

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660235

研究課題名(和文) オーダーメイド型バベシアワクチンの開発研究

研究課題名(英文) Development of made-to-order type Babesia vaccine

研究代表者

横山 直明 (Yokoyama, Naoaki)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：80301802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アジア、アフリカ、南アメリカのMSA遺伝子群を含む赤血球侵入関連遺伝子の遺伝子多型を明らかにし、かつ標的遺伝子の単離に成功した。また、バベシアのワクチン候補分子(RAP-1、AMA-1、TRAP)の赤血球侵入への関与について明らかにした。さらに、バベシアのメロゾイト期における遺伝子発現プロファイルについて明らかにし、かつバベシアの赤血球侵入を試験管内で評価できる新たな手法やバベシアの遺伝子改変を可能とする技術を開発した。いずれの成果もバベシア症に対するワクチン開発に向けた重要な知見となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have isolated erythrocyte invasion-related genes, including those encode MSA, and determined the genetic polymorphism of these genes in Babesia that is distributed in Asia, Africa, and South America. In addition, we revealed the involvement of Babesia vaccine candidate molecules (RAP-1, AMA-1, TRAP) in the parasite's erythrocyte invasion. Furthermore, in addition to establishing new in vitro tools for the elucidation of the mechanisms associated with erythrocyte invasion as well as for the genetic engineering of Babesia, we clarified the gene expression profiles in the merozoite stage of this parasite. The findings of the present study are useful not only for furthering our understanding of erythrocyte invasion mechanisms of Babesia but also for the development of vaccines against babesiosis.

研究分野：獣医原虫病学

キーワード：原虫 バベシア ワクチン オーダーメイド 赤血球侵入

1. 研究開始当初の背景

ウシバベシアは宿主赤血球内に寄生し、増殖～破壊～感染を繰り返すことで赤血球を溶血させ、深刻な発熱、貧血、血色素尿、黄疸などの病害を引き起こす。バベシアの赤内型増殖メカニズムの解析の中で、赤血球への侵入を果たす際の2つの蛋白質群が注目されている。1つは、原虫外膜に配置する、MSA-1、MSA-2b、MSA-2c と呼ばれる GPI アンカー膜蛋白質群で、宿主赤血球を最初に認識する原虫分子である(図1)。2つ目は、原虫内小器官から分泌される RAP-1、AMA-1、TRAP である。これらの分泌蛋白質群は原虫が赤血球侵入を果たす際に機能すると考えられている。いずれの分子も赤血球への吸着活性を持ち、それぞれの特異抗体を加えると原虫の赤血球侵入が抑えられる。RAP-1、AMA-1、TRAP の遺伝子配列は世界の流行株でよく保存されているが、抗体による侵入阻害効果は低く実用的ではない。一方で、MSA 群は高度な遺伝子多型を示すものの、同一株に対しては抗体が極めて高い阻害効果を示す。本挑戦的萌芽研究では、後者 MSA 群を活用して赤血球侵入阻止型のカクテル型サブユニットワクチンの開発基盤を確立する。

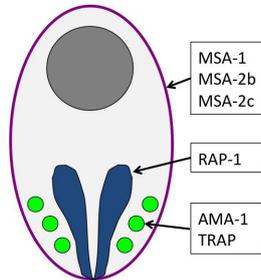


図1:赤血球侵入に関わるバベシアのワクチン候補分子

2. 研究の目的

ウシバベシアは宿主赤血球内に寄生し、深刻な発熱、貧血、血色素尿、黄疸などの病害を引き起こす。しかし、いまだ有効なワクチンが開発されていない。本研究では、高度な遺伝子多型を示すものの、同一株に対しては抗体が極めて高い赤血球侵入阻害効果を示す原虫外膜蛋白質 MSA 群を標的として、汚染国の流行株に適応したオーダーメイド型のカクテルサブユニットワクチンの開発に向けた学術基盤を確立する。

3. 研究の方法

オーダーメイド型バベシアワクチンの開発に向けて、以下の研究項目を設定した。

(1) 世界のバベシア流行株の遺伝子多型を解析し、単離した様々なタイプの MSA 群の特異抗体を作製する。また、それぞれの特異抗体と各種免疫抗原との反応交差性、特異抗体による原虫増殖阻害効果の結果、及び各種 MSA 遺伝子の系統分布から、それぞれの MSA

群の特異抗体がカバーできる原虫抑制スペクトルを決定する。

(2) 増殖抑制効果は低いながらも流行株に対応できる RAP-1、AMA-1、TRAP の組換え抗原に対する特異抗体も作製し、MSA 群の特異抗体を加えた様々な組み合わせの増殖抑制効果を検証する。

(3) 得られた成果を総括して、各汚染国オーダーメイド型のカクテルサブユニットワクチンの開発に向けた学術基盤を整備する。

4. 研究成果

オーダーメイド型バベシアワクチンの開発に向けて、以下の研究成果を得た。

(1) フィリピン、スリランカ、モンゴル、ベトナム、タイ、ブラジル、エジプト、ガーナの MSA 遺伝子群を含む赤血球侵入関連遺伝子の遺伝子多型を明らかにし、かつ標的遺伝子の単離に成功した。

(2) バベシアのワクチン候補分子(RAP-1、AMA-1、TRAP)の赤血球侵入への関与について明らかにした。

(3) バベシアのメロゾイト期における遺伝子発現プロファイルと転写機序について明らかにした。

(4) バベシアの赤血球侵入を試験管内で評価できる新たな手法を開発した。また、バベシアの遺伝子改変を可能とする技術を確立した。

バベシアの遺伝子多型解析や実験系の確立が先行し、MSA 群がカバーする原虫抑制スペクトルの決定やカクテルワクチンの試作には至らなかったが、いずれの成果もバベシア症に対するワクチン開発に向けた重要な知見となった。

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13件)

Yokoyama, N., Sivakumar, T., Tuvshintulga, B., Hayashida, K., Igarashi, I., Inoue, N., Long, P.T., and Lan, D.T.: Genetic variations in merozoite surface antigen genes of *Babesia bovis* detected in Vietnamese cattle and water buffaloes. *Infect. Genet. Evol.*, 30: 288-295, 2015. (査読有り) doi:

- 10.1016/j.meegid.2014.12.035.
- Elsify, A., Sivakumar, T., Nayel, M., Salama, A., Elkhtam, A., Rizk, M., Mosaab, O., Sultan, K., Elsayed, S., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. *Parasitol. Int.*, 64:79-85, 2015. (査読有) doi: 10.1016/j.parint.2014.10.002.
- Tattiyapong M, Sivakumar T, Ybanez AP, Ybanez RH, Perez ZO, Guswanto A, Igarashi I, and Yokoyama N.: Diversity of *Babesia bovis* merozoite surface antigen genes in the Philippines. *Parasitol. Int.*, 63: 57-63, 2014. (査読有) doi: 10.1016/j.parint.2013.09.003.
- Sivakumar, T., Tattiyapong, M., Fukushi, S., Hayashida, K., Kothalawala, H., Silva, S.S., Vimalakumar, S.C., Kanagaratnam, R., Meewewa, A.S., Suthaharan, K., Puvirajan, T., de Silva, W.K., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: Genetic characterization of *Babesia* and *Theileria* parasites in water buffaloes in Sri Lanka. *Vet. Parasitol.*, 200: 24-30, 2014. (査読有) doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.029.
- Yamagishi, J., Wakaguri, H., Yokoyama, N., Yamashita, R., Suzuki, Y., Xuan, X., and Igarashi, I.: The *Babesia bovis* gene and promoter model: an update from full-length EST analysis. *BMC Genomics*. 15:678, 2014. (査読有) doi: 10.1186/1471-2164-15-678.
- Salama, A. A., Terkawi, M. A., Kawai, S., Aboulaila, M., Nayel, M., Mousa, A., Zaghawa, A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Exp. Parasitol.*, 135: 623-8, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.exppara.2013.09.017.
- Terkawi, M.A., Ratthanophart, J., Salama, A., Aboulaila, M., Asada, M., Ueno, A., Alhasan, H., Guswanto, A., Masatani, T., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Xuan, X., and Igarashi, I.: Molecular Characterization of a New *Babesia bovis* Thrombospondin-Related Anonymous Protein (BbTRAP2). *PLoS One*, 8: e83305, 2013. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0083305.
- Simking, P., Saengow, S., Bangphoomi, K., Sarataphan, N., Wongnarkpet, S., Inpankaew, T., Jittapalapong, S., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: The molecular prevalence and MSA-2b gene-based genetic diversity of *Babesia bovis* in dairy cattle in Thailand. *Vet. Parasitol.*, 197:642-8, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.015.
- Sivakumar, T., Lan, D.T., Long, P.T., Yoshinari, T., Tattiyapong, M., Guswanto, A., Okubo, K., Igarashi, I., Inoue, N., Xuan, X., and Yokoyama, N.: PCR Detection and Genetic Diversity of Bovine Hemoprotzoan Parasites in Vietnam. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 1455-62, 2013. (査読有) doi: <http://doi.org/10.1292/jvms.13-0221>
- Nagano, D., Sivakumar, T., de Macedo, A.C., Inpankaew, T., Alhassan, A., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: The Genetic Diversity of Merozoite Surface Antigen 1 (MSA-1) among *Babesia bovis* detected from Cattle Populations in Thailand, Brazil and Ghana. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 1463-70, 2013. (査読有) doi: <http://doi.org/10.1292/jvms.13-0251>
- Sivakumar, T., Okubo, K., Igarashi, I., de Silva, W.K., Kothalawala, H., Silva, S.S., Vimalakumar, S.C., Meewewa, A.S., and Yokoyama, N.: Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. *Infect. Genet. Evol.*, 19: 134-40, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.meegid.2013.07.001.
- Ybañez, A.P., Sivakumar, T., Ybañez, R.H., Vincoy, M.R., Tingson, J.A., Perez, Z.O., Gabotero, S.R., Buchorno, L.P., Inoue, N., Matsumoto, K., Inokuma, H., and Yokoyama, N.: Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. *Vet. Parasitol.*, 196: 13-20, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.vetpar.2013.02.013.
- Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T.,

Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. Infect. Genet. Evol., 16: 178-85, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.005.

[学会発表](計6件)

横山直明、Sivakumar Thillaiampalam、五十嵐郁男、井上昇: Genetic variations in merozoite surface antigen genes of *Babesia bovis* detected in Vietnamese cattle and water buffaloes. 第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月21、22日、杏林大学(東京都、三鷹市)

Sivakumar Thillaiampalam、横山直明: Genetic diversity of *Babesia bovis* merozoite surface antigen genes: Implications for strain verification and immune control. 第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月21、22日、杏林大学(東京都、三鷹市)

麻田正仁、八幡一英、Hakimi Hassan、横山直明、金子修、Sures Carlos、河津信一郎: WR99210 選択システム及びプラスチジン S 選択システムの併用による *Babesia bovis* 遺伝子改変技術の確立及びノックアウト遺伝子相補実験への応用、第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月21、22日、杏林大学(東京都、三鷹市)

石崎隆弘、Sivakumar Thillaiampalam、五十嵐郁男、横山直明: On ice 法を用いた赤血球侵入能を有する赤血球外バベシアの精製、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9~12日、北海道大学(北海道、札幌市)

麻田正仁、Sures Carlos、Hakimi Hassan、横山直明、五十嵐郁男、八幡一英、金子修、河津信一郎: *Babesia bovis* におけるダブルトランスフェクション法の確立、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9~12日、北海道大学(北海道、札幌市)

Sivakumar Thillaiampalam、林田京子、五十嵐郁男、横山直明: Epidemiology of *Babesia* and *Theirelia* parasites in cattle and water buffalo populations in Sri Lanka. 第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27、28日、愛媛大学(愛媛県、松山市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山直明 (YOKOYAMA, Naoaki)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号: 80301802

(2) 研究分担者

井上昇 (INOUE, Noboru)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号: 10271751

(3) 連携研究者

()

研究者番号: