

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26305016

研究課題名(和文)西アフリカにおける重症マラリア発生機序のアミノ酸インフォマティクス解析

研究課題名(英文) Amino acid informatics-based nutritional analysis of severe malaria patients in West Africa

研究代表者

嘉糠 洋陸 (KANUKA, HIROTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア原虫は、増殖に必要なアミノ酸の一部を感染動物の血漿中に依存するため、その中に含まれる遊離アミノ酸について、マラリア原虫の寄生成立において重要な役割を担うことが示唆されていた。本研究では、タイのマヒドン大学病院に入院した重症マラリア患者の血液を用いた解析から、マラリア原虫感染による血中アミノ酸組成の顕著な変化、および血中アミノ酸とマラリア重症化との関連性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium parasite is incapable of most types of amino acid biosynthesis, and acquires the nutrients from hemoglobin digestion and the plasma free amino acids incorporation into erythrocyte. These facts indicated that plasma amino acid must be important for their parasite establishment in infected host. In order to further characterize the interactions between parasite and host, multivariate analysis using statistical modeling of amino acid concentrations (aminogram) of blood of severe malaria patients infected with *P. falciparum* was performed. This result demonstrated that Plasmodium infection caused drastic alteration in serum aminogram. Furthermore, a subset of amino acids in serum were significantly correlated with component that WHO-defined criteria for severe falciparum malaria. The data suggest that amino acid informatics-based nutritional approach might be crucial to develop novel method to control severe malaria.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 病原体 アミノ酸 栄養 原虫 宿主

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の感染が引き起こすマラリアは、AIDS や結核とともに世界三大感染症に分類されている疾病である。熱帯熱マラリア患者は適切な処置が施されない場合、重症貧血や脳性マラリアなどの重篤な症状を呈し、その多くが死に至る。マラリア原虫は複雑な生活環を有し、巧みに宿主免疫機構を免れることから、有効なワクチン開発は途上にある。これまで、いくつかの抗マラリア薬の開発に成功しており、薬剤を塗布した蚊帳の無償配布などから死亡者数は年々減少している (WHO, 2015)。しかし、1980年代から既に問題視されていた薬剤耐性問題に対し未だ解決策を見出せておらず、新たに開発されたアルテミシニン誘導体と他の抗マラリア薬とを併せた治療法 (ACT: Artemisinin-based Combination Therapy) に対しても、マラリア根絶へ向け実施された薬剤の無償配布は、却って耐性原虫株による被害を顕在化させている。さらに、地球温暖化による流行地域拡大のおそれから、新規の概念に基づくマラリア制御法の確立が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

マラリア原虫は、中間宿主であるヒトやマウスに感染した後、まずは肝臓にて増殖し、続いて赤血球に寄生部位を移す。赤血球内において原虫が分裂・増殖を繰り返す際、マラリア原虫は様々な栄養素を血中から摂取する。特にアミノ酸について、大半の合成経路を欠くマラリア原虫は、赤血球内のヘモグロビンを分解することによりアミノ酸を得ている。しかし、メチオニンやイソロイシンなど一部のアミノ酸については、ヘモグロビン中の含量が微量、もしくは全く含まれていない。そのため、原虫は赤血球膜上に数種類の輸送体を設置し、血漿中の栄養素を赤血球内に取り込ませることにより、それらのアミノ酸を利用する。これらの知見は、宿主の血中に含まれる遊離アミノ酸がマラリア原虫の寄生成立において重要な役割を担うことを示唆する。

マラリアを始めとする様々な感染症の諸症状は、原因となる各臓器・組織における異常へと細分化され、各々の異常は相互に関連するものであることから、それらを包括的に解析することは既存の手法では困難である。さらに、生体内のアミノ酸は誘導体等を含めると数十種以上が存在し、他の栄養素と複雑な栄養代謝ネットワークを形成しているため、数種類のアミノ酸に関する解析からではマラリアという疾病における役割を理解することは困難である。研究代表者らは、がんや代謝異常の研究において各臓器の代謝の変化に伴って変化することが報告されている網羅的な血液中の遊離アミノ酸濃度組成 (血中アミノグラム) についての解析手法を感染症研究に応用し、複数のアミノ酸の組合せを網羅的かつ統計的に解析する「アミノ酸インフォマティクス解

析」を実施することにより、宿主と感染症との新規相互作用の解明を試みている。

研究代表者らはこれまでの研究から、齧歯類モデルを用いて、マラリア感染宿主血中の血漿および肝臓の遊離アミノ酸組成が顕著に変化することを報告している。さらに、それらのアミノグラムデータをもとに、アミノ酸同士の結びつきの可視化に成功している。これらの結果は、アミノ酸濃度という古典的な栄養生化学パラメータを多変量としての見直すことにより、マラリア制御のための新たな知見が提示される可能性を示す。本研究開発課題はこれらの知見に立脚し、栄養学的知見に基づくマラリア制御法開発に向けた新規研究基盤の構築を試みるものである (図1)。

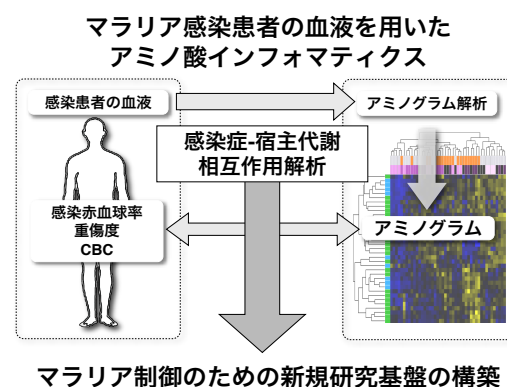


図1 本研究の主要概念図

3. 研究の方法

(1) 重症熱帯熱マラリア原虫感染患者血清のアミノグラム測定

狩野繁之博士 (独立行政法人国立国際医療研究センター) のコーディネート、およびクルドゥスドウスリヴィッチャ博士 (タイ・マヒドン大学) 協力のもと、マヒドン大学病院に入院した重症マラリア患者21人の治療前後の血清 (対応あり) を用いて、その中に含まれる遊離アミノ酸及びその誘導体計 35 種類以上を網羅的に測定する (アミノグラム解析)。なお、この解析にはイオン交換クロマトグラフィーとニンヒドリン発色を組み合わせたアミノ酸自動分析計が必要であり、味の素株式会社イノベーション研究所が分析を担当する。

(2) 血清アミノグラムデータを用いた階層クラスタ解析

研究代表者らはこれまでの研究から、齧歯類モデルにおける個体毎のアミノグラムの差異に着目した統計分析を起点として、マラリア原虫の増殖能や宿主の症状の重症化と血中遊離アミノ酸との関係性を見出している。重症マラリアとアミノ酸との新たな関係性を見出すことを目的として、同様の手法を用い、血清アミノグラムデータを two-way coupled 階層クラスタ統計分析へ供する。クラスタリングに用いる対象間の距離の基準 (類似度) にはマンハッタン距離を、クラスタ

一間の距離の測定(類似度の評価)にはワード法を用いる。

(3) 治療前後それぞれにおけるアミノ酸と血中因子との相関解析

マラリアの発症は原虫の増殖に伴う感染赤血球の破裂に端を発し、その重症化の過程には、血中 pH の変化、血小板数の減少など、血液の性状変化が関与する。そこで、マラリアの重症化と血中アミノ酸濃度との関係の詳細な検証を目的として、スピアマンの順位相関検定を用いて、ヘモグロビン濃度や赤血球数など各血中因子の濃度とアミノ酸濃度との相関解析を実施する。有意差の有無の判定については、 $|\rho| \geq 0.7$ 、 $p < 0.5$ を基準値として用いる。

(4) ヒト個別血清を用いた熱帯熱マラリア原虫の培養実験

熱帯熱マラリア原虫培養にはヒトの赤血球および血清が使用される。血清のロットによって原虫の増殖が異なることが知られている。マラリア原虫の培養は 100 年以上の歴史を有しながら、培養の不安定さおよびその原因については未解明のままであった。研究代表者らはこれまでの研究から得られた知見から、アミノグラムの個人差が原虫の増殖に影響する仮説を得た。本研究において、日本赤十字社より譲渡された献血血液を用いて熱帯熱マラリア原虫を培養し、まずはその増殖動態をパラメータとして、血清毎の増殖の差異を解析する。高効率に多くの血清を用いて原虫の増殖を解析するため、評価には原虫の有する乳酸脱水素酵素を定量する試験を使用する。

4. 研究成果

(1) マラリア感染によって患者血中アミノグラムが顕著に変化する

通常、血中のアミノグラムは生体の恒常性を維持する範囲で一定に保たれている。しかし本解析結果から、重症マラリア患者の各種血中遊離アミノ酸濃度が、治療前後で顕著に変化することを明らかにした(図2)。アミノ酸群の代謝合成経路は、生体内の代謝経路の中心を担い、それらは複雑な栄養ネットワークとして構成されていることから、相互に関連するアミノ酸多変量がマラリアの重症化を定義する可能性が示唆された。

重症マラリア患者血清アミノグラムは治療前後で顕著に変化している

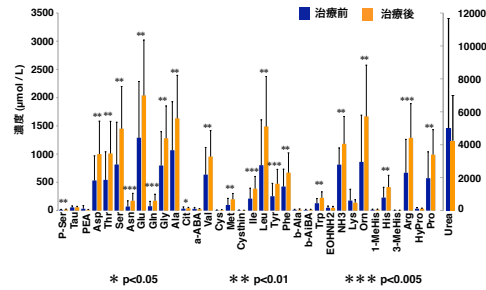


図2 重症熱帯熱マラリア原虫感染患者の血清アミノグラム

(2) 血清中のアミノ酸動態は、マラリア感染によってそれぞれ顕著な変化を示す

重症マラリア患者血清アミノグラムの多くが、治療前後で別のクラスターに分類された(図3)。この結果は前項の結果を裏打ちするものであるが、さらに、アミノ酸ごとに変化動態に差異が認められることを明らかにした。これらの結果から、マラリア重症化の過程に、血中アミノグラムの差異が影響する可能性が示唆された。

アミノ酸毎にマラリア原虫感染時の変化動態は異なる

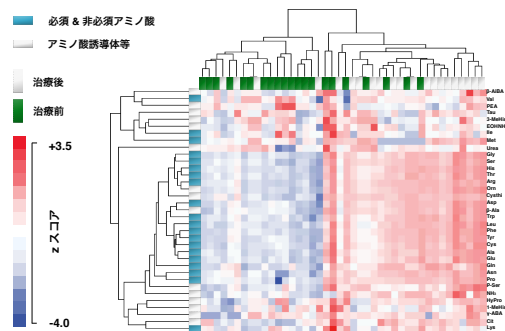


図3 重症熱帯熱マラリア原虫感染患者血清アミノグラムの two way coupled クラスター解析

(3) 血清中の一部のアミノ酸濃度は、WHO が定義する重症マラリア判定基準の値と有意に相関を有する

熱帯熱マラリアの経過は悪性であり、重症貧血、代謝性アシドーシス、頭痛、錯乱、昏睡などの脳症や肺水腫など様々な病態や合併症を併発し、治療開始が遅れた場合は死への転帰をとる危険性が増大する。熱帯熱マラリアの臨床検査所見の初期～中期は、正急性貧血、赤血球の大小不同、赤血球数・ヘマトクリットの低下、白血球数減少とそれに伴う相対的単球増多、CRPの上昇、血小板減少などが認められる。治療が遅れ重症化した場合は、LDHの著増、総コレステロールの著減と中性脂肪の増加、欠尿や無尿に伴うクレアチニンや BUN の上昇、低血糖、電解質異常等の所見を呈する。本解析結果から、血中因子とアミノ酸とで濃度に関する相関を持つ組合せパターンが、治療前後で顕著に変化することを明らかにした。また、一部のアミノ酸に

関して、WHO が定義する重症マラリア判定基準の値と有意に相関を有することを明らかにした(図4)。

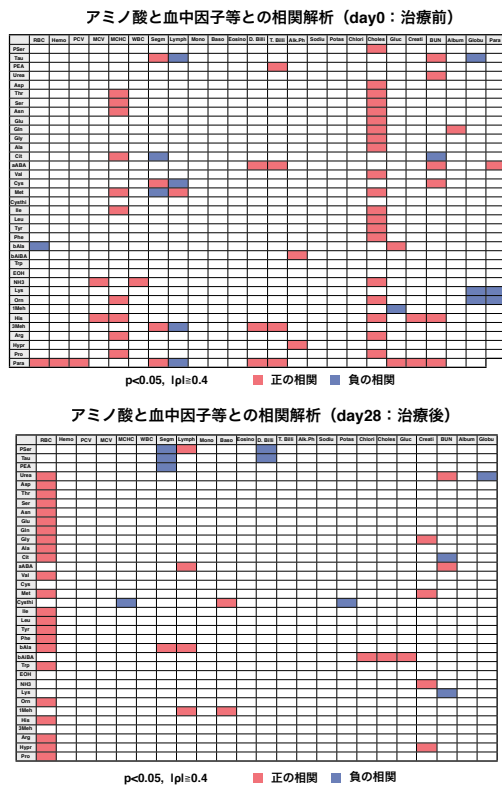


図4 各血中因子と血中アミノ酸濃度との相関解析(上:治療前、下:治療後)

(4) 培養に使用する血清毎に熱帯熱マラリア原虫の増殖に差が認められる

個別血清を用いた本実験結果から、血清因子の個人差が、原虫の増殖に影響を与えることを見出した(図5)。今後、増殖について顕著に増減が認められた血清のうち、上下それぞれ 10%程についてアミノグラム解析を実施し、原虫増殖を規定する責任アミノ酸群の同定を実施する予定である。

使用する血清のロットによって熱帯熱マラリア原虫の増殖が増減する

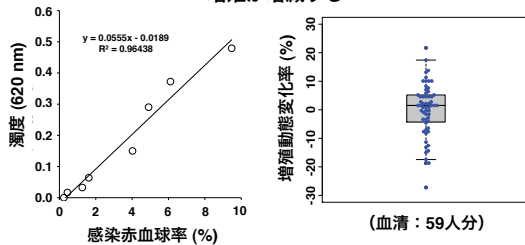


図5 個別血清を用いた原虫の培養実験

5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計7件)

① Erisha Saiki, Kenji Nagao, Moritoshi Iwagami, Shinya Fukumoto, Srivicha Krudsood, Tatsuya Sakurai, Makoto

Bannai, Shigeyuki Kano, Hiroataka Kanuka 「 Preventing malaria by adjusting amino-acid intake」 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Malaria: From Innovation to Eradication (B5) 2017.2.22 (ウガンダ)

② Erisha Saiki, Kenji Nagao, Moritoshi Iwagami, Shinya Fukumoto, Srivicha Krudsood, Tatsuya Sakurai, Makoto Bannai, Shigeyuki Kano, Hiroataka Kanuka 「 Preventing malaria by adjusting amino-acid intake」 JSPS Core-to-Core Program International Joint Workshop on Vector-Borne Diseases in Burkina Faso 2017.1.10 (ブルキナファソ)

③ 齊木選射、長尾健児、石上盛敏、福本晋也、クルドゥスドゥスリヴィッチャ、櫻井達也、坂内慎、狩野繁之、嘉糠洋陸 「アミノ酸摂取量の調整によるマラリア制御の可能性」 第 133 回東京慈恵会医科大学成医会総会 2016.10.6 (東京)

④ 齊木選射、櫻井達也、坂内慎、狩野繁之、嘉糠洋陸 「アミノ酸摂取量の調整によるマラリア制御の可能性」 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2016.8.23 (帯広)

⑤ 齊木選射、長尾健児、石上盛敏、福本晋也、クルドゥスドゥ スリヴィッチャ、櫻井達也、坂内慎、狩野繁之、嘉糠洋陸 「熱帯熱マラリアにおける重症化と宿主血中アミノ酸群動態の相関」 第 85 回日本寄生虫学会大会 2016.3.19 (宮崎)

⑥ 齊木選射、長尾健児、石上盛敏、福本晋也、クルドゥスドゥ スリヴィッチャ、櫻井達也、坂内慎、狩野繁之、嘉糠洋陸 「熱帯熱マラリアにおける重症化と宿主血中アミノ酸群動態の相関」 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015.3.21 (東京)

⑦ 齊木選射、長尾健児、福本晋也、櫻井達也、坂内慎、嘉糠洋陸 「マラリアをモデルとした病原体感染の重症化と宿主血中アミノ酸ダイナミクス」 第 22 回分子寄生虫学ワークショップ/第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2014.8.31 (帯広)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://jikei-tropmed.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嘉糠 洋陸(KANUKA HIROTAKA)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号:50342770

(2) 研究分担者

案浦 健(ANNOURA TAKESHI)
国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官
研究者番号:90407239

(3) 連携研究者

狩野 繁之(KANO SHIGEYUKI)
独立行政法人国立国際医療研究センター・研
究所・部長
研究者番号:60233912