

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700455

研究課題名（和文） DNA免疫法を用いた霊長類用検出抗体の作成法の確立

研究課題名（英文） Establishment of producing method for detection antibody for primate using DNA immunization technology

研究代表者

東岸 任弘（TOUGAN TAKAHIRO）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20379093

研究成果の概要（和文）：

リスザル (*Saimiri sciureus*) はマラリアワクチンの開発にとって最も価値のある実験動物にもかかわらず、その IgG については解析が行われていない。抗体を介した免疫応答に抗体依存的細胞障害 (ADCC) と呼ばれるメカニズムが知られており、感染マラリア原虫の排除にとって重要である。このメカニズムにおいて、ヒトでは抗原を認識した IgG1 あるいは IgG3 が Fc レセプターの一つある FcγRIIIa と結合することが知られている。そこで我々はリスザルの FcγRIIIa に興味を持ち、この遺伝子を同定した。これまでに、ヒトの FcγRIIIa の 176 番目のフェニルアラニンがバリンに置換した変異では IgG1、IgG3 のみならず、IgG4 にも結合することが報告されている。我々はリスザルの FcγRIIIa において、相当する残基がバリンであることを見出した。このことは IgG と Fc レセプターとの関係、ADCC のメカニズムの進化を知る上で非常に興味深い。

最後に我々は高感度で特異性の高い抗リスザル IgG モノクローナル抗体を開発し、このモノクローナル抗体がウェスタンブロッティングおよび ELISA で有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) is a valuable experimental animal for research into infectious diseases such as malaria vaccine development; however, the IgG molecules in this animal are not yet to be characterized. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is an antibody-mediated immune response and is important for exclusion of pathogens or cancer cells. In human, IgG1 or IgG3 interacts with the Fc receptor, FcγRIIIa. Previous studies have revealed that human FcγRIIIa contains a substitution (Phe→Val) at residue 176 that can interact with IgG4 in addition to IgG1 and IgG3. Here we show that the squirrel monkey IgG interacts with its FcγRIIIa. Finally, highly sensitive and specific anti-squirrel monkey IgG monoclonal antibodies were developed for used in western blotting and ELISA assays.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：リスザル、モデル動物、免疫関連遺伝子、イムノグロブリン、Fcγレセプター、検出抗体、次世代シーケンサー、マラリア

1. 研究開始当初の背景

医学研究ではヒトを用いた生体実験は当然のことながら許されず、マウス、モルモット、サルといった実験動物を用いて研究が進められている。その中でもヒトと同じ霊長類に属するサルは、医学の基礎研究から前臨床試験において必要不可欠な実験動物として広汎な研究に使用されている。本申請者の主要研究テーマであるマラリアワクチンの開発は、ヒトでの使用を念頭に置いており、ヒトと同様の免疫応答を示すサルはワクチンの効果、安全性を調べる上で必須かつ貴重な実験動物である。例えばヒト熱帯熱マラリア原虫の感染可能なモデル動物はリスザルのみである。

本申請者はここ数年、マラリアワクチンの候補抗原である SE36 ワクチンの研究を行ってきた。その中には、医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターにおいてカニクイザルを用いたアジュバントの研究、及びリスザルを用いたワクチン免疫とマラリア原虫の感染実験が含まれる。これらの研究結果から「第二世代 SE36 ワクチン」を設計し、現在はリスザルによる「第二世代 SE36 ワクチン」の免疫・感染実験が進行中である。

「第二世代 SE36 ワクチン」は上述のように進行しているが、さらなる研究の進展には大きな障害がある。それは、サルの免疫応答を研究するための抗 IgG 抗体などが揃っていないという問題である。サル用の抗体としてはアカゲザル・カニクイザル用のトータル IgG 抗体が販売されているが、リスザルのトータル IgG 抗体はなく、IgG 量の測定にはこれらの抗体を利用するしかない。さらに IgG サブクラス (IgG1~4) の検出においては、そもそもサル用抗体がないので、ほとんどの研究者がヒト用抗体を代用せざるをえない。しかし、抗ヒト IgG1~4 抗体のカニクイザル、リスザルへの交差は高いものでも 20%程度、大抵は 10%以下である (Asada, Y. et al. 2002)。しかもその特異性については不明なままである。そのため、貴重なヒト代用実験動物であるサルを用いているにもかかわらず、十分なデータが得られないのが現状である。

こうしたサル免疫応答研究用の基本的分析試料が欠如しているという現状を鑑み、本研究の「DNA 免疫法を用いた霊長類用検出抗体の作成法の確立」を着想した。

2. 研究の目的

(1) カニクイザル・リスザルのトータル IgG、及びそのサブクラス (IgG1~4) 分子群を特異的に検出するモノクローナル抗体を作成する。サブクラスは相互に類似しており、95%以上の特異性を示すものを作成する。

(2) 作成した抗体を用いて、これまでに行ってきたカニクイザル・リスザルを用いた免疫・感染実験における抗体価の結果と比較検討する (効果判定試験)。これまで用いてきたヒトやアカゲザルに対する抗 IgG 抗体の結果と比較し、それらの抗体よりも検出感度、特異性が高い検出抗体の作成を目指す。

(3) IgG 以外の Fc レセプターやサイトカインなど、免疫学研究に有用な他の分子群にも応用可能な抗体作成のためのプロトコルを確立する。本研究では実際にはカニクイザル・リスザルの IgG 抗体を作成するが、ここから得られた知見を基に、その他の分子種、実験動物種においても応用可能な検出抗体作成プロトコルを作成する。

3. 研究の方法

(1) カニクイザル・リスザルの IgG サブクラス cDNA のクローニング：医薬基盤研究所・JCRB 遺伝子バンクから公開されているカニクイザル遺伝子バンクを利用して cDNA をクローニングする。リスザルについてはこのようなデータバンクはないので、カニクイザルやアカゲザルの配列データを参考にする。

クローニングする領域は発現後にネイティブに近い立体構造を取る必要があるため、重鎖の定常領域 (CH1~3 領域) 全長をクローニングする。

(2) 目的配列を持つ発現ベクターの構築 pIC ベクターなどの発現ベクターに目的配列をクローニングする。その際 C 末端に GFP を付加する。GFP は正常な立体構造を取る場合に蛍光を発し、抗原タンパク質の発現と立体構造の確認に利用する。ネイティブフォームの抗原を認識する抗体を作成するため、最初は定常領域全長を発現させるが、発現量が少な過ぎたり、細胞表面に効率的に発現できない (後述) 場合には領域を狭めるなどの検討を行う。

(3) 培養細胞の細胞表面における発現 目的とする抗原の細胞表面での発現量を測定するため、抗原を発現させた細胞をフローサイトメーターで測定する。抗体産生量の多寡は細胞表面での抗原の発現量に依存する事が多いため、発現量が極端に低い場合には (1)、(2) に戻り、発現領域、発現ベクターを検討し、さらに発現させる培養細胞も検討する。細胞表面もしくは細胞内での発現の確認には、抗原を発現させた培養細胞の膜透過性を高め、抗 GFP 抗体を細胞内に透過させ、その蛍光をフローサイトメーターで検出することにより評価する。

(4) 発現ベクターのマウスへの導入、及び、抗体産生の確認：(3) で検討した発現ベクターをエレクトロポレーション法によりマウスに導入する。導入法は DNA ワクチンの接種

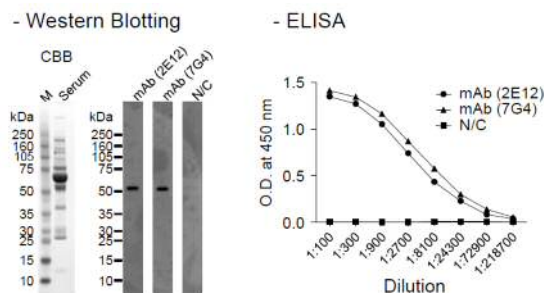
と同様である。申請者の所属する研究室には遺伝子導入に必要な機器・施設・ノウハウが整っているので問題なく導入できる。発現ベクター導入後、数週間から十週間にわたって抗体価を測定する。抗体の産生とその力価は(3)で用いた抗原を発現させた培養細胞を用いてフローサイトメーターで評価する。仮に十分な力価が得られない場合は、免疫アジュバントや導入法を検討し、必要であれば、(1)、(2)に立ち返り再検討する。

(5)ハイブリドーマの作成、及び、モノクローナル抗体の精製：免疫したマウスからB細胞を採取し、ミエローマ細胞を融合させることでハイブリドーマを作成する。目的の抗体を効率的に発現しているハイブリドーマを取得するために、フローサイトメーターや細胞ELISA法によりスクリーニングを行う。取得した陽性クローンの中からIgG1~4のそれぞれに交差性を示さないクローンを取得する。最後に取得したそれぞれのクローンが発現しているモノクローナル抗体をアフィニティーカラム法で精製する。

4. 研究成果

リスザル (*Saimiri sciureus*) はマラリアワクチンの開発にとって最も価値のある実験動物にもかかわらず、そのIgGについては解析が行われていない。抗体を介した免疫応答に抗体依存的細胞障害 (ADCC) と呼ばれるメカニズムが知られており、感染マラリア原虫の排除にとって重要である。このメカニズムにおいて、ヒトでは抗原を認識したIgG1あるいはIgG3がFcレセプターの一つあるFcγRIIIaと結合することが知られている。そこで我々はリスザルのFcγRIIIaに興味を持ち、この遺伝子を同定した。これまでに、ヒトのFcγRIIIaの176番目のフェニルアラニンがバリンに置換した変異ではIgG1、IgG3のみならず、IgG4にも結合することが報告されている。我々はリスザルのFcγRIIIaにおいて、相当する残基がバリンであることを見出した。このことはIgGとFcレセプターとの関係、ADCCのメカニズムの進化を知る上で非常に興味深い。

最後に我々は高感度で特異性の高い抗リスザルIgGモノクローナル抗体を開発し、このモノクローナル抗体がウェスタンブロットティングおよびELISAで有用であることを示



した。

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11件)

①Endemic Burkitt lymphoma is associated with strength and diversity of *Plasmodium falciparum* malaria stage-specific antigen antibody response. Aka P, Vila MC, Jariwala A, Nkrumah F, Emmanuel B, Yagi M, Palacpac NM, Periago MV, Neequaye J, Kiruthu C, Tougan T, Levine PH, Biggar RJ, Pfeiffer RM, Bhatia K, Horii T, Bethony JM, Mbulaiteye SM. Blood. 2013 May 3. (査読有り)

doi: 10.1182/blood-2012-12-475665

②Within-population genetic diversity of *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens reveals geographic distance from a Central sub-Saharan African origin. Tanabe K, Mita T, Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Kawai S, Jombart T, Kobayashi F, Horii T. Vaccine. 2013 Feb 18;31(9):1334-9. (査読有り)

doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.039

③TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. Hum Vaccin Immunother. 2013 Jan 4;9(2):283-290. (査読有り)

doi:10.4161/hv.22950

④*Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. Tachibana SI, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NM, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, Kaneko O, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. Nature Genetics. 2012 Aug 5;44(9):1051-5. (査読有り)

doi:10.1038/ng.2375.

⑤Transcutaneous immunization using a dissolving microneedle array protects against tetanus, diphtheria, malaria, and influenza. Matsuo K, Hirobe S, Yokota Y, Ayabe Y, Seto M, Quan YS, Kamiyama F, Tougan T, Horii T, Mukai Y, Okada N,

Nakagawa S. J Control Release. 2012 Jun 28;160(3):495-501. (査読有り)
doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.001

⑥ Geographic differentiation of polymorphism in the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate gene SERA5. Tanabe K, Arisue N, Palacpac NM, Yagi M, Tougan T, Honma H, Ferreira MU, Färnert A, Björkman A, Kaneko A, Nakamura M, Hirayama K, Mita T, Horii T. Vaccine. 2012 Feb 21;30(9):1583-93. (査読有り)
doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.124.

⑦ Antibodies reactive to *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen in children with burkitt lymphoma from ghana. Guech-Ongey M, Yagi M, Palacpac NM, Emmanuel B, Talisuna AO, Bhatia K, Cristina Stefan D, Biggar RJ, Nkrumah F, Neequaye J, Tougan T, Horii T, Mbulaiteye SM. Int J Cancer. 2012 Apr 15;130(8):1908-14. (査読有り)
doi:10.1002/ijc.26203

⑧ The Mek1 phosphorylation cascade plays a role in meiotic recombination of *Schizosaccharomyces pombe*. Tougan T, Kasama T, Ohtaka A, Okuzaki D, Saito TT, Russell P, Nojima H. Cell Cycle. 2010 Dec 1;9(23):4688-4702. (査読有り)
doi: 10.4161/cc.9.23.14050

⑨ Genopal™: a novel hollow fiber array for focused microarray analysis. Okuzaki D, Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Akita T, Nojima H. DNA Research. 2010;17(6):369-379. (査読有り)
doi: 10.1093/dnares/dsq025.

⑩ Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. Horii T, Shirai H, Jie L, Ishii KJ, Palacpac NQ, Tougan T, Hato M, Ohta N, Bobogare A, Arakaki N, Matsumoto Y, Namazue J, Ishikawa T, Ueda S, Takahashi M. Parasitology Int. 2010 Sep;59(3):380-386. (査読有り)
doi: 10.1016/j.parint.2010.05.002.

⑪ Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Sci Transl Med. 2010 Mar 31;2(25):25ra24. (査

読有り)
doi: 10.1126/scitranslmed.3000759.

[学会発表] (計16件)

① 第82回日本寄生虫学会大会(口頭発表)・2013年3月31日(日)(2013年3月29日(木)～3月31日(日))・東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京)抗SE36抗体の誘導とマラリア抵抗性に関する遺伝的バックグラウンドの研究/Analysis of African HLA genes in a population that participated in the Phase 1b trial of BK-SE36・東岸任弘、Nirianne Q. Palacpac、八木正典、中村昇太、後藤和義、Thomas G. Egwang、堀井俊宏

② 日本薬学会第133回年会(口頭発表)・2013年3月28日(木)(2013年3月27日(水)～3月30日(土))・パシフィコ横浜(神奈川県)・新規アジュバントを添加した次世代SE36マラリアワクチンの開発:旅行者用ワクチンへのアプローチ・東岸任弘、青枝大貴、Cevayir Coban、片貝祐子、甲斐知恵子、保富康宏、石井健、堀井俊宏

③ 感染症若手フォーラム 2013(口頭)・2013年2月28日(木)(2013年2月28日(木)～3月2日(土))・北広島クラッセホテル(北海道)・抗SE36抗体の誘導とマラリア抵抗性に関する遺伝的バックグラウンドの研究・東岸任弘、Nirianne Q. Palacpac、八木正典、中村昇太、後藤和義、Thomas G. Egwang、堀井俊宏

④ 日本実験動物科学・技術九州2012(口頭発表)・2012年5月25日(金)(2012年5月24日(木)～5月26日(土))・ビーコンプラザ(大分)・リスザルは単一のIgGを持ち、サブクラスを持たない・東岸任弘、中村昇太、朴辰幸、片貝祐子、保富康宏、立花太郎、堀井俊宏

⑤ NGS現場の会 第2回研究会(ポスター発表)・2012年5月24日(木)(2012年5月23日(水)～5月25日(金))・ホテル阪急エキスポパーク(大阪)・リスザルは1種類のIgGを持ち、サブクラスを持たない・東岸任弘、中村昇太、朴辰幸、片貝祐子、保富康宏、立花太郎、堀井俊宏

⑥ 5th International CVRDC-RIMD Joint Symposium(ポスター発表)・2012年5月11日(金)(2012年5月10日(木)～5月12日(土))・SEOGWIPO KAL HOTEL(韓国・濟州島)・Squirrel monkey has a single IgG and no IgG subclasses・Takahiro Tougan, Shota Nakamura, Chin-Heng Paku, Yuko Katakai,

Yasuhiro Yasutomi, Taro Tachibana and Toshihiro Horii

⑦日本分子生物学会 第 12 回 春季シンポジウム(ポスター発表)・2012年4月25日(水) (2012年4月25日(水)～4月26日(木))・石和温泉・慶山(山梨)・リスザルは単一のIgGを持ち、サブクラスを持たない・東岸任弘、中村昇太、朴辰幸、片貝祐子、保富康宏、立花太郎、堀井俊宏

⑧日本実験動物技術者協会北陸支部 本部共催講習会第331回(口頭発表)・2012年3月10日(土)・金沢大学学際科学実験センター(石川)・新規アジュバント添加による次世代 SE36 マラリアワクチンの開発と実用化:旅行者用ワクチンへのアプローチ・東岸任弘、青枝大貴、八木正典、有末伸子、片貝祐子、保富康宏、甲斐知恵子、石井健、堀井俊宏

⑨感染症若手フォーラム(口頭&ポスター発表)・2012年2月2日(木)～4日(土)・「やすらぎ伊王島」海に見えるホテル(長崎)リスザルは1種類のIgGしか持たず、サブクラスを持たない・東岸任弘、中村昇太、朴辰幸、片貝祐子、保富康宏、立花太郎、堀井俊宏

⑩第 34 回分子生物学会年会(口頭&ポスター発表)・2011年12月13日(火)～2011年11月16日(金)・パシフィコ横浜(神奈川県)・Squirrel monkey has a single IgG and no IgG subclasses・Takahiro Tougan, Shota Nakamura, Chin-Heng Paku, Yuko Katakai, Yasuhiro Yasutomi, Taro Tachibana and Toshihiro Horii

⑪第 7 回霊長類医科学フォーラム(口頭発表)・2011年11月18日(金)・研究交流センター 国際会議場(茨城)・新規アジュバント添加による次世代 SE36 マラリアワクチンの開発と実用化:旅行者用ワクチンへのアプローチ/Development and application of next generation SE36 malaria vaccine formulated with a novel adjuvant: approach to travelers' vaccine.・東岸任弘、青枝大貴、八木正典、有末伸子、片貝祐子、保富康宏、甲斐知恵子、石井健、堀井俊宏

⑫Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II) (口頭発表)・2011年11月16日(水)～2011年11月17日(木)・長崎大学(長崎)・Development of next generation SE36 malaria vaccine formulated with a novel adjuvant: approach to travelers' vaccine.・Takahiro Tougan, Taiki Aoshi,

Masanori Yagi, Cevayir Coban, Nobuko Arisue, Yuko Katakai, Yasuhiro Yasutomi, Chieko Kai, Ken J. Ishii and Toshihiro Horii

⑬ 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases (口頭発表)・2011年9月12日(月)～2011年9月16日(金)・奈良女子大学(奈良)・Development of next generation SE36 malaria vaccine formulated with a novel adjuvant: approach to travelers' vaccine.・Takahiro Tougan, Taiki Aoshi, Masanori Yagi, Cevayir Coban, Nobuko Arisue, Yuko Katakai, Yasuhiro Yasutomi, Chieko Kai, Ken J. Ishii and Toshihiro Horii

⑭ IUMS (International Union of Microbiological Societies) 2011 Congress (ポスター発表)・2011年9月6日(火)～2011年9月10日(土)・Sapporo Convention Center, Sapporo Business Innovation Center(北海道)・Development of next generation SE36 malaria vaccine formulated with a novel adjuvant: approach to travelers' vaccine.・Takahiro Tougan, Taiki Aoshi, Masanori Yagi, Cevayir Coban, Nobuko Arisue, Yuko Katakai, Yasuhiro Yasutomi, Chieko Kai, Ken J. Ishii and Toshihiro Horii

⑮第 14 回日本ワクチン学会学術集会(口頭発表)・2010年12月11日(土)～2010年12月12日(日)・九段会館(東京)・新規アジュバント添加による次世代 SE36 マラリアワクチンの開発と実用化:旅行者用ワクチンへのアプローチ・東岸任弘・石井健・堀井俊宏

⑯第 79 回日本寄生虫学会大会(口頭発表)・2010年5月20日(木)～2010年5月21日(金)・旭川市大雪クリスタルホール(北海道)・新規アジュバント添加による次世代 SE36 マラリアワクチンの開発と実用化:旅行者用ワクチンへのアプローチ/Development and application of next generation SE36 malaria vaccine formulated with a novel adjuvant: approach to travelers' vaccine.・東岸任弘・青枝大貴・八木正典・有末伸子・片貝祐子・保富康宏・甲斐知恵子・石井健・堀井俊宏

[図書] (計9件)

① *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen 5 (SE36) as a malaria vaccine candidate.

Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Ishii KJ, Horii T.
Vaccine. 2011 Aug 11;29(35):5837-45.

② Preparation of a High-Quality cDNA Library from a Single-Cell Quantity of mRNA Using Chum-RNA.
Nojima H, Tougan T.
Methods Mol Biol. 2011 729:15-35.

③ マラリアワクチン
東岸任弘、堀井俊宏
総合臨床 Vol. 60 No. 11 pp53-57 2011
(2011/11 発刊)

④ マラリアワクチンの開発
東岸任弘、田邊和裕、堀井俊宏
Pharma Medica Vol. 29 No. 4 pp53-57 2011
(2011/4 発刊)

⑤ 寄生虫による粘膜感染
東岸任弘、堀井俊宏
臨床粘膜免疫学 pp489-497 (2010/12 発刊)
株式会社シナジー

⑥ マラリア
東岸任弘、堀井俊宏
臨床検査増刊号 Vol. 54 No. 11
pp1413-1421 2010

⑦ マラリアワクチンの実現に向けて
東岸任弘、石井健、堀井俊宏
次世代ワクチンの産業応用技術 pp175-186
(2010/9 発刊)

⑧ ワクチン
東岸任弘、堀井俊宏
新薬展望 Vol. 46 No. S-1
pp139(349)-145(355) 2010

⑨ マラリアワクチンの臨床開発
東岸任弘、石井健、堀井俊宏
DDS (DDS 学会誌) Vol. 25 No. 1 pp37-45 2010

[その他]

ホームページ等
大阪大学・微生物病研究所・分子原虫学分野
ホームページ
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/protozool/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東岸 任弘 (TOUGAN TAKAHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：20379093

(2) 連携研究者

堀井 俊宏 (HORII TOSHIHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：80142305

保富 康宏 (YASUTOMI YASUHIRO)
医薬基盤研・霊長類医学科学研究センター・
センター長
研究者番号：90281724

立花 太郎 (TACIBANA TARO)
大阪市立大学・工学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：80311752

中村 昇太 (NKAMURA, SHOTA)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：90432434