

氏名	松森 宏明
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第 7261 号
学位授与の日付	令和 7 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文の題目	マラリア病態モデルを用いた新規環状過酸化物・N-89 の治療早期におけるマラリア原虫反応様式の解析

学位論文要約

【背景・目的】

従来のマラリア治療薬・chloroquine や mefloquine に対する耐性マラリア原虫の出現報告だけでなく、WHO が推奨する第一選択治療薬・artemisinin (ART) (図 1A) に対する耐性マラリア原虫の出現は、マラリアの制圧および治療を困難にさせる。そのため、新規抗マラリア薬の開発が急務である。ART 分子内の endoperoxide 構造に着目した新規抗マラリア薬の開発研究において、我々は *in vitro* および *in vivo* で優れた抗マラリア活性を示す 1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadecane (N-89) を見出した (図 1B)。昨今、マラリアに関連する死者の約 8 割を 5 歳未満の小児が占める報告から、我々は小児でも使用しやすい剤形の開発に研究方針を転換し、polyethylene glycol (PEG) を基剤とした経皮吸収製剤 (transdermal formulation: td) を見出した。td N-89 (60 mg/kg) をネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) 感染マウスに 1 日 2 回を 4 日間塗布すると、再燃することなく完治することを既に報告している。当該研究において、マラリア病態モデルマウスの感染率は td N-89 投与後 24 時間目をピークに減少するが、24 時間目までにマラリア原虫がどのような反応を示すかについては明らかではない。また、これまでの N-89 作用機序解析の過程において、我々は N-89 の標的候補分子として、原虫小胞体に局在する endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein (ERC) を同定しており、N-89 処理によってタンパク量が低下することを報告している。

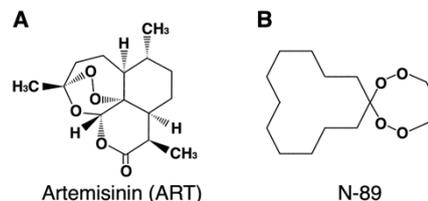


図1. (A) ART および (B) N-89 の構造式

本研究は、td N-89 を含む抗マラリア活性化合物の薬効を事前予測できるかどうかを明らかにすることを目的として、マラリア病態モデルマウスへ td N-89 を処理した直後におけるマラリア原虫のステージ分布、形態および原虫遺伝子の発現変化を解析した。

【実験方法】

5~7 週齢の ICR マウスの背部を 4 cm² に剃毛し、感染率が 0.2~0.4 % となった時点において、剃毛領域へ N-89 を含む軟膏製剤 (約 65 mg/回) を塗布した。比較対象として ART を使用し、control 群は PEG 製剤のみを塗布した。

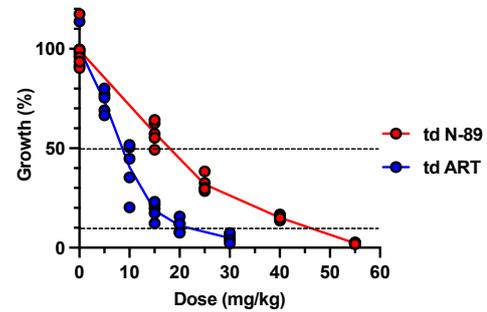
1. 4-day suppressive test 法を用いて、td N-89 および td ART の 50 % および 90 % マラリア原虫阻害活性量 (effective dose of 50 % or 90 %: ED₅₀ or ED₉₀ 値) を算出した。
2. td N-89 あるいは td ART を 1 日 2 回、4 日間処理することによる *P. berghei* 感染マウスの感染率推移および生存日数を解析した。
3. td N-89 による *P. berghei* 原虫のステージ分布・形態変化を光学顕微鏡で観察した。
- 4-5. td N-89 あるいは td ART 処理による *P. berghei* への影響を解析するため、同じマウスから得られた血液を経時的に採取し、各々の遺伝子発現レベルを相対定量法で評価した。

【結果】

1. *P. berghei* 感染マウスに対する td N-89 および td ART のマラリア原虫阻害量の算出

4-day suppressive test 法を用いて、td N-89 および td ART の用量反応曲線を作成し (図 2)、各薬剤のマラリア原虫阻害量 (ED) ED₅₀ および ED₉₀ 値を算出した (td N-89: ED₅₀; 17.6 ± 3.2 mg/kg, ED₉₀; 46.0 ± 4.0 mg/kg. td ART: ED₅₀; 8.6 ± 2.1 mg/kg, ED₉₀; 21.8 ± 3.9 mg/kg, n=5)。td N-89 の ED₅₀ および ED₉₀ 値は既存の報告と同等であった。一方、ART は経皮吸収製剤として抗マラリア活性を示すことが初めて分かった。以後の実験は完治量に近似な ED₉₀ 値の td N-89 および td ART を用いた。

図 2. *P. berghei* 感染マウスに用量が異なる td N-89 および td ART を 1 日 1 回、4 日間塗布した後における用量反応曲線。4 日目における control 群の感染率を “Growth 100 %” とした。使用した td N-89 および td ART の量は以下の通りである。td N-89: 0, 15, 25, 40 および 55 mg/kg, td ART: 0, 5, 10, 15, 20 および 30 mg/kg。td N-89 および td ART の ED₅₀ および ED₉₀ 値は、黒点線上の数値とした。(n=5)



2. *P. berghei* 感染マウスへ td N-89 を処理した後における感染推移と生存日数の評価

我々は、60 mg/kg の td N-89 を *P. berghei* 感染マウスに 1 日 2 回を 4 日間塗布すると再燃することなく完治する研究を既に報告している。そこで、同様のスケジュールにおいて、ED₉₀ 値の td N-89 あるいは td ART 処理による *P. berghei* 感染マウスの感染率推移と生存日数を 30 日間評価した。td N-89 群の感染率は塗布開始 24 時間目をピークにその後減少し (図 3A)、8 匹中 3 匹が完治し、平均生存日数は 22.4 ± 7.9 日以上だった (図 3B)。一方、td ART 群の感染率は、塗布開始 12 時間後をピークにその後減少したが (図 3A)、塗布終了直後から再上昇し、平均生存日数は 11.0 ± 0.8 日だった (図 3B)。td N-89 群の生存日数は td ART 群と比べて有意に延長した (図 3B)。

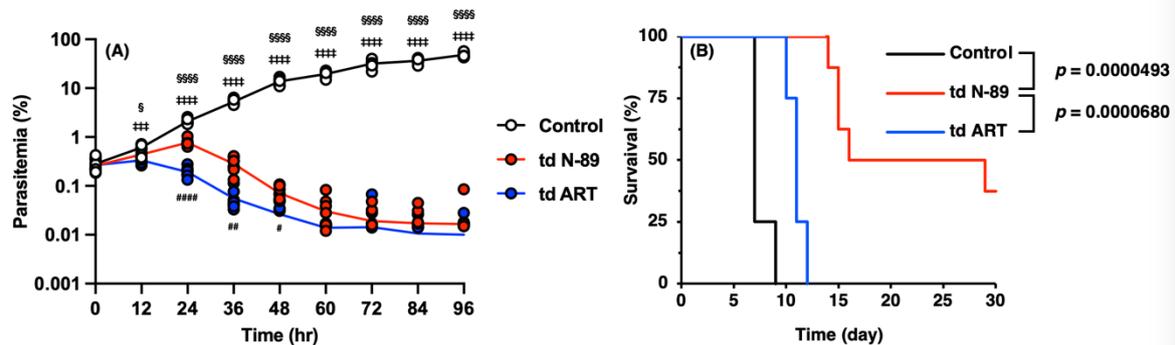


図 3. *P. berghei* 感染マウスに td N-89 あるいは td ART を 1 日 2 回 4 日間塗布した際の (A) 感染率推移と (B) 生存日数。§: control 群と td N-89 群の比較; §: p -value < 0.05, §§: p -value < 0.01, §§§: p -value < 0.0001, ‡: control 群と td ART 群の比較; ‡: p -value < 0.05, ‡‡: p -value < 0.001, ‡‡‡: p -value < 0.0001, #: td N-89 群と td ART 群の比較; #: p -value < 0.05, ##: p -value < 0.01, ####: p -value < 0.0001。

3. *P. berghei* 感染マウスへ td N-89 を処理した後における原虫ステージ分布・形態の変化

td N-89 を塗布すると 24 時間時点まで減少した結果から、td N-89 処理後における *P. berghei* のステージ分布および形態変化を 24 時間時点まで観察した。Control 群と td N-89 群の ring のステージ分布は 12 時間時点まで変化はみられなかったが、24 時間時点における td N-89 群の ring parasites は、control 群と比べて、増加した (図 4A)。Ring parasites の形態変化はみられなかった。Schizont parasites の形態は変化がみられなかった一方、ステージ分布は、12 時間目まで control 群と同様の分布を示し、24 時間目まで有意に低下した (図 4B)。td N-89 群の trophozoite ステージ分布は、control 群と比べて、12 時間目までは同様の推移を示したが、24 時間目では、有意に低下した。また、td N-89 処理後 8 時間目から、原虫の核 (水色) や不規則な形状の細胞質 (緑色) を特徴とする abnormal trophozoites が観察され、時間依存的に増加した (図 4D-E)。この結果から、td N-89 は投与直後から原虫に影響を及ぼし、abnormal な trophozoite parasites が早期に観察されることが *in vivo* 実験で初めて分かった。

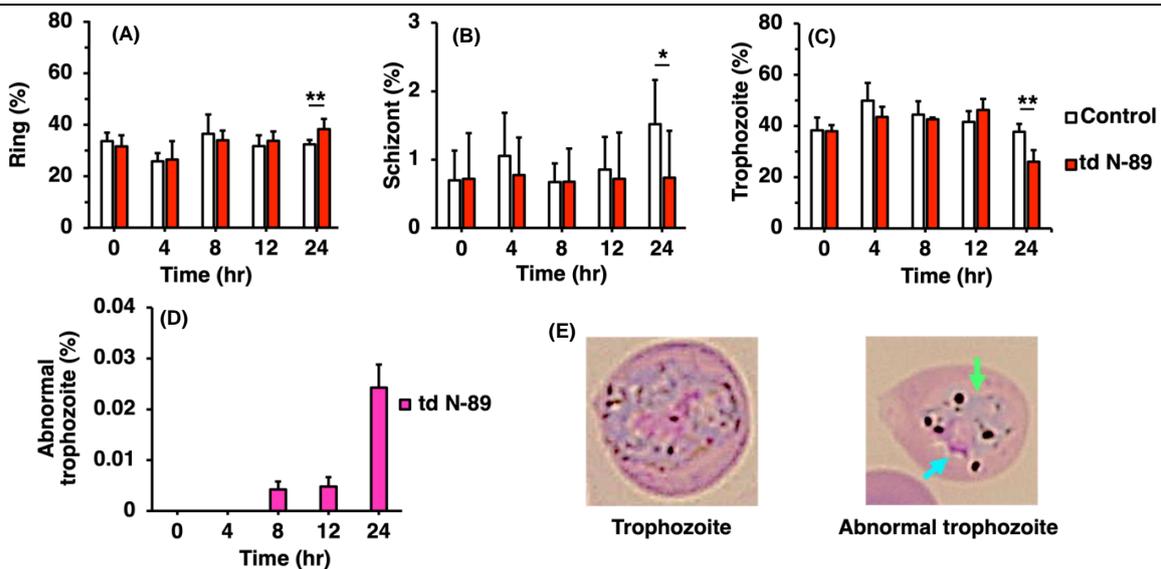


図4. *P. berghei* 感染マウスに td N-89 を1日2回、1日間塗布した際の赤内期マラリア原虫のステージ分布推移および形態。(A) ring parasites, (B) schizont parasites, (C) trophozoite parasites, (D) abnormal trophozoites. (E) normal trophozoite (左) および abnormal trophozoite (右, 水色; 凝縮した核, 緑色; 不規則な形状の細胞質)。 (n=8) *: p -value < 0.05, **: p -value < 0.01。

4. *P. berghei* 感染マウスへ td N-89 あるいは td ART を処理した後における *PbERC* 遺伝子の発現変動

td N-89 処理後8時間目から abnormal trophozoites がみられた結果を踏まえ、12時間目までの遺伝子発現変化を相対定量法で解析した。内在性コントロールとして用いた *PbGAPDH* の threshold cycle (C_T value) は、薬剤投与の有無に関わらず、12時間時点まで変化しなかった (図5A)。薬剤処理による *PbERC* 遺伝子発現変動を検証したところ、control 群と比較して、td N-89 群の *PbERC* は2時間目から12時間目まで遺伝子発現が継続的に抑制された (図5B-C)。一方、td ART 群の *PbERC* 遺伝子発現は、control 群と比べて、4時間目から8時間目まで抑制されたが、12時間目では同等の発現量だった (図5B-C)。これら結果より、N-89 は *PbERC* と特異的に作用するが、ART と *PbERC* の関連は低いことが示唆された。

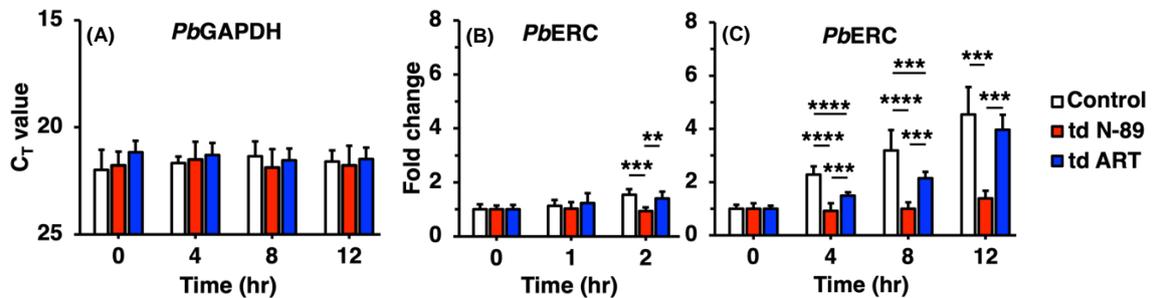


図5. *P. berghei* 感染マウスに td N-89 あるいは td ART を処理した後における (A) *GAPDH* の C_T value および (B, C) *PbERC* 遺伝子発現レベルの経時的な変化 (n=4)。 **: p < 0.01, ***: p < 0.001, ****: p < 0.0001。

5. *P. berghei* 感染マウスへ td N-89 あるいは td ART を処理した後における原虫のオートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子の発現変動

td N-89 処理後、原虫の形態が不完全な abnormal trophozoites が時間依存的に増加した結果より、td N-89 が原虫細胞死を誘導する可能性が予測された。そこで、原虫のオートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子が td N-89 処理によって変動するかを解析した。原虫生存に必須の apicoplast 膜形成に関与するオートファジー関連遺伝子 (autophagy-related gene: ATG) ・ ATG5, ATG8 および ATG12 の発現は、td N-89 処理によって抑制された (図6A-C)。また、有性生殖期・gametocytes の形成と適正数の維持に必要なアポトーシス関連遺伝子・metacaspase 2 (MCA2) は、td N-89 処理によって増加する結果を得た。これら結果は、td N-89 が apicoplast 膜形成および gametocytes 形成と適正数の維持に異常を来たす可能性が示唆された。

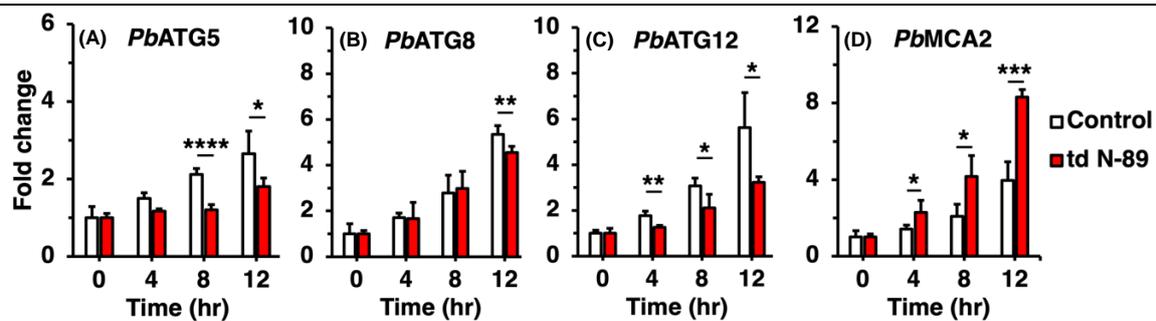


図6. *P. berghei* 感染マウスに td N-99 を処理した後に原虫オートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子の経時的な変化 (n=8). (A) *PbATG5*, (B) *PbATG8*, (C) *PbATG12*, (D) *PbMCA2*. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

【考察】

本研究により、以下の知見を得た。

1. N-89 と同じ分子構造を有する ART が経皮吸収製剤として抗マラリア活性を示した。
2. 同等の抗マラリア活性を示す量の td N-89 および td ART を *P. berghei* 感染マウスへ処理したにも関わらず、処理終了後における td N-89 群の平均生存日数は、td ART 群と比べて、有意に延長した。
3. td N-89 は、ring parasites から trophozoite parasites への形態移行を阻害することで、trophozoite および schizont parasites のステージ分布が低下した。
4. td N-89 処理により、異形な abnormal trophozoites が時間依存的に出現・増加した。
5. ERC は、td N-89 との関連性が高い一方、td ART との関連性は低いことが示唆された。
6. td N-89 は、原虫細胞死に影響を及ぼす可能性が考えられた。

マラリア感染症に対する第一選択治療薬・N-89 と同じ分子内構造を有する ART は、経皮吸収製剤としても抗マラリア活性を示すが、治療による平均生存日数は td N-89 群の方が長いことを初めて明らかにした。単剤 ART を投与されたマラリア患者は、完治しにくく再燃しやすい報告が多数あり、本研究で得られた結果を支持すると考えられる。また、マラリア感染赤血球がマウスの脾臓で処理されたため、abnormal trophozoite は想定していた数より少なく検出されたが、時間経過と共に増加することを *in vivo* で明らかにした。

td N-89 は、*PbERC* 発現を2時間目から12時間目まで継続的に抑制するだけでなく、生存や有性生殖原虫への分化に必要な発現を遺伝子レベルで処理早期から制御することで、マラリア原虫は死に至る可能性が推測された。しかし、td N-89 が *PbERC* を含む遺伝子発現を変動させるメカニズムは本研究で明らかにできなかった。td N-89 の作用機序を明らかにするため、今後は td N-89 処理後における原虫遺伝子発現の変動を網羅的に解析する必要がある。

【結論】

本研究により、td N-89 は *PbERC* 遺伝子発現を阻害し、細胞死関連遺伝子を変動させることで、abnormal trophozoites が検出されることを *in vivo* で初めて明らかにした。これら結果は、td N-89 の抗マラリア薬効 (感染率低下) がみられる前の原虫側における反応であり、特に、*PbERC* 遺伝子発現が早い段階から変動することが分かった。以上より、td N-89 は td ART とは異なる作用機序を介して抗マラリア活性を示すことをマラリア病態モデルマウスを用いた *in vivo* 実験で初めて明らかにした。

3 参考論文および関連文献

【参考論文】

1. The antimalarial activity of transdermal N-89 mediated by inhibiting ERC gene expression in *P. berghei*-infected mice. H. Matsumori, T.Q. Dinh, S. Miyoshi, M. Morita, H.-S. Kim. *Parasitol. Int.* 106 (2025), 103026.

【関連文献】

なし