

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08450

研究課題名(和文) 赤血球ATP受容体シグナリングを標的にマラリア感染を防ぐ：耐性のない治療法の確立

研究課題名(英文) Role of purine nucleotide receptor signaling in *P. falciparum* invasion of erythrocytes.

研究代表者

越野 一郎 (Koshino, Ichiro)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80328377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアは年間40万人が死亡する世界最大の感染症の一つである。宿主赤血球で起こる、ATP刺激で起こる細胞内情報伝達の活性化がマラリア原虫の赤血球侵入に必須であることを実証し、それを遮断することによって新規のマラリア治療法を確立することを目的とした。

予想に反して、ATP刺激を遮断する薬剤はいずれもマラリア原虫の赤血球侵入を抑制しなかった。他方、ATP刺激によって生じるはずである赤血球内サイクリックAMP濃度の上昇を再現する種々の処置はマラリア原虫の侵入を阻害することが明らかとなった。

赤血球でのみサイクリックAMP濃度を上昇させることによるマラリア防御法の基盤を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界規模での精力的な研究にも関わらずマラリアが甚大な人的被害をもたらし続けている理由は、マラリア原虫の高頻度な遺伝子変異による薬剤耐性の獲得である。

遺伝子変異の恐れが全くない宿主赤血球を標的とし、細胞内サイクリックAMP濃度を上昇させることによってマラリア原虫の感染を抑制できることを示した本研究の成果は、薬剤耐性の発生が事実上起こり得ない全く新規の治療法を確立するための基盤となる非常に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Malaria is one of the major three infectious diseases in the world, caused by infection by malaria parasites. This study was conducted to examine if ATP-mediated intracellular signaling in host erythrocytes is critical in parasite infection, and to establish the basis for therapeutic strategy to prevent the parasite invasion of erythrocytes by interrupting the signaling pathway.

Contrary to the expectation, all reagents examined which interrupt ATP-mediated signaling failed to inhibit parasite invasion. However, several reagents that leads to elevation in intracellular cyclic AMP level inhibited parasite invasion.

These findings give some basis for therapeutic strategy by increasing cyclic AMP level exclusively in erythrocytes.

研究分野：生化学

キーワード：マラリア 赤血球 cAMP

1. 研究開始当初の背景

世界最大の感染症の1つであるマラリアが、世界規模での取組みにも関わらず甚大な人的被害をもたらしている最大の理由は、マラリア原虫の高頻度な遺伝子変異による、薬剤耐性の獲得とワクチンの標的となる原虫タンパク質の抗原性変化である。すなわち、治療薬が原虫を標的としたものである限り、多かれ少なかれ耐性株出現の危険性を潜在的に孕んでいるということで、まったく新規のアプローチによる耐性が生じない治療薬・治療法の確立が強く期待されている。

2. 研究の目的

本研究では我々が見出した「マラリア原虫の赤血球侵入における赤血球ATP受容体の関与」に基づき、赤血球ATP受容体シグナリングの役割、実体、およびそのメカニズムの解明を通して、遺伝子変異が起らない宿主赤血球を標的とした耐性を生じない全く新規の薬剤標的を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

熱帯熱マラリア原虫の in vitro 感染実験

熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*, F32 株) の in vitro 培養は定法に従い、5% ソルビトール処理ならびに磁気細胞分離法 (MACS) により分化段階の同期を行った。MACS により分離調製した成熟虫体 (分裂体) 感染赤血球を新鮮赤血球に添加し、各種薬剤の存在下で培養した。15-18 時間後に薄層塗沫を作成してギムザ染色し、新鮮赤血球への侵入により生じた感染赤血球 (輪状体) を顕微鏡観察にて算定し、感染赤血球率を求めた。

ATP 受容体アンタゴニスト

赤血球に発現していることがわかっている ATP 受容体ファミリーに対するアンタゴニスト (Table 1) を単独あるいは組み合わせて添加し、in vitro 培養系で感染実験を行い、マラリア原虫に赤血球侵入に利用されている ATP 受容体の同定を試みた。

cAMP 類似体及び各種阻害剤

当初は、上記で同定した受容体の下流のシグナル経路を同定し、それを種々の薬剤により遮断することで原虫の赤血球侵入を阻害できることを検討する予定であったが、予想に反して (1) で検討したどのアンタゴニストも侵入阻害効果を示さなかったことから、予備実験の結果より関与が強く示唆されていた細胞内 cAMP 濃度の重要性について、ホスホジエステラーゼ阻害剤 (IBMX)、PKA 阻害剤 (PKI-m)、ならびに cAMP 類似体 (Sp-cAMP、Rp-cAMP) の効果を in vitro 感染実験で検討した。

Table 1. Reagents used in this study.

Reagent	Specificity	IC/EC ₅₀
NF340	P2Y ₁₁ antagonist	72 nM
MRS2279	P2Y ₁ antagonist	51.6 nM
BX430	P2X ₄ antagonist	0.54 μM
ZM241385	adenosine A _{2A} antagonist	40 nM
Theophyllin	adenosine A antagonist	~10 μM
IBMX	PDE inhibitor	1.3 μM
Sp-cAMP	PKA activator	
Rp-cAMP	PKA inhibitor	
PKI-m	PKA inhibitor	

4. 研究成果

P2 受容体アンタゴニストの効果

G_s と共役し細胞内 cAMP を上昇させることが報告されている P2Y₁₁ 受容体に対するアンタゴニスト NF340 は検討したいずれの濃度においても原虫の赤血球侵入を阻害しなかった (Fig. 1A)。そこで赤芽球系細胞での発現が RNAseq 解析により確認されている (personal communication, Dr. Narla Mohandas, New York Blood Center) プリンヌクレオチド受容体のアンタゴニストについても検討を行ったが、効果が認められなかった (Fig. 1B-D)。

当初の予想とは異なり、ATP を

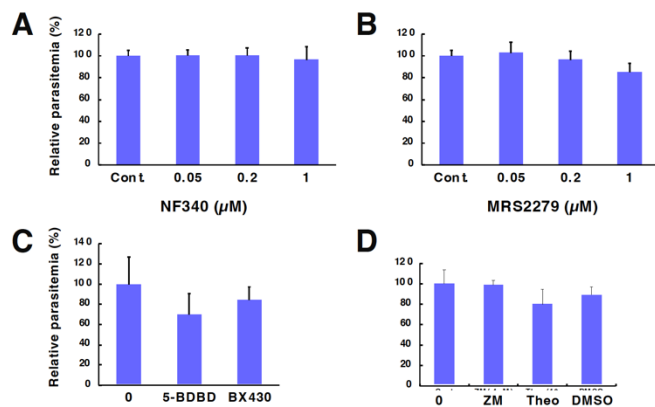


Fig. 1 Effects of P2 receptor antagonists.

(A) NF340, (B) MRS2279, (C) 5-BDBD and BX430, and (D) ZM241385 (ZM) and theophyllin (Theo) did not inhibit parasite invasion. 5-BDBD and BX430 were used at 5 μM. ZM241385 and theophyllin were used at 4 μM and 40 μM, respectively.

含むプリンヌクレオチドの受容体はマラリア原虫の赤血球侵入には重要な役割を果たしていないことが分かった。

細胞内 cAMP についての検討

上記の結果を受け、果たして cAMP は重要なのかを検証するため、細胞内の cAMP 濃度を変化させる種々の試薬が原虫の赤血球侵入に及ぼす影響について検討を行った。

cAMP を加水分解するホスホジエステラーゼ (PDE) の阻害剤である 3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) の存在下で *in vitro* 感染実験を行ったところ、IBMX の濃度依存的にマラリア原虫の赤血球侵入が阻害された (Fig. 2)。IBMX はマラリア原虫の PDE には影響しないことが報告されており、赤血球内の cAMP 濃度の上昇は原虫の赤血球侵入をむしろ抑制することが示唆された。

細胞内 cAMP の影響を直接的に検討するため、膜透過性で PDE による加水分解を受けない cAMP の類似体を用いた *in vitro* 感染実験を行った。

活性型類似体である Sp-cAMP はマラリア原虫の赤血球侵入を有意に阻害した (Fig. 3)。Sp-cAMP は、おそらく一部が膜を透過せずに脂質二重層に残ることによって、赤血球膜の物性を変化させることが分かっている (越野、未発表データ) ため、同じく膜透過性の非活性型類似体である Rp-cAMP についても検討を行った。Rp-cAMP は原虫の赤血球侵入を阻害しなかったことから、Sp-cAMP の効果は赤血球膜の物性を変化させたことではなく、細胞内 cAMP 濃度を上昇させたことによるものであると考えられた。

以上の結果より、赤血球内の cAMP 濃度が上昇するとマラリア原虫の赤血球侵入が抑制されることが明らかとなった。

PKA についての検討

細胞内 cAMP 濃度の上昇に続く細胞内シグナリング経路について cAMP で活性化されるプロテインキナーゼ A (PKA) の関与を検討した。

膜透過性の PKA 阻害剤である myristoylated PKI 14-22 アミド (PKI-m) の存在下で *in vitro* 感染実験を行ったところ、検証した濃度範囲 (-500 nM) ではマラリア原虫の赤血球侵入を阻害しないことが明らかとなった。PKI-m はマラリア原虫の PKA を阻害しないことが報告されている。

この結果から、cAMP は PKA 以外のシグナリング経路を活性化してマラリア原虫の赤血球侵入を阻害することが示唆された。

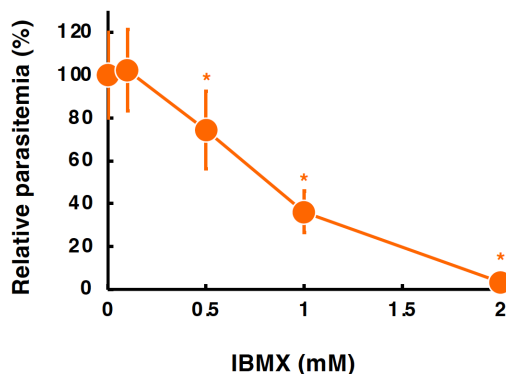


Fig. 2 Effects of a PDE inhibitor.

3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a non-selective phosphodiesterase (PDE) inhibitor, significantly inhibited Pf invasion in a dose dependent manner. This observation suggested that increased cAMP might rather inhibit Pf invasion. *: $p < 0.01$ vs 0 mM IBMX.

IBMX has been shown not to inhibit Plasmodial PDE.

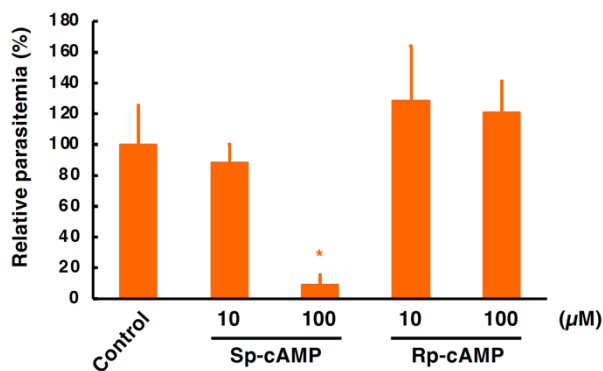


Fig. 3 Effects of active or inactive cAMP analogs.

Sp-cAMP, a membrane permeable and PDE resistant cAMP analog, significantly inhibited Pf invasion. In contrast, Rp-cAMP, an inactive cAMP analog, which antagonizes cAMP, did not affect Pf invasion. *: $p < 0.01$ vs Control.

Preliminary results showed that forskolin, an adenylate cyclase activator, also inhibits Pf invasion (not shown). These results indicated that increased cAMP inhibits Pf invasion.

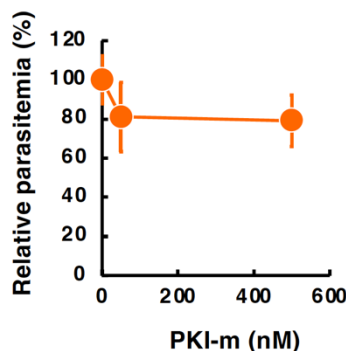


Fig. 4 Effects of a PKA inhibitor.

Myristoylated PKI 14-22 amide, a membrane permeable PKA inhibitor peptide did not affect Pf invasion, suggesting that Pf invades red cells in the absence of PKA activity.

It has been shown that non-mirystoylated version of this peptide inhibits human PKA, but not Plasmodial PKA.

結語

今回の検討ではマラリア原虫が利用している宿主赤血球側の受容体を同定することはできなかったが、細胞内 cAMP 濃度の上昇（とおそらくそれに続く細胞内シグナリング）がマラリア原虫の赤血球侵入を阻害することが明らかとなった。侵入阻害に関わるシグナリング経路は PKA を介さないものであると推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 越野一朗、中村史雄
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入におけるcAMPの役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越野一朗、中村史雄
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入に関わるプリン受容体の検索
3. 学会等名 第91回日本生化学会
4. 発表年 2018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
研究分担者	新敷 信人 (Arashiki Nobuto) (80569658)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	

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
---------	---------