

令和元年6月10日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2018

課題番号：26305015

研究課題名(和文) マラリア原虫アルテミシニン耐性遺伝マーカーの開発:フィールドゲノミクスによる解析

研究課題名(英文) Development of genetic marker for artemisinin-resistant malaria: Field-genomics analysis

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、封じ込め対策への実用可能なアルテミシニン耐性遺伝マーカーを開発することである。研究成果として、アフリカにおける初めてのアルテミシニン耐性原虫の発見と耐性候補遺伝子マーカーの同定、パプアニューギニアにおけるPfKelch13耐性型(C580Y)原虫の出現発見とその起源・拡散の解明である。これらの成果は、耐性監視を中心とした実際面での応用に大きく貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは世界3大感染症の一つである。その根絶のために抗マラリア薬は不可欠であるが、容易に耐性化する。本研究でアフリカでの有用性が期待される新規候補マーカーが明らかになった。今後のさらなる検討によって、その有用性が確認されれば、今後はアフリカにおける耐性原虫の出現と拡散を簡便に評価することが可能になる。これは、耐性マラリア原虫の封じ込め対策へ大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to develop genetic maker(s) that is useful for the containment strategy of resistant parasites. We achieved, 1) first identification of artemisinin-resistant parasites in Africa and identification of potential resistant marker, and 2) detection of malaria parasites harboring mutant PfKelch13 allele (C580Y) and elucidation of its origin and route of their spread. These achievement would greatly contribute the practical application toward the surveillance of resistant parasites.

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 遺伝子マーカー 早期診断 分子疫学 耐性進化

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界3大感染症の一つで、毎年数億人の患者と百万人弱の死亡者を出している。制圧のために抗マラリア薬は不可欠であるが、最も対策が急がれている熱帯熱マラリア原虫はこれまですべての既存抗マラリア薬に対して耐性化してきた。研究代表者（JAC, 2009）及び Roper（Science, 2004）らは、既存抗マラリア薬への耐性原虫は、タイ国境地域を中心とする限定された地域から出現、アフリカへと拡散することによって、蔓延化したことを明らかにしている。2000年代半ばから導入されたアルテミシニン併用療法（ACT）により、マラリア死亡者は減少しているが、耐性原虫の出現がタイ国境地域から報告され始めている。代用薬のない現状において、アルテミシニン耐性の蔓延は致命的となる。このような中、WHOは2011年からアルテミシニン耐性原虫の封じ込め計画を推進、2013年には耐性拡大への緊急宣言を出している。

効果的な封じ込めには、アルテミシニン耐性の出現・拡散を手軽に評価できる遺伝マーカーの開発が必要不可欠である。そのような中、2013年に初めてACTによる耐性（治療遅延）と連鎖する2つの原虫 SNP（MAL10 と MAL13）が発見され、遺伝マーカーとしての期待が高まっている（Science, 2012, PNAS, 2013）。申請者らの検討により、MAL10/MAL13のSNPsは耐性報告のあるタイ国境地域にのみ分布していたが（Int J Parasitol, 2013）、MAL10のSNPは、耐性のないパプアニューギニア（PNG）にも分布していることがわかった。これは、本SNPsを遺伝マーカーとして実用化するためには、より詳細な科学的検討を蓄積する必要があることを意味する。

本課題の目的は、封じ込め対策への実用可能なアルテミシニン耐性遺伝マーカーを開発することである。MAL10/MAL13の有用性の評価及びゲノムワイド解析（GWAS）を用いた新たなアルテミシニン耐性遺伝子を同定する。アルテミシニン耐性遺伝マーカーの開発は、耐性モニタリングを中心とした実際面での応用に大きく貢献すると考え、本課題を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

- ① 調査地で薬剤耐性試験をおこない、新規耐性候補SNPs（MAL10とMAL13）とアルテミシニン耐性との関連を明らかにする。
- ② ゲノムワイド関連解析（GWAS）を用いて新たなアルテミシニン耐性遺伝マーカーを同定する。
- ③ マラリア原虫集団において、MAL10、MAL13及び2)により同定された耐性候補遺伝子の変異が持つ意義を集団遺伝学的解析により明らかにする。
- ④ これらの候補マーカーを用いた調査地における経時的な遺伝疫学調査とセンチネルサイトでの広域調査によって耐性の出現、選択及び拡散ダイナミズムを解明する。

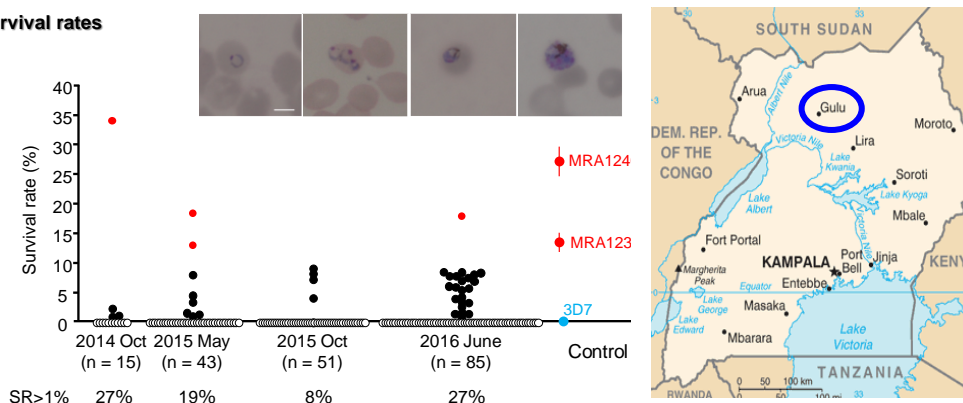
## 3. 研究の方法

- ① **アルテミシニン併用療法への耐性（治療遅延）のモニタリング**  
In vivoでのアルテミシニン+ルメファントリン（AL）による耐性レベルを正確にモニタリングするため、ALで治療後の熱帯熱マラリア患者における原虫密度を6時間毎の採血により評価する。血液検体は濾紙に採取し、遺伝的解析の試料とする。予定実施数は50例である。治安の悪化等により入院検査が不可能な場合は、WHOの耐性基準（治療3日目の原虫陽性を耐性とする）に従いACT耐性を判定する。
- ② **ゲノムワイド関連解析を用いた新たなアルテミシニン耐性遺伝マーカーの同定**  
白血球を除去した濾紙血液検体よりQiagen QIAamp Blood Midi Kitを使用してDNAを抽出する。その後、multiple displacement amplification法により全ゲノム増幅をおこない、十分なゲノム量としてから、HiSeqを用いた次世代シーケンズ解析により全ゲノム配列を決定する。
- ③ **新しいin vitro薬剤耐性試験手法（Ring-stage survival assay）を用いたアルテミシニン耐性のモニタリング**
- ④ **明らかとなったアルテミシニン耐性関連変異の原虫集団における意義の解明**  
耐性候補遺伝マーカー変異が検出された場合、その変異は、「アルテミシニンとは別の原因によって選択され集団に存在」や「遺伝的浮動によりある地域集団にたまたま存在している」可能性がある。そこで、アルテミシニン導入以前の血液試料を用いて、以下を検討しこのような耐性候補変異の集団遺伝学的特徴を明らかにする。

## 4. 研究成果

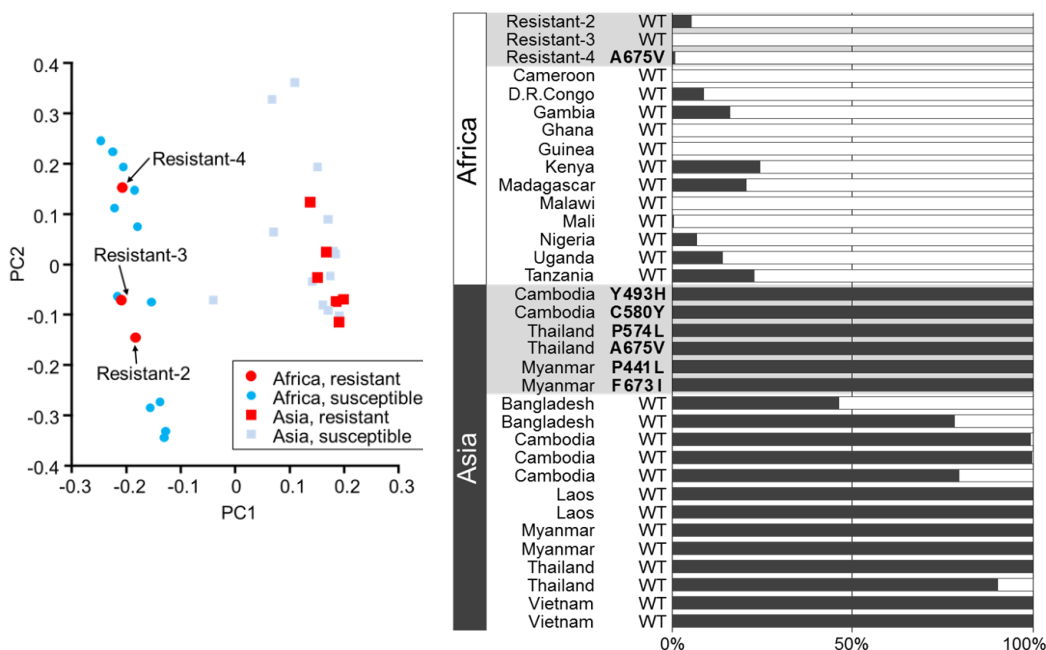
- ① アフリカにおいて初めてのアルテミシニン耐性原虫の発見

### RSA survival rates



RSA は患者因子に左右されないアルテミシニン耐性の *in vitro* 検出法として 2013 年に開発された方法だが、我々はマラリア流行現場で実施できるように改良し、2014 年から 3 年間ウガンダ共和国のグル市で定期的な調査を実施した。その結果、194 人のマラリア患者において 2%にあたる 4 人の患者がアルテミシニン耐性原虫に感染していることを発見した。うち 1 例は東南アジアに分布している耐性原虫より高い耐性レベルを示していた。

さらに、耐性原虫の由来を明らかにするため、得られた原虫の全 DNA 配列を決定し、様々な地域に分布するマラリア原虫の全 DNA 配列の比較とともにベイズ法を用いた統計処理による解析を行った。PCA 解析（下図左）、ベイズ法によるクラスタリング（STRUCTURE、下図右）いずれの方法によっても、今回発見した耐性原虫はいずれも東南アジアとは異なったクラスターに属していることが明らかになった。以上の解析によって、ウガンダで発見されたアルテミシニン耐性原虫は東南アジアから移入したものではなく、アフリカで独自に出現、進化していることをつきとめた。



### ② ウガンダにおける候補アルテミシニン耐性候補遺伝マーカーの同定

ウガンダにおける候補アルテミシニン耐性遺伝マーカーを同定することができた。本遺伝子変異 X はアルテミシニン耐性と強く相関し、2013 年度から 5 年間でその頻度が大きく増加している。現在、原虫の全ゲノム解析およびマイクロサテライト解析によって、本候補遺伝子の妥当性を進化的な側面から解析している。

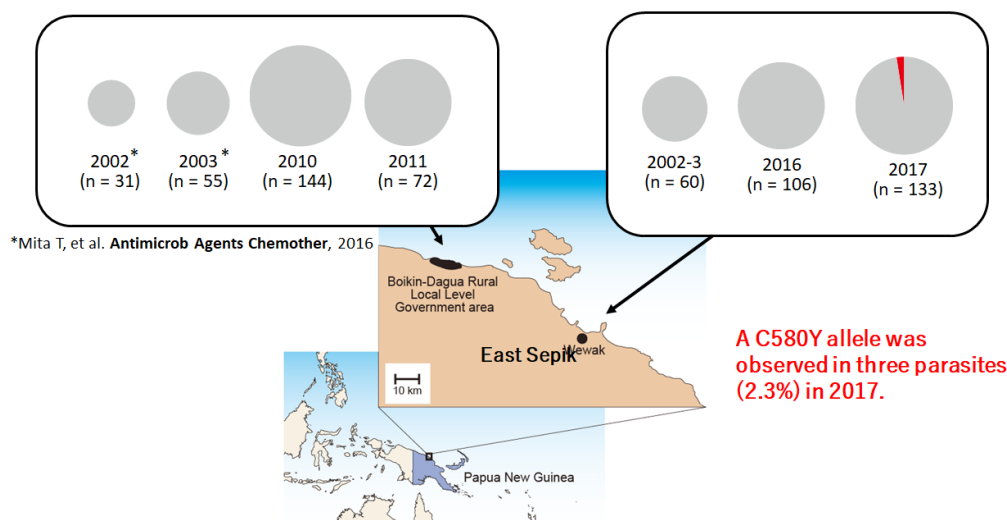
### ③ パプアニューギニアでの PfKelch13 耐性型原虫の出現とその起源・拡散の集団遺伝学的解析

アルテミシニン耐性遺伝子として 2014 年に発見された K13 遺伝子の C580Y 変異原虫が東南アジアで急激に拡散していることが報告されている (Anderson T, Mol Bio Evo, 2017)。しかし、本変異原虫はメコン流域以外では南米のガイアナが報告されるのみで

ある。

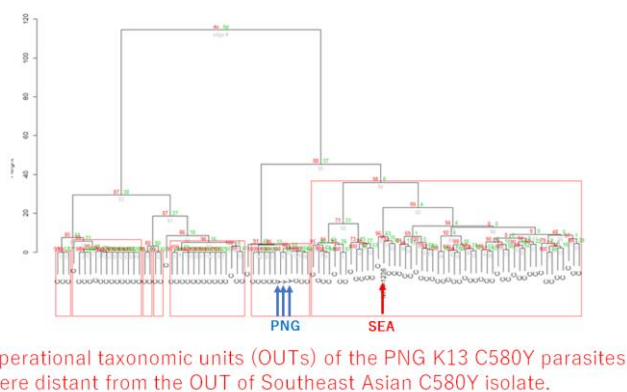
我々はパプアニューギニアでの継続調査によって、2017年から本変異原虫が出現していることを明らかにした。2018年の調査では本変異頻度は上昇しており、アルテミシニンの使用によって、原虫集団内で自然選択を受けている可能性を示唆している。

### Prevalences of *K13* alleles in Papua New Guinea



PfKelch13 周囲に存在する 18 のマクロサテライトマーカーのタイピングを実施し、集団遺伝学的解析を実施した。その結果、パプアニューギニアの C580Y 原虫はニューギニア地域に起源を持つ可能性が高く、懸念されていた東南アジアからの移入の可能性は非常に低いことが明らかになった。

### A hierarchical cluster analysis (Euclid distance, Ward's method)



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

- ① Yamamoto T, Yatsushiro S, Hashimoto M, et al. Development of a highly sensitive, quantitative, and rapid detection system for *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells using a fluorescent blue-ray optical system. *Biosens Bioelectron.* 2019;132:375-381 10.1016/j.bios.2019.02.064.
- ② Rodrigues PT, Valdivia HO, de Oliveira TC, et al. Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Scientific reports.* 2018;8:1993 10.1038/s41598-018-19554-0.
- ③ Mita T, Hombhanje F, Takahashi N, et al. Rapid selection of sulphadoxine-resistant *Plasmodium falciparum* and its effect on within-population genetic diversity in Papua New Guinea. *Scientific reports.* 2018;8:5565 10.1038/s41598-018-23811-7.

- ④ Ikeda M, Kaneko M, Tachibana SI, et al. Artemisinin-Resistant Plasmodium falciparum with High Survival Rates, Uganda, 2014-2016. Emerging infectious diseases. 2018;24:718-726 10.3201/eid2404.170141.
- ⑤ Balikagala B, Mita T, Ikeda M, et al. Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda. Malar J. 2017;16:23 10.1186/s12936-016-1663-1.
- ⑥ Yatsushiro S, Yamamoto T, Yamamura S, et al. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda. Scientific reports. 2016;6:30136 10.1038/srep30136.
- ⑦ Pongvongsa T, Nonaka D, Iwagami M, et al. Household clustering of asymptomatic malaria infections in Xepon district, Savannakhet province, Lao PDR. Malar J. 2016;15:508 10.1186/s12936-016-1552-7.
- ⑧ Mita T, Tachibana S, Hashimoto M, Hirai M. Plasmodium falciparum kelch 13: a potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. Expert Rev Anti Infect Ther. 2016;14:125-135 10.1586/14787210.2016.1106938.
- ⑨ Mita T, Culleton R, Takahashi N, et al. Little Polymorphism at the K13 Propeller Locus in Worldwide Plasmodium falciparum Populations Prior to the Introduction of Artemisinin Combination Therapies. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:3340-3347 10.1128/AAC.02370-15.
- ⑩ Tanabe K, Zollner G, Vaughan JA, et al. Plasmodium falciparum: genetic diversity and complexity of infections in an isolated village in western Thailand. Parasitol Int. 2015;64:260-266 10.1016/j.parint.2013.09.011.
- ⑪ 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. 2015;64:267-273 10.1016/j.parint.2014.11.002.
- ⑫ Mita T, Jombart T. Patterns and dynamics of genetic diversity in Plasmodium falciparum: what past human migrations tell us about malaria. Parasitol Int. 2015;64:238-243 10.1016/j.parint.2014.09.007.
- ⑬ Mita T, Ohashi J, Venkatesan M, et al. Ordered accumulation of mutations conferring resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the Plasmodium falciparum parasite. J Infect Dis. 2014;209:130-139 10.1093/infdis/jit415.

〔学会発表〕（計 30 件）

〔図書〕（計 2 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔その他〕

広報 45 件（2018 年 3 月、日経新聞、読売新聞、科学新聞、朝日新聞デジタル、その他）

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大橋順

ローマ字氏名：Ohashi Jun

所属研究機関名：東京大学

部局名：理学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）： 80301141

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。