

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26305009

研究課題名(和文) タイ国境地域患者由来アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の株化と耐性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of artemisinin resistance in Thai-Myanmar border region

研究代表者

岩永 史朗 (IWANAGA, Shiroh)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20314510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、アルテミシニン耐性原虫がタイ国境地域で出現し、その拡散防止が喫緊課題となっている。本研究ではタイ-ミャンマー国境地域由来原虫に対し独自の指標に基づき設定した条件下でスクリーニングを行い、アルテミシニン耐性原虫株の樹立した。更に同耐性原虫株より独自に開発した耐性遺伝子迅速同定法を用いて耐性遺伝子候補を同定し、細胞内の酸化状態が耐性に重要な役割を果たすことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we collected the malaria patient bloods in Thai-Myanmar and established 255 of the cultivable parasite strain. Next, we established the detection method for artemisinin resistance. In this method, we cultured the parasites in the presence of 5 nM of artemisinin for 96 hours and evaluated their resistance in terms of their survivals. By using this method, we identified 7 artemisinin resistant parasites from those obtained cultivable parasites. In contrast to the Cambodian resistant parasite, one of them did not show the resistance at the ring stage. This result indicated that Thai-Myanmar resistant parasite was different from the Cambodian resistant parasites. Furthermore, we identified the gene responsible for redox system as drug resistance gene. This result suggested that the change of the redox condition in the cell may involved in the artemisinin resistance.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア アルテミシニン 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

マラリアは東南アジア・アフリカを中心に年間約2~3億人の感染者と約65万人の死者を出す世界三大感染症の一つである。現在、殆ど全ての抗マラリア薬に対する耐性原虫が出現し地球規模で蔓延していることから、その治療は耐性原虫が出現していない唯一の薬剤であるアルテミシニンに依存している。しかし近年タイ-カンボジア及びタイ-ミャンマー国境地域においてアルテミシニンの治療効果の低下が報告され、耐性原虫の出現が強く懸念されるとともに、その拡散防止が喫緊の課題となっている。耐性原虫の拡散を防止するためには耐性原虫株を樹立し耐性遺伝子を同定して、これを指標に疫学調査を行うことが重要である。しかし未だ *in vitro* において患者由来原虫のアルテミシニン耐性を検出できないことから耐性原虫は株化されておらず、有効な対策は講じられていない。

2. 研究の目的

本研究では以下の研究を計画する①タイ-ミャンマー国境地域（図1）のマラリア患者の治療履

歴を基にアルテミシニン耐性原虫株候補を選定し安定培養株化する。

②前述の三項目を指標

にスクリーニング条件を設定し、安定培養株からアルテミシニン耐性原虫株を樹立する。③アルテミシニン耐性原虫株から独自の耐性遺伝子同定法を用い耐性遺伝子を同定する。以上の研究により新規なアルテミシニン耐性検出法を作製し、アルテミシニン耐性機構の解明を試みる。



図1:タイ-ミャンマー国境地域フィールドサイト

3. 研究の方法

(1) 患者由来血液からの安定培養株の樹立

国立公衆衛生省・疾病制御部・第10支部の協力の基、メーサリエン総合病院及びメーソット総合病院を受診したマラリア患者の治療経過を記録し、アルテミシニンを用いた混合療法 (Artemisinin Combination Therapy: ACT) による治療が遅延した患者を把握する。通常、ACTによる治療では約3日間以内に末梢血中の原虫が死滅するが、アルテミシニン耐性原虫の感染を疑われる患者では4~6日間かかることから、これを指標として治療の遅延を判定する。一方、同時に前述のマラリア患者の血液をACTによる治療前に採取し、チェンマイ大学を中継してBIOTECまで移送する。メーサリエン地域及びメーソット地域とBIOTECは数百km離れており、直接移送した場合、原虫が死滅する可能性があることから、これを防ぐために中継地点であるチェンマイ大学にて短期間原虫を培養し、冷凍ストックにした後BIOTECへ移送する。BIOTECでは移送された原虫ストックを再度培養に供し培養安定株化する。現在、上記経路で原虫を移送し、安定的に培養株を得ている。最終的に患者の治療履歴を参照し、アルテミシニン耐性原虫の候補を選定して日本へと移送する。上記作業はマラリア患者が急増する雨季の前後に各3週間をかけて実施する。

(2) アルテミシニン耐性原虫株の樹立

初めにアルテミシニン耐性株を選択するためのスクリーニング条件を決定する。スクリーニング条件は①薬剤濃度、②培養日数、③薬剤処理回数に関して以下の手順で設定する。

①薬剤濃度の設定：野生型原虫のアルテミシニンに対する IC_{50} 及び IC_{90} を決定する。次に IC_{50} と IC_{90} の間になるように複数の薬剤濃度を設定し、各薬剤濃度下で野生型原虫を培養する。その後、数日間原虫の生育

の変化をモニターし、最も緩やかに原虫が死滅する濃度条件を決定する。

②培養日数の設定：決定した薬剤濃度下で野生型原虫を培養し、原虫が完全に死滅する最短日数を決定後、それよりも1日短い期間を培養日数として設定する。

③薬剤処理回数設定：決定した薬剤濃度・培養日数で野生型原虫を培養後、薬剤を除去し数日間から1週間程度培養する。次に原虫を新鮮赤血球とともに継代し、再び前述と同様に薬剤存在下および非存在下で培養を行う。この工程を繰返し、最終的に原虫が完全に死滅する回数を薬剤処理回数として設定する。続いてフィールドサイト患者由来のアルテミシニン原虫株候補を、上記①～③を実施して決定したスクリーニング条件下で培養する。原虫株のアルテミシニン耐性能はスクリーニング後、生存していた原虫の IC_{50} を野生型原虫と比較することで評価する。一方、設定した条件で全ての候補原虫が死滅した場合は薬剤処理回数、培養日数、薬剤濃度の順に条件を緩和し、再度培養を試みる。複数の耐性株が得られた場合は IC_{50} を指標に耐性能が最も強いものを選択し、以降の実験に供する

(3)アルテミシニン耐性遺伝子の同定

株化したアルテミシニン耐性株より図1Aに示す方法に従い、遺伝子ライブラリーを構築する。即ちまず、ゲノムDNAを抽出し制限酵素による限定分解を行って10-50kbのDNA断片を調製する。次にこれらをセントロメアプラスミドに組み込み、独自に開発した高効率遺伝子導入法により直接、野生型株(薬剤感受性)へ導入する。次に(2)で設定した条件下でライブラリーを導入した原虫をスクリーニングし、新たにアルテミシニン耐性を獲得した原虫を選択する。続いて選択した原虫を限界希釈法によりクローン化し、インサートDNA断片が挿入されたセントロメアプラスミドを回

収する。インサートDNAの配列はゲノムウォーキング法により決定し、これを基にアルテミシニン耐性に関与する原虫染色体上の領域を同定する。最終的に同定した領域中に存在する遺伝子を個別に導入した組換え原虫を作製して薬剤耐性能を検討し、アルテミシニン耐性遺伝子を同定する。また耐性遺伝子中の変異を同定し、個別の変異を野生型原虫に導入して耐性能を調べ、耐性を付与する変異を同定する。更にIで得たアルテミシニン耐性株を含む原虫安定培養株において、同定した耐性遺伝子の配列を調べて変異の有無を調べ治療履歴との相関を検討する。

これにより同定した耐性遺伝子が分子マーカーとして利用可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) 患者由来血液からの安定培養株の樹立

平成26年度～27年度の期間に提携しているメーサリエン総合病院及びメーソット総合病院を受診したマラリア患者より血液を採取し、総計で255株の安定培養株を樹立することができた。これらは全て日本へと移送し、タイ・日本の両国で保存サンプルとした。

(2) アルテミシニン耐性原虫株の樹立

アルテミシニン耐性株を樹立するためには正確なアッセイ方法が必要となる。しかし、アルテミシニン耐性が世界で初めて検出されたカンボジア由来株がリング期のみで耐性を示すことから、現在は同生育ステージのみを対象としたRing survival assay(RSA)により耐性を調べている。そのため、原虫が他のステージでの耐性持つ可能性は考慮されておらず、重要な耐性を見落とす可能性があり、不正確である。そこでまず、これを改良することを目的とし、赤血球内の全生育ステージを対象としたアルテミシニン耐性の

検出法の確立を試みた。即ち、薬剤濃度、薬剤処理日数、処理回数について培養条件を検討し、原虫の生存を指標に耐性を評価した。実験にはカンボジア-タイ国境地域由来の耐性株 (MRA1240 株) と同地域由来の感受性株 (MRA1239 株) を陽性および陰性コントロールとした。MRA1240 および 1239 株の RSA による耐性指標値 (RSA 値) はそれぞれ、88% と 0.01% である。実験の結果、図 2 に示すように 5 nM のジハイドロアルテミシニンにより 96 時間処理をおこない、薬剤除去後、培養を続けた結果、MRA1240 株は薬剤処理で死滅することなく、生育した。一方、MRA 株は完全に死滅し、陽性および陰性コントロールにおいて明確な耐性の差を検出することができた。よって、この条件においてアルテミシニン耐性を明確に検出可能であることが示された。続いて別のカンボジア由来の 3 種の耐性株 (MRA1236, 1238, 1241 株) について前述の条件で耐性を検討した。MRA1236、1238、1241 株の RSA 値はそれぞれ、27.3%、6.2%、49.3% であり、RSA において MRA1240 株よりも弱い耐性を示す。MRA1236 および 1241 株については薬剤除去後、3 日目に原虫の生存が確認され、アルテミシニン耐性を有することが明確に検出された。一方、MRA1238 に関しては薬剤除去後、8 日目において生存が確認され、前述の 2 株よりも耐性が弱いことが確認された。この耐性の程度は RSA 値と完全に相関していることから、本手法は耐性を検出するだけでなく、その程度も評価可能であることが

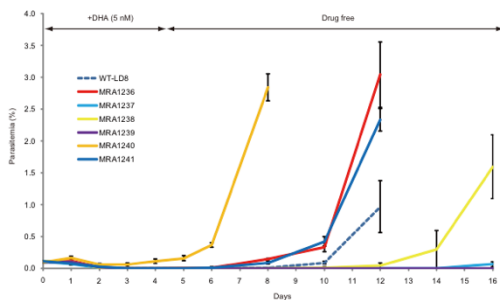


図 2 : SAAR によるカンボジア由来株のアルテミシニン耐性示された。本研究ではこの手法を Simple

Assay for Artemisinin Resistance (SAAR) と呼ぶ。

次に SAAR を使い、(1) で樹立した原虫株の内 41 株についてアルテミシニン耐性を検討した結果、MRA1236 よりも耐性を示す原虫を 9 株、同定した。また、これらの内、7 株については再現性良くアルテミシニン耐

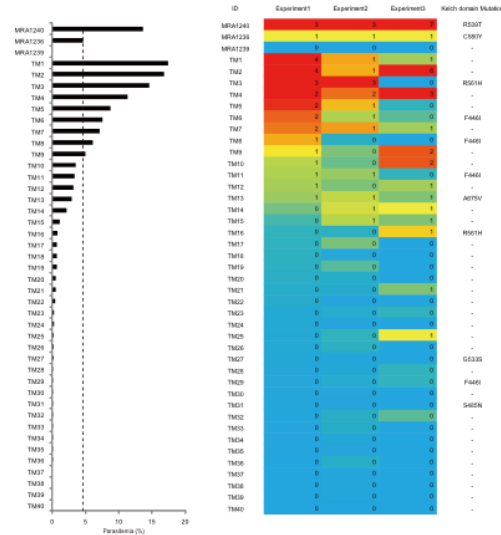


図 3: タイ-ミャンマー国境地域患者株のアルテミシニン耐性

性を検出することができ、これらのタイ-ミャンマー国境地域のアルテミシニン耐性株 (TM1-7) とした (図 3)。続いて検出した 7 株のアルテミシニン耐性株についてカンボジア株と同様に RSA を行った。その結果、SAAR では MRA1236 株と同程度以上の耐性が検出されにも関わらず、いずれの株の RSA 値は MRA1236 株よりも低いものであった。そこで

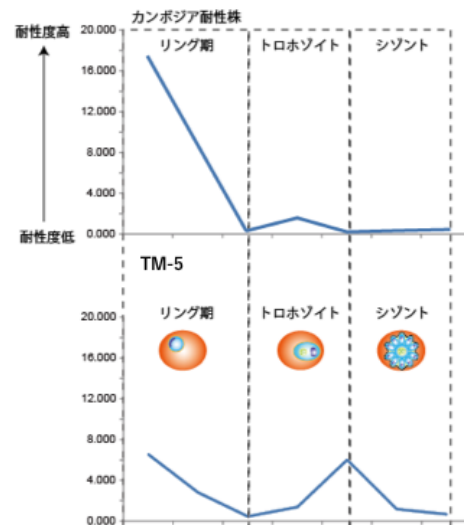


図 4: TM-5 株のアルテミシニン耐性のステージ特異性

RSAで活性が全く検出されなかったTM-5株についてアルテミシニン耐性のステージ特異性を検討した。その結果、TM5株はリング期後期からトロホゾイト期に耐性を示すことが明らかとなった(図4)。以上のことから少なくともタイ-ミャンマー国境地域のアルテミシニン耐性株は既に報告されているカンボジア株とは異なるアルテミシニン耐性株であることが明らかとなった。

(3)アルテミシニン耐性遺伝子の同定

カンボジア株とは異なる耐性機構を持つTM-5株を材料にマラリア原虫人工染色体を用いた迅速同定法による耐性遺伝子の同定を試みた(図5)。まず、TM-5株からゲノムDNA

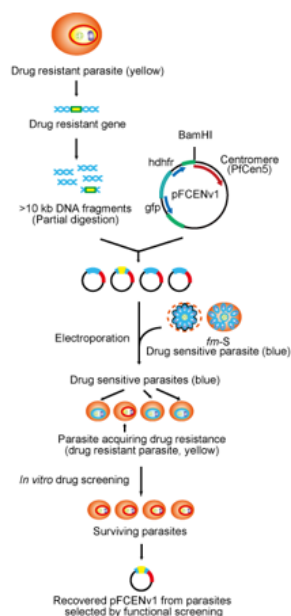


図5:人工染色体を使った耐性遺伝子同定法

を抽出し、ゲノム全体を約10カバールする遺伝子ライブラリーを構築した。次にライブラリーを二分割し、SAARと同じ条件でライブラリーを処理して生存した原虫を回収した。この作業を4回繰り返す、最終的に生存した原虫を得た。得られた原虫より人工染色体を回収して組み込まれているDNA断片の配列を解析したところ、内部に細胞内の還元状態維持に関わる遺伝子が含まれていることが明らかとなった。アルテミシニンは原虫内に取り込まれた際にEndoperoxide bridgeの切断によりperoxideが生成され、原虫の細胞内タ

ンパク質等の分子を酸化する。よって同定した遺伝子は細胞内を通常よりも還元状態にすることにより、この活性化したアルテミシニンによる細胞内分子の酸化を抑制して耐性を示すと考えられた。

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6件)

- ①. Saito F., Hirayasu K., Satoh T., Wang C.W., Lusingu J., Arimori T., Shida K., Palacpac N.M.Q., Itagaki S., Iwanaga S., Takashima E., Tsuboi T., Kohyama M., Suenaga T., Colonna M., Takagi J., Lavstsen T., Horii T., Arase H., Immune evasion of Plasmodium falciparum by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature*. 7;552(7683):101-105, 2017. doi: 10.1038/nature24994. (査読有り)
- ②. Shiratsuchi T, Rai U, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S., Yuda M, Tsuji M., A potent malaria vaccine based on adenovirus with dual modifications at Hexon and pVII., *Vaccine*. 35(50):6990-7000. 2017 doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.066. (査読有り)
- ③. Li X, Huang J, Kaneko I, Zhang M, Iwanaga S., Yuda M, Tsuji M. A potent adjuvant effect of a CD1d-binding NKT cell ligand in human immune system mice., *Expert Rev Vaccines*. , 16(1):73-80. 2017 doi: 10.1080/14760584.2017.1256208 (査読有り)
- ④. Yuda M., Iwanaga S., Kaneko I., Kato T., Global transcriptional repression: An initial and essential step for Plasmodium sexual development., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112:12824-12829, 2015. doi: 10.1073/pnas.1504389112. (査読有り)
- ⑤. Kaneko I., Iwanaga S., Kato T., Kobayashi I., Yuda M., Genome-Wide Identification of the Target Genes of AP2-0, a Plasmodium AP2-Family Transcription Factor., *PLoS Pathogen*. 11:e1004905, 2015. doi:

10.1371/journal.ppat.1004905. (査読有り)

- ⑥. Iwanaga S., Isawa H, Yuda M., Horizontal gene transfer of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. *Nat Commun.* 5:3373. 2014 doi: 10.1038/ncomms4373. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ①. Iwanaga S., Drug resistance in Malaria., Awaji, Japan, *The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity*, 2016. (Invited speaker)
- ②. Iwanaga S., Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks., Medical Entomology Symposium at the Annual Meeting of Taiwan Entomological Society. 21/10/2015 (Invited speaker)
- ③. Iwanaga S., Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks., Kobe, Japan 01-04/12/2015 BMB2015 (Invited speaker)
- ④. Iwanaga S., Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks. 2015 International meeting of Matryoshka-type Evolution 30/09/2015-02/10/2015 (Invited speaker), Tsukuba, Tsukuba Univ. (Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells)
- ⑤. Iwanaga S., Horizontal gene transfer (HGT) of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks., International Symposium on Frontier Science of Pathogen-transmitting Vectors, 2, Feb, 2015 (Invited speaker), Tokyo.

[図書] (計 0 件)

無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: マラリア原虫のアルテミシニン耐性検出法

発明者: 岩永史朗・油田正夫・金子伊澄

権利者: 三重大学

種類: 特許権

番号: 特願 2016-151355 (P2016-151355)

出願年月日: 2016 年 8 月 1 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

無し

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩永 史朗 (IWANAGA, Shiroh)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 20314150