

離株を 13 種に分類できた。これらの結果と伝搬阻止活性を比較すると、Pvs25、Pvs28 いずれに対する抗血清もどのように変異があっても強い伝搬阻止活性を示した。以上の結果より、Sal I 株由来の組換え Pvs25 及び Pvs28 は、抗原変異をさほど考慮する必要がなく、有望な三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補と考えられた。

#### D. 結論

組み換え yPvs25 および yPvs28 をワクチン抗原として作成した抗血清は抗原変異の有無に関わらず流行地の三日熱マラリア原虫の媒介蚊体内での発育を阻害することが示され、yPvs25 および yPvs28 が伝搬阻止ワクチンの抗原として有望であることが明らかとなった。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shirano M, Tsuboi T, Kaneko O, Tachibana M, Adams JH, Torii M. Conserved regions of the *Plasmodium yoelii* rhoptry protein RhopH3 revealed by comparison with the *P. falciparum* homologue. Mol. Biochem. Parasitol. 112: 297-299, 2001.
- 2) Tachibana M, Tsuboi T, Templeton TJ, Kaneko O, Torii M. Presence of three distinct ookinete surface protein genes, Pos25, Pos28-1, and Pos28-2, in *Plasmodium ovale*. Mol. Biochem. Parasitol. 113: 341-344, 2001.
- 3) Yuda M, Yano K, Tsuboi T, Torii M, Chinzei Y. von Willebrand Factor A Domain-related Protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 116: 65-72, 2001.
- 4) Suwanabun N, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Maneechai N, Rachapaew N, Yim-amnuaychok N, Punkitchar V, Coleman RE. Development of a method for the in vitro production of *Plasmodium vivax* ookinetes. J. Parasitol. 87, 928-930, 2001.
- 5) Kaneko O, Tsuboi T, Ling IT, Howell S, Shirano M, Tachibana M, Cao YM, Holder AA, Torii M. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the clag multigene family in *Plasmodium falciparum* and *P. yoelii*. Mol. Biochem. Parasitol. 118: 237-245, 2001.
- 6) Kaneko O, Mu J, Tsuboi T, Su X, Torii M. Gene structure and expression of a

- Plasmodium falciparum* 220-kilodalton protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins.  
Mol. Biochem. Parasitol. In press.
2. 学会発表
- 1) Tsuboi T, Sattabongkot J, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Saul A.  
*Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccine development: Efficacy study on human isolates from Thailand.  
Thirty-sixth joint conference on parasitic diseases. U.S.-Japan cooperative medical science program. Bethesda, MD USA July 23-24, 2001.
  - 2) Tachibana M, Tsuboi T, Kaneko O, Khuntirat B, Torii M.  
Sequence polymorphism in three distinct ookinete surface proteins in two types of *Plasmodium ovale* defined by SSU rRNA sequence.  
ASTMH 50th annual meeting, Atlanta, Georgia, USA, 2001. 11. 11-15
  - 3) Kaneko O, Tsuboi T, Shirano M, Tachibana M, Ling IT, Howell S, Cao YM, Otsuki H, Holder AA, Torii M.  
The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is coded by members of the clag multigene family in *Plasmodium falciparum* and *P. yoelii*.  
ASTMH 50th annual meeting, Atlanta, Georgia, USA, 2001. 11. 11-15.
  - 4) Tsuboi T, Sattabongkot J, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Saul A.  
Malaria transmission-blocking vaccines: current progress of vaccine development against *Plasmodium vivax*.  
ASTMH 50th annual meeting, Atlanta, Georgia, USA, 2001. 11. 11-1.
  - 5) Li F, Templeton TJ, Tsuboi T, Torii M, Vinetz JM.  
Antibodies to the *Plasmodium* ookinete micronemal protein CTRP reduce infectivity to mosquitoes.  
ASTMH 50th annual meeting, Atlanta, Georgia, USA, 2001. 11. 11-15.
  - 6) Tsuboi T, Sattabongkot J, Hisaeda H, Stowers A, Torii M, Saul A.  
Transmission-blocking vaccine development of *vivax* malaria.  
Vivax Malaria Research: 2002 And Beyond, Bangkok, Thailand, 2002. 2. 3-8.
  - 7) 坪井敬文, Sattabongkot J, 久枝一, 橘真由美, 鳥居本美.  
三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンの流行地における効果判定.  
第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会, 山形, 2001. 4.
  - 8) 金子修, Fidogk DA, 鳥居本美, Miller LH.

ポジショナルクローニングによって見出された熱帯熱マラリア原虫の新規赤血球侵入関連分子.

第 70 回日本寄生虫学会, 山形, 2001.4.

- 9) 橘真由美, 坪井敬文, 油田正夫, Rungruang T, 鎮西康雄, Venetz JM, 鳥居本美.

マラリア原虫オーキネートにおけるマイクロネーム蛋白の局在と細胞内移行.

第 70 回日本寄生虫学会, 山形, 2001.4.

- 10) 坪井敬文, Sattabongkot J, 久枝一, 橘真由美, 鳥居本美.

三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンの流行地における効果判定.

第 42 回日本熱帯医学会大会/日本熱帯医学会雑誌 29(増):210 2001.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない

マラリアの病態疫学、流行予測及び感染動向に関する研究

分担研究者 姫野 國祐 九州大学大学院医学研究院教授

研究要旨

異なったマラリア流行地で普遍的に通用する DNA ワクチンの開発を行った。

A. 研究目的

- ① マラリアワクチン候補蛋白である MSP-1 及び CSP をコードする遺伝子を用いワクチン蛋白のユビキチン化、抗原提示細胞のリガンド・調節性因子 (CTLA-4, L-selectin, FcγR3L) 熱ショック蛋白質 (HSP60, HSP70, gp96) との融合化による任意の免疫応答方向付けがマラリア 感染防御に及ぼす影響を分子生物学的及び免疫学的手法を用いて明らかにしマラリア感染に対する有効な DNA ワクチネーション法を確立する。
- ② DNA 免疫法の発展に伴いワクチン候補抗原の同定として発現ライブラリー免疫法という手法が開発された。このシステムを用いることによりマラリア原虫遺伝子ライブラリーからワクチン抗原遺伝子の検索を行い新たなワクチン遺伝子の同定を行う。

B. 研究方法

(1) ワクチンベクターの構築

Merozoite surface protein-1 (MSP-1) 及び Circumsporozoite protein (CSP) はそれぞれメロゾイト期及び肝臓期のマラリア原虫が発現するワクチン抗原である。これら蛋白をコードする遺伝子を用い以下のベクターを構築する。

- ① これまで DNA ワクチンによる免疫誘導では抗原提示細胞の樹状細胞が重要な役割を果たしていた事が明らかにされている。そこで樹状細胞のリガンド分子 (CTLA-4, L-selectin) または分化調節性因子 (FcγR3L) と MSP-1/CSP の融合蛋白を発現するワクチンベクターを構築する。
- ② 近年クロスプライミングという抗原提示構築で外来性抗原でも CD8<sup>+</sup> 細胞の誘導が可能であり、そこで主役を成すものは熱ショック蛋白質 (HSP) であることが明らかになった。また HSP 自体にもアジュバント作用があり、特殊のアジュバントを用いなくても抗原性を保持し免疫惹起効果が高いことが報告されている。そこで HSP-60, HSP-70, gp96 と MSP-1/CSP の融合ベクターを構築する。

(2) 遺伝子銃を用いたネズミマラリア感染系を用いた DNA ワクチネーション

マラリア感染防御に係わる免疫応答は MHC class I 依存性 (CD8<sup>+</sup> 細胞) 及び MHC class II 依存性 (CD4<sup>+</sup> 細胞) および抗体依存性 (B 細胞) の 3 つに大別できる。効果的なマラリア感染防御免疫を誘導する上でこれら免疫応答のバランス制御がキープポイントである。マラリア DNA ワクチンにより惹起される免疫応答を増強あるいは任意の方向へ誘導するために上記の構築した融合蛋白発現ベクターを遺伝子銃を用いてマウスにワクチネーションを施し DNA 免疫後の MSP-1/CSP に対する抗体価の推移、T 細胞の応答性及びマラリア致死感染に対する防御効果について免疫学

的な観点から非融合 DNA ワクチンとの検討を行う。さらにそのエフェクター防御機構を明らかにするため、免疫マウスへの抗体投与 (抗 CD4, 抗 CD8, 抗 NK, 抗 IFN-γ) 実験 in vitro 及び in vivo におけるサイトカイン (IFN-γ, IL-4, IL-10, TGF-β) 産生パターンについて検討を行う。

以上の DNA ワクチネーションにより惹起される MSP-1 及び CSP に対する免疫応答誘導の方向づけと防御効果との関連を検討し、それぞれのマラリアの感染ステージ (赤内期又は肝臓期) に対して最も有効なワクチン効果を発揮する融合 DNA ワクチンの方法論を確立する。

C. 研究結果及び考察

マウスマラリア原虫である *Pyoelii* を用いた感染系を用いて、*Pyoelii* 由来の MSP-1 遺伝子を用いて DNA ワクチンを行った。この原虫感染に対しては MSP-1 遺伝子と IL-12 遺伝子のコンビネーション DNA ワクチン法が最も効果的で強い防御免疫を誘導した。この原虫に対してはユビキチン遺伝子等とのフュージョン DNA はそれ程効果的ではなかった。このため、MSP-1 の改造および MSP-3 遺伝子の新しい遺伝子の構築を進めている。また IL-12 遺伝子単独でもワクチン効果は得られなかった。今後さらに抗原遺伝子および DNA ワクチン法を確立していく。

D. 結論

細胞内寄生性原虫のエスケープ機構の相異に対応した DNA ワクチン法の確立が我々の大きな課題であり、またこのような法則性の確立はワクチン開発のうえで急務である。

E. 研究発表

1. CD4<sup>+</sup> T cells are required for HSP65 expression in host macrophages and for protection of mice infected with *Plasmodium yoelii*.  
Zhang, M., Hisaeda, H., Sakai, T., Li, Y., Ishikawa, H., Hao, Y., Nakano, Y., Ito, Y., and Himeno, K.  
(2001) *Parasitology International* 50(3):201-209
2. Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal *Plasmodium yoelii*, in A/J mice.  
Sakai, T., Hisaeda, H., Nakano, Y., Zhang, T., Takashima, M., Ishii, K., Maekawa, Y., Matsumoto, S., Nitta, Y., Miyazaki, J., and Himeno, K.  
(2002) *Infect Immun*, in press.
3. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malarial.  
Zhang, M., Hisaeda, H., Kano, S., Matsumoto, Y., Hao, Y., Locaresuwan, S., Aikawa, M., and Himeno, K.  
(2001) *Microbes and Infection*, 3(5):363-367

## 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Lin, Q., Katakura, K., Oue, M., Kano, S. and Suzuki, M. Effects of minocycline against mefloquine-, chloroquine- and pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 343-348 (2001)
2. Inaba, H., Ohmae, H., Kano, S., Faarado, L., Boaz, L., Leafasia, J. and Suzuki, M. Variation of incubation time in an *in vitro* drug susceptibility test of *Plasmodium falciparum* isolates studied in the Solomon islands. *Parasitol. Int.*, 50: 9-13 (2001).
3. 池ノ上望、佐藤久美子、鈴木 守、増田剛太、狩野繁之 マラリア患者血中クロロキン濃度の簡便な測定系の構築 日本臨床寄生虫学会誌 12: 139-141 (2001)
4. Lin, Q., Katakura, K. and Suzuki, M. Inhibition of mitochondrial and plastid activity of *Plasmodium falciparum* by minocycline. *FEBS Lett.*, in press (2002).
5. Nonaka, R., Oku, H., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis of small domain peptides of glycolytic enzyme enolase. In: *Peptide Science 2000*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2001; pp 301-304 (2001).
6. Abe, N., Oku, H., Yamada, K. and Katakai, R. Synthesis and conformational analysis of model peptides containing a metal binding site of plastocyanine. In: *Peptide Science 2000*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2001; pp 289-292 (2001).
7. Ishiguro, T., Oku, H., Yamada, K., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis of a peptide having partial sequence of enolase. In: *Peptide Science 2000*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2001; pp 293-296 (2001).
8. Yasuno, K., Oku, H., Yamada, K. and Katakai, R. Synthesis and conformational analysis of depsipeptides containing  $\alpha$ -hydroxyisobutyric acid. In: *Peptide Science 2000*, T. Shioiri ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2001; pp 297-300 (2001).
9. Ohyama, T., Oku, H., Yoshida, M. and Katakai, R. Crystal structure of a depsipeptide, Boc-(Leu-Leu-Lac)<sub>3</sub>-Leu-Leu-OEt. *Biopolymers*, 58: 636-642 (2001).
10. Tasaka, S., Ohmori, H., Gomi, N., Iino, M., Machida, T., Kiue, A., Naito, S. and Kuwano, M. Synthesis and structure-activity analysis of novel dihydropyridine derivatives to overcome multidrug resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11: 275-277 (2001).

11. Kawakami, A., Miyamoto, T., Higuchi, R., Uchiumi, T., Kuwano, M. and Van Soest, R. W. M. Structure of a novel multidrug resistance modulator, irciniasulfonic acid, isolated from a marine sponge, *Ircinia* sp. *Tetrahedron Lett.*, 42: 3335-3337 (2001)
12. Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G. L., Uchiumi, T. and Kuwano, M. Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 1-9 (2001).
13. Nagayama, J., Iino, M., Tada, Y., Kusaba, H., Kiue, A., Ohshima, K., Kuwano, M. and Wada, M. Retrovirus insertion and transcriptional activation of the multidrug-resistance gene in leukemias treated by a chemotherapeutic agent in vivo. *Blood*, 97: 759-766 (2001).
14. Izumi, H., Imamura, T., Nagatani, G., Ise, T., Murakami, T., Uramoto, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Nomoto, M., Okamoto, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Funa, K. and Kohno, K. Y-box binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.*, 29: 1200-1207 (2001).
15. Hinoshita, E., Taguchi, K., Inokuchi, A., Uchiumi, T., Kinukawa, N., Shimada, M., Tsuneyoshi, M., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 35: 765-773 (2001)
16. Harris, M. J., Kuwano, M., Webb, M. and Board, P. G. Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/cMOAT). *J. Biol. Chem.*, 276: 20876-20881 (2001).
17. Shibahara, K., Sugio, K., Osaki, T., Uchiumi, T., Maehara, Y., Kohno, K., Yasumoto, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 7: 3151-3155 (2001).
18. Inokuchi, A., Hinoshita, E., Iwamoto, Y., Kohno, K., Kuwano, M. and Uchiumi, T. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes: a transcriptional control of a plausible bile acid transporter. *J. Biol. Chem.*, 276: 46822-46829 (2001).
19. Goto, H., Kohno, K., Sone, S., Akiyama, S., Kuwano, M. and Ono, M. Interferon  $\gamma$ -dependent induction of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial growth factor through  $\gamma$ -activated sequence-like element in human macrophages. *Cancer Res.*,

- 61: 469-473 (2001).
20. Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T. and Ono, M. Angiogenesis factors. *Int. Med.*, 40: 565-572 (2001).
  21. Migita, T., Oda, Y., Naito, S., Morikawa, W., Kuwano, M. and Tsuneyoshi, M. The accumulation of angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2750-2756 (2001).
  22. Okamoto, M., Ono, M., Uchiumi, T., Ueno, H., Kohno, K., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor b in human cancer cells-transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim. Biophys. Acta.*, in press (2002).
  23. Hirata, T., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. ZD1839 ('Iressa') induces antiangiogenic effects through inhibition of EGFR tyrosine kinase. *Cancer Res.*, in press (2002).
  24. Itokawa, T., Nokihara, H., Nishioka, Y., Sone, S., Iwamoto, Y., Yamada, Y., Cherrington, J., McMahon, G., Shibuya, M., Kuwano, M. and Ono, M. Antiangiogenic effect by SU5416 is partly due to inhibition of Flt-1 receptor signaling. *Mol. Cancer Therapeutics*, in press (2002).
  25. Shirano, M., Tsuboi, T., Kaneko, O., Tachibana, M., Adams, J. H. and Torii, M. Conserved regions of the *Plasmodium yoelii* rhoptry protein RhopH3 revealed by comparison with the *P. falciparum* homologue. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 112: 297-299 (2001).
  26. Tachibana, M., Tsuboi, T., Templeton, T. J., Kaneko, O. and Torii, M. Presence of three distinct ookinete surface protein genes, Pos25, Pos28-1, and Pos28-2, in *Plasmodium ovale*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 113: 341-344 (2001).
  27. Yuda, M., Yano, K., Tsuboi, T., Torii, M. and Chinzei, Y. von Willebrand factor A domain-related protein, a novel microneme protein of the malaria ookinete highly conserved throughout *Plasmodium* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 116: 65-72 (2001).
  28. Kaneko, O., Tsuboi, T., Ling, I.T., Howell, S., Shirano, M., Tachibana, M., Cao, Y. M., Holder, A. A. and Torii, M. The high molecular mass rhoptry protein, RhopH1, is encoded by members of the *clag* multigene family in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 118: 223-231 (2001).

29. Suwanabun, N., Sattabongkot, J., Tsuboi, T., Torii, M., Maneechai, N., Rachapaew, N., Yim-amnuaychok, N., Punkitchar V. and Coleman, R. E. Development of a method for the in vitro production of *Plasmodium vivax* ookinetes. J. Parasitol., 87: 928-930 (2001).
30. Kaneko, O., Mu, J., Tsuboi, T., Su, X. and Torii, M. Gene structure and expression of a *Plasmodium falciparum* 220-kilodalton protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins. Mol. Biochem. Parasitol., in press.
31. Zhang, M., Hisaeda, H., Sakai, T., Li, Y., Ishikawa, H., Hao, Y. P., Nakano, Y., Ito, Y. and Himeno, K. CD4<sup>+</sup> T cells are required for HSP65 expression in host macrophages and for protection of mice infected with *Plasmodium yoelii*. Parasitol. Int., 50: 201-209 (2001).
32. Zhang, M., Hisaeda, H., Kano, S., Matsumoto, Y., Hao, Y. P., Looaresuwan, S., Aikawa, M. and Himeno, K. Antibodies specific for heat shock proteins in human and murine malaria. Microbes Infect., 3: 363-367 (2001).
33. Sakai, T., Hisaeda, H., Nakano, Y., Zhang T., Takashima, M., Ishii, K., Maekawa, Y., Matsumoto, S., Nitta, Y., Miyazaki, J. and Himeno, K. Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal *Plasmodium yoelii*, in A/J mice. Infect. Immun., in press.



20010707

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。