

氏名（本（国）籍）	Ehab Elnour Ahmed Mossaad（スーダン共和国）
主指導教員名	帯広畜産大学 教授 河津 信一郎
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第431号
学位授与年月日	平成27年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学位論文題目	Studies on Calcium Signaling in Hemoprotozoan Parasites （住血原虫におけるカルシウムシグナリングに関する研究）
審査委員	主査 帯広畜産大学 教授 鈴木 宏志 副査 帯広畜産大学 教授 河津 信一郎 副査 岩手大学 教授 板垣 匡 副査 東京農工大学 准教授 古谷 哲也 副査 岐阜大学 教授 志水 泰武

学位論文の内容の要旨

マラリアは *Plasmodium* 属住血原虫の人体寄生によるハマダラカ媒介性の熱帯感染症で、世界の 90 を越える国と地域で流行が認められる。2012 年には約 2 億人がマラリアに感染し、このうち約 63 万人が不幸にしてこの感染症によって命を落としている。このように、マラリアは依然として世界的感染症の筆頭に挙げられ、その画期的な治療法・予防法の開発が待たれている。*Plasmodium falciparum* による熱帯熱マラリアは、ヒトの 5 種類のマラリアのうち最も重篤な感染症となる。マラリアの治療は抗マラリア薬による化学療法が基本になる。一方、これまで広汎に使用されてきた抗マラリア薬、例えばクロロキン（CQ）では既に薬剤耐性マラリア原虫が出現し、その拡散が世界のマラリア流行地で深刻な問題となっている。

Babesia 属住血原虫 *Babesia bovis* の寄生によるウシのバベシア症は、マダニ媒介性の感染症で、世界各地の畜産業に経済的な被害を及ぼしている。バベシア症の治療もジアミジン誘導体やイミドカルブによる化学療法が基本になるが、これら薬剤に対する耐性原虫の出現が既に報告されている。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、住血原虫の細胞を含む真核生物の細胞において、多彩な生理機能を調節する重要な細胞内情報伝達因子となる。マラリア原虫やバベシアなどの住血原虫の細胞と宿主となる哺乳動物の細胞では、 Ca^{2+} による細胞生理機能の調節 (Ca^{2+} シグナリング) にいくつかの相違点が認められ、これらはマラリアやバベシア症の新規治療法開発の標的として着目されている。

本研究では、 Ca^{2+} シグナリング阻害剤の薬剤耐性マラリア治療法への応用および、 Ca^{2+} シグナリングのバベシア赤血球内発育型（メロゾイト）の赤血球からの遊出（エグレス）

での役割について検討した。

第一章では、 Ca^{2+} シグナリング阻害剤と CQ の併用が CQ 耐性マラリア原虫の *in vitro* 増殖に与える影響について検討した。1, 4, 5-trisphosphate (IP_3) 受容体を阻害する薬剤、2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) を熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の *in vitro* 培養感染血に添加すると原虫細胞に重篤な発育障害が生じる。一方で、CQ がマラリア原虫細胞に作用すると細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇するという報告がある。そこで、これら原虫細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常性を阻害する化合物の併用が原虫細胞の生理にどのような影響を与えるかを検証した。CQ 耐性 *P. falciparum* K1 株 *in vitro* 培養感染血に種々の濃度の CQ と 2-APB を同時に投与すると、同原虫株増殖の CQ による 50% 阻害濃度 (IC_{50}) が耐性域から感受性域に低下し、CQ 耐性が消失した。蛍光カルシウム指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージング実験の結果、CQ の投与によって酸性食胞 (AFV) に貯蔵された Ca^{2+} が細胞質に放出される現象を観察した。また、蛍光 pH 指示薬を用いた同様の実験で、CQ 投与時に原虫細胞質の pH が低下する現象を観察した。CQ は AFV に集積し、CQ 耐性原虫では CQ とともに H^+ が AFV から細胞質に放出されることが知られている。このことから、CQ 耐性原虫では CQ 投与が AFV をアルカリ化することで Ca^{2+} が細胞質に漏れ出すと考察した。CQ と 2-APB の同時投与による CQ 耐性消失のメカニズム解明に興味を持たれるところである。

第二章では、2-APB と CQ の併用が CQ 耐性マラリア原虫の *in vivo* 増殖に与える影響について検討した。ネズミマラリア原虫 *P. chabaudi* CQ 耐性 AS (30CQ) 株を ICR マウスに原虫感染血の腹腔内接種で感染させて、CQ 単独および CQ と 2-APB の同時投与で治療した。その結果、CQ の単独投与は寄生率の推移に影響を及ぼさなかった。一方、2-APB 同時投与群で、有意な寄生率の減少と CQ 耐性の消失を観察した。

第三章では、バベシアにおいて、細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇がメロゾイトのエグレスを誘導するかを検証した。*B. bovis* の *in vitro* 培養感染血にカルシウムイオノフォア A23187 を投与し、原虫寄生率の推移を観察した。その結果、A23187 投与群において寄生率の有意な低下とその後の寄生率の有意な上昇が観察された。このことから、A23187 による原虫細胞質の Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇が *B. bovis* メロゾイトのエグレスを誘導したことが示唆された。また、小胞体などのオルガネラに局在する Ca^{2+} -ATPase の阻害剤、タプシガルギン (Tg) を *B. bovis* の *in vitro* 培養感染血に投与したところ、赤血球外に遊出したメロゾイトの数の経時的な上昇が観察された。蛍光カルシウム指示薬と共焦点レーザー顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージング実験で、A23187 および Tg の投与によって実際に *B. bovis* メロゾイト細胞質の Ca^{2+} 濃度が上昇することも確認され、Tg 感受性のオルガネラから細胞質への Ca^{2+} 放出が *B. bovis* メロゾイトのエグレスに関与していることが示唆された。 Ca^{2+} 放出以降エグレス惹起までのカスケードの解明に興味を持たれるところである。

以上の成績から、CQ と 2-APB を同時に投与する処方が、安全で安価な新規の薬剤耐性マラリア治療法の開発に向けて有用なコンセプトとなり得ることが示唆された。また、ウシのバベシア症の新規治療戦略の開発においても同原虫細胞での Ca^{2+} シグナリングが有用な標的となり得ることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

マラリアは *Plasmodium* 属住血原虫の人体寄生によるハマダラカ媒介性の熱帯感染症で、世界人口の約 34 億人がこの感染症のリスクの下に生活している。2012 年には約 2 億人がマラリアに感染し、このうち約 63 万人が不幸にしてこの感染症によって命を落としている。

Plasmodium falciparum による熱帯熱マラリアは、ヒトの 5 種類のマラリアのうち最も重篤な感染症となる。マラリアの治療は抗マラリア薬による化学療法が基本になる。一方、これまで広汎に使用されてきた抗マラリア薬、例えばクロロキン (CQ) では既に薬剤耐性マラリア原虫が出現し、その拡散が世界のマラリア流行地で深刻な問題となっている。

Babesia 属住血原虫 *Babesia bovis* の寄生によるウシのバベシア症は、マダニ媒介性の感染症で、世界各地の畜産業に経済的な被害を及ぼしている。バベシア症の治療もジアミジン誘導体やイミドカルブによる化学療法が基本になるが、これら薬剤に対する耐性原虫の出現が既に報告されている。

カルシウムイオン (Ca^{2+}) は、住血原虫の細胞を含む真核生物の細胞において、多彩な生理機能を調節する重要な細胞内情報伝達因子となる。 Ca^{2+} による細胞生理機能の調節 (Ca^{2+} シグナリング) には宿主と住血原虫の間でいくつかの相違点が認められ、これらはマラリアやバベシア症の新規治療法開発の標的として着目されている。

本研究では、 Ca^{2+} シグナリング阻害剤の薬剤耐性マラリア治療法への応用および、 Ca^{2+} シグナリングのバベシア赤血球内発育型 (メロゾイト) の赤血球からの遊出 (エグレス) での役割について検討した。

Ca^{2+} シグナリング阻害剤として、1, 4, 5-trisphosphate (IP_3) 受容体を阻害する薬剤、2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) を CQ 耐性 *P. falciparum* 株 *in vitro* 培養感染血に種々の濃度の CQ と同時に投与したところ、同原虫株増殖の CQ による 50% 阻害濃度 (IC_{50}) が耐性域から感受性域に低下し、CQ 耐性が消失した。

ネズミマラリア原虫 *P. chabaudi* CQ 耐性株をマウスに原虫感染血の腹腔内接種で感染させて、CQ の単独投与および CQ と 2-APB の同時投与で治療した。その結果、CQ の単独投与は寄生率の推移に影響を及ぼさなかったが、2-APB 同時投与群で有意な寄生率の減少と CQ 耐性の消失を観察した。

以上の成績から、CQ と 2-APB を同時に投与する処方が、安全で安価な新規の薬剤耐性マラリア治療法の開発に向けて有用なコンセプトとなり得ることが示唆された。

次に、バベシアにおいて、細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇がメロゾイトのエグレスを誘導するかを検証した。*B. bovis* の *in vitro* 培養感染血にカルシウムイオノフォア A23187 を投与し、原虫寄生率の推移を観察した。その結果、A23187 投与群において寄生率の有意な低下とその後の寄生率の有意な上昇が観察された。また、小胞体などのオルガネラに局在する Ca^{2+} -ATPase の阻害剤、タプシガルギン (Tg) を *B. bovis* の *in vitro* 培養感染血に投与したところ、赤血球外に遊出したメロゾイトの数の経時的な上昇が観察され、Tg 感受性のオルガネラから細胞質への Ca^{2+} 放出が *B. bovis* メロゾイトのエグレスに関与していることが示唆された。

以上の成績から、ウシのバベシア症の新規治療戦略の開発においても同原虫細胞での Ca^{2+} シグナリングが有用な標的となり得ることが示唆された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Calcium ions are involved in egress of *Babesia bovis* merozoites from bovine erythrocytes
著 者 名 : Mossaad, E., Asada, M., Nakatani, D., Inoue, N., Yokoyama, N., Kaneko, O. and Kawazu, S.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 77 (1) : 53-58, 2015

既発表学術論文

1) 題 目: An interplay between 2 signaling pathways: Melatonin-cAMP and IP_3 - Ca^{2+} signaling pathways control intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*

著 者 名: Furuyama, W., Enomoto, M., Mossaad, E., Kawai, S., Mikoshiba, K. and Kawazu, S.

学術雑誌名: Biochemical Biophysical Research Communications

巻・号・頁・発行年: 446 (1) : 125-131, 2014