

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04072

研究課題名(和文) HLA結合抗原ペプチド変異はヒトマラリア感染免疫を変化させるか

研究課題名(英文) Antigenic variation can change T cell immunity in malaria?

研究代表者

平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：60189868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：年間40万人が死亡する熱帯熱マラリアには、重症、症候性、無症候性の、病態の異なるマラリア患者が存在している。これらの病態形成にはHLAを始めとする宿主の免疫能個体差およびマラリア原虫遺伝子の多様性が相互に関与していると考えられる。そこで、マラリア感染症の病態形成メカニズムを免疫遺伝学的な観点から解明することを目的として、各病態群の感染原虫およびヒト宿主遺伝子群の多型を次世代シーケンサーにより解析した。フィリピン島嶼部住民由来の血液サンプルから得たDNAから、マラリア原虫遺伝子、中でもワクチン候補として重要視されているTAM遺伝子の増幅、解析に成功し、遺伝子多型の存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱帯熱マラリアはサブサハラアフリカの5歳以下の乳幼児の死因のトップであり、ワクチンなどの予防法の開発、確立は急務となっていることから、T細胞性免疫の重要性に着目したワクチン開発が広く行われている。しかしこの際に最も問題となるのが実験や効果に対する評価方法である。ヒトの感染免疫をワクチンなどの介入研究以外で評価することは実際には非常に困難であることから、本研究のように、宿主、病原体遺伝子双方についてゲノム情報を取り出し、解析することは重要で、とりわけ患者のHLA型と原虫変異抗原の配列情報から実際の患者の細胞性免疫反応の変異による影響をある程度予測、検定することで可視化が可能になる。

研究成果の概要(英文)：It is well considered that the diversity not only in host immune response including HLA but also the malaria parasite genes are involved in the interaction of pathological situation. In order to elucidate the pathogenic mechanism of malaria infection, we analyzed the genetic polymorphisms of parasite genes targeted as vaccine candidate and major HLA genes by using the next generation sequencing (NGS) analysis method. To observe the genetic variation in a small area of Philippines, we determined genomic sequences of the genes isolated from peripheral blood of 82 patients with symptomatic malaria in Palawan Island. After NGS, 78 out of 82 individuals showed reasonable quality for the analysis, ranged from 11,536 to 188,248 reads per gene per sample. When we estimated levels of polymorphism in each gene, in the TAM gene, 6 alleles were assigned in the population, and 2 alleles were newly classified. The population base study of malaria genome will give us thus useful informations.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：熱帯熱マラリア 無症候性 HLA遺伝子 マラリアワクチン 多型性 抗原変異 ケニア フィリピン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蚊媒介感染症として知られるマラリアは3大感染症の1つとして世界的にも注目されている。なかでも熱帯熱マラリアはサブサハラアフリカの5歳以下の乳幼児の死因のトップであり、年間40万人が死亡している。マラリア死の多くは重症マラリアによるが、その病態は、高原虫血症、それによる溶血性貧血、末梢循環不全による脳マラリアや多臓器不全など多彩である。年齢が上がるにつれ、住民はある程度の免疫を獲得し、高度流行地では原虫血症があるのに全く症状を呈さない無症候性マラリアが多数みられるようになる。無症候ゆえに治療することもなく、感染型の生殖母体を血中に保有するいわゆるキャリアとなり、流行を維持する重要な感染源となっている。このように、マラリア流行地には、重症マラリア、重症ではないが症状を有する症候性マラリア、そして無症候性マラリアという明らかに病態の異なるマラリア患者が存在している。これらの病態形成に、原虫の蚊の中での有性生殖期の組み換えによる遺伝子変異や宿主の免疫に関連した遺伝要因が強く影響していることが報告されている。宿主遺伝子では特に、第6染色体短腕の組織適合性遺伝子領域のHLA遺伝子多型やTNF遺伝子多型との関連が強く指摘されている。

最近、ワクチン開発におけるT細胞性免疫の重要性が指摘されている。HIV感染細胞やがん細胞を標的としたワクチン治療においてはCD8細胞障害性T細胞の働きが重要であることは容易に想像されるが、デングワクチンのように抗体による防御が重要であると予想されたものでも、抗体産生のみでは十分な防御効果が得られないことがサノフィワクチンの第3相臨床試験の結果明らかとなった。またRTS,Sマラリアワクチンの臨床試験の結果を見ても、当初期待された肝細胞期の細胞障害性T細胞誘導効果は明らかでなく、そのためか、感染防御効果は十分には得られていない。世界的にはCD4あるいはCD8T細胞の適切な刺激効果を持ったワクチンの開発なくしては、ワクチン開発のブレークスルーはないと考えられている。

ワクチン開発の必要性から、HLAクラスI及びクラスII分子の提示するペプチド抗原のモチーフ解析や、HLA分子との結合活性を有する抗原ペプチドのプロテオーム解析が進み、データが蓄積することで、ヒト集団のかなりの部分をカバーするHLAアレル毎の結合ペプチドの予測ソフトが完成しつつある。例えば、米国NIAIDのEIDBホームページ上のプラットフォーム(<http://www.immuneepitope.org/>)は、各種感染症やがん免疫の研究に応用され、免疫原性の高いペプチドが実際に7-8割の確率で同定されている。ある患者のHLA型と感染している病原体のゲノム情報があれば、その患者のT細胞性免疫がどのような病原体の抗原ペプチドで刺激されているのかをかなりの確率で予測することが可能となっている。本研究では、ゲノム情報について各患者から次世代シーケンサーを用いて取り出し、その患者のHLA型と原虫変異抗原の配列情報を予測ソフトに入力することで、実際にその患者の細胞性免疫反応の変異による影響をある程度予測できるのではないかと推測した。

2. 研究の目的

マラリア感染症の病態形成メカニズムを免疫遺伝学的な観点から解明する。この目的のため、熱帯熱マラリアの典型的な病態である重症マラリア、症候性(有熱)マラリア、無症候性マラリアを対象に、アジア及びアフリカの流行地で観察される各病態群の感染原虫およびヒト宿主遺伝子群の多型を次世代シーケンサーにより解析し、特に抗原とリンパ球間の相互作用に変化を与えるマラリア抗原変異の病態形成への影響を検討する。その中でも、HLAクラスI、II分子が認識しうるエピトープ関連変異に焦点を絞って、病態との関連を調べることにした。

3. 研究の方法

本研究では、典型的な病態として症候性あるいは無症候性マラリアを対象とし、すでに異なるプロジェクトで採血、収集したる紙血由来DNAを用いることとした。「マラリア抗原ペプチドの変異が宿主のHLA分子の親和性に変化をもたらし症候性あるいは無症候性という病態を作る」という仮説のもとに、感染原虫の抗原変異を個人レベルで調べ、そのHLA型に対応するT細胞エピトープのロスあるいはゲインが病態に与える影響を観察する。この目的のためには、各人のヒト宿主HLA遺伝子多型とそれに対応するマラリア原虫抗原ペプチド多型あるいは変異を同時に決定する必要があり、感染時の少量の血液DNAを増幅後、次世代シーケンサー(NGS)による大量解析を行うための方法論の確立を目指した。まずはマラリア抗原、宿主抗原のそれぞれについて、各遺伝子多型のNGS解析手法を検討した。

4. 研究成果

(1) 紙血由来DNAの全ゲノム増幅の検討

症候性、無症候性マラリア患者については、すでに収集の終わった保存DNAを対象とするため、ヒト血液中に微量に混入している程度の感染原虫ゲノムの解析については十分量の確保が難しいことが予想された。貴重なサンプルであることからバックアップの意味も含めて原虫およびヒトゲノムDNAの増幅について検討した。従来のphi29によるゲノム増幅法はヒト*Alu*配列特異的なプライマーを用いていることから、TA含量が極端に高いマラリアゲノムには不向きである。そこで最近開発されたTth Primer polymeraseを組み合わせた増幅法を用いて、ヒト培養細胞由来DNAおよびマラリア培養株である3D7A由来DNAを用いて増幅を試みた。Tth Primer polymeraseはプライマー配列非依存的にランダムな短い一本鎖DNAを合成可能であることから

増幅効率の均一化も期待されたが、ヒトにおいては予想通り 2ng のゲノム DNA が 1.2ug 程度まで増幅された。各種プライマーセットを用いて PCR による増幅確認を行った結果でも問題なく増幅がみられたことから、ケニア人由来の保存サンプル 400 例について増幅を行った。一方のマラリアゲノムについては、ヒトと同量、またはそれ以上の鋳型ゲノム DNA を用いて行った実験では、現在のところ増幅産物を得るには至っていない。3D7A はマラリア株の中で最も TA 含量が高く 80%以上であることが知られていることから、合成に必要な 4 種の各塩基 (A,G,T,C) の配合割合も考慮しつつ、現在増幅検討を続けている。

(2) マラリア抗原遺伝子の NGS 解析の検討

(1)と同時並行で、マラリア感染患者血液由来 DNA に共存するマラリア由来 DNA を標的として、次世代シーケンサーによる複数遺伝子の解析法の開発を行った。まず、候補遺伝子としてマラリアワクチン抗原候補遺伝子など 22 遺伝子を選定後、塩基配列データベースに登録されている当該遺伝子情報より塩基配列を収集し、ほぼ全長をカバーするプライマーセット 37 組を設計した。次に実験室で汎用されている培養株である 3D7A および Dd2 より抽出したゲノム DNA を用いて、プライマーセット毎の PCR 条件の検討、設定を行った。結果、11 遺伝子について条件の最適化が完了したことから、イルミナ社の MiSeq を使用して解析を行った。予備実験での良好な結果を確認した後、フィリピンパラワン島嶼部より収集、保存済の症候性および無症候性マラリア患者の紙血由来ゲノム DNA 82 検体を用いて、11 遺伝子をそれぞれの最適条件下で PCR 増幅ののち、解析に用いた。得られた配列データは、SAMtools, GATK 等の一般的な解析ソフトを使用して、精度、総リード数における有効リード数を数値化の上、判定して用いた。結果、TAM, AMA-1, GLURP, MSP-1, MSP-2, MSP-3, PF10_0355, pfdhfr の 8 遺伝子について、82 検体より 25,745,711 本、1 検体当たり平均で 313,972 本の有効塩基配列情報が得られたことから、遺伝子多型に関する詳細な解析を行った。

8種の遺伝子のうちワクチン候補遺伝子として最重要視されている TAMは、本研究では610,730の有効配列が得られた。各個体の総リード数が2桁以下を示した4検体については解析から除外し、78検体から得られた塩基配列データを、データベースから取得した3D7A株のTAM遺伝子塩基配列情報と比較したところ、翻訳領域に相当する約1.4kbの塩基配列はカバーされていたものの、リファレンスである3D7A株と完全一致する配列はなかった。得られた配列のクラスター解析を行うと6種に分類され、塩基配列多型の存在が示された。

そこで、当該配列について新たに非翻訳領域に設計したプライマーを用いて詳細な解析を行った。すなわち、翻訳領域を完全に含む約1.7kbをPCR増幅後、サンガー法により直接塩基配列を決定した。結果、繰り返し配列中において18塩基の欠失、27塩基の欠失、また繰り返し配列上流に3塩基挿入の計3種の多型が認められた。さらに、2箇所の一塩基多型が検出されたことからクローニングにより配列決定を行った。その結果、フィリピンパラワン島住民由来のTAM遺伝子は少なくとも5種類存在し、うち2種はデータベース上に完全一致の配列登録は見いだせなかったことから新規アレルであることが示唆された。この5種のアレルについて、推定されるアミノ酸配列を比較したところ、挿入、欠失部位はいずれもフレームシフトによる非同義置換をひき起すことが推測された(図1)。TAM遺伝子のエピトープ変異が宿主の細胞性免疫反応にどのように関わるのかについて興味をもたれることから、その他の遺伝子解析と併せて解析を継続する必要がある。

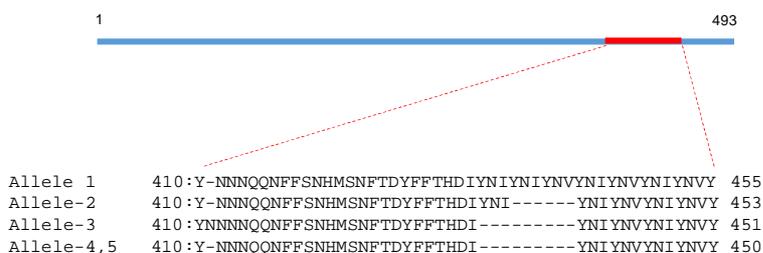


図1. 塩基配列から推定されるマラリアTAM 遺伝子 (493アミノ酸残基)多型性

Miseq で得られたデータのうち十分な有効配列が得られなかった残り 3 種の遺伝子については、非特異的な増幅産物の混入や、Miseq へのローディングのための増幅産物の断片化の行程に問題があったと考えられることから検討が必要であるものの、本法は有効な解析法であると考えられた。しかしながら、貴重なサンプルゲノム DNA について現在のところ全ゲノム大量増幅の見通しが確保できないことから、個々の遺伝子を個別増幅することについての見直しを行う必要があった。そこで、新たに複数標的に対するプライマーでの同時増幅が可能なマルチプレックス PCR の手法を取り入れることを考案した。後述するヒト遺伝子の NGS 解析と実験系の統一を図るため、NGS 機器については新たに Ion PGM(S5)を用いることとし、条件設定を行った。プライマーセットの設計には専用のデザインソフトを用い、計画開始当初の標的とした 13 遺伝子を含む 21 遺伝子について各遺伝子の全長をカバーできるよう、最終的に 254 プライマーセットを設計、作製した。現在培養株由来 DNA を用いて条件検討を行っており、データ収集を行っている。

(3) HLA を中心としたヒト遺伝子の NGS 解析の検討

マラリア感受性および抵抗性因子としてヒト個体差を規定している HLA 遺伝子の解析を行うことは、今後のワクチンデザインを考えるにあたり必須項目となることから、今回は HLA 遺伝子を中心とした免疫関連遺伝子の NGS 解析についても検討を行った。

HLA はクラス I の A, B, C とクラス II の DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 遺伝子を対象とし、当初は翻訳領域全長をカバーするプライマーセットを設計して検討を行った。しかし増幅領域が最短でも 5kb 以上となることから紙血由来の低純度 DNA の増幅には不向きであり、実際の検討でも均一な増幅結果を得ることはできなかった。得られた PCR 増幅産物を MiSeq にロードするためにおこなった断片化についても、サンプルによって増幅効率に差が生じ、安定した結果を得ることができなかった。

そこで、MiSeq でのマルチプレックス NGS の可能性について検討した。候補遺伝子は、HLA 遺伝子以外にも自然免疫に関連する遺伝子多型である、鎌状赤血球症、卵形赤血球症、サラセミア、G6PD 欠損症、ヘモグロビン C などの赤血球異常症、内皮細胞上の感染赤血球リガンド分子などの多型が直接無症候性あるいは症候性マラリアと関連するかどうかを、ヒト遺伝子多型との何らかの関連によって証明できないかと考え、さらに MICA, MICB, TNFA, TNFB などの HLA 様免疫関連遺伝子群や、FcRIIA, Duffy, Band3, ICAM-1, E-selectin, TLR2, TLR4, TLR9, TNFR, CD36, CRP, BAFF 等の赤血球レセプターやその関連遺伝子を選定した。これらについてマルチプレックス PCR のためのプライマーデザインを行ったが、MiSeq を使用する場合には増幅領域を 250bp、可能な限り 80-150bp に設定しなければならず、1 つの exon が 260bp 前後で両末端部分に超可変部領域を含む HLA 遺伝子の構造からは、目的領域は 50%程度しかカバーすることができなかった。

このことから方針を一新し、Ion PGM (S5)を使用したマルチプレックス PCR での NGS 法を新たに考案、検討した。増幅領域を 125bp-375bp に拡張することで、目的の各 HLA 遺伝子についてすべての exon と上流および下流の非翻訳領域を 95%~100%カバー可能なプライマーを設定することに成功した。最終的には上述の遺伝子の他 HLA-DRB5 を含む計 29 遺伝子について 422 プライマーセットを設計し、99.2%以上のカバー率を得ることが可能となった。

そこで本プライマーセットを用いて、既知 HLA 遺伝子型の健常者由来 DNA の遺伝子タイピングを試みた。Ion PGM のプロトコールに従い増幅を行った後、ライブラリ作製を行いシーケンサーにて解析を行ったところ、1 検体当たりの総リード数 5,978,000 と、大変良好であった。解析においては HLA 以外の遺伝子について通常の解析方法で多型検出が可能であったが、HLA 遺伝子については多数の多型からパターンを特定してアレル(遺伝子型)を判定する必要があることから、HLA 遺伝子型判定専用ソフトの開発を進めた。各遺伝子座には現在 DDBJ(DNA data bank of Japan)に配列登録されているすべての既報のアレルについて塩基配列情報を入手し、解析専用データベースの構築を行った。さらに、exon 部分の多型の有無で識別が可能、かつ、生物学的意義を有する HLA 遺伝子型(第二区域)までの確実なタイピングを目指して改良を重ねた結果、現在までに概ねの検体については既知遺伝子型との一致が得られた。

このことからケニア人紙血由来 DNA75 例について本プライマーセットによるマルチプレックス PCR 増幅を実施し、NGS での良好な泳動結果を得ることに成功した。現在は HLA 以外の他の遺伝子と共に総合的な解析を行っていることから、データが得られ次第マラリア抗原遺伝子多型解析の結果と併せてエピトープ関連解析を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Joseph M Bodi, Celestin N Nsibu, Roland L Longenge, Michel N Aloni, Pierre Z Akilimali, Pierre M Tshibassu, Patric K Kayembe, Ahmeddin H Omar, Kenji Hirayama, Jan Verhaegen, Aime Lumaka, Prosper T Lukusa.	4. 巻 3
2. 論文標題 High IgG1 Malaria Antibodies level in Children is a Possible Risk Factor of Blackwater Fever:A Case-Control Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatrics & Health Research	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Mbanefo EC, Ahmed AM, Titouna A, Elmaraezy A, Trang NT, Phuoc Long N, Hoang Anh N, Diem Nghi T, The Hung B, Van Hieu M, Ky Anh N, Huy NT, Hirayama K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep45963	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naruse TK, Methenge PG, Narahara C, Benedicte MM, Avenido EF, Mercado ES, Espino FE, Jiz M, Mizukami S, Tanimoto K, Kimura A, Hirayama K.
2. 発表標題 Genomic diversity of the human malaria parasite Plasmodium falciparum, isolated from a domestic population of Palawan Island, Philippines.
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Farhana Mosaddeque, Shusaku Mizukami, Awet A Teklemichael, Satoshi Mizuta, Yoshimasa Tanaka, Mayumi Taniguchi, Michiko Fukuda, Nobuyuki Kobayashi, Nguyen T Huy, Kenji Hirayama.
2. 発表標題 Discovery of novel antimalarial(s) using high throughput screening and combinational chemistry.
3. 学会等名 WCP2018 KYOTO 第18回国際薬理学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Farhana Mosaddeque, Mizukami Shusaku, Teklemichael Awet Alem, Mizuta Satoshi, Tanaka Yoshimasa, Taniguchi Mayumi, Fukuda Michiko, Huy Nguyen Tien, Hirayama Kenji.
2. 発表標題 Discovery of novel antimalarial(s) from hemozoin inhibitors.
3. 学会等名 第59回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ali Mahmoud Ahmed, Evaristus Chibunna Mbanefo, Nguyen Thi Huyen Trang, Nguyen Tien Huy, Kenji Hirayama.
2. 発表標題 Association of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: a systematic review and meta-analysis.
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会2017
4. 発表年 2017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	水上 修作 (MIZUKAMI Shusaku) (00508971)	長崎大学・熱帯医学研究所・准教授 (17301)	
連携 研究者	濱野 真二郎 (HAMANO Shinjiro) (70294915)	長崎大学・熱帯医学研究所・教授 (17301)	
連携 研究者	カレトン リチャード (CULLETON Richard) (10503782)	長崎大学・熱帯医学研究所・准教授 (17301)	

