

No.	25-3155	
Project Title	宿主MAPキナーゼ阻害剤によるマラリア原虫の発育抑制メカニズムの解明	
Principal Investigator	Kenji Hikosaka (Chiba University・Associate professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	Mutsuhiro Takekawa (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Professor)
	Project Member (s)	武川睦寛 (分子シグナル制御分野・教授)
	Project Member (s)	石野智子 (東京科学大学 大学院医歯学総合研究科 国際環境寄生虫病学分野・教授)
	Project Member (s)	陳雪 (千葉大学 大学院医学研究院 感染生体防御学・特任助教)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書(年次終了・研究完了)【国内】

共同研究報告 (年次終了)

世界三大感染症の一つであるマラリアは、年間約60万人の死者を出しており、その約9割がサブサハラ・アフリカに住む5歳未満の幼児である。このことから、マラリアは国際保健上、解決すべき最重要課題の一つとなっている。日本国内においても、流行地への渡航者の感染や、感染者によって国内に持ち込まれる輸入感染症としての対策が必要である。しかしながら、これらの対策の進展は順調であるとは言い難い。実際、WHOが2021年に初めて推奨したマラリアワクチンRTS, S/AS01については、その感染防御効果が速やかに低下することが報告されている。また、マラリアの第一選択治療薬であるアルテミシニンに対する耐性原虫の出現も報告されている。さらに、マラリア原虫はこれまでにアルテミシニン以外の既存薬に対しても次々と耐性を獲得してきており、薬剤耐性の進展を抑制することは撲滅対策を策定する上で最優先課題となっている。このような状況を踏まえ、本研究ではマラリア治療戦略の新たなアプローチとして宿主標的療法(Host-directed therapy, HDT)に着目している。宿主細胞内に侵入する病原体は、宿主の細胞内環境を利用して増殖する。HDTは、化合物によって宿主細胞内環境を変化させることで、病原体の発育を抑制することを目的とした治療戦略である。この療法の特筆すべき利点は、標的が病原体ではなく宿主であるため、薬剤耐性株の出現を抑制できる可能性がある点であり、これは現在のマラリア制圧における最大の課題と合致する。我々はこれまでに、原虫培養*in vitro*試験において、図1に示す宿主Mitogen-activated Protein Kinase(MAPK)経路のMEK1阻害剤が、マラリア原虫の赤血球内発育ステージを抑制することを見出している。赤血球ステージにおける発育抑制は治療上有用であるが、MEK1のリン酸化阻害がどのような機序で原虫の発育抑制につながるのかは未解明である。そこで本研究では、宿主および原虫におけるリン酸化タンパク質および転写産物の網羅的解析を行い、宿主リン酸化経路阻害剤が原虫発育に与える影響を明らかにすることを目的とする。今年度は、赤血球ステージの原虫を用いた実験において、以下の成果を得た。

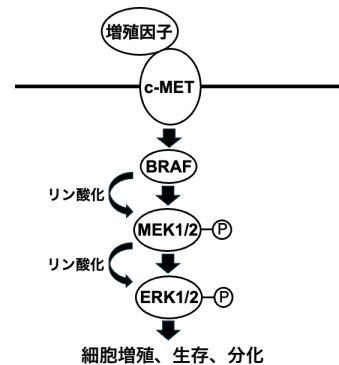


図1. 宿主のMAPK経路
連続したリン酸化により細胞の増殖、生存、分化が促進される。

1. 宿主MEK1阻害剤によるマラリア原虫赤血球ステージの発育抑制

マラリア原虫赤血球ステージの発育抑制効果をもつ宿主MEK1のリン酸化阻害剤については、2022年にAdderleyらがTrametinibを報告している(nature communications, 2020, 11, 4015)。そこで我々は、陽性コントロールTrametinibを含む9種のMAPK経路のMEK1阻害剤を用い、0.1、1、5、10 μ Mの濃度で原虫発育抑制効果について評価した。その結果、TrametinibおよびCobimetinibは5 μ M以上の濃度で効果を示した。次に、赤血球ステージの原虫の各発育ステージにおいて、MAPK経路の末端酵素(図1)であるERKのリン酸化状況を調べたところ、シゾントのステージでリン酸化が検出された(図2)。このことより、TrametinibおよびCobimetinibは原虫の発育ステージに特異的な効果を示すことが考えられたため、発育ステージを同期化した原虫を用いてそれぞれの化合物の評価を実施した。まず、TrametinibおよびCobimetinibのIC₅₀を決定したところ、それぞれ42 nMおよび3.3 μ Mであった。IC₅₀の5倍濃度のTrametinibおよびCobimetinibを、原虫の各発育ステージの培養液に4時間曝露したところ、シゾントの発育ステージにおいて原虫発育抑制効果が認められた(図3)。以上の結果より、MEK1阻害剤は、シゾント期の原虫感染時に上昇するMAPK経路のリン酸化状態を阻害することで、原虫の発育を阻害していることが示唆された。

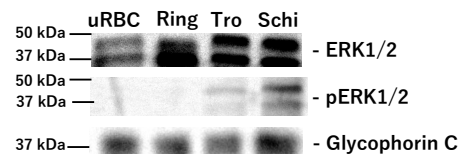


図2. 各原虫発育ステージにおけるERKのリン酸化状況

uRBC: 非感染赤血球、Ring: リング、Tro: トロフォゾイト、Schi: シゾント

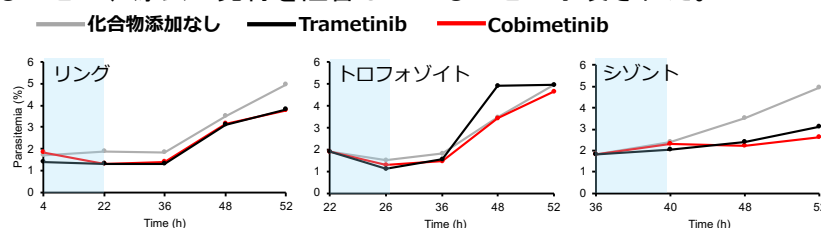


図3. 発育ステージを同期化した原虫に対する Trametinib および Cobimetinib の発育抑制効果
時間(Time)はリング同期化後の培養時間、水色の部分は4時間の化合物曝露を示す。

2. MEK1以外のMAPK経路関連酵素の阻害剤によるマラリア原虫赤血球ステージの発育抑制

上述したように、MEK1のリン酸化阻害剤はシゾント期原虫の発育を抑制した。そこで、MAPK経路のMEKの上流と下流の酵素に対する阻害剤の評価を実施した。阻害剤は、MEK1の上流に存在するc-MET（増殖因子受容体）の阻害剤であるTivantinib、MEK1のリン酸化に関与するBRAFの阻害剤であるSB590885、MEK1の下流に存在するERKのリン酸化阻害剤であるSCH772984の3つの化合物を用いた（図1参照）。それぞれの化合物を、0.1、1、5、10 μM の濃度で原虫培養液に添加し、原虫発育抑制効果について評価した。その結果、Tivantinibは10 μM までの濃度で効果を示さなかったが、SB590885は5 μM 以上で、SCH772984は1 μM 以上で高い原虫発育抑制効果を示した（図4）。これにより、MEK1のリン酸化に直接関与する酵素の阻害が、マラリア原虫の発育を抑制することが考えられた。

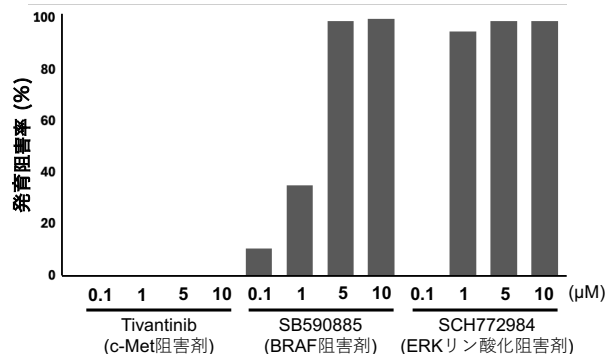


図 4. MAPK 経路関連酵素の阻害剤によるマラリア原虫発育抑制

今後の展開

宿主リン酸化タンパク質が原虫の発育にどのように関わっているのかをより詳細に解明するため、以下の実験を計画している。

1. 宿主細胞及び原虫のキノーム解析及びトランスクリプトーム解析

1年目に得られた知見を基に使用する化合物を選定し、宿主細胞および原虫のキノーム解析を実施することで、宿主リン酸化タンパク質が原虫タンパク質のリン酸化に与える影響を評価する。さらに、トランスクリプトーム解析を併せて実施し、宿主MEK1の阻害が宿主および原虫双方の転写活性に及ぼす影響を解析する。

2. 原虫のメタボローム解析による宿主MEK1リン酸化阻害による原虫代謝経路の変化の特定

原虫の発育抑制がどの代謝経路の変化に起因するのかを明らかにする。これにより、宿主リン酸化タンパク質の関与の具体的な機序の解明を目指す。

3. MEK1ノックアウトHepG2細胞へのマラリア原虫感染

本研究で着目している「マラリア治療におけるHDTの応用」では、マラリア原虫の肝臓ステージも重要な標的と位置付けている。原虫の感染成立には、肝細胞への侵入および細胞内での増殖が不可欠であり、本研究ではこのステージにおける宿主MAPK経路と原虫発育の関係にも着目する。研究代表者らは1年目にMEK1ノックアウトHepG2細胞を樹立した。2年目には、このノックアウト細胞にマラリア原虫を感染させ、その発育・増殖を評価するとともに、赤血球ステージで用いた網羅的解析手法を適用し、肝細胞内における分子変化についても検討する予定である。