

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590498

研究課題名(和文) マイクロサテライト多型解析を応用したマラリア薬剤耐性アレル頻度の将来予測

研究課題名(英文) Development of predictive model for future prevalence of antimalarial-resistant gene using microsatellite polymorphism

研究代表者

美田 敏宏 (Mita, Toshihiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80318013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアはエイズ、結核と並ぶ世界3大感染症の一つである。グローバルな対策における最大の障壁は薬剤耐性マラリア原虫の出現と拡大である。本研究により、一点サンプリングによって得られたデータから薬剤耐性原虫の適応度が推定でき、将来耐性原虫の頻度が変化していく軌跡を予測することができるモデルを作成することができた。本解析モデルは様々な流行地に適用でき、頻回のサンプリングを必要とせずに耐性遺伝子頻度の未来予測を可能とする。

研究成果の概要(英文)：Malaria is one of the three major infectious disease including tuberculosis and HIV/AIDS. The biggest barrier for the global achievement of malaria control is emergence and spread of drug resistant malaria. This study successfully created a model that can estimate a level of selective advantage in drug-resistant parasite by one-point sampling and by using this estimate, predict the trajectory of drug resistant allele prevalence. This model will be able to be applicable to various malaria endemic regions and provide future estimation of drug-resistance without frequent sampling.

研究分野：熱帯医学

キーワード：マラリア 薬剤耐性 耐性遺伝子 予測モデル

1. 研究開始当初の背景

マラリアはエイズ、結核と並ぶ世界3大感染症の一つで、毎年数億人の患者と百万人以上の死亡者を出している。現在、抗マラリア薬による早期治療が制圧の重要な柱となっているが、薬剤耐性マラリア原虫が急増しており、その対策上大きな問題となっている。第一選択薬として広く用いられていたピリメタミン・サルファドキシシン(ファンシダール[®])およびクロロキン耐性の責任遺伝子 dhfr, dhps および pfcr1 が 1980 年代後半から 2000 年にかけて順次発見され、マラリア薬剤耐性レベルの評価に原虫薬剤耐性遺伝子の解析が広く用いられるようになった。

このような背景のもと、これまで申請者らは薬剤耐性原虫の出現と拡散メカニズムの解明に取り組んできた。近年は、全流行地域をほぼ包括した熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性遺伝子とともに、マイクロサテライト多型を用いた集団遺伝学的解析をすすめ、以下の重要な知見を報告してきた。

(1) 薬剤耐性マラリア原虫は、限られた地域からごく稀にしか出現しない。

(2) 薬剤耐性原虫の移入によって、耐性蔓延地域が拡大していく。

(3) クロロキンおよびファンシダール耐性原虫は、ほぼ同様の地理学的経路により広がっていった。

(4) いったん耐性原虫が地域に移入すると、薬剤による選択によって、その頻度が急激に増加する。以上のことは、流行地に移入した耐性原虫が、抗マラリア薬の使用により選択され、その頻度が増加することにより、薬剤耐性を深刻化させることを意味している。申請者らのこれまでの成果および国外の類似研究から、耐性原虫がどのような地理的拡散をしていたか、についての知見は蓄積されてきた。しかし、いつ耐性原虫が出現し、どのような時間経過で増加していったのかについては、まだ多くのことが未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、薬剤耐性マラリア対策へ応用可能な基盤研究として、ある地域にいつ耐性原虫の移入が起こり、当該薬剤の使用状況下で将来、耐性原虫がどのように増加していくのかを推定することができる解析モデルを開発することを目指している。この目的の下、以下について順次明らかにしていく。

(1) それぞれの地域における原虫集団サイズを推定する。集団サイズは地域差が大きく、耐性の進化と最も関連する因子の一つである。

(2) マイクロサテライトは SNP と比べ、突然変異率が高く、座位ごとの変異率の違いも大きい。本研究で用いるクロロキン(pfcr1)および SP 耐性関連遺伝子(dhfr, dhps)の近傍に存在するマイクロサテライト

の突然変異率を明らかにする。

(3) 本研究で用いるマイクロサテライト座位間の組換え率を明らかにする。

(4) マラリアは非常に高い頻度で自殖をおこなっているが、自殖では組換えが起こらない。自殖の程度には地域差があるため、それぞれの地域における自殖の割合(近交係数)を、多重感染解析から明らかにする。

(5) 薬剤耐性遺伝子の近傍に存在するマイクロサテライト多型度の上昇速度と ~ から、シミュレーションプログラムを作成し、耐性原虫の相対適応度(感受性原虫に対する有利度)を最尤推定する。

(6) 最尤推定された耐性原虫の相対適応度から、耐性原虫がそれぞれの地域に、いつ移入したのか、今後どのように増加していくのかの将来予測をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 熱帯熱マラリア原虫検体の薬剤耐性遺伝子型頻度および耐性進化系統の決定

地域差を考慮した解析検体の選択

薬剤耐性はアジア、オセアニア、アフリカ、南米の4地域で固有に進化している。このため、それぞれの地域(カンボジア、パプアニューギニア、ガーナ、ブラジル)からすでに得ている熱帯熱マラリア原虫を解析に用いる。

薬剤耐性遺伝子シーケンスと頻度分析

クロロキン、ファンシダール耐性と関連する以下の薬剤耐性遺伝子を対象とする、pfcr1, dhfr, dhps。耐性関連変位部位を中心とした領域を直接シーケンスし、それぞれの地域の耐性遺伝子頻度をもとめる。分析手法はすでに確立済みである(Mita et al. Mol Biochem Parasitol 2004)。

薬剤耐性遺伝子周囲マイクロサテライトのタイピング

耐性原虫が、どのような耐性進化系統に属するのか明らかにするため、薬剤耐性遺伝子周囲マイクロサテライト多型(TAリピート反復数)解析をおこなう。解析マイクロサテライト座位、および解析手法はすでに決定されている。反復数の決定は、5'末端蛍光標識プライマーを用いた Semi-nested PCR 法、および Applied Biosystems 3130 にて行う。

中立なマイクロサテライトマーカーのタイピング

(2) 解析モデル作成に必要な地域原虫集団に固有な遺伝変数の数量化

マイクロサテライト突然変異率および原虫集団サイズの推定

マイクロサテライトの突然変異率は非常に高く、座位間の違いは大きい。合祖理論を応用したプログラム Fins を用いることによって突然変異率を最尤推定する。予備実験により、解析する座位数は2座位のとき、最も

良い推定値を得ることができることが分かっている。また、多型度が高すぎたり、低すぎたりする座位では多型情報が不十分なため、各マイクロサテライト座位のヘテロ接合度を計測し、多型度の適切な2座位を選択する。これらを用いた Fins 解析により、解析座位の突然変異率を求める。

原虫集団サイズは地域差が大きいいため、それぞれのサンプル地域における集団の有効な大きさを求める。Fins 解析により集団あたりの組換え率も最尤推定することができる。この推定値と、熱帯熱マラリア原虫の組換え率 17kb/cM (どの染色体でもほぼ一定であり、hot spot も明らかになってきている) (Mu et al. Nat Genet 2010) から、各地域における原虫集団の有効な大きさを数量化する。

近交係数の決定

マラリアにおける自殖の割合 (近交係数) は 0.2~0.9 とされているが、地域による差異が大きい。自殖の割合に比例して、組換えによるマイクロサテライト多型増加の速度は低下するため、近交係数は重要な変数である。媒介蚊は一回の吸血で産卵するため、近交係数は多重感染率から推定可能である。そこで、1- で得た msp-1 タイピング結果から各地域における近交係数の類似値を求める。

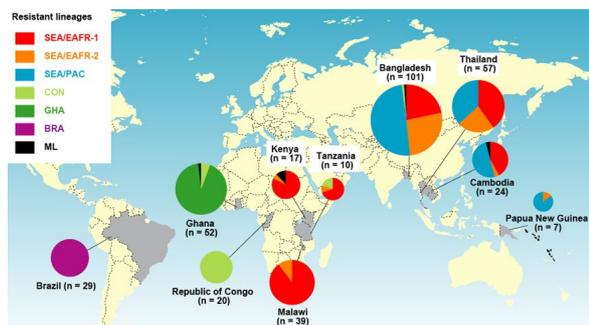
(3) 耐性原虫頻度の未来予測を可能とする解析モデルの作成

以上の検討から定量化された遺伝変数を用いて解析モデルの作成をおこない、耐性原虫頻度が将来どのように変化するか予測する。さらに作成したモデルの有用性を評価する。

実際に流行地で起こっていることをシミュレーションできるモデルを作成し、耐性原虫の相対適応度、すなわち耐性原虫が毎世代どれぐらいの頻度で増加していくかを推定する。作成にはエクセルを用い、受精に参与する配偶子 (生殖体) を抽出する過程に乱数を振る。移入時には単一であった耐性原虫のマイクロサテライト多型度は、組換えと突然変異によって上昇する。薬剤耐性の相対適応度を 1、野生株の相対適応度を $1-s$ とする。 s を 0 から 1 まで変化させ、各 s に対して、シミュレーションをおこない、耐性遺伝子頻度が実験 1- で求めた観察値と同様になった時点でランを終了する。このときシミュレーションから得られたマイクロサテライト多型度と実験 2- で求めた観察値の一致度を評価し、最も一致度の高い s を最尤推定値とする。なお、シミュレーションで起こさせる突然変異と組換え、および近交係数、集団サイズは実験 2- でもとめた値を用いる。

4. 研究成果

(1) 熱帯熱マラリア原虫検体の薬剤耐性遺伝子型頻度および耐性進化系統の決定については、アフリカ、アジア、南米、メラネシアと地域差を考慮した解析検体を選択し、クロロキン、SP 耐性遺伝子シーケンスと頻度分析をおこなった。さらに、耐性遺伝子周囲マイクロサテライトのタイピングをおこない、耐性進化について解析した。その結果、クロロキンについては4系統、ピリメタミン、サルファドキシンではそれぞれメジャーな耐性系統として、2, 5 系統が明らかになった。詳細については、すでに論文で公表している (2, 5, 6)。

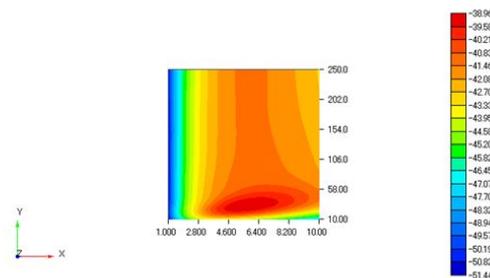


dhps の耐性系統分布

(2) 解析モデル作成に必要な地域原虫集団に固有な遺伝変数の数量化

最も耐性系統が単純なパプアニューギニアの検体を用いてシミュレーションをおこなった。さらに以後の解析には、11 個全ての MS 座のデータがあるサンプルのみを解析対象とした (wild 27 例、single 1 例、double 72 例)。

8 例の野生型のデータに対し、Fins プログラム (coalescent simulation) を用いて、連鎖する MS 座の、突然変異率と組換え率の推定を試みた。シミュレーションプログラムに限界から解析座位は 2 つとした。これらは Dhfr 遺伝子座の上流と下流から 1 つずつ選択した (-29.61kb と +5.87kb)。



対数尤度ヒートマップ (Z 軸が対数尤度) X 軸は世代あたりのステップワイス突然変異率 ($4Nm$) を、Y 軸は世代あたりの組換え率 ($4Nr$) を示す。

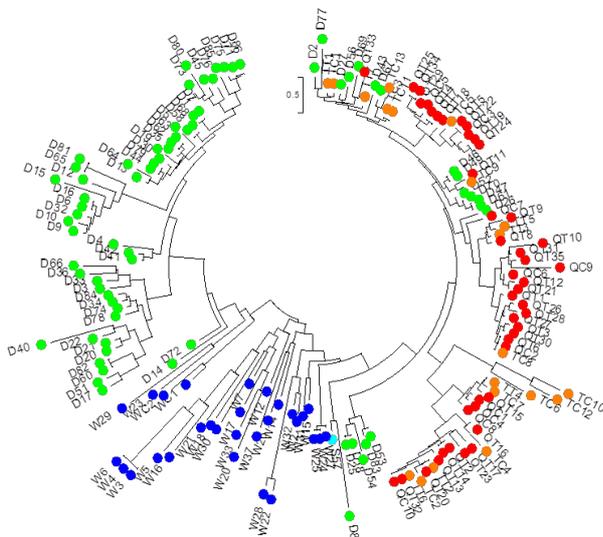
図に示すように、最尤推定値は $4Nm=2N$, $m=5.73$ ($CI=3.55 \sim 9.00$), $4Nr=2N$, $r=31.82$ ($CI=14.85 \sim 65.76$) であった。熱帯熱マラ

リア原虫の世代当りの組換え率は、一般に 17kb /cM であるので、この 2 つの MS 座間では $r=0.02087(=0.01 \times (29.61+5.87)/17)$ と推定される。また、PNG における近交係数 f は 0.63 であるので、 $r'=r(1-f)$ より (Mu et al., PLoS Biol 3(10): e335) $r'=0.0077219$ となる。

以上より、Wewak におけるマラリア原虫の有効集団サイズは $N'=2060$ (962~4258) である。また、 $m'=m(1+f)$ より (Mu et al., PLoS Biol 3(10): e335) 世代当りのシングルステップ突然変異率は $m'=0.00227$ (0.00140~0.00356) と推定される。

(3) 耐性原虫頻度の未来予測を可能とする解析モデルの作成

主成分分析と距離行列に基づく系統樹解析によって、耐性型 double mutant のうち、52 例はメラネシア起源、20 例は東南アジア起源と推定された。



距離行列に基づく系統樹解析 PNG、タイ、カンボジアから選んだ 167 サンプルをもとに、近隣結合法により系統樹を作成赤色は quadruple mutant (Q)、オレンジ色は triple mutant (T)、緑色は double mutant (D)、水色は single mutant (S)、青色は wild type (W) を示す

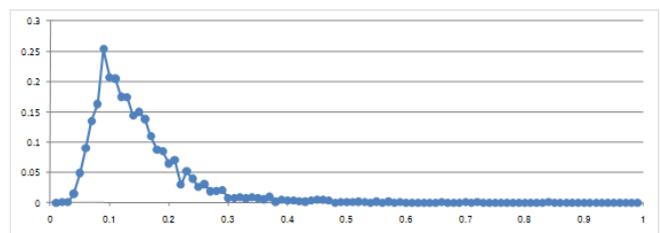
野生型の頻度は 7.2%、single は 1.8%、PNG タイプ (double) は 67.6%、東南アジアタイプ (double) は 23.3% 程度と推定される。また、頻度が高いことから、PNG タイプの株の誕生時期は、東南アジアタイプの株が PNG に移入した時期よりも早いことがわかる。

前向きシミュレーションでは、集団サイズ $N=2060$ 、シングルステップ突然変異率 $m'=0.00227$ 、組換え率 $r=0.02087$ (近交係数を考慮するので、ここは通常の組換え率を利用する)、近交係数 $f=0.63$ (0.63 の確率で自殖 (つまり組換え無し) するとした) とおいた。ステップ薬剤耐性株 (double) の相対適応度を 1、野生株の相対適応度を $1-s$ とし、決定

論的方程式により、メラネシアタイプの耐性株が Wewak に出現 (移入) してからその頻度が 67.6% まで頻度が上昇する過程の頻度変化の軌跡、および、東南アジアタイプの耐性株が移入してからその頻度が 23.3% まで頻度が上昇する過程の頻度変化の軌跡を求めた (この時点がランの終了時点)。なお、それぞれの株がどの程度流入したのかは不明なため、ある時点で 1 株のみが Wewak に移入したと仮定した。

各グループ内における、-29.61kb と +5.87kb の 2 つの MS 座位からなるハプロタイプのヘテロ接合度は、メラネシアタイプが 0.59 であり、東南アジアタイプが 0.64 であった。また、最も頻度の高いハプロタイプ 163-111 の頻度は、メラネシアタイプが 0.63 であり、東南アジアタイプが 0.6 であった。

野生型ハプロタイプの頻度は世代によらず一定 (観察値と同じ) と仮定し、耐性型のみで機会的遺伝的浮動が起こると仮定したシミュレーションを行った。ラン終了時に、ヘテロ接合度と最頻ハプロタイプの頻度が、観察値の上下 20% 以内に収まれば成功とし (4 つ全てが収まれば)、各 s に対して 1000 試行あたりの成功割合を求めた (下図)。 $s=0.09$ (メラネシア由来は 106 世代前、東南アジア由来は 96 世代前に相当) のときの成功率が最も高かったが、 $s=0.05\sim 0.35$ (メラネシア由来は 24~194 世代前、東南アジア由来は 23~176 世代前に相当) くらいまでが 95% credible interval (95% 信用区間) になる。



本研究課題は、いまだあきらかになっていないマラリア原虫集団における各種集団遺伝学的パラメーターを明らかにし、その結果を用いて熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性が今後どのように変化していくのかを予測することができる解析モデルを開発することにある。最終目標としてのシミュレーションモデルの開発は達成することができ、研究計画はおおむね順調に進んだと言える。本モデルを用いて、耐性原虫の持つ s を推定できたが、実用レベルへと精度を向上させるためには、「自殖率のより良い推定」及び「マイクロサテライト座位間の組換え率の推定」をさらにすすめていく必要があり、今後の課題となる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)
いずれも査読あり

1. Murai K, Culleton R, Hisaoka T, Endo H, Mita T. Global distribution of polymorphisms associated with delayed *Plasmodium falciparum* parasite clearance following artemisinin treatment: genotyping of archive blood samples. **Parasitol Int**. In press
2. Mita, T., Ohashi, J., Venkatesan, M., Marma, A. S., Nakamura, M., Plowe, C. V., & Tanabe, K. Ordered accumulation of mutations conferring resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the *Plasmodium falciparum* parasite. **J Infect Dis**. 2014. 209: 130-139
3. Tanabe K, Jombart T, Horibe S, Palacpac N, Honma H, Tachibana S, Nakamura M, Horii T, Kishinod H, Mita T*. *Plasmodium falciparum* mitochondrial genetic diversity exhibits isolation-by-distance patterns supporting a sub-Saharan African origin. **Mitochondrion** 2013 13: 630-636
4. Mita, T., Tanabe, K. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. **Jpn J Infect Dis** 2012 65: 465-45
5. Takahashi, N., Tanabe, K., Tsukahara, T., Dzodzomenyo, M., Dysoley, L., Khamlome, B., Sattabongkot, J., Nakamura, M., Sakurai, M., Kobayashi, J., Endo, H., Hombhanje, F., Tsuboi, T., Mita, T. A large scale survey for

novel genotypes of the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistant *pfcrt* gene **Malaria J** 2012 11:92

6. Mita, T., Venkatesan, M, Ohashi, J, Culleton, R, Takahashi, N, Tsukahara, T., Ndounga, M, Dysoley, L, Endo, H, Hombhanje, F, Ferreira, M, Plowe, CV, Tanabe, K. Limited geographical origin and global spread of sulfadoxine-resistant *dhps* alleles in *Plasmodium falciparum* populations. **J Infect Dis** 2011 204:1980-8
7. Tanabe, K., Zakeri, S, Palacpac M, Afsharpad, M, Randrianarivelosia M, Kaneko, A, Marma, AS, Horii, T, Mita, T. Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (PfATP6) gene among wide geographical parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. **Antimicrob Agents Chemother** 2011 55:94-100.

〔学会発表〕(計 28 件)

〔図書〕(計 3 件)

1. 美田敏宏 . マラリア/バベシア . 今日の治療指針 2014 . 256-7, 2014
2. 美田敏宏、北潔 . 検査値を読む : 寄生虫卵・虫体検査 . 内科 111: 1049, 2013
3. 遠藤弘良、美田敏宏 . 熱帯性脾腫 . 症候群ハンドブック 274, 2011

6 . 研究組織

(1)研究代表者

美田 敏宏 (MITA, Toshihiro)
順天堂大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 : 80318013