

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 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：2013～2015

課題番号：25305009

研究課題名(和文) 三日熱マラリア伝播阻止ワクチン候補抗原の探索

研究課題名(英文) Screening of novel vivax malaria transmission-blocking vaccine candidate molecule

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：三日熱マラリア伝播阻止ワクチンの標的候補(PvG#3, PvG#6, PvG#13, PvG#16)の組換えタンパク質を作製し、其々のタンパク質に対するウサギ抗血清を作製した。これらの抗血清は三日熱マラリア原虫の生殖母体表面に反応した。タイのマラリア診療所の三日熱マラリア患者から得た感染血液に作製した抗血清を添加し、人工吸血装置により媒介蚊に吸血させた。約7日後に蚊を解剖して中腸壁の虫体数を計測したところ、PvG#3, PvG#6, PvG#16に対する抗血清を添加した群では虫体数の有意な減少が認められ、これら3種の分子が三日熱マラリア伝播阻止ワクチン候補抗原になる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Malaria transmission-blocking vaccines (TBV) aim to interfere with the development of the malaria parasite in the mosquito vector, and thus prevent spread of transmission in a community. We aimed to discover novel Plasmodium vivax TBV candidates by using rodent malaria model and finally selected four target molecules; PvG#3, PvG#6, PvG#13 and PvG#16. We produced the recombinant proteins of these target molecules using wheat germ cell-free system. Rabbit antisera against these recombinant proteins were generated. In IFA, anti-PvG#3, -PvG#6, -PvG#13 and -PvG#16 antisera were reacted on the surface of P. vivax gametocytes. Membrane feeding transmission assays using P. vivax isolates obtained in Thailand demonstrated that anti-PvG#3, anti-PvG#6 and anti-PvG#16 antisera significantly reduced the number of oocysts developing in the mosquito midgut. In conclusion, our results indicate that PvG#3, PvG#6 and PvG#16 are potential transmission-blocking vaccine candidates of P. vivax.

研究分野：分子寄生虫学

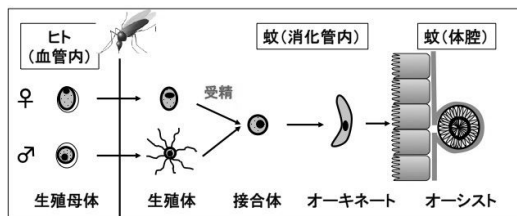
キーワード：寄生虫学 マラリア ワクチン 三日熱マラリア 伝播阻止ワクチン 感染症 熱帯病

1. 研究開始当初の背景

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挙っていない。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注目されている。

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、オーキネートへと发育し、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)、この蚊中腸内における各发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は人に投与した際に抗体価の上昇が弱いこと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。

図1 マラリア原虫の有性生殖



そこで、P25に代わりうる新たな伝搬阻止ワクチン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。ゲノムデータベース(PlasmoDB)を基に、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、蚊ステージ原虫に発現する可能性が高く、ワクチン標的として虫体表面に局在する可能性が高いものに着目して候補分子の選択を行った。この中から約20のマラリア原虫分子に絞り込み、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。蛍光抗体法によって分子の局在を観察したところ、7個が蚊ステージ原虫の虫体表面(4個が生殖体、1個が生殖体から接合体、2個が生殖体からオーキネート)に局在していた。このうちの1個についてネズミマラリアの系で伝搬阻止活性を検討したところ、抗血清投与群に有意な原虫数の減少が認められた。以上のネズミマラリアで得られた成果

を踏まえ、三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索が可能と判断した。

2. 研究の目的

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」として新たなコントロール法の樹立が待たれる三日熱マラリアを対象として実施する。三日熱マラリアは実験室で培養ができないために、研究に用いるマラリア原虫は流行地であるタイ国の患者から採取した感染赤血球を材料とし、新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンの開発をすすめることを目的として、以下の点に絞って本研究を実施した。

申請者がネズミマラリアにおいて同定した伝搬阻止ワクチン候補分子について、三日熱マラリア原虫の相同分子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、これを抗原としてウサギを免疫して抗血清を作製する。

流行地の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患者血液を再構成し、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、蚊体内で发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投与群とコントロール血清投与群間の差を検定して伝搬阻止効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) コムギ胚芽無細胞法を用いた組換えタンパク質の大量合成と抗血清の作製

ネズミマラリア(*Plasmodium yoelii*)を用いた先行研究によって同定した7種の伝搬阻止ワクチン候補抗原のうちの4種について、三日熱マラリア患者から調整したcDNAを鋳型としてPCR増幅した。コムギ胚芽無細胞タンパク質発現コンストラクトに増幅した遺伝子産物を挿入し、各組換えタンパク質のGST(glutathione S-transferase)融合タンパク質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、各組換えタンパク質の大量合成及び精製を行った。精製した組換えタンパク質でウサギを免疫して抗血清を作製した。

作製した抗血清の原虫分子に対する反応性を、ウエスタンブロッティング法および間接蛍光抗体法により判定した。また、抗体価の検定を組換えタンパク質を用いたELISA法および三日熱マラリア原虫を用いた間接蛍光抗体法によって行った。陽性反応を示した抗血清は、組換えタンパク質を用いた抗原特異的アフィニティー精製を行った。

(2) 調査研究実施国・地域の概要

本研究は、タイ王国西部でミャンマーと

の国境地帯に位置するカンチャナブリ (Kanchanaburi) (下図を参照) の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血液を用いて行った。カンチャナブリはタイ国におけるマラリアの高度流行地の一つであり、マラリア診療所には、年間を通じて三日熱マラリアと熱帯熱マラリアの患者が多数訪れている。



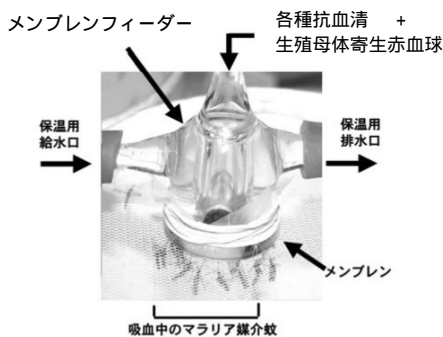
(3) マラリア媒介蚊

本研究に使用するハマダラカ (*Anopheles dirus*) はこの地域における主要なマラリア媒介蚊で、マヒドン大学熱帯医学部において大量飼育を行っているものを、海外共同研究者である Sattabongkot 教授らの協力によって使用し、吸血後は専用の飼育設備において飼育した後に、1匹ずつ解剖して中腸のマラリア原虫数の測定に供した。

(4) 抗血清の伝搬阻止効果の測定

作製した特異抗体をフィールドに持参して以下の研究を行った。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、インフォームドコンセントを得た後に、肘静脈からの採血によって三日熱マラリア原虫の感染赤血球を採取した。

患者から採血した感染赤血球と持参した特異抗体を、いくつかの希釈倍率で混合し、下図の人工吸血装置 (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。



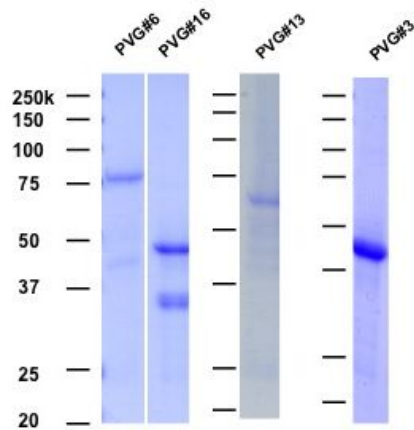
十分に吸血した蚊を選別して、約1週間室温で飼育した後に、蚊を解剖し、中腸壁に形成された原虫 (オーシスト) 数を顕微鏡下で算定し、特異抗体の伝搬阻止活性を評価した。

コントロール抗体を吸血させた蚊と比較して、特異抗体を吸血させた蚊のオーシスト数が有意に減少した場合に、伝搬阻止活性を有すると判定した。

4. 研究成果

(1) 組換えタンパク質の作製

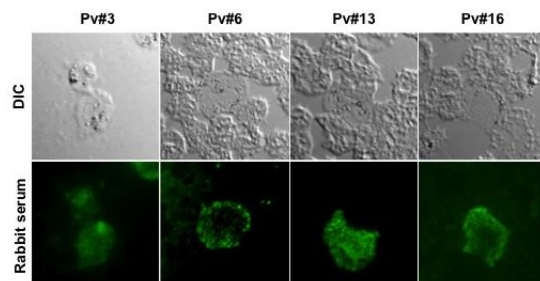
予想される分子量がそれぞれ、24.8kDa、27.4kDa、60.7kDa、75.2kDa の4種のタンパク質、PvG#3、PvG#16、PvG#13、PvG#6 のN末端の分泌シグナル部分を除くほぼ全長の配列を cDNA から PCR 増幅した後に、N末端側に GST を融合させた組換えタンパク質としてコムギ胚芽無細胞蛋白質合成系を用いて大量合成し、アフィニティー精製したところ、下図に示す様にそれぞれの組換えタンパク質が合成されていた。



(2) ウサギ抗血清の作製と三日熱マラリア患者血液中の虫体 (生殖母体) に対する反応性

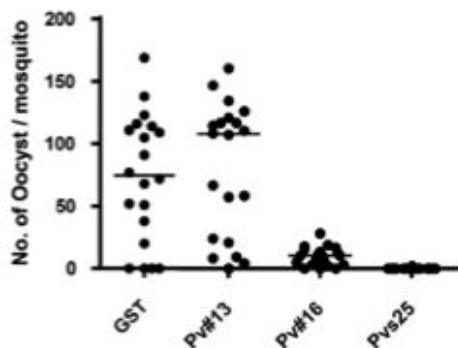
作成した4種の組換えタンパク質 (rPvG#3、rPvG#6、rPvG#13、rPvG#16) を抗原として、ウサギを免疫して抗血清を作成した。

ウサギ抗血清の三日熱マラリア原虫に対する反応性を確認するために、生殖母体を含む患者血液を抗原としたウエスタンブロットを実施した。また、三日熱マラリア患者血液を抗原とする間接蛍光抗体法を用いてウサギ抗血清の抗原特異性を検討した。その結果、下図に示すように PvG#3、PvG#6、PvG#13、PvG#16 に対するウサギ抗血清は、いずれもタイ国の三日熱マラリア患者血液から調整した生殖母体の虫体表面に特異的に反応することが確認された。

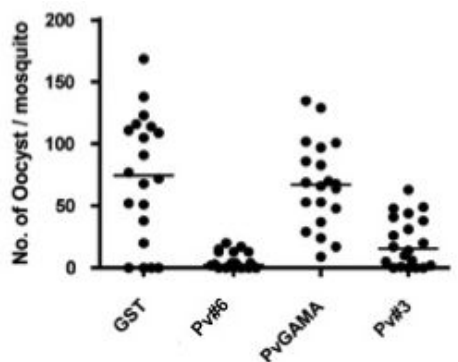


(3) 抗血清による三日熱マラリア原虫伝播阻止効果の判定

作成したウサギ抗血清を用いて伝播阻止活性の検討を行った。タイのマラリア診療所を訪れた三日熱マラリア患者から採血した血液に、ウサギ抗血清をいくつかの希釈倍率で加えたものを、人工吸血装置を用いて蚊に吸血させ、約7日後に中腸に形成されたオーシスト数を計測した。代表的な結果を下図に示す。陰性コントロールに用いた GST に対する抗血清を用いた群の中腸1個あたりのオーシスト数の中央値が約70個であったのに対し、陽性コントロールとして添加した Pvs25 に対する抗体を添加した群では殆どオーシストの形成が観察されなかった。本研究で作製した PvG#13 に対する抗血清を添加した群ではオーシスト数の中央値が100以上であり、陰性コントロールと有意な差は認められなかった。これに対し、PvG#16 に対する抗血清を添加した群においてはオーシスト数の中央値が約10個で陰性コントロール群に対して有意な減少を示した。



また下図に示すように、同じ患者血液を用いて同時に実施した人工吸血実験の結果、比較のために用いた PvGAMA に対する抗体を用いた群の中腸1個あたりのオーシスト数の中央値が約70個で陰性コントロールの GST に対する抗血清を用いた群とほぼ同じであったのに対し、本研究で作製した PvG#6 に対する抗血清を添加した群ではオーシスト数の中央値が5以下であり、陰性コントロールに対して有意に低下していた。また、PvG#3 に対する抗血清を添加した群においてもオーシスト数の中央値が約10個で陰性コントロール群に対して有意な減少を示した。



以上の結果から、今回作製した三日熱マラリアの生殖母体に発現する4種のタンパク質に対する抗血清のうち、PvG#3、PvG#6、PvG#16の3つの抗血清を添加した群において有意なオーシスト数の減少が認められ、これらの原虫タンパク質が伝播阻止ワクチン候補抗原としての可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) 橘 真由美、鳥居本美、須藤 萌、坪井敬文 新規伝播阻止ワクチン候補 PyGM75 の抗原決定領域の決定 第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 19-20 日、宮崎市民プラザ、宮崎県宮崎市
- 2) Tachibana M, Torii M, Sudo M, Tsuboi T, Ishino T. C-terminus region of male gamete surface protein, PyGM75 induce malaria transmission-blocking antibody. Molecular approaches to Malaria 2016, February 21-25, 2016, Lorne, Australia
- 3) Tachibana M, Torii M, Sudo M, Tsuboi T, Ishino T. Screening for highly immunogenic region of PyGM75, a novel transmission-blocking vaccine candidate. 64th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, October 25-29, 2015, Philadelphia, USA
- 4) Lorsuwannarat N, Shinzawa N, Tachibana M, Katsube R, Tsuboi T, Torii M, Ishino T. The functional analysis of a Plasmodium alveolin protein during mosquito stage parasite development. 64th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, October 25-29, 2015, Philadelphia, USA
- 5) 橘 真由美、鳥居本美、須藤 萌、坪井敬文、石野智子 雄性生殖体表面に局在する PyGM75 は受精に重要である 第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21-22 日、杏林大学三鷹キャンパス、東京都三鷹市
- 6) Tachibana M, Torii M, Sudo M, Tsuboi T, Ishino T. Identification of the novel transmission-blocking vaccine target expressing on the surface of male gametes. 63rd Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, November, 02-06, 2014, New Orleans, USA.

- 7) 原國哲也、山田清太郎、宮田 健、山口 類、玉城志博、坪井敬文、J. Sattabongkot、橘 真由美、鳥居本美、新川 武 三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原(Pvs 25) の反復整列化とそのワクチン効果
第 83 回日本寄生虫学会大会、2014 年 3 月 27-28 日、愛媛大学城北キャンパス、愛媛県松山市
- 8) Tachibana M, Torii M, Sudo M, Yokouchi Y, Tsuboi T, Ishino T. Novel molecule that is specifically expressed on male gametocyte and microgamete has potential role on exflagellation. 62nd Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, November 13-17, 2013, Washington DC, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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