

機関番号：18001
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590425
 研究課題名（和文）マラリアワクチン開発のためのアジュバント分子構築とその免疫賦活機能の解明
 研究課題名（英文）Development of molecular adjuvants for design of malaria vaccines
 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

研究成果の概要（和文）：

我々は独自のワクチンプラットフォームの技術基盤構築に成功し（「薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバント及びワクチン」PCT/JP2010/51915（2010年2月10日））、それを三日熱マラリア（*Plasmodium vivax*）伝搬阻止ワクチン候補抗原（Pvs25）およびネズミマラリア原虫（*Plasmodium yoelii*）のメロゾイト抗原（MSP1）に対する有効性として実証した。また、本システムの日本脳炎ウイルス感染に対する有効性も示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a novel strategy to increase immune responses by creating genetic protein fusion complex composed of three physically linked molecular entities: (i) a vaccine antigen, (ii) an α -helical coiled-coil, and (iii) an antigen-presenting cell-targeting ligand. Vaccine efficacy of the tricomponent complex was evaluated using an ookinete surface protein of *Plasmodium vivax* and a merozoite surface protein of *Plasmodium yoelii*. Immunization of mice conferred substantial levels of *P. vivax* transmission blockade as well as protection from lethal *P. yoelii* infection in mice. This system, designated as the tricomponent immunopotentiating system (TIPS), onto which any recombinant antigens could be loaded, may be a promising strategy in devising subunit vaccines against malaria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：ワクチン学

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：マラリア、ワクチン、アジュバント、デリバリーシステム、ワクチンプラットフォーム

1. 研究開始当初の背景

歴史的にワクチンは感染症対策に大きく貢献してきた (Oya, 1992)。しかし、マラリアに対しては未だ有効なワクチンがない。近年のワクチンへの期待は様々であるが、国内外を問わず新しいワクチン研究開発の動向として、組換えタンパク質や組換え生物自体を活用したものが重要になってくると思われる。特に、マラリア等の寄生虫疾患に対しては、ウイルスや細菌性の感染症と異なり、病原体の一部を組換え技術によって造り出したコンポーネントワクチンに頼らざるをえない。これまで我々は、寄生虫 (マラリア原虫、日本住血吸虫、回虫)、ウイルス (日本脳炎ウイルス)、細菌 (結核菌)、プリオン、自己免疫疾患などを対象に、既知および新規の抗原を用いて感染防御ワクチンの可能性を検討してきたが、何れの場合もアジュバントやデリバリーシステムといった免疫を増強する何らかの工夫が必須であった。この点に関しては、世界保健機構の Robert Bergquist も過去に以下のように述べている。「科学者が今日まで、マラリア、リーシュマニア、住血吸虫症などの寄生虫感染症に対するワクチンの開発を試みてきたなかで学んだことは、この目標が如何に難しく、また、アジュバントの存在なしには決して実現できないという現実である。」(*TRENDS in Parasitology* Vol. 21 No. 3 March 2005)

これまで我々は、マラリア伝搬阻止粘膜ワクチンの研究開発に携わってきたが、そのなかでもアジュバントは極めて重要なものであるという結論に達している。例えば、以前、タイ国のマラリア感染患者から採取した原虫 (三日熱及び熱帯熱) の媒介蚊への伝播を完全に抑制できる研究結果を報告したが (Arakawa, 2003, 2005)、単に抗原を粘膜面

へ投与しても殆ど免疫応答を惹起できなかった事実は、ワクチン開発における重要課題であると考えていた。従って、如何に防御効果の高い抗原を発掘しても、有効な (粘膜) アジュバントあるいは (粘膜) デリバリーシステムなしには有効なワクチンを開発することは難しいというのが我々の見解であった。研究開始当初、このことを強調する国内の研究者は少数派であったが、我々はワクチン、特に組換えタンパク質性の抗原の免疫原性を向上させることが、ワクチン抗原の発掘にも匹敵する重要課題であると認識していた。これは、上述した Robert Bergquist の認識と同じであった。よって、我々は組換えタンパク質を基にした粘膜ワクチンの開発に対しては当然のこと、組換えタンパク質を用いたワクチン全般について、アジュバント分子の開発とそれを如何に安定した形で免疫系に提示できるか、即ちデリバリー機能の賦与が極めて重要であるという認識のもと、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究課題の申請時における最大の目的は、新たな (粘膜) アジュバント及び (粘膜) デリバリーシステムの基盤となる技術を開発することであり、未だ有効なワクチンが存在しないマラリアを具体的な標的とし、そのワクチン開発に貢献するプラットフォーム技術を確立することであった。さらに、それが他の感染症ワクチン開発の足がかりとなることを目標に設定した。これまでのワクチン研究開発の多くは、新規の防御抗原の探索が主流であったが (無論その重要性は極めて大きい)、我々は以前からアジュバントやデリバリー分子の開発が極めて重要であることを認識していた。特に、寄生虫疾患に対しては、組換えタンパク質性の抗原を基にした

コンポーネントワクチンに頼らざるを得ないため、その重要性は高かった。

研究開始当初、我々は以下の三点をワクチンプラットフォームの評価系として確立することを目的とした。

- (1) 生産効率解析 (コスト面、構築産物の安定性等における優位性)
- (2) 免疫学的機能解析 (並びに安全性確認)
- (3) 感染防御機能解析

また、その目的のため、具体的標的分子として、三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 (Pvs25) を選択し、研究期間内に以下の三点を達成することを目標とした。

- (1) 新しい独自のアジュバント・デリバリーシステムの構築
- (2) その生化学的、免疫学的機能解析ならびにマラリアに対する感染防御機能の解析
- (3) 構築したワクチンプラットフォームの他の感染症への応用技術の確立

3. 研究の方法

マラリアワクチンプラットフォーム開発のため、大量生産可能な発現系 (コスト面の優位性)、構築産物の安定性に加え、免疫学的な優位性、安全性、そして最も重要な感染防御機能を併せ持ったシステムを構築することを計画した。そのため、遺伝子・タンパク質工学、免疫学、寄生虫学の三専門分野およびマラリア浸淫地域 (タイ国北東部) をフィールドにもつ研究グループと国際連携チームを組み、具体的には三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原 (Pvs25) をモデルとし、以下の五段階を順次完了させることを計画した。

- (1) アジュバント・デリバリー系に関する分子およびシステムの構築
- (2) その物性に関する生化学的解析
- (3) その免疫賦活機能の免疫学的解
- (4) Pvs25 抗原をモデルとしたワクチンの

免疫原性向上に向けた機能解析ならびにマラリア感染患者血液と媒介蚊を用いた伝搬阻止機能解析

- (5) 以上の結果を基にした他のワクチン開発への応用研究の展開 (メロゾイトワクチンのモデルとしてネズミマラリア原虫の MSP1 抗原を含む)

4. 研究成果

本研究では、我々独自のワクチンプラットフォーム技術「三部構成免疫賦活システム (Tricomponent Immunopotentiating System: TIPS) 」を開発した (PCT/JP2010/051915)。TIPS は、①ワクチン抗原、②多量体を形成するコイルドコイル構造をもつコアモチーフ、③標的リガンドの三部から構成され、その何れの構成部分も目的に応じて換装可能なシステムである (図1)。

この多量体を形成させるデザインの利点は、分子全体の安定性と Avidity (個々の標的リガンドのレセプターへの親和性の和) が向上することである。ワクチンを搭載した多量体分子は、標的リガンドによって目的の免疫担当細胞、特に樹状細胞や B リンパ球などの抗原提示機能をもつ細胞へワクチン抗原を効率良く運搬できる。また同時に、多量体分子は細胞内シグナル伝達を増強し、効果的に免疫応答を惹起することができる (図2)。本研究では TIPS の機能評価のため、マラリア原虫に対する効果を検証した。その結果、

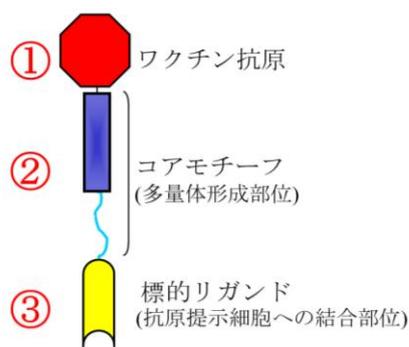


図1 TIPS

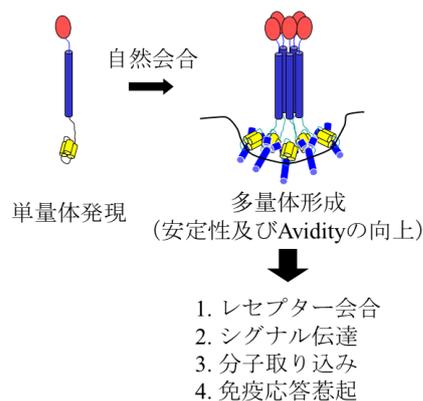


図2 TIPSの機能

マウスを用いた動物実験において、マラリア原虫の致死感染を完全に防御できる免疫を賦与することに成功した。つまり、TIPSにワクチン抗原を搭載することで高い感染防御免疫が成立することが分かった。

これまで、TIPSは二種類のマラリア原虫抗原 (Pvs25、MSP1) および一種類の日本脳炎ウイルス抗原を用いてその有効性を確認しており、他の感染症への汎用性も期待できると考えている。特筆すべき点は、本研究期間中に我々のワクチンプラットフォーム技術を応用することで、*家畜感染症Aに対するワクチンの実用化の見通しが出てきたことである。さらに、TIPSの研究から派生した関連技術を分子生物学的実験ツールとして開発することにも成功し(特願 2009-200164)、既に国内試薬メーカーと共同で実用化研究段階に入っている。(*家畜感染症Aに対するワクチン研究開発に関しては、まだ特許申請前のため、共同研究開発者である製薬企業の実名や対象となる病名を開示できない。)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

(主な原著論文 全て査読有)

1. Miyata T, Harakuni T, Sugawa H, Sattabongkot, J, Kato A, Tachibana M, Torii M, Tsuboi T and Arakawa T. (2011) Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax*

ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. **Vaccine** 29:2720-2726.

2. Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T. (2010) *Plasmodium vivax* ookinete surface protein Pvs25 linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. **Infect Immun.** 78:3773-3782.
3. Arakawa T, Tachibana M, Miyata T, Harakuni T, Kohama H, Matsumoto Y, Tsuji N, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, and Tsuboi T. (2009) Malaria ookinete surface protein-based vaccination via the intranasal route completely blocks parasite transmission both in passive and active vaccination regimes in a rodent malaria infection model. **Infect. Immun.**, 17:5496-5500.
4. Harakuni T, Kohama H, Tadano M, Uechi G, Tsuji N, Matsumoto Y, Miyata T, Tsuboi T, Oku H, Arakawa T. (2009) Mucosal Vaccination Approach against Mosquito-Borne Japanese Encephalitis Virus. **Jpn. J. Infect. Dis.** 62:37-45.
5. Kohama H, Umemura M, Okamoto Y, Yahagi A, Goga H, Harakuni T, Matsuzaki G, Arakawa T. (2008) Mucosal immunization with recombinant heparin-binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) in

infected mice. **Vaccine** 26:924-932.

(総説 全て査読無)

1. Arakawa T. (2011) Adjuvants: no longer a 'dirty little secret', but essential key players in vaccines of the future. **Expert Rev. Vaccines** 10:1-5.
2. 新川武、宮田健、原國哲也 (2009) 「新しい感染症防御ワクチンプラットフォーム創製への取り組み」日本獣医寄生虫学会誌 (Jpn. J. Vet. Parasitol. 8:11-22.)

[学会発表] (計43件)

1. Takeshi Arakawa 「A new malaria vaccine platform technology for improved parasite transmission blockade and protection against lethal parasite infection」第4回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 平成22年2月8日 (岡山大学)
2. 新川武 「新しい感染症防御ワクチンプラットフォーム創製への取り組み」農研機構・生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業セミナー 平成22年1月21日 (東京大学農学部弥生講堂)
3. 宮田健、原國哲也、池原歩、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14回日本ワクチン学会学術集会 平成22年12月11-12日 (九段会館、東京)
4. 原國哲也、宮田健、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、李長春、渡部久実、松崎吾朗、新川武 「酵母 *Pichia pastoris* 発現ネズミマラリア原虫メロゾイト表面抗原 MSP1-19 の感染防御効果」第14回日本ワクチン学会学術集会 平成22年12月11-12日 (九段会館、東京)
5. Takeshi Arakawa、Takeshi Miyata、Tetsuya Harakuni “A new vaccine platform technology for improved protection against malaria parasite infection” International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, 平成22年10月14-15日 (ソウル、韓国)
6. Takeshi Miyata、Ayumu Ikehara、Tetsuya Harakuni、Takafumi Tsuboi、Jetsumon Sattabongkot、Mayumi Tachibana、Torii Motomi、Goro Matsuzaki、Takeshi Arakawa “Tricomponent Immunopotentiating System”, a novel vaccine platform technology 第14回国際免疫学会議 平成22年8月22-27日 (神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場、神戸市)
7. 新川武、宮田健、原國哲也、池原歩、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗 「新たなワクチンプラットフォーム創製のための三部構成四価免疫賦活複合体 (TITs)」第79回寄生虫学会 平成22年5月20-21日 (旭川市)
8. 宮田健、原國哲也、池原歩、坪井敬文、Jetsumon Sattabongkot、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武 「新たなワクチンプラットフォーム創製のための三部構成五価免疫賦活複合体 (TIPs)」第79回寄生虫学会 平成22年5月20-21日 (旭川市)
9. 田福宣治、只野昌之、三股亮太郎、川上博哉、瀬脇智満、新川武 「日本脳炎ウイルスの外殻及びNS1蛋白質を用いたサブユニットワクチン開発の試み」第57回日本ウイルス学会学術集会 平成21年10月25-27日 (都市センターホテル、東京)

10. 新川武「コンポーネントワクチン開発のためのワクチンプラットフォーム創製」(シンポジウム)第50回日本熱帯医学会大会 平成21年10月22-23日(沖縄コンベンションセンター)
11. 原國哲也、宮田健、只野昌之、松崎吾朗、新川武「ヘテロ型5量体コレラトキシンBサブユニット(CTB)-ワクチンキメラ分子による粘膜免疫」第50回日本熱帯医学会大会 平成21年10月22-23日(沖縄コンベンションセンター)
12. 新川武 寄生虫病の制御:抗寄生虫薬の現状、ワクチン開発・寄生虫ドラッグターゲット「コンポーネントワクチン開発のための新しいワクチンプラットフォーム構築に向けて」(シンポジウム)第147回日本獣医学会・日本獣医寄生虫学会シンポジウム 平成21年4月2-4日(栃木県総合文化センター・栃木県自治会館)
13. 原國哲也、菊池三穂子、奈良武司、宮田健、平山謙二、新川武「日本住血吸虫パラミオシン抗原を用いた粘膜ワクチンに関する研究」第77回日本寄生虫学会大会 平成20年4月3-4日(長崎ブリックホール)

〔図書〕(計1件)

「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)、印刷中

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称:「薬物運搬体並びにこれを利用したアジュバント及びワクチン」

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:PCT/JP2010/51915

出願年月日:2010年2月10日

国内外の別:国外

名称:「分子量マーカー及び分子量マーカーの作製方法」

発明者:新川武、宮田健、松崎吾朗

権利者:琉球大学

種類:特許

番号:特願2009-200164

出願年月日:2009年8月31日

国内外の別:国内

○取得状況(計1件)

名称:Heterotype Pentamer Recombinant Vaccine

発明者:新川武、他7名

権利者:琉球大学

種類:特許

番号:US 7,544,361 B2

出願年月日:2009年6月9日

国内外の別:国外

〔その他〕

ホームページ等

沖縄感染防御プロジェクトネットワーク(O-AIDE) <http://www.o-aide.net/>

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)

琉球大学熱帯生物圏研究センター・
ポスドク研究員

研究者番号:20448591

平良 東紀 (TAIRA TOKI)

琉球大学農学部・准教授

研究者番号:60315463

(3) 連携研究者

坪井 敬文 (TSUBOI TAKAFUMI)

愛媛大学無細胞生命科学工学研究
センター・教授

研究者番号:00188616