

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年5月15日

| | | | |
|-------|--|----------------------------------|-------|
| 採択番号 | 2019-共同-7 | | |
| 研究部門 | 感染免疫研究部門 | 原虫病研究センター 内共同研究担当教員 | 福本 晋也 |
| 研究課題名 | 臨床応用を目指したアデノ随伴ウイルスを用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの開発研究 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | いより みつひろ 伊従 光洋 | 金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授 | |
| 研究分担者 | よしだ しげと 吉田 栄人 | 金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授 | |
| | もはまど しゃなじ Mohammad Shanaij | 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻・ 大学院生 | |
| | | | |
| | ふくもと しんや 福本 晋也 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 | |
| 研究期間 | 2019年4月1日 ～ 2020年3月31日 | | |
| 目的・趣旨 | <p>アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus; AAV)は、近年、遺伝子治療用のベクターシステムとして広く利用されているウイルスベクターであるが、ワクチンベクターとしての報告例は少ない。AAV は非病原性かつ抗原発現持続性に優れているため、安全で有効性の高いマラリアワクチンベクターに応用できると考えられる。本研究では、熱帯熱マラリア原虫抗原を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発し、強力な免疫応答を誘導するアデノウイルスベクター(Ad)との Heterologous Prime-Boost 免疫法を行うことで、そのワクチン効果を調査することを目的とした。マラリア抗原として、スポロゾイト期抗原 PfCSP とオオキネート期抗原 Pfs25 を標的とし、作製したワクチンの感染防御効果ならびに伝搬阻止効果をマウスモデルで評価した。</p> | | |

| | |
|----------------|---|
| <p>研究経過の概要</p> | <p>アデノ随伴ウイルス(AAV)とアデノウイルス(Ad)を用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの作製</p> <p>AAV 血清1型(AAV1)、AAV5、AAV8 ならびに Ad ベクターのそれぞれを用いて、熱帯熱マラリア原虫の感染防御抗原 PfCSP と伝搬阻止ワクチン抗原 Pfs25 とを融合発現する2価ワクチンを構築し大量精製した。</p> <p>マラリアチャレンジ感染実験</p> <p>(i)プライム・ブースト免疫法:Ad 初回免疫/AHV1 追加免疫の順でマウスに筋肉内接種し、PfCSP 発現型遺伝子組換えネズミマラリア原虫によるチャレンジ感染試験を行った。並行して液性免疫応答ならびに細胞性免疫応答を解析し、ワクチンの有効性を評価した。</p> <p>(ii)プライム・ターゲット免疫法:マウスに Ad 筋肉内接種/AHV8 静脈内投与を行い、上記と同様の感染実験で有効性を評価した。</p> <p>マラリア伝播阻止実験</p> <p>(i) Direct feeding assay:Ad 初回免疫/AHV 追加免疫の順でマウスに筋肉内接種し、感染血を投与後にハマダラカに吸血させ伝搬阻止効果を判定した。</p> <p>(ii) Membrane feeding assay:上記のチャレンジ感染実験で感染防御効果を示したマウスから血清を採取し、英国研究協力者 Dr. Blagborough に試料を送付した。熱帯熱マラリア原虫感染血を用いて伝搬阻止効果を判定予定である。</p> |
| <p>研究成果の概要</p> | <p>AAV と Ad を用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの作製</p> <p>Pfs25-PfCSP 融合タンパクを発現する Ad、AAV1、AAV5 ならびに AAV8 の各種ベクターの構築、精製に成功した。それぞれのウイルスベクターを培養細胞に導入すると、Pfs25 ならびに PfCSP が細胞表面に共局在して発現した。</p> <p>マラリアチャレンジ感染実験</p> <p>(i)プライム・ブースト免疫法:Ad/AAV1 を基盤とした2価ワクチンをマウスに筋肉内接種し PfCSP 発現型組換え原虫 PfCSP/Pb スポロゾイトによるチャレンジ感染試験を行なった結果、57%~100%の感染防御効果を示した。抗 Pfs25 抗体価と抗 PfCSP 抗体価は免疫1ヶ月後でそれぞれおよそ 200 万倍と 500 万倍であり、共に上昇した。さらに経時変化を調査したところ、抗 Pfs25 抗体価と抗 PfCSP 抗体価は免疫9ヶ月後でそれぞれおよそ 40 万倍と 100 万倍であり、ピークから緩やかに減少したものの非常に高い抗体価を維持した。</p> <p>(ii)プライム・ターゲット免疫法:肝臓指向性 AAV8 ベクターを筋肉内接種と静脈内投与し、感染防御効果を比較した。筋肉内接種マウスでは感染防御効果は 60%であったが、静脈内投与の場合 100%の完全感染防御効果が示された。</p> <p>マラリア伝播阻止実験</p> <p>(i) Direct feeding assay:赤血球期の Pfs25 発現型組換え原虫 PbPfs25DR3 を Ad/AAV1 免疫マウスに感染させた後、直接ハマダラカに吸血させ、蚊にマラリア原虫が伝播するか評価した。対照群に比較した伝播阻止効果は免疫1ヶ月後で90%以上、免疫9ヶ月後で80%以上であり、いずれの場合でも平均オオシスト数は99%抑制された。</p> <p>(ii) Membrane feeding assay:Ad/AAV1 ワクチン免疫によって得られた血清(抗 Pfs25 抗体値>平均 100 万倍)を英国に送付済みであり、熱帯熱マラリア原虫感染血を用いて伝搬阻止効果を判定予定である。</p> |

研究成果の
発表

【原著論文】

1. Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Emran TB, Amelia F, Islam A, Syafira I, Yoshida S. A Viral-Vectored Multi-Stage Malaria Vaccine Regimen With Protective and Transmission-Blocking Efficacies. *Front Immunol.*, 10:2412, 2019.

【学会発表】

1. ○伊従光洋、Yenni Yusuf、吉井達也、Mohammad Shahnij、水上浩明、福本晋也、吉田栄人. 臨床応用を目指したアデノ随伴ウイルスを用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの開発研究. 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究成果報告会 帯広, 2020.2.13.
2. ○Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Yenni Yusuf, Daisuke S. Yamamoto, Shinya Fukumoto, Kunitaka Yoshida, Kento Genshi, Tatsuya Yoshii, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida. The mechanism of PfCSP-based malaria vaccines and its application to the viral vectored vaccine platform. 17th International Congress of Immunology 北京, 2019.10.19-23.
3. ○伊従光洋, 小川良平, 新倉保, Talha Bin Emran, 丹保秀太, 井上信一, 小林富美恵, 吉田栄人. バキュロウイルス筋肉内接種による肝臓期マラリア原虫の殺傷と遺伝子発現解析. 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.
4. ○大塚広夢, 伊従光洋, 吉田栄人. ウイルスベクターと組換えタンパクを用いた PfCSP マラリアワクチンによる免疫応答の多様性. 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.
5. ○Mohammad Shahnij, Mitsuhiro Iyori, Ashekul Islam, Intan Syafira, Iroha Yamagoshi, Mayu Kajino, Shigeto Yoshida. Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoite challenge. 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.
6. ○Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, Mitsuhiro Iyori, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida. A two-dose multi-stage malaria vaccine regimen elicits protection and blocks parasite transmission. 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.
7. ○Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Kento Genshi, Yutaro Onoue, Talha Bin Emran, Shigeto Yoshida. Full-length *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein administered with Imject Alum elicits complete protection in mice against the transgenic *P. berghei* sporozoites. PROTEIN ISLAND MATSUYAMA 2019 松山, 2019.9.10-11.