

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発事業 e-ASIA 共同研究プログラム  
(英語) International Collaborative Research Program  
The e-ASIA Joint Research Program (e-ASIA JRP)

研究開発課題名：(日本語) マラリアワクチン候補分子トランスアミダーゼ様分子のヒトマラリアでの抗原性および遺伝子多様性の解析  
(英語) Antigenicity to humans and gene polymorphism of the new malaria vaccine candidate, TAM (Trans-amidase like molecule) of Asian malaria.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野 教授  
平山 謙二

所属 役職 氏名：(英語) Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN),  
Nagasaki University, Professor, Kenji Hirayama

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

本研究課題の2年目であった平成28年度は、サンプル収集や解析についての各種準備が順調に進展した。まず、研究全体に関連する事項としては、RITM (フィリピン) に続いて長崎大熱帯医学研究所も、研究計画について倫理委員会への申請を行い、承認を得た。ただし、この承認は、現時点での研究計画に対してのものであるため、計画の更新や変更が行われた際には、改めて倫理審査を受ける必要がある。また、血液サンプル収集及びサンプルを用いた実験を行う拠点として設置する長崎大学-RITM 合同実験室についても準備が進み、パラワン島の Provincial Health Office (PHO)の実験室準備を RITM が、機器の準備・発送を長崎大学が行った。

また、本研究課題の3つの柱である1. TAM を含むマラリアワクチン候補抗原の多型性情報収集、2. 住民の抗原特異的な免疫応答の指標となる *ex vivo* 実験系の確立、3. 研究協力ネットワークの構築、のそれぞれについても、以下のような進展が認められた。

1. TAM を含むマラリアワクチン候補抗原の多型性情報収集：前年度に実施を決定したマラリア抗原及び HLA など宿主因子の次世代シーケンス(Next Generation Sequencing: NGS)を用いた解析

に関連して、解析対象の遺伝子それぞれに対する PCR プライマーなど実験条件の最適化を行った。また、シーケンシングにより得られたデータの解析方法最適化のため、東京医科歯科大学難治疾患研究所と協力して検討を行うとともに、先方に大学院生を派遣し、必要な解析方法について研修を受けさせた。これらの設定条件を用いて、パラワン島で収集され RITM に保管されている既存マラリア患者血液 DNA サンプルの解析を近日中に行う予定である。この解析により、設定が適切であるか検証される予定である。

**2. 住民の抗原特異的な免疫応答の指標となる *ex vivo* 実験系の確立：**これまで困難であった TAM などマラリア抗原リコンビナントタンパク質の可溶化状態での精製に成功した。これにより、今後の実験に十分な量の精製可溶性抗原タンパク質を準備することができた。また、これに続いて、リコンビナント抗原タンパク質を用いた ELISA 及び ELISPOT の実験条件最適化も実施した。

**3. 研究協力ネットワークの構築：**期間中を通して継続的にメールや Skype による交流を行っていたが、特に 2～3 月の 2 か月間は、互いの研究施設を訪れての意見交換・トレーニング等が頻繁に行われた。2 月には、長崎大学のグループが DSMRC (ミャンマー) を訪問し、合同ミーティングで今後の共同研究方針について話し合った。また、合意に時間のかかっていた MOU の内容についても、この訪問での話し合いが元になり、最終的に合意することができた。3 月には、長崎大学と RITM からそれぞれ 1 名が、ともにパラワン島に準備中の合同実験室を訪問し、その準備状況を確認するとともに、使用方法などについて協議した。またその翌週には、RITM のグループが、長崎大学にて ELISA、ELISPOT 及び NGS のトレーニングを受けた。その滞在に合わせたミーティングでは、互いの施設での準備状況の確認、及び、サンプル収集など今後の方針について意見交換を行った。

ここまで慎重に各種準備を積み重ねた結果、次年度には、既存サンプルを用いた NGS 解析など、患者サンプルを用いた実験及びその解析を行うことが可能な状態にまで至ることができた。

## 英文

As a result of FY2016, the second year of this research project, various preparations for sample collection and analysis have progressed steadily. First, related to the whole research, following the RITM (Philippines), Nagasaki University, NEKKEN (Japan) applied for research plan to the ethics committee and which was approved. Since this approval is based on the current research plan, it is necessary to ask an ethics review again when the plan is updated or changed. In addition, the preparation of Nagasaki University - RITM joint laboratory, which will be the base of sample collection and experiment, also progressed. RITM are preparing laboratory in Provincial Health Office (PHO) on Palawan Island, Nagasaki University prepared and shipped equipment.

Our scopes in the study, 1. Polymorphism analysis of malaria vaccine candidate antigens including TAM, 2. Establishment of an *ex vivo* experimental system to examine the antigen-specific immune response, 3. Development of research collaboration network, also progressed as described below.

1. Polymorphism analysis of malaria vaccine candidate antigens including TAM: For the genetic analysis of malaria antigen and host factors such as HLA by Next Generation Sequencing (NGS), the experimental conditions such as PCR primers for each gene were optimized. In order to optimize the analytical method of data obtained by the sequencing, we examined the systems with research group of Tokyo Medical and Dental University Medical Research Institute and sent a PhD student to acquire enough technique and knowledge for the analysis. Using these setting conditions, we will analyze blood DNA samples of malaria patients in Palawan Island already stored in RITM. By this analysis, it will be verified that the settings are appropriate.

2. Establishment of an *ex vivo* experimental system to examine the antigen-specific immune response: Purification

method for malaria antigen such as TAM recombinant proteins in soluble condition which was difficult to see until now, were confirmed. As a result, a sufficient amount of purified soluble antigen proteins prepared for future experiments. Following this, ELISA and ELISPOT, using recombinant antigen proteins, experimental condition were optimized.

3. Development of research collaboration network: During the period, we have been continuously contacted by e-mail or Skype, especially in February and March 2017, frequent exchange of opinions and training by visiting were done. In February, Nagasaki University visited DSMRC (Myanmar) and discussed about our collaboration in the joint meeting. Also, regarding the MOU between us that took time, this visit led us to the agreement afterwards. In March, each representative from Nagasaki University and RITM visited a Palawan Island, and confirmed the current status of preparations for the joint laboratory and discussed how to utilize it. In the following week, the research group of RITM received training on ELISA, ELISPOT and NGS in Nagasaki University. We also organized meetings in accordance with their stay and exchanged opinions on the preparations in each institute and future plan on sample collection.

Careful preparation of various setting in these two years will bring us to the experiments and analysis with patient sample, like NGS analysis using existing samples, in FY2017.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）  
なし。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表  
なし。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし。

(4) 特許出願  
なし。