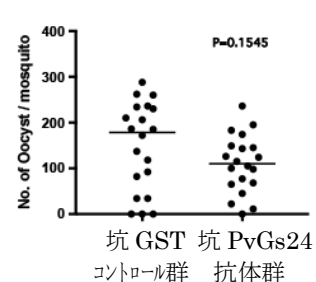


図 6d 患者 D の血液を用いた結果

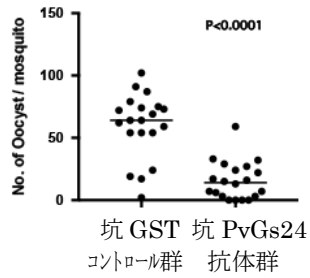
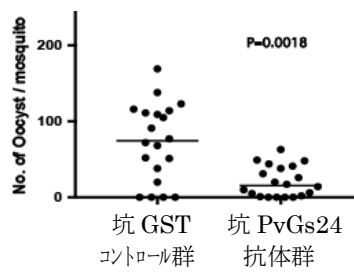


図 6e 患者 E の血液を用いた結果



患者 A、B、C から採血した感染赤血球を用いて実施した人工吸血法では、コントロールとして用いた坑 GST 抗体を添加して吸血させた蚊の中腸に形成されたオーシスト数と坑 PvGs24 抗体を添加して吸血させた実験群の蚊の中腸に形成されたオーシスト数には有意な差が認められなかった (Mann-Whitney U test を用いて検定した際の P 値は、0.1545 から 0.9733)。他方、患者 D、E から採血した感染赤血球を用いて実施した人工吸血法では、コントロールとして用いた坑 GST 抗体を添加して吸血させた蚊の中腸に形成されたオーシスト数と坑 PvGs24 抗体を添加して吸血させた実験群の蚊の中腸に形成されたオーシスト数には有意な差が認められた (Mann-Whitney U test を用いて検定した際の P 値は、0.001 以下および 0.0018)。以上の結果は、一部の患者では坑 PvGs25 抗体によりハマダラ蚊の体内における三日熱マラリア原虫の発育が有意に阻害され、伝搬阻止効果を有することを示唆するものであった。しかし、過半数の患者から得た赤血球を用いた人工吸血実験ではコントロール群の蚊と実験群の蚊の中腸に見出された原虫数にほとんど差が認められず、患者によって吸血実験の結果が全く異なることが示された。今後、これらの差がどのような要因から生じているのかを検討し、PvGs24 の伝搬阻止ワクチン候補抗原としての可能性を評価する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	橘 真由美  (TACHIBANA Mayumi)  (00301325)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教   (16301)	
研究分担者	石野 智子  (ISHINO Tomoko)  (40402680)	愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授   (16301)	