

財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

平成 22 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 金子 修
所属機関名： 長崎大学 熱帯医学研究所
所属部署名： 原虫学分野 職名： 教授
所 在 地： 長崎県長崎市坂本 1 丁目 12-4
電 話： 095-819-7838 内線： 7838



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学

3. 成果の概要

三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられ、ヒト免疫と思われる選択圧がかかっている多型抗原 PvSTP1 について、①4 年間でアミノ酸アレルが変化するか、②アレル頻度分布は 4 年間で一定か、③特定の型が病原性と関連するかについて解析した。2004 年の 21 配列、2008 年の 13 配列を用いて解析を行ったところ、4 年間で有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルが 21 あった。また、アレル頻度分布は、4 年間でシステインに富む CRD と呼ばれる領域は多型の VAR 領域と比較して有意に変化が少なかった。①CRD が平衡淘汰にさらされている可能性、②宿主免疫を逃れるために VAR の多型性による抗原変異を起こしている可能性、の二点の可能性が考えられた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 金子 修
所属機関名：長崎大学 熱帯医学研究所
中国側研究者氏名： 曹 雅明
所属機関名：中国医科大学 基礎医学院

職名：教授
部署名：原虫学分野
職名：教授
部署名：抗感染免疫研究室

ヒト感染性マラリア原虫中国流行地株の分子疫学

研究者氏名	金子修
日本研究機関	長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野
中国共同研究者	曹雅明、王各各、朱晓彤
中国研究機関	中国医科大学基礎医学院抗感染免疫研究室

要旨：

中国南部では依然として三日熱マラリアが流行し問題となっている。三日熱マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、ロゼット形成や細胞接着現象を起こし、病原性との関連が予想されるが詳細はあきらかでない。そこで、三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられ、ヒト免疫と思われる選択圧がかかっている多型抗原 PvSTP1 について、2004 年と 2008 年に収集した原虫を用いて、①2004 年に見られたアミノ酸アレルが 2008 年にも存在するか、②アレルの頻度分布は 4 年間で一定か、③特定の型の PvSTP1 が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかについて解析した。2004 年の 21 配列、2008 年の 13 配列を用いて解析を行ったところ、2004 年に見られ 2008 年では有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルが 21 ある一方、2004 年に見られず 2008 年にみられるようになったアミノ酸アレルが 4 つあった。さらに、2004 年と 2008 年の間に CRD ではアレル頻度が VAR と比較して変化が少ないことが分かったため、①CRD が平衡淘汰にさらされている可能性、②宿主免疫を逃れるために VAR の多型性を用いて抗原変異を起こしている可能性、の二点の可能性を考えた。これを明らかにするために中立遺伝子のアレル頻度の変化の解析を行うことが必要と考えられる。また、特定の PvSTP1 アレルと病原性との関連は見られなかったが、さらに多くの塩基配列を加えて解析を行う必要がある。

Key Words 三日熱マラリア、抗原、多型性、

緒 言：

中国の南部では依然として三日熱マラリアが流行し、他の感染症との合併による間接的な死亡や体力低下に伴った生産性の低下による経済的損失が問題となっている。三日熱マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、感染赤血球が非感染赤血球に接着するロゼット形成と呼ばれる現象を起こし、病原性との関連が予想されているが、詳細はあきらかでない。我々は最近、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現する SURFIN という分子を同定したが、その三日熱マラリア原虫の相同体である PvSTP1 は三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現していると考えられる[1]。このような分子は、マラリア病原性の解析のカギとなるのみならず、ヒト免疫にも直接さらされるワクチン候補と考えられるため、PvSTP1 の解析は重要な課題である。

現在までに、我々の教室では抗 PvSTP マウス抗体をすでに作成し、分子レベルでの基礎的解析を行っているが、同時に、曹博士が 2004 年に収集し、保管していた中国の雲南省、浙江省、湖北省の 3 つの異なる地区の三日熱マラリア原虫 DNA（各地区 20 標本づつ）について PvSTP の塩基配列を決定した。その結果、PvSTP は非常に多型で、多くのアレルが存在することがわかった。また、集団遺伝学的統計解析により、ヒト免疫によると思われる淘汰圧を検出することができた。

そこで、本研究では PvSTP1 のアレル頻度が経年的に変化するのかどうかを、2004 年と 2008 年に収集した原虫を用いて、①2004 年度に見られたアレルがまだ存在するかどうか、②アレルの頻度分布は安定して存在しているのか（抗原変異を起こすか）、③特定の型の PvSTP1 が三日熱マラリア原虫の病原性と関連するかを解析することで、将来、この分子を標的とするコントロール戦略を立てる基礎情報を得ることを目的として行った。

対象と方法：

A. 三日熱マラリア患者からのマラリア原虫の採取

三日熱マラリア原虫標本は、2008 年、中国国内の雲南省のマラリア流行地において患者の同意を得た後にマラリア感染血液を濾紙に採取することで曹雅明により集められた。

B. DNA 抽出と PCR 増幅、塩基配列決定（図 1）

濾紙からのマラリア原虫 DNA の抽出を市販の DNA 抽出試薬（EZ1 DNA Tissue Kit; Qiagen）を用いて行った。抽出した DNA を鋳型として、KOD-Plus- DNA polymerase を用いて PvSTP1 の細胞外領域をコードする DNA 断片の PCR 増幅をおこなった。PvSTP1 には SalI 型と IVD10 型があるため、5' 側プライマーは SalI 型特異的プライマー（TTTCATTTCAAAAATATGTATTACTCTTG）と IVD10 型特異的プライマー（TTTCATTTCAAAAATATGTATTACTCTTG）、3' 側プライマーは共通プライマー（AAGAAGGAAAA TAAATGTGATAAAGCC）を用いて Initial PCR を行い、この PCR 産物を鋳型として、SalI 型 Nested 用プライマー（GAAAACAAACTTATAATATAATGCA）もしくは、IVD10 型 Nested 用プライマー（ACATAGTACTAT GTGTCTTGAAATATG）と Initial PCR に用いた 3' 側プライマーを用いて Semnested PCR を行った。塩基配列決定は PCR 産物を鋳型とする直接シーケンス法により行った。反応は 2 回に分けて行い、一つは 5' primer により、もう一つは 3' primer によりシーケンス反応を行うことにより、PCR 増幅反応中のエラーが入らないように注意した。

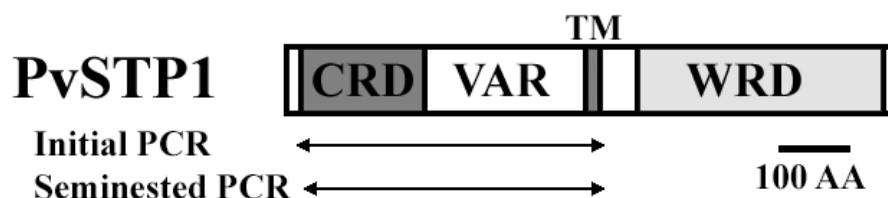


図 1. PvSTP1 の模式図。細胞外領域にある Cystein-rich domain (CRD) と Variable domain (VAR)、細胞内領域にある Tryptophan-rich domain (WRD)、および膜貫通領域 (TM) を示す。図の下に、Initial PCR と Semnested PCR により増幅される部位を示す。スケールバー=100 アミノ酸。

C. 統計学的解析

得られた塩基配列より、予想アミノ酸配列を決定し、2004 年度に雲南省の三日熱マラリア原虫から得られた PvSTP1 のアレルと比較した。多型を示す全てのアミノ酸部位について、アミノ酸の頻度分布が 2004 年と 2008 年の群で有意に異なるかどうかを Fisher's exact test により検討した。また、PvSTP1 の二つの領域、①種々のマラリア原虫の相同体間において保存されているシステインが豊富な Cystein-Rich Domain (CRD) と②種々のマラリア原虫の相同体間において非常に多型性に富む Variable Domain (VAR) の間で、頻度分布が変化しているアミノ酸部位の数が有意にことなるかどうかをカイニ乗検定で検討した。P<0.05 を有意に異なるとした。

結 果：

顕微鏡検査にて三日熱マラリア原虫と診断された 52 標本について、IVD10 型プライマーを用いて PCR 増幅をおこなったところ、27 標本について PvSTP1 遺伝子断片を PCR 増幅することが出来た。残りの 25 標本について SalI 型プライマーを持ちいて PCR 増幅をおこなったところ、25 標本すべてについて、PvSTP1 遺伝子断片の増幅ができた。これらの PCR 産物の直接塩基配列決定を行ったところ、IVD10 型プライマーにより増幅された 27 の PCR 産物のうち、18 が重複感染で 9 つが単一アレル優位であった。SalI 型プライマーにより増幅された 25 の PCR 産物のうち、21 が重複感染で 4 つが単一アレル優位であった。そこで単一アレル優位の合計 13 の塩基配列を用いて 2004 年度に 15 標本から得られた 21 の塩基配列と比較解析することとした。

①2004 年度に見られ 2008 年度では有意に減少して見られなくなったアミノ酸アレルがある。

2004 年標本にみられたが、その頻度が有意に減少して 2008 年標本では検出されなかったアミノ酸は Sal I 株のアミノ酸配列を基準として、N²⁸、I³⁵、N¹³⁸、A¹³⁹、P¹⁴¹、K¹⁴³、S²⁸³、N²⁹⁸、E³¹⁸、T³²²、P³²⁵、D³³⁰、P³³⁷、A³³⁸、A³⁴⁰、D³⁴¹、I³⁵⁰、L³⁵¹、H³⁸¹、A³⁹⁵、H³⁹⁶ の 21 アミノ酸あった。逆に、2004 年標本には見られなかったが、その頻度が有意に増加して 2008 年標本で検出されたアミノ酸は同様に、T¹⁴³、E²³⁵、Q²⁶³、K²⁶⁶ の 4 アミノ酸であった。

②VAR と比べて CRD ではアレル頻度分布は比較的安定していた。

2004 年と 2008 年の間で頻度分布が変化していた個所は、CRD（アミノ酸部位 23-199）で見つかった 75 の多型部位中 15 個所であった、また、VAR（アミノ酸部位 200-416）で見つかった 91 の多型部位中 35 個所であった。CRD と VAR において比較したところ、有意に CRD の方が、頻度分布が安定して存在していることがわかった（ $P < 0.01$ ）。

	100 AA	
PvSTP1 細胞外領域	CRD	VAR
頻度分布が 変化した部位	15	35
多型部位	75	91 ($P < 0.01$)

図 2. PvSTP1 細胞外領域 Cystein-rich domain (CRD) と Variable domain (VAR) における頻度分布の変化した部位の程度。スケールバー＝100 アミノ酸。

③特定の PvSTP1 アレルと発熱の有無や原虫感染率との関連は見られなかった。

2004 年と 2008 年の全てのサンプルをまとめた 34 塩基配列と患者発熱の有無および感染率との相関を検討したが有意な関連を見出すことはできなかった。

考 察：

本研究では PvSTP1 のアレル頻度が経年的に変化するのかどうかを中心に解析を行ったところ、2004 年と 2008 年の間に、CRD ではアレル頻度が VAR と比較して変化が少ないことが分かった。CRD はシステインに富んだ領域で種々のマラリア原虫間で保存性が高く、三日熱マラリア原虫では 300 ものメンバーを持つ VIR と呼ばれる多重遺伝子族にドメイン・シャッフリングにより使用されるようになっており、未同定ではあるが重要な機能を有すると考えられている。4 年間の年月にもかかわらず、この領域の多くの多型部位のアミノ酸アレル頻度が一定であること、VAR ではアレル頻度が多い多型部位で変化していることは、CRD が平衡淘汰にさらされているか、あるいは逆に VAR が多型性により抗原変異を起こしているかの可能性があると考えられる。マラリア原虫抗原に対する平衡淘汰については、熱帯熱マラリア原虫の主要抗原である MSP1 について解析が行われ、第二領域と呼ばれる多型部位が異なる地域間でもアレル頻度が一定であることが報告されている[2]。熱帯熱マラリア原虫の MSP1 については、さらにアレル頻度は経年的には変化しないことが報告されており、熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫と言う差はあるものの、VAR のアレル頻度の経年変化はさらなる検討を要する。そのためには、中立遺伝子に関するアレル頻度の変化の解析と、さらに後年の標本を用いてこの点を確認することが必要である。また、2008 年に解析した配列数が少ないため、各種の関連解析の検出感度が低くなっている。そのため、

重複感染がみられた標本について大腸菌を用いたクローニングを行って、さらに多くの塩基配列を加えて解析を行う必要がある。

参考文献：

1. Winter G, Kawai S, Haeggstrom M, Kaneko O, von Euler A, Kawazu S, Palm D, Fernandez V, Wahlgren M. "SURFIN is a polymorphic antigen expressed on Plasmodium falciparum merozoites and infected erythrocytes." *J Exp Med* 201(11):1853-63 (2005).
2. Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K, Roper C, Mikes ZS, Sakihama N, Bojang KA, Oduola AM, Kremsner PG, Arnot DE, Greenwood BM, McBride JS. "A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses." *Nat Med* 6(6):689-92 (2000).

作成日：2010 年 3 月 14 日