

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03478

研究課題名（和文）抗マラリア薬作用機序における宿主免疫機構の役割の解明

研究課題名（英文）Role of Host Immune System in Pharmacological Action of Anti-Malaria Drugs

研究代表者

前川 洋一（MAEKAWA, Yoichi）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10294670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアはマラリア原虫の感染によって発症する三大感染症の一つである。マラリア治療薬（抗マラリア薬）はマラリア制圧に向けた必須のピースであるが、薬剤耐性の出現が問題となる。抗マラリア薬は生体内でも直接マラリア原虫を殺滅することでマラリアを治癒していると考えられているが、私たちの研究から生体内での抗マラリア薬の薬理作用には宿主免疫機構が関与していることが明らかとなった。特に抗マラリア薬として最もポピュラーなクロロキンのマラリア治癒作用には宿主免疫グロブリンが大きく関与していること、また免疫グロブリンを産生するB細胞そのものはクロロキンの作用に対して負の影響を持つことが示唆される結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは本研究から、抗マラリア薬の生体内での薬理作用には宿主免疫機構が大きく関与しているとの知見を得た。この知見から、抗マラリア薬にてマラリアを治療する際には患者の免疫機構が十分に維持されている必要があることが示唆された。一方、マラリア流行地では栄養不全や若年者など免疫機構が十分ではないものが感染する。このような患者では抗マラリア薬が十分にその効果を発揮せず、感染が遷延するのではないかと推察される。感染の遷延と抗マラリア薬の持続的使用によって薬剤耐性原虫の出現が危惧される。そのため、抗マラリア薬を使用する際にはこれまで以上に患者の免疫機構の状態に留意し、状態によって治療法を選択する必要がある。

研究成果の概要（英文）：Malaria is one of the three major infectious diseases caused by the infection with Plasmodium species. Malaria drugs (antimalarial drugs) are an essential component of malaria control, but the emergence of drug resistance is a significant challenge. Antimalarial drugs are believed to cure malaria by directly killing Plasmodium parasites even in vivo, but our studies have demonstrated that the host immune system is involved in the pharmacological action of antimalarial drugs in vivo. In particular, our findings indicated that host immunoglobulins play a pivotal role in the malaria-curing action of chloroquine, the most widely used antimalarial drug. Furthermore, our results suggested that immunoglobulin-producing B cells themselves have a negative impact on the mode of action of chloroquine in vivo.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 薬剤耐性 宿主免疫機構 免疫グロブリン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは感染者数2億人、死亡者数40万人に上る非常な脅威を有する感染症である。マラリアの制圧に向け様々な対策が講じられ一定の成果をあげている。マラリア治療薬(抗マラリア薬)は個々のマラリア患者の治療とともに集団投薬にも用いられる、マラリア制圧に向けての必須のピースである。多くの抗マラリア薬は伝承や風習による民間療法で用いられてきた薬剤を起点としているものが多い。これらはいずれも治療薬として開発される段階で試験管内での直接的な原虫殺滅作用が十分に検証されている。これらの検証に基づくと、生体でのマラリア治療効果も薬剤の直接的な原虫殺滅作用に依存していると考えることが妥当である。私たちもこの考えに基づき行った実験において、ある免疫不全マウスに赤内期マラリア原虫を感染させクロロキンを投与した。野生型マウスでは赤内期マラリアをクロロキンで完全に治療できたが、免疫不全マウスではほとんど効果を示さず、マウスは全個体死亡した。これらの結果から、私たちは「抗マラリア薬の生体内での“統合的”な作用機序には宿主免疫機構が必須である」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は「抗マラリア薬の生体内での作用機序の解明」である。私たちが特に着目しているのは、薬剤の「統合的」な作用機序には宿主免疫機構が必須ではないかという点である。従って本研究の第一到達目標は、抗マラリア薬の生体内作用機序における宿主免疫機構の関与を精細に明らかにすることである。すなわち、統合的薬剤作用機序に関与している宿主免疫機構の細胞や分子の同定を行うことである(マラリア治療についての新たな側面からの理解)。また、関与する細胞や分子を人為的に賦活化させる方法と抗マラリア薬を組み合わせることでより強力な抗マラリア活性を迅速に発揮できる治療法が創出できる可能性(薬剤耐性マラリア対策への新たな基盤的知見を提供)を検討することも副次的目標とする。

3. 研究の方法

本研究では以下の3点の解明項目について研究を行った。

- (1) 当該免疫不全マウスでクロロキンが効果を発揮しない現象の分子基盤の解明
- (2) 生体内での抗マラリア薬の“統合的”な作用機序に関与する宿主免疫機構の同定
- (3) 生体内での薬剤耐性マラリア原虫の出現機序と耐性機構の解明

私たちが見出した現象は免疫グロブリンを産生しないマウスを用いることで認められる。すなわち、免疫グロブリンを産生できないマウスにおけるマウスマラリア感染ではクロロキンが全く奏功しない。そこで(1)および(2)では遺伝子改変による各種免疫不全マウスを用いて、私たちが見出した現象に関与する細胞や分子の同定を試みた。

(3)に関しては以下の研究計画を策定した。免疫不全マウスで抗マラリア薬に対して抵抗性を示したマラリア原虫では抗マラリア薬に対して耐性を獲得しているのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するため、当該マウスから感染赤血球を次の感染に供し、抗マラリア薬に対してどのような反応を示すかを確認した。また、数代に渡る継代感染でも抗マラリア薬に対して耐性を示した原虫での薬剤耐性機構を解明するため、マラリア原虫の網羅的遺伝子解析を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) 生体内でのクロロキンの抗マラリア薬理作用に影響を及ぼす細胞・因子について

本研究の基盤的知見である私たちは従来の研究から、免疫グロブリン産生不全マウス (Ig 欠損マウス) に非致死性マウスマラリア原虫株である *Plasmodium yoelii* (PyXNL) を感染させ、感染 10 日後からクロロキンを投与しても原虫血症がほとんど低下せず、感染マウスは全て感染死するという結果を得た。この結果から、抗マラリア薬であるクロロキンの生体内での薬理作用には宿主免疫機構、特に免疫グロブリンが関与していることが示唆された。そこで、免疫グロブリンがどのように抗マラリア薬の薬理作用に関与しているのかを明らかにするため、免疫機構に関与する細胞や分子を欠損する遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。

免疫グロブリンは適応免疫系に属する感染防御因子である。適応免疫系には T 細胞や B 細胞が属している。そこで、クロロキンの生体内薬理作用における適応免疫系の関与を検討した。T 細胞や B 細胞はその発生過程で抗原受容体遺伝子の再構成が起こる。遺伝子再構成には Rag 分子が関与しており、Rag2 遺伝子を欠損するマウス (Rag2 欠損マウス) では成熟した T および B 細胞を欠失する適応免疫系欠損マウスとなる。Rag2 欠損マウスでは、PyXNL 赤内期感染に対する抗マラリア薬クロロキン投与により原虫血症が低下し顕微鏡レベルで原虫血症が認められなくなった。この結果は Ig 欠損マウスとは異なるものであった。このことから、適応免疫系に属する細胞がクロロキンの生体内薬理作用に負の影響を及ぼしているのではないかと考えられた。免疫グロブリンは B 細胞から産生される。そこで、次に B 細胞を欠損するマウスを用いて検証した。B 細胞を欠損する muMT マウスでは PyXNL 赤内期感染に対しクロロキンによる原虫血症の低下が認められた。この結果は B 細胞を有するが免疫グロブリンは持たない Ig 欠損マウスとは異なるものであった。Rag2 欠損マウスの結果と合わせて考えると、B 細胞が生体内でのクロロキンの薬理作用に対して負の影響を与えている可能性が示唆された。また、B 細胞による負の影響は免疫グロブリンが欠失している時のみ顕在化すると考えられ、免疫機構が正常なマウスでは B 細胞の負の影響は観察されないのではないかと推察された。一方、muMT マウスでは顕微鏡レベルで原虫血症を認めなくなった後にクロロキン投与を中止すると再び原虫血症が出現した。このことから、免疫グロブリンは抗マラリア薬にてマラリアを完全に治癒する上で重要な因子であることが示唆された。

(2) アルテミシニン薬理作用に対する宿主免疫機構の関与

私たちが見出したクロロキンの薬理作用に対する免疫グロブリンおよび B 細胞の影響について、他の抗マラリア薬でも同様の影響があるかを検証した。アルテミシニンは現在のマラリア治療においてフロントラインの薬剤である。Ig 欠損マウスにおいてクロロキン投与では原虫血症がほとんど低下しないが、アルテミシニンを投与すると原虫血症は低下した。したがって、クロロキンで認められた現象はアルテミシニンには当てはまらず、クロロキン特有の薬理作用と関連しているのではないかと考えられた。一方、アルテミシニン投与により原虫血症の低下が認められた Ig 欠損マウスのうちおよそ 25% の個体でアルテミシニン投与を中止すると原虫血症が再び出現した。また、Rag2 遺伝子欠損マウスでも赤内期 PyXNL 感染をアルテミシニンで完全に治癒させることはできなかった。このことから、アルテミシニンはクロロキンよりもより生体内でより直接的にマラリア原虫を殺滅していることが示唆されるとともに、クロロキンやアルテミシニンによる赤内期マラリアの完治において免疫グロブリンが必須であることが明らかとなった。

(3) 宿主免疫機構と抗マラリア薬薬剤耐性原虫出現機序との関連

クロロキンによる治療における Rag2 欠損マウスや muMT マウス、及びアルテミシニンによる治療での Ig 欠損マウスのように、抗マラリア薬治療を中止すると再び昆虫血症が出現・上昇することから、免疫不全マウスでは抗マラリア薬に対し耐性の原虫が出現したのではないかとの仮説を立てた。そこでこの仮説を検証するため、クロロキン治療に耐性マラリアを示す免疫不全マウスから分離した感染赤血球を別のマウスに感染させ再度クロロキンを投与した場合に薬剤耐性を示すかどうかを観察した。すると、感染させた野生型マウスの中には原虫血症が低下する個体も存在した。一方、Ig 欠損マウスや muMT マウスで同一個体において継続的にクロロキンを投与した場合には薬剤耐性を示すことから、マラリア原虫は比較的容易に一過性の薬剤耐性状態（順応）となる可能性が示唆された。

最後に、*P. yoelii* の致死株である PyNL を用い Rag2 欠損マウスで同様の検証を行ったところ、PyXNL の場合と異なり完全に治癒することができた。PyXNL と PyXL には幾つかの遺伝的差異やそれに由来する生物学的特徴があるが、その中の一つに生体内での原虫の増殖速度がある。PyXL は PyXNL と比較し、原虫血症の上昇が著しく早い。薬剤耐性には赤内期マラリア原虫の dormancy（休眠性）が関与することが示唆されていることから、私たちが見出した PyXL と PyXNL のクロロキンに対する応答に違いの要因の一つに、増殖速度とそれに関連する dormancy が関係しているのではないかと考えられた。また、生体内では dormancy 原虫の出現に対し免疫グロブリンをはじめとする宿主免疫機構がその排除に重要な役割を担っていることも示唆された。さらに、一過性薬剤耐性を示す原虫の中から遺伝子変化を伴った真の薬剤耐性原虫が出現する（適応）のではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ayaka Fujimaki, Kazuki Ohuchi, Shinnosuke Takizawa, Takanori Murakami, Hisaka Kurita, Isao Hozumi, Xiaopeng Wen, Yoshihisa Kitamura, Zhiliang Wu, Yoichi Maekawa, Masatoshi Inden	4. 巻 13
2. 論文標題 The neuroprotective effects of FG-4592, a hypoxia-inducible factor-prolyl hydroxylase inhibitor, against oxidative stress induced by alpha-synuclein in N2a cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15629-15639
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-42903-7.	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 -
1. 著者名 Tsukumo Shin-ichi, Subramani Poorani Ganesh, Seija No?, Tabata Mizuho, Maekawa Yoichi, Mori Yuya, Ishifune Chieko, Itoh Yasushi, Ota Mineto, Fujio Keishi, Di Noia Javier M., Yasutomo Koji	4. 巻 8
2. 論文標題 AFF3, a susceptibility factor for autoimmune diseases, is a molecular facilitator of immunoglobulin class switch recombination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abq0008	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 -
1. 著者名 Sukhonthip Khueangchiangkhwang, Zhiliang Wu, Isao Nagano, Yoichi Maekawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Trichinella pseudospiralis-secreted 53 kDa protein ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting the IL-23/IL-17 axis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 101415-101426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101415.	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 -
1. 著者名 Dewayani Astri, Kamiyama Naganori, Sachi Nozomi, Ozaka Sotaro, Saechue Benjawan, Arika Shimpei, Goto Mizuki, Chalalai Thanyakorn, Soga Yasuhiro, Fukuda Chiaki, Kagoshima Yomei, Maekawa Yoichi, Kobayashi Takashi	4. 巻 613
2. 論文標題 TRAF6 signaling pathway in T cells regulates anti-tumor immunity through the activation of tumor specific Th9 cells and CTLs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyai Masafumi, Kanayama Tomohiro, Hyodo Fuminoriら	4. 巻 3
2. 論文標題 Glucose transporter Glut1 controls diffuse invasion phenotype with perineuronal satellitosis in diffuse glioma microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdaa150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Taishin, Horie Kenta, Hinoi Eiichi, Hiraiwa Manami, Kato Akihisa, Maekawa Yoichi, Takahashi Akihisa, Furukawa Satoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 How does spaceflight affect the acquired immune system?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-020-0104-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuta T, Okada H, Takemura Gら	4. 巻 54
2. 論文標題 Neutrophil Elastase Inhibition Ameliorates Endotoxin-induced Myocardial Injury Accompanying Degradation of Cardiac Capillary Glycocalyx	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 386-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 クエアンチアックワン スコンティップ、呉 志良、前川 洋一
2. 発表標題 The role of antibodies against distinct developmental stage of <i>Trichinella spiralis</i>
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Sukhonthip Khueangchiangkhwang, Zhiliang Wu, Yoichi Maekawa
2. 発表標題 The novel effect of antibodies on Trichinellosis
3. 学会等名 第16回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sukhonthip Khueangchiangkhwang, Wu Zhiliang, MAEKAWA Yoichi
2. 発表標題 Early diagnosis of Trichinella infection by detecting microRNAs in extracellular vesicles secreted by Trichinella
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sukhonthip Khueangchiangkhwang, Zhiliang Wu, Yoichi Maekawa
2. 発表標題 Role of extracellular vesicles from parasitic nematode, Trichinella spiralis
3. 学会等名 第76回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 呉志良、Sukhonthip Khueangchiangkhwang、前川洋一
2. 発表標題 免疫環境の変化に対する繊毛虫の対応
3. 学会等名 第76回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-ichi Tsukumo, Yoichi Maekawa, Keishi Fujio, Koji Yasutomo
2. 発表標題 AFF3 regulates class switch recombination by enhancing mutagenesis of switch region
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, Yoichi Maekawa, Satoshi Matsuda
2. 発表標題 T-lineage specific Arf-deficient mice are susceptible to Leishmania major infection
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sukhonthip Khueangchiangkhwang, Zhiliang Wu, Yoichi Maekawa
2. 発表標題 Modulation of host immune response by extracellular vesicles from parasitic nematode, Trichinella spiralis
3. 学会等名 第14回 寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Wu Zhiliang, Nagano Isaoa, Khueangchiangkhwang Sukhonthipa, Maekawa Yoichi	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 80
3. 書名 Trichinella and Trichinellosis	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------