

令和元年9月17日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460515

研究課題名(和文) 集団ゲノム学の先端的分析手法を用いたグローバルなマラリア拡散ダイナミズムの解明

研究課題名(英文) Global dynamics of malaria parasites using an advanced technology of population genomics

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルテミシニン耐性マラリア原虫の出現と拡散経路の解明を目的とした研究である。本研究により、ウガンダに耐性原虫が存在することを発見した。これまで耐性はアフリカには出現していないとされており、世界で初めてのアフリカでの耐性の報告である。さらに、その耐性起源は東南アジアからの移入ではなく、アフリカにあることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは世界三大感染症のひとつである。第一選択薬であるアルテミシニンに対する耐性原虫はすでに東南アジアの一部地域では蔓延化しているが、今回の研究で世界で初めてアフリカにも出現していることを見出した。さらに、その起源は東南アジアからの移入ではなく、アフリカにあることを解明した。本成果は、薬剤耐性マラリア原虫がアフリカからも出現することを明らかにし、当地における薬剤耐性マラリアサーベイランスの重要性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify an global emergence and spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* parasites. We identified several artemisinin-resistant parasites in Uganda. Before our discovery, it was believed that artemisinin-resistance has not been emerged in Africa and thus, this is the first identification of artemisinin resistance in Africa. We also found that an origin of resistant parasites was not in Southeast Asia where resistant parasites have emerged and spread into the area. Rather, artemisinin resistance indigenously appeared in some part in Africa.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア アルテミシニン 耐性 進化 K13 マイクロサテライト

1. 研究開始当初の背景

世界3大感染症の一つであるマラリアの中でも、広い分布域と高い致死率から、対策上最も重要な熱帯熱マラリア原虫は、すべての既存抗マラリア薬に対する耐性機能を進化させてきた。

アルテミシニンとは現時点で治療効果が期待できる唯一の抗マラリア薬である。2000年代半ばからWHOはアルテミシニン併用療法を積極的に推進し、多くの流行国で効果をあげているが、すでに耐性原虫の出現が報告され始めている。

有効な代用薬がない現在、耐性の蔓延化がもたらす影響は計り知れない。このため、WHOは薬剤耐性の拡散防止を中心とした封じ込め戦略を強力に推進している。このような背景のもと、申請者は薬剤耐性原虫の出現と拡散のメカニズム解明に取り組み、以下の重要な知見を報告してきた。

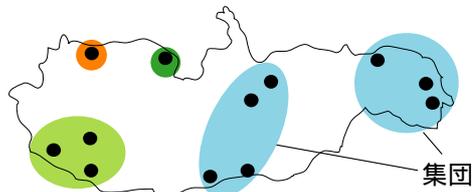
(1) 薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫は、限られた地域(主にタイ国境)からごく稀に出現する。

(2) 薬剤耐性原虫の移動(移入)により、耐性地域が拡大し、耐性の蔓延化が起こる。

(3) 本年(H25)発見されたアルテミシニン耐性(治療遅延)に関連する2つの新規SNPsはタイ国境地域のみを観察される。

これは、既存薬剤への耐性の蔓延化は、きわめて稀にタイ国境周辺から出現した耐性原虫が流行地を拡散し、その分布域を拡大することによって起こることを示しており、それまでのマラリア薬剤耐性進化のパラダイムを大きく転換させることになった。しかし、本知見を実際のマラリア薬剤耐性原虫の封じ込め戦略へと応用するためには、グローバルな原虫の拡散ダイナミズムの解明、すなわち「薬剤耐性マラリア原虫が、どのような経路でアフリカに至り、さらに大陸内をどのように拡散していくか」について明らかにすることが不可欠である。

マラリアは流行地に一様に分布しているわけではなく、地理的にある程度独立した原虫集団を形成して存在している(下図)。



原虫が集団を形成して流行地に分布

マラリア原虫は媒介蚊や人の移動によって原虫集団間を移動するが、その程度には大きな差がある。このような集団間の移出入レベルの差は、薬剤耐性原虫の拡散経路に大きな影響を与える。

本課題では、近年めざましい進歩を遂げた

分子集団遺伝学手法を応用し、原虫集団間の移動ダイナミズムを解明する。グローバルな耐性原虫の拡散経路を明らかにすることによって、耐性原虫封じ込め戦略への足がかりとしたい。

2. 研究の目的

本研究では、全流行地を網羅する地域から得られた熱帯熱マラリア検体を用いて、「マラリア原虫が、どのような経路でアフリカに至り、さらに大陸内をどのように移動・拡散していくか」について明らかにする。この目的の下、以下について順次明らかにしていく。

- 1) ハウスキーピング遺伝子やマイクロサテライトを用いて、それぞれの原虫集団における遺伝的特徴-遺伝的多様度、有効な集団の大きさ、連鎖不平衡等を明らかにする。
- 2) 原虫集団間の移入障壁やグループ構造を明らかにし、集団間での原虫の移動ダイナミズム(移動の方向や程度)を解明する。
- 3) 薬剤耐性原虫の系統解析により、それぞれの集団と耐性進化系統との関連を明らかにする。
- 4) 以上の結果を原虫集団の地理情報とともにシミュレーションで解析、薬剤耐性原虫のグローバルな拡散経路の尤度推定をする。

3. 研究の方法

(概要) 熱帯熱マラリア原虫のハウスキーピング遺伝子とマイクロサテライトをタイピングし、遺伝統計学・分子集団遺伝学的手法で解析、各集団の遺伝的特徴、集団間の移動ダイナミズム(移入の有無やその程度)を明らかにする。

さらに既存抗マラリア薬への原虫耐性遺伝子及びそれに連鎖するマイクロサテライトタイピングから薬剤耐性の起源と系統を決定する。

(解析検体)

以下の流行地を網羅する熱帯熱マラリア原虫



(方法)

1) それぞれの原虫集団における集団遺伝学的特徴を解明する

集団の遺伝的多様度と自然選択の評価

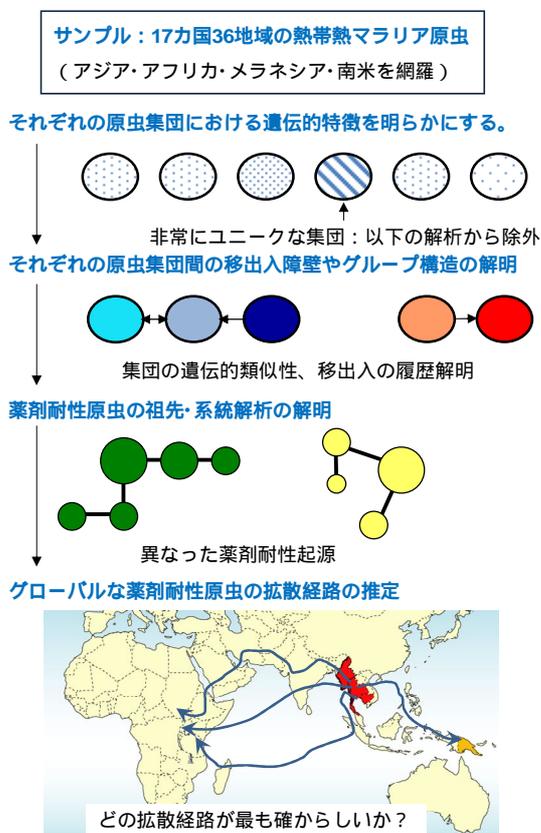
ハウスキーピング遺伝子である *serca* と *ads1* の配列をシーケンス解析により決定し、塩基多様度、多形サイトの数、dN、dS、

Tajima-D test 等を用いて遺伝的多様度と自然選択を評価する。

連鎖不平衡レベル、集団の有効な大きさ、ヘテロ接合度の推定

解析に必要なマイクロサテライト座位数を決定するために、msを用いたシミュレーションを実行する。実施には高い近親交配率や頻繁な組換えなどマラリアに特有な集団遺伝学的特徴を組み入れる。シミュレーションにより決定された数の座位は各染色体から均等に選択されるようにする。タイピング法はnested PCR + フラグメント解析を用いるが、多型度がきわめて低い座位や自然選択を受けている座位は除外する。遺伝データはDnaSP 及び Arlequine 等のソフトを用いて、集団遺伝学的な解析をする。

2) マラリア原虫集団のグループ構造や集団間の移出入レベルを明らかにする



原虫集団間のグループ構造の解明

集団間が極めて似た遺伝的構成を持つ場合、グループ化が可能である。1で決定したデータを用いて、Median-Joining法を用いたネットワーク解析をおこない、この点を明らかにする。本解析手法により、グローバルな原虫集団の相互関連性も評価できる。

集団間の移出入レベルの解明

ベイズ理論を用いた集団構造解析シミュレーションプログラムを用いて、グローバルなマラリア集団の数を最尤推定する。さらに

各原虫集団の亜集団の解析により集団間のmigrationの痕跡を定量化する。

3) 原虫集団と薬剤耐性の進化系統との関連を明らかにする

以下の検討により薬剤耐性の起源と進化系統を明らかにし原虫集団との関連について検討する。

薬剤耐性遺伝子多型解析

クロロキン、ファンシダール耐性と関連する *pfprt*, *dhfr*, *dhps*, *pfmdr1* の耐性関連変位部位を中心とした領域の直接シーケンスにより耐性遺伝子の遺伝型を決定する。

耐性遺伝子に連鎖するマイクロサテライト多型解析による耐性進化系統解析

薬剤耐性遺伝子の 10kb 以内に存在し、遺伝的ヒッチハイキングを受けているマイクロサテライトをタイピングする。の結果と併せ、薬剤耐性原虫の進化系統を明らかにする。

4) 薬剤耐性原虫のグローバルな移動ダイナミズムの解明

耐性原虫起源と拡散経路

耐性起源地との進化系統、原虫集団間のグループ構造や定量化した移出入レベル及び原虫集団の地理的情報から、耐性原虫起源と拡散経路を明らかにする。

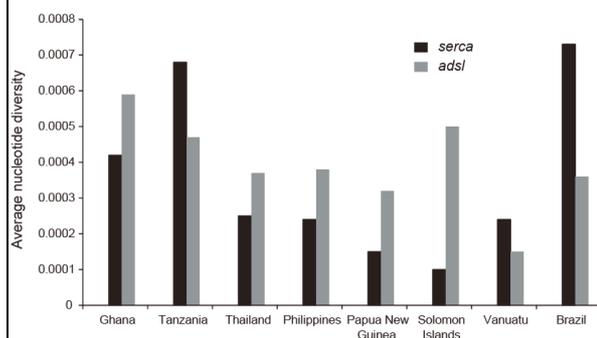
推定された移動経路の尤度解析

明らかになった経路の起こりやすさを評価するために、1で得られた遺伝子データを現実データとしたシミュレーションにより、推定された移動経路の尤度を求める。最も起こりうる経路は最尤推定値として定量化される。本シミュレーションはベイズモデルに基づいて作成されており、すでにヘリコバクター (Linz. Nature 2007) や申請者らによるマラリア (Tanabe, Mita. Curr Biol 2010, Mitochondrion 2013) での様々な migration の解析に用いられている。

4. 研究成果

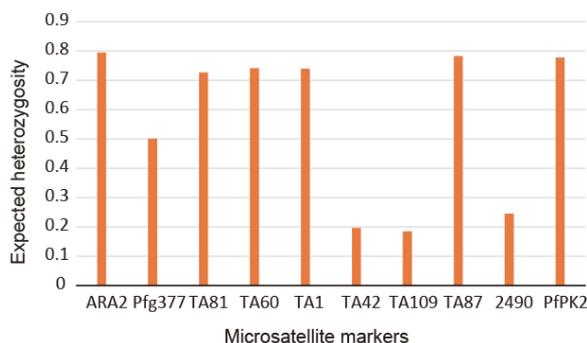
1) それぞれの原虫集団における集団遺伝学的特徴の解明

ハウスキーピング遺伝子のシーケンス解析を実施し、自然選択の有無と集団の多様性を評価した。予想通り *adsl*, *serca* 遺伝子いずれにも純化選択が働いていた。



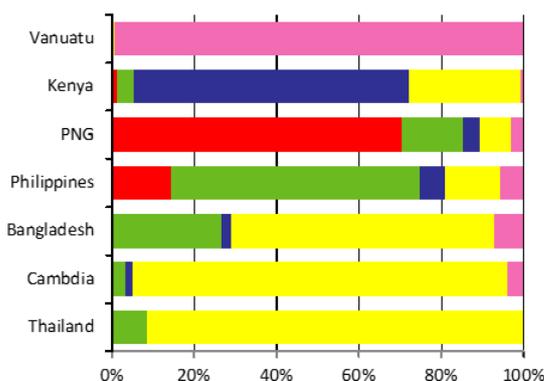
塩基多様度、多形サイトの数を各集団で比較したところ、多様度はアフリカの集団（ガーナ、タンザニア）で高く、東南アジアとメラネシアの集団では低い傾向を示した。

マイクロサテライト解析では、必要な座位数は 10 座位とした。これらはすでに様々スタディで用いられているものである。マイクロサテライトを用いたヘテロ接合度は下図のように座位によって異なるが、平均ヘテロ接合度は 0.6 から 1.0 を示した。最も低い値を示したのはバヌアツであり、有効な集団サイズも最小であった。



2) マラリア原虫集団のグループ構造や集団間の移出入レベル

10 座位のマイクロサテライトを用いて STRUCTURE 2.3 による集団構造解析をおこなった。分集団数として K=5 が最も高い適合を示していた。解析では Nonadmixture モデルを用いた場合に一番明瞭なクラスタリング結果が得られた。



5 つの分集団コンポーネントが明瞭に分離されている。最も明瞭なのはバヌアツである。バヌアツの検体はほぼ単一であり、他の分集団コンポーネントをほとんど含まない。バヌアツは isolate された島々からなり、マラリア流行度も低い。このようなマラリア生態環境から、マラリア原虫は当地において独自の進化をとげていると考えられる。

タイのサンプルもほとんど黄色一色である。カンボジアの検体も同様である。タイ、カンボジア、ミャンマーは Great Mekong subregion として、薬剤耐性マラリア原虫の

起源地として重要な地域である。この地域の原虫は非常に強い薬剤選択圧にさらされているという特徴を持つ。これら黄色で示されるコンポーネントがバヌアツ同様にほぼ単一である理由は、強い薬剤圧により比較的限定された原虫が選択されたためであると考えられる。

赤で示すコンポーネントは PNG を中心に分布している。このコンポーネントは一部フィリピンにも存在するが、その他の地域にはほとんど見られない。PNG フィリピンへの migration の存在を示唆する。さらに、フィリピンを示すと考えられる緑のコンポーネントが、PNG にも見られることから、フィリピン PNG の流れもあったのだろう。

青のコンポーネントはケニアを中心に観察され、アフリカの原虫を示すものかも知れない。このコンポーネントは PNG、フィリピン、バングラディッシュにもわずかに見られる。以前我々は、熱帯熱マラリア原虫はアフリカを起源として、人の移動とともにボトルネックを経験しながら、アフリカ 南アジア

東南アジア メラネシアへとその生息域を広げた可能性が高いことを報告している (Tanabe, Curr Biol 2010)。この仮説によれば、青のコンポーネントは、マラリアが生息域を広げた時代から続くものとなるう

3) 原虫集団と薬剤耐性の進化系統との関連を明らかにする

研究期間中にアルテミシニン耐性遺伝子 K13 が同定された (Ariey, Nature 2014)。もし K13 がアルテミシニン耐性の責任遺伝子であれば、持続的なアルテミシニン選択圧がその多型パターンを変化させる可能性が高い。

そこで、初めてのアルテミシニン耐性出現以前に得られた全流行地を網羅する 13 カ国の熱帯熱マラリア原虫を用いて、K13 を直接シーケンシング法により決定し、ベースライン多型を解析、さらに DnaSPV5 及び MEGAVer6 を用いた集団遺伝学的解析も合わせおこなった。配列を決定することができた全 563 検体中 34 例に多型を認めた。SNP 数は 24 であり 20 が singleton であった。塩基多様度は 0.00016 であり、serca と adsl での平均 (0.00043) より低値を示していた。田嶋の D は有意に負の値をとっていた。ハプロタイプ多様度は 0.12 と低値を示した。

アルテミシニン耐性との相関が報告されている C580Y 変異はカンボジアでのみ 22% に見られた。K13 のベースライン多型度は、以前解析したハウスキーピング遺伝子よりさらに低く、田嶋の D の値も有意に負の値であることから、アルテミシニン耐性に起因しない選択的一掃が比較的最近起きた可能性がある (Mita et al. Antimicrob Agents Chemother. 2016)。

パプアニューギニアの集団で、C580Y 変異を持つマラリア原虫 3 例を見いだした。これ

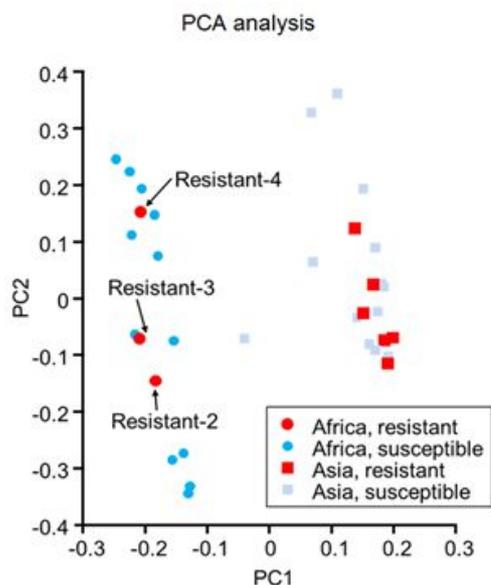
までに本変異を持つアルテミシニン耐性原虫がメコン流域外へ拡散した報告はなく、我々の見出した3例が拡散によるものと確認されれば、今後のマラリア対策上極めて重要な事例となる。これら3例の起源を推定するため、K13近傍マイクロサテライトおよびSNP解析を実施した。その結果、これら3例はカンボジアにおいて単離されたC580Y変異を持つアルテミシニン耐性原虫(MRA-1236)と非常によく似たハプロタイプを示しているものの、K13野生型の検体にも類似のハプロタイプが分布しており、K13近傍のハプロタイプのみでは、耐性がパプアニューギニアから出現したのか、メコンからの拡散なのかについての結論は出ていない。現在、全ゲノム解析を実施している。

Microsatellite-haplotype

Pfkelch13

	-31.9 kt	-6.36 kt	-3.74 kt	-0.15 kt	3.4 kb	8.6 kb	15.1 kb	72.3 kb
C580Y	203	286	310	195	134	284	141	280
Y493H	215	277	310	199	126	284	141	274
R539T	203	286	310	195	126	262	141	278
I543T	203	286	310	195	134	288	141	290
C580Y	203	286	310	195	134	276	141	274
C580Y	203	286	310	195	134	276	141	274
C580Y	203	286	310	195	134	276	141	274
WT	209	277	315	193	118	278	141	286
WT	221	277	315	193	118	272	141	276
WT	209	277	315	193	118	278	141	286
WT	209	280	318	195	118	282	141	276
WT	219	283	318	195	124	282	141	272
WT	209	277	315	193	118	278	141	286
WT	209	277	315	193	118	278	141	286
WT	209	277	315	193	118	278	141	286
WT	213	274	306	203	122	290	144	280
WT	209	280	312	195	128	266	141	274

ウガンダの調査で発見したアルテミシニン

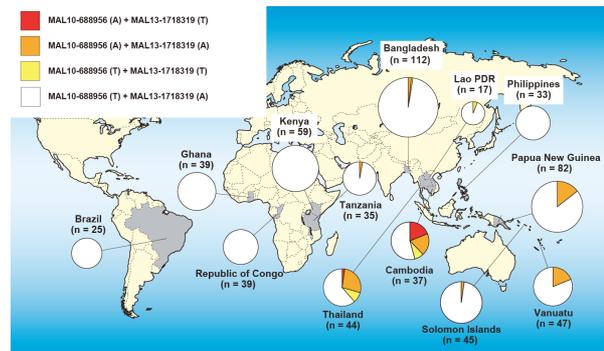


ン耐性原虫3例について、全ゲノム解析データをもとに主成分分析およびSTRUCTURE解析を実施し、3例が「アフリカで独自に出現」したのか、あるいは「メコン流域のアルテミシニン耐性原虫がアフリカに拡散」したのかを検討した。その結果、3例のアルテミシニン耐性原虫はいずれもアフリカ由来のマラ

リア原虫集団と強い相関を示したことから、アフリカで独自に出現したことが明らかになった。(Ikeda, Mita et al, Emerging infectious diseases. 2018)

4) 薬剤耐性原虫のグローバルな移動ダイナミズムの解明

アルテミシニン耐性と関連するSNPsが同定されたため(Takala-Harrison et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)これらの解析を実施した。下図に示すようにメコン流域を中心とした分布が見られ、アルテミシニン耐性原虫の拡散経路もこれまでの検討同様であることが明らかになった。



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26件)

Mita T, Hombhanje F, Takahashi N, Sekihara M, Yamauchi M, Tsukahara T, Kaneko A, Endo H, Ohashi J. Rapid selection of sulphadoxine-resistant *Plasmodium falciparum* and its effect on within-population genetic diversity in Papua New Guinea. Scientific reports. 2018;8:5565. 査読あり

Ikeda M, Kaneko M, Tachibana SI, Balikagala B, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Yamauchi M, Sekihara M, Hashimoto M, Katuro OT, Ochia A, Obwoya PS, Auma MA, Anywar DA, Odongo-Aginya EI, Okello-Onen J, Hirai M, Ohashi J, Palacpac NMQ, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T, Mita T. Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* with High Survival Rates, Uganda, 2014-2016. Emerging infectious diseases. 2018;24:718-26. 査読あり

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;14:125-35. 査読あり

Mita T, Culleton R, Takahashi N,

Nakamura M, Tsukahara T, Hunja CW, Win ZZ, Htike WW, Marma AS, Dysoley L, Ndounga M, Dzodzomenyo M, Akhwale WS, Kobayashi J, Uemura H, Kaneko A, Hombhanje F, Ferreira MU, Bjorkman A, Endo H, Ohashi J. Little Polymorphism at the K13 Propeller Locus in Worldwide Plasmodium falciparum Populations Prior to the Introduction of Artemisinin Combination Therapies. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:3340-7. 査読あり

Mita T, Jombart T. Patterns and dynamics of genetic diversity in Plasmodium falciparum: what past human migrations tell us about malaria. Parasitol Int. 2015;64:238-43. 査読あり

〔学会発表〕(計 47 件)

Mita T, Ikeda M, Kaneko M, Balikagala B, Tachibana S-I, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Hashimoto M, Katuru O, Ochia A, Obwoya P, Auma M, Anywar D, Odongo-Aginya E, Hirai M, Palacpac N, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T. Detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum isolates with ex-vivo ring-stage survival assay in Uganda. Keystone Symposia Conference: Malaria: From Innovation to Eradication. 2017.

Mita T. A mutator Plasmodium berghei model to investigate antimalarial drug resistance. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 66th Annual Meeting. 2017.

美田敏宏. 新規 ex-vivo 薬剤耐性検出法を用いた高度感染地域におけるアルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の検出. 第 15 回分子寄生虫マラリア研究フォーラム. 2016.

美田敏宏. マラリアの脅威とそれに立ち向かう新規技術の開発. 第 57 回日本熱帯医学会総会市民講座「蚊がもたらす感染症から身を守る」. 2016.

Mita T. Baseline polymorphisms of artemisinin-resistant marker, Pfk13-propeller, in geographically widespread Plasmodium falciparum parasite populations: genotyping of archive blood samples. Scientific Workshop to Explore e-ASIA Research Collaboration Opportunities Focused on Emerging Infectious Disease and Cancer Priorities in South East Asia

and the Pacific Rim. 2015.

〔図書〕(計 3 件)

美田敏宏. 蚊媒介感染症に関する最近の話題: マラリア. 臨床と微生物. 2017:71-6.

美田敏宏. 特集未来への投資 マラリア撲滅へ「薬剤耐性マラリア拡大の解明と対策」. 国際人流. 2015:12-6.

美田敏宏. 旅行者下痢症とその対策. In: 本田 徹 金明, editor. アジア旅行者のための感染症対策. 改訂第 2 版. 東京: 連合出版; 2015. p. 29-57.

〔産業財産権〕

〔その他〕

平成 30 年 4 月 23 日 日本経済新聞、

平成 30 年 4 月 6 日 科学新聞

平成 28 年 3 月 30 日 日刊工業新聞

Coffee doctors: マラリア克服のためのキーワードは「対策」

<http://coffeedoctors.jp/doctors/2346/>

朝日新聞デジタル、東洋経済、プレジデント、講談社、読売等、web ニュース 43 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美田 敏宏 (Toshihiro Mita)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 80318013

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()