

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08765

研究課題名(和文)アルテシニン耐性化はマラリア原虫の適応度を下げるのか - 全生活環での包括的解明

研究課題名(英文) Comprehensive elucidation of fitness cost in drug-resistant malaria parasites through while life cycle

研究代表者

橘 真一郎 (Tachibana, Shin-Ichiro)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90414630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子変異による薬剤耐性の獲得は、一方で適応度の低下を引き起こす。そのため、一般的に薬剤耐性変異を持つ生物は、薬剤が存在しない環境下では生存に不利となる。本研究では、妊婦のマラリア感染予防のために服用される抗マラリア薬サルファドキシシン(SX)を対象に、マウスマラリア原虫モデルを利用して、SX耐性マラリア原虫の適応度を評価した。その結果、SX耐性マラリア原虫の適応度はSXを服用していないマウス体内でも低下せず、かつ蚊体内ではSX耐性マラリア原虫の方が有意に個体数を増殖させることがわかり、SX耐性マラリア原虫では適応度の低下が起こらない可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、遺伝子変異によって薬剤耐性を獲得した病原体には、適応度の低下が見られる。しかしながら本研究によって、マラリア原虫では薬剤耐性の獲得が適応度の低下を引き起こさない事例があるという、これまでの常識を覆す知見が得られた。本研究結果は、今後も抗マラリア薬を持続的かつ効果的に利用するための方策を考える上で参照されるべきものであり、国際保健に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Acquisition of drug resistance with gene mutations generally raises decrease of fitness in organisms, and therefore, the drug resistance may be disadvantageous under conditions without the drug. To assess fitness costs imposed by resistant to sulfadoxine (SX) alone, we comprehensively evaluated parasite fitness within-hosts and within-vectors using a transgenic rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Competitive experiments in which SX-resistant and wild-type parasites were co-infected into mice showed a similar growth rate. In contrast, growth rate was significantly greater in SX-resistant clones than that in wild-type clones within vectors. These observations suggest that acquisition of SX resistance did not alter the within-rodent fitness in the absence of the drug, whereas it unexpectedly provoked a fitness advantage within mosquitoes.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア原虫 薬剤耐性 適応度 種内競争

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアは、蚊によって媒介されるマラリア原虫が引き起こす人類最大の原虫感染症で、毎年約 2 億人の感染者を出し、40 万人以上に及ぶ人々の命を奪っている。現在、マラリアに対して利用可能なワクチンはない。主なマラリア対策は、発見者が 2015 年にノーベル賞を受賞した治療薬アルテミシニンをはじめとする、多くの抗マラリア薬の発見とその利用による治療によってなされている。しかしながら、これまでに導入された全ての薬剤に対し、その都度耐性を持つマラリア原虫が出現・拡散しており、マラリア対策上の大きな脅威となっている。特に、現在第一選択薬として使われているアルテミシニンに対して、近年深刻化している耐性マラリア原虫の出現・拡散問題は速やかに対処すべき重要課題である。

(2) 抗マラリア薬の一つとして知られるクロロキンは、耐性の蔓延によってその使用を禁止した地域において、数年後にその地域のクロロキン耐性マラリア原虫集団が元の感受性マラリア原虫集団に戻ったことが報告されている。これは、耐性の獲得・維持には代償を伴い、薬剤を使用していない(薬剤選択圧の無い)環境下では、耐性個体は感受性個体よりも適応度が下がり、生存競争に不利となることを示唆している。この性質を利用すれば、定期的に使用薬剤を変更することで耐性の出現・拡散を抑えることができ、現存する薬剤のローテーション使用で持続的なマラリア治療が可能となる。

(3) しかしながら、この方策は全ての薬剤耐性マラリア原虫に導入できるわけではない。抗マラリア薬サルファドキシシンに対する耐性マラリア原虫では、耐性化をもたらす遺伝子内の変異が蓄積すると、集団内で耐性型の遺伝子が固定され、感受性型に戻らないことが明らかとなっている。そのため、アルテミシニンの使用停止によってマラリア原虫集団内の耐性個体と感受性個体の比率がどのような挙動を示すのかを知ることは、今後のマラリア対策上、非常に重要な問題である。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではアルテミシニン耐性マラリア原虫の適応度、およびサルファドキシシン耐性マラリア原虫の全生活環を通じた適応度を明らかにすることを目的とした(図1)。



図1. 薬剤使用停止による薬剤耐性-感受性マラリア原虫間で起こる種内競争前後のマラリア原虫集団の構造変化の概念図

(2) 対象マラリア原虫種として、げっ歯類マラリア原虫を使用した。本種はヒトに感染するマラリア原虫と比較的近縁であるが、ヒトに対する感染性を持たない。そのため、ヒトマラリア原虫では感染事故を起こす可能性があるために実施が困難な、蚊体内期の解析を容易に行うことができる利点があることから、本研究の実験モデルとして採用した。

(3) 対象とする薬剤耐性マラリア原虫の適応度を測る尺度として、分化・増殖能力を検証し、それらの尺度を耐性個体と感受性個体とで比較する。蚊体内のマラリア原虫には薬剤選択圧はかからない。薬剤非存在下における耐性原虫の適応度を明らかにし、感受性個体の適応度と比較することで、蚊を介した耐性原虫の伝搬効率を評価する。これにより、野外における薬剤耐性原虫の拡散効率を見積る。

3. 研究の方法

(1) 使用するマラリア原虫、およびその宿主生物

本研究では研究対象として、げっ歯類マラリア原虫の一種 *Plasmodium berghei* を用いた。また、本種の無性生殖期の脊椎動物宿主としてマウス（ハツカネズミ BALB/c 系統）を、有性生殖期の無脊椎動物宿主としてハマダラカ（*Anopheles stephensi* SXX 系統）を用いた。

（2）可視化マラリア原虫の作製

P. berghei ゲノムに蛍光タンパク質遺伝子（GFP [緑] および mRuby2 [赤]）を挿入することで、蛍光タンパク質を全生活環において恒常的に発現するマラリア原虫を作製した。

（3）薬剤耐性原因遺伝子変異の導入

CIRSPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、アルテミシニン耐性の責任遺伝子 *kelch13* に C592Y 置換（ヒトマラリア原虫 *P. falciparum* [Pf] の C580Y に相当）、サルファドキシシン耐性の責任遺伝子 *dhps* に耐性型の A394G 置換（Pf の A437G に相当）を伴う変異の導入を行なった。サルファドキシシン耐性変異の導入には成功し、変異導入マラリア原虫をマウスに感染させた後、マウスにサルファドキシシンを投与して耐性の獲得を確認した。しかしながら、アルテミシニン耐性変異が導入されたマラリア原虫を得ることはできなかった。

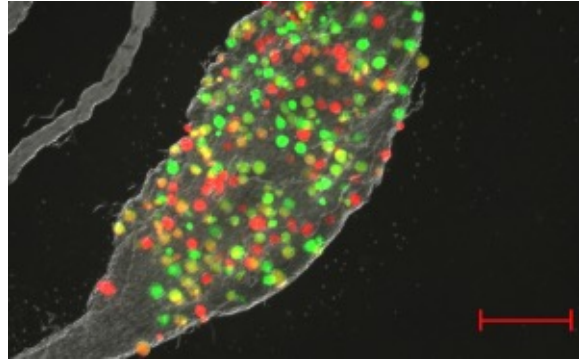


図2. 蚊中腸に感染した可視化マラリア原虫（赤：耐性原虫、緑：感受性原虫、黄：耐性-感受性交雑原虫）

（4）薬剤耐性マラリア原虫の適応度の評価

前項目で作製したサルファドキシシン耐性マラリア原虫を、耐性を持たない感受性マラリア原虫と混合してマウスおよび蚊に感染させ、両宿主内における薬剤耐性-感受性マラリア原虫間の増殖率を観察した（図2）。

4. 研究成果

（1）薬剤耐性マラリア原虫の作製

ゲノム編集技術を使い、アルテミシニンおよびサルファドキシシンへの耐性に関わる遺伝子 *dhps* に、耐性化を引き起こす変異の導入を試みた。サルファドキシシン耐性については、変異の導入に成功するとともに、薬剤投与下において生存する個体（サルファドキシシン耐性化マラリア原虫）を単離することに成功した。一方、アルテミシニン耐性については、サルファドキシシンの場合と同じ手法で変異の導入を何度も試みたが、変異の導入された個体を単離することはできなかった。アルテミシニン耐性に関わる遺伝子 *kelch13* は、変異によって耐性化を引き起こすが、一方でそのマラリア原虫個体の適応度を低下させることが知られている。そのため、アルテミシニン耐性マラリア原虫が出現・拡散している地域では、適応度を補償すると考えられている別の遺伝子変異も高頻度に観察される。本研究では適応度の補償に関わる遺伝子への変異導入は行なわず、*kelch13* への変異導入のみを試みた。変異導入は培養マラリア原虫集団に対して行なったが、変異導入率は100%ではないことから、変異導入した後、耐性化個体を単離するまでの過程では、変異が導入された個体（耐性化個体）とされなかった個体（感受性個体）とが共存する期間がある。この際に耐性化個体と感受性個体との間で種内生存競争が起こり、その結果、適応度の低い耐性化個体が淘汰され、単離ができなかったものと考えられる。*Kelch13* 遺伝子への変異導入については、適応度補償に関わる遺伝子への変異導入も並列して行う必要があることが示唆された。

（2）全生活環を通した耐性マラリア原虫の適応度評価

前項目で作製に成功したサルファドキシシン耐性原虫を使用して、マラリア原虫の無性生殖期および有性生殖期の全生活環（全発育期間）に渡る適応度評価を行った。耐性化マラリア原虫と感受性マラリア原虫とをマウスおよび蚊に共感染させ、両マラリア原虫間の成長速度を比較した。

・マウス感染下における適応度比較：マウスに耐性化および感受性マラリア原虫を 1:1 比で共感染させ、以降、マウスへ薬剤を投与することなく、薬剤非存在下で両マラリア原虫のマウス血液内存在比率を経時的に観測した。その結果、両マラリア原虫の存在比に有意な変化は見られなかった。このことから、サルファドキシシン耐性マラリア原虫の適応度を測る指標の一つとなる赤

増殖速度は、赤血球期のマラリア原虫にではサルファドキシシン耐性（変異）を獲得しても低下しないことが示唆された。

・蚊感染下における適応度比較：耐性化および感受性マラリア原虫が 1:1 比で感染しているマウス血液を人工吸血装置を用いて蚊に吸血させ、蚊にマラリア原虫を感染させた。マウス感染時とは対照的に、蚊体内において耐性化マラリア原虫は、蚊からマウスへ感染するための発育ステージであるスポロゾイト期の個体数を感受性マラリア原虫のそれよりも多く増殖させていることが明らかとなった。

（3）まとめ：本研究結果は、サルファドキシシン耐性化個体の方が感受性個体よりも多く伝播され得ることを示唆する。また野外において、単にサルファドキシシンの使用を停止するのみでは耐性化マラリア原虫の数を減少させることが困難である可能性も示唆している。本研究は、作用機序の異なる抗マラリア薬をローテーション使用し、野外において耐性化マラリア原虫数を積極的に抑制することの重要性を強調するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Tachibana S-I, Ikeda M, Yamauchi M, Katuro OT, Ntege EH, Sekihara M, Fukuda N, Takahashi N, Yatsushiro S, Mori T, Hirai M, Opio W, Obwoya PS, Anywar DA, Auma MA, Palacpac NMQ, Tsuboi T, Odongo-Aginya EI, Kimura E, Ogwang M, Horii T, Mita T	4. 巻 19
2. 論文標題 Recovery and stable persistence of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites after its discontinued use in Northern Uganda	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-020-03157-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sekihara M, Tachibana S-I, Yamauchi M, Yatsushiro S, Tiwara S, Fukuda N, Ikeda M, Mori T, Hirai M, Hombhanje F, Mita T	4. 巻 17
2. 論文標題 Lack of significant recovery of chloroquine sensitivity in Plasmodium falciparum parasites following discontinuance of chloroquine use in Papua New Guinea	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2585-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ikeda M, Kaneko M, Tachibana S-I, Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Yamauchi M, Sekihara M, Hashimoto M, Katuro OT, Olla A, Obwoya PS, Auma MA, Anywar DA, Odongo-Aginya EI, Okello-Onen J, Hirai M, Ohashi J, Palacpac NMQ, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T, Mita T.	4. 巻 24
2. 論文標題 Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum with High Survival Rates, Uganda, 2014-2016	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 718-726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2404.170141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana S-I, Auma M, Ntege EH, Ito D, Takashima E, Palacpac NMQ, Ekwang TG, Onen JO, Kataoka M, Kimura E, Horii T, Tsuboi T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Absence of in-vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-016-1663-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Miotto O, Sekihara M, Tachibana S-I, Yamauchi M, Ikeda M, Mori T, Hirai M, Pearson R, Amato R, Goncalves S, Mueller I, Barry A, Noviyanti R, Ringwald P, Ohashi J, Hombhanje F, Kwiatkowski D, Mita T
2. 発表標題 Emergence of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum with kelch13 C580Y mutations in Papua New Guinea
3. 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 68th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田美恵, 金子恵, 橘真一郎, 山内祐人, Betty Balikagala, 江本桜子, 福田直到, 牧喜子, 森稔幸, 平井誠, 橋本宗明, Osbert T. Katuro, Mary Auma, Denis A. Anywar, Nirianne M. Q. Palacpac, 片岡正俊, Emmanuel I. Odongo-Aginya, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏
2. 発表標題 ウガンダ北部マラリア原虫集団におけるアルテミシニン耐性レベルの推移
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Betty Balikagala, 池田美恵, 橘真一郎, 山内祐人, 福田直到, 関原誠, 江本桜子, Osbert T. Katuro, Opio Walter・Mary Auma, Denis A. Anywar, 森稔幸, 平井誠, 片岡正俊, Nirianne M. Q. Palacpac, Emmanuel I. Odongo-Aginya, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏
2. 発表標題 In-vivo artemisinin resistance may have emerged in Uganda
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内祐人・平井誠・橘真一郎・森稔幸・美田敏宏
2. 発表標題 蚊-マウスモデルにおけるサルファドキシン耐性マラリア原虫の適応度に関する研究
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachibana S-I, Hirai M, Mori T, Mita T
2. 発表標題 Prerequisite Emergence of Background Mutations for kelch13-related Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum isolates
3. 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirai M, Ikeda M, Tachibana S-I, Mita T
2. 発表標題 Isolation of piperazine-resistant rodent malaria parasite from malaria mutator
3. 学会等名 American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平井誠・池田美恵・橘真一郎・美田敏宏
2. 発表標題 高頻度突然変異マラリア原虫を用いた薬剤耐性機構解明への挑戦
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2016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	平井 誠 (Hirai Makoto) (50326849)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	