

厚生労働科学研究委託費
(新興・再興感染症に対する革新的 医薬品等開発推進研究事業)
委託業務成果報告書(業務項目)

アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究

腸管系寄生虫症の解析

担当責任者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 ジアルジア症・赤痢アメーバ症・クリプトスポリジウム症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。本研究はインド NICED との共同研究を通じて、日印の国際共同研究の基盤を確立することを目的に研究を展開している。本年度はインドで流行する赤痢アメーバの集団としての遺伝的多様性を理解することを目的に、3種類のタンパク質コード遺伝子と3種類の非コード領域(イントロン及び遺伝子間領域)の遺伝子配列解析を通じた赤痢アメーバの遺伝的多型解析を行った。

A. 研究目的

本研究は主要な死亡原因のひとつである下痢症を対象とした研究を行う。消化管感染症は全死亡の約4%(216万人)を占める重要な感染症であり、HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める(WHO Report, 2009)。消化管感染症のうち原生生物による感染症として重要なのは、赤痢アメーバ症、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、プラストシスチス症などであり、これらが原虫が原虫性下痢症の大部分を占める。赤痢アメーバ症が開発途上国を中心として世界の人口の約1%に感染し、年間10万人の死者を生む重要な原虫である。一方、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症などは特に途上国での小児の感染率は極めて高いものの、小児の発育・発達に大きな影響を与え、高いDALYの原因となる。

我々は、インドコルカタにある National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED)、Indian Council of Medical Research (ICMR) と腸管原虫症に関する共同研究を行った。その目的は、アジア、特に南アジアとの腸管原虫症研究の連携を強

化し、情報ネットワークを構築することであった。更に、人的交流と人材育成を通じてお互いの研究能力の向上と病原体検出の情報の早期収集に有用なネットワークを構築することを目的とした。初年度はインド国内の赤痢アメーバ症例、特に便検体及び肝膿瘍穿刺液を用いて、3種類のタンパク質コード遺伝子と3種類の非コード領域(イントロン及び遺伝子間領域)の遺伝子配列解析を行った。

B. 研究方法

1. 臨床検体

51例の赤痢アメーバ検体を解析に用いた。内訳は26例の下痢症例、20例のアメーバ肝膿瘍例、5の無症状症例であった。

2. 遺伝子型別解析

糞便または肝膿瘍穿刺液から顕微鏡法、抗原捕捉法(E. histolytica II kit, Techlab)で陽性と診断された検体に関して、DNA stool mini kitでDNAを抽出した。すべての検体に関して coding 領域としては lysine glutamate rich protein 1 (kerp1), lysine glutamate rich protein 2 (kerp2), amoebapore C (apc)の3種

の座位、non-coding 領域に関しては Intron (AY956435)、遺伝子間領域では AY956439 の 2 箇所の領域を用いて PCR による増幅と直接配列解析を行った。方法は既出の方法 (Bahattacharya et al., 43, 4815-9, J Clin Microbiol 2005) に記述された方法を用いた。

2. 配列・クラスター解析

遺伝子配列は Clustal W、MEGA によりアラインし、SeaView Graphical Interface により可視化した後、Epi-Info で評価した。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる病原体の取扱いに関する許可、ヒト臨床検体の取り扱いに関する許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. タンパク質コード領域の多様性

51 種の臨床検体から kerp1, kerp2, apc に関してそれぞれ 1, 18, 2 種類の single nucleotide polymorphism (SNP) が検出された。それぞれの SNPs の位置、アミノ酸の置換の有無を表 1, 2 に示した。

Target loci	Name of SNP	SNP position	Amino acid substitution
<i>kerp1</i> (XM_648537) <i>kerp2</i> (XM_648547)	K1	329A/G	110 N/S
	Ka1	155A/G	52 K/R
	Kp2	204A/C	X
	Kp3	500A/G	167 E/G
	Kp4	549A/T	183 K/N
	Kp5	168 T/G	56 D/E
	Kp6	393A/G	X
	Kp7	137 C/T	46 S/F
	Kp8	174A/C	X
	Kp9	202A/C	68 T/P
	Kp10	277A/C	93 T/P
	Kp11	208A/T	103 Y/T
	Kp12	83A/G	28 K/R
Kp13	356 T/C	119 F/S	

表 1 coding region の SNPs

Target loci	Name of SNP	SNP position	Amino acid substitution
<i>kerp2</i> (XM_648547)	Kp14	489A/G	X
	Kp15	547A/G	183 K/E
	Kp16	88 A/C	30 T/P
	Kp17	160C/C	54 A/P
	Kp18	303A/C	101 K/N
<i>apc</i> (X76903)	A1	296 T/C	X
	A2	640 T/C	X

Target loci	Name of SNP	SNP position	Amino acid substitutions
<i>Intron</i> (AY956435)	Ir1	283 T/G
	Ir2	298 A/T
	Ir3	303G/A
<i>Intergenic region</i> (AY956439)	Igc1	328G/A
	Igc2	613 G/T

表 3 non-coding region の SNPs

3. 特定の病型にのみ見られる SNPs

赤痢アメーバ症はその臨床症状に従い、赤痢・腸炎型(D)・肝膿瘍型(LA)・無症状(AS)とに分けられる。図 4 にそれぞれ D 型・LA 型・AS 型だけに見られる SNPs、並びに、LA と AS 型に共通して見られる SNPs、更にすべての病型において見られる SNPs とが存在した。これらの SNPs をまとめた(表 4)。

Disease outcome	Target loci				
	<i>kerp1</i> (XM_648537)	<i>kerp2</i> (XM_648547)	<i>apc</i> (X76903)	Intron (AY956435)	Intergenic region (AY956439)
Sole D		Kp12 (83 A/G)	A1 (296 T/C)		
		Kp13 (356 T/C)			
		Kp14 (489 A/G)			
		Kp15 (547 A/G)			
Sole LA		Kp5 (168 T/G)		Igc1 (328 G/A)	
Sole AS		Kp6 (393 A/G)			
		Kp8 (174 A/C)			
		Kp9 (202 A/C)			
		Kp10 (277 A/C)			
		Kp11 (308 A/T)			
		Kp16 (68 A/C)			
		Kp17 (160 G/C)			
		Kp18 (303 A/C)			
LA/AS		K1 (155 A/G)		Ir2 (298 A/T)	
		Kp3 (500 A/G)		Ir3 (303 G/A)	
		Kp4 (549 A/T)			
		Kp2 (204 A/C)			
Common			A2 (640 T/C)	Ir1 (283 T/G)	Igc2 (613 G/T)

表 4 各病型に特異的に見られた SNPs と横断して見られた SNPs

D. 考察及び結論

我々は前研究班より、インドの NICED との研究連携を深めると同時に、赤痢アメーバにおける腸管原虫症全般の分子疫学的情報を収集することを目的として共同研究を進めている。赤痢アメーバ症の分子疫学研究に関しては、これまでタンパク質をコードしない高度に多型を示す領域 tRNA 近傍短反復配列(t-RNA-linked short tandem repeat、以下 tRNA-STR)の 5

種の座位を標的として、インドから臨床検体から得られた赤痢アメーバの遺伝的な多様性に関して、解析を行ってきた。この結果、インドにおける赤痢アメーバの臨床株の遺伝的多様性は、野崎らが日本の MSM(男性同性愛者)で示した赤痢アメーバ株において示したと同様に、極めて高いことが確認された。同時に tRNA-STR 遺伝子座の特定の遺伝子型が腸炎・肝膿瘍・無症候等の病型と相関していることが示された。この研究成果の問題点は、tRNA-STR がタンパク質をコードする領域になく、その多型と表現型(臨床像)との相関を結びつける病原性や免疫などに関与しうるタンパク質分子の相違に原因を帰結できなかった点にあった。

そこで本研究では、他の研究で示された病原性に関与することが示されているタンパク質遺伝子の内で細胞接着や細胞穿孔に関与することの知られている kerp1, kerp2, apc を用いた解析を行った訳である。その結果、特に kerp2 に際だったヌクレオチドレベルでの多型性が存在することが、世界で初めて明らかとなった。それぞれの SNPs が病型と相関するかを今後統計解析により検証するとともに、kerp2 の SNPs の変異に伴うタンパク質の機能の転換の観点から、生化学的・細胞生物学的観点から検証する予定である。以上の成果は、同時に NICED との連携を更に強化することに貢献をした。

E . 健康危険情報

該当せず

F . 研究発表

1. 論文発表

(i) Mukherjee, A. K., Chowdhury, P., Bhattacharya, M. K., Rajendran, K., Nozaki, T., and Ganguly. S. Association between *Giardia duodenalis* and co-infection

with other diarrhea-causing pathogens in India. *BioMed Res Int*, Volume 2014, Article ID 786480, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/786480>.

Anwar, S., Dikhit, M. R., Singh, K. P., Kar, R. K., Zaidi, A., Sahoo, G. C., Roy, A. K., Nozaki, T., Das, P., and Ali, V. Interaction between Nbp35 and Cfd1 proteins of cytosolic Fe-S cluster assembly reveals a stable complex formation in *Entamoeba histolytica*. *PLoS One* 9, e108971, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0108971.

2. 学会発表

なし

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず

