

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
分担研究者名 : 狩野繁之、安田加奈子、奥 浩之

キーワード : GMP、免疫、抗体価、モノクローナル抗体、エピトープマッピング、抗原局在、抗原ペプチド、分子設計、化学合成法

研究成果 :

(1) 抗原ペプチドの製造法の最適化

スケールアップ製造に対応するためのプロセス最適化、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。

(抗原 1) 1 つの Lys 残基によって 2 分岐した MAP と呼ばれるリジンデンドリマーに、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 と呼ばれるリジンデンドリマーに、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」として目的物を得た。

(2) Balb/c マウスを用いた免疫試験(抗原性の確認)

24 年度からの継続で、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種の構造は上記説明のとおり)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、新たに構造を変更した AD22 を作製し新たに免疫実験を開始した(この構造に関しては特許の申請中であるので本報告書では非開示とする)。

この結果、免疫後第4週目までのデータが本年度内に preliminary data として得られている。すべての4種の AD22 を基本構造とした微粒子で、生食投与の対照群に比べて高い抗体価を得ることができ、特に新型人工抗原 AD22new での免疫群で、第3週、第4週で投与前から統計学的に優位な抗体価の上昇が観察され、他の従来型を除く2種の構造をもつ微粒子よりも、ワクチンとしての抗原性の高さが示唆された。

(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ェルトに達したら、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。培養上清は硫酸安塩析(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プロテイン A カラムを用いて IgG を精製した。各クローン 200 ml 培養から 1~2mg の IgG を回収することができた。精製の確認は SDS-PAGE で行った。この作業はルーチン化できており現在順次抗体を増やし、ED50 算出試験の準備を行っている。作成されたモノクローナル抗体による原虫の増殖阻害試験は、26年度に行う予定である。

(4) AD22 ペプチドとプラスミノーゲンの結合性の解析

抗 AD22 抗体がどの様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、1 0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、Dot blot 法、ELISA 法で解析した。その結果プラスミノーゲンは、AD22 の(特許出願内容につき、配列は非開示)の10残基と結合することが判明した。この配列は分担研究者:駒木班が明らかにした抗 AD22 抗体のエピトープである8残基配列(特許出願内容につき、配列は非開示)を含む配列である。この様に 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唆された。

Subject No. : 24A113

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

Researchers: Shigeyuki Kano, Kanako Yasuda, Hiroyuki Oku

Key word : GMP, immunity, antibody titer, monoclonal antibody, epitope mapping, antigen localization, antigenic polypeptide, molecular designing, chemical structure

Abstract :

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 either "(AD22-map2cys)2" or "(AD22-map2cyspal)2".

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

The "(AD22-map2cys)2" and "(AD22-map2cyspal)2", were administered to Balb/c mice and the IgG titer levels were studied and compared with those by original AD22-map. Antibody titers kept increasing, and those increased titers of the immunized sera against new- and the original AD22-map at 4th week were significantly higher than the pre-immune sera. The tests are now undergoing up to 40-50 weeks.

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

According to the screening test in the last year, 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. Malaria parasite growth inhibition tests using these purified antibodies are currently undergoing.

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

It was reported recently that the enolase located on the surface of ookinete (mosquito-satage malaria parasite) was binding 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 recognized by the anti-AD22 antibody.

「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:狩野繁之)

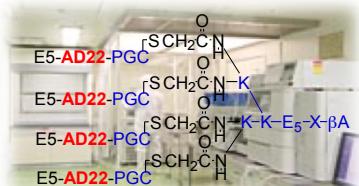
「GMP準拠マラリアエノラーゼワクチンの防御機能の解明」(分担研究者:狩野繁之)

「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:奥浩之)

「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:安田加奈子(駒木加奈子)

24年度研究達成状況

GMP基準抗原AD22newの化学合成



AD22

抗体治療薬の開発

*in vitro*培養原虫
増殖阻害試験

徐放性
微粒子

皮下投与



抗体価の変動観察

モノクローナル抗体産生
ハイブリドーマ作製

腹水回収

mAb大量調製

徐放性メカニズムの解析

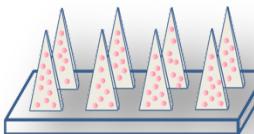
イメージアナライザー解析



ワクチン効果の再確認

25年度研究達成状況

マイクロニードルアレイの作成



平成26年度

抗体治療薬の開発

*in vitro*培養原虫
増殖阻害試験

徐放性
微粒子

皮下投与



抗体価の変動観察

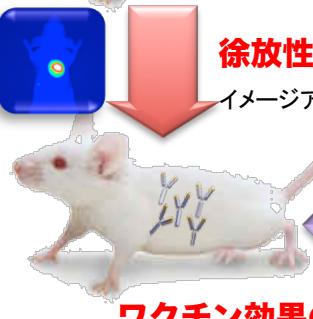
モノクローナル抗体産生
ハイブリドーマ作製

腹水回収

mAb大量調製

徐放性メカニズムの解析

イメージアナライザー解析



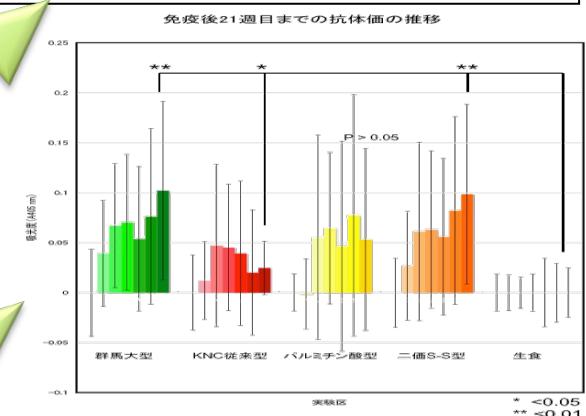
攻撃感染試験

皮下投与

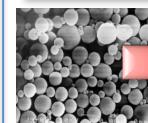
P. berghei

蛍光抗体法

- 11%~41%の増殖阻害活性を示す
クローニングが得られた。
- 抗体は原虫メロゾイドの表面に局在
原虫侵入阻害



26年度研究に先送り



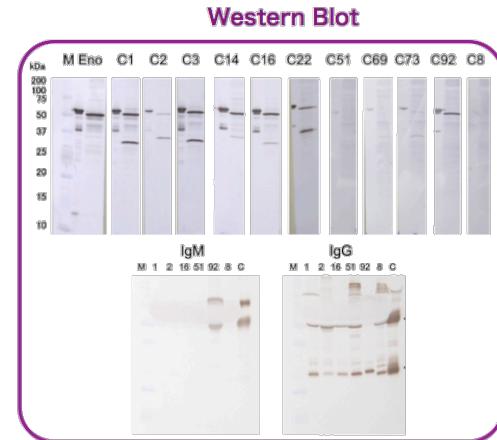
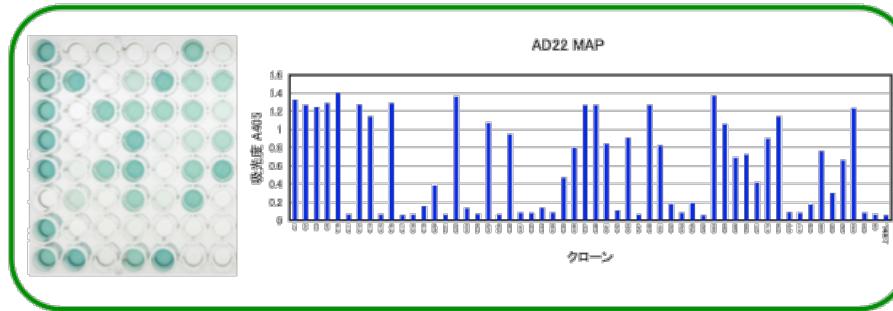
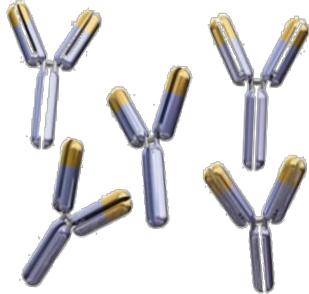
C57BL/6



脳マラリアに対する
ワクチン効果の確認

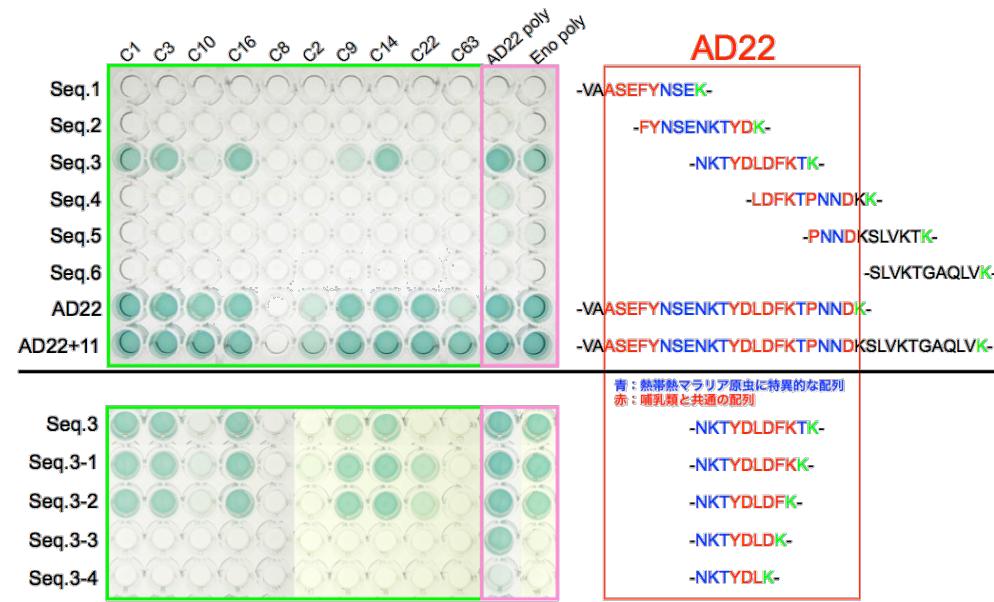
モノクローナル抗体の作成とスクリーニング

1stスクリーニングで得た54クローンから、10クローンを選抜。

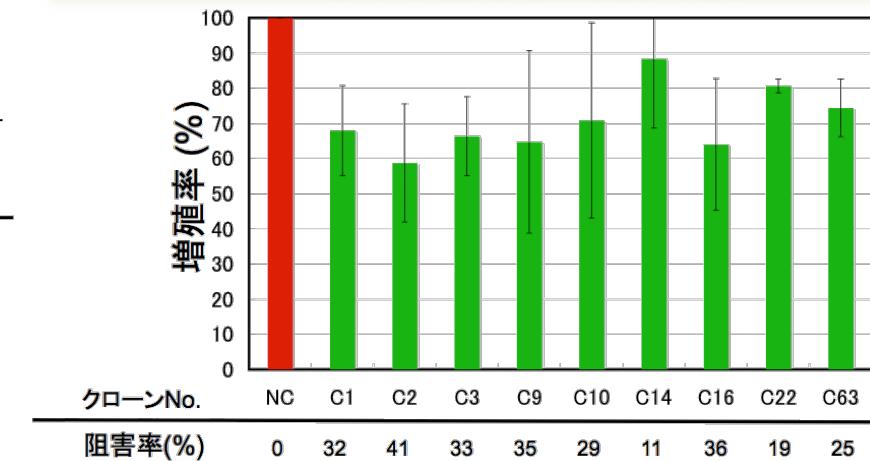


エピトープマッピング

6つのクローンが熱帯熱マラリア原虫に特異的な配列を含む8残基のペプチドに反応した。



In vitro 原虫増殖阻害試験



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
主任研究者名 : 狩野繁之
分担研究者名 : 狩野繁之

キーワード : GMP、免疫、抗体価

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。

そこで平成 25 年度は、以下の3つのテーマを計画し、①の免疫試験について成果を得た。

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。24 年度からの継続で、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、新たに構造を変更した AD22 を作製し新たに免疫実験を開始した(この構造に関しては特許の申請中であるので本報告書では非開示とする)。

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。今後新型人工抗原 AD22new 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 26 年度も継続して行う。(なお本研究全体で用いる人工抗原 AD22new 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。)

この結果、免疫後第4週目までのデータが本年度内に preliminary data として得られている。すべての4種の AD22 を基本構造とした微粒子で、生食投与の対照群に比べて高い抗体価を得ることができ、特に新型人工抗原 AD22new での免疫群で、第3週、第4週で投与前から統計学的に優位な抗体価の上昇が観察され、他の従来型を除く2種の構造をもつ微粒子よりも、ワクチンとしての抗原性の高さが示唆された。

以下の②、③は当初は25年度に予定していたが、上記①がワクチン開発の医師主導治験へ向けての最優先事項となったので、これに傾注して研究を進めたため、②、③は26年度に送って行うこととした。

② Plasmodium berghei ANKA 株原虫(*P.b.* ANKA)による攻撃感染試験

人工抗原 AD22new を Balb/c マウスに接種し、特異抗体を上昇させたのち、ローデントマラリア *P.b.* ANKA 原虫による攻撃感染試験(Challenge infection)を行う。寄生率の変動測定、体重の変動測定、生存率等を調査し、対象区と比較を行いワクチン効果の判定とその詳細な記載を目標とする。なおワクチン効果は世界のマラリアワクチン開発研究とデータを揃えるために、1)寄生率を抑えること、2)症状を抑えること、3)死亡を抑えることの3点を指標とする。これらの成果から人工抗原 AD22new のワクチン効果確認を目標とする。

③ 人工抗原の皮下投与後の動態解析

接種後の微粒子抗原の皮下分布と変動を調べるために FITC や Hilite Fluor647 で標識した微粒子抗原を作成する(分担研究者: 奥浩之)。ヌードマウスに蛍光ラベルした微粒子を投与を行い *in vivo* イメージアナライザーで分布変動を経時的に観察する。また皮下組織の変動や免疫細胞の分布等調べるため、マウス皮膚組織やリンパ節等を採取し顕微鏡観察を行う。生体内での微粒子の動向を観察結果から、なぜ長期的に抗体価が持続するのか、生体内での徐放メカニズムの解明を目標とする。

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

主任研究者名 : 狩野繁之

分担研究者名 : 安田加奈子(駒木加奈子)

キーワード : モノクローナル抗体、エピトープマッピング、抗原局在

研究成果 :

平成 25 年度は、モノクローナル抗体の大量精製と ED50 の算出と治療効果判定試験、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を達成目標とした。進捗状況は以下に記載する。

① 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ェルトに達したら、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プロテイン A カラムを用いて IgG を精製した。各クローン 200 ml 培養から 1~2mg の IgG を回収することができた。精製の確認は SDS-PAGE で行った。この作業はルーチン化できており現在順次抗体を増やし、ED50 算出試験の準備を行っている。なお当初予定であったヌードマウスにハイブリドーマを投与して IgG を大量に回収する方法は、動物実験の倫理上の問題から行わなかった。(26 年度も継続)

② 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、着手できなかった。

③ 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 抗体がどの様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。その結果プラスミノーゲンは、AD22 の(特許出願内容につき、配列は非開示)の 10 残基と結合することが判明した。この配列は分担研究者: 駒木班が明らかにした抗 AD22 抗体のエピトープである 8 残基配列(特許出願内容につき、配列は非開示)を含む配列である。この様に 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。(26 年度も継続)

課題番号 : 24指113

研究課題名 : 热帶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

主任研究者名 : 狩野繁之

分担研究者名 : 奥 浩之

キーワード : 抗原ペプチド、分子設計、化学合成法、GMP

研究成果 : 平成25年度は下記2点の研究を中心に行った。

(1) 抗原ペプチドの製造法の最適化

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て研究を開始した。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50-100mgスケールの2種類)。さらに免疫投与によって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(500-1,000mgスケール、1 dose 50ugとして10,000-20,000dose分に相当)の製造に対応できることが明らかとなった。

a) 抗原分子

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、本研究においても工夫されている。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されている。

(抗原1) 1つのLys残基によって2分岐したMAPと呼ばれるリジンデンドリマーに、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。

(抗原2) 1つのLys残基によって2分岐したMAPと呼ばれるリジンデンドリマーに、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。

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「リジンデンドリマー」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取HPLC装置により目的物の精製を行った。

c) 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 HClaq. (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 HClaq. (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 %

(2) 投与方法と製剤に関する研究

より免疫効果の高い投与方法を目指して皮内投与用の金属製マイクロニードルの検討とマイクロニードル投与に適した1μm以下の粒径を持つナノ微粒子製剤の作成に成功した。

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
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	2014年1月

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
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
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
LAMP法を用いた三日熱マラリア患者の鑑別診 断 : フィリピンでの実例	矢野和彦、石上 盛敏、奥浩之、 Elena A. Villacorte、 Pilarita T. Rivera、狩野繁 之	第24回日本臨床寄生 虫学会	東大寺総合文化セ ンター 金鐘ホー ル 奈良市	2013年6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
該当なし				

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
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
(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)

※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。