

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 28 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390141

研究課題名(和文)地球規模マラリア根絶：アルテミシニン治療効果に関わる人・原虫多型の地域特性

研究課題名(英文)Area-specific human and parasite polymorphism in the context of global malaria eradication.

研究代表者

金子 明 (KANEKO, AKIRA)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60169563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：私達はケニアのビクトリア湖の4島嶼及び湖畔の集落で、マラリア調査を2012-2013年にかけて展開しており、同時期に収集したサンプルでアルテミシニン耐性マーカーについて解析した。539サンプルのK13-propeller遺伝子塩基配列を同定することに成功し、4種類の非同義置換と5種類の同義置換を確認した。これらの変異は5か所の調査地域で共有されるものは認められなかったが、Mfangano島で認められたA578S変異は同地域で半年の時間的解離を認める複数のサンプルで確認できた。今後K13-propeller遺伝子のモニタリングを続けることが必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted surveillance for mutations in the Plasmodium falciparum K13-propeller gene of an artemisinin-resistant candidate on 4 islands and one coastal village in Lake Victoria, Kenya with high transmission in 2012-2013. Four new types of nonsynonymous and five new types of synonymous mutations were detected among the 539 samples analyzed. All the mutations found were different from those reported in Cambodia and no mutations were observed at more than two of these five different sites. Furthermore, only one type of mutation, A578S, from the Mfangano Island was detected during two different seasons, whereas other mutations were not observed in the next season half a year later. Monitoring these molecular markers and the efficacy of antimalarial drugs is critical for increasing our understanding of artemisinin resistance and predicting their spread.

研究分野：マラリア撲滅研究

キーワード：マラリア撲滅 熱帯熱マラリア アルテミシニン G6PD欠損症 原虫薬剤耐性 ケニア オセアニア

1. 研究開始当初の背景

(1) Global Malaria Eradication :

2008年9月15日ニューヨークにおける国連ミレニアム開発計画マラリアサミットで新たな地球規模マラリア根絶計画が公表された。1955年に始まった最初の世界マラリア根絶計画は1960年台後半までに頓挫した。その敗因はマラリア伝播の地域特性を考慮せず流行地に一律に対処したためと総括されている。現在各地でマラリア感染リスクの減少が報告されてきており、Global Fund等の新たな資金投入による薬剤処理蚊帳 (impregnated bed nets: ITN) やアルテミシニン を基盤とする併用化学療法 (Artemisinin-based combination therapy: ACT) 等現在の主要マラリア対策法の流行国におけるスケールアップが奏功しているとの認識が形成されつつある。しかし熱帯アフリカに代表される高度流行地域においてマラリア撲滅が可能であるかは、世界におけるマラリア根絶に至る過程において残された課題である。

(2) ヒト・マラリア原虫の共進化と地域特性 :

我々は、アフリカ、アジア、オセアニアの様々な地域における熱帯熱マラリア原虫集団の遺伝学的多型とサハラ以南アフリカからの距離との間に強い負の相関があることを報告した。この isolation by distance による明確な原虫の地理的パターンは以前に報告されているヒト多型にみられたパターンを反映するものであり、現生人類は約15万年前にアフリカに出現したところ現生原虫に感染した後アフリカからともに世界に拡散して行ったとする説を支持する。この out of Africa 共進化説において本研究計画が対象とするケニア・ビクトリア湖周辺は始点、パプアニューギニアは終点と目される。さらにこの拡散過程においてヒトと原虫はそれぞれの定着地域で多型を獲得しそれが地域特性として現在のマラリア対策に影響を与えていると仮定する。

(3) 集団化学療法による島嶼マラリア撲滅 :

島嶼は干渉研究に対して自然の実験系を提供する。我々は、1991年以来、オセアニア・ヴァヌアツのアネイチウム島において700人の全人口を対象として、住民のクロロキンとプリマキンを中心とした集団治療 (Mass drug administration: MDA) と ITN によるマラリア撲滅可能性研究を展開し、住民主導の活動が確保されればマラリア撲滅は可能であり、達成された "malaria freedom" が長期間維持されることを示してきた。我々はこの島嶼マラリア撲滅戦略をケニア・ビクトリア湖高度マラリア流行島嶼への応用を計画している。

(4) 薬剤耐性マラリア原虫の蔓延とアルテミシニンの出現 :

マラリア化学療法には、これまでクロロキンが使用されてきたが薬剤耐性の出現のために、もはや効果的ではない。薬剤耐性マラリア原虫の蔓延は地球規模のマラリア対策における重大な問題である。ACTはこの状況を打開するための強力なツールとして出現してきた。伝統的な漢方薬を由来とするアルテミシニン (ART) はマラリア治療において著しく早い反応性を示す。ヒトにおける重篤な副作用は事実上認められない。しかし最近カンボジアにおける熱帯熱マラリア治療において ART 耐性が示唆されており、早急に作用機序を明らかにし、有効な耐性株拡散防止策を樹立する必要がある。

(5) ヒト多型と ART 治療効果 :

ART の血中半減期は非常に短い個人差が大きく、その薬物動態制御には何らかの遺伝的因子の関与が示唆されている。最近では、ART の半減期を延ばすような誘導体であるアーテメーターが用いられるが依然半減期は短い。ART やアーテメーターは主に肝臓に発現する薬物代謝酵素 CYP2B6 や CYP3A4 によって代謝され体外に排泄されるため、申請者らはこれら代謝酵素の活性の高低が薬物動態の個人差を引き起こし、薬効や副作用発現に影響すると考える。特に CYP2B6 は多くの遺伝子多型が報告されている。一方、異常ヘモグロビン症がマラリア原虫の抗マラリア剤感受性に影響を与える可能性が示唆されている。年間100万人に及ぶマラリアによる死亡圧および原虫とヒトの長い共進化の歴史により、それぞれの流行地において固有の組み合わせで異常ヘモグロビン症が選択されている (マラリア仮説)。ART による熱帯熱マラリア原虫排除は HbE 患者においては増強され、サラセミア患者においては減じた。鎌状赤血球症および G6PD 欠損症患者においては変化しなかった。

(6) 原虫薬剤耐性遺伝子多型 :

近代流行地の医療における抗マラリア薬の使用がマラリア原虫ゲノム上で著しい選択圧となっている。熱帯熱マラリア原虫 dhfr 遺伝子 (葉酸代謝拮抗剤のターゲット) 近傍のマイクロサテライトハプロタイプの解析から我々はオセアニアにおける葉酸拮抗剤耐性の二つの異なるリンケージを同定した。一つは東南アジアからの流入で、もう一方は薬剤使用前の de novo 出現であった。これらの結果は薬剤耐性サーベイランスのモデルとしてユニークかつ重要である。一方、ART 耐性を決定する主要な原虫側分子は未だ同定されていない。Sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (*serca*) は ART のターゲットの一つと考えられてきた。最近、我々は in vivo 及び in vitro の両方で ART にレスポンスする *P. falciparum* Multidrug Resistance Protein (MRPs) homologue (*pfmrp1*) の特異的 SNP を同定した。

2. 研究の目的

マラリア根絶は、21世紀人類が対峙するGlobal Health上の課題であるが、熱帯アフリカ等高度流行地域における撲滅可能性は未だ定かでない。アルテミシニンを基盤とする併用化学療法は殺虫剤処理蚊帳使用とともにマラリア対策における主たる武器である。しかしアルテミシニンの作用機序には不明な点が多い。地域特異的なマラリア原虫と人の遺伝学的多型はそれぞれ薬剤感受性および薬理学的特性を規定し治療効果に影響を及ぼすと我々は仮定する。本研究は世界で高度マラリア流行地域を代表するケニアおよびパプアニューギニアをフィールドとして、malariaologyとmolecular cell biologyという異分野を結合させることによりヒト及び原虫の両面からアルテミシニン治療効果を検討し、究極的に地域特性に基づくマラリア化学療法構築を目標とする。

3. 研究の方法

ケニア・ビクトリア湖周辺の村落で各々千人程度の被験者を対象にmalarimetric surveyを実施し血液濾紙サンプルを採取した。見出されたマラリア感染者についてヒト赤血球異常症多型、原虫薬剤耐性遺伝子多型との関連を解析した。見出されるART治療効果に関わる重要なヒトおよび原虫多型について現在の遺伝子パターンの起源を探り地域特異的なマラリア化学療法戦略の確立をマラリア撲滅の脈絡において目指した。

4. 研究成果

(1) ビクトリア島嶼人口のマラリア感染率：

2012年1月以来、5回にわたってMbitaにおいてマラリア調査を行った。このうち4回の調査はNgodhe, Kibuogi, Takawiri, Mfanganoの4島および陸側Ungoye村の同様な人口を対象にした。このうち2014年8月調査のラポにおけるPCR解析は終了していない。1回の調査で総計約2500人全年齢を対象にし、サンプルの約半数が10歳以下の小児である。

マラリア原虫検査は、(1) microscopy, (2) RDT, 及び(3) PCRの3法で行われた。地域別、年齢特異的陽性率について以下の図に示す。

総じて原虫陽性率はUngoyeで最も高く、Takawiri, Kibuogi, Ngodheの3小島では低く、Mfanganoでは中間であった。Ungoyeでは陽性率は10歳以下小児で高くその後加齢に従って減少していく高度伝播地域に特徴的なパターンが見られたのに対して、Takawiri, Kibuogi, Ngodheの3小島ではこの年齢依存パターンははっきりしなかった。これらのデータは多くの原虫感染がsubmicroscopicであり、低い原虫カウントの感染者が伝播の継続に重要な役割を担っていることを示唆する。

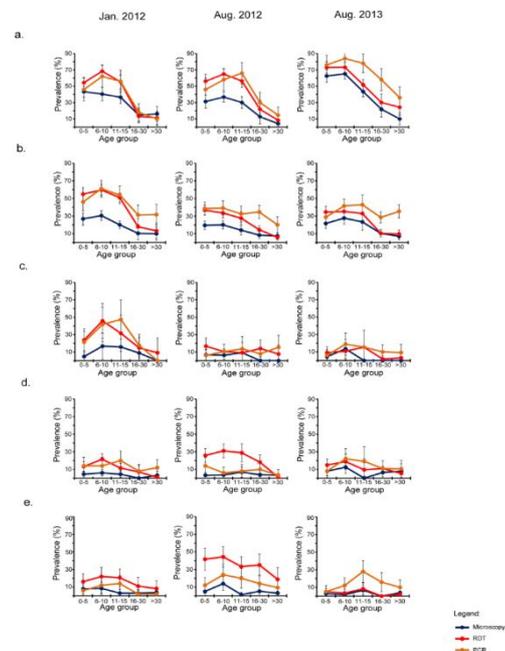


Figure 1: Malaria prevalence by age group in (a) Ungoye, (b) Mfangano, (c) Takawiri, (d) Kibuogi, and (e) Ngodhe.

(2) マラリア原虫アルテミシニン耐性の分子疫学：

近年、アルテミシニンに対する耐性原虫の出現・伝播がカンボジアを中心とする東南アジアで報告されていたが、2014年にK13-propeller遺伝子がその耐性に関連していることがArieyらによって報告された。この報告によりK13-propeller遺伝子における点変異(特にC580Y, R539T及びY439H)が*in vitro*でのparasite survival rateや*in vivo*でのparasite clearance rateに相関すること明らかとなった。私達はケニアのビクトリア湖の島々(Kibuogi, Ngodhe, Takawiri及びMfangano島)及び湖畔の集落(Ungoye)で、マラリアの分子疫学調査を2012-2013年にかけて展開しており、同時期に収集したサンプルをretrospectiveに解析した。この解析では539サンプルのK13-propeller遺伝子の塩基配列を同定することに成功し、4種類の非同義置換と5種類の同義置換を確認することができた。これらの変異は5か所の調査地域で共有されるものは認められなかったが、Mfangano島で認められたA578S変異は同地域で半年の時間的解離を認める複数のサンプルで確認できた。今後、経時的にK13-propeller遺伝子のモニタリングを続けることはケニアでのアルテミシニン耐性株の出現を早期に発見し、対策を講ずるために必要であると考えられる。

(3) オセアニア島嶼におけるマラリア撲滅維持：

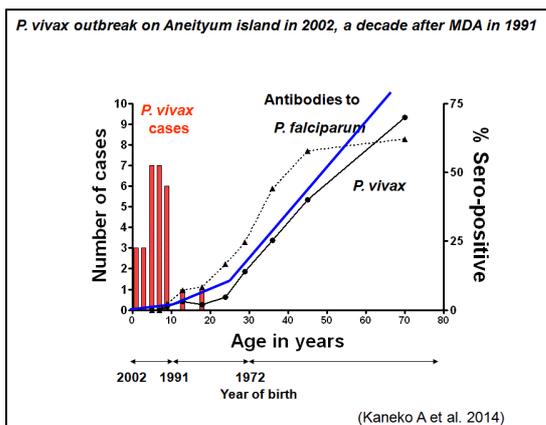
再感染はマラリア撲滅後の主要な関心事である。媒介蚊対策と組み合わせ9週間の週

一集団薬剤投与が 1991 年にアネイチウム島全人口 (718) に対して実施された結果、熱帯熱マラリアは消滅し三日熱マラリア (Pv) も 1996 年以降なくなった。マラリア伝播遮断は 2002 年 1 月に Pv 再燃が報告されるまで持続した。我々はこの流行時に年齢群別マラリア感染率を検討した。

アネイチウム島全人口を対象としたマラリア感染率調査が当初の Pv 勃発報告から 6 および 10 ヶ月後の 2 回実施された。

2002 年 7 月、759 島民を調べ 22 人の Pv 感染が顕微鏡にて確認された：この内 20/298 は 1991 年のマラリア撲滅開始後生まれの小児、2/126 は 1991-1982 年間に生まれた 10 代であり、1982 年以前生まれの成人には感染はなかった (0/339)。高感度の PCR 診断により Pv 感染は 77 人に上がり、すべての年齢層に分布していた。年齢群別陽性率はそれぞれ、12.1%、16.7%、6.0%であった (P < 0.001, 若年 2 群対成人群)。2002 年 11 月、同様の年齢特異的感染率パターンが見いだされたが、顕微鏡および PCR による Pv 感染はそれぞれ 6/746 および 39/741 であった。尚すべての顕微鏡陽性例は PCR 陽性であった。Pv 原虫に対する抗体陽性率は年齢によって増加し、1991 年以降生まれの小児においては高齢者より有意に低かった。

マラリア撲滅後も持続する Pv に対する獲得免疫は撲滅以前に生まれた人々を防御すると考えられる。この免疫は感染自体を阻止しないが、赤内型原虫感染を顕微鏡検出閾値以下のレベルにまで抑制する。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Isozumi R, Uemura H, Ichinose Y, Logedi J, Omar AH, Kaneko A. Novel Mutations in K13 Propeller Gene of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum*. *Emerg Infect Dis*, 2015 Mar;21(3):490-2. doi: 10.3201/eid2103.140898. 査読あり

Chan CW, Sakihama N, Tachibana S, Lum JK, Tanabe K, Kaneko A. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* at the

crossroads of exchange among islands in Vanuatu: implications for malaria elimination strategies. *PLoS One*. 2015 Mar 20;10(3):e0119475. doi:10.1371/journal.pone.0119475. eCollection 2015. 査読あり

Watanabe N, Kaneko A, Yamar S, Leodoro H, Taleo G, Tanihata T, Lum JK, Larson PS. Determinants of the use of insecticide-treated bed nets on islands of pre- and post-malaria elimination: an application of the health belief model in Vanuatu. *Malaria Journal* 2014; 13:441 doi:10.1186/1475-2875-13-441. 査読あり

④ Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. *Parasitol Int*. 2014; S1383-5769(14)00127-5. doi:10.1016/j.parint.2014.09.006. 査読あり

⑤ Jovel IT, Ferreira PE, Veiga MI, Malmberg M, Mårtensson A, Kaneko A, Zakeri S, Murillo C, Nosten F, Björkman A, Ursing J. Single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum* V type H+ pyrophosphatase gene (pfvp2) and their associations with pfprt and pfmdr1 polymorphisms. *Infection, Genetics and Evolution* 2014;24:111-5. 査読あり

⑥ Kaneko A, Chaves LF, Taleo G, Morris K, Isozumi R, Wickremasinghe R, Perlmann H, Takeo S, Tsuboi T, Kimura M, Björkman A, Troye-Blomberg M, Tanabe K, Drakeley C. Characteristic Age Distribution of *Plasmodium vivax* Infections after Malaria Elimination on Aneityum Island. *Infect Immune* 2014;82:243-52. 査読あり

Cavaco I, Hombhanje FW, Gil JP, Kaneko A. Frequency of the functionally relevant aryl hydrocarbon receptor repressor (*AhRR*) Pro185Ala SNP in Papua New Guinea. *Drug Metab Pharmacokin* 2013;28:519-21. 査読あり

Honjo K, Chaves LF, Satake A, Kaneko A, Minakawa N. When they don't bite, we smell money: understanding malaria bednet misuse. *Parasitology* 2013; 140: 580-586. 査読あり

Takahashi N, Tanabe K, Tsukahara T, Dzodzomenyo M, Dysoley L, Khamlome B, Sattabongkot J, Nakamura M, Sakurai M, Kobayashi J, Kaneko A, Endo H, Hombhanje F, Tsuboi T, Mita T. Large-scale survey for novel genotypes of *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance gene *pfcr*t. *Malaria Journal* 2012, 11:92 doi:10.1186/1475-2875-11-92. 査読あり

Awah N, Kaneko A. Iron deficiency and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* 2012; DOI: 10.1093/cid/cis020. 査読あり

Tanabe K, Arisue N, Palacpac NMQ, Yagi M, Tougan T, Honma H, Ferreira MU, Färnert A, Björkman A, Kaneko A, Nakamura M, Hirayama K, Mita T, Horii T. Geographic differentiation of polymorphism in the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate gene SERA5. *Vaccine* 2012; 30:1583-93. 査読あり

〔学会発表〕(計 9件)

木村 政継、寺本 勲、五十榎 理恵、川本 文彦、金子 明. マラリア迅速診断法としての A0 染色の再評価. 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015 年 3 月 21 日, 杏林大学三鷹キャンパス (東京都・三鷹市)

木俣 勲、木村 正継、五十榎 理恵、Zulkarnain Md Idris, Chim W. Chan, James Kongere, Ahmedeen Omar, 金子 明. マラリア撲滅プログラムにおける G6PD 欠損症スクリーニング法改良の試み(2). 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015 年 3 月 21 日, 杏林大学三鷹キャンパス(東京都・三鷹市)

五十榎 理恵、上村 春樹、木俣 勲、木村 政継、一瀬 休生、John Logedi、Ahmeddin H.Omar、金子 明. Novel point mutations were observed in the *Plasmodium falciparum* K13-propeller gene of an artemisinin-resistant candidate in western Kenya. 第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21 日杏林大学三鷹キャンパス(東京都・三鷹

市)

Kaneko A. Sustainable malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu, 1991 -2014. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 63rd Annual Meeting. 2nd-6th November 2014. New Orleans(USA).

マラリア撲滅プログラムにおける G6PD 欠損症スクリーニング法改良の試み. 木俣 勲, 木村政継, 五十榎 理恵, Md Idris Zulkarnain, Chan Chim Wai, Kongere James, Omar Ahmedeen, 金子 明. 第 83 回寄生虫学会大会 2014 年 3 月 28 日. 愛媛大学城北キャンパス(愛媛県・松山市).

Kaneko A. Malaria elimination on islands. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 62nd Annual Meeting, November 13 - 17, 2013, Washington, DC(USA).

Kaneko A. Immune protection against *Plasmodium vivax* infection a decade after malaria elimination. 第 82 回寄生虫学会大会 2013 年 3 月 28-31 日. 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都・文京区)

Kaneko A. Variable malaria prevalence and G6PD deficiency on islands in Lake Victoria. 第 82 回寄生虫学会大会 2013 年 3 月 28-31 日. 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都・文京区)

金子 明. People living on islands with malaria: from Vanuatu to Lake Victoria. 第 16 回日本渡航医学会学術集会, 2012 年 7 月 22 日, 大阪大学吹田キャンパス(大阪府・吹田市)

〔図書〕(計 2 件)

金子 明 他、マラリア「今日の治療指針」2012、pp.237-8、医学書院(東京)。

金子 明 他、マラリア「midicina」Vol.52 No.4 増刊号 2015、pp.603-606、医学書院(東京)。

〔その他〕

本プロジェクトのプロモーションを目的として、短編映画「THE MALARIA FIGHT」を作成した。以下のリンクから閲覧できる。

<https://drive.google.com/open?id=0BzwXqXPg29thcU5FTIMzYTN0VFE&authuser=0>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 明 (KANEKO, Akira)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：60169563

(2) 研究分担者

寺本 勲 (木俣勲) (TERAMOTO
(KIMATA), Isao)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：20153174

五十棲 理恵 (ISOZUMI, Rie)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：30550355

平塚 真弘 (HIRATSUKA, Masahiro)
東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授
研究者番号：50282140