

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08653

研究課題名（和文）細胞外NADシグナルによるマラリア感染防御機構の解明

研究課題名（英文）Role of extracellular NAD against malaria infection

研究代表者

中川 崇（Nakagawa, Takashi）

富山大学・学術研究部医学系・教授

研究者番号：40610374

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、マラリア感染の初期段階において赤血球から放出されたNADが細胞外シグナル伝達物質として作用し、マラリア感染防止に働いているという仮説をにもとづき、細胞外NADシグナルがどのようにマラリア感染防御機構に関与しているのかを解明することを目的とした。その結果、マラリア感染により、NAD合成経路のうち、Preiss-Handler経路が活性化していることが解った。また、NADは細胞外においてマクロファージに作用し、様々な炎症性サイトカインを放出させることが解った。しかしながらマクロファージの活性化にはTLR4は関与しておらず、別経路での活性化機構が存在していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは現在においても年間2億人の人々が感染し、発展途上国を中心として100万人の死者を出す原虫感染症である。そのため、より効果的な治療薬の開発が望まれている。本研究は、マラリア感染においてNAD代謝が関与していることの一端を明らかにした研究であり、NAD代謝がマラリア治療の新たなターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we elucidate how the extracellular NAD signal is involved in the defense against malaria infection. We hypothesised that NAD released from red blood cells at the early stage of malaria infection acts as an extracellular signal to prevent malaria infection. We revealed that the Preiss-handler pathway was activated by malaria infection. It was also found that NAD acts extracellularly on macrophages and promoted to releases various inflammatory cytokines. However, it was suggested that TLR4 was not involved in the macrophage activation and that there is an alternative pathway.

研究分野：薬理学

キーワード：マラリア NAD代謝

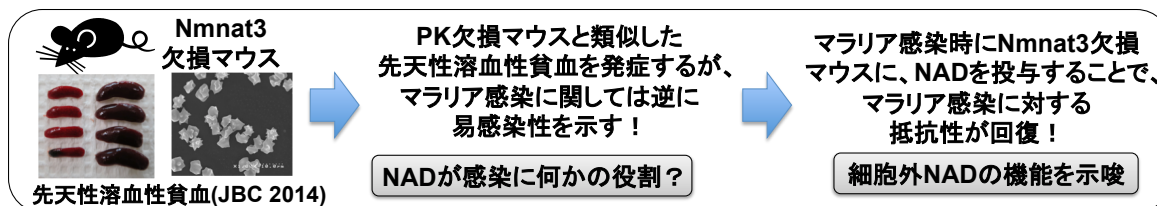
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは現在においても年間2億人の人々が感染し、発展途上国を中心として100万人の死者を出す原虫感染症である。以前からピルビン酸キナーゼ (PK) 欠損症などの、先天性溶血性貧血を示す赤血球酵素異常症がマラリア感染に対し抵抗性を示すことが知られていたが、その詳細な機序は不明のままであった。申請者は補酵素である NAD (ニコチンアミドジヌクレオチド) の合成酵素 Nmnat3 (Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3) の機能解析をする中で Nmnat3 欠損マウスでは赤血球 NAD レベルが著明に減少し、解糖系を介したエネルギー産生が阻害されることで PK 欠損症に非常に類似した溶血性貧血を示すことを報告した (J Biol Chem. 2014)。興味深いことに、この Nmnat3 欠損マウスはマラリア感染に関しては、PK 欠損マウスとは逆に易感染性を示し、非常に死亡率が高いことが判った。一般に溶血性貧血では赤血球寿命が短縮しているため、マラリア原虫が感染しても増殖出来ないことが、感染抵抗性を示す原因の一つとして考えられてきたが、Nmnat3 欠損マウスも他の溶血性貧血と同様に赤血球寿命が短縮していることから、単純な赤血球寿命だけでは説明できない、別の機序がマラリア原虫の赤血球感染・増殖のステップに重要ではないかと考えられた。Nmnat3 欠損マウスは、溶血性貧血のフェノタイプについては PK 欠損マウスとほぼ同様であることから、両者の唯一の違いである NAD レベルの差がマラリア感染に関与しているのではないかとの仮説を立てた。一般に、マラリア原虫は赤血球内で増殖した後、赤血球膜を破壊し細胞外に放出されるが、その際に赤血球内 NAD も血中へと放出される。近年、ATP 等の細胞内代謝物が細胞外へと放出され、シグナル伝達分子として作用することが数多く報告されている。例えば、細胞内エネルギー通貨として重要な ATP は、細菌感染の際にバクテリアの細胞膜が破綻し、細胞外に放出されると、いわゆる Danger signal として働き、マクロファージや T 細胞上にあるプリン作動性受容体を介して免疫系の活性化などを行っている。また、プリン作動性受容体ファミリー (P2X 受容体および P2Y 受容体) のうち、P2Y1 受容体(P2Y1R)や P2X7 受容体(P2X7R)では、NAD もリガンドとして機能することが報告されている。P2Y1R や P2X7R はマクロファージなどの免疫細胞に強く発現しており、プリン作動性受容体を介したシグナル伝達経路によりその機能が制御されていると考えられている。さらに、マクロファージなどの各種免疫細胞の細胞膜上には NAD を cyclic-ADP リボース(cADPR)や ADP リボース(ADPR)に分解する NAD glycolydrase である CD38 や CD157 が存在しており、細胞外において NAD を代謝することができる。また、LPS 刺激で誘導した M1 マクロファージでは、CD38 の発現が顕著に増加することが解っている。しかしながら、これら細胞外 NAD のシグナルとマラリア感染との関連については良く解っていないかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、「マラリア感染の初期段階において赤血球から放出された NAD が細胞外シグナル伝達物質として作用し、マラリア感染防御に働いている。」という仮説を証明すべく、マウスマラリア感染モデルと、CD38 や CD157 などの NAD 代謝酵素欠損マウスを用いることで、マラリア感染初期の免疫反応に細胞外 NAD 代謝がどの様に関与しているのか明らかにし、細胞外 NAD シグナルによるマラリア感染防御機構を解明する。マラリアは今も世界中で多くの死者を出す最重要課題の感染症であり、より効果的な治療薬の開発が望まれている。そのため、本研究成果により、新たなマラリア感染防御機構が明らかになれば、これらを用いた今までにない側面からのマラリア治療法を開発できると期待される。



3. 研究の方法

①マラリア感染時の赤血球 NAD 代謝の解析

マラリア感染時に赤血球 NAD レベルが著明に増加することが以前に報告されている (Blood. 1998)。一般に哺乳類はニコチンアミドを材料とする salvage 経路で NAD を合成するが、マラリア原虫は、ニコチン酸を使った Preiss-Handler 経路で NAD を合成していると考えられる。そこで実際のマラリア感染した野生型赤血球の NAD 代謝経路の代謝物について、メタボロミクスを用いて網羅的に解析し、どの NAD 合成経路が細胞外への NAD 放出に重要であるか検討する。具体的には、Nmnat3 欠損マウスに非致死性マウスマラリアである *Plasmodium chabaudai* を感染させ、感染後経時的にマラリア感染率を調べ、感染後 7 日目でマウスを安楽死させ、採血を行う。その後、赤血球のみを分離し、メタノール-水-クロロホルムにて代謝物を抽出する。NAD 関連代謝物の測定については、以前に我々が報告した LC/MS による手法を用いて、Salvage 経路、Preiss-Handler 経路のすべての中間代謝物を定量する。その後、非感染マウスとの比較を行う。また Nmnat3 欠損マウスについても同様の解析を行う。

② *In vivo* マラリア感染における細胞外 NAD 代謝の役割解析

細胞外において NAD を分解する酵素 CD38 の欠損マウスに非致死性マウスマラリアである *Plasmodium chabaudai* を感染させ、感染性、死亡率が改善できるか検証する。また、NAD の下流代謝物が関与する場合、それらを代謝する酵素を決定するために、CD38 や CD157 の欠損マウスを用いて、同様の感染実験を行い、Nmnat3 欠損マウス同様、マラリア感染に感受性を示すか確認する。もしその効果が部分的もしくは見られない場合、CD38/CD157 のダブルノックアウトマウスを用いる。

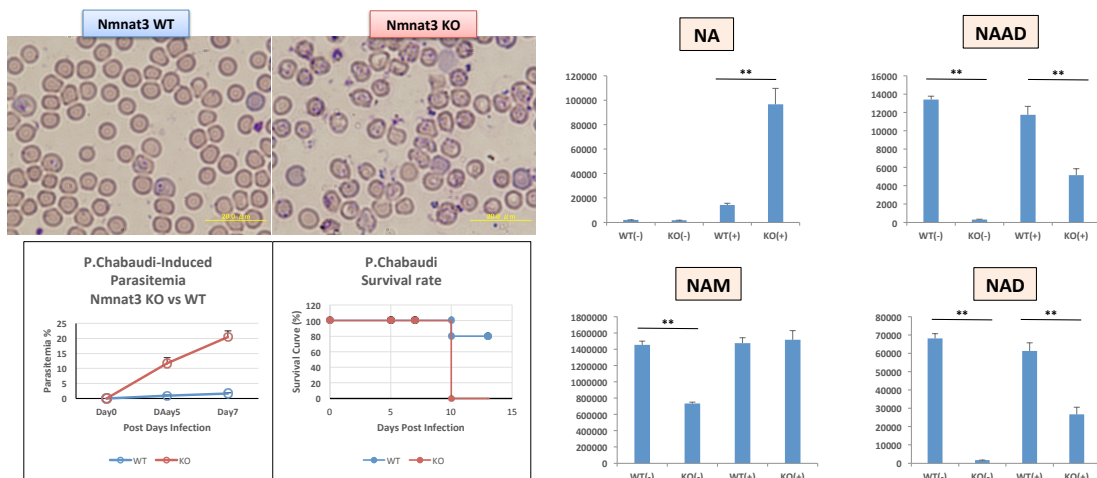
③ 細胞外 NAD シグナルの *in vitro* 培養系を用いた解析

単離骨髄由来マクロファージを用いて、NAD や ADP リボース、サイクリック ADP リボース、ニコチンアミドなど様々な NAD 関連代謝物と共培養することで、IL-6 や IL-1b、TNF α といった炎症性・遊走性サイトカインなどが実際に誘導されるか、qPCR や ELISA を用いて明らかにする。そして、NAD を含めたどの NAD 代謝産物が、炎症性・遊走性サイトカインの誘導に重要なのか決定する。

4. 研究成果

① マラリア感染時の赤血球 NAD 代謝の解析

非致死性マウスマラリア株である *Plasmodium chabaudai* を野生型マウスならびに Nmnat3 ノックアウトマウスに感染させたところ、図に示すように野生型マウスでは感染 7 日目で数%程度の感染率であったが、Nmnat3 ノックアウトマウスでは約 20%の感染率を示した。また、この結果に一致するように野生型マウスでは感染後 10 日経ってもほとんど死ななかったのに対して、Nmnat3 ノックアウトマウスは感染 10 日後までに全数が死亡した。そこで、感染後 7 日目に赤血球を単離し、NAD 関連代謝物の解析を行った。以前の報告ではマラリア感染により NAD レベルが上昇することが報告されていたが、野生型マウスでは NAD レベルに感染の有無で変化はなかった。一方で、マラリアの NAD 合成経路である Preiss-Handler 経路の前駆体であるニコチン酸 (NA) は感染により著明に増加した。興味深いことに、Nmnat3 ノックアウトマウスでは、感染により NAD、ニコチンアミド (NAM)、ニコチン酸アデニンジヌクレオチド (NAAD)、NA はすべて上昇した。特に、NAD については野生型マウスより著明に増加していることが確認された。



② *In vivo* マラリア感染における細胞外 NAD 代謝の役割解析

細胞外において NAD を分解する酵素 CD38 の欠損マウスでは、好中球の遊走が傷害され、細菌感染に対して感受性が亢進することが報告されている (Nat Med 2001)。そこで、マラリア感染に対しても感受性が変化しているか確認を行った。しかしながら、CD38 欠損マウスでは野生型マウスと比較して特に、感染率、生存率に大きな差は見られなかった。CD38 にはホモログである CD157 が存在していることから、CD38/CD157 のダブルノックアウトマウスを用いてされる検討を行うため、マウスの導入を行った。今後、CD38/CD157 ダブルノックアウトマウスを用いたマラリア感染実験を行っていく予定である。

③ 細胞外 NAD シグナルの *In vitro* 培養系を用いた解析

細胞外 NAD の免疫細胞への効果を調べるため、骨髄由来マクロファージ (BMDM) を用いた *In vitro* 実験を行った。すると、NAD 投与により、IL-6 や IL-1b、TNF α といった炎症性サイトカインの発現が惹起されることが解った。細胞内 NAD がリガンドとして作用するシグナル経路として、プリン作動性受容体シグナルと TLR シグナルが考えられる。以前の報告で、ポリ ADP-リボースが TLR4 のリガンドとして作用することが報告されている (Chem Biol 2015)。そこで、TLR4 KO マウス由来 BMDM を用いてサイトカインの発現プロファイルを調べたが、野生型マウス由来 BMDM との間で大きな差はなかった。つまり、TLR シグナルは関与していないことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Fujisaka Shiho, Usui Isao, Nawaz Allah, Igarashi Yoshiko, Okabe Keisuke, Furusawa Yukihiro, Watanabe Shiro, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Watanabe Yoshiyuki, Nagai Yoshinori, Yagi Kunimasa, Nakagawa Takashi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Bofutsushosan improves gut barrier function with a bloom of Akkermansia muciniphila and improves glucose metabolism in mice with diet-induced obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-020-62506-w	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 Nishida Yasuhiro, Nawaz Allah, Kado Tomonobu, Takikawa Akiko, Igarashi Yoshiko, Onogi Yasuhiro, Wada Tsutomu, Sasaoka Toshiyasu, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Imura Johji, Tokuyama Kumpei, Usui Isao, Nakagawa Takashi, Fujisaka Shiho, Kunimasa Yagi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Astaxanthin stimulates mitochondrial biogenesis in insulin resistant muscle via activation of AMPK pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 241 ~ 258
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/jcsm.12530	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 Yasukawa Kai, Kinoshita Daisuke, Yaku Keisuke, Nakagawa Takashi, Koshiba Takumi	4. 巻 295
2. 論文標題 The microRNAs miR-302b and miR-372 regulate mitochondrial metabolism via the SLC25A12 transporter, which controls MAVS-mediated antiviral innate immunity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 444 ~ 457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1074/jbc.RA119.010511	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 Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Gulshan Maryam, Takatsu Kiyoshi, Okamoto Hiroshi, Nakagawa Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolism and biochemical properties of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) analogs, nicotinamide guanine dinucleotide (NGD) and nicotinamide hypoxanthine dinucleotide (NHD)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41598-019-49547-6	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 Hikosaka Keisuke, Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi	4. 巻 7
2. 論文標題 Implications of NAD metabolism in pathophysiology and therapeutics for neurodegenerative diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutritional Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1080/1028415X.2019.1637504	査読の有無 無
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 Okabe Keisuke, Yaku Keisuke, Tobe Kazuyuki, Nakagawa Takashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Science	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12929-019-0527-8	査読の有無 無
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 中川 崇	4. 巻 48
2. 論文標題 NAD代謝 による老化・疾患制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床化学	6. 最初と最後の頁 22~27
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 無
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 Nawaz Allah, Mehmood Arshad, Kanatani Yukiko, Kado Tomonobu, Igarashi Yoshiko, Takikawa Akiko, Yamamoto Seiji, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi, Yagi Kunimasa, Fujisaka Shiho, Tobe Kazuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Sirt1 activator induces proangiogenic genes in preadipocytes to rescue insulin resistance in diet-induced obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29773-0	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 Gulshan Maryam, Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Mahmood Arshad, Sasaki Tsutomu, Yamamoto Masashi, Hikosaka Keisuke, Usui Isao, Kitamura Tadahiro, Tobe Kazuyuki, Nakagawa Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Overexpression of Nmnat3 efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e12798 ~ e12798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace1.12798	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 Matsui Sho, Sasaki Tsutomu, Kohno Daisuke, Yaku Keisuke, Inutsuka Ayumu, Yokota-Hashimoto Hiromi, Kikuchi Osamu, Suga Takayoshi, Kobayashi Masaki, Yamanaka Akihiro, Harada Akihiro, Nakagawa Takashi, Onaka Tatsushi, Kitamura Tadahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07033-z	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 Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi	4. 巻 47
2. 論文標題 NAD metabolism: Implications in aging and longevity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ageing Research Reviews	6. 最初と最後の頁 1 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arr.2018.05.006	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 Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Hikosaka Keisuke, Nakagawa Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 NAD Metabolism in Cancer Therapeutics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2018.00622	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 Okabe Keisuke, Usui Isao, Yaku Keisuke, Hirabayashi Yoshio, Tobe Kazuyuki, Nakagawa Takashi	4. 巻 504
2. 論文標題 Deletion of PHGDH in adipocytes improves glucose intolerance in diet-induced obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 309 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.180	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 Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K	4. 巻 8
2. 論文標題 CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00231-1	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 Yamamoto M, Inohara H, Nakagawa T	4. 巻 36
2. 論文標題 Targeting metabolic pathways for head and neck cancers therapeutics	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer and Metastasis Reviews	6. 最初と最後の頁 503 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10555-017-9691-z	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 Yaku K, Okabe K, Nakagawa T	4. 巻 32
2. 論文標題 Simultaneous measurement of NAD metabolome in aged mice tissue using liquid chromatography tandem-mass spectrometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Chromatography	6. 最初と最後の頁 e4205 ~ e4205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bmc.4205	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 夜久圭介、中川崇	4. 巻 41
2. 論文標題 NAD 代謝による老化制御機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 23～27
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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 夜久圭介、中川崇
2. 発表標題 マラリア感染時の免疫応答におけるNADの役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川崇
2. 発表標題 NAD代謝の疾患生物学
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----