

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 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：2014～2016

課題番号：26305010

研究課題名(和文) 流行地患者血液を用いた新規伝搬阻止ワクチン候補抗原の有効性の検討

研究課題名(英文) Evaluation of novel transmission blocking vaccine antigen using infected patient's blood from endemic area

研究代表者

石野 智子 (Ishino, Tomoko)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：40402680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アジア地域を中心に患者数が多いにも関わらず対策が進まず「忘れられた感染症」と呼ばれる三日熱マラリアを対象とする。私たちが独自に同定した伝搬阻止ワクチン候補抗原MGSが、三日熱マラリア原虫において有効かどうか、感染流行地の患者血液を用いて検討する。ウサギを用いて作出したPvMGS特異抗体が、三日熱マラリア原虫の蚊の体内での受精・発育を抑制することが示唆された。また、フィールド分離マラリア原虫において、PvMGSには遺伝子多型がほとんど認められないことから、三日熱マラリア原虫伝搬阻止ワクチン開発に向けて、PvMGSのさらなる研究を行うことが有意義といえる。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium vivax is the causative agent of human malaria spreading in the south-east Asia and the South America. To eradicate Plasmodium vivax, development of transmission blocking vaccine is required. Here, we intended to evaluate the effectiveness of novel vaccine target, named MGS, using parasite-infected blood collected from Thailand.

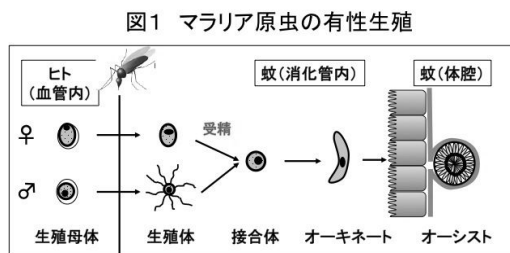
The specific antibodies against PvMGS generated from a rabbit had a tendency to reduce parasite development inside mosquito bodies. In addition, the genetic polymorphisms in PvMGS locus were less frequent than those in other vaccine candidate antigens, such as PvCSP or PvAMA1. Our findings suggest that PvMGS is promising target for transmission blocking vaccine development.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：マラリア 伝搬阻止ワクチン

### 1. 研究開始当初の背景

国際規模のマラリア対策では、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、新たな武器として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得られていない。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着目されている。



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、オーキネートへと発育し、中腸上皮を穿通して基底膜でオーシストを形成する(図1)。蚊中腸内における各発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。唯一臨床試験まで進んだ候補、P25を抗原としたワクチン開発においては、ヒトでの抗体価が十分に上がらないという問題が生じている。現在までに候補抗原の数が極めて限られていることが伝搬阻止ワクチン開発を実現させる上で大きな問題であり、新規候補抗原の探索が緊急の課題であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、アジア地域を中心に患者数が多いにも関わらず対策が進まず「忘れられた感染症」と呼ばれる三日熱マラリアを対象とする。これまでに、ネズミマラリア原虫を用いた研究で、私たちが独自に同定した伝搬阻止ワクチン候補抗原MGSがヒトマラリアでも有効かどうかを検討する。三日熱マラリア流行地であるタイ国の患者の血清中のPvMGSに対する特異抗体価を測定し、患者血清中の抗体による伝搬阻止効果を検定することで、PvMGSの新規伝搬阻止ワクチン抗原としての有用性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

三日熱マラリア原虫は、現在までに in vitro での培養方法が確立されていないので、タイ王国の国境付近の感染流行地において、患者の血液を材料として研究を行う。研究協力者である、マヒドン大学熱帯医学部の Jetsumon Sattabongkot 博士の協力のもと、ミャンマーとの国境付近のカンチャナブリ、ターソンヤン(図2参照)にあるマラリアクリニックに一週間程度滞在して、インフォームドコンセントの後集めた患者血液を用いて以下の研究を行う。



<図2 調査研究実施地域>

- 1) 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抗原(PvMGS)の三日熱マラリア原虫における相同分子(PvMGS)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、これを抗原として患者血清中の抗PvMGS抗体価の測定を行う。
- 2) 高い抗PvMGS抗体価を示した患者の血清からIgG抗体を精製する。これを三日熱マラリア原虫感染赤血球と混合して、人工吸血装置を用いて媒介蚊に吸血させる(図3参照)。

約一週間飼育した後に、蚊体内で発育した原虫数を測定し、患者由来IgG抗体による伝搬阻止活性を検定す



<図3 人工吸血法>

- る。
- 3) 組換え PvMGS をウサギに免疫して得られた特異抗体を用いて、前述の方法で伝搬阻止活性を検定する。
  - 4) 患者から得られたマラリア原虫の DNA を解析することで、PvMGS に一塩基多型がどの程度検出されるか調べる。

#### 4. 研究成果

##### 1) **PvMGS** のコード領域のクローニングとタンパク質発現

PlasmoDB を用いて探索した PvMGS の相同分子 PvMGS のコード領域を、三日熱マラリア原虫血液ステージ cDNA サンプルを鋳型に PCR を用いて増幅した。この時、分泌シグナルと C 末端側の疎水性のアミノ酸に富む領域を除いて増幅した。これを、コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成システムを用いて、GST を N 末端側に融合させて合成した。グルタチオンセファロースカラムで精製後、予想サイズにメジャーなバンドとして目的のタンパク質が得られた。

##### 2) 患者血清中の **PvMGS** の抗体価の測定

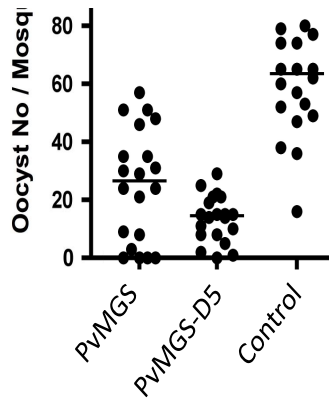
平成 26 年度に得られた 3 種類の患者血清を用いて、ELISA 法により PvMGS の抗体価を測定したところ、このうちの 1 人の血清中に PvMGS 抗体が含まれていることがわかった。

##### 3) **PvMGS** 抗体価と伝搬阻止効果の相関解析

平成 26 年度に得られた 3 種類の患者血清から IgG 抗体を精製し、その伝搬阻止効果を平成 28 年度に得た三日熱マラリア原虫感染赤血球を用いた人工吸血法にて評価した。その結果、伝搬阻止効果と PvMGS の抗体価には相関が認められなかった。一方で、PvMGS や既知の伝搬阻止候補抗原である Pv230 の抗体を有意に含まない IgG 試料でも伝搬阻止効果が見られたことから、未同定の伝搬阻止抗体が含まれることが示唆された。

##### 4) ウサギ **PvMGS** 抗体の伝搬阻止効果の評価

分泌シグナルと C 末端側の疎水性領域を除いたほぼ全長の PvMGS、および C 末端側疎水領域に隣接する一部領域(PvMGS-D5 と命名)を GST 融合タンパク質として発現



＜図4 PvMGS抗体の伝搬阻止効果測定

し、ウサギに免疫して特異抗体を作製した。これら特異抗体の伝搬阻止効果を、三日熱マラリア原虫感染赤血球を用いて人工吸血

法にて評価した。平成 28 年度に得られた 4 種類の三日熱マラリア感染赤血球を用いて実験を行ったところ、PvMGS-D5 抗体にはマラリア原虫の伝搬に抑制的に働く傾向が認められた(図4)。

##### 5) フィールドサンプルにおける **PvMGS** の一塩基多型の解析

マラリアの発病阻止ワクチンの開発を困難にしている原因のひとつとして、標的分子の遺伝子多型が非常に多く認められることが挙げられる。そこで、これまでに得られた患者由来原虫ゲノム DNA 4 種類を用いて、PvMGS 遺伝子座の塩基配列を解析した。その結果、他のステージのワクチン候補分子である PvAMA や PvCSP に比較すると一塩基多型は極めて少ないことがわかった。具体的には、最も多い試料で 1660 bp 中 7 カ所の変異が認められたが、そのうち 5 カ所はイントロン領域であり、アミノ酸置換を伴うものは 1 カ所のみであった。他の 3 つの試料中にはアミノ酸置換を伴う変異はなかった。これはハウスキーピング分子 (Adenylosuccinate lysate) と同程度に少ない。一方で、感染阻止ワクチンの標的分子である circumsporozoite protein (CSP) は 1134 bp 中に平均で 25 の塩基置換が認められ、そのうち 12 ヶ所はアミノ酸変異を伴っていた。

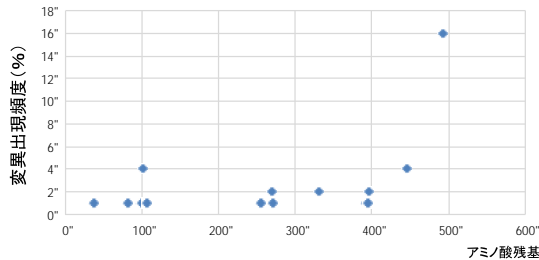
さらに、データベースを利用して世界中の感染流行地の患者から分離された 100 程度の三日熱マラリア原虫のゲノム配列の解析を行った。PvMGS に関しては、アミノ酸置換を伴う変異が 13 ヶ所で認められ、そのうち 1 カ所は全体の 16% の試料で変異が導入されていた。それ以外は 4% 以下の極めて低い頻度でのみ変異の導入が見られた。



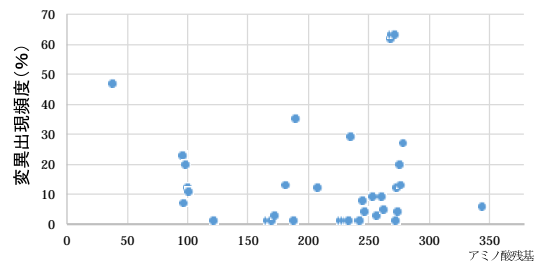
一方で、PvCSP 遺伝子座に関しては、変異導入の箇所も多く、またその頻度も極めて大きいことがわかる。タイのみでなく世界から分離された三日熱マラリア原虫についても、PvMGS には遺伝子多型はほとんど認められないことがわかった(図5参照)。

以上の結果から、PvMGS は三日熱マラリアの伝搬阻止ワクチンの新規候補抗原とし

A) PvMGSのアミノ酸変異を伴う変異



B) PvCSPのアミノ酸変異を伴う変異



<図5 世界の患者分離株(100試料)中の一塩基多型解析>

て、以下の二点から十分に可能性があることがわかった。1) PvMGS 特異抗体が、蚊の体内でのマラリアの受精・発育に抑制的に働く傾向がみられた。2) 世界から分離された三日熱マラリア原虫の塩基配列解析から、PvMGS には遺伝子多型が極めて限定的にしか認められないこと。

本研究を行ったタイ王国では、マラリア対策が国家的に行われており、近年患者数の大幅な減少に成功している。しかしながら、三日熱マラリア原虫には肝内休眠体に起因する再発が知られており、根絶するためには伝搬阻止ワクチンの導入が非常に望まれる。一方研究面では、充分量の感染血液の入手が困難になりつつあるが、研究協力者の情報やネットワークにより、その時々患者が多いと予想される場所を訪問することで、本研究が遂行できた。引き続き伝搬阻止効果の測定を行い、PvMGS のどの領域が効果的な伝搬阻止抗体を産生するか、等の検討が必要である。また、患者血清中の抗体価の解析から、原虫のPvMGSでは伝搬阻止抗体を十分に誘導されない可能性が示唆された。一方で、患者血

清中には、これまで報告のなかった新たな伝搬阻止抗体が含まれていることが示唆され、新規候補抗原の探索の必要性が示された。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 雄特異的 osmiophilic body タンパク質 PyGM75 の生殖体・接合体形成過程における役割の解析 橋真由美 鳥居本美 須藤萌 坪井敬文 石野智子 第86回 日本寄生虫学会大会 2017年5月28-29日、北海道大学、北海道札幌市
- Development of *Plasmodium falciparum* exflagellation assay. Kazutoyo Miura, Bingbing Deng, Luwen Zhou, Tomoko Ishino, Takafumi Tsuboi, Carole A. Long, 66th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, November 13-17, 2016, Atlanta, Georgia USA
- 新規伝搬阻止ワクチン候補 PyGM75 の抗原決定領域の決定 橋真由美 鳥居本美 須藤萌 坪井敬文 石野智子 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
- Development of *Plasmodium falciparum* exflagellation assay. Kazutoyo Miura, Bingbing Deng, Luwen Zhou, Tomoko Ishino, Takafumi Tsuboi, Carole A. Long 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
- C-terminus region of male gamete surface protein, PyGM75 induce malaria transmission-blocking antibody, Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino, Molecular approaches to Malaria 2016, February 21-25, 2016, Lorne, Victoria, Australia
- Screening for highly immunogenic region of PyGM75, a novel transmission-blocking vaccine candidate, Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino, 64th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene,

October 25-29, 2015, Philadelphia, USA

- 7) 雄性生殖体表面に局在する PyGM75 は受精に重要である 橘真由美 鳥居本美 須藤萌 坪井敬文 石野智子 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
- 8) Identification of the novel transmission-blocking vaccine target expressing on the surface of male gametes, Mayumi Tachibana, Motomi Torii, Moe Sudo, Takafumi Tsuboi, Tomoko Ishino, 63rd Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, November 2-6, 2014, New Orleans, USA.

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
愛媛大学プロテオサイエンスセンター 寄生虫病原体学部門  
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石野 智子 (Ishino, Tomoko)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・准教授  
研究者番号：40402680

### (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

松岡 和弘 (Matsuoka, Kazuhiro)  
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・助教  
研究者番号：60617140

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

Jetsumon Sattabongkot  
マヒドン大学・熱帯医学部・部門長