

マラリア原虫薬剤耐性遺伝子を同定する革新的技術の開発

実施予定期間：平成 22 年度～平成 24 年度

代表機関：三重大学

代表者：油田 正夫

国内参画機関：

代表者：

国外参画機関：National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

代表者：Chairat Uthapibull

I. 概要

薬剤耐性原虫の世界的な分布拡大は現在のマラリア対策にとって解決すべき最も重要な課題である。本研究課題は薬剤耐性マラリア原虫の世界的な発生源であるタイのマラリア専門家と協力し、各種抗マラリア薬に対する耐性遺伝子を同定する革新的技術を開発することを目的とする。本技術は薬剤耐性マラリア原虫の拡散を防止する強力な手段となると共に、耐性を生じにくい薬剤の開発に繋がることが期待される。

1. 共同研究の内容

a. 相手国・地域における課題のニーズと社会への適用

タイ国境地帯は世界的な耐性マラリア原虫の発生源であり、東南アジアにおいても最も深刻なマラリア被害を受ける地域の一つである。最新のタイ政府の報告によるとマラリアの感染者はミャンマー、ラオス、カンボジア、マレーシアとの国境地帯において 90 年代後半以降、年間約 8～9 万人以上が確認され、その被害は増加の一途を辿っている。これらの地域ではクロロキン、メフロキン、ファンシダール等の従来の薬剤による治療効果は急激に低下している。また、これまで耐性原虫の発生が報告されていない唯一の薬剤であったアルテミシニンに対しても、2009 年にタイ-カンボジア国境地帯において耐性原虫の発生が報告されており、その拡散を予防することが喫緊の課題となっている。

同地域ではこれまで WHO などの国際機関の協力により数多くの疫学調査が実施されてきた。しかしながら、耐性の原因となる遺伝子変異については限られた情報しか存在せず、その拡散の実態を把握することは技術的に極めて困難であった。またこのことが現場でのマラリア対策の実施に大きな障害となってきた。本プロジェクトで開発する技術は、薬剤耐性マラリア原虫の分布状況を把握し、適切な抗マラリア戦略を策定することを可能とする。また新たな耐性原虫の発生に対しその拡散を未然に防止する強力な手段となる。したがって同国のマラリア対策に大きく貢献するものと考えられる。

b. 研究内容・手法

薬剤耐性マラリア原虫由来耐性遺伝子の同定は従来、耐性一感受性原虫間の遺伝子連鎖解析により行われてきた。しかし、宿主動物（霊長類）と媒介蚊を用いる必要があるため、多大な時間（数年～十年）と労力を要し、これまでわずか 2 種の耐性遺伝子しか同定されていない。また、DNA マイクロアレイ・超高速シーケンサーを用いて SNP を同定し、薬剤耐性能との関連を調べる試みが米国を中心に実施されたが、SNP 数は膨大であり、実装のある成果を生み出すには至らなかった。したがって実用的な耐性遺伝子同

定法は未だ存在していない。

一方、三重大グループは実験モデルであるネズミマラリア原虫において「マラリア原虫人工染色体」の作製に成功した (Cell Host & Microbe, 2010)。人工染色体は 1. 従来法の 100～1000 倍以上の効率で原虫に遺伝子を導入することができる、2. 導入した遺伝子は細胞分裂を経ても疑似染色体として安定に保持されるという特徴を持つ。申請者等は人工染色体のこれら特徴を利用して遺伝子ライブラリーを作成し、それをネズミマラリア原虫に直接導入することで、薬剤耐性遺伝子をスクリーニングするシステムを構築した (図 1 参照, 特許申請中)。本システムにおいて耐性遺伝子を同定するために要した日数は僅か三週間であり、連鎖解析法に比して格段に効率的に耐性遺伝子が同定できることが実証できた。また最も重要なヒトマラリア原虫である熱帯熱マラリア原虫でも人工染色体の作製に成功し (特願：2009-051454)、加えて同原虫ではこれまで不可能とされていた遺伝子直接導入法を確立した。

以上の成果をもとに熱帯熱マラリア原虫でも遺伝子同定技術を確立することが可能と考え本プロジェクトを構想した。本プロジェクトでは BIOTEC との共同研究により以下の計画を実施する。

(1) タイ患者由来薬剤耐性原虫の取得

H22-24 年度：タイ・BIOTEC グループにより実施

(a) マラリア患者由来感染血液の採取

タイ国内において各地に設置されている医療機関の協力のもと、マラリア患者より感染血液を採取する。特に国境地帯において薬剤耐性原虫が蔓延していることを念頭に、当該地域から重点的に血液試料を採取する。すでに担当医療機関には BIOTEC 側から協力要請を打診し、内諾を得ている。

(b) 患者由来マラリア原虫の試験管内培養への順応・薬剤耐性試験

採取した患者由来マラリア原虫感染血液をヒト血清・合成培地を用いた試験管内培養に供し、安定培養株として確立する。次に株化した原虫を各種マラリア治療薬 (クロロキン、ピリメサミン、メフロキン、アトバコン、アルテミシニン等) 存在下で培養し、耐性能を評価する。

(2) 熱帯熱マラリア原虫人工染色体による薬剤耐性遺伝子同定法の確立

H22-H23 年度：三重大学グループにより実施

(a) 耐性原虫遺伝子ライブラリーの作製

既に株化され耐性遺伝子 (pfcr1^{T76K}) が特定されているクロロキン耐性原虫 (Dd2 strain) を用い耐性遺伝子同定法を確立する。) 耐性原虫よりゲノム 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。次に調製した DNA 断片を熱帯熱マラリア原虫人工染色体に組み込み、薬剤耐性原虫遺伝子ライブラリーを構築する。

(b) 遺伝子ライブラリーの原虫への導入とスクリーニング

構築した遺伝子ライブラリーを直接導入法により野性型 (薬剤感受性) 原虫へ導入する。クロロキンによるスクリーニングを行い、新たに耐性能を獲得した原虫、即ち耐性遺伝子が導入された原虫を選択する。

(c) 薬剤耐性遺伝子の同定

選択した薬剤耐性原虫より人工染色体を回収し、組み込まれた DNA 断片の両端配列を PCR ゲノムウォーキング法により決定する。公開されている熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報と決定した両端配列から、DNA 断片のゲノム上の位置を特定する。複数のゲノム断片を比較し、共通する遺伝子として薬剤耐性遺伝子 (pfcrt^{T76K}) を同定する。以上の実験を通じて同定法を確立するとともに、改良・効率化を図る。

(3) 患者由来薬剤耐性原虫株からの薬剤耐性遺伝子の同定

H23-24 年度：三重大学グループにより実施

タイ・BIOTEC グループが株化した耐性原虫株から新規耐性遺伝子を同定し本技術の有効性を実証する。同定した耐性遺伝子は再度、人工染色体に組み込み、野性型 (感受性) 原虫へ導入し、耐性能 (具体的には半数阻害濃度 (IC₅₀) を決定し薬剤耐性の原因遺伝子であることを確認する。また配列中に存在する耐性を付与する遺伝子変異 (点変異・配列欠損・付加) を特定する。耐性遺伝子であると確認されたものに関してはその情報を BIOTEC グループにフィードバックする。耐性遺伝子が確定されれば特異的プライマーを作成し PCR 法とダイレクトシーケンス法を実施することで、当該遺伝子変異を持った原虫が患者血液中に存在するかを容易に確認することができる。

c. 我が国を中心とした科学技術コミュニティの構築と技術の普及・国際標準の創出の可能性

本申請で開発する「人工染色体を用いた薬剤耐性遺伝子同定法」は従来の連鎖解析をベースとした方法や最新機器による SNP 同定をベースとした方法と比べ、迅速性・正確性の点ではるかに優れており、事実上唯一の実用的な同定技術であることから国際標準技術となることは間違いない。加えて、当該方法は高額装置を必要とせず、比較的容易に発展途上国へ移転・普及できると考える。現段階では技術確立とフィールドへの応用性検討を主眼とするため、日本-タイという小規模での国際共同研究を実施するが、技術の汎用性を鑑みると近い将来、東南アジア・アフリカ・中南米へと共同研究が進展していく可能性は十分あり、技術発信国として日本がリーダーシップをとる科学技術コミュニティが形成されると考えられる。

d. 本研究の波及効果

マラリアは世界 100 カ国で流行し、年間約 5 億人の感染者と約 200 万人の死者を出す世界 3 大感染症のひとつである。薬剤耐性原虫の広範な分布により、治療が困難となっている国は東南アジア・アフリカ各国に存在することから、その波及効果は大きい。前項に述べたように同様の研究を他の流行国で展開することにより、その地域の疫学調査研究を飛躍的に向上させることができると考える。

2. ネットワーク構築の実現可能性

三重大学と BIOTEC の研究グループ間では 2006 年より交流を開始している。2009 年 4 月よりは隔月で会議を実施しており、共同研究実施に必要な体制は整っている。研究材料となるタイ・マラリア患者由来感染血液の採取については、BIOTEC グループが現地へ赴き、直接担当医療機関との交渉を行い計画実施の許可を得ている。すでに三重大学と BIOTEC 側間で包括的研究協定 (MOU) 締結した。

3. 本制度により取組を支援する必要性

本申請は相手国に対する単なる技術供与ではなく、基礎的、先端的研究を基軸とした挑戦的な取り組みである。よって ODA による開発プログラムによる支援を受け難い側面を有している。またマラリアは発展途上国の感染症であり、製薬会社による積極的な研究開発活動は期待できない。以上の理由から本制度による国際貢献を目的とした国家レベルでの支援が必要である。

4. 継続性

タイ国境地域は世界でも有数の耐性マラリア原虫発生地帯であり、タイ国内での耐性原虫の出現・分布拡大を防ぐためには、薬剤耐性原虫のモニタリングを支援期間終了後も長期に渡って継続する必要がある。したがって実施期間終了後も、本研究で構築した BIOTEC および医療機関との研究ネットワークを利用し、タイ国境地域での研究を継続する。特にアルテミシニン誘導体に対する耐性原虫が同地域で発生したという報告は世界的な問題となっており、本耐性遺伝子同定技術を用いた研究の継続は必要である。また耐性原虫対策は他のアジア・アフリカ諸国にとっても最重要課題であり、タイ国での研究をモデルケースとして、他のアジア・アフリカ諸国との国際的な共同研究へと本プロジェクトを発展させることができると考える。

5. 相手国・地域との政府レベルでの協力関係の強化・構築への発展性

タイ国では 1949 年以降継続して「Malaria control program」を実施し、マラリア制圧に政府レベルで取り組んでいる。1997 年に公衆衛生省が出した当該プログラムに関する報告書で挙げられた重要 6 項目のうち 2 項目が国境地域・耐性マラリア対策に関連するものでありその関心の高さを窺わせる。したがって本研究で目標とする薬剤耐性遺伝子同定法確立、患者由来薬剤耐性株の樹立および薬剤耐性遺伝子の同定はタイ政府が推進するマラリア対策と合致しており、これを強力に推進するものと期待される。また本プロジェクトで確立を目指す耐性遺伝子同定法は現在のところ唯一の実用的な耐性遺伝子同定法であり、日本独自の技術によって開発されるものである。したがって、日本政府の科学技術外交強化で謳われる「我が国の国際的プレゼンス」を強化し、日本-タイおよび他のアジア・アフリカ諸国との政府レベルでの協力関係の発展に繋がるものと考えられる。

6. 生命倫理・安全面への配慮について

本申請研究では組換えマラリア原虫を作製することから「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」に基づき、実験許可申請が必要である。既に熱帯熱マラリア原虫人工染色体を用いた組換え原虫作製実験に関し、所属機関に申請を行い、その実験許可を得ており、研究実施上問題はない。また、タイでの患者由来血液試料の採取に関しては担当医療機関の審議委員会に申請し採取許可を得ている。

7. 研究実施体制

a. 代表機関の組織体制

三重大学では国際研究交流担当の事務組織として国際交流チームを設置し、国際共同研究・教育を推進している。本申請研究においても国際交流チームによって組織的支援が行われる。

b. 役割分担

(1) 国名：日本 機関名：三重大学（代表者：油田正夫）

活動内容：熱帯熱マラリア原虫人工染色体による薬剤耐性遺伝子同定法の確立及び、患者由来薬剤耐性原虫株を用いた同法の実用性の実証（薬剤耐性遺伝子の同定）

(2) 国名：タイ王国 機関名：National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)（代表者：Chairat Uthapibull 博士）

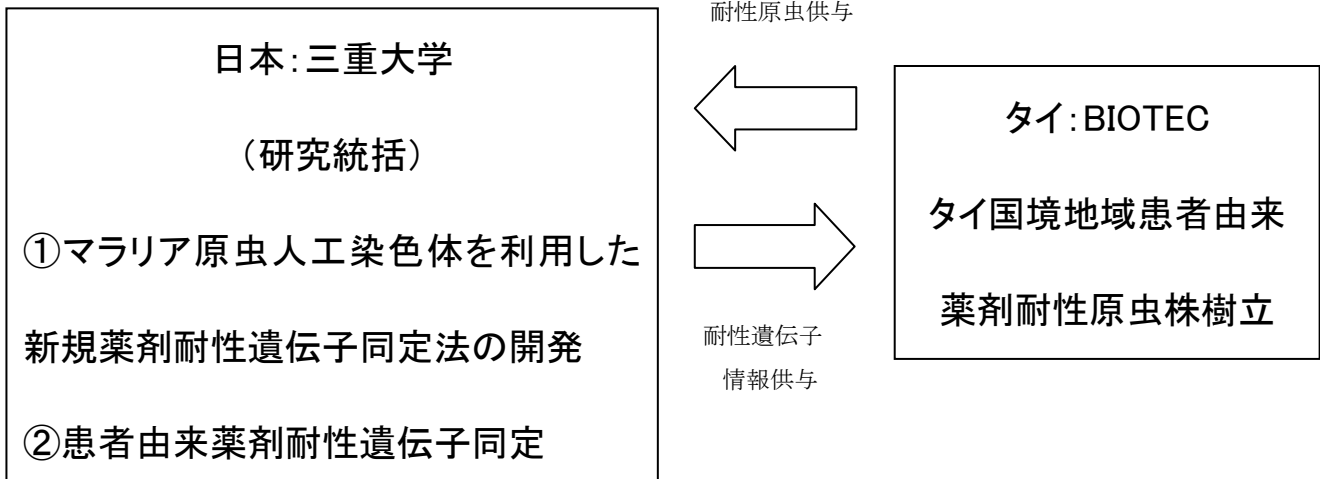
活動内容：タイ患者由来薬剤耐性原虫の取得

c. 責任体制等

全研究に対する統括および日本国内の研究に対する統括は三重大学・研究代表者・油田正夫が行う。タイ国内での研究統括は BIOTEC・Chairat Uthapibull 博士が行う。研究の進捗状況は少なくとも毎月一回、双方の統括責任者が検討会議を開き、確認する。また年に一度、日本もしくはタイの研究機関に関係者が集まり、成果報告会を実施する。

「研究体制図」

アジア・アフリカ科学技術協力の戦略的推進
マラリア原虫薬剤耐性遺伝子を同定する革新的技術の開発



| 氏名 | 所属部局・職名 | 提案課題における役割 |
|---------------------------|---|-----------------------|
| ◎ 油田 正夫 | 三重大学医学部・教授 | 研究代表者・研究統括 |
| 岩永 史朗 | 三重大学医学部・准教授 | 人工染色体ライブラリー作製 |
| 金子 伊澄 | 三重大学医学部・助教 | 組換えマラリア原虫作製 |
| ○ Chairat Uthaipibul | National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)・Research scientist | 薬剤耐性原虫株樹立 |
| Sumalee Kamchonwongpaisan | National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)・Research scientist | 患者由来マラリア原虫の試験管内培養への順応 |

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 22 年度

・計画

すでに耐性遺伝子が同定されている熱帯熱マラリア原虫を用い人工染色体ライブラリーを作製し、耐性遺伝子同定法を確立するための条件検討を行う(三重大学)。タイ国境地域から薬剤耐性原虫の採集、株化を開始する(BIZOTEC)。

・実績

すでに耐性遺伝子が同定されている熱帯熱マラリア原虫を用い人工染色体ライブラリーを作製し、耐性遺伝子同定法を確立するための条件検討を行った。耐性遺伝子のスクリーニングに必要な遺伝子導入条件をほぼ確立することが出来た(三重大学)。タイ国境地域のマラリア感染患者から感染血液を採集し原虫の株化を行った(BIOTEC)。約 80 の独立した原虫株を樹立することが出来た。

b. 平成 23 年度

・計画

タイ国境地域患者からの薬剤耐性原虫の採集、株化を行う(BIOTEC)。耐性遺伝子同定法の改良・効率化を図る(三重大学)。また得られた患者由来薬剤耐性原虫株から人工染色体ライブラリーを作製し新規薬剤耐性遺伝子の同定を試みる(三重大学)。

・実績

タイ・ミャンマー国境地域の高度感染地域のマラリア患者血液から人工培地での培養に順応した原虫株(安定株)を約 100 株樹立し、そこから 10 株の薬剤耐性株を樹立した(タイ国・BIOTEC グループとの共同研究)。ま

た、耐性遺伝子同定法の改良・効率化により、ゲノム全体をカバーするライブラリーの作製が可能となり、それを用いたスクリーニング系を構築した。この系を用いて既知のピリメサミン耐性遺伝子だけでなく、クロロキン耐性原虫から新規耐性遺伝子の候補遺伝子を得ることができた(三重大学)。この方法により、患者由来薬剤耐性原虫株から新規遺伝子を含めた薬剤耐性遺伝子を同定するための準備を行った(三重大学)。

c. 平成 24 年度

・計画

引き続きタイ国境地域患者から薬剤耐性原虫の採集し、株化を行う(BIZOTEC)。得られた患者由来薬剤耐性原虫株から新規薬剤耐性遺伝子を同定する(三重大学)。

9. 年次計画

| 研究項目 | 1年度目 | 2年度目 | 3年度目 |
|---|----------|----------|------|
| ・熱帯熱マラリア原虫人工染色体による薬剤耐性遺伝子同定法の確立 ・患者由来薬剤耐性原虫株からの薬剤耐性遺伝子の同定 (代表機関：三重大学) | 薬剤耐性遺伝子 | 同定法の確立 | |
| | | 薬剤耐性遺伝子の | 同定 |
| ・タイ患者由来薬剤耐性原虫の取得 (国外参画機関：BIOTEC) | タイ患者由来薬剤 | 耐性原虫の取得 | |