

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
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推進事業
社会システム改革と研究開発の一体的推進を行う健康・医療関連プログラム
(英語) International Collaborative Research Program: Program for Integrated
Promotion of Social System Reform and Research and Development

補助事業課題名 : (日本語) ウガンダにおけるマラリアワクチンの臨床研究拠点形成
(英語) Development and sustainability of Malaria Vaccine Clinical Research Center

補助事業担当者 (日本語) 微生物病研究所 教授 堀井俊宏
所属 役職 氏名 : (英語) Research Institute for Microbial Diseases, Professor, Toshihiro Horii

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

補助分担当者 (日本語) プロテオサイエンスセンター 教授 坪井敬文
所属 役職 氏名 : (英語) Proteo-Science Center, Professor, Takafumi Tsuboi

補助分担当者 (日本語) 群馬大学大学院医学系研究科 教授 久枝 一
所属 役職 氏名 : (英語) Hajime HISAEDA Professor Graduate School of Medicine, Gunma University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

マラリアは熱帯・亜熱帯地域において毎年 1~5 億人が罹患し、約 50 万人が死に至っている感染症である。本研究ではマラリア対策の切り札と呼ばれるマラリアワクチンの臨床開発、薬剤耐性原虫の出現監視、及び、新たな診断法の実用開発を目的として活動してきた。

1-1 BK-SE36 マラリアワクチン臨床開発 : BK-SE36 マラリアワクチンは熱帯熱マラリア原虫 SERA5 の N 末端領域に由来する SE36 抗原と水酸化アルミニウムゲルを混合した凍結乾燥製剤である。6-20 歳を対象としたウガンダにおける臨床研究の結果、BK-SE36 ワクチン接種により、1 年間で 72% の発症防御効果が得られた (2010-2012)。2015 年からはブルキナファソにおける 1-5 歳児を対象とした Phase Ib 臨床試験を EVI (ヨーロッパ・ワクチン・イニシアチブ)、および、CNRFP (ブルキナファソ国立マラリア研究所) とともに開始した。治験は二重盲検で実施し、2017 年 9 月に最終報告書が提出されるまではコードブレイクはされないため、抗体価の上昇およびマラリア感染防御効果についての詳細は不明であるが、重篤な副作用は報告がなく 12-24 ヶ月の幼児においても安全であると予想される。また、非メチル化 CpG 配列を持つ一本鎖オリゴ DNA アジュ

バント (CpG-K3) と BK-SE36 を組み合わせ、国内における第 1a 相臨床試験を実施した。その結果、安全性が確認されるとともに、半量と全量の両群で誘導抗体価の平均値は BK-SE36 の約 4 倍に上昇した。一方、SE36 タンパク質の立体構造予測よりアミノ末端に存在する 8 個のアミノ酸残基からなる 8mer リピートとセリンリッチ領域、及び、中央部に位置するセリンリピート周辺は天然変性領域であることが予測された。抗 SE36 抗体価の高いウガンダ人血清に対する反応性を調べたところ、ほとんどの抗体が 8mer リピートとセリンリッチ領域に反応した。一方、BK-SE36/CpG ワクチンで誘導されたヒト抗 SE36 抗体は中央部周辺に反応する。この誘導抗体は直接マラリア原虫の増殖を阻害することが観察された。また、現在 BK-SE36/CpG の第 1b 相臨床試験の準備をしており、2017 年 6 月から開始を予定している。

1-2 RAPID システムによる未知病原体の探索： RAPID(Robotics Assisted Pathogen Identification System)システムは次世代シーケンサーによる未知病原体探索である。新興感染症や奇病の発生頻度の高い北部ウガンダにおいて常時迅速対応できるよう拠点を維持しており、また、平成 28 年度においては世界最高能力を有する HiSeq3000 を導入した (本補助金以外の外部資金による)。

1-3 研究拠点形成に関する活動： 平成 24 年に GO-Marc 「グル・大阪大学マラリア臨床共同研究センター」を設立し、分子生物学研究室を立ち上げ、十分な研究機材を設置された。さらに、ウガンダより 4 名の留学生を受け入れ、3 名が博士号を取得した (愛媛大学)。残り 1 名は平成 28 年に博士課程に入学した (群馬大学)。

1-1-2 ウガンダにおける薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の包括的疫学的研究： ウガンダにおいては、2004 年からアルテミシニン併用療法がマラリア治療の第一選択薬として用いられている。2014 年 10 月から 2016 年 6 月まで計 6 回の Ex-vivo RSA によるアルテミシニン感受性試験を実施、計 194 例中、耐性は 4 例に見られた。アルテミシニン耐性責任遺伝子 *Pfkelch13* のシークエンスは 1 例が A675V 変異を示したが、他の 3 例は野生型であった。耐性 4 例中 3 例については、感染原虫の全ゲノムを決定した。今回発見したアルテミシニン耐性原虫はアフリカに由来することが明らかとなった (論文査読中)。

1-1-3 超高感度マラリア診断装置の開発： マラリア原虫を超高感度・正確・定量的かつ易操作に検出するため、微細加工技術を用いて作製したポリスチレン製細胞チップを基盤技術としてフィールド使用を目指したマラリア診断デバイスの開発を行った。標準的な顕微鏡観察と迅速・超高感度なマラリア診断デバイスについて 100 例以上のマラリア患者より採取した血液を用いて比較検討し、新規の診断デバイスがより高感度で簡便かつ正確であることのデータを得た。また、よりコンパクトかつバッテリー駆動化による診断装置の開発に成功した。

Malaria causes 100-500 million morbidity and a half million mortality each year in the tropics and subtropics. In this study, we have been working for clinical development of malaria vaccine, monitoring appearance of drug resistant parasites, and development of new diagnostic apparatus.

1-1 Clinical development of BK-SE36 malaria vaccine: BK-SE36 malaria vaccine is a lyophilized powder that is a mixture of SE36 recombinant protein derived from N-terminal region of *P. falciparum* SERA5 and aluminum hydroxide gel. 72% of protective efficacy for one year was observed in a clinical research conducted in Uganda with 6-20 years old subjects (2010-2012). Currently we are conducting Phase Ib trial in Burkina Faso with 1-5 years old subject. The trial is a collaboration with European Vaccine Initiative, Centre National pour recherche et formation sur paludism of Burkina Faso and Osaka University. The final report is scheduled to dispatch in September 2017,

although severe adverse events were not reported. In parallel, we have conducted Phase Ia clinical trial of BK-SE36 with CpG-K3 adjuvant, single stranded oligo DNA with un-methylated CpG sequence. As a result, the safety was confirmed and around 4 times higher anti-SE36 antibody at both half dose and full dose were observed. From a tertiary structure prediction, N-terminal region and central region around serine repeat are estimated as intrinsically denatured regions. Ugandan sera are exclusively reacted with N-terminal region, in stead vaccine induced human sera reacted with the central region. The later serum inhibited the parasite growth in culture. We are preparing Phase Ib trial of BK-SE36/CpG to start in 29 June 2017.

1-2 Search for unknown pathogens by the RAPID system: RAPID (Robotics Assisted Pathogen Identification System) system is a search for unknown pathogens by the next generation sequencer. We have maintained our base so that we can always respond promptly in Northern Uganda, where the incidence of emerging infectious diseases could occur. Recently we installed HiSeq 3000 NGS which has the world's highest ability in 2016 (due to external funds other than this subsidy).

1-3 Activities on formation of research base in Uganda: In 2012, we have established GO-Marc "Guru · Osaka University malaria clinical collaborative research center" and a molecular biology laboratory equipped with sufficient research tools. In addition, four students from Uganda were accepted in Japanese graduate school. Among them three received Ph.D. (Ehime University). The other one entered the doctoral course in 2016 (Gunma University).

1-1-2 Comprehensive epidemiological study of *P. falciparum* drug resistant parasites in Uganda: In Uganda, artemisinin combination therapy has been used as a first-line drug for malaria treatment since 2004. To study the emergence of the resistant parasites, a total of six field studies were performed from October 2014 to June 2016 of which 4 resistant cases were detected among a total of 194 subjects. One sequence of the artemisinin resistance-responsible gene Pfk13 showed A675V mutation, while the other three cases were wild type. For each of 3 out of 4 cases, the whole genome was determined. It was revealed that the artemisinin resistant parasites discovered in this study are African origin (paper is under reviewing).

1-1-3 Development of Ultrahigh-sensitivity Malaria Diagnostic Equipment: To detect malaria parasites in patient blood, we have developed ultra-sensitive, accurate, quantitative and easy operation system of a polystyrene cell chip fabricated using microfabrication technology. We validated the system with standard microscopic observation using blood samples collected more than 100 malaria patients, and showed that the new diagnostic device is more sensitive, convenient and accurate. In addition, we developed a more compact and battery driven diagnostic device.

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 1 件、国際誌 25 件）

BK-SE36 マラリアワクチン臨床開発研究

1. Honma H, Niikura M, Kobayashi F, Horii T, Mita T, Endo H, Hirai M. Mutation tendency of mutator *Plasmodium berghei* with proofreading-deficient DNA polymerase δ . *Sci Rep*. 2016 Nov 15;6:36971.
2. Yagi M, Palacpac NM, Ito K, Oishi Y, Itagaki S, Balikagala B, Ntege EH, Yeka A, Kanoi BN, Katuru O, Shirai H, Fukushima W, Hirota Y, Egwan TG, Horii T. Antibody titres and boosting after natural malaria infection in BK-SE36 vaccine responders during a follow-up study in Uganda. *Sci Rep*. 2016 Oct 5;6:34363.
3. Tougan T, Ito K, Palacpac NM, Egwan TG, Horii T. Immunogenicity and protection from malaria infection in BK-SE36 vaccinated volunteers in Uganda is not influenced by HLA-DRB1 alleles. *Parasitol Int*. 2016 Oct;65(5 Pt A):455-8.
4. Dent AE, Malhotra I, Wang X, Babineau D, Yeo KT, Anderson T, Kimmel RJ, Angov E, Lanar DE, Narum D, Dutta S, Richards J, Beeson JG, Crabb BS, Cowman AF, Horii T, Muchiri E, Mungai PL, King CL, Kazura JW. Contrasting Patterns of Serologic and Functional Antibody Dynamics to *Plasmodium falciparum* Antigens in a Kenyan Birth Cohort. *Clin Vaccine Immunol*. 2015 Dec 9;23(2):104-16.
5. Tachibana SI, Kawai S, Katakai Y, Takahashi H, Nakade T, Yasutomi Y, Horii T, Tanabe K. Contrasting infection susceptibility of the Japanese macaques and cynomolgus macaques to closely related malaria parasites, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium cynomolgi*. *Parasitol Int*. 2015 Jun;64(3):274-81.
6. Yagi M., Bang G., Tougan T., Palacpac N. M. Q., Arisue N., Aoshi T., Matsumoto Y., Ishii K. J., Egwan T. G., Druilhe P. and Horii T. Protective Epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 Malaria Vaccine Reside in Intrinsically Unstructured N-Terminal Repetitive Sequences. *PLoS ONE*. 9(6): e98460 (2014).
7. Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014 May 14;15(5):551-63.
8. Nirianne M. Q. Palacpac, Edward Ntege, Betty Balikagala, Adoke Yeka, Hiroki Shirai, Nahoko Suzuki, Christopher Nsereko, Bernard Kanoi, Takuya Okada, Thomas G. Egwan and Toshihiro Horii. Hematological and biochemical data obtained in rural northern Uganda. *IJERPH (nternational Journal of Environmental Research and Public Health — Open Access Journal)* 11(5):4870-85, 2014.
9. Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu SI, Palacpac NM, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K. Generation of Rodent Malaria Parasites with a High Mutation Rate by Destructing Proofreading Activity of DNA Polymerase δ . *DNA Res*. 2014 Aug;21(4):439-46.
10. Tanabe K, Jombart T, Horibe S, Palacpac NM, Honma H, Tachibana SI, Nakamura M, Horii T, Kishino H, Mita T. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. *Mitochondrion*. 2013 Nov;13(6):630-6.
11. Aka, P., Vila, M.C., Jariwala, Nkrumah, F., Emmanuel, B., Yagi, M., Palacpac, N.M.Q., Periago, M.V., Neequaye, J., Kiruthu, C., Tougan, T., Levine, P.H., Biggar, R.J., Pfeiffer, R.M., Horii T., Bhatia, K., Bethony, J.M., and Mbulaiteye, S.M. Endemic Burkitt lymphoma is associated with strength and diversity of *Plasmodium falciparum* malaria stage-specific antigen antibody response. *Blood*. 2013 Aug 1;122(5):629-35.
12. Palacpac N.M.Q., Ntege E., Yeka A., Balikagala B., Suzuki N., Shirai H., Yagi M., Ito K., Fukushima W., Hirota Y., Nsereko C., Okada T., Kanoi B.N., Tetsutani K., Arisue N., Itagak S., Tougan T., Ishii K.J., Ueda S., Egwan

T.G., and Horii T. Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. *PLoS ONE*. 8(5): e64073 (2013).

13. Tougan T, J Ishii K, Horii T. Development and Application of Next Generation SE36 Malaria Vaccine Formulated with a Novel Adjuvant: Approach to Travelers' Vaccine. *Yakugaku Zasshi*. 133(11):1153-7 (2013).
14. Owalla TJ, Palacpac NM, Shirai H, Horii T, Egwang TG. Association of naturally acquired IgG antibodies against *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen-5 with reduced placental parasitemia and increased birth weight in pregnant Ugandan women: A pilot study. *Parasitol Int*. 62(3):237-9 (2013).
15. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ and Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 9(2): 283-290 (2013).
16. Tanabe K, Arisue N, Palacpac NM, Yagi M, Tougan T, Honma H, Ferreira MU, Färnert A, Björkman A, Kaneko A, Nakamura M, Hirayama K, Mita T and Horii T. Geographic differentiation of polymorphism in the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate gene SERA5. *Vaccine*. 30(9):1583-93 (2012).

ウガンダにおける薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の疫学的研究

17. Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana S-I, Auma M, Ntege EH, Ito D, Takashima E, Palacpac NMQ, Egwang TG, Onen JO, Kataoka M, Kimura E, Horii T, Tsuboi T. Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda. *Malar J*. 16(1):23 ,(2017).
18. Mita, T., Ohashi, J., Venkatesan, M., Marma, A. S., Nakamura, M., Plowe, C. V., & Tanabe, K. Ordered accumulation of mutations conferring resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the *Plasmodium falciparum* parasite. *J Infect Dis*. 209: 130-139 (2014). ©
19. Takahashi, N., Tanabe, K., Tsukahara, T., Dzodzomenyo, M., Dysoley, L., Khamlome, B., Sattabongkot, J., Nakamura, M., Sakurai, M., Kobayashi, J., Endo, H., Hombhanje, F., Tsuboi, T. & Mita, T. A large scale survey for novel genotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant pfcrt gene *Malaria J*. 11:92 (2012)
20. Tanabe K, Mita T, Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Kawai S, Jombart T, Kobayashi F and Horii T. Within-population genetic diversity of *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens reveals geographic distance from a Central sub-Saharan African origin. *Vaccine*. 31(9):1334-9 (2013).

迅速・超高感度なマラリア診断デバイス開発

21. Shouki Yatsushiro, Takeki Yamamoto, Shohei Yamamura, Kaori Abe, Eriko, Obana, Takahiro Nogami, Takuya Hayashi, Takashi Sesei, Hiroaki Oka, Joseph Okello-Onen, Emmanuel I. Odongo-Aginya, Mary Auma Alai, Alex Olia, Dennis Anywar, Miki Sakurai, Nirianne MQ Palacpac, Toshihiro Mita, Toshihiro Horii, Yoshinobu Baba, Masatoshi Kataoka. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda. *Sci Rep*, 6: 30136 (2016)
22. Kataoka M, Abe K, Hashimoto Y, Yamamura S, Yatsushiro S. Development of microchips for the analysis of biomarkers in blood. *Rinsho Byori*. 2012 Nov;60(11):1094-100. Japanese.
23. Abe K, Hashimoto Y, Yatsushiro S, Yamamura S, Bando M, Hiroshima Y, Kido J, Tanaka M, Shinohara Y, Ooie T, Baba Y, Kataoka M. Simultaneous immunoassay analysis of plasma IL-6 and TNF- α on a microchip. *PLoS One*. 2013;8(1):e53620.

24. Yamamura S, Yatsushiro S, Yamaguchi Y, Abe K, Shinohara Y, Kataoka M. Detection of miRNA in cell cultures by using microchip electrophoresis with a fluorescence-labeled riboprobe. *Sensors (Basel)*. 2012;12(6):7576-86.
25. Yamamura S, Yatsushiro S, Yamaguchi Y, Abe K, Shinohara Y, Tamiya E, Baba Y, Kataoka M. Accurate detection of carcinoma cells by use of a cell microarray chip. *PLoS One*. 2012;7(3):e32370.
26. Yamamura S, Yatsushiro S, Yamaguchi Y, Abe K, Shinohara Y, Tamiya E, Baba Y, Kataoka M. Accurate detection of carcinoma cells by use of a cell microarray chip. *PLoS One*. 7(3):e32370 (2012).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Do not forget the blood-stage: BK-SE36/CpG in Clinical Trial. ポスター、Toshihiro Horii、Keystone symposia Conference: Malaria: From Innovation to Eradication (B5)、2017/02/21、Kampala, Uganda
2. マラリアワクチン開発とマラリア制圧、招待講演、堀井俊宏、第32回日本環境感染学会総会・学術集会、2017/02/25、神戸市
3. Uniqueness of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. 招待講演、Toshihiro Horii、U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP), 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Parasitic Disease Panel、2017/02/09、ソウル・韓国
4. What's new with BK-SE36, a blood-stage malaria vaccine candidate? 招待講演、Toshihiro Horii、Joint International Tropical Medicine Meeting 2016、2016/12/08、Bangkok, Thailand
5. Uniqueness of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. ポスター、Toshihiro Horii、Keystone Symposia Conference : Translational Vaccinology for Global Health (S1) 2016/10/27、London, UK
6. Development and Sustainability of Malaria Vaccine Clinical Research Center in Uganda and Clinical Development of BK-SE36 Malaria Vaccine Candidate. 口頭、Toshihiro Horii、TICAD Pre-event; The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan.、2016/07/13、東京
7. Detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* isolates using novel ex-vivo assay in Uganda. 口頭、Toshihiro Mita et al.、TICAD Pre-event; The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan.、2016/07/13、東京
8. Development of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda. 口頭、Masatoshi Kataoka et al.、TICAD Pre-event; The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan.、2016/07/13、東京
9. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria. 口頭、Poster. M. Kataoka, S. Yatsushiro, T. Yamamoto, H. OKa, J. Okello-Onen, E. I. Odongo-Aginia, NM. Palacpac, T. Mita, Y. Baba, T. Horii. 2017 Keystone Symposia Conference, 2017/02/21. Kampala, Uganda
10. BK-SE36/CpG マラリアワクチンの臨床開発、口頭、堀井俊宏、第85回日本寄生虫学会大会（宮崎県宮崎市）、2016/03/19～2016/03/20
11. マラリア原虫感染赤血球における血清タンパク質の取り込みメカニズムの解明、口頭、東岸任弘、第85回日本寄生虫学会大会（宮崎県宮崎市）、2016/03/19～2016/03/20
12. BK-SE36 malaria vaccine candidate for young children、口頭、Toshihiro Horii、Symposium for Promotion of science and technology cooperation between Africa and Japan and Symposium for Innovate Network for Pan-African Surveillance of NTD and Infectious Diseases Program、Weston Hotel, Nairobi, Kenya、2016/01/14/～2016/01/15

13. マラリア原虫の寄生戦略の新規解析法の開発、ポスター、東岸任弘、BMB2015（第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会）（兵庫県淡路市）、2015/12/01～2015/12/04
14. Clinical Development of BK-SE36 malaria vaccine、口頭、Toshihiro Horii、第56回日本熱帯医学会大会（大阪府吹田市）、2015/12/04～2015/12/06
15. Identification and characterization of host proteins associated with N-terminal domain (P47) of SERA5 of *P. falciparum*、ポスター、東岸任弘、感染症若手フォーラム 2015（兵庫県淡路市）、2015/09/06～2015/09/08
16. サルマラリア原虫 *Plasmodium gonderi* のゲノム解析ーマラリア原虫の系統関係解明に向けてー、口頭、有末伸子、第23回分子寄生虫学ワークショップ&第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム（北海道帯広市）、2015/08/30～2015/09/02
 1. BK-SE36 malaria vaccine candidate for young children、口頭、Toshihiro Horii、Malaria R&D in a Time of Global Partnerships（東京都）、2015/06/26

（3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

（4）特許出願
該当なし

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
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推進事業
社会システム改革と研究開発の一体的推進を行う健康・医療関連プログラム
(英語) International Collaborative Research Program: Program for Integrated Promotion of Social
System Reform and Research and Development

補助事業課題名 : (日本語) ウガンダにおけるマラリアワクチンの臨床研究拠点形成
(英語) Development and sustainability of Malaria Vaccine Clinical Research Center

補助事業担当者 (日本語) プロテオサイエンスセンター 教授 坪井敬文
所属 役職 氏名 : (英語) Proteo-Science Center, Professor, Takafumi Tsuboi

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
分担課題名 : (英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名 : (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

新規マラリアワクチン候補抗原探索にかかる研究活動

マラリアは熱帯・亜熱帯地域において流行する重篤な感染症である。薬剤耐性原虫等の出現が大きな脅威となって以来、新たな対策の切り札としてこれまで 30 年以上ワクチン開発が精力的に行われてきた。しかし、これまで研究されてきたワクチン候補抗原は 10 種に満たず未だ実用化に至ったものは一つもない。中でも赤血球期を標的とする発症阻止ワクチンは流行地住民の防御免疫を強化しうるが、その開発は遅れている。その中で、大阪大学の BK-SE36 マラリアワクチンは、ワクチン効果が期待されその開発が強力に進められている。さらに、それに続く次世代ワクチンの開発も必要であるため、新規ワクチン候補抗原の探索が急務である。

本研究では、新規マラリア発症阻止ワクチン候補抗原を探索するため、ウガンダで実施した BK-SE36 マラリアワクチン臨床試験で得られた血清試料を入手し、それを用いてコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて作製した熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイをスクリーニングし、そ

れにより防御免疫に関連する原虫抗原を同定し、新規発症阻止ワクチン候補を同定した。

実施方法：ウガンダ北部リラ地区において実施された BK-SE36 マラリアワクチンの Phase Ib 臨床試験と 1 年間のフォローアップ調査で得られた 6~20 歳の計 66 名の血清試料を入手した。これらの試料は、マラリア流行の疫学的、免疫学的なベースラインデータが詳しく得られているため、本研究に最適である。次に、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて熱帯熱マラリア赤血球期原虫プロテインアレイを作製し、それと上記血清との免疫反応を解析し、感染防御に関連するマラリア原虫抗原をハイスループットに探索した。

実施経過・結果：ウガンダからの上記血清試料を入手するために必須の、ウガンダ政府の倫理委員会の審査が平成 25 年末に終了し、患者血清を用いた研究が許可された。そこで、平成 25 年度末に上記のウガンダ人血清試料を 66 名分入手できた。また、熱帯熱マラリア原虫全ゲノム 5400 遺伝子の内、三分の一強をカバーする 1827 種類の組換えタンパク質からなる大規模なプロテインアレイを作製した (Arumugam et al., 2014)。平成 26 年度からウガンダ人血清試料を用いてプロテインアレイの免疫スクリーニングをハイスループットな AlphaScreen システムを用いて実施した。その結果、938 種 (51.3%) の原虫タンパク質に抗原性を認めた。次にこれら 938 種類の原虫抗原に対する抗体価と、マラリア発症防御の相関を解析したところ、128 種の原虫抗原に対する抗体価が高い程発症防御に働くことが判明した。それらの抗原を原虫の発育ステージ別に分類すると、赤血球に感染する赤血球期原虫と、蚊から感染するスポロゾイト期の原虫抗原が大部分を占めていた。また、その内 53 種はシグナル配列もしくは膜貫通領域が予測されていることから、ワクチン候補抗原と考えられた (Kanoi et al., 2016)。

これらの研究成果は、本免疫スクリーニングアプローチが防御免疫に関連する抗原、つまりワクチン候補抗原の探索に有用であることを示している。

Research on novel malaria vaccine candidate discovery

Plasmodium falciparum malaria remains a disease of global health importance. Emerging drug resistance to both the parasites and the mosquito vectors control calls for development of improved and novel approaches towards malaria elimination. Malaria vaccines present a feasible option. Extensive malaria vaccine discovery efforts have yielded only a handful of vaccine candidates, with few that progressed to clinical trials having unsatisfactory low or moderate efficacies. There is therefore, an urgent need to carefully profile antibody responses against *P. falciparum* antigens to identify the targets of malaria protective immunity to form the bases of second-generation vaccine targets following BK-SE36 malaria vaccine currently under development.

In this study, immunoreactivity to a large library of recombinant proteins (n=1827) derived from ~30% of the entire *P. falciparum* genome, was determined for identification of novel malaria vaccine candidates. The recombinant proteins were expressed by wheat germ cell-free system (WGCFs); a eukaryotic platform that can synthesize quality plasmodial proteins that induce biologically functional antibodies in immunized animals. Human sera were obtained from indigenous residents of a malaria endemic region in Northern Uganda who were naturally exposed to *P. falciparum* infections. The 66 volunteers were enrolled in the phase Ib clinical trial of the BK-SE36 vaccine with the follow up at the start of a rainy season and prospectively monitored for symptomatic malaria episodes for a year. Protein immunoreactivity to the sera was determined by AlphaScreen; a homogeneous high-throughput system that detects protein interactions.

Analysis revealed broader protein immunoreactivity than previously observed in similar

immuno-epidemiological studies. Fifty-one percent of the proteins (938/1827) in the library were immunoreactive against the Ugandan sera. Antibody responses to 128 proteins, expressed in different stages of parasite lifecycle, significantly associated with protection from symptomatic malaria; defined as fever $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$ and asexual parasitemia of $\geq 2500/\mu\text{l}$ of blood. Fifty-three antigens out of the 128 were down-selected as the most plausible targets of host protective immunity by virtue of having a predicted signal peptide and/or transmembrane domain(s), or confirmed localization on the parasite surface. The 53 proteins comprised of not only previously characterized vaccine candidates with known parasite expression, localization and function but also novel uncharacterized proteins.

In conclusion this work demonstrates and emphasizes the great importance of using a combination of (i) an unbiased genome-wide recombinant protein library to comprehensively identify potential targets of immunity in malaria, (ii) use of WGCFs generated proteins, that are comparatively more soluble, intact, biologically active and immunoreactive to human sera; and (iii) application of high-throughput immunoscreening system (AlphaScreen) for unbiased antibody quantification and profiling. The study offers new options for rational discovery and selection of potential malaria vaccine candidates.

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 0 件、国際誌 7 件)
新規マラリアワクチン候補抗原探索にかかる研究活動

1. Kanoi BN, Takashima E, Morita M, White MT, Palacpac NMQ, Ntege EH, Balikagala B, Yeka A, Egwang TG, Horii T, Tsuboi T. Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized *Plasmodium falciparum* proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. *Vaccine*. 35(6):873-881, (2017).
2. Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana S-I, Auma M, Ntege EH, Ito D, Takashima E, Palacpac NMQ, Egwang TG, Onen JO, Kataoka M, Kimura E, Horii T, Tsuboi T. Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda. *Malar J*. 16(1):23, (2017).
3. Ntege EH, Arisue N, Ito D, Hasegawa T, Palacpac NMQ, Egwang TG, Horii T, Takashima E, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein homologue 5-interacting protein, PfRipr, as a highly conserved blood-stage malaria vaccine candidate. *Vaccine*. 34:5612–5622 (2016).
4. Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Sacci JB, Iriko H, Mazeika JK, Han ET, Limbach K, Patterson NB, Sedegah M, Cruz AM, Tsuboi T, Hoffman SL, Carucci D, Hollingdale MR, Villasante ED, Richie TL. Discovery of novel *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic antigens for vaccine development. *PLoS One*. 2015, 10(8):e0136109.
5. Arumugam TU, Ito D, Takashima E, Tachibana M, Ishino T, Torii M and Tsuboi T. Application of wheat germ cell-free protein expression system for novel malaria vaccine candidate discovery. *Expert Rev Vaccines*. 13(1):75-85 (2014).
6. Ito D, Hasegawa T, Miura K, Yamasaki T, Arumugam TU, Thonkuiatkul A, Takeo S, Takashima E, Sattabongkot J, Han ET, Long CA, Torii M and Tsuboi T. RALP1 is a rhoptry-neck erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum* merozoite and a potential blood-stage vaccine candidate antigen. *Infect Immun*. 81(11):4290-4298 (2013).
7. Sakamoto H, Takeo S, Maier AG, Sattabongkot J, Cowman AF and Tsuboi T. Antibodies against a *Plasmodium falciparum* antigen PfMSPDBL1 inhibit merozoite invasion into human erythrocytes. *Vaccine*. 30:1972-1980 (2012).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Absence of in-vivo selection of K13 polymorphisms after Artemether Lumefantrine treatment in Uganda. ポスター、[Balikagala B](#), Sakurai M, Ikeda M, Yatsushiro S, Takahashi N, Auma M, [Ntege EH](#), Ito D, Takashima E, [Palacpac NMQ](#), Onen JO, Kataoka M, Kimura E, [Horii T](#), [Mita T](#), [Tsuboi T](#). ASTMH 65th annual meeting, 2016/11/13-17, 国外、Atlanta, USA.
2. Antibody profiles to wheat germ cell-free system synthesized *P. falciparum* proteins correlate with protection from symptomatic malaria in Uganda. ポスター、[Kanoi BN](#), Takashima E, Morita M, [Ntege EH](#), [Balikagala B](#), [Palacpac NMQ](#), Yeka A, Egwang TG, [Horii T](#), [Tsuboi T](#). ASTMH 65th annual meeting, 2016/11/13-17, 国外、Atlanta, USA.
3. Identification of PfRipr, an RH5-interacting protein, as a highly conserved blood-stage malaria vaccine candidate against *Plasmodium falciparum*. ポスター、[Ntege EH](#), Arisue N, Ito D, Hasegawa T, [Palacpac NMQ](#), Egwang TG, [Horii T](#), Takashima E, [Tsuboi T](#). ASTMH 65th annual meeting, 2016/11/13-17, 国外、Atlanta, USA. An integrated approach to tackling malaria in Uganda with special reference to novel malaria vaccine candidate discovery、招待講演、Tsuboi T, Kanoi BN, Egwang TG, Horii T、E-JUST 2nd International Conference on Innovative Engineering, Alexandria, Egypt, May 19-21, 2015.国
4. Comprehensive analysis of Artemether-Lumefantrine efficacy among children with uncomplicated malaria in northern Uganda、ポスター発表、[Balikagala B](#), [Sakurai M](#), [Ikeda M](#), [Yatsushiro S](#), Takahashi N, [Auma M](#), [Ntege EH](#), Ito D, Takashima E, [Palacpac NMQ](#), [Onen JO](#), [Kataoka M](#), [Kimura E](#), [Horii T](#), [Mita T](#), [Tsuboi T](#)、ASTMH 64th annual meeting, Philadelphia, USA, October 25-29, 2015.国外
5. Identification of a strain transcending blood-stage malaria vaccine candidate against Plasmodium falciparum among four novel blood-stage antigens、ポスター発表、[Ntege EH](#), [Arisue N](#), Ito D, Hasegawa T, [Palacpac NMQ](#), [Horii T](#), Takashima E, [Tsuboi T](#)、ASTMH 64th annual meeting, Philadelphia, USA, October 25-29, 2015.国外
6. Profiling of antibody responses against Plasmodium falciparum protein array in Ugandan children for identification of novel blood-stage vaccine candidates、口頭発表、[Kanoi BN](#), Takashima E, Morita M, [Ntege EH](#), [Balikagala B](#), [Palacpac NMQ](#), [Egwang TG](#), Horii T, Tsuboi T、ASTMH 64th annual meeting, Philadelphia, USA, October 25-29, 2015.国外
7. WGCFS: an innovative technology expressing quality proteins for the post-genome malaria vaccine candidate discovery、口頭発表、[Tsuboi T](#)、50th Anniversary and 18th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Bethesda, USA, January 11-14, 2016.国外
8. アフリカ大陸におけるアルテメシニン耐性マラリアの出現、口頭発表、[池田美恵](#)、[金子 恵](#)、[橘真一郎](#)、[Mawagali Betty Balikagala](#)、[櫻井美樹](#)、[八代聖基](#)、[橋本宗明](#)、[Alex Olia](#)、[Anywar Dennis](#)、[Auma Mary](#)、[Palacpac Nirianne M.Q.](#)、[平井誠](#)、[片岡正俊](#)、[木村英作](#)、[Aginya Emmanuel](#)、[坪井敬文](#)、[堀井俊宏](#)、[美田敏宏](#)、第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎市、3/19-20、2016.国内
9. ポストゲノムマラリアワクチン研究は宿主寄生体関係の総体的理解につながる、招待講演、[坪井敬文](#)、第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会 合同大会、神戸市、12/1-4、2015. 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当無し

平成 28 年度 医療研究開発推進事業費補助金
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推進事業
社会システム改革と研究開発の一体的推進を行う健康・医療関連プログラム
(英語) International Collaborative Research Program: Program for Integrated
Promotion of Social System Reform and Research and Development

補助事業課題名 : (日本語) ウガンダにおけるマラリアワクチンの臨床研究拠点形成
(英語) Development and sustainability of Malaria Vaccine Clinical Research Center

補助事業担当者 (日本語) 群馬大学大学院医学系研究科 教授 久枝 一
所属 役職 氏名 : (英語) Hajime HISAEDA Professor Graduate School of Medicine, Gunma University

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究

分担課題名 :

補助事業分担者

所属 役職 氏名 :

II. 成果の概要 (総括研究報告)

マラリアワクチンの開発で問題となる宿主免疫抑制機構および環境要因に関わる研究

1. 腸管寄生性蠕虫の感染率

2013年に2度行ったマラリアの有無を問わない全患者対象を対象とした検鏡による糞便検査では 186 例中 19 例で虫卵および幼虫が認められ、感染率は 10.4%であった。内訳は、鉤虫 2 例、小型条虫 8 例、マンソン住血吸虫 7 例、回虫 1 例、判別不明な幼虫 1 例であった。マラリアと診断された 69 例中、重複感染は 8 例で見られた。さらに、持ち帰った糞便の DNA を用いた PCR による蠕虫の検出したところ、20 例で陽性と判定できた。その内訳は、条虫/吸虫特異的プライマーで増幅されたものが 12 例、マンソン住血吸虫特異的プライマーでも陽性となったものが 6 例、両者が検出されたもの 3 例、線虫特異的プライマーで増幅されたものが 5 例であった。糞便の DNA を用いた PCR でも顕微鏡での観察とほぼ同程度の検出が可能であった。2014年以降に採取した糞便についても PCR での解析を行ったところ、173 検体中 10 例で陽性であり、感染率は 5.8%であった。

当初想定していたより低い感染率であることが明らかとなった。13年よりも14年以降で感染率が下がっていることも考慮すると、現地で行われている腸管寄生虫に対するマストリートメントが奏効していることが考え

られた。これらの事実は、寄生虫による免疫変調の影響は少ないと予想され、ワクチンの開発にあたり追い風となるであろう。

2. マラリアと腸内細菌叢の関与

ウガンダで採取した糞便サンプルを用いた腸内細菌の解析に先立ち、動物実験レベルでの検証を行った。マラリアの死因の大部分は熱帯熱マラリアにおける合併症であり、重症マラリアの診断基準でもある脳マラリアである。マウスでも実験的脳マラリアを起こすモデルがある。C57BL/6 (B6) マウスにネズミマラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株を感染させると、原虫血症率の低い時期である感染後10日前後で全てのマウスが痙攣などの中枢神経症状を呈して死に至る。系統の異なるBALB/c マウスではB6マウスが脳マラリアを発症する時期に死に至らず、脳マラリア抵抗性であるが最終的には感染後30日ほどで全頭高い原虫血症率で死亡する。さらに、感染B6マウスでは粘膜の脱落、出血など腸管組織の異常が見られたが、BALB/c マウスでは腸管への影響は見られなかった。両者のマウスでの腸内細菌叢を検討したところ、脳マラリアを発症するB6マウスでは善玉菌のラクトバチルス科の細菌が感染に伴い著しく減少し、悪玉菌とされる腸内細菌科の細菌の増加も顕著に見られた。一方、脳マラリアを発症しないBALB/c マウスでも同様の傾向が認められたが、その変化はB6マウスに比べて小さかった。以上のことから、マラリアが腸内細菌に影響を与えることが明らかとなった。また、脳マラリアの発症の有無で腸内細菌の変化に違いがあったように、腸内細菌とマラリアの病態の相関が示唆された。

マウスでの結果を受けて、ウガンダから持ち帰った糞便サンプルの解析を行った。2013、2014年に採取したサンプルでマラリア患者と非マラリア患者での比較を行った。マラリア患者で若干の変化があるようであったが、有意な差は認められなかった。その理由として個人差が大きいこと、比較対象が健常人でないこと、さらに、マウスの検討で重症マラリアでの変化が大きかったが、外来に来る非重症マラリア患者からのサンプリングしか行わなかったことが考えられた。そこで、これらの欠点を是正すべく以降のサンプリングは、同一個人で病期とより正常に近い治療後の2週間以上あけた回復期を比較できるようにフォローアップサンプルも採取した。また、対象も脳マラリアを含む入院が必要な重症患者にまで拡大した。2015年に採取した、入院患者121名、その回復期89名、外来患者77名、その回復期49名からの検体、合わせて336検体を用いて腸内細菌の解析を行った。重症度を考慮せず病期と回復期での比較を行うと、マラリア発症時期では明らかに腸内細菌叢が異なることが明らかになった。さらに、外来患者と入院患者を比較すると、入院患者での回復期との変化は外来患者での回復期との変化に比べ有意に大きかった。以上の結果は、マラリアでは腸内細菌の変調が起こり、その程度は重症度に比例することが示唆され、マウスで見られた結果を再現することができた。

3. マラリア患者での血中タンパク質の解析

2015年に採取した入院患者25名、その回復期19名、外来患者22名、その回復期14名の血漿サンプル中のサイトカイン等、106種類の分子について定量を行った。検出できなかった13種を除いた93分子について、回復期に比較して変動していたものを入院患者と外来患者を区別して振り分けた。ほとんどの血中タンパク質がマラリアによって変動することが分かった。多くは入院患者と外来患者で共通して増加、あるいは減少していた。興味深いのは、入院患者でのみ増加するタンパク質が28種あり、これらの中にマラリアの重症化に関わる分子の存在が示唆される。その中には動物実験で関与が示されているサイトカイン等の分子も含まれており信頼性は高いと思われる。これら分子群についてはマウスモデルでの検証を含め今後の検討を行う。

1. Prevalence of intestinal helminth infection

Helminthic infections are known to affect immune responses including vaccine efficacy. Thus, it is

important to know the prevalence of helminthic infections in malaria endemic areas to develop malaria vaccines. To this end, we collected fecal samples from all patient aged 2 to 15 and microscopic observations for eggs and parasites were performed. Among collected 186 samples in 2013, we detected infection in 19 samples (10.4%) including 2 hookworms, 8 dwarf tapeworms, 7 schistosoma, 1 roundworm, and 1 unidentified larva. These samples were further verified using PCR technique after DNA extraction. We could amplify helminth-specific sequences from 20 samples similarly to microscopic analyses. PCR detection was applied to fecal samples obtained later than 2013 and revealed that 10 samples out of 173 were positive (5.8%). The prevalence observed in this study was much less than we expected. In considering the prevalence became lower in 2014 than in 2013, mass drug administration has been successfully conducted even in rural areas of African countries. These results suggest that immune modulation by helminthic infection is minimum and encourage developing malaria vaccines.

2. Malaria and intestinal microbiota

Prior to microbiotic analyses using human samples, we evaluated the relationship between malaria and microbiota using a mouse model. Infection of C57BL/6 (B6) mice with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) results in death within 10 days with showing neurological disturbance such as convulsion, which serves experimental cerebral malaria (ECM) model. Furthermore, B6 mice developing ECM exhibited intestinal pathological changes, such as detachment of epithelia in the small intestines. Notably, an apparent dysbiosis occurred, characterized by a reduction of Firmicutes and an increase in Proteobacteria. Some genera of microbiota correlated with parasite growth and/or ECM development. By contrast, BALB/c mice did not show neurological symptoms but suffered from high parasitemia leading to death later than 20 days, indicating resistance of BALB/c mice to ECM. Those mice showed milder intestinal pathology and dysbiosis. These results indicate that the severity of cerebral and intestinal pathology coincides with the degree of alteration in microbiota.

After completion of analyses in mouse model, we analyzed human fecal samples for microbiotic composition. First, we compared fecal samples from malaria patients and non-malaria patients obtained in 2013 and 2014. It revealed that only marginal and not significant alterations in malaria patients were observed compared with non-malaria patients. The reasons why we could not find differences might be 1) variability among each individual seemed very big, 2) non-malaria patients visiting hospital were recruited as negative controls, and 3) we recruited only outpatients who showed milder symptoms despite severe malaria did induce dysbiosis in the mouse model. To overcome these pitfalls, we collected fecal samples from inpatients with complicated severe or outpatients with uncomplicated milder falciparum malaria during illness and after convalescence, at least 10 days after treatment, allowing us to compare not only severe versus mild but also ill versus health in each individual. We found that composition of microbiota in patients during illness significantly differed from that in those after convalescence. And the degree of alteration in microbiota in patients with complicated malaria was greater than patients with uncomplicated malaria. These findings suggest that malaria alters composition of intestinal microbiota associated with disease severity, which coincides with our insights from the mouse model.

3. Analyses of inflammatory proteins in plasma samples from malaria patients

We also analyzed proteins such as inflammatory cytokines in blood samples. Among analyzed 93 proteins after exclusion of undetected 13 proteins, 48 molecules were increased or decreased in plasma

samples from patients during illness compared with those after convalescence indifferently of disease severity. However, 28 proteins were increased only in patients with complicated malaria, suggesting existence of responsible molecules for disease severity among these proteins.

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 0 件、国際誌 13 件）

マラリアワクチン開発で問題となる宿主免疫抑制機構及び環境要因に係る研究活動

1. Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Olia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T, Hisaeda H. *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Sci Rep** 5: 15699, doi: 10.1038/srep15699, 2015.
2. Okada H, Suzue K, Imai T, Taniguchi T, Shimokawa C, Onishi R, Hirata J, and Hisaeda H. A transient resistance to blood-stage malaria in interferon- γ -deficient mice through impaired production of host cells preferred by malaria parasites. *Frontiers Microbiol.* 6:600. doi; 10.3389/fmicb.2015.006600. eCollection 2015.
3. Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, and Hisaeda H. Cytotoxic activities of CD8⁺ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. **Elife** 4, doi: 10.7554/eLife.04232, 2015.
4. Imai T, Iwawaki T, Akai R, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, and Hisaeda H. Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice. **Int. J. Parasitol.** 44: 681-685, 2014.
5. Imai T, Ishida H, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, and Hisaeda H. CD8⁺ T cell activation by murine erythroblasts infected with malaria parasites. **Sci. Rep.** 3: 1572 (2013).
6. Duan X, Imai T, Chou B, Tu L, Himeno K, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, and Hisaeda H. Resistance to malaria by enhanced phagocytosis of erythrocytes in LMP7-deficient mice. **PLoS One** 8: e59633 (2013).
7. Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, Iwakura Y, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, and Hisaeda H. IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. **Eur. J. Immunol.** 43: 2696-2706 (2013).

フィラリア症など蠕虫感染に関する研究活動

8. Nagayasu E, Yoshida A, Hombu A, Horii Y, Maruyama H: Paragonimiasis in Japan: A Twelve-year Retrospective Case Review (2001–2012). **Int. Med.** 2015;54(2):179-86.
9. Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Hayashi T, Kohara Y, Fujiyama A, Itoh T: Efficient *de novo* assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. **Genome. Res.** 2014 Aug;24(8):1384-95
10. Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H: Identification of a bacteria-like ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. **PLoS One.** 8(3):e58458. (2013).
11. Kikuchi T, Koga M, Shimizu S, Miura T, Maruyama H, Kimura M: Efficacy and safety of paromomycin for treating amebiasis in Japan. **Parasitol Int.** 62(6):497-501 (2013).

12. El-Malky MA, Maruyama H, Al-Harathi SA, El-Beshbishi SN, Ohta N: The role of B-cells in immunity against adult *Strongyloides venezuelensis*. *Parasit Vectors*. 6:148 (2013).
13. Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol Int.* 62 (1): 57-65 (2013)
Kimura M, Koga M, Kikuchi T, Miura T, Maruyama H: Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: the second report from the research group. *Parasitol Int.* 61(3): 466-469 (2012).

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ネズミマラリア原虫感染により腸内細菌バランス失調が起こる、口頭、谷口委代 他12名、宮崎市、2015年3月、第85回日本寄生虫学会大会
2. アフリカ大陸におけるアルテミシニン耐性マラリアの出現、口頭、池田美恵 他18名、宮崎市、2015年3月、第85回日本寄生虫学会大会

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし