特 集 第70回日本衛生動物学会大会シンポジウム 特別寄稿文

肝臓ステージを標的とした新規抗マラリア戦略の開発研究

伴 戸 博 徳, 山 本 雅 裕*

大阪大学微生物病研究所感染病態分野
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1)

(受領: 2018年8月3日; 掲載決定: 2018年8月24日)

Antimalaria drug discovery for host factor targeting liver-stage malaria

Hironori BANDO and Masahiro YAMAMOTO*

* Corresponding author: myamamoto@biken.osaka-u.ac.jp
Department of Immunoparasitology, Research Institute for Microbial Diseases (RIMD), Osaka University,
3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received: 3 August 2018; Accepted: 24 August 2018)

マラリアはエイズ・結核に並ぶ世界三大感染症の一つであり、世界保健機関（WHO）によると、2016年には44万人以上ものマラリア死亡者が推定されている。未だ有効なワクチンは存在しないが、クロロキンを始めとする様々な抗マラリア薬が開発されており、一度は感染者数および死亡者数が減少した。しかしながら近年、薬剤耐性原虫の急速な出現および拡散に伴い、マラリアは再び猛威を振るい始めている。マラリアは複雑な生活環をもっており、宿主の肝臓期、赤血球内期、そして媒介昆虫である蚊の体内期がある。既存の抗マラリア薬の多くは“赤血球期原虫”を作用標的としている（Delves et al., 2012）。しかし、マラリア原虫は抗原遺伝子が多形であることや、遺伝的可変性が高いなどの理由から薬剤耐性の獲得が早く、現在マラリア治療の第一選択薬であるアルテミシニンにおいても、すでに耐性原虫の出現が確認されている。また、既存薬の多くは特定のマラリア原虫分化ステージの虫体を作用標的としているため、作用点が類似しており、同時に複数の薬剤耐性を持つ多剤耐性原虫も出現してきており、治療薬および予防薬の選択肢がほとんど無いのが現状である。こうして、代替薬開発および既存薬との併用療法に利用可能な新規抗マラリア薬の開発が急務とされている。

そこで我々は、新規抗マラリア戦略基盤創出に向けて、これまで研究が困難であるなどの理由により標的とされてこなかった肝臓期原虫に着目した。媒介昆虫から宿主に感染したマラリア原虫（スポロゾイト）はまず肝臓へ到達し、非増殖型から増殖型の肝内型原虫へ形態変化を行う。このことから、肝臓期原虫の感染を阻止すると発病することは無く、また、赤血球期に入る前に原虫の増殖を抑えることで、再伝播も確実に防ぐことが可能と考えられる。実際に、肝臓期原虫の増殖速度を一過的に抑制する事が、脳性マラリアの発症を抑制することがマウスマラリアモデルによって証明されており（Lewis et al., 2015）、また、マラリアワクチン候補の一つ

であるRTS,Sにおける人の臨床試験においても、肝臓期原虫の増殖速度を抑える事で、脳性マラリアの発症が一部抑制される事が示唆されている（Alonso et al., 2004; Bejon et al., 2005; Agnandji et al., 2012）。以上の理由から、本研究は、従来からの課題を克服する次世代の抗マラリア薬開発の基盤創出に向けて、“肝臓期原虫”の分化・増殖に重要な役割を果たす、新規創薬標的となりうる“宿主因子”の探索を行うこととした。

まず始めに、2008年に行われた727個の遺伝子をターゲットとしたキナーゼ特異的なRNAiスクリーニングの結果を基に（Prudencio et al., 2008）、肝内型原虫数の抑制率と細胞の増殖率、遺伝子の機能などのデータから、8個の新規創薬標的候補遺伝子を選定した。次にこれらについて、CRISPR/Cas9ゲノム編集法によりキナーゼドッドまたはキナーゼノックアウトの肝細胞を作成し、マウスマラリア原虫（*Plasmodium berghei*）の*in vitro*感染実験により、宿主キナーゼが肝臓期原虫に及ぼす影響を評価した。その結果、両細胞において肝内型原虫数を60%以上抑制するキナーゼを3つ取得した（図1a）。そのうちのひとつであるキナーゼ：METは先行研究が存在しており、スポロゾイトが肝細胞へ侵入後、細胞間を通過する際にMETおよび下流のシグナル経路の活性化が起こり、これがマラリア原虫感染にとって重要な役割を果たしていることが明らかとなっている（Carrolo et al., 2003; Leiriao et al., 2005）。一方、残り2つ（リン酸化酵素：キナーゼAおよび受容体型チロシンキナーゼ：キナーゼB）がマラリア原虫感染において果たす役割に関してはほとんど明らかとなっていない。また、今回取得した3つのキナーゼについてノックアウトマウスは存在するが、MET欠損マウスは胎性致死であり、キナーゼB欠損マウスは出生率の低下や生育異常などが起こることが知られている。一方、キナーゼA欠損マウスに特徴的に表現型は知られていない。このことから、キナーゼAは他のキナーゼと比較して、副作用等な観点からも創薬

図1. 新規創薬標的としてのキナーゼAの*in vitro*有効性実証試験.

図2. 新規創薬標的としてのキナーゼAの*in vivo*有効性実証試験.

標的として有用であることが推察されるため、本研究ではキナーゼAに着目し、より詳細な作用点解析および*in vivo*実験を進めた。

まず、感染3時間の細胞内に存在する原虫数の比較を行ったが、野生型とキナーゼA欠損細胞の間に差は見出されなかった(図1b)。このことから、キナーゼAはスポロゾイトの細胞への侵入に影響を及ぼさないことが明らかとなった。次に、スポロゾイトは肝細胞へ感染後24時間以内に、増殖型の肝内型原虫へ分化することが知られているため、感染後

24時間の細胞内に存在する原虫の形態比較を行った(図1c)。その結果、キナーゼA欠損細胞内では、感染後24時間でもほとんどの原虫がスポロゾイトの状態が存在しており、原虫の形態変化が正常に進んでいないことが明らかとなった(図1c)。このことから、キナーゼAはスポロゾイトが肝内型原虫へ形態を変化させていくために重要に役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに、マウスマラリアモデルを用いた*in vivo*での Proof of Concept (POC) 取得に向けて、キナーゼA欠損マウスの

作成および *in vivo* 感染実験を行い、マウスの生存率比較および肝臓期原虫の感染動態解析を行った (図2)。生体イメージング観察装置 (IVIS) による肝臓内原虫数の比較および血中への原虫放出量を野生型のマウスと比較解析した結果、キナーゼA欠損マウスでは、肝臓内の原虫数が減少し (図2a)、血中へのマラリア原虫放出時期の遅延および放出原虫数の抑制が起こり (図2b)、脳性マラリア発症による死亡が60%以上抑制されることを明らかにした (図2c, 2d)。

以上の結果から、キナーゼAは“肝臓期原虫”の形態変化に重要な役割を果たす、新規創薬標的となりうる“宿主因子”であることが、*in vitro* および *in vivo* 実験によって示された。そこで今後は、キナーゼAの作用機序の解明を進めるとともに、キナーゼAまたはその関連シグナル経路の宿主因子を標的とした新規創薬候補遺伝子の探索とモデル化合物のスクリーニングを行う予定である。

文 献

- Agnandji, S. T., Lell, B., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Methogo, B. G., Kabwende, A. L., Adegnik, A. A., Mordmüller, B., Issifou, S., Kremsner, P. G., Sacarlal, J., Aide, P., Lanasp, M., Aponte, J. J., Machevo, S., Acacio, S., Bul, H., Sigauque, B., Macete, E., Alonso, P., Abdulla, S., Salim, N., Minja, R., Mpina, M., Ahmed, S., Ali, A. M., Mtoro, A. T., Hamad, A. S., Mutani, P., Tanner, M., Tinto, H., D' Alessandro, U., Sorgho, H., Valea, I., Bihoun, B., Guiraud, I., Kaboré, B., Sombié, O., Guiguemdé, R. T., Ouédraogo, J. B., Hamel, M. J., Kariuki, S., Onoko, M., Odero, C., Otieno, K., Awino, N., McMorro, M., Muturi-Kioi, V., Laserson, K. F., Slutsker, L., Otieno, W., Otieno, L., Otsyula, N., Gondi, S., Otieno, A., Owira, V., Oguk, E., Odongo, G., Woods, J. B., Ogutu, B., Njuguna, P., Chilengi, R., Akoo, P., Kerubo, C., Maingi, C., Lang, T., Olotu, A., Bejon, P., Marsh, K., Mwambingu, G., Owusu-Agyei, S., Asante, K. P., Osei-Kwakye, K., Boahen, O., Dosoo, D., Asante, I., Adjei, G., Kwara, E., Chandramohan, D., Greenwood, B., Lusingu, J., Gesase, S., Malabeja, A., Abdul, O., Mahende, C., Liheluka, E., Malle, L., Lemnge, M., Theander, T. G., Drakeley, C., Ansong, D., Agbenyega, T., Adjei, S., Boateng, H. O., Rettig, T., Bawa, J., Sylverken, J., Sambian, D., Sarfo, A., Agyekum, A., Martinson, F., Hoffman, I., Mvalo, T., Kamthunzi, P., Nkomo, R., Tembo, T., Tegha, G., Tsidya, M., Kilembe, J., Chawinga, C., Ballou, W. R., Cohen, J., Guerra, Y., Jongert, E., Lapierre, D., Leach, A., Lievens, M., Ofori-Anyinam, O., Olivier, A., Vekemans, J., Carter, T., Kaslow, D., Leboulloux, D., Loucq, C., Radford, A., Savarese, B., Schellenberg, D., Sillman, M. and Vansadia, P.; RTS,S Clinical Trials Partnership. 2012. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *N. Engl. J. Med.*, 367: 2284–2295.
- Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., Bassat, Q., Aide, P., Ofori-Anyinam, O., Navia, M. M., Corachan, S., Ceuppens, M., Dubois, M. C., Demoitié, M. A., Dubovsky, F., Menéndez, C., Tornieporth, N., Ballou, W. R., Thompson, R. and Cohen, J. 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*, 364: 1411–1420.
- Bejon, P., Andrews, L., Andersen, R. F., Dunachie, S., Webster, D., Walther, M., Gilbert, S. C., Peto, T. and Hill, A. V. 2005. Calculation of liver-to-blood inocula, parasite growth rates, and preerythrocytic vaccine efficacy, from serial quantitative polymerase chain reaction studies of volunteers challenged with malaria sporozoites. *J. Infect. Dis.*, 191: 619–626.
- Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigario, A. M., Silva, S., Leiriao, P., Carapau, D., Armas-Portela, R., Comoglio, P. M., Rodriguez, A. and Mota, M. M. 2003. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat. Med.*, 9: 1363–1369.
- Delves, M., Plouffe, D., Scheurer, C., Meister, S., Wittlin, S., Winzeler, E. A., Sinden, R. E. and Leroy, D. 2012. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med.*, 9: e1001169.
- Leiriao, P., Albuquerque, S. S., Corso, S., van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Rodriguez, A., Giordano, S. and Mota, M. M. 2005. HGF/MET signalling protects *Plasmodium*-infected host cells from apoptosis. *Cell. Microbiol.*, 7: 603–609.
- Lewis, M. D., Behrends, J., Sa, E. C. C., Mendes, A. M., Lasitschka, F., Sattler, J. M., et al. 2015. Chemical attenuation of *Plasmodium* in the liver modulates severe malaria disease progression. *J. Immunol.*, 194: 4860–4870.
- Prudencio, M., Rodrigues, C. D., Hannus, M., Martin, C., Real, E., Goncalves, L. A., Carret, C., Dorkin, R., Röhl, I., Jahn-Hoffmann, K., Luty, A. J., Sauerwein, R., Echeverri, C. J. and Mota, M. M. 2008. Kinome-wide RNAi screen implicates at least 5 host hepatocyte kinases in *Plasmodium* sporozoite infection. *PLoS Pathog.*, 4: e1000201.