

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860277

研究課題名(和文) マラリア原虫の遺伝子点変異による薬剤耐性獲得様式の解明

研究課題名(英文) Mutation patterns of mitochondrial DNA in atovaquone-resistant malaria parasites

研究代表者

彦坂 健児 (Hikosaka, Kenji)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：30456933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマラリア原虫の薬剤耐性獲得様式を解明するために、抗マラリア薬であるアトバコン(ATQ)を投与したPlasmodium berghei感染マウスを用いた。P. berghei感染マウスにATQを投与しATQ耐性関連の変異について調べたところ、既報のアミノ酸変異(L271V、K272R、V284F)及び新規の変異(I258M)が確認された。V284Fの変異をもつ原虫集団のmtDNA全領域の変異をさらに詳細に調べるために継続的に採取したP. berghei感染血液について次世代シーケンサーによるディープシーケンスを行ったところ、ATQ投与後6日目に変異が急激に出現したことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To clarify mechanism of emergence of resistance to antimalarial drugs, we investigated emergence patterns of a point mutation associated with drug resistance using Plasmodium berghei-infected mice. In this study, atovaquone (ATQ), targeting cytochrome b (cob) gene encoded on mitochondrial DNA (mtDNA) of Plasmodium, was selected as an antimalarial drug. In a result, four non-synonymous mutations were found in cob; three mutations (L271V, K272R and V284F) were already reported and the remaining one (I258M) was new. In order to further elucidate emergence patterns of these point mutations, we performed deep sequencing of Plasmodium mtDNA, which was extracted from infected blood collected continuously, using a next-generation sequencer. Analysis of the deep sequencing revealed that the mutation (V284F) was dramatically emerged six days after administration of ATQ. In the future, we will investigate emergence pattern of the other mutations (L271V, K272R and I258M) by deep sequencing.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア Plasmodium 薬剤耐性 抗マラリア薬 アトバコン ミトコンドリアゲノム 動物感染モデル

1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間約 3 億人の患者数と約 100 万人の死者を出す世界三大感染症の一つであり、*Plasmodium* 属原虫によって引き起こされる。いまのところマラリアに対する有効なワクチンは存在せず、その治療は化学療法に依存している。しかし、マラリア原虫は既存の治療薬に対する薬剤耐性株を高頻度に出現させるため、新規の作用機序を有する抗マラリア剤の開発が望まれている。最近、我が国において承認された抗マラリア剤「マラロン」はアトバコン (ATQ) とプログアニルの合剤である。このうちアトバコンは、mt ゲノム (mtDNA) コード遺伝子であるシトクローム *b* (*cob*) を標的としている。アトバコンに対する薬剤耐性株は、*in vitro* および *in vivo* の実験で報告されており、*cob* 遺伝子のアミノ酸変異を伴う塩基配列の点変異 (非同義置換) によって惹起される。マラリア感染マウスにおいては、COB の 284 番目のアミノ酸が最初に変異し (V284F)、その後、他のアミノ酸部位が変異 (M133I、L144S) することで薬剤耐性度がより高くなることが報告されている。これはアトバコン耐性が段階的なアミノ酸変異によって惹起されることを示唆する。このような段階的な薬剤耐性の獲得は、マラリア流行地で既に広く使用されている他の抗マラリア剤でも報告されている。スルファドキシシン/ピリメタミン合剤については、標的がそれぞれジヒドロ葉酸還元酵素 (*dhfr*) およびジヒドロプテロイン酸合成酵素 (*dhps*) であること、薬剤耐性度はそれぞれの酵素のアミノ酸配列が段階的に変異することで高くなることがわかっているが、その発生機構はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

現在、マラリアの治療は化学療法に依存していることから、抗マラリア薬の耐性マラリア原虫株の出現は深刻な問題である。我々はマラリア原虫における薬剤耐性株出現を制御するために、点変異によって引き起こされる薬剤耐性化の発生機序を明らかにすることを目的に研究を進めている。そのため、本研究では、実験室レベルで点変異による薬剤耐性出現の再現が可能な ATQ 投与マラリア感染マウスをモデルとし、その点変異の発生パターンを詳細に解析した。

3. 研究の方法

(1) ATQ 耐性株出現モデルの検討

薬剤耐性株出現モデルを確立するために、げっ歯類マラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA 株) 感染マウスへの自由飲水による ATQ 投与濃度 (0.05~250 µg/ml) を検討した。薬剤耐性かどうかの判定は、アトバコンの標的遺伝子である *cob* の全長塩基配列の決定による点変異の検出によって行った。

(2) 投与経路の違いが ATQ 耐性原虫株の出

現に与える影響

これまでに、*in vivo* におけるげっ歯類マラリア原虫における ATQ 耐性株の出現は、ATQ の腹腔内投与による報告のみであったため、(1)において確立した ATQ の自由飲水の方法との違いを検討した。ATQ の腹腔内投与は既出の報告に従い 1 mg/kg を 3 日間連続投与した。感染率は血液塗抹標本のギムザ染色により算出した。

(3) *cob* の塩基配列の継時的動態

ATQ に関連した点変異の獲得について継時的に解析するために、*P. berghei* 感染マウスを用い、ATQ 投与前、及び投与後 2~3 日毎の血液を採取した。感染血液より DNA を抽出後、PCR によって *cob* 遺伝子領域を含む mtDNA 全長 (6 kb) の増幅を行い、サンガー法により *cob* 遺伝子の全塩基配列を決定した。

(4) ディープシーケンス解析

ATQ 耐性株のうち V284F の変異をもつ原虫集団 (ATQ 自由飲水によって惹起された変異をもつ集団) の mtDNA 全領域の変異をさらに詳細に調べるために、ATQ 投与前及び投与後 2、4、6、8 および 11 日目の PCR 増幅産物の次世代シーケンサーによるディープシーケンスを行った。

(5) mt ゲノムのコピー数の決定

ATQ の標的である *cob* は mtDNA にコードされていることから、ATQ は *P. berghei* の mtDNA のコピー数に影響を与えている可能性がある。そのため、(3)で継時的に採取した各サンプルの DNA を用い、リアルタイム PCR によって 1 原虫あたりの mtDNA のコピー数を算出した。この際、mtDNA 側のプライマーは *cob* の領域内で、核ゲノム側のプライマーは sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ATPase (SERCA) 遺伝子の領域内でそれぞれ設計した。

4. 研究成果

(1) ATQ 耐性株出現モデルの確立

ATQ 投与濃度の検討の結果、5 µg/ml の自由飲水で耐性株の出現が認められた。これは、1 日のアトバコン投与量 1 mg/kg に相当する。アトバコン耐性株の *cob* の塩基配列を決定したところ、850 番目の G が T に変異していた。COB の V284F のアミノ酸変異を伴うこの変異は、既に *P. berghei* のアトバコン耐性株の変異として報告されている。

(2) ATQ 投与経路 (自由飲水と腹腔内投与) の比較

P. berghei 感染マウスへの ATQ 1 mg/kg 腹腔内投与群 (n=4) および 5 µg/ml 自由飲水群 (n=4) では、両群とも ATQ 投与後 4 日目に感染率が検出限界以下となり 8 日目に再び原虫が検出されるという推移であった (図 1)。

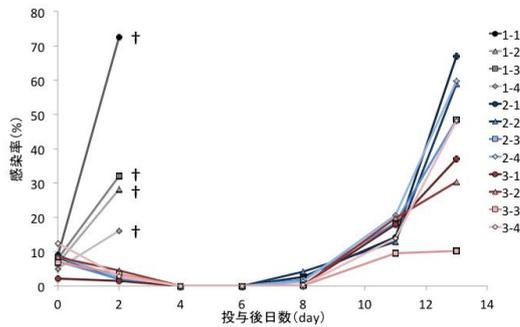


図 1. ATQ 投与後の感染率の推移
1-1~1-4 は無処置対照群 (n=4)、2-1~2-5 は ATQ 1 mg/kg 3 日間連続腹腔内投与群 (n=4)、3-1~3-4 は ATQ 5 µg/ml の自由飲水群 (n=4)。

以上の結果より、ATQ の自由飲水による投与でも腹腔内投与と同等の解析が可能であることが示唆された。

(3) *cob* の塩基配列の継時的動態

感染率の再上昇が確認された ATQ 投与後 11 日目における *cob* の全塩基配列をサンガー法にて決定したところ、腹腔内投与群において V284F および I258M のアミノ酸変異を伴う点変異 (非同義置換) が確認された。また、自由飲水群では、L271V、K272R および V284F の変異が確認された。今回確認されたアミノ酸変異のうち、L271V、K272R および V284F は *P. berghei* で既に報告されているが、I258M の変異はげっ歯類マラリア原虫の *in vivo* の研究では未報告のものであった。この新規のアミノ酸変異 I258M は熱帯熱マラリア原虫感染ヒト臨床サンプルで 2014 年に初めて報告されており、今回げっ歯類マラリア原虫でも同様の変異が再現されたことは非常に興味深い。

(4) ディープシーケンス解析

ディープシーケンスの結果、6 つのサンプルにおいて 17,569~23,968 の読み深度が得られ、V284F の変異は ATQ 投与後 6 日目に急激に出現していることが明らかとなった (図 2)。また、これらの mtDNA の他の領域における塩基配列の変異は存在しないことが予測された。

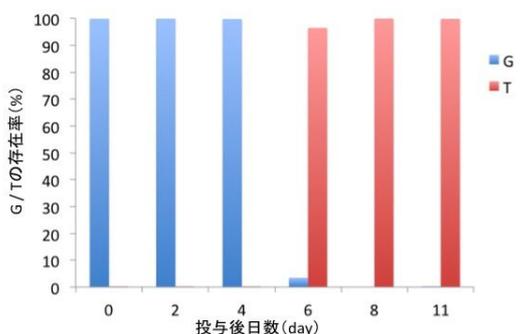


図 2. V284F を惹起する *cob* 850 番目の G と T の存在率

(5) ATQ 投与が *P. berghei* の mt ゲノムのコピー数に与える影響

mtDNA のコピー数を算出したところ、1 原虫あたり 63~135 コピー存在した (図 3)。

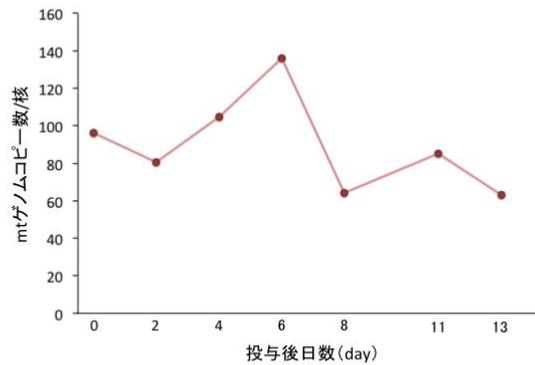


図 3. ATQ 投与期間中の mtDNA のコピー数の推移

この結果とディープシーケンスの読み深度より今回解析できた原虫数を概算すると、145~321 個の原虫を解析した計算となる。薬剤耐性が出現する背景となる原虫集団はより数が多いと考えられるため、今後はシーケンスデータのアウトプット量の多いシーケンサーの使用を予定している。また、今回の研究では、1 原虫に存在する 100 コピーほどの mtDNA の中に変異が存在するのかが、原虫集団として変異をもった原虫が存在するのかが解明されなかったため、1 原虫あたりの一塩基多型解析も予定している。

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 4 件)

Hikosaka K, Hirai M, Komatsuya K, Ono Y, Kita K. Lactate retards the development of erythrocytic stages of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Int.* 査読有 2015;64:301-3. DOI: 10.1016/j.parint.2014.08.003

Hikosaka K, Tanabe K, Kita K. Mitochondrial genome structure of the phylum Apicomplexa. *Jpn J Protozool.* 査読有 2015;48:45-56. http://protistology.jp/journal/jjp48/JJ_P48HIKOSAKA.pdf

Suzuki S, Hikosaka K, Balogun EO, Komatsuya K, Niiikura M, Kobayashi F, Takahashi K, Tanaka T, Nakajima M, Kita K. *In vivo* curative and protective potential

of orally administered 5-aminolevulinic acid plus ferrous ion against malaria. Antimicrob Agents Chemother. 査読有 2015;59:6960-7.
DOI: 10.1128/AAC.01910-15

Nakano R, Nakano A, Hikosaka K, Kawakami S, Matsunaga N, Asahara M, Ishigaki S, Furukawa T, Suzuki M, Shibayama K, Ono Y. First report of metallo-β-lactamase NDM-5-producing *Escherichia coli* in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 査読有 2014;58:7611-2.
DOI: 10.1128/AAC.04265-14

〔学会発表〕(計 3件)

彦坂 健児、本間 一、松崎 素道、野呂瀬 一美、北 潔. マラリア原虫の遺伝子点変異によるアトバコン耐性獲得様式の解明. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市) 2016 年 3 月 20 日

彦坂 健児、本間 一、松崎 素道、野呂瀬 一美、北 潔. マラリア原虫の遺伝子点変異による薬剤耐性獲得様式の解明. 第 23 回分子寄生虫ワークショップ/第 13 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 帯広畜産大学・原虫病センター PK ホール(北海道・帯広市) 2015 年 8 月 31 日

彦坂 健児 アピコンプレクサ原虫の多様なミトコンドリアゲノム構造. 第 47 回日本原生生物学会大会. 宮城教育大学(宮城県・仙台市) 2014 年 11 月 1 日

〔図書〕(計 1件)

Hikosaka K, Komatsuya K, Suzuki S, Kita K. Mitochondria of malaria parasites as a drug target, Chapter 2, 17- 38, in: Amidou S. (Ed.), An Overview of Tropical Diseases. 査読有 2015. Intech, ISBN 978-953-51-2224-1

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/infection-hostdefense/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

彦坂 健児 (HIKOSAKA, Kenji)
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教
研究者番号：30456933