

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03480

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリアのミクロガメート表面抗原を標的とする伝搬阻止ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of novel transmission blocking vaccine targeting microgamete surface antigen of Plasmodium falciparum

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・特命教授

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)：熱帯熱マラリア原虫の新規伝搬阻止ワクチン候補抗原であるPfMiGSに対する単クローン抗体を作成した。PfMiGSにcMycタグを付加した遺伝子改変原虫を作出し、マウス抗PfMiGS単クローン抗体とウサギ抗cMyc抗体とを用いた2重免疫電子顕微鏡染色法により、これらの抗体が同一の生殖母体内の細胞内小器官に共局在することを示した。これにより単クローン抗体がPfMiGSに特異的に反応することを確認すると共に、熱帯熱マラリア原虫のMiGSが生殖母体のosmophilic bodyに局在することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱帯熱マラリアは現在においても人類に多大な影響を及ぼす感染症の一つである。マラリア制圧手段として、媒介蚊の体内で原虫の発育を阻止する伝搬阻止ワクチンが期待されている。本研究において伝搬阻止効果が期待される熱帯熱マラリア原虫の分子(PfMiGS)を標的とする単クローン抗体を作成したことで、熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン開発研究の有用な手段を提供することが可能となった。また、熱帯熱マラリア原虫の生殖母体にPfMiGSが局在することを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We generated monoclonal antibodies that recognizes PfMiGS, a candidate antigen for a novel vaccine to prevent infection with Plasmodium falciparum, which causes lethal disease in humans. Genetically modified parasite with cMyc-tag addition to PfMiGS (PfMiGS-cMyc) were generated to examine the reaction specificity of monoclonal antibodies. Double immunoelectron microscopy staining using mouse anti-PfMiGS monoclonal antibody and rabbit anti-cMyc antibody showed that these antibodies co-localized with a significant frequency in the cytoplasm of single gametocytes, confirming that one of the monoclonal antibody (1H6) reacts specifically with PfMiGS. Immunoelectron microscopy using PfMiGS-cMyc parasites showed that it co-localized with PfG377, which localizes specifically to osmophilic bodies, confirming that PfMiGS also localizes specifically to osmophilic bodies.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 熱帯熱マラリア ワクチン 伝搬阻止 生殖母体 寄生虫学

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、現在でもアフリカの5歳以下の小児を中心に年間60万人以上が死亡する重要な感染症である(WHO world malaria report 2021)。2000年以降に国際的に展開されたアルテミシンを基盤とした新たな治療法の推奨、薬剤添加蚊帳の配布や殺虫剤噴霧による媒介蚊の対策などのキャンペーンが功を奏して減少してきたマラリアによる死亡者数が、近年は停滞から再び増加の傾向を示している。その中で、マラリアワクチンは殺虫剤抵抗性蚊や治療薬に対する耐性原虫の出現によるマラリア再燃のリスクに対抗する有効な手段として期待されたものの、未だに広く実用化されるには至っていない。マラリアのワクチン開発は、媒介蚊から人への感染原虫であるスポロゾイトを標的とした感染阻止ワクチンや、病態を起こす赤血球ステージのメロゾイトを標的とした発病阻止ワクチンを中心に進められたが、いずれも実用に向けた十分な成果は上がっていない。その中で、媒介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。

媒介蚊の中腸に取り込まれたマラリア原虫の生殖母体は赤血球から脱出し、雌雄の生殖体が融合した後、オーキネートに発育して中腸上皮を穿通し、基底膜でオーシストが形成される。この発育過程において、蚊中腸内の各ステージ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。これまでに報告された伝搬阻止ワクチン候補抗原の数は限られており、その中でも臨床試験まで進んでいるのはオーキネート表面タンパク質の Pfs25 のみである。期待に反して、臨床試験では Pfs25 に対する十分な抗体がヒトでは産生されないという課題や、また接種部位に副反応が起こるなどの問題が明らかとなり、新たな候補抗原の探索がワクチン実用化に向けた喫緊の課題として提唱された (Malkin EM et al. *Vaccine*. 2005, Wu et al. *PLoS One*. 2008)。また、システインに富む P230 や P48/45 は S-S 結合による立体構造を正しく反映した抗原の作製が困難で、有効な抗体の誘導に難渋している。伝搬阻止ワクチンの研究開発においては、*Pseudomonas aeruginosa* exoprotein A (EPA) を結合した組換えタンパク質 (rPfs25-EPA) を用いたアフリカの成人を対象とする臨床試験において、ヒトへの安全性が実証され、免疫被検者の血清に伝搬阻止活性が認められた。しかし、阻害活性を誘導するために複数回の免疫が必要であること、そして高い抗体価を長期間体内で維持することが困難であることが示された (Sagara et al. *Lancet Infect Dis*. 2018)。その克服には時間を要することが予想されるため、新規候補分子の探索が引き続き必要となっている。

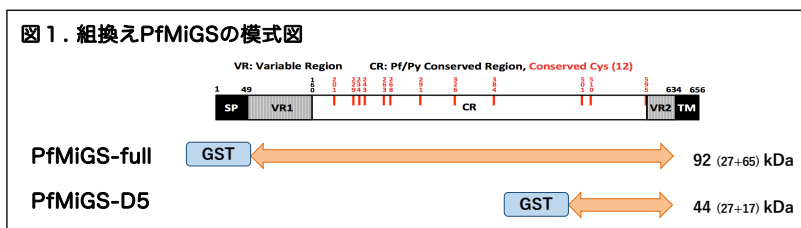
2. 研究の目的

我々は抗体の誘導が容易な可能性のある新たな伝搬阻止ワクチン候補抗原を探索することでワクチン開発の裾野を広げることが必要と考え、プロテオーム解析データをもとにして MiGS を含む 20 の候補分子の絞り込みを行なった。絞り込んだ分子を対象にネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) を用いた基礎研究を実施したところ、組換え PyMiGS (Microgamete surface protein) で免疫した後に *P. yoelii* を感染させたマウスから吸血した蚊において、コントロールに比較して 99% の高い原虫発育抑制効果が認められた (Tachibana et al. *Vaccine*. 2018)。更に雄性生殖体 (マイクロガメート) の表面に発現する PyMiGS を認識する抗体が、マイクロガメート表面に結合することで受精を阻害することも確認された (Tachibana et al. *Cell Microbiol*. 2018, Tachibana et al. *Vaccine*. 2018)。人における最も重篤な病態を引き起こす病原体である熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) のプロテオーム解析では、PfMiGS が生殖母体に選択的に発現することが示唆されており (Lasonder et al. *Nucleic Acids Res*. 2016)、PfMiGS が伝搬阻止ワクチンの候補抗原となり得るのではないかと考えられる。そこで、本研究は PfMiGS を標的とする伝搬阻止ワクチンの開発を進めるために、抗 PfMiGS 単クローン抗体を作製し、高い伝搬阻止活性の得られる抗原部位を同定することをめざして実施した。

3. 研究の方法

(1) 組換え PfMiGS タンパク質の作成

PfMiGS をコードする遺伝子の N 末端側のシグナルペプチドと C 末の膜貫通領域を除くほぼ全長の領域 (PfMiGS-full) と、ネズミマラリアにおける先行研究で高い抗原性と伝搬阻害活性が示された Region V-IV に相当する領域 (PfMiGS-D5) を、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成用にコードンを最適化した合成 PfMiGS 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 (図 1)、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて GST 融合タンパク質として合成した後、グルタチオンセファロースカラムを用いて組換え PfMiGS タンパク質



(rPfMiGS-full と rPfMiGS-D5)の精製を行った。

(2) PfMiGS に対する単クローン抗体の作製

3匹のBALB/cマウスを100 μ gのrPfMiGS-D5を抗原として完全フロイントアジュバントを用いて免疫した後に、2週間隔で50 μ gのrPfMiGS-D5と不完全フロイントアジュバントによる5回の追加免疫を行った。また、同様にして3匹のBALB/cマウスに対してrPfMiGS-fullを用いた免疫を実施した。3回目の免疫の2週後に採血して、免疫抗原に対する抗体価をELISA法により測定した。抗体価の上昇が顕著であった1匹のマウスの脾臓を摘出し、脾細胞とマウスミエローマ細胞との細胞融合を行った後に96穴のマイクロプレートで選択培養を行った。約2週後に増殖の認められたウェルの培養上清を採取してELISA法によるスクリーニングと再クローニングを行った。選択したハイブリドーマの拡大培養を行って培養上清を採取し、抗原反応性の検討と単クローン抗体のクラス及びサブクラスの同定をAntigen BiosciencesのIsotyping kitを用いて行った。更に選択したハイブリドーマを培養増殖した後にpristane処理したBALB/cマウス各5匹の腹腔に接種して飼育した後に腹水を回収した。

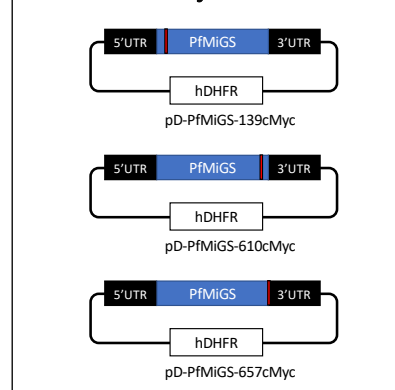
(3) 熱帯熱マラリア原虫生殖母体の培養

熱帯熱マラリア原虫の完全培地(5%のAlbMaxと5%ヒト血清を添加、ゲンタマイシン非添加)にヘマトクリット値で2%になるようにヒト赤血球を添加して、輪状体の多い条件(原虫寄生率5-10%)までNF54株を培養した後に、無性生殖期原虫を排除するため50mMのN-アセチルグルコサミン(N-GlcNAc)を添加して92時間培養した。その後は赤血球の添加を止め、培地交換のみを11日間継続することで生殖母体の培養を行った。

(4) PfMiGS-cMyc 発現遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫の作出

熱帯熱マラリア原虫PfMiGS遺伝子にcMycタグを融合させたPfMiGS-cMyc遺伝子を発現する遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫の作出を行なった。PfMiGS遺伝子の5'UTR、及び3'UTRを熱帯熱マラリア原虫NF54株から抽出したgDNAからそれぞれPCR増幅した。NF54株のPfMiGS遺伝子のイントロンを除く全長配列の414番目と415番目、及び1827番目と1828番目の塩基間にcMycタグをそれぞれ導入したPfMiGS-cMyc遺伝子を人工合成した。PfMiGS遺伝子のイントロンを除く全長配列をNF54株の生殖母体から抽出したcDNAからPCR増幅し、C末端にcMycタグを融合するためのプラスミドベクターに挿入した。このプラスミドからC末端にcMycタグを融合したPfMiGS-cMyc遺伝子を再度PCR増幅した。増幅した遺伝子産物、及び人工合成遺伝子を薬剤耐性マーカー(hDHFR発現カセット)が組み込まれた遺伝子発現プラスミドベクターに挿入し、エピゾーマル発現用コンストラクト3種を構築した(図2)。

図2. PfMiGS-cMyc発現用プラスミド



遺伝子組換え原虫を作出するため、電気穿孔法を用いてPfMiGS-cMyc発現用コンストラクトをそれぞれ導入したヒト赤血球にNF54株を感染させた。感染を確認した後、トリメトプリムをin vitro培養系に添加して約1ヶ月培養することで、エピゾーマルにコンストラクトを保持したPfMiGS-cMyc発現遺伝子組換え原虫を選択的に作出した。

(5) 単クローン抗体のPfMiGSに対する反応性の検定

培養して得た生殖母体を含む熱帯熱マラリア原虫NF54株、免疫抗原に用いたrPfMiGS-Full, またはrPfMiGS-D5のタンパク質を、非還元条件のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ローディングバッファーで抽出し、97 $^{\circ}$ Cで5分間煮沸した後、5-20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動(SDS-PAGE)にて分離した。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PfMiGS単クローン抗体等の1次抗体を1時間反応させた。次に転写膜をHRP結合ヤギ抗マウスIgG抗体等の2次抗体に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。

間接蛍光抗体法用に、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、1次抗体を37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、Alexa Fluor 488で標識した2次抗体を37 $^{\circ}$ 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 ScopeA1; Carl Zeiss)を用いて、生殖母体に対する反応性を観察した。

(6) 免疫電子顕微鏡法

培養した熱帯熱マラリア原虫の生殖母体をパーコール精製した後に、0.2%Glutaraldehyde-2%Formaldehyde-HEPESバッファーを用いて氷温で30分間固定した。アルコール脱水した後にLR-White樹脂に置換し、42 $^{\circ}$ Cで5日間加温して重合させた。グリッドに載せた超薄切片を5%脱脂粉乳、0.01%Tween-20添加PBS(PBS-Milk-Tween)に浸漬してブロッキングした後に、PBS-Milk-Tweenで希釈した1次抗体液に移して4 $^{\circ}$ Cで一晩、反応させた。0.4%BlockAce, 0.01%Tween-20添加PBS(PBS-BlockAce-Tween)で洗浄した後に、PBS-Milk-Tweenで40倍希釈した金コロイド標識2次抗体液に浸漬して90分間反応させ、PBS-BlockAce-Tweenで30分間洗浄した。4%酢酸ウラン溶液とクエン酸鉛水溶液で電子染色した後に、電子顕微鏡(JEM-1230)を用いて単クロー

ン抗体の抗原分子の局在及び反応性について詳細に観察した。

4. 研究成果

(1) 組換え PfMiGS の作成

単クローン抗体の免疫抗原とする目的で、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて rPfMiGS-full1 及び rPfMiGS-D5 を合成した(図3)。その後、グルタチオンセファロースカラムを用いて rPfMiGS-full1 と rPfMiGS-D5 を精製して、免疫抗原を調整した。

(2) 抗 PfMiGS 単クローン抗体の作成

rPfMiGS-full1 又は rPfMiGS-D5 を抗原として免疫した各3匹の BALB/c

マウスの血清を採取して、抗体価の上昇を ELISA 法により検定した。その結果、rPfMiGS-full1 免疫マウスでは抗体価の顕著な上昇が認められなかった。他方、PfMiGS-D5 で免疫したマウスでは抗体価の上昇が認められたので、1匹のマウスの脾臓を摘出してハイブリドーマの作成とクローニングを行なった。2度の single-cell cloning の結果、rPfMiGS-D5 に高い反応性を示す1株(6A11)しか樹立できなかった。そこで、更に多数のハイブリドーマ株を樹立するために、継続飼育していた免疫マウスに追加免疫を行い、1匹のマウスの脾臓を摘出してハイブリドーマの作成とクローニングを実施した。2度の single-cell cloning の結果、rPfMiGS-D5 に反応性を示す6株のクローンを樹立した。6株のクローン細胞の培養上清を採取し、PfMiGS-D5 (TEVにて GST除去)、PfMiGS-full1 (His-tag、GSTなし)、GSTを抗原として ELISA 法による反応特異性の検討を行なった。その結果、1株(1H6)の培養上清で高い結合性と特異性で PfMiGS に反応することが示された。他の5株は融合タンパク質として付加した GST と同等の反応性であった(表1)。

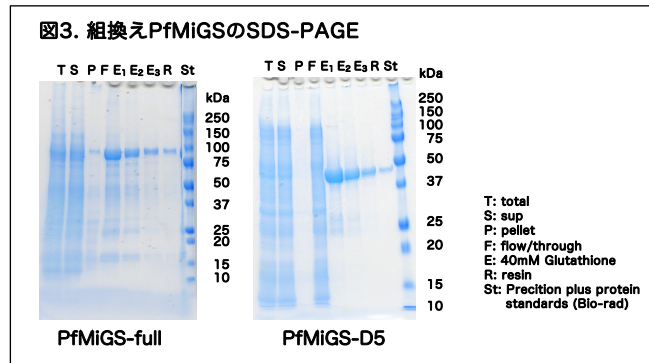
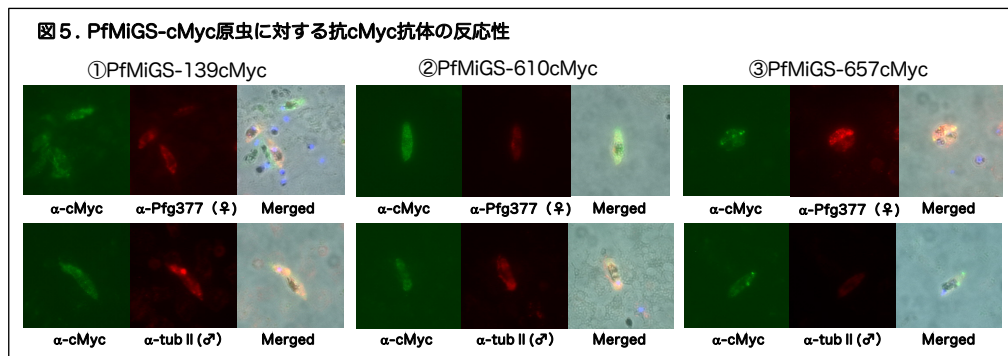
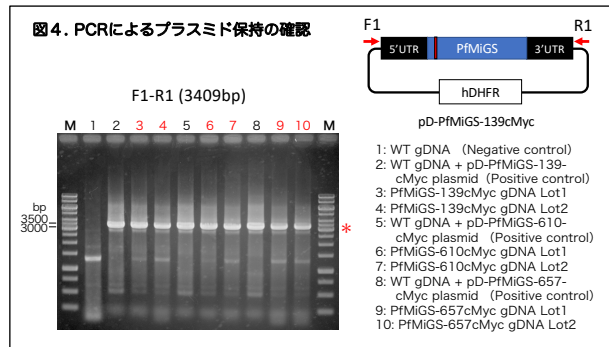


表1. ELISA による抗体反応性の評価 (ELISA titer: OD=0.5)

| | | 単クローン抗体(mAb)産生株 | | | | | |
|----|---------------|-----------------|------|------|------|------|------|
| | | 1H6 | 1A3 | 1C4 | 3A7 | 5E3 | 3F4 |
| 抗原 | rPfMiGS_D5 | 8.681 | 3.35 | 3.88 | 3.84 | 3.81 | 2.96 |
| | rPfMiGS_full1 | 8.215 | 3.25 | 3.96 | 3.92 | 3.92 | 2.94 |
| | GST | 3.904 | 3.10 | 3.92 | 3.94 | 3.98 | 2.99 |

(3) PfMiGS-cMyc 発現遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫の作出

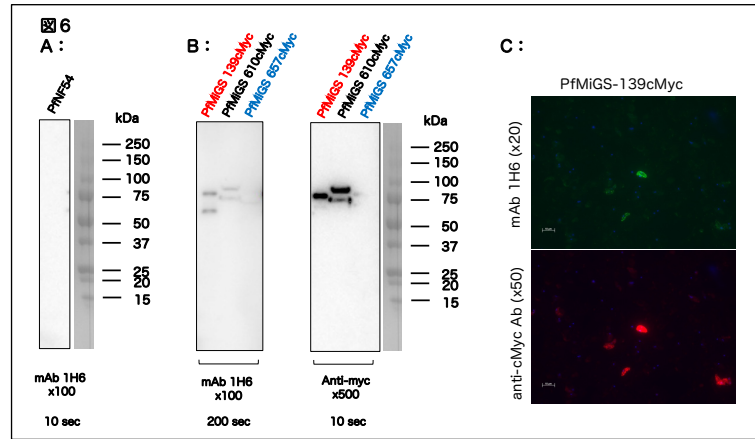
熱帯熱マラリア原虫 PfMiGS 遺伝子に cMyc タグを融合した PfMiGS-cMyc 遺伝子を発現する遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫3種を作出することに成功した。得た組換え原虫から抽出した gDNA について、発現用コンストラクトに特異的なプライマーを用いて PCR したところ、予測される分子量にシグナルを認めたことから、これらの組換え原虫がコンストラクトを保持していることが確認された(図4)。そして、これらの PfMiGS-cMyc 原虫を用いた間接蛍光抗体法において、生殖母体に抗 cMyc 抗体による蛍光反応が認められ、原虫が cMyc を発現することが確認された(図5)。



(4) PfMiGS-cMyc 原虫に対する単クローン抗体の反応性

ウエスタンブロット法(非還元条件)を用いた検定において、PfNF54株(野生株)に対する

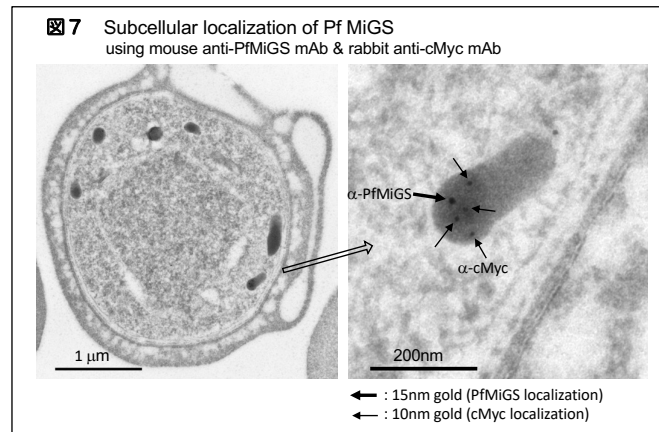
単クローン抗体 (mAb#1H6) の反応性が極めて弱かったことから (図 6 A)、生殖母体における PfMiGS-cMyc の発現が確認された組換え原虫を用いて原虫由来の PfMiGS に対する単クローン抗体 (mAb#1H6) の反応性を検討した。その結果、図 6 B に示すように、抗 cMyc 抗体の反応を示す 75kDa 付近のバンドとほぼ一致する部位に mAb#1H6 に対する弱いバンドが観察され、PfMiGS-cMyc に対して mAb#1H6 が反応することが示された。また、蛍光抗体法においても mAb#1H6 と抗 cMyc 抗体と同様の反応が観察された (図 6 C)。



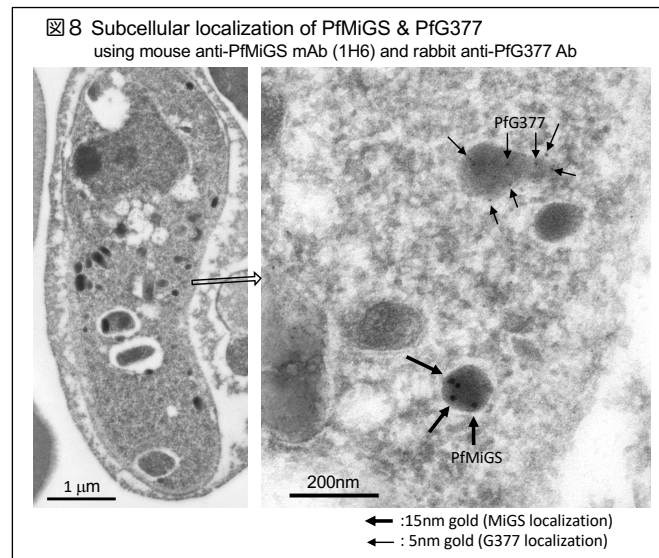
また、蛍光抗体法においても mAb#1H6 と抗 cMyc 抗体と同様の反応が観察された (図 6 C)。

(5) 免疫電子顕微鏡法による mAb#1H6 の反応性 (局在) の検討

PfMiGS-cMyc 原虫を抗原とする免疫電子顕微鏡法を実施して、マウス mAb#1H6 の反応部位とウサギ抗 cMyc 抗体の反応部位を検討した。その結果、生殖母体の osmiophilic body に mAb#1H6 の反応を示す 15nm の金コロイド粒子と抗 cMyc 抗体の反応を示す 10nm の金コロイド粒子の両者の沈着が観察された (図 7)。そこで、mAb#1H6 が PfMiGS に特異的に反応することを確認するために、抗 cMyc 抗体と mAb#1H6 とが同一の生殖母体の osmiophilic body に反応するか否かについて検討を行った。PfMiGS-cMyc 原虫のうち、1 虫体の断面において 5 個以上の osmiophilic body を有する生殖母体を対象とし、その虫体内の osmiophilic body に 2 個以上の金コロイド粒子が沈着するものを positive、それ以外を negative として分割表を作成し、カイ 2 乗検定 (独立性の検定) を行った。その結果は χ^2 score が 178.16 で mAb#1H6 と抗 cMyc 抗体の反応部位に有意の強い関連性があることが示された ($P < 0.0001$)。



PfMiGS が雌雄いずれの生殖母体の osmiophilic body に発現するかについて検討する為、熱帯熱マラリア原虫の雌性生殖母体に特異的に発現する PfG377 と PfMiGS との共局在に着目して、免疫電子顕微鏡法による観察を行った。その結果、PfMiGS-cMyc 原虫においては、図 8 に示すように、1 個の生殖母体の細胞質内に PfG377 陽性の osmiophilic body と PfMiGS 陽性の osmiophilic body とが同時に認められた。野生株においても同様の所見が得られるかの検討が必要であるが、少なくとも PfMiGS-cMyc 原虫では雌性生殖母体の一部の osmiophilic body に PfMiGS が発現することが示された。



(6) まとめ

本研究において、熱帯熱マラリア原虫の生殖母体に発現する分子 PfMiGS に特異的に反応する単クローン抗体を作成した。また、PfMiGS に cMyc タグを付加した PfMiGS-cMyc を発現する組換え原虫を作出した。これらの単クローン抗体と遺伝子組換え原虫を用いて、PfMiGS の発現様式を検討した結果、PfMiGS が熱帯熱マラリア生殖母体の osmiophilic body に局在することが明らかになった。また、PfMiGS が雌性生殖母体の osmiophilic body に発現する可能性が示唆された。

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) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602) | |
| 研究分担者 | 入子 英幸 (Iriko Hideyuki) (60346674) | 神戸大学・保健学研究科・准教授 (14501) | |
| 研究分担者 | カレトン リチャード (Culleton Richard) (10503782) | 愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授 (16301) | |
| 研究分担者 | 伊藤 大輔 (Ito Daisuke) (80609298) | 鳥取大学・医学部・助教 (15101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|