

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20765

研究課題名（和文）熱帯熱マラリア原虫のアフリカ型アルテミシニン耐性機序解明

研究課題名（英文）Mechanism of artemisinin resistance in African Plasmodium falciparum

研究代表者

福田 直到（Fukuda, Naoyuki）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10913048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々はウガンダ共和国北部でKelch13 C469Y変異およびA675V変異を有するアルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫を発見し、これらの変異が臨床的耐性と関連することを示した。本研究は変異原虫の表現型を培養系で確認することを目的として開始した。しかしゲノム編集によって同変異を導入した標準培養株は明確なアルテミシニン耐性を示さず、何らかのバックグラウンド変異が耐性獲得に必要であると考えられた。そこでフィールド由来耐性株のゲノムを解析し、新たな変異XがA675V変異と同時に入ることで有意に耐性度が高まることが分かった。ゲノム編集により変異Xを導入した原虫を作製し、表現型解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルテミシニンは現時点で熱帯熱マラリアに対する第一選択薬である。本薬剤の導入により世界のマラリアコントロールは著しく進歩したが、近年アルテミシニン耐性原虫が急速に増加しており、治療失敗や患者の増加がみられている。2021年時点ですでに年間2億人以上がマラリアに罹患し、うち60万人以上が死亡するという莫大な社会的損失が生じている。本研究はマラリアの被害が最も大きいアフリカで新たに出現したアルテミシニン耐性の機序を明らかにするものであり、耐性遺伝子マーカーとしての利用や、耐性原虫に対する新規治療の開発、耐性原虫が集団内で増加する機序の解明と公衆衛生戦略の立案など、様々な応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have discovered artemisinin-resistant Plasmodium falciparum parasites harboring Kelch13 C469Y or A675V mutation in northern Uganda. This study was started to confirm the phenotype using in vitro culture models. However, the genome-edited standard culture strains with the mutations did not display clear artemisinin resistance, which suggested that some background mutations are necessary to acquire resistance. Then, we performed whole genome analysis of the field isolates and discovered that a novel mutation X increases resistance level accompanied by the A675V mutation. We are analyzing the phenotype of the genome-edited parasites with the mutation X.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 薬剤耐性 アルテミシニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界三大感染症の1つとされ、年間2億人以上の感染と60万人以上の死亡をもたらす国際保健上最も重要な疾患の一つである。中でもアフリカでは最も重症な熱帯熱マラリアが90%以上を占める(WHO. World Malaria Report. 2022)。熱帯熱マラリアの第一選択治療はアルテミシニン誘導体を含む併用療法であるが、2008年にカンボジアで最初のアルテミシニン耐性が報告されて以降(Noedl H, et al. N Engl J Med. 2008)、東南アジアで急速な拡大がみられている(Ashley EA, et al. N Engl J Med. 2014)。これにより併用薬にも耐性が出現したことで、当該地域における治療後の感染再燃率は50%にも達した(van der Pluijm RW, et al. Lancet Infect Dis. 2019)。

アフリカでアルテミシニン耐性は散発的な症例報告に留まっていた(Hawkes M, et al. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2015)が、我々はウガンダ共和国においてKelch13タンパクにC469Y変異またはA675V変異を有する原虫株が流行しており、臨床的治療効果が有意に低下(治療後の原虫消失遅延)していることを確認した(Balikagala B, Fukuda N, et al. N Engl J Med. 2021)。Kelch13タンパクの耐性変異は複数見つかっており、中でもC580Yはin vivo、in vitro両方の試験の末に東南アジア型のアルテミシニン耐性マーカーとして確立している(Straimer J, et al. Science. 2015)。しかし研究開始時点ではC469Y変異やA675V変異とアルテミシニン耐性の関連は完全には証明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的はアフリカ型アルテミシニン耐性の原因がKelch13タンパクのC469Y変異およびA675V変異であることをin vitroでも証明し、耐性変異として確定することである。臨床的耐性、すなわち患者の治療を開始した後の原虫消失遅延とこれらの変異が関連すること、そして患者血液から得られた原虫を直接培養してアルテミシニン感受性が低下することは我々の研究で示された(Balikagala B, Fukuda N, et al. N Engl J Med. 2021)。本研究は実験室において標準培養株やフィールド由来感受性株にこれらの変異を導入することで、アルテミシニン耐性の原因であることを確定することを目的として実施した。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集によるアルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の作出

標準培養株である3D7、Dd2に加えて、アルテミシニン耐性が発見されたウガンダ北部で採取したアルテミシニン感受性熱帯熱マラリア原虫をクローニングして、これらにKelch13 C469YおよびA675V変異を導入することでアルテミシニン耐性原虫を作出する。Cas9とDSM1耐性遺伝子yDHODHを有するプラスミド1と、ガイドRNA配列および変異kelch13遺伝子ドナー配列、WR99210耐性遺伝子hDHFRを有するプラスミド2を構築し、未感染赤血球に同時トランスフェクションしたのち各原虫株を感染させ、DSM1とWR99210を加えて選択培養した。得られた原虫を限界希釈法によりクローニングして各変異を有する原虫を作出した。

さらに同様の方法により、Kelch13変異原虫に再びゲノム編集を施して野生型に戻したものをクローニングした。

(2) 表現型解析1 アルテミシニン感受性評価

アルテミシニン感受性試験として最も一般的に用いられるring-stage survival assayを用いて評価した。原虫は生活環におけるステージによって薬剤感受性が異なり、最もアルテミシニン感受性の低い輪状体におけるin vitro感受性はヒトにおけるin vivo耐性をよく反映することが知られている。まず、作出した原虫のステージをソルビトール法で輪状体に同調したのち、24~30時間ほど培養を継続し、後期栄養体~分裂体に変化したところでパーコール法により分裂体のみを抽出した。これを3時間培養することで輪状体を得た。0 nMまたは700 nMのジヒドロアルテミシニンを含む培地で6時間、さらにジヒドロアルテミシニンを含まない培地で66時間培養し、顕微鏡的に生存している原虫の数をカウントした。薬剤フリーコントロールに対する原虫の生存率によってアルテミシニン感受性を評価した。

(3) 表現型解析2 Fitness 評価

ゲノム編集により作出した変異原虫と、オリジナルの原虫、さらに野生型に戻した(back mutation)原虫を同条件で培養し、増殖率を比較した。また2種類の原虫を同数混合して3日間培養し、変異型・野生型それぞれに特異的なプローブを用いた定量的PCRで増殖度を比較した。

4. 研究成果

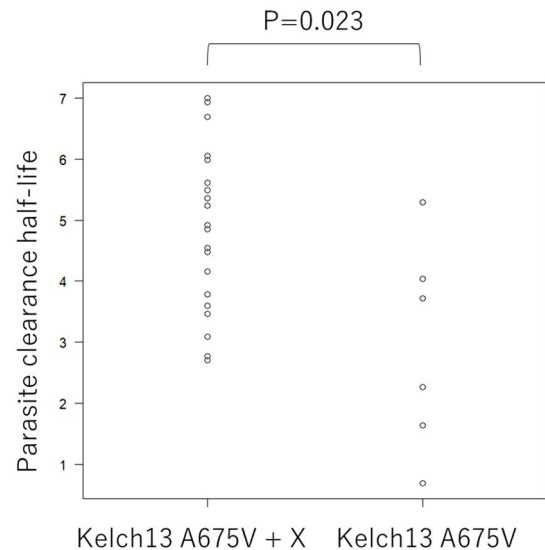
(1) kelch13 遺伝子のゲノム編集

Kelch13タンパクにC469YおよびA675V変異を導入するため、上記のようなゲノム編集用プラスミドを構築してトランスフェクションを行った。標準培養株に対するA675V変異導入では有

意なアルテミシニン感受性の低下を認めず、当該変異以外のバックグラウンド変異が耐性獲得に必要であると考えられた。フィールド由来のアルテミシニン感受性株でも同様の実験を行ったが、トランスフェクション後の増殖効率が低く、表現型解析に使用できるクローンを得ることができなかった。その間に標準培養株を用いた同様の結果が他のグループより報告されたため (Stokes BH, et al. N Engl J Med) 研究の方向性を当初のものから変更し、バックグラウンド変異を探索することとした。また同報告に対しては我々の Correspondence (Mita T, Fukuda N, et al. N Engl J Med. 2022) が出版された。

(2) フィールド株の全ゲノム解析

Kelch13 A675V 変異がアルテミシニン耐性を付与するのに必要なバックグラウンドを探索するため、ウガンダ北部で得られたフィールド株の全ゲノム解析と GWAS を行った。既知のバックグラウンド変異 (*arps10*, *crt*, *fd*, *mdr2*, *nif4*, *pibp* の各遺伝子上の SNP) はアルテミシニン耐性例のいずれにおいても見られず、アフリカ型のバックグラウンド変異として報告されている *coronin* や *falcipain-2a* 上の変異 (Tumwebaze PK, et al. Nat Commun. 2022) も耐性度との関連は明らかでなかった。しかし新たな変異 X が見いだされ、A675V 変異例の中で変異 X の有無により有意な *in vivo* 耐性度の差が認められた ($P=0.023$, 図)。解析した中で変異 X を単独で有する原虫はなく、常に Kelch13 A675V 変異と同時に存在していた。この事実により、Kelch13 A675V 変異原虫に変異 X が加わったことでアルテミシニン耐性が生じたと考えられた。そこでこの変異 X に注目して変異原虫を作製し、その表現型を解析することとした。



図：変異 X と *in vivo* アルテミシニン感受性の関係

(3) 新規耐性変異候補の検証

Kelch13 A675V 変異と変異 X をそれぞれ単独で、または両方同時に有する原虫をゲノム編集により作製した。変異 X の導入効率が低く難航したが、ゲノム編集に用いるガイド RNA と薬剤選択マーカーの最適化により改善が得られた。これを用いてアルテミシニン感受性、増殖効率、生殖母体形成能などの表現型解析や、back mutation 実験を実施中である。これらの成果は今後論文として公表することを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Balikagala Betty, Fukuda Naoyuki, Ikeda Mie, Katuro Osbert T., Tachibana Shin-Ichiro, Yamauchi Masato, Opio Walter, Emoto Sakurako, Anywar Denis A., Kimura Eisaku, Palacpac Nirianne M.Q., Odongo-Aginya Emmanuel I., Ogwang Martin, Horii Toshihiro, Mita Toshihiro	4. 巻 385
2. 論文標題 Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMoa2101746	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 Toshihiro Mita, Naoyuki Fukuda, Betty Balikagala	4. 巻 386
2. 論文標題 Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Africa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 New England Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1056/NEJMc2117480	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 Coppee Romain, Bailly Justine, Sarrasin Veronique, Vianou Bertin, Zinsou Boris-Enock, Mazars Edith, Georges Hugues, Hamane Samia, Lavergne Rose-Anne, Dannaoui Eric, Balikagala Betty, Fukuda Naoyuki, Odongo-Aginya Emmanuel I, Mita Toshihiro, Houze Sandrine, Clain Jerome	4. 巻 online
2. 論文標題 Circulation of an Artemisinin-Resistant Malaria Lineage in a Traveler Returning from East Africa to France	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cid/ciac162	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 Zhang Xiaochen, Ishikawa Dai, Nomura Kei, Fukuda Naoyuki, Haraikawa Mayuko, Haga Keiichi, Shibuya Tomoyoshi, Mita Toshihiro, Nagahara Akihito	4. 巻 11
2. 論文標題 Donor Screening Revisions of Fecal Microbiota Transplantation in Patients with Ulcerative Colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11041055	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 Fukuda N, Tachibana S, Ikeda M, Sakurai-Yatsushiro M, Balikagala B, Katuro O, Yamauchi M, Emoto S, Hashimoto M, Yatsushiro S, Sekihara M, Mori T, Hirai M, Opio W, Obwoya P, Auma M, Anywar D, Kataoka M, Palacpac N, Odongo-Aginya E, Kimura E, Ogwang M, Horii T, Mita T	4. 巻 81
2. 論文標題 Ex vivo susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs in Northern Uganda	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102277 ~ 102277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102277	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 Fukuda Naoyuki, Balikagala Betty, Ueno Tsuyoshi, Anywar Denis A, Kimura Eisaku, Palacpac Nirianne Marie Q, Odongo-Aginya Emmanuel I, Ogwang Martin, Horii Toshihiro, Miida Takashi, Mita Toshihiro	4. 巻 76
2. 論文標題 The Impact of Sequestration on Artemisinin-Induced Parasite Clearance in Plasmodium falciparum Malaria in Africa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1585 ~ 1593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cid/ciac944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

順天堂大学医学部 熱帯医学・寄生虫病学講座 業績 https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/kiseityu/achievements.html

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------