

課題番号 : 24指113

研究課題名 : マラリアワクチン開発医療達成のためのproof of concept研究

主任研究者名 : 狩野繁之

キーワード : マラリア、熱帯熱マラリア原虫、ワクチン、エノラーゼ、合成ペプチド、AD22、GMP、抗体価、モノクローナル抗体、エピトープマッピング、侵入阻害

研究成果 : 当該研究は3つの分担研究、

- 1) GMP 準拠マラリアエノラーゼワクチンの防御機能の解明、
 - 2) 免疫系ヒト化マウスを用いた抗マラリア原虫モノクローナル抗体治療薬の開発、
 - 2) 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼを標的とするインテリジェントペプチドワクチンの材料開発、
- から構成され、それぞれの研究成果が他の研究成果の基礎となる interactive な研究構造となっており、主任研究者のリーダーシップによって、1つの総体をなすプロジェクトとなっている。

本研究では、マラリアワクチンの First in Human 試験に向けた Proof of Concept を得るために、新たに GMP 基準 AD22 抗原“AD22new”を作製し、ワクチン実用化に向けたデータ取得とワクチン効果メカニズムの解明を目的とした。

① 抗原ペプチドの製造法の最適化

1つの Lys 残基によって2分岐した MAP と呼ばれるリジン dendリマーに、二量化「-S-S-結合」用に Cys (Acm) 残基の組み込まれた幹部分「map2cys」と2本の抗原配列の枝部分「AD22」から構成される抗原ペプチド「AD22-map2cys」、さらにヨウ素酸化による S-S 二量体「(AD22-map2cys)₂」として目的物を得ることとした。本研究で用いる GMP 対応の人工抗原 AD22new は、これまで用いてきた AD22 抗原とは抗原配列を結びつける部分構造に違いを有しているために、その有用性を新たに確認することを予定した。

しかし一方で、AD22new は、構造上 GMP 準拠で大量製造することが困難であることが判明したため、さらに抗原配列を結びつける部分構造をアミド結合に変更し、新規アミド結合2価型 AD22 から抽出、精製、二量化「-S-S-結合」で作成された「抗原3」についてもマウスの免疫試験を平行した解析を行った（パワーポイント（1）参照）。なお「抗原3」の製造法に関して、特許（特願 2014-241420：群馬大学と NC GM の共同出願）を出願した。さらに海外出願のために PCT を JST 外国出願支援制度に申請した。

② 微粒子製造法の変更

これまでに主任研究者らは、生分解性のポリ乳酸・グルコール酸共重合体（PLGA）を材料に徐放性微粒子ワクチンを作製してきた。その製造過程で行う PLGA 溶液の調整にジクロロメタン（塩化メチレン）を用いてきた。しかしながらジクロロメタンの使用と印刷会社作業員の発癌との関係が報告され、それまでは有機溶剤中毒予防規則の対象物であったジクロロメタンが、昨年11月より特定化学物質障害予防規則（特化則）の対象物に変わった。このためジクロロメタンを使用して微粒子製造を企業に依頼した場合、排気管理などの空調設備やアイソレーターなどに莫大な費用がかかることが判明した。そこで特化則の対象物ではない酢酸エチルを用いて PLGA 調整を行い、さらに GLP を想定した製造法で微粒子を作製することとした。

③ Balb/c マウスを用いた免疫試験（抗原性の確認）

Balb/c マウスは抗原に対して液性免疫（Th2 型）が優位に働くとされ、ワクチンの抗原性確認に一般的に広く用いられている。当該研究では、従来型（アミド結合4価）に加え、抗原配列を結びつける

部分構造の違う 3 種の人工抗原 1)AD22new、2) 新型（アミド結合 2 価(S-S)）パルミチン酸付加、3) 新型（アミド結合 2 価(S-S)）「抗原 3」、で作製した微粒子を Balb/c マウスに投与し、特異抗体の上昇や変動の測定を行った。その結果、免疫前の血清と比較して、新型抗原 3 種とも従来型抗原と同様に、血清中の特異抗体 IgG の上昇がそれぞれ確認でき、ワクチン候補としての抗原性が確認できた。そしてその中でも、「抗原 3」が最も優位に抗体価の上昇が認められたので、今後の FIH 目指した GMP 準拠のペプチド抗原（原薬）とすることに決定した。

④ 酢酸エチル型とジクロロメタン型微粒子の比較

初期の微粒子製造法では、遠心分離機による洗浄工程を行っていたが、GLP を想定した製造工程で遠心分離機使用した場合、アイソレーター等の設備投資に莫大な費用がかかることから、遠心分離作業を省いた製造法で、酢酸エチル型、ジクロロメタン型の両方を新たな製造法で作製して検討した。

酢酸エチル型初期微粒子の免疫応答が悪かったので、その製造工程で抗原が微粒子に取り込まれていない可能性が考えられ、蛍光抗体法による微粒子表面の抗原の局在を共焦点顕微鏡で観察を行った。その結果、従来型（2010 年製造）では、微粒子表面の抗原が検出されたが、新たな製法で作製された微粒子は、酢酸エチル型、ジクロロメタン型とも微粒子表面の抗原は検出されなかった。しかしながら、微粒子を生食に懸濁してその上清と、微粒子をアルカリ溶解した溶液について、ドットブロット法で抗原を検出した結果、抗原は微粒子に取り込まれていることが、判明した。さらに微粒子懸濁液を室温で 2 ヶ月放置した後の上清中に抗原が、酢酸エチル型で検出された。このことから上清中に微粒子に取り込まれた抗原が放出（徐放）されていることが判明し、新しい製造法の微粒子でも本研究のコンセプトが再現された。

この新たな酢酸エチル型、ジクロロメタン型の微粒子をマウスに皮下投与で免疫したところ、組換え体エノラーゼと反応する特異抗体の上昇がウェスタンブロット法によって確認され、新型微粒子の抗原性も確認された。これまでに申請者は、微粒子ワクチン投与により AD22 に対する特異抗体価が 60 週にわたり上昇、維持することを見出している。今後新型抗原 3 AD22 で作製した微粒子ワクチン投与により、どの様な抗体価の変動や持続性を示すか、これまで同様 60 週以上の観察を目標とするので、本試験は研究期間終了後も継続して行う。

⑤ 抗 AD22 モノクローナル抗体の作成及び、原虫増殖阻害活性のある抗体クローンの選抜

抗体治療薬の作成を見据えて、以下のモノクローナル抗体の作成、選抜を行った。まず、マウスモノクローナル抗体の作成は、業者に委託し 54 種のクローン得た。その後のクローン選抜を国立国際医療研究センターのラボで行った。候補クローンの選抜基準は当初の計画通り、1) 抗原 AD22 に対する反応性を有すること、2) 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 組換え体エノラーゼに対する反応性を有すること、3) IgM の混入の無いこととし、それぞれの項目について ELISA 法や western blot 法を用いて解析した。またその後行う感染実験ではローデントマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) も用いるため、*P. berghei* の AD22（熱帯熱マラリア原虫のものとアミノ酸 30 残基中、2 残基の違いがある）にも反応するクローンを同様に選抜し 8 種に絞り込んだ。再度限界希釈を行い 1 種あたり複数のクローンを含む計 19 クローンを得た。この 19 クローンから IgG を精製し熱帯熱マラリア原虫培養上清に各種クローン抗体を混入し、原虫増殖阻害活性を示す 8 クローンを最終的に選抜した。

なお、免疫系ヒト化マウスへの感染実験系の確立に関しては、免疫系ヒト化マウス（理化学研究所との共同研究予定）が未だ完成しなかったことから、残念ながら着手できなかった。

⑥ モノクローナル抗体のエピトープ解析と親和性の解析

選抜された抗 AD22 抗体クローンについて、さらにエピトープ（抗体が認識して結合する抗原の特定

の構造単位) 解析を行った。AD22(30 残基)を 8~10 残基ずつ短くした部分ペプチドを合成して、抗体との反応性を ELISA により解析した。その結果、抗 AD22 抗体のエピトープとして 8 残基配列 Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe を明らかにした。この配列のうち Lys-Thr はマラリア原虫 *P. falciparum* および *P. berghei* の双方に固有でヒトなどほ乳類に無い挿入配列である。また、これらのモノクローナル抗体の親和性の測定をおこなった。ELISA を用いてこれらの抗体の抗原に対する解離定数(Kd)を算出した。

⑦ AD22 ペプチドとプラスミノゲンの結合性の解析

抗AD22抗体がどのようなメカニズムでワクチン効果を示すのか防御機構の解明の一環として開始した。近年、マラリア原虫の媒介蚊感染虫体であるオオキネートは、ヒト血液中のプラスミノゲンを原虫表面のエノラーゼ分子を介して結合して、宿主細胞に侵入していることが報告され始めた。おそらく、原虫表面でのプラスミン活性が、原虫の宿主細胞への侵入を促進しているものと推定されている。この現象は、オオキネートで確認されたものであり、他の肝臓細胞や赤血球侵入に関与するかは不明である。そこで AD22 の近傍配列を含む、2 残基 +AD22+11 残基の配列 (Val-Ala-AD22-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr- Gly-Ala-Gln-Leu-Val)を分割した、10 残基ずつ (5 残基 overlap、6 種類)の合成ペプチドに対するプラスミノゲンの結合能を、Dotblot 法、ELISA 法で解析した。予備的なデータとして、プラスミノゲンは、AD22 の Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe-Lys-Thr の 10 残基と結合する可能性が示唆された。この配列は、抗 AD22 抗体のエピトープである 8 残基配列 Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe を含む配列であり、AD22 抗体が認識する配列とプラスミノゲンの結合する配列が共通する可能性が示唆された。

⑧ 微粒子抗原の皮下投与での挙動に関する研究

上記の抗原 3 について、蛍光標識化と抗原ナノ微粒子の作成と皮下での挙動を検討した。皮下での挙動を検討するため、フルオレセインよりも光耐性の高い HiLyte fluor 488 acid を用いて、抗原への標識反応と、PD10 カラムによるゲルろ過精製を行った。これらの蛍光標識抗原を用いて、PLGA7520 のマイクロスフェア作成を行った。さらに ICR-nu/nu(4W, メス)へ微粒子製剤の皮下投与を行い、消失過程の測定を行った (結果はパワーポイント(4)参照)

⑨ 生体吸収性高分子を用いたマイクロニードル製剤

近年研究が盛んになっている生体吸収性材料によるマイクロニードルには、投与部位や投与手技によっては針が欠けてしまう大きな欠点がある。そこで、本研究では抗原ナノ微粒子の投与に用いる目的と投与の確実性から、1本の樹脂材料によるマイクロデポ剤が適していると判断し、製剤製造法の検討を行った。具体的には皮下で溶解する生体適合性の高い高分子(ポリビニルピロリドン)によって抗原ナノ微粒子を固化したデポ剤を作成した。作成には、なるべく酸素に触れないように窒素気流下にて液体のビニルピロリドンと抗原ナノ微粒子を懸濁し、金属製の注射針内に吸引を行った。注射針のまま放射線重合反応を行った。すなわち注射針中に固体のポリビニルピロリドンに抗原ナノ微粒子が分散したデポ剤の作成に成功した。この製剤を用いることによって、投与後に皮下へ残留したナノ微粒子から抗原が少しずつ放出されることで抗体価が長期に持続する効果が期待される。

以上、3分担研究者の3年間にわたる一連の独立/共同研究で、新規に製造された GMP 対応可能な分子構造を有する AD22 を用いて、マラリアワクチンの First in Human 試験に向けた Proof of Concept の最も重要な部分を得ることができたと考えられる。

Subject No. : 24A113

Title : Investigating proof of concept for the achievement of malaria vaccine development

Researchers: Shigeyuki Kano, Kanako Komaki-Yasuda, Hiroyuki Oku

Key word : malaria, *Plasmodium falciparum*, vaccine, enolase, synthetic peptide, AD22, GMP, antibody titer, monoclonal antibody, epitope mapping, inhibition of invasion

Abstract : This research project consisted of 3 interactive sub-themes:

- 1) Elucidation of protective function of the GMP-compliant malaria enolase vaccine,
- 2) Development of monoclonal antibody drug targeting malaria parasite,
- 3) Development of an intelligent peptide vaccine targeting *Plasmodium falciparum* enolase, which can be harmoniously led and organized by the principal investigator, SK, with his vigorous leadership.

The purpose of the study is to obtain the proof of concept (POC) of the efficacy of the vaccine that is to be under first-in-human study leading to product development and manufacture.

1. Optimization of the process methods for antigenic polypeptides

We optimized process methods for a series of antigenic peptides containing a partial sequence, Ala256-Asp277 (AD22), from *Plasmodium falciparum* enolase. To enhance peptide immunogenicity, we designed MAP (multiple antigenic peptide) dendrimers consisting of a branched lysine core on which two copies of the AD22 peptides are displayed. Among several ways to prepare MAP molecules, we synthesized the construct entirely in the solid phase: the two amino groups of a lysine core were used as branching points for the elongation of the immunogenic peptide AD22 sequences. In the final step, the constructs were dimerized by iodine oxidation and following -S-S- formation, into “(AD22-map2cys)2”.

2. Change of the procedure of manufacturing microspheres

To dissolve the antigenic polypeptides, “(AD22-map2cys)2”, we changed the solvent from dichloromethane to ethyl acetate, which will be more suitable for GMP-compliant development of the vaccine. We tested the procedure carefully so that the ethyl acetate could completely dissolve the vaccine material.

3. Experiment of immunization on Balb/c mice to confirm the antigenicity of the polypeptides

Three different structures of AD22 antigens such as 1) “AD22new”, 2) “(AD22-map2cys)2” and 3) “(AD22-map2cyspal)2” were administered to Balb/c mice and the IgG titer levels were compared

with those by “original AD22-map”. Antibody titers kept increasing by either of the antigens, and those increased titers of the immunized sera at 4th week were significantly higher as compared with the pre-immune sera. Among those, significant increase of the titers were observed with “(AD22-map2cys)²” administration, thus it is decided as the final product for our vaccine development. The tests for observing the increase of the titers are to be continued up to 40-50 weeks of the immunization.

4. Evaluation of the microspheres which include AD22

Inclusion of the AD22 inside the microspheres which were produced by either way, AD22 dissolved by dichloromethane or that dissolved by ethyl acetate. Dot blot analysis revealed that both microspheres contain satisfactory amount of antigen inside which should be released slowly when they are administered subcutaneously. Western blotting analysis also revealed that mice immunize by both antigenic microspheres produced antibodies which reacted specifically with enolase antigen at around 47kD molecule.

5. Large-scale hybridoma culture and purification of monoclonal IgG antibodies.

According to the screening test, 8 selected hybridoma clones were cultured at large scale. From 200 mL of each culture, 1-2 mg of each monoclonal IgG antibody could be obtained through ammonium sulfate precipitation and purification using protein A columns. Purities of each antibody were verified by SDS-PAGE. Growth inhibitory activities were also confirmed for the 8 monoclonal antibodies.

In addition, immunofluorescence microscopical observation of the inhibition of merozoites' invasion into the erythrocytes was performed using anti-AD22 antibody. As a result, aggregations of merozoites were observed possibly due to the effect of the antibodies localized on the surface of the merozoites.

6. Selection and large-scale purification of the monoclonal IgG antibodies.

An epitope mapping analysis revealed 8 amino acids sequence (Asn –Lys –Thr –Tyr –Asp –Leu –Asp –Phe) within the AD22 to be specific epitope for the anti-AD22 monoclonal antibodies. In addition, the Kd values for each antibody were calculated. From large-scale hybridoma culture, 5 mG of each monoclonal antibody was purified and ready for injection to mice.

7. In vitro binding test between AD22 peptide and plasminogen.

It was reported recently that the enolase located on the surface of ookinete (mosquito-stage

malaria parasite) was binding to plasminogen of the mammalian blood meal and that this interaction was essential for the ookinete to invade into the midgut cell of the mosquito. Thus, we hypothesized that the binding of the enolase on the surface of the merozoite to the plasminogen is also essential for the merozoite's invasion into human red blood cells. Therefore, partial peptide sequences of AD22 peptide were tested for the binding to plasminogen by Dot-blot and ELISA analyses. As a result, 10 amino-acids sequence was speculated to bind specifically to the plasminogen, and this sequence contains the amino-acids epitope, which was also recognized by the anti-AD22 antibody.

8. *In vivo* behavior of vaccine microspheres subcutaneously administered

The fluorophore (HiLyte Fluor 488) labeled antigen peptide was encapsulated into bio-absorbable PLGA polymer microspheres using an oil/water emulsion. When we injected the microspheres subcutaneously, disappearance of microspheres at the implantation site was observed using an *in vivo* fluorescence imager. In our observed data, fluorescence intensity was decreased very rapidly for the initial 3 hours just after implantation. The disappeared spheres can be estimated to be migrated into lymph nodes via lymphatic vessels. Actually, we have observed a stronger green fluorescence in closely located lymph nodes (sub-iliac nodes) connected to the administered site at 3 hours after injection.

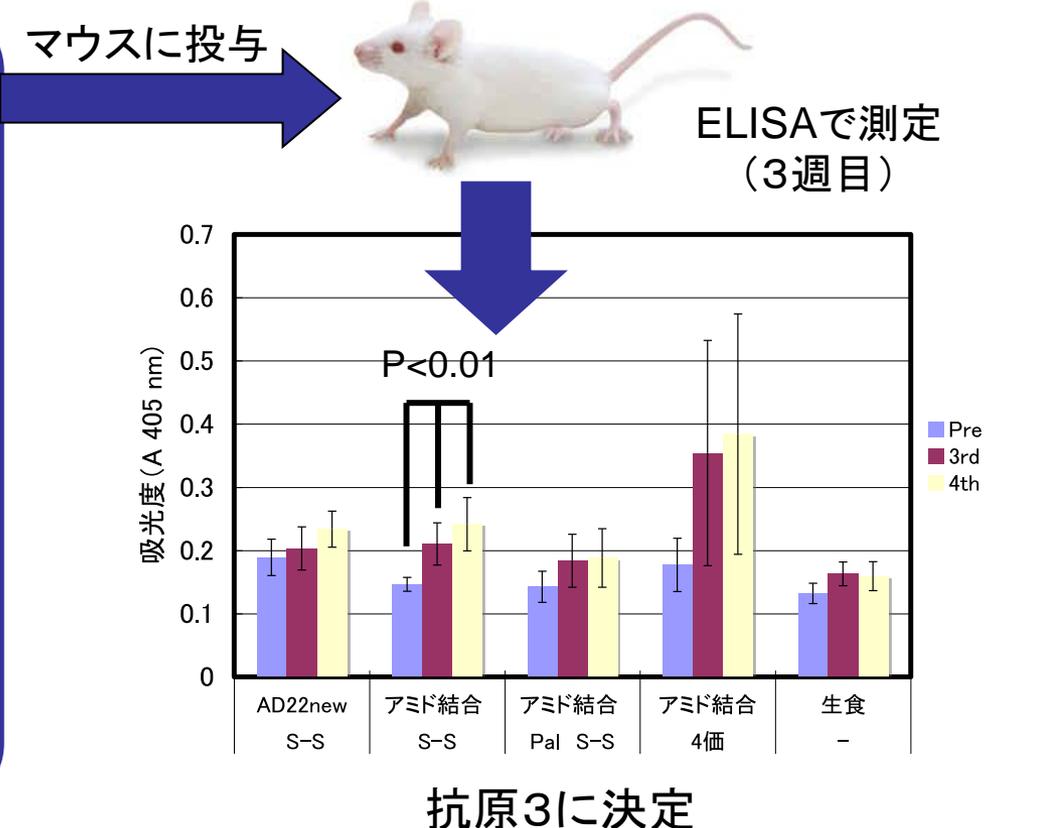
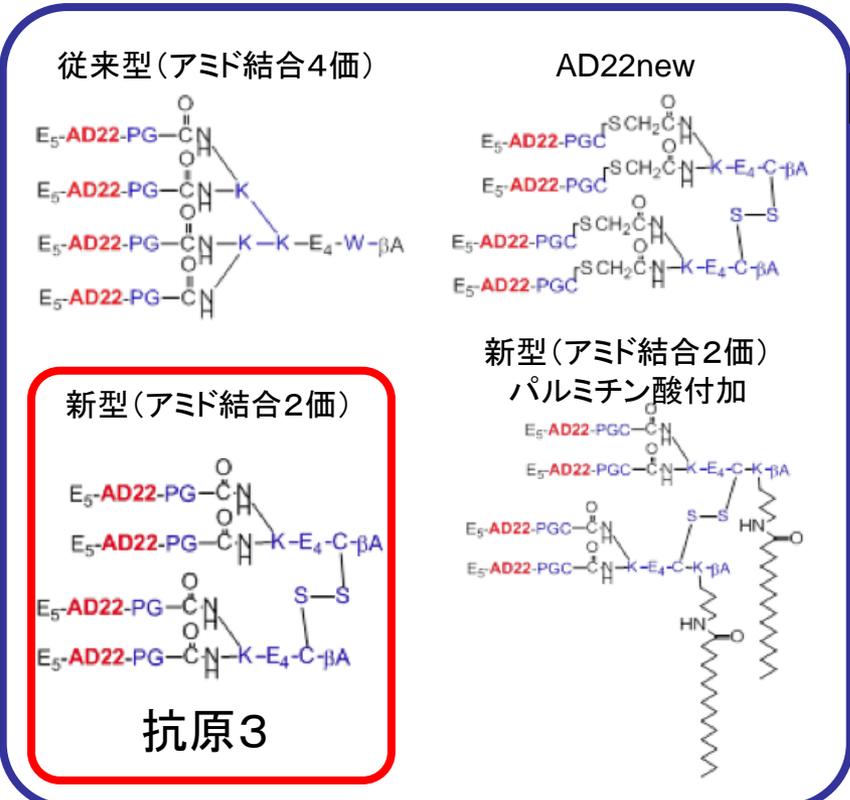
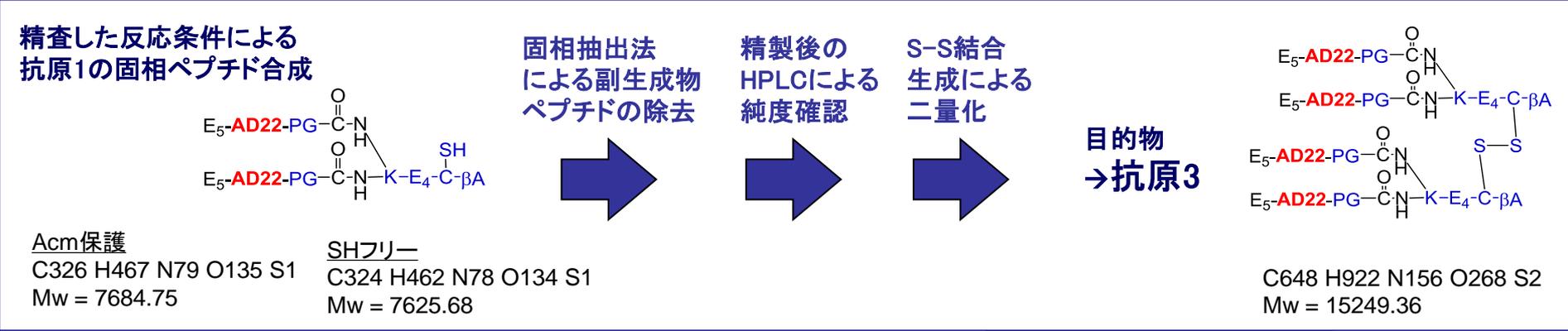
9. Design and fabrication of dissolving polymer depot material

The depot vaccine material was fabricated by room temperature gamma-ray polymerization of a liquid monomer (vinylpyrrolidone) within a needle mold (28-gauge hypodermic injection needle) to form polyvinylpyrrolidone (PVP) depot that encapsulate the antigenic peptides. The monomer was chosen as the structural material for the polymer micro-needles, because it is biocompatible, mechanically strong and highly water-soluble.

As described above, 3 years' dedicated efforts for elucidating POC leading to first-in-human study were concluded to be satisfactory in finding out proper vaccine design of AD22 microspheres to produce preferable antibodies to inhibit the invasion of the parasites into the host cells. Can't wait for the development and manufacturing of the product.

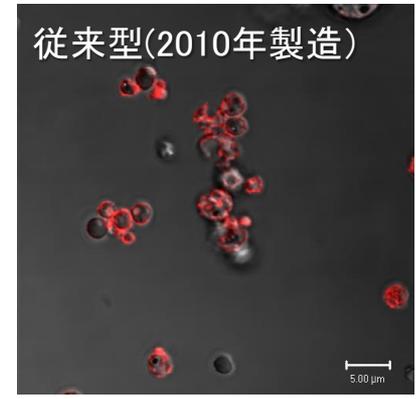
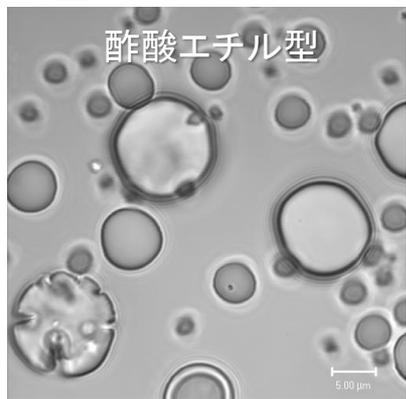
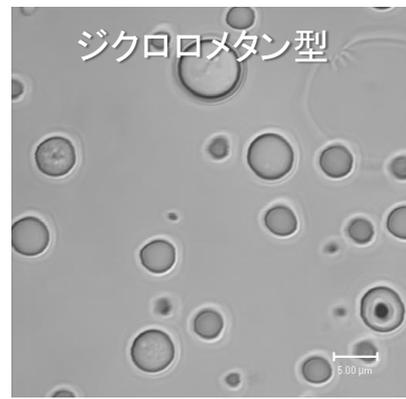
(24指113) 研究報告書 (パワーポイント)(1)(事後)(主任研究者: 狩野)

抗原ペプチドの製造法の最適化と免疫試験

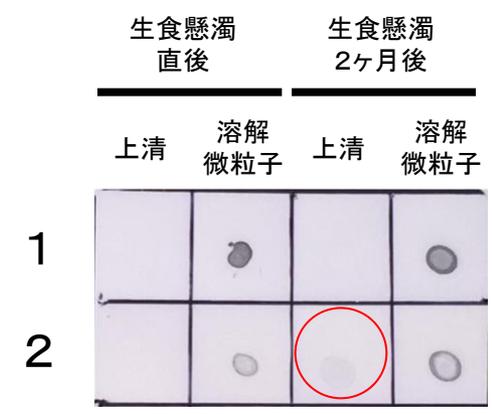


新しい製法による微粒子 (抗原3) の比較検討

抗AD22ウサギ血清とAlexa 568二次抗体で検出



ドットブロット法 (抗AD22血清で検出)

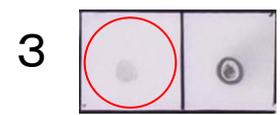


1: ジクロロメタン型
2: 酢酸エチル型

(○懸濁液上清に抗原を検出)

2010年
生食懸濁後
凍結保存

溶解
上清 微粒子



3: 従来型(2010年製造)

(○懸濁液上清に抗原を検出)

ウェスタンブロット法による解析(免疫後6週)

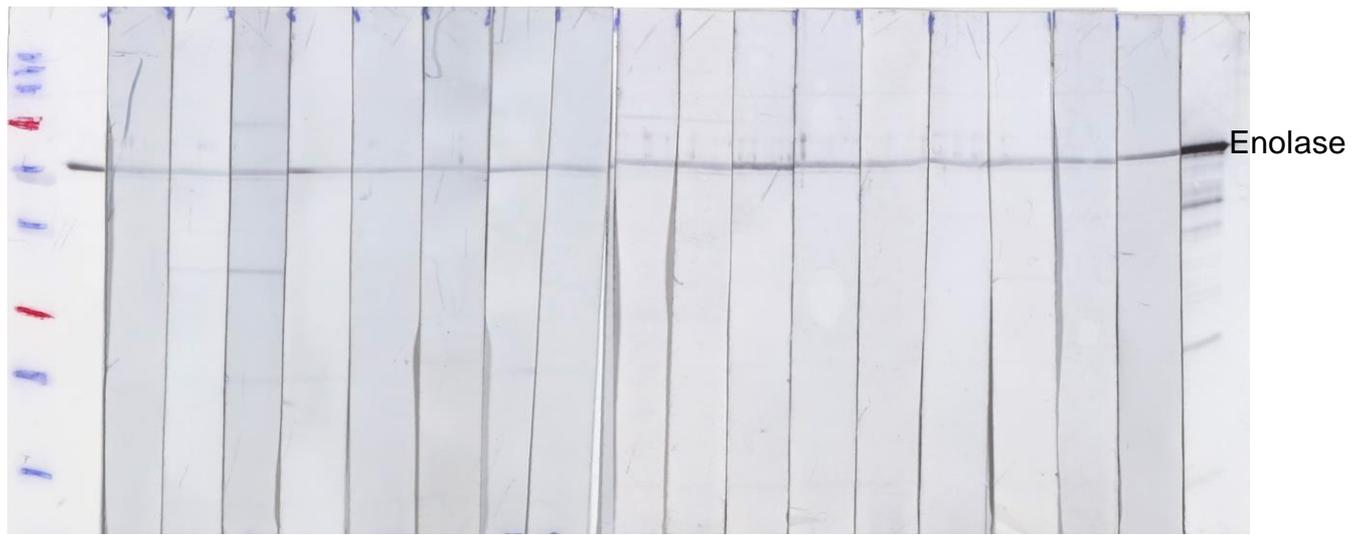
実験群1
ジクロロメタン
1回のみ免疫

実験群2
ジクロロメタン
2回免疫

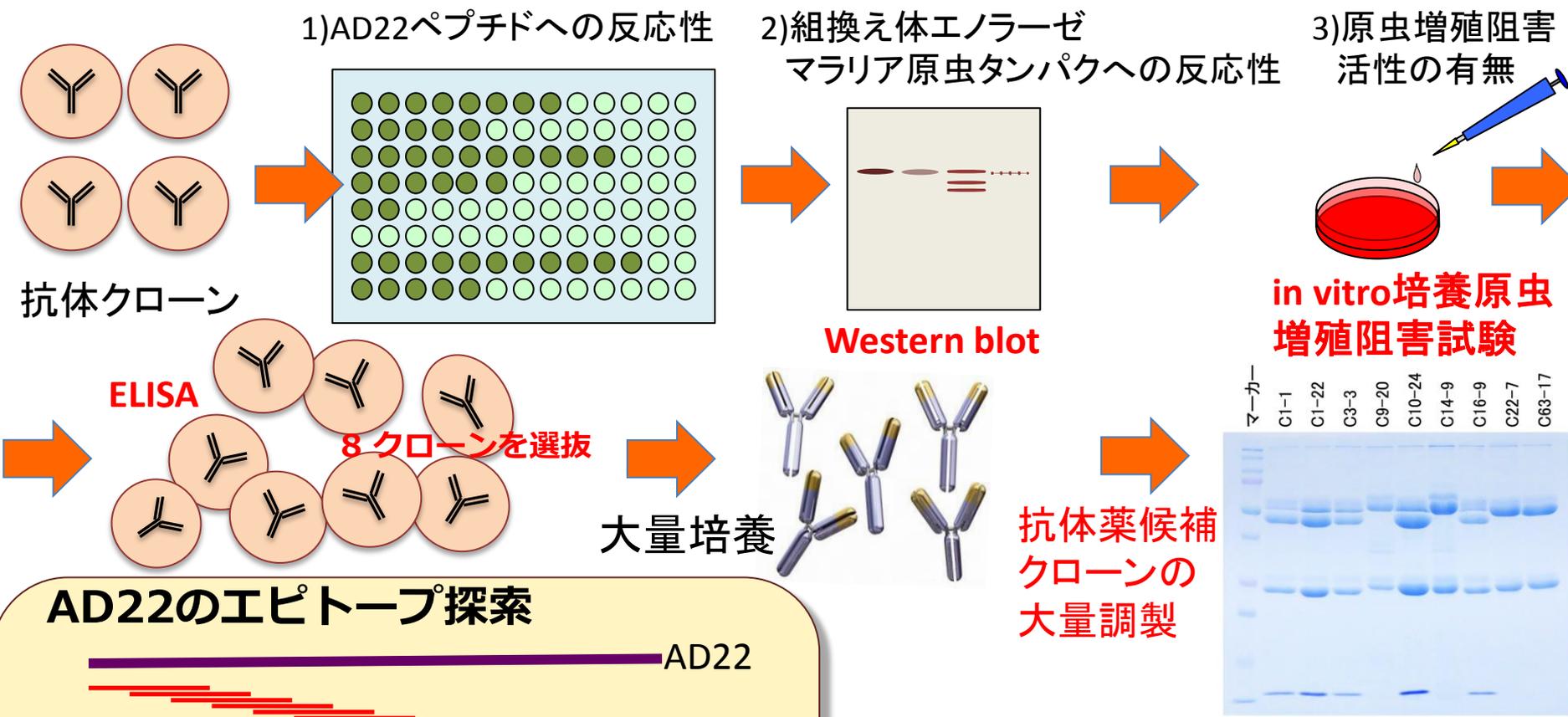
実験群3
酢酸エチル
1回のみ免疫

実験群4
酢酸エチル
2回免疫

免疫試験
ポジコン
mAb



治療薬候補の抗AD22抗体クローンの選抜と原虫増殖阻害機序の解明



AD22のエピトープ探索

AD22

部分ペプチド作製

ELISAによる抗体クローンとの反応性の測定

エピトープの決定
(Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe)
ワクチン抗原の改良!

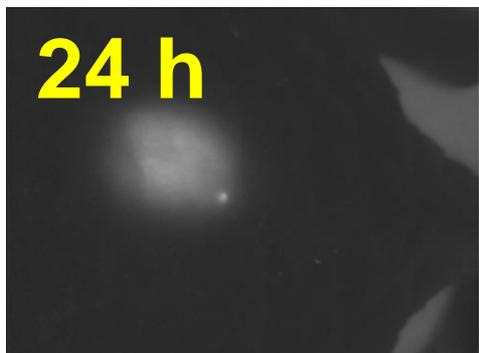
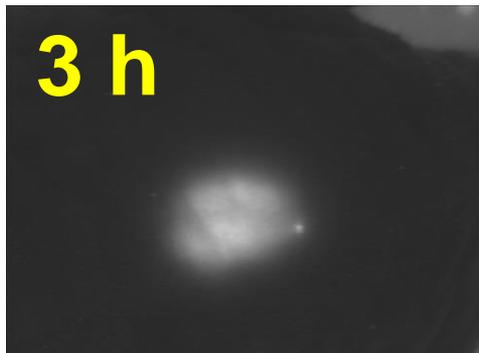
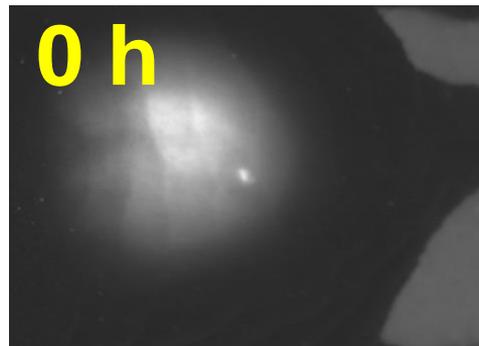
AD22と抗体クローンの親和性(Kd)の算出

より親和性の高いクローンを選抜
抗体クローンの改良!

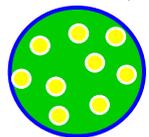
(24指113) 研究報告書 (パワーポイント)(4)(事後)(主任研究者: 狩野)

インテリジェント製剤の作成と皮下投与に関する研究

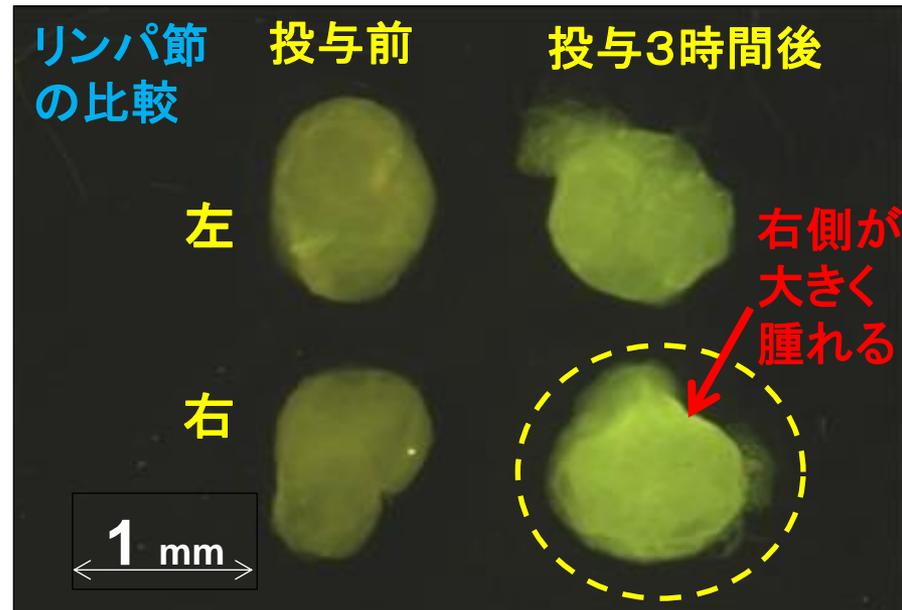
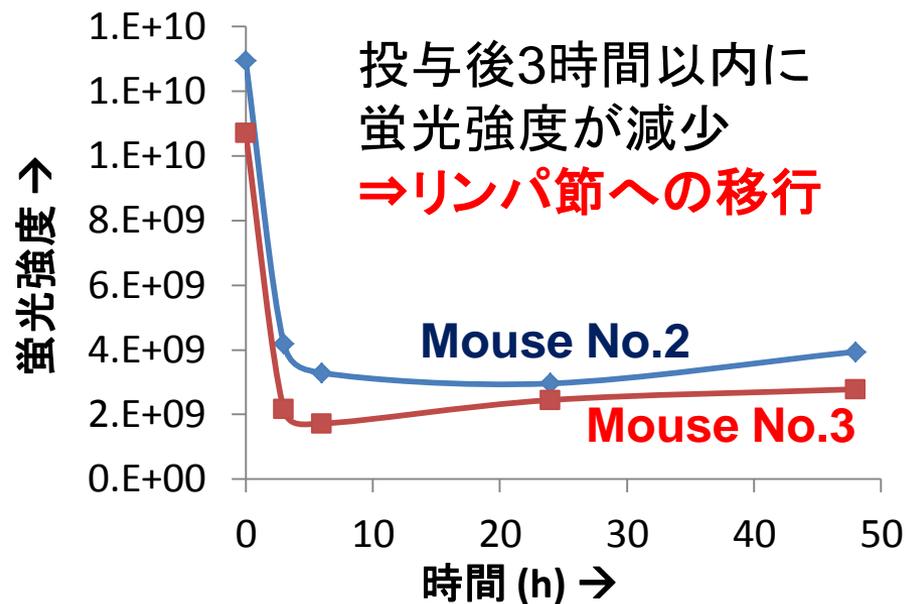
蛍光標識抗原の微粒子製剤
および皮下投与後の消失過程



ICR-nu/nu ♀
製剤7.0 mg/50 μL
皮下投与



← 蛍光標識
抗原



課題番号 : 24指113

研究課題名 : GMP準拠マラリアエノラーゼワクチンの防御機能の解明

分担研究者名 : 狩野繁之

キーワード : マラリア、ワクチン、GMP、抗体価、AD22

研究成果 : 当初の全体計画としては、本研究で用いる GMP 対応の人工抗原 AD22new は、これまで用いてきた AD22 抗原とは抗原配列を結びつける部分構造に違いを有しているために、その有用性を新たに確認することを予定した。具体的には、AD22new 抗原ワクチンをマウス皮下に投与し、特異抗体の上昇や、変動の測定を中心とした各種免疫実験、免疫マウスへの攻撃感染試験を行いワクチン効果の確認を行うこと。またマウス体内 (*in vivo*) での徐放性メカニズムの解明や、新たに実験的脳マラリア発症マウスを用いてワクチン効果の作用機作解明を試みることである。

① Balb/c マウスを用いた免疫試験 (抗原性の確認)

Balb/c マウスは抗原に対して液性免疫 (Th2 型) が優位に働くとされ、ワクチンの抗原性確認に一般的に広く用いられている。初年度から行った、抗原配列を結びつける部分構造の違う 3 種の人工抗原 AD22new で作製した微粒子 (この内 2 種の構造の説明は奥分担研究者の報告に詳細に記載した) と従来型の部分構造の抗原微粒子計 4 種を Balb/c マウスに投与し、特異抗体の上昇や、変動の測定を中心に行い、新型抗原の抗原性の確認調査を行った。免疫前の血清と比較して、新型抗原 3 種とも従来型抗原と同様に、血清中の特異抗体 IgG の上昇がそれぞれ確認できた。しかしながらこれら AD22new は、その構造上 GMP 準拠で大量製造することが困難であることが判明したため、新たに抗原配列を結びつける部分構造をアミド結合に変更した 2 種 AD22 を作製し、従来型及び AD22new との比較免疫実験を行った。なおこの新しい構造の製造法に関して特許 (特願 2014-241420 : 群馬大学との共同出願) を出願した。さらに海外出願のために JST 外国出願支援制度に申請した。

研究期間を通じて行った免疫実験の結果、抗原配列をアミド結合で結びつける 2 価型のペプチドを S-S 結合で結びつける構造のペプチド抗原 (抗原 3 と命名) を、今後の FIH 目指した GMP 準拠のペプチド抗原 (原薬) とすることに決定した。

② 微粒子製造法の変更 (当初の研究計画には無い)

これまでに申請者らは、生分解性のポリ乳酸・グルコール酸共重合体 (PLGA) を材料に徐放性微粒子ワクチンを作製してきた。その製造過程で行う PLGA 溶液の調整にジクロロメタン (塩化メチレン) を用いてきた。しかしながらジクロロメタンの使用と印刷会社作業員の発癌との関係がでたことにより、それまでは有機溶剤中毒予防規則の対象物であったジクロロメタンが、昨年 11 月より特定化学物質障害予防規則 (特化則) の対象物に変わった。このためジクロロメタンを使用して微粒子製造を企業に依頼した場合、排気管理などの空調設備やアイソレーターなどに莫大な費用がかかることが判明し

た。そこで今後のことも考慮し特化則の対象物ではない酢酸エチルを用いて PLGA 調整を行い、さらに GLP を想定した製造法で微粒子を作製することにした。

(なお本研究全体で用いる人工抗原 AD22new や新規アミド結合 2 価型 AD22 で作製した微粒子ワクチンは、分担研究者である奥浩之よりすべて供給を受け、免疫実験は国立国際医療研究センター研究所動物実験施設で行った。)

③ 酢酸エチル型とジクロロメタン型微粒子の比較

酢酸エチル型に変更した初期の試作品で Balb/c マウスに皮下投与で免疫を行ったが、従来型で免疫したときのような、免疫応答は見られず ELISA 法による抗 AD22 特異抗体の上昇は観察されなかった。またこの微粒子で免疫したマウスに攻撃感染試験も試みたが、ワクチン効果は観察されなかった。

初期の微粒子製造法では、遠心分離機による洗浄工程を行っていたが、GLP を想定した製造工程で遠心分離機使用した場合アイソレーター等の設備投資に莫大な費用がかかることから、遠心分離作業を省いた製造法で、ジクロロメタン法の再検討もふまえて、酢酸エチル型、ジクロロメタン型の両方を新たな製造法で作製し検討した。

酢酸エチル型初期微粒子の免疫応答が悪かったので、その製造工程で抗原が微粒子に取り込まれていない可能性が考えられたので、蛍光抗体法による微粒子表面の抗原の局在を共焦点顕微鏡で観察を行った。その結果、従来型（2010 年製造）では、微粒子表面の抗原が検出されたが、新たな製法で作製された微粒子は、酢酸エチル型、ジクロロメタン型とも微粒子表面の抗原は検出されなかった。

しかしながら、微粒子を生食に懸濁にてその上清と、微粒子をアルカリ溶解した溶液について、ドットブロット法で抗原を検出した結果、抗原は微粒子に取りこまれていることが、判明した。さらに微粒子懸濁液を室温で 2 ヶ月放置した後の上清中に抗原が、酢酸エチル型で検出された。このことから上清中に微粒子に取りこまれた抗原が放出（徐放）されていることが判明し、新しい製造法の微粒子でも本研究のコンセプトが再現された。

この新たな酢酸エチル型、ジクロロメタン型の微粒子をマウスに皮下投与で免疫したところ、組換え体エノラーゼと反応する特異抗体の上昇がウェスタンブロット法によって確認され、新型微粒子の抗原性も確認された。

これまでに申請者は、微粒子ワクチン投与により AD22 に対する特異抗体価が 60 週にわたり上昇、維持することを見出している。今後新型抗原 3 AD22 で作製した微粒子ワクチン投与により、どのような抗体価の変動や持続性を示すか、これまで同様 60 週以上の観察を目標とするので、本試験は研究期間終了後も継続して行う。

課題番号 : 24指113

研究課題名 : 免疫系ヒト化マウスを用いた抗マラリア原虫モノクローナル抗体治療薬の開発

分担研究者名 : 安田加奈子 (駒木加奈子)

キーワード : マラリア、ワクチン、モノクローナル抗体、エピトープマッピング、侵入阻害

研究成果 :

① 抗 AD22 モノクローナル抗体の作成及び、原虫増殖阻害活性のある抗体クローンの選抜

マウスモノクローナル抗体の作成は、業者に委託し 54 種のクローンを得た。その後のクローン選抜を国立国際医療研究センターのラボで行った。候補クローンの選抜基準は当初の計画通り、1) 抗原 AD22 に対する反応性を有すること、2) 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 組換え体エノラーゼに対する反応性を有すること、3) IgM の混入の無いこととし、それぞれの項目について ELISA 法や western blot 法を用いて解析した。またその後行う感染実験ではローデントマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) も用いるため、*P. berghei* の AD22 (熱帯熱マラリア原虫のものとアミノ酸 30 残基中、2 残基の違いがある) にも反応するクローンを同様に選抜し 8 種に絞り込んだ。再度限界希釈を行い 1 種あたり複数のクローンを含む計 19 クローンを得た。この 19 クローンから IgG を精製し熱帯熱マラリア原虫培養上清に各種クローン抗体を混入し、原虫増殖阻害活性を示す 8 クローンを最終的に選抜した。

② モノクローナル抗体のエピトープ解析と親和性の解析

選抜された抗 AD22 抗体クローンについて、さらにエピトープ (抗体が認識して結合する抗原の特定の構造単位) 解析を行った。AD22 (30 残基) を 8~10 残基ずつ短くした部分ペプチドを合成して (分担研究者、奥浩之と共同)、抗体との反応性を ELISA により解析した。その結果、抗 AD22 抗体のエピトープとして 8 残基配列 Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe を明らかにした。この配列のうち Lys-Thr はマラリア原虫 *P. falciparum* および *P. berghei* の双方に固有でヒトなどほ乳類に無い挿入配列である。また、これらのモノクローナル抗体の親和性の測定をおこなった。ELISA を用いてこれらの抗体の抗原に対する解離定数 (Kd) を算出した。

③ モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの大量培養と IgG の精製

前年度に、選抜した 8 クローンのハイブリドーマの大量培養を行った。凍結保存のハイブリドーマを解凍し、10% FCS 添加 RPMI 培地で培養し、細胞が増殖しコンフルートに達したら、フラスコ数を増やして継代した。最終的に各クローン 200 ml の培養上清を得た。培養上清は硫酸塩析 (50%飽和) 処理を行い IgG を沈殿させた後 PBS で透析を行った。高速遠心で未溶解物を取り除いた後、AD 2 2 をリガンドにしたアフィニティーカラムを用いて AD22 特異的 IgG を精製した。この作業がルーチン化できたので、各クローンそれぞれ 5mg 以上の IgG を精製し、モノクローナル抗体マラリア治療薬としてマウスに投与する為の材料を得た。

④ モノクローナル抗体のメロゾイト原虫細胞局在の解析

これまでの研究で解糖系の酵素であるエノラーゼは、原虫細胞質に局在することを、蛍光抗体法や免疫電顕法で明らかにしてきた。しかしながらこの通常の蛍光抗体法では、パラホルムアルデヒドで固定後、Triton-X100 で細胞表面に穴あけをして、抗体が細胞質にアクセスできるようにして検出しているため、原虫表面の局在は不明である。抗体が原虫に作用する場合、感染赤血球が抗体を貪食で取り込む可能性もあるが、原虫が裸むき出しに成るメロゾイトに直接作用すると考えるのが妥当と言える。そこで、まずパーコール密度勾配遠心でトロホゾイト期、シズント期の原虫を精製して抗体と共に培養し、8時間後にシズントが破裂して放出したメロゾイトや感染赤血球を洗浄後、パラホルムアルデヒドで固定した後に蛍光標識二次抗体を用いて共焦点レーザー走査顕微鏡で観察し、原虫に作用した抗体の検出を行った。その結果、抗体が原虫表面に作用したと考えられるメロゾイトの集合体が観察された。原虫増殖阻害のメカニズムとしては、抗体が作用したメロゾイトの赤血球侵入阻害によるものと考えられた。

⑤ AD22 ペプチドとプラスミノーゲンの結合性の解析

この研究は、本来計画には無かったが、抗 AD22 抗体がどのようなメカニズムでワクチン効果を示すのか防御機構の解明の一環として開始した。近年、マラリア原虫の媒介蚊感染虫体であるオオキネートは、ヒト血液中のプラスミノーゲンを原虫表面のエノラーゼ分子を介して結合して、宿主細胞に侵入していることが報告され始めた。おそらく、原虫表面でのプラスミン活性が、原虫の宿主細胞への侵入を促進しているものと推定されている。この現象は、オオキネートで確認されたものであり、他の肝臓細胞や赤血球侵入に関与するかは不明である。そこで AD22 の近傍配列を含む、2 残基+AD22+11 残基の配列 (Val-Ala-AD22-Lys-Ser-Leu-Val-Lys-Thr- Gly-Ala-Gln-Leu-Val) を分割した、10 残基ずつ (5 残基 overlap、6 種類) の合成ペプチド (分担研究者: 奥班作製) に対するプラスミノーゲンの結合能を、Dotblot 法、ELISA 法で解析した。予備的なデータとして、プラスミノーゲンは、AD22 の Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe- Lys-Thr の 10 残基と結合する可能性が示唆された。この配列は、抗 AD22 抗体のエピトープである 8 残基配列 Asn-Lys-Thr-Tyr-Asp-Leu-Asp-Phe を含む配列であり、AD22 抗体が認識する配列とプラスミノーゲンの結合する配列が共通する可能性が示された。

⑥ 免疫系ヒト化マウスを用いた熱帯熱マラリア原虫の感染系実験系の確立

予定していたこのテーマは、免疫系ヒト化マウス (理化学研究所との共同研究予定) が未だ完成していないことから、残念ながら着手できなかった。

課題番号 : 24指113
研究課題名 : 熱帯熱マラリア原虫エノラーゼを標的とするインテリジェントペプチドワクチンの材料開発
分担研究者名 : 奥 浩之

キーワード : 熱帯熱マラリア原虫、エノラーゼ、合成ペプチド
研究成果 : 分担研究者は、マラリア流行地で普及可能な最先端ワクチン技術として、(a) 生物由来原料を用いずに安定な化学合成原料のみから構成され、(b) 簡便に投与できて樹脂製のマイクロニードルを皮下・皮内に投与して、(c) 長期間の抗体価を維持するインテリジェントなワクチン材料の開発を目的として研究を行った。

現行のワクチンの欠点として、①生物製剤であるために輸送や保管には厳密な温度管理（コールドチェーン、例えば禁凍結で4℃以下の保管、または-20℃以下の冷凍保管など）を必要とする問題、②医療従事者や医療インフラの不十分な地域でも簡便に投与可能なワクチン剤形が必要とする問題があった。さらに③マラリアワクチンの候補抗原は抗体価が下がりやすく抗体価を維持するために複数回投与を確実にを行うための問題がある。よって流行地で使用可能なマラリアワクチンには、これらの問題点を解決する必要性として本研究を着想した。

以下、本分担研究の成果を記載する。

(研究成果1) 抗原ペプチドの製造法の最適化

抗原ペプチドの分子設計と効率的な化学合成法の開発を目的として研究を行った。また、スケールアップ製造に対応するためのプロセス最適化を目標とした。さらには GMP 製造に対応することを目標として、2種類の抗原ペプチド（抗原1、抗原2）についてプロセス研究を行った（10mg スケールと50-100 mg スケールの2種類）。さらに免疫投与によって比較を行い、高い抗体価の得られた抗原1についてスケールアップ製造の基礎検討を行い、比較的規模の大きなサブグラムスケール（500-1,000 mg スケール、1 dose 50 ug として10,000-20,000 dose 分に相当）の製造に対応できることを明らかにした。

(1-a) 抗原ペプチドの分子設計

これらの抗原ペプチドの溶解性は、ガンペプチドワクチンの開発において臨床応用を妨げる原因となっているので、本研究でも工夫した。すなわち Glu 残基を配置して抗原ペプチド分子間及び分子内の会合抑制、等電点が pI=7 から離れるように分子設計を行った。

(抗原1) 1つの Lys 残基によって2分岐した MAP と呼ばれるリジン dendリマーに、二量化「-S-S-結合」用に Cys(Acm) 残基の組み込まれた幹部分「map2cys」と2本の抗原配列の枝部分「AD22」から構成される抗原ペプチド「AD22-map2cys」、さらにヨウ素酸化による S-S 二量体「(AD22-map2cys)₂」として目的物を得ることとした。

(抗原2) 1つの Lys 残基によって2分岐した MAP と呼ばれるリジン dendリマーに、自己集合ミセル形成用に Lys(palmitoyl) 残基の組み込まれた幹部分「map2pal」と2本の抗原配列の枝部分「AD22」から構成される抗原ペプチド「AD22-map2pal」、さらにヨウ素酸化による S-S 二量体「(AD22-map2cyspal)₂」として目的物を得ることとした。

(1-b) 製造（合成と精製）

(抗原1) (抗原2) は大規模製造と低コスト化に対応させるため幹部分「リジン dendリマー」と抗原配列の枝部分を1回のペプチド合成により組み込みを行った。それぞれの精製は ODS 担体を用いた固相抽出法や分収 HPLC 装置により目的物の精製を行った。

<分析データ>

(抗原1)

- ・ 外観：白色凍結乾燥体

- ・ アミノ酸分析値 (加水分解条件: 6M HCl aq. (with Phenol) 110°C, 22hrs) Asp(28) 28.00, Thr(8) 7.78, Ser(8) 7.21, Glu(36) 35.62, Gly(4) 4.02, Ala(4) 4.00, Cys(2) 1.36, Leu(4) 4.03, Tyr(8) 8.00, Lys(10) 10.07, NH₃(16) 18.08, Pro(8) 8.18, Phe(8)+β-Ala(2) 10.01.
- ・ ESI-MS(negative ion) : MW = 15249.3 (理論値 15249.3)
- ・ 純度(逆相 HPLC, ODS カラム): 96.3 %

(抗原 2)

- ・ 外観: 白色凍結乾燥体
- ・ アミノ酸分析値 (加水分解条件: 6M HCl aq. (with Phenol) 110°C, 22hrs) Asp(28) 27.96, Thr(8) 7.75, Ser(8) 7.21, Glu(36) 35.70, Gly(4) 4.01, Ala(4) 4.00, Cys(2) 1.90, Leu(4) 4.04, Tyr(8) 7.81, Lys(12) 11.99, NH₃(16) 17.21, Pro(8) 8.20, Phe(8)+β-Ala(2) 9.98.
- ・ ESI-MS(negative ion) : MW = 15982.2 (理論値 15982.5)
- ・ 純度(逆相 HPLC, ODS カラム): 96.4 %

将来の目標である、臨床応用におけるコールドチェーンの不要なワクチン製剤として実用化のためには、徹底的な抗原ペプチドの高純度化作業が必要となる。本成果の抗原ペプチドは 96%以上の精製度を容易に実現することがわかった。よって将来のワクチン製剤の安定性試験に向けた、高度精製の作業に耐えうる事が明らかとなった。

さらに大量製造法の開発を行った抗原 1 については、ヒトへの投与に安全性の観点からより適していると考えられるカウンターイオンへの置換を行った。すなわち抗原ペプチドをイオン交換樹脂に通すことでトリフルオロ酢酸塩から塩酸塩への置換を行った。今後さらに 28 年度以降に予定しているヒトへの臨床試験を経ることによって、マラリアワクチン抗原としてヒトへの高い安全性が証明されると期待される。

(研究成果 2) インテリジェント製剤の作成と皮下投与に関する研究

上記の抗原 1 と抗原 2 について、蛍光標識化と抗原ナノ微粒子の作成と皮下での挙動を検討した。さらに免疫効果の高い投与方法を目的としたマイクロニードル製剤の製造検討を行った。

(2-a) 抗原の蛍光標識化と抗原ナノ微粒子の作成

皮下での挙動を検討するため、フルオレセインよりも光耐性の高い HiLyte fluor 488 acid (米国 AnaSpec 社製) を用いて、抗原 1 および抗原 2 への標識反応と、PD10 カラムによるゲルろ過精製を行った。これらの蛍光標識抗原を用いて、PLGA7520 (和光純薬製、注射剤製造用) のマイクロスフェア作成を行った。さらに ICR-nu/nu(4W, メス)へ微粒子製剤の皮下投与を行い、消失過程の測定を行った (結果は主任研究者研究成果パワーポイント参照)

(2-b) 生体吸収性高分子を用いたマイクロニードル製剤

近年研究が盛んになっている生体吸収性材料によるマイクロニードルには、投与部位や投与手技によっては針が欠けてしまう大きな欠点がある。本研究では抗原ナノ微粒子の投与に用いる目的と投与の確実性から、1本の樹脂材料によるマイクロデポ剤が適していると判断し、製剤製造法の検討を行った。具体的には皮下で溶解する生体適合性の高い高分子 (ポリビニルピロリドン) によって抗原ナノ微粒子を固形化したデポ剤を作成した。作成には、なるべく酸素に触れないように窒素気流下にて液体のビニルピロリドンと抗原ナノ微粒子を懸濁し、金属製の注射針内に吸引を行った。注射針のまま放射線重合反応を行った。すなわち注射針中に固体のポリビニルピロリドンに抗原ナノ微粒子が分散したデポ剤の作成に成功した。この製剤を用いることによって、投与後に皮下へ残留したナノ微粒子から抗原が少しずつ放出されることで抗体価が長期に持続する効果が期待される。

以上の成果より、ヒトへの臨床研究において、現行の RTS,S 抗原など他のマラリアワクチン抗原候補に広く見られる抗体価が落ちやすい欠点を凌駕するような革新的ワクチンの実用化が期待される。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指113

研究課題名： マラリアワクチン開発医療達成のためのproof of concept研究

主任研究者名： 狩野繁之

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies Targeting the Loop Region of <i>Plasmodium falciparum</i> Enolase	Hiroyuki Oku, Risa Onishi, Utako Arai, Yudai Kimoto, Keiichi Yamada, Kazuo Shinozuka, Kazuhiko Yano, Shigeyuki Kano	Peptide Science 2014	第2014巻、275-278ページ	2015年
マラリアの基礎とワクチン	奥 浩之, 狩野繁之	バムサジャーナル (The Journal of Biomedical Science and Biosafety)	第26巻第1号：31-35ページ	2014年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
熱帯熱マラリア原虫酵素の部分ペプチドを用いた免疫血清のエピトープマッピング	奥浩之、大西里咲、木本侑大、新井詩子、山田圭一、矢野和彦、狩野繁之	高分子学会関東支部 第30回群馬・栃木地区講演会	群馬県桐生市 群馬大学理工学部	平成27年3月
Development Project of an All-Synthetic Nano/Micro-Sphere Vaccine Targeting <i>Plasmodium falciparum</i> Enolase	Hiroyuki Oku, Risa Onishi, Utako Arai, Yudai Kimoto, Keiichi Yamada, Miho Ohue, Yoshiaki Ohyama, Tetsuya Nakamura, Kazuhiko Yano, Shigeyuki Kano	GUMI & AMDE 2014	群馬県桐生市 群馬大学理工学部	平成26年12月
Epitome Mapping of Inhibitory Antibodies Targeting the Loop Region of <i>Plasmodium falciparum</i> Enolase Using Synthetic Peptide Libraries	Hiroyuki Oku, Risa Onishi, Utako Arai, Yudai Kimoto, Keiichi Yamada, Kazuhiko Yano, Shigeyuki Kano	JITMM 2014 & FBPZ8	Centara Grand and Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand	平成26年12月
熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドを用いたモノクローナル抗体作成とエピトープマッピング	奥浩之、大西里咲、木本侑大、新井詩子、山田圭一、篠塚和夫、矢野和彦、狩野繁之	第51回ペプチド討論会（徳島市）	徳島大学薬学部 徳島県徳島市	平成26年10月
Epitope mapping of inhibitory monoclonal antibodies targeting the loop region of <i>Plasmodium falciparum</i> enolase using a combination of synthetic peptide libraries	Hiroyuki Oku, Utako Arai, Risa Onishi, Yudai Kimoto, Keiichi Yamada, Kazuhiko Yano, and Shigeyuki Kano	ICOPA2014 (13th International Congress of Parasitology)	The Hotel Camino Real Polanco Mexico City, Mexico	2014年8月

研究発表及び特許取得報告について

Novel Polymer Nanospheres for Serological Diagnosis of Malaria	Hiroyuki Oku, Kazuhiko Yano, Shinya Kitamura, Keiichi Yamada, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, and Shigeyuki Kano	JITMM 2013	Centara Grand and Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand	2013年12月
Gamma-Ray Polymerized Nanospheres for Serological Diagnosis of Malaria	Hiroyuki Oku, Kazuhiko Yano, Brian Bacay, Shinya Kitamura, Mai Fukuno, Keiichi Yamada, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, and Shigeyuki Kano	62nd Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine	Marriot Wardman Park, Washington DC, USA	2013年11月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
微粒子を用いたマラリアワクチンと抗体価検査キット (口頭発表)	奥浩之	首都圏北部4大学発 新技術説明会	東京都千代田区 J S T 東京本部	平成26年6月
マラリアの基礎とワクチン	奥浩之	第24回トラベラーズワクチンフォーラム研修会	国立国際医療研究センター	2013年9月

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼ蛋白質の部分配列を用いた人工抗原とその製造方法		独立行政法人国立国際医療研究センター、 国立大学法人群馬大学	(2014年11月28日)	(日本)
三日熱マラリアと熱帯熱マラリアの双方を検出するペプチドおよび抗体検査材料		独立行政法人国立国際医療研究センター、 国立大学法人群馬大学	(2014年11月1日)	(PCT出願のみ、各国移行前)
熱帯熱マラリア原虫感染症の検査及び診断薬、並びに検査及び診断キット		国立大学法人群馬大学	(2014年4月9日)	(日本)
微粒子およびその製造方法	特許第5429707号	国立大学法人群馬大学	2013年12月13日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。