

課題番号 :先26指202

研究課題名 :医師主導治験マラリアワクチンFIHに向けた開発研究

主任研究者名 :狩野繁之

キーワード :AD22, enolase, plasminogen, merozoite, gametocyte, ookinete

研究成果 :原虫の生活史の3つのステージにおけるワクチン効果を検証し、それぞれでPOCを得ることを目標とする。以下、それぞれのステージ毎に、初年度(平成26年11月28日採択、12月1日開始)の実績を報告する。

1) メロゾイト(merozoite)期

a) 抗 AD22 モノクローナル抗体の作成

モノクローナル抗体は、既製の抗 AD22 の 8 クローンを用いた。このうち 2 クローンは、新たにハイブリドーマをヌードマウスに接種し増殖させ (NCGM では動物実験倫理上、ハイブリドーマをマウスに投与出来ないので業者に委託)、得られた腹水よりプロテイン A カラムを用いて IgG を精製した。残りの 6 クローンは、ハイブリドーマを培養して上清より IgG を精製した。

b) 抗 AD22 モノクローナル抗体を用いた *in vitro* 原虫増殖阻害試験

各クローンについて 5~6mg の IgG を調整し終わり、*in vitro* 原虫増殖阻害試験を開始した。培養上清中の抗体が、原虫が分裂体 (schizont) に増殖するのを阻害する効果が顕微鏡下に観察された。今後、増殖阻害の定量化を図る。

c) plasminogen binding protein としての enolase の表面ペプチド配列

原虫表面 enolase とヒト plasminogen の結合を抗 AD22 抗体が阻害することにより、(プラスミン活性が得られず) 原虫が宿主細胞に侵入するのが阻害されると考える。関連する研究から enolase の plasminogen 結合部位は、マラリア原虫の enolase のアミノ酸配列に換算して 260 番目から 285 番目のループ部分であると推定された。抗 AD22 抗体に反応する抗原エピトープである 8 残基の配列-NKTYDLDF-は、まさにこの部分に含まれる。そこでペプチドライブラリーを作成し、ELISA 法および Dot-blot 法で plasminogen が結合するアミノ酸配列の探索を行った (詳細はパワーポイント図を参照)。その結果、260 番目からの 5 残基-NKTYD-に強い結合性が認められた。

2) オーキネート(ookinete)期 (初年度内にスポロゾイトの調整が時間的につかないので、2年度の計画を前倒した)

マラリア原虫オーキネートに対する抗 AD22 抗体の結合能の解明を目的とし、共焦点レーザー走査顕微鏡観察で解析した。蚊体内に吸血によって取り込まれたマラリア原虫は、まず蚊の腸管内へと送られる。マラリア原虫はここでオーキネートとなり、吸血後約 20 時間後から中腸細胞に侵入し、24 時間後には中腸腔側へと通過してオーシストを形成する。このような中腸ステージのマラリア原虫に対する AD22 特異的抗体の発育阻害効果を解析するに当たり、まずオーキネートに対する抗体の結合能の解析をおこなった。

ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) に、マラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) ガメトサイトを含む血液をメンブレン・フィーディングにより吸血させ、20~24 時間後にこれを回収した。マラリア原虫は、蚊中腸内での動態の観察を容易にするため、蛍光タンパク質 GFP を恒常的に発現する遺伝子組換えマラリア原虫を用いた。オーキネートが細胞内に侵入した状態の中腸を蚊から取り出し、抗 AD22 モノクローナル抗体 2 種、抗 AD22 ポリクローナル抗体 1 種、アクチンプローブ (Phalloidin)、核プローブ (TO-PRO-3) を用いて、免疫染色をおこなった。次に、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて中腸断面を観察し、中腸細胞内のオーキネートと抗 AD22 抗体の局在について、詳細な解析を行った。その結果、抗 AD22 ポリクローナル抗体を使用した染色により、中腸細胞内を通過中のオーキネートが部分的に染色される像が得られた。

初年度の結果から、抗 AD22 ポリクローナル抗体が蚊ステージのマラリア原虫に結合することが示された。これは、抗 AD22 抗体が中腸ステージのマラリア原虫に結合し、オーキネートの中腸侵入およびオーシストの形成を阻害する可能性を示唆している。また同様に、ヒトへの感染ステージであるスポロゾイトについても、抗体の結合による運動阻害効果が期待される。2 年度、蚊ステージのマラリア原虫に対する抗 AD22 抗体の発育阻害効果について、*in vivo*、*in vitro* の両側面から、さらなる解析を実施する。

3) ガメトサイト(gametocyte)期

a) ガメトサイト表面におけるエノラーゼの発現解析

現在上記の新たに精製した抗体を用いて、ガメトサイト表面におけるエノラーゼの発現解析の準備を進めている。

Subject No. : 26A202
Title : Research and development for malaria vaccine first-in-human investigator-initiated clinical trials
Researchers : Shigeyuki Kano
Key word : AD22, enolase, plasminogen, merozoite, gametocyte, ookinete
Abstract : The purpose of this research is to obtain proof of concept (POC) on the effectiveness of the “AD22 vaccine” at 3 respective stages of the parasite life cycle.

1) merozoite stage

a) Anti-AD22 monoclonal antibody

Eight monoclonal antibodies against AD22 amino acids were obtained as affinity-purified IgGs using hybridoma cells.

b) *In vitro* growth inhibition test using anti-AD22 monoclonal antibodies

From each clone, 5 to 6mg of IgGs were purified and added to the supernatant of the parasite culture dishes. Inhibition of the parasites' growth from ring stage to schizont stage was microscopically observed. Growth inhibition curve is now being obtained.

c) Enolase as a plasminogen binding protein

Plasminogen is believed to bind to the enolase, which is located on the surface of the parasite, and is subsequently activated to the serine protease plasmin by host-derived tissue plasminogen activator or urokinase, recruiting potential proteolytic activity to encourage parasites to invade into the host cells.

Lorena *et al.* reported that the DKSLVK sequence of enolase located between amino acids 277-282 were binding sites of plasmin(ogen). In this study, we identified more plasmin(ogen) binding sites of enolase by using synthetic peptide libraries. The ELISA and Dot-Blot analyses of synthetic peptides representing a part of enolase sequences identified a 10-residue sequence NKTYDLDFKT located between amino acids 264-273 as a strongest binding epitope mediating binding of plasminogen to enolase. Interestingly, the 10-residues were located within an exposed surface-loop in each of the monomers of the quaternary structure of the enolase, which would be suitable target for inhibitory antibody, such as anti-AD22 antibody.

2) ookinate stage

Plasmodium gametocytes are taken up into mosquito midgut, where they develop into ookinetes, and they invade into the mosquito midgut cells. Within 24 h after mosquito blood meal, ookinetes reach basal lamina and develop into oocysts. Prior to analyzing capacity of anti-AD22 antibody to hinder midgut-stage ookinetes, binding ability of it to ookinete was examined microscopically.

Anopheles stephensi, ingested *P. berghei*-infected mouse blood, was collected 20~24 h after blood meal. GFP-expressing *Plasmodium* was used to facilitate microscopic observation. Midgut containing *Plasmodium* ookinetes in its cells were dissected out and provided to the immunostaining with anti-AD22 antibodies (2 monoclonal and 1 polyclonal antibodies), phalloidin (probe for actin), and TO-PRO-3 (probe for nucleus). The longitudinal sections of ookinetes-containing midgut were analyzed with confocal laser-scan microscope for the localization of ookinetes and of anti-AD22 antibody. The longitudinal images revealed the co-localization of GFP-ookinete and anti-AD22 polyclonal antibody, indicating the binding capacity of anti-AD22 antibody to midgut-stage ookinetes.

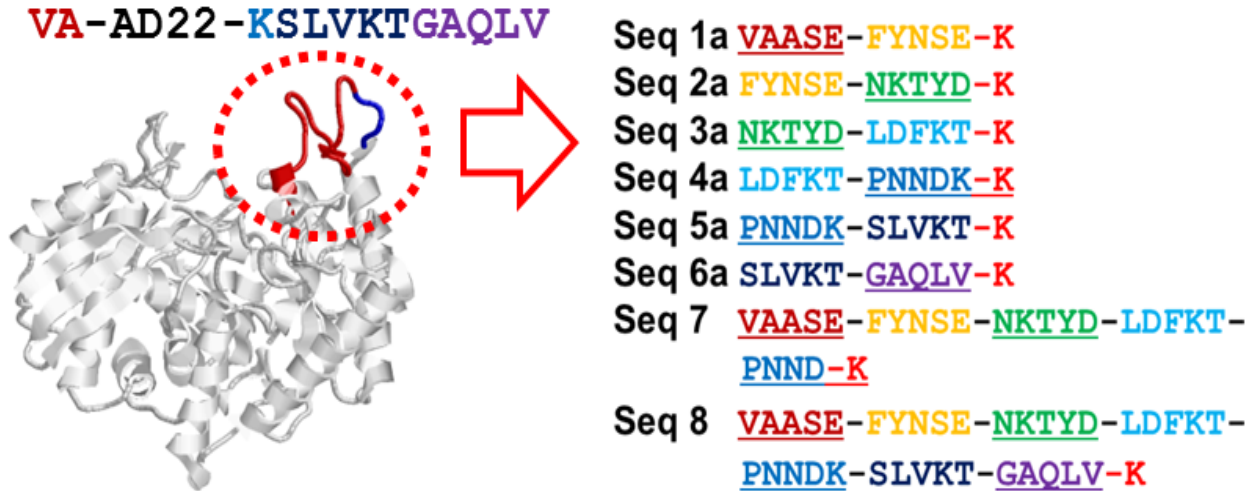
This finding suggests potential utility of anti-AD22 antibody to thwart parasites crossing midgut cells and developing into oocysts. Further analysis *in vivo* and *in vitro* will characterize potential of anti-AD22 antibody to hinder *Plasmodium* development and its transmission capacity in mosquito.

3) gametocyte stage

Using the affinity-purified monoclonal antibodies, localization of AD22, part of enolase, on the surface of gametocyte is to be elucidated.

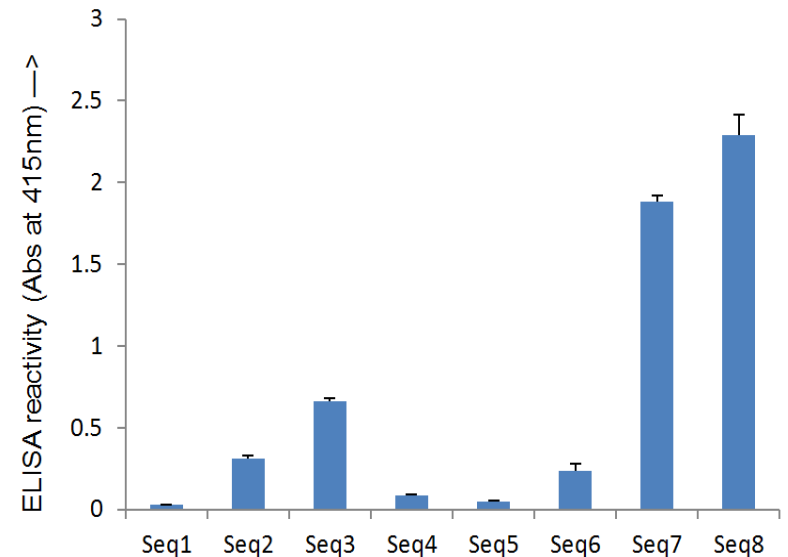
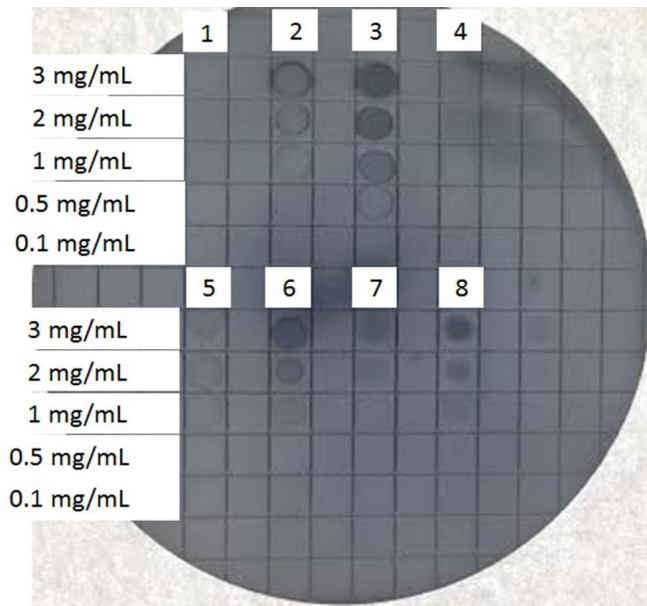
Figure 1. 原虫enolaseの各部分peptideによるplasminogen結合の比較

(a) 設計したSeq1-Seq8部分peptideの配列



下記2法の解析結果より、Seq2, 3, 6, 7, 8に対してpeptide鎖とplasminogenの強い結合が観察された。NKTYDの5残基が共通しており、特にSeq 3に強い結合が見られており、plasminogen結合部位と考えられた。

(b) ニトロセルロース膜を用いたDot-Blot法 (DAB発色) (c) ELISAプレートを用いたELISA法 (TMB発色)



(先26指202) 医師主導治験マラリアワクチンFIHに向けた開発研究 (2) (狩野・主任)

(方法)

- 1) 吸血20-24時間後の*An.stephesi*を解剖し、中腸内のオーキネートを検出
- 2) 使用した*P.berghei*株はGFPを発現している
- 3) 中腸自体を可視化するために、ファロイジン（緑）も併用
- 4) 筋繊維の間に見えるバナナ型がオーキネート
- 5) マゼンダ色が抗AD22ポリクローナル抗体染色
- 6) 青色が核染色（TO-PRO-3）になります
- 7) 共焦点レーザー顕微鏡で観察したZ軸方向の重ね合わせ画像

(結果)

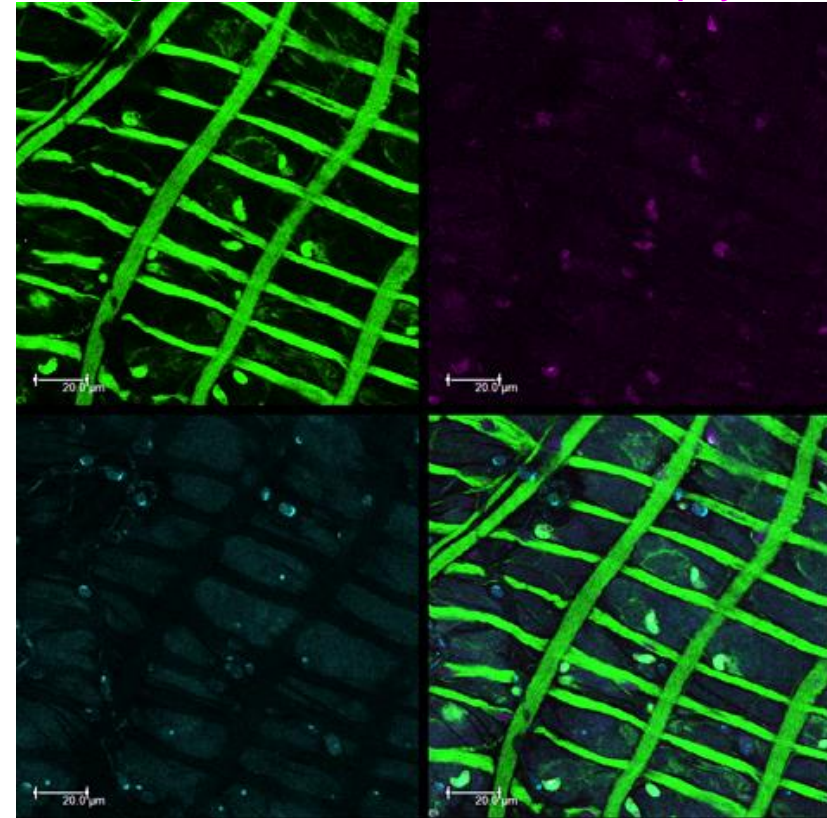
- 1) 1/100希釈ポリクワドでオーキネートが染め出された（右上）
（生データに近く、シグナル強度は調整していない）
- 2) ポジのオーキネートの核部分は抜けているようだが、それ以外の部分での局在ははっきりしない
- 3) 一部、片側先端だけ染まっているように見えるオーキネートがある。

(結論)

オーキネートの表面にエノラーゼが発現している

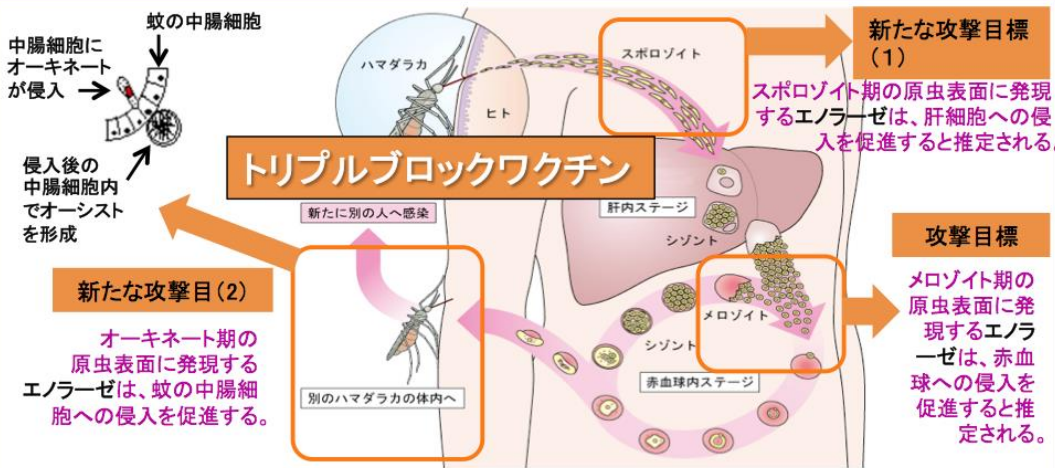
P.berghei GFP +Phalloidin

anti-AD22 polyclonal



TO-PRO-3

Merge



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：先26指202

研究課題名：医師主導治験マラリアワクチンF I Hに向けた開発研究

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
該当なし			

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所
Epitope mapping of inhibitory antibodies targeting the loop region of Plasmodium falciparum enolase using synthetic peptide libraries.	Hiroyuki Oku, Risa Onishi, Utako Arai, Yudai Kimoto, Keiichi Yamada, Kazuhiko Yano, Shigevuki Kano	Joint International Tropical Medicine meeting 2014	Centara Grand & Bangkok Convention Centre at CentralWorld, Bangkok, Thailand

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
マラリアワクチン開発、治療効果も期待 国際医療センター、多国籍企業へ導出目指す	狩野繁之、助永義和	日刊薬業	じほう社
Govt-Backed Research Center Looks to License Malaria Vaccine to Mega Pharma	Kano S, Sukenaga Y	PHARMA JAPAN WEB	JIHO, Inc.

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)
該当なし			

※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。

研究発表及び特許取得報告について

年

年月
December, 2014

年月日
2015年2月18日
2015年2月27日

出願国