

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19394

研究課題名(和文) プリマキンに替わる抗マラリア自然免疫賦活化薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new immunostimulatory drug for non-haemolytic alternative to PQ.

研究代表者

吉田 栄人 (YOSHIDA, Shigeto)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：バキュロウイルス(BV)筋注により誘導された自然免疫応答が肝臓期マラリア原虫を排除していることをIFN- $\alpha$ RK0およびIFN-gRK0マウスを用いて解明した。プリマキンでは、感染24時間後の肝臓内原虫を排除することはできず、BV効果がプリマキンを上回っていることが明らかとなった。このメカニズムとして、BVが誘導する抗肝臓期マラリア原虫活性はIFN- $\alpha$ からのシグナル伝達による自然免疫応答メカニズムが大きく関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三日熱マラリアの根治治療に使用されている唯一の薬プリマキンは、多くの禁忌、副作用があり三日熱マラリアコントロールの障害となっている。BVが誘導する自然免疫応答が肝臓期マラリア原虫に対して強力な殺傷効果を発揮するメカニズムを一部解明できたことは、BVを利用したプリマキンに替わる新しいコンセプトの抗マラリア新薬の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Baculovirus (BV)-induced innate immunity completely kills liver-stage parasites using IFN- $\alpha$ RK0 and IFN-gRK0 mice. As primaquine (PQ) is the only licensed drug for the radical cure of *P. vivax* hypnozoites, we compared the elimination effects of BV with those of PQ. Treatment with PQ could not exclude liver-stage parasites. Treatment with BV proves to be more effective than PQ. BV effectively induces fast-acting innate immune responses that provide powerful first lines of both defensive and offensive attacks against pre-erythrocytic parasites. Our results illustrate the potential of BV as a new potent prophylactic and therapeutic immunostimulatory agent against pre-erythrocytic stage parasites.

研究分野：感染症、マラリア、治療薬

キーワード：三日熱マラリア プリマキン 自然免疫 バキュロウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトに感染するマラリア原虫のうち主に東南アジアで蔓延している三日熱マラリア原虫は、急性期(赤内期)にアルテミシニン(2015年ノーベル医学・生理学賞)による治療で発熱などの症状が改善するが、肝細胞中に原虫の休眠体(ヒプノゾイト 次頁図)が残存し、数カ月~数年の期間を経て80%が再発する。このマラリア再発は、マラリアの撲滅にとっての大きな障害となっている。ヒプノゾイトを排除できる唯一の薬剤であるプリマキンは、(i)G6PD欠損の人に投薬すると溶血性貧血を引き起こし死に至る場合がある。このため、マラリア検査と同時にG6PD活性スクリーニングが不可欠であり、活性を確認した後でない処方できない。(ii)発疹、悪心、嘔吐、腹痛といった副作用があり、大量投薬に適さない。さらに(iii)プリマキンによる根治療法(14日間)を行っても時に再発が見られ、プリマキン低感受性原虫の存在が懸念されている。このような禁忌、副作用、耐性原虫出現等々の問題点があるにもかかわらず、年間8千万人もの感染者に投薬されている。プリマキンに替わる薬剤の探索が長年続けられてきているが開発には至っていない。国内でも帰国した感染者(輸入マラリア)10人程度に毎年投薬されている。

マラリア感染は肝臓内で自然免疫応答を誘導する:

マラリア感染時において、宿主肝臓細胞がマラリア原虫RNAを認識し肝臓期原虫を一部殺傷する。MAVS (cytosolic RNA sensors) を介した自然免疫センサーが作動し、Type-I IFN 発現を誘導するメカニズムが提唱されている (Nat Med 2013)。しかし、それだけでは完全な排除には至らない。もし強力な自然免疫応答が誘導できれば完全排除も可能となると我々は考えている。

### 2. 研究の目的

プリマキンに替わる新しいコンセプトの抗マラリア薬の開発を提案する。バキュロウイルス(BV)が有する特殊なアジュバンド効果を研究する過程で、「BVを大腿部に筋注すると遠距離にある肝臓内のマラリア原虫に対して100%の強力な殺傷効果を発揮する」ことを見出した。BVが誘導する自然免疫応答が肝臓期マラリア原虫に対して強力な殺傷効果を発揮するメカニズムをDNAアレイ法およびKOマウスを駆使して解明する。さらに自然免疫応答の持続性を調べ、予防薬・治療薬の両機能を有する全く新規の「自然免疫賦活化薬」という新しいコンセプトでプリマキンを凌駕する抗マラリア新薬の開発を提案する。

### 3. 研究の方法

(A) 治療効果(感染→BV接種)プリマキンとの比較:

スポロゾイト1,000匹をマウス尾静脈に感染接種し、24 or 42時間後にBVを筋注接種する。42時間後は成熟したスポロゾイトが肝臓からメロゾイトとして飛び出してくる間際の時期で、45時間後には完全に赤内期に移行する。プリマキン(WHO推奨ドースの100倍)よりも治療効果があるのか?これをスメアのギムザ染色で感染の有無をモニターして検証する。コントロール群(非接種)では感染21日後までには全匹死亡する条件で感染実験を行う。

(B) 感染防御効果(BV接種→感染):

BVを筋注接種し、6時間後から27日まで各群で時間を変えてスポロゾイト1,000匹をマウス尾静脈に感染接種する。その後、スメアのギムザ染色で感染の有無をモニターする。BV接種後どのくらいの期間感染を防御できるのか?これにより自然免疫応答の持続性を明らかにする。下記(C)では、液性因子と肝臓内因子について作用効果を検討する。

(C) 自然免疫応答メカニズム解析:

①血清(液性因子)の解析: BVを筋注接種し、6時間後に血清を採取する。IFN-I, II型および各種炎症性サイトカイン量をELISAで測定する。さらにこの血清を別のスポロゾイト感染マウスに接種し、治療効果を調べる。BVにより誘導される液性因子には治療効果がある分子が含まれるのか?を検証する。

②肝臓内因子の解析: 感染24時間後はスポロゾイトが肝臓で猛烈に増殖している時期である。この時期にBVを筋注接種すると、完璧に原虫を殺傷することを確認している。このデータを拠り所に、肝臓からのメロゾイト排出までに残された時間は20時間しかない状況で、即効かつ強力な自然免疫応答が発動されると予想している。この自然免疫応答を解明するためにBVを筋注接種し、6時間後に肝臓を摘出してRNAを抽出し、DNAアレイ解析を行う。この解析から、筋注接種部位である大腿部で活性化した自然免疫応答が(i)どのような経路で肝臓にシグナルを送り、(ii)どんなエフェクター因子が肝臓期原虫を殺傷するのか?を予測する。

### 4. 研究成果

マウスに*P. berghei* スポロゾイト1,000匹を静脈に感染接種し、24 or 42時間後にバキュロウイルス(BV)を筋注接種したところ、24時間後では100%のマウスがマラリア発症から免れた。一方、42時間後ではすべてのマウスがマラリアを発症した。しかし、発症が大きく遅延していた。

つまり、BV 筋注により誘導された自然免疫応答が肝臓期マラリア原虫を排除していることが明らかとなった。プリマキン処理では、感染 24 時間後の肝臓内原虫を排除することはできなかった。BV 効果がプリマキンを上回っていることが明らかとなった。

BV 接種 6 時間後のマウスの血中には IFN- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  が分泌されていた。そこで、この 2 つのサイトカインに注目して BV 接種マウスの血清に抗 IFN- $\alpha$  抗体あるいは抗 IFN- $\gamma$  抗体を加えて中和した後に別の正常マウスに移入したところ、抗 IFN- $\alpha$  抗体処理では 100% のマウスがマラリア発症から免れ、抗 IFN- $\gamma$  抗体処理ではその程度は低下し発症遅延のみが確認された。IFN- $\alpha$  は IFN- $\gamma$  の上流に有り、別のエフェクター分子の発現にも重要であると考えられる。さらに、IFN- $\alpha$  あるいは IFN- $\gamma$  のレセプターをノックアウトしたマウスでのマラリア原虫感染実験を行ったところ前述の中和抗体と同様に、IFN- $\alpha$  レセプターノックアウトマウスではマラリア排除効果が消失した。IFN- $\gamma$  レセプターノックアウトでも排除効果が減少したが、依然として発症遅延効果は維持されていた。この結果より、BV が誘導する抗肝臓期マラリア原虫活性は IFN- $\alpha$  からのシグナル伝達による自然免疫応答メカニズムが大きく関与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshida K, Iyori M, Blagborough AM, Salman AM, Dulal P, Sala KA, Yamamoto DS, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Yoshii T, Yusuf Y, Tokoro M, Hill AVS, Yoshida S	4. 巻 8
2. 論文標題 Adenovirus-prime and baculovirus-boost heterologous immunization achieves sterile protection against malaria sporozoite challenge in a murine model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-21369-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Emran TB, Iyori M, Ono Y, Amelia F, Yusuf Y, Islam A, Alam A, Tamura M, Ogawa R, Matsuoka H, Yamamoto DS, Yoshida S	4. 巻 8
2. 論文標題 Baculovirus-induced fast-acting innate immunity kills liver-stage Plasmodium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Immunol	6. 最初と最後の頁 2441-2451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1800908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Amelia F, Iyori M, Emran TB, Yamamoto DS, Genshi K, Otsuka H, Onoue Y, Yusuf Y, Islam A, Yoshida S	4. 巻 e12624
2. 論文標題 Down-selecting circumsporozoite protein-based malaria vaccine: a comparison of malaria sporozoite challenge model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasit Immunol	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pim.12624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Islam A, Emran TB, Yamamoto DS, Iyori M, Amelia F, Yusuf Y, Yamaguchi R, Alam MS, Silveira H, Yoshida S	4. 巻 9
2. 論文標題 Anopheline antiplatelet protein from mosquito saliva regulates blood feeding behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39960-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Yoshida M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Alam A, Emran TB, Amelia F, Islam A, Otsuka H, Takashima E, Tsuboi T, Yoshida S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Adeno-associated virus as an effective malaria booster vaccine following adenovirus priming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.00730	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Emran TB, Amelia F, Islam A, Syafira I, Yoshida S	4. 巻 10
2. 論文標題 A Viral-Vectored Multi-Stage Malaria Vaccine Regimen With Protective and Transmission-Blocking Efficacies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 2412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Emran TB, Iyori M, Yoshida S
2. 発表標題 Baculovirus-induced innate immunity confers complete protection against Plasmodium pre-erythrocytic stage parasites
3. 学会等名 14th International congress of parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iyori M, Yoshida K, Yusuf Y, Emran TB, Yoshii T, Hashizume H, Shimada S, Yamamoto DS, Fukumoto S, Mizukami H, Yoshida S
2. 発表標題 Development of a novel malaria vaccine based on heterologous prime-boost immunization regimen using adenovirus and adeno-associated virus vectors
3. 学会等名 14th International congress of parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊従 光洋, Emran TB, 小野 祐希, 松岡 裕之, 山本 大介, 吉田 栄人
2. 発表標題 肝臓期マラリア原虫を完全排除可能な非感染性ウイルスベクターに関する研究
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山越 彩葉, 伊従 光洋, 堀 直人, Emran TB, 志田 壽利, 吉田 栄人.
2. 発表標題 組換えワクシニアウイルスLC16m8 を基盤としたマラリアワクチンの感染防御効果の検討 (II)
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下 陽夏, 伊従 光洋, 山口 莉理夏, Isram A, 吉井 達也, 吉田 栄人
2. 発表標題 感染症媒介蚊由来唾液タンパクの種間比較
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀 直人, 伊従 光洋, 吉田 邦嵩, Emran TB, 島田 聡, Islam A, 志田 壽利, 吉田 栄人
2. 発表標題 組換えワクシニアウイルスLC16m8 のマラリアワクチンとしての新規アプローチ
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 辻村 聡恵, 伊従 光洋, Emran TB, 吉井 達也, 吉田 栄人
2. 発表標題 強力な抗肝臓期マラリア原虫効果を発揮する自然免疫応答
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊従 光洋, Emran TB, 小野 祐希, 吉田 栄人
2. 発表標題 The impact of baculovirus-induced innate immunity on elimination of the liver-stage Plasmodium through interferon signaling.
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 栄人
2. 発表標題 ウイルスベクタープラットフォームを基盤とした乳児用次世代型マラリアワクチン
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iyori M, Amelia F, Genshi K, Onoue Y, Emran TB, Yoshida S,
2. 発表標題 Full-length Plasmodium falciparum circumsporozoite protein administrated with Imject Alum elicits complete protection in mice against the transgenic P. berghei sporozoites
3. 学会等名 PROTEIN ISLAND MATSUYAMA 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井谷慧、伊従光洋、辻村聡恵、吉田栄人
2. 発表標題 肝臓期マラリア原虫をバキュロウイルス投与で治療した後に誘導される獲得免疫応答の解析
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Yoshida S
2. 発表標題 A two-dose multi-stage malaria vaccine regimen elicits protection and blocks parasite transmission
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shahnaij M, Iyori M, Islam A, Syafira I, IYamagoshi I, Kajino M, Yoshida S
2. 発表標題 Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoite challenge
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shahnaij M, Iyori M, Islam A, Syafira I, IYamagoshi I, Kajino M, Yoshida S
2. 発表標題 Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoite challenge
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shahnaij M, Iyori M, Islam A, Syafira I, IYamagoshi I, Kajino M, Yoshida S
2. 発表標題 Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoite challenge
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 広夢、伊従光洋、吉田 栄人
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Islam A, Iyori M, Yamamoto DS, Tuno N, Yamaguchi R, Silveira H, Yoshida S
2. 発表標題 Anopheline anti-platelet protein (AAPP), a novel saliva protein, enables blood acquisition in Anopheles stephensi
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iyori M, Amelia F, Yusuf Y, Yamamoto DS, Fukumoto S, Yoshida K, Genshi K, Yoshii T, Mizukami H, Yoshida S
2. 発表標題 The mechanism of PfcSP-based malaria vaccines and its application to the viral vectored vaccine platform
3. 学会等名 17th International Congress of Immunology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田栄人
2. 発表標題 A viral-vectored multi-stage malaria vaccine regimen with protective and transmission-blocking efficacies
3. 学会等名 4th Global Conference and Expo on Vaccines Research & Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 マラリアワクチン	発明者 吉田 栄人、志田 壽利、伊従 光洋、 堀 直人、吉田 邦	権利者 国立大学法人金 沢大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-038100	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 マラリア治療剤、マラリア予防剤及び抗マラリア自然免疫賦活剤	発明者 吉田 栄人	権利者 国立大学法人金 沢大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-057311	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 組換えアデノ随伴ウイルスを含むマラリアワクチン	発明者 吉田 栄人、水上 浩 明、伊従 光洋、吉井 達也	権利者 国立大学法人金 沢大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-019247	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

