

MMRC



**ANNUAL REPORT OF MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER, CHIBA UNIVERSITY 2019**

千葉大学 真菌医学研究センター 報告

23



目 次

Content

はじめに	
Preface for Annual Report for 2019	
感染免疫分野 米山教授 感染応答プロジェクト Project for Immune Response in Infections Diseases	3
感染免疫分野 西城准教授 サイトカインプロジェクト Project for Cytokine Research	5
感染免疫分野 後藤准教授 微生物・免疫制御プロジェクト Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis	7
病原機能分野 知花准教授 カンジダ・グラブラータフェノームプロジェクト <i>Candida glabrata</i> Phenome Project	10
臨床感染症分野 亀井教授 臨床感染症プロジェクト Project of Clinical Investigation	12
臨床感染症分野 山本特任教授 感染宿主応答ネットワークプロジェクト Project for Host Response Network of Bacterial Infection	16
感染症制御分野 石和田准教授 感染症制御プロジェクト Project for Infection Control and Prevention	19
RNA 感染治療学分野 伊庭特任教授 RNA 制御プロジェクト Project for RNA Regulation	24
微生物資源分野 高橋准教授 微生物創生プロジェクト Project for Systems Biology of Microorganisms	27
微生物資源分野 矢口室長 バイオリソース管理室 Management of Unit of Microbiological Resources	29
文部科学省 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原真核微生物」 Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology National BioResource Project “Pathogenic Eukaryotic Microorganisms”	32
長崎大学熱帯医学研究拠点特定領域共同研究 「アフリカで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と形態学的, 生理学的, 分子生物学的解析」プロジェクト Cooperative Research of Priority Areas with NEKKEN, Nagasaki University Project for Collections, and morphological, physiological and molecular biological analysis of human pathogenic fungi and actinomycetes in Africa	33
高齢者・新生児アスペルギルス症制圧へ向けた予防・診断・治療開発プロジェクト The project for prophylaxis, diagnosis, and treatment for aspergillosis and the other mycoses in aged and neonate patients	34

AMED/JICA 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) 「ブラジルと日本の薬剤耐性を含む真菌感染症診断に関する研究と リファレンス協力体制強化プロジェクト」 AMED/JICA Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) “The establishment of a research and reference collaborative system for the diagnoses of fungal infections including drug-resistant ones in Brazil and Japan”	36
感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE) Japanese Initiative for Progress of Research on Infectious Disease for Global Epidemic (J-PRIDE)	38
千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・リーディング研究育成プログラム 「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」 Leading Research Promotion Program, Institute for Global Prominent Research Advanced Research of Infection and Immunity Based on Integrative Understanding of Host-Microbe Interactions	39
平成30年度 共同利用・共同研究報告 2018 Fiscal Year Cooperative Research Program Report	40
感染症研究グローバルネットワークフォーラム2018 The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity	59
2019年講演会 2019 Scientific Meetings & Seminars	61

はじめに

我が国では高齢者の増加に伴い、高度医療や生活習慣病に起因する日和見感染症や呼吸器疾患を基礎疾患とする難治性の真菌感染症が増加しています。また経済活動や観光等のグローバル化に伴い、輸入真菌感染症等をはじめとするさまざまな感染症の脅威にも直面しています。このような背景で、我が国唯一の真菌感染症の研究・治療拠点である真菌医学研究センターに求められる役割は以前にも増して重要になっています。

本センターは、学内において感染症の研究はもとより、免疫、病原微生物、細胞生物、ケミカルバイオロジー、情報生命科学等を包含する領域の研究拠点として、基礎研究者と共同研究を推進するとともに、学外では文科省より認定された「共同利用・共同研究拠点」事業を通じて、国内・海外の大学、公的研究機関、医療機関、企業等との緊密な共同研究を先導し、病原真菌コミュニティの発展と次世代の人材育成を目指しています。

本センターの特色として、基礎研究と平行して臨床研究及び医療活動を積極的に行っていることが挙げられます。真菌感染症の臨床研究・治療学の拠点として、千葉大学附属病院に我が国初の真菌症専門外来を開設し、また全国の大学・医療機関からの要請に応じてコンサルテーションも長年に及び実施しています。さらに小児感染症においても、附属病院の小児科・感染症管理治療部・感染症内科と連携した活発な臨床研究を行っています。

本センターは、真菌感染症の研究を支える、世界レベルの規模と品質を誇る病原真菌・放線菌のバイオリソースを有しています。文科省より認定された「ナショナルバイオリサーチプロジェクト（NBRP）」の支援もとで、病原真菌の収集、保存、分与、オミックス情報解析等を通じて、基礎・臨床研究、共同利用・共同研究拠点事業、国際共同研究等を支えています。昨年度は、真菌講習会およびバイオリソースの機能強化を目指して、旧ラジオアイソトープ実験室を、バイオリソース管理室の占有スペースとしてリニューアルしました。

本年度も、ブラジル、米国、ドイツ、英国、ポルトガル、中国等の真菌研究拠点と活発な国際共同研究を行いました。特に平成28年ブラジル・カンピーナス大学医学部と連携して地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS）に採択されたことを契機に、現地における薬剤耐性真菌による感染症の実態解明を目指して、若手研究者の相互交流を通じて共同研究を実施しました。

本センターでは、国内外より卓越した研究者を招請し、毎年国際フォーラムを開催しています。本年度は、マイクロバイオームを主題にして、第8回感染症研究グローバルネットワークフォーラムを2020年1月に千葉大学附属病院で開催しました。参加者は述べ220名を数え多くの共同研究も立ち上がりました。

本年も、千葉大学、本センターの運営協議会メンバー、特任教授、兼任教授、客員教授、グラントフェローはじめ、国内外の多くの共同研究者による御指導、御支援を賜りましたことに心より感謝致します。

令和2年4月

千葉大学真菌医学研究センター長

笹川千尋

Preface for Annual Report for 2019

Our country has already become a “super-aged” society, and the incidences of fungal infectious diseases are steadily increasing due to the increase in advanced medical care and lifestyle-related disorders in patients with opportunistic infectious diseases and respiratory diseases. Moreover, the dramatic increase in worldwide trade and tourists from abroad, along with the spread of severe fungal infectious diseases, is a key issue within the aging population. The Medical Mycology Research Center (MMRC) at Chiba University has become increasingly important because it plays three roles: as a research organization, a medical activity, and a promoter of educational activities aimed at raising public awareness.

In 2011, MMRC was certified as a Joint Usage/Research Center by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). Since then, MMRC has been actively engaged in medical mycology research and related fields, including infection immunology, infection biology, bioinformatics, and infection disease sciences, through partnerships with universities, public institutions, medical institutions, hospitals, and pharmaceutical companies. In 2014, we opened a specialty clinical research facility for fungal infectious diseases at Chiba University Hospital that is the only outpatient clinic for such diseases in Japan. In addition, we are actively conducting clinical research on pediatric infectious diseases in cooperation with the Hospital's departments of pediatrics, infectious disease management and treatment, and infectious disease internal medicine.

MMRC has a fungal culture collection, designated as a national bioresource, that is a prerequisite not only for promoting our own research but also for the fungal research community in Japan and around the world. MMRC also has BSL-3 facility, the only such laboratories at Chiba University.

We are also enthusiastic about promoting international collaborations with several outstanding fungal research groups in Brazil, US, UK, China, Portugal, and Germany. For example, in 2016, a team of the Division of Clinical Research at MMRC was adopted by SATREPS, a Japanese government program that promotes international joint research. As part of this program, our team has collaborated with the fungal research team in Campinas University in Brazil to investigate the impact of drug resistance on fungal infectious diseases in Brazil.

Finally, we envision MMRC as the leading institution for excellent scientific research in fungal infectious research, as well as a key resource for research on pathogenic fungi that will ultimately advance the field of medical mycology.

April, 2020

Chihiro Sasakawa PhD

Director of MMRC

米山 P I (感染応答) プロジェクト

Project for Immune Response in Infections Diseases

研究概要 (Summary)

感染に対する生体防御は、自然免疫と獲得免疫によって協調して行われている。本プロジェクトでは、ウイルス感染に応答した自然免疫誘導に注目し、感染センサー RIG-I-like 受容体 (RLR) によるウイルス由来の非自己 RNA 検知の分子機構の解明と、それによって引き起こされる免疫応答の生理機能を解析することにより、ウイルス感染症に対する新たな治療戦略の開発を目指した解析を行っている。

Innate immune system plays an essential role in self-defense against infection of a variety of pathogens. In this project, we focus on antiviral innate immunity, especially molecular machinery for detection of viral RNA by retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) and subsequent immune responses. The results obtained from the studies will help us to establish a novel therapeutic or preventive strategy against RNA virus-induced infectious diseases.

教授	米山 光俊	Professor	Mitsutoshi Yoneyama
助教	尾野本浩司	Assistant Professor	Koji Onomoto
特任助教	小野口和英	Assistant Professor	Kazuhide Onoguchi
技術職員	常喜 儒彦	Research Technician	Michihiko Jogi (~ 2019.8)
技術補佐員	滝沢みゆき	Research Promotion Technician	Miyuki Takizawa

1. Identification of a new autoinhibitory domain of interferon-beta promoter stimulator-1 (IPS-1) for the tight regulation of oligomerization-driven signal activation

Takahasi K¹, Onomoto K², Horiuchi M³, Kato H⁴, Fujita T⁵, Yoneyama M²

¹ Department of Life Science, Gakushuin University, Tokyo, 171-0031, Japan.

² Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, 260-8673, Japan.

³ Department of Chemistry, Division of Integrated Human Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido, 061-0293, Japan.

⁴ Institute of Cardiovascular Immunology, University of

Bonn, Bonn, 53105, Germany.

⁵ Laboratory of Molecular Genetics, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, 606-8507, Japan.

Upon viral infection, retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors detect viral foreign RNAs and transmit anti-viral signals via direct interaction with the downstream mitochondrial adaptor molecule, interferon (IFN)- β promoter stimulator-1 (IPS-1), to inhibit viral replication. Although IPS-1 is known to form prion-like oligomers on mitochondria to activate signaling, the mechanisms that regulate oligomer formation remain unclear. Here, we identified an autoinhibitory domain (AD) at amino acids 180-349 to suppress oligomerization of IPS-1 in a resting state and regulate activation of downstream signaling. Size exclusion chromatography (SEC) analysis demonstrated that AD was required to suppress auto-oligomerization of the

caspace recruitment domain (CARD) of IPS-1 via intramolecular interactions. This was supported by the observation that cleavage of a peptide bond between IPS-1 CARD and AD by Tobacco Etch virus (TEV) protease relieved autoinhibition. Conversely, deletion of this domain from IPS-1 enhanced signal activation in IFN-reporter assays, suggesting that IPS-1 AD played a critical role in the regulation of IPS-1-mediated anti-viral signal activation. These findings revealed novel molecular interactions involved in the tight regulation of innate anti-viral immunity.

2. Functional analysis of RNA binding proteins (RBPs) that are responsible for induction of anti-viral innate immunity via RNA-granule formation.

Onomoto K, Ban M, Kuroki Y, Tsutsuba C, Watanabe Y, and Yoneyama M.

Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, 260-8673, Japan.

We demonstrated that viral infection induces RLRs to accumulate in cytoplasmic granular-like structure, anti-viral stress granule (avSG). We further revealed that avSG plays a critical role as a platform for the initiation of RIG-I-mediated anti-viral signaling. Here, we are analyzing several RBPs that play a role in the regulation of both RIG-I-mediated signal activation and avSG formation. We are also trying to identify novel RBPs that can be involved in anti-viral innate immune responses using several biochemical approaches.

3. Molecular interaction between anti-viral innate immune responses and endoplasmic reticulum (ER) stress responses.

Onoguchi K, Mochizuki Y, and Yoneyama M.

Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, 260-8673, Japan.

We are interested in how the ER stress-induced response communicates with RLR-mediated signaling in the virus-infected cells. Recently, we have identified a novel molecule that is involved in the activation of both signaling pathways, suggesting a molecular interaction between these two stress-inducible signaling cascades.

Publications

- 1) Takahasi, K., Onomoto, K., Horiuchi, M., Kato, H., Fujita, T., Yoneyama, M. (2019). Identification of a new autoinhibitory domain of interferon-beta promoter stimulator-1 (IPS-1) for the tight regulation of oligomerization-driven signal activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 517, 662-669.
- 2) Matsuo, K., Haku, A., Bi, B., Takahashi, H., Kamada, N., Yaguchi, T., Saijo, S., Yoneyama, M., Goto, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol Immunol*, 63, 155-163.
- 3) Ohto, T., Konishi, M., Tanaka, H., Onomoto, K., Yoneyama, M., Nakai, Y., Tange, K., Yoshioka, H., Akita, H. (2019). Inhibition of the inflammatory pathway enhances both the in vitro and in vivo transfection activity of exogenous in vitro-transcribed mRNAs delivered by lipid nanoparticles. *Biol Pharm Bull*, 42, 299-302.

西城 P I (サイトカイン) プロジェクト

Project for Cytokine Research

研究概要 (Summary)

生体は、多種多様な細胞や組織が互いに時空的に作用することにより恒常性が維持される一つシステムであり、その維持においてサイトカインは中心的な役割を担っている。多くの疾病は単に一つの臓器、組織の異常ではなく、免疫系を始めとする種々のシステムの異常であることから、これらを統合するサイトカインの役割を知ることは非常に重要である。本プロジェクトでは、感染性疾患や炎症性疾患の病態形成におけるサイトカインの役割を解明し、最終的に新たな治療薬の標的分子を見出すことを目的とする。

Cytokines play a central role in maintenance of homeostasis. Because, a disease is not caused by only one problem of an organ, but caused by a systemic disorder, which is regulated by cytokines, it is important to study their functions. We aim to find new therapeutic targets for inflammatory diseases and infectious diseases by investigating the roles of cytokines in pathogenesis.

准 教 授	西城 忍	Associate Professor	Shinobu Saijo
助 教	矢部 力朗	Assistant Professor	Rikio Yabe
特 任 研 究 員	ファビオ セイチ ヨシカワ ヤマダ	Post Doctoral Fellow	Fabio Seiti Yoshikawa Yamada
技 術 補 佐 員	水口 潤子	Research Promotion Technician	Junko Minakuchi
技 術 補 佐 員	鈴木 智明	Research Promotion Technician	Tomoaki Suzuki

1. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungal infection.

Fabio Seiti Yoshikawa Yamada, Rikio Yabe and Shinobu Saijo

Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

Dectin-1 and Dectin-2 are type II transmembrane proteins of the C-type lectin family with single carbohydrate recognition domains (CRDs) in their extracellular region. They are expressed mainly in dendritic cells and macrophages. Dectin-1 recognizes β -glucans with its CRD and transduces signals through its immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-like motif in the cytoplasmic domain, whereas Dectin-2 recognizes α -mannans and transduces its signal through association with the ITAM-containing Fc receptor γ chain. Upon ligand binding, spleen tyrosine kinase

is recruited to the ITAM and activates the caspase recruitment domain family member 9 (CARD9)-nuclear factor- κ B axis, resulting in the activation of various genes including those encoding pro-inflammatory cytokines. Both β -glucans and α -mannans are major cell wall components of fungi including *Candida albicans* (*C. albicans*) and *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*). Recently, it was reported that Dectin-1 is important in protection against *P. carinii* by inducing reactive oxygen species, whereas both Dectin-1 and Dectin-2 play important roles in defense against *C. albicans* by preferentially inducing Th17 cell differentiation. These findings unveiled new anti-fungal immunity.

2. Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine.

Mari T. Iwasawa¹, Yuumi Nakamura^{1†}, Seiichiro

Wakabayashi¹, Seitaro Nakagawa¹, Yuki Katayama¹, Mitsutoshi Yoneyama², Hiromitsu Hara³, Yoichiro Iwakura^{2,4,5}, Aoi Akitsu⁵, Naohiro Inohara^{6,7}, Gabriel Nunez^{6,7}, Hiroyuki Matsue^{1,2†} and Shinobu Saijo

¹ Department of Dermatology, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, 260-8670, Japan

² Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

³ Department of Immunology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University, 8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

⁴ Center for Experimental Medicine and Systems Biology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

⁵ Center for Animal Disease Models, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science, Noda-shi, Chiba 278-0022, Japan

⁶ Department of Pathology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁷ Comprehensive Cancer Center, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA

IL-17-mediated immunity has become known as an essential host defense mechanism against microbial infections. We previously reported that IL-17 is required to the host defense against systemic candidiasis, however, the role of the cytokines in the cutaneous candidiasis has remained unclear. To investigate *Candida albicans* (*C. albicans*) infection that more closely represents physiological skin infections in humans, we developed an epicutaneous candidiasis (ECC) mouse model that does not require any epidermal disruption.

Unlike systemic candidiasis, we identified that IL-17A and

IL-17F redundantly play critical roles in the clearance of *C. albicans* from infected skin using this ECC model. IL-17A and IL-17F promoted neutrophil recruitment to the epidermis and the expression of antimicrobial peptides. Notably, phagocytosis of hyphal forms of *C. albicans* was severely impaired in IL-17-deficient neutrophils; however, it was restored by stimulation with recombinant IL-17. The fungal recognition receptor TLR2, and the adaptor signaling molecule, MyD88, was not essential for the clearance of *C. albicans*.

Publications

- 1) Miura, T., Kawakami, K., Kanno, E., Tanno, H., Tada, H., Sato, N., Masaki, A., Yokoyama, R., Kawamura, K., Kitai, Y., Takagi, N., Yamaguchi, K., Yamaguchi, N., Kyo, Y., Ishii, K., Imai, Y., Saijo, S., Iwakura, Y., Tachi, M. (2019). Dectin-2-Mediated Signaling Leads to Delayed Skin Wound Healing through Enhanced Neutrophilic Inflammatory Response and Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Invest Dermatol.* 139(3), 702-711.
- 2) Suematsu, R., Miyamoto, T., Saijo, S., Yamasaki, S., Tada, Y., Yoshida, H., Miyake, Y. (2019). Identification of lipophilic ligands of Siglec5 and -14 that modulate innate immune responses. *J Biol Chem.* 294(45), 16776-16788.
- 3) Matsuo, K., Haku, A., Bi, B., Takahashi, H., Kamada, N., Yaguchi, T., Saijo, S., Yoneyama, M., Goto, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol Immunol.* 2019 63(5), 155-163.

後藤 P I (微生物・免疫制御プロジェクト)

Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis

研究概要 (Summary)

腸管は食餌性抗原や腸内細菌・真菌など多種多様な抗原に常に曝されている特殊な組織である。これら無数の抗原に対処するため、腸管では免疫細胞と上皮細胞が相互に作用しながら病原性微生物を排除し、非病原性微生物と共存する基盤を形成することで腸管の恒常性維持に寄与している。この腸内微生物との共生関係の破綻は、炎症性腸疾患に代表される腸疾患のみならず、肥満や糖尿病などの全身性の疾患発症の素因となることから、腸内微生物との共生システムや腸管免疫細胞と上皮細胞による腸管恒常性制御システムを理解することは重要な命題である。本プロジェクトでは、宿主と腸内細菌間の共生因子であり腸管上皮細胞が発現する $\alpha 1, 2$ -フコースによる腸内細菌との共生機構を明らかにし、腸管恒常性維持システムの解明とその破綻によって引き起こされる様々な疾患、特に感染症や代謝疾患の治療法の開発を目的としている。

Gastrointestinal tract is a unique organ which is constitutively exposed by various antigens including dietary materials and commensal bacteria and fungi. In order to exclude pathogens and create symbiotic environment to non-pathogenic microorganisms, intestinal epithelial cells (ECs) and immune cells contribute to establish homeostasis of intestinal microenvironment. Disruption of symbiotic relationship between host and commensals predispose to the development of inflammatory bowel diseases and systemic disorders such as obesity and diabetes. Therefore, it is important to understand the mechanism of symbiotic and homeostatic condition regulated by intestinal ECs and immune cells. In this project, we aim to uncover the symbiotic system with commensal micro- and mycobiota mediated by epithelial $\alpha 1, 2$ -fucose. We further investigate the role of commensal microbes in the establishment of intestinal homeostasis and develop novel therapeutic approaches for the treatment of diseases such as infection and metabolic syndrome caused by the disruption of intestinal homeostasis.

准 教 授	後藤 義幸	Associate Professor	Yoshiyuki Goto
大 学 院 生	畢 蓓蓓	Graduate Student	Bei Bei Bi
大 学 院 生	川島 秀介	Graduate Student	Shusuke Kawashima
大 学 院 生	白 旭	Graduate Student	Akira Haku
大 学 院 生	寺山 千晶	Graduate Student	Chiaki Terayama
技 術 補 佐 員	藤本 恭子	Research Promotion Technician	Kyoko Fujimoto

1. Innate and acquired immune system regulates intestinal epithelial $\alpha 1, 2$ -fucosylation

Yoshiyuki Goto^{1,2,3}, and Hiroshi Kiyono^{3,4}

¹ Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis, Division of Molecular Immunology, Medical

Mycology Research Center, Chiba University

² Division of Mucosal symbiosis

³ International Research and Development Center for Mucosal Vaccine, Institute for Medical Science, The University of Tokyo

⁴ Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical

Science, The University of Tokyo

α 1, 2-fucosyl linkages located to terminal carbohydrate moiety expressed on intestinal epithelial cells is catalyzed by fucosyltransferase 2 (Fut2). Epithelial α 1, 2-fucose is one of symbiotic factors which mediate host-microbiota interaction. For example, epithelial α 1, 2-fucose is utilized as a dietary carbohydrate by various symbiotic bacteria such as Bacteroides. Therefore, disruption of Fut2 leads to dysbiosis both in mice and human and predisposed to the development of inflammatory diseases such as Crohn's disease. Despite of the importance for intestinal and systemic homeostasis, the molecular and cellular mechanisms of the induction of epithelial Fut2 and subsequent α 1, 2-fucosylation remain unknown. We found that group 3 innate lymphoid cells (ILC3) are critical inducers of intestinal epithelial Fut2 expression and fucosylation that is mediated by the production of interleukin 22 and lymphotoxin from ILC3 in a commensal bacteria-dependent and -independent manner, respectively. In addition, IL-10-producing CD4⁺ T cells negatively regulate intestinal epithelial α 1, 2-fucosylation. These data unveil a novel function of innate and acquired immune cells in creating the appropriate symbiotic environment through regulating the epithelial α 1, 2-fucosylation.

2. Commensal bacteria and host immune system regulate fungi colonization in the gut

Haku Akira¹, Bei bei Bi¹, Chiaki Terayama¹, Yoshiyuki Goto^{1,2}

¹ Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis, Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University

² Division of Mucosal symbiosis, International Research and Development Center for Mucosal Vaccine, Institute for Medical Science, The University of Tokyo.

Tremendous numbers of microorganisms colonize in the gut of their host. Several specific fungi including *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* have been reported to reside in the human gut. Although commensal bacteria are known to

modulate gut homeostasis and dysbiosis triggers various kinds of host diseases including infection and inflammatory bowel diseases, it is unclear how these commensal fungi colonize and affect host physiology. In addition, *C. albicans* are also known to exert pathogenic effects in the immunocompromised host and expand to the systemic compartments, which is called invasive candidiasis, one of the serious infectious diseases in the world. Importantly, colonization of *C. albicans* in the gut trigger invasive candidiasis. Therefore, it is important to identify how *C. albicans* colonize in the gut. In this study, we aim to uncover the mechanism by which commensal fungi colonize in the gut and affect the development of host diseases. We examine the role of commensal bacteria and gut immune system in the regulation of fungi colonization and develop novel therapeutic approaches for the treatment of host diseases.

Publications

- 1) Ichikawa, T., Hirahara, K., Kokubo, K., Kiuchi, M., Aoki, A., Morimoto, Y., Kumagai, J., Onodera, A., Mato, N., Tumes, D, Goto, Y., Hagiwara, K., Inagaki, Y., Sparwasser, T., Tobe, K., Nakayama, T. (2019). CD103hi Treg cells constrain lung fibrosis induced by CD103low tissue-resident pathogenic CD4 T cells. *Nat Immunol.* 20, 1469-1480.
- 2) Fujimoto, K., Kawaguchi, Y., Shimohigoshi, M, Gotoh, Y., Nakano, Y., Usui, Y., Hayashi, T., Kimura, Y., Uematsu, M., Yamamoto, T., Akeda, Y., Rhee, JH., Yuki, Y., Ishii, KJ., Crowe, SE., Ernst, PB., Kiyono, H., Uematsu, S. (2019). Antigen-specific Mucosal Immunity Regulates Development of Intestinal Bacteria-mediated Diseases. *Gastroenterology.* 157, 1530-1543. e4.
- 3) Goto, Y. (2019). Epithelial Cells as a Transmitter of Signals From Commensal Bacteria and Host Immune Cells. *Front Immunol.* 10, 2057.
- 4) Saku, A., Hirose, K., Ito, T., Iwata, A., Sato, T., Kaji, H., Tamachi, T., Suto, A, Goto, Y., Domino, SE., Narimatsu, H., Kiyono, H., Nakajima, H. (2019). Fucosyltransferase 2 induces lung epithelial fucosylation and exacerbates house dust mite-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 144,

698-709. e9.

- 5) Matsuo, K., Haku, A., Bi, B., Takahashi, H., Kamada, N., Yaguchi, T., Saijo, S., Yoneyama, M.,

Goto, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol Immunol.* 63, 155-163.

知花 P I (カンジダ・グラブラータフェノーム) プロジェクト

Candida glabrata Phenome Project

研究概要 (Summary)

病原性酵母カンジダ・グラブラータの全遺伝子改変株を利用し、抗真菌薬の開発ならびに病原性に関する遺伝子の特定と機能解析を進めている。

Using the systematically constructed full genome mutant library in pathogenic yeast *Candida glabrata*, we are performing development of anti-fungal drugs, gene identification and functional analyses involved in pathogenicity.

准 教 授	知花 博治	Associate Professor	Hiroji Chibana
技 術 職 員	高橋 梓	Research Technician	Azusa Takahashi
特 別 研 究 員	佐藤美智代	JSPS Research Fellow	Michiyo Sato
グランドフェロー	山口 正視	Grand Fellow	Masashi Yamaguchi
技 術 補 佐 員	笹本 要	Research Promotion Technician	Kaname Sasamoto
技 術 補 佐 員	大岩 真理	Research Promotion Technician	Mari Ohiwa
技 術 補 佐 員	中野 恵子	Research Promotion Technician	Keiko Nakano
技 術 補 佐 員	津田 一恵	Research Promotion Technician	Kazue Tsuda

Role of major facilitator superfamily transporter Qdr2p in biofilm formation by *Candida glabrata*

Widiasih Widiyanto T¹, Chen X¹, Iwatani S¹, Chibana H², Kajiwara S¹.

¹ School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan.

² Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Chiba, Japan.

Candida glabrata represents the second-most frequent cause of candidiasis infections of the mucosa, bloodstream and genito-urinary tract in immunocompromised individuals. The incidence of *C. glabrata* infection has increased significantly in the last two decades, mainly due to this species' abilities to resist various antifungal drugs and to form biofilms. We focused on the relationship between biofilm formation and the product of QDR2, a *C. glabrata* member of the major facilitator superfamily (MFS) gene family, given that fungal

biofilm formation limits drug penetration and is associated with persistent infection. The fungal cells in biofilms were compared between a *C. glabrata* Δ qdr2 mutant and its wild-type strain. Cells were analysed for metabolism activity and drug susceptibility (using tetrazolium assay), adhesion activity, growth assay and intracellular pH (using flow cytometry). Compared to the wild type, the *C. glabrata* Δ qdr2 showed lower adhesion activity and higher fluconazole susceptibility when assessed as a biofilm. The mutant also showed decreased metabolic activity during biofilm formation. Furthermore, the mutant grew more slowly under neutral-basic pH conditions. The qdr2 deletion in *C. glabrata* resulted in an impaired ability to maintain pH homeostasis, which led in turn to a reduction of cell growth and of adherence to an artificial matrix. These results suggested that the Qdr2p function is needed for proper biofilm formation and biofilm maintenance in *C. glabrata* as well as biofilm drug resistance towards fluconazole. Qdr2p may play an important role in *C. glabrata*'s ability to form biofilms on implanted medical devices in human bodies.

Publications

- 1) Onami, JI., Kobayashi, N., Watanabe, M., Yamada, O., Mizutani, O., Yokoyama, K., Haruo, T., Chibana, H., Kamata, Y. (2019). An updated data portal for fungal allergens with curated information. *Bioinformatics*. 11; 15(11), 820-823.
- 2) Shiratori, R., Furuichi, K., Yamaguchi, M., Miyazaki, N., Aoki, H., Chibana, H., Ito, K., Aoki, S. (2019). Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Sci Rep*. 10; 9(1), 18699.
- 3) Huang, Y., Fujii, K., Chen, X., Iwatani, S., Chibana, H., Kojima, S., Kajiwara, S. (2019). Fungal NOX is an essential factor for induction of TG2 in human hepatocytes. *Med Mycol*. pii: myz105. doi: 10.1093/mmy/myz105.
- 4) Widiasih Widiyanto, T., Chen, X., Iwatani, S., Chibana, H., Kajiwara, S. (2019). Role of major facilitator superfamily transporter Qdr2p in biofilm formation by *Candida glabrata*. *Mycoses*. 62(12), 1154-1163.
- 5) Ikezaki, S., Cho, T., Nagao, JI., Tasaki, S., Yamaguchi, M., Arita-Morioka, KI., Yasumatsu, K., Chibana, H., Ikebe, T., Tanaka, Y. (2019). Mild Heat Stress Affects on the Cell Wall Structure in *Candida albicans* Biofilm. *Med Mycol J*. 60(2), 29-37.
- 6) Horinouchi, Y., Yamaguchi, M., Chibana, H., Togashi, T. (2019). Nuclear behavior and roles indicate that Codiolum phase is a sporophyte in *Monostroma angicava* (Ulotrichales, Ulvophyceae). *J Phycol*. 55, 534-542.

亀井 P I 臨床感染症プロジェクト

Project of Clinical Investigation

研究概要 (Summary)

我が国における「真菌症リファレンスセンター」(輸入真菌症を含む)として、一般施設では実施困難な菌種同定、遺伝子検査など特殊検査を毎年400-500件あまり受け入れており、並行して全国から寄せられる真菌症の診断・治療のコンサルテーションにも対応している。本年はさらに日本感染症学会及び日本臨床微生物学会から先進的感染症検査が実施可能な施設として「先進的感染症検査施設」に認定された。また附属病院に設置した真菌症専門外来も、全国から患者が来院するなど、活発な臨床活動を行っている。研究面では国内のさまざまな研究機関、医療施設と協力した臨床・基礎研究を行っており、アスペルギルス症に代表される難治性真菌症の感染機構や診断・治療法の開発研究を進めているが、その中でもアスペルギルス耐性株の疫学と耐性機構の研究などにも力を入れ、多くの画期的な論文を発表するなど高い成果を挙げている。また、2016年から開始したブラジル・カンピーナス大学感染症内科とのSATREPS(地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム)に代表されるように、国際連携による共同研究も盛んに行っている。

We have been doing basic and clinical research primarily on fungal infections along with seeing patients in the Specialty Clinic for Fungal Infections at the University Hospital. Working as the Reference Center for fungal infections, we were designate as an Advanced Progressive Laboratory by JSID and JSCM, taking consulting services on fungal diseases from all over the country(ca. 400-500 cases/year). With regard to research activities, we are investigating the mechanisms of infection of intractable fungal diseases and the development of their diagnostic and therapeutic methods in collaboration with various universities/pharmaceutical companies. The epidemiology and mechanisms of antifungal resistance also hold a prominent part of our research, and a collaborative study with Sao Paulo State University of Campinas, Brazil (SATREPS), which has started in 2016, has made this topic as its main target.

教授	亀井 克彦	Professor	Katsuhiko Kamei
准教授	渡辺 哲	Associate Professor	Akira Watanabe
特任助教	村長 保憲	Research Assistant Professor	Yasunori Muraosa
特任助教	新居 鉄平	Research Assistant Professor	Teppey Arai
特任助教	ハジム O. A カリファ	Research Assistant Professor	Hazim O. Abdelgalil Kahlifa (2019.7~)
研究員	東江 昭夫	Researcher	Akio Toh-e
外国人研究者	賀 丹	Foreign Researcher	Dan He (~ 2019.10)
グランドフェロー	田口 英昭	Grand Fellow	Hideaki Taguchi
再雇用職員	鎗田 響子	Research Technician	Kyoko Yarita
技術補佐員	八尋 真希	Research Promotion Technician	Maki Yahiro (~ 2019.11)
技術補佐員	関 里亜	Research Promotion Technician	Rio Seki
技術補佐員	土屋由紀子	Research Promotion Technician	Yukiko Tsuchiya
技術補佐員	井上 京子	Research Promotion Technician	Kyoko Inoue

1. **Characterisation of novel-cell-wall LysM-domain proteins LdpA and LdpB from the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*.**

Yasunori Muraosa, Takahito Toyotome, Maki Yahiro and Katsuhiko Kamei

Aspergillus fumigatus, a filamentous fungus that is ubiquitous in the environment, causes several human pulmonary disorders, including chronic and acute invasive infections and allergic diseases. Lysin motif (LysM) is a small protein domain that binds chitin, a major component of fungal cell wall polysaccharides. Several secreted LysM-domain proteins without catalytic function (LysM effectors) have been identified. They act as virulence factors in plant pathogenic fungi by preventing the immune response induced by chitin; however, LysM proteins in mammalian pathogenic fungi remain largely unexplored. We describe two novel LysM-domain proteins, LdpA and LdpB, in *A. fumigatus*. Functional analyses of single and double knockouts revealed no significant effects on cell wall chitin content, cell wall integrity, fungal morphology and fungal growth. Fluorescent signals from LdpA-green fluorescent protein (GFP) and LdpB-GFP were observed in cell wall and extracellular matrix. In a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis, survival did not differ between Δ ldpA/B and wild-type infection; however, further studies are required to reveal their functions in fungal-host interactions.

2. ***Schizophyllum commune* induces IL-17-mediated neutrophilic airway inflammation in OVA-induced asthma model mice.**

Jun Hanashiro, Yasunori Muraosa, Takahito Toyotome, Koichi Hirose, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

Schizophyllum commune is a ubiquitous basidiomycetous fungus typically found across the world, which has been detected in indoor and outdoor air. Some studies indicated that sensitization to *S. commune* is correlated with asthma severity in patients. Patients with chronic severe or acute fatal asthma have neutrophil-dominant airway inflammation. We

hypothesized that *S. commune* can exacerbate asthma. To test this hypothesis, we evaluated the direct immunomodulatory activities of *S. commune* in allergic airway inflammation induced by non-fungal sensitization. Ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice were generated using wild-type (WT) and Il-17a^{-/-}-Il-17f^{-/-} mice that were intratracheally exposed to *S. commune*, then immune responses in the lungs were assessed after 24 h. Intratracheal administration of *S. commune* in OVA-induced asthma model mice enhanced neutrophilic airway inflammation, increased the mRNA expression of CXCL1 and CXCL2 in the lungs, and provoked IL-17A, and IL-17F production in BAL fluid. In addition, neutrophilic airway inflammation was significantly inhibited in Il-17a^{-/-}-Il-17f^{-/-} mice compared with those found in WT mice. We demonstrated that *S. commune* induces neutrophilic airway inflammation in OVA-induced asthma model mice, and IL-17A and IL-17F had central roles in this activity. As *S. commune* inhabits the general environment, including indoor and outdoor air, our results suggested that *S. commune* is a causative agent of asthma exacerbation. This study has provided clues regarding the mechanisms behind fungi and asthma exacerbation.

3. **A simple method to detect point mutations in *Aspergillus fumigatus* cyp51A gene using a Surveyor Nuclease assay.**

Tepei Arai, Hidetaka Majima, Akira Watanabe and Katsuhiko Kamei

One of the main mechanisms of azole-resistance of *Aspergillus fumigatus* is thought to be a reduction in the drug affinity to the drug target molecule Cyp51A due to its amino acid mutation(s). It is known that the azole-resistance pattern is closely related to the mutation site(s) of the molecule. In this study, we tried to develop a simple and rapid detection method for *cyp51A* mutation(s) using the endonuclease Surveyor Nuclease. Surveyor Nuclease assay was verified using several azole-resistant strains of *A. fumigatus* that possesses point mutations in Cyp51A. For validation of Surveyor Nuclease assay, blind tests were conducted using 48 strains of *A. fumigatus* (17 azole-resistant and 31 azole-

susceptible strains). Surveyor Nuclease assay could rapidly detect *cyp51A* mutations with one primer set. Also, all the tested strains harboring different *cyp51A* single point mutations could be clearly distinguished from wild type. Surveyor Nuclease assay is a simple method that can detect *cyp51A* mutations rapidly.

4. The genetic basis of *C. glabrata* resistance to azole and echinocandins antifungal agents.

Hazim O. Abdelgalil Kahlifa, Teppei Arai, Yasunori Muraosa, Akira Watanabe and Katsuhiko Kamei

The genetic basis of azole and echinocandins resistance in clinical *C. glabrata* isolates in Japan was investigated along with the genetic relationship between the isolates by multilocus sequence typing (MLST). The isolates were checked phenotypically for resistance to different classes of antifungal agents, and genotypically to detect the mutations in *PDR1*, *ERG11*, and hot spot 1 (HS1), hot spot 2 (HS2), and hot spot 3 (HS3), of *FKS1*, and HS1 and HS2 of *FKS2*. Through the analysis the phenotypic/genotypic patterns of antifungal resistance was clearly demonstrated, and MLSTT genotyping revealed 13 different sequence types (ST), with three new STs. This result is expected to clarify the molecular mechanisms underlying fungal resistance leading to new strategies to prevent their epidemic spread.

Publications

- 1) Abe, N., Fujita, Y., Nagaoka, K., Ohkusu, M., Yasuda, S., Kamei, K., Tatsumi, K. (2019). Disseminated cryptococcosis with bronchiolitis and cellulitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 199(2), 235-236.
- 2) Toyotome, T., Hamada, S., Yamaguchi, S., Takahashi, H., Kondoh, D., Takino, M., Kanesaki, Y., Kamei, K. (2019). Comparative genome analysis of *Aspergillus flavus* clinically isolated in Japan. *DNA Res.* 26(1), 95-103.
- 3) Ozawa, K., Mochizuki, K., Takagi, D., Ishida, K., Sunada, A., Ohkusu, K., Kamei, K., Hashimoto, A., Tanaka, K. (2019). Identification and antifungal sensitivity of two new species of *Diaporthe* isolated. *J Infect Chemother.* 25(2), 96-103.
- 4) Yagi, K., Ushikubo, M., Maeshima, A., Konishi, M., Fujimoto, K., Tsukamoto, M., Araki, K., Kamei, K., Oyamada, Y., Oshima, H. (2019). Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus lentulus* in an adult patient: A case report and literature review. *J Infect Chemother.* 25(7), 547-551.
- 5) Muraosa, Y., Toyotome, T., Yahiro, M., Kamei, K. (2019). Characterisation of novel-cell-wall LysM-domain proteins LdpA and LdpB from the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep.* 9(1), 3345.
- 6) Kobayashi, K., Asakura, T., Kawada, I., Hasegawa, H., Chubachi, S., Ohara, K., Kuramoto, J., Sugiura, H., Fujishima, S., Iwata, S., Umeyama, T., Katano, H., Uwamino, Y., Miyazaki, Y., Kamei, K., Hasegawa, N., Betsuyaku, T. (2019). Disseminated histoplasmosis from a calcified lung nodule after long-term corticosteroid therapy in an elderly Japanese patient: A case report. *Medicine (Baltimore).* 98(17), e15264.
- 7) Fujita, Y., Ishiwada, N., Takei, H., Suwabe, SI., Yarita, K., Ohkusu, M., Muraosa, Y., Kamei, K., Shimojo, N. (2019). Usefulness of gastric aspirate culture for diagnosing congenital immunodeficiency in an infant with fungal pneumonia caused by *Rasamsonia piperina*. *Tohoku J Exp Med.* 247(4), 265-269.
- 8) Takeda, K., Suzuki, J., Watanabe, A., Matsuki, M., Higa, K., Inoue, E., Akashi, S., Shimada, M., Kawashima, M., Ohshima, N., Fukami, T., Masuda, K., Yamane, A., Tamura, A., Nagai, H., Matsui, H., Tohma, S., Kamei, K. (2019). Species identification, antifungal susceptibility, and clinical feature association of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from the lower respiratory tract. *Med Mycol.* 2019 Jun 26. pii: myz072. doi: 10. 1093/mmy/myz072. [Epub ahead of print]
- 9) Hashimoto, S., Tanaka, E., Ueyama, M., Terada, S., Inao, T., Kaji, Y., Yasuda, T., Hajiro, T., Nakagawa, T., Noma, S., Honjo, G., Kobashi, Y., Abe, N., Kamei, K., Taguchi, Y. (2019). A case report of pulmonary *Botrytis* sp. infection in an apparently healthy individual. *BMC Infect Dis.* 19(1), 684.

- 10) Ito, A., Ishiguro, T., Takaku, Y., Kagiya, N., Kamei, K., Takayanagi, N. (2019). Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Schizophyllum commune*: A special interest in positive culture of other basidiomycetes fungi. Intern Med. 58(24), 3569-3572.
- 11) Suda, K., Yamashita, T., Kawase, Y., Yarita, K., Yoshizaki, A., Akamata, K., Asano, Y., Kamei, K., Sato, S. (2019). Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Alternaria alternata* in an immunosuppressed patient. J Dermatol. 46(12), e448-e449.
- 12) Tonoi, T., Inohana, T., Sato, T., Noda, Y., Ikeda, M., Akutsu, M., Murata, T., Maekawa, Y., Tanaka, A., Seki, R., Ohkusu, M., Kamei, K., Ishiwada, N., Shiina, I. (2019). Total synthesis and antimicrobial evaluation of 23-demethyleushearilide and extensive antimicrobial evaluation of all synthetic stereoisomers of (16Z, 20E)-eushearilide and (16E, 20E)-eushearilide. Molecules. 24(19): pii: E3437.
- 13) Ishizaki, S., Watanabe, S., Sawada, M., Ninomiya, J., Otani, T., Tanaka, M., Harada, T., Kamei, K. (2019). A case of tinea pedis in a child caused by *Trichophyton interdigitale* with two different colony phenotypes on primary culture. Med Mycol J. 60(4), 91-95.
- 14) Hanashiro, J., Muraosa, Y., Toyotome, T., Hirose, K., Watanabe, A., Kamei, K. (2019). *Schizophyllum commune* induces IL-17-mediated neutrophilic airway inflammation in OVA-induced asthma model mice. Sci Rep. 9(1), 19321.

山本（感染宿主応答ネットワーク）プロジェクト

Project for Host Response Network of Bacterial Infection

研究概要 (Summary)

本プロジェクトでは、細菌感染と発症のメカニズムを分子レベルで解明し、研究成果を感染症の予防と治療へ役立てることを目指している。感染現象は、2つの異なる生物（病原体と宿主）の間に形成される新たな生命現象である。細菌感染のメカニズムを分子レベルで解き明かすことにより、細菌と生体の間に展開される複雑系の生命現象を解き明かすことを合わせて目指している。

「主要な研究テーマ」

- (I) サルモネラ属細菌をモデルとした、食細胞内寄生性を有する病原細菌の全身感染症発症機序並びに持続感染機構の解明
- (II) AAA⁺プロテアーゼ ClpXP の研究成果に基づいた慢性感染症治療薬となる anti-persister の探索研究

Research Focus

- (I) **Dissecting the molecular mechanisms of systemic infection and persistent infection by facultative intracellular bacteria through the study of *Salmonella*-host interplay: We focus on the *Salmonella* effectors, which we have identified through a meta-analytic approach to the accurate prediction of effectors, to elucidate the dynamic interplay with their host targets and bacterial strategies for withstanding the host innate- and acquired-immune systems.**
 - (II) **Identification and development of anti-persister compounds as a new class of antibiotics to treat chronic infection: Our previous studies on the AAA⁺ protease, ClpXP allowed us to hypothesize that the dysregulation of proteolysis by activation of ClpP core in the absence of the regulatory ClpX ATPase may lead to corruption of bacterial physiology and eventually death of dormant cells. The compounds leading such uncontrolled proteolysis could be potential as a new class of antibiotics to treat chronic infection.**
-

特任教授 山本 友子
技術補佐員 野村祐理子

Professor
Research Promotion Technician

Tomoko Yamamoto
Yuriko Nomura

1. Humoral Immunity vs. *Salmonella*

Akiko Takaya¹, Tomoko Yamamoto² and Koji Tokoyoda³

¹ Laboratory of Microbiology and Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

² Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

³ Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) Berlin, Germany

In primary infection with *Salmonella*, it has been reported —without consideration of *Salmonella*'s functions— that humoral immunity plays no role in the clearance of bacteria. In fact, *Salmonella* targets and suppresses several aspects of humoral immunity, including B cell lymphopoiesis, B cell activation, and IgG production. In particular, the suppression of IgG-secreting plasma cell maintenance allows the persistence of *Salmonella* in tissues. Therefore, the critical role(s) of humoral immunity in the response to *Salmonella* infection, especially at the late phase, should be re-investigated. The suppression of IgG plasma cell memory

strongly hinders vaccine development against non-typhoidal *Salmonella* (NTS) because *Salmonella* can also reduce humoral immune memory against other bacteria and viruses, obtained from previous vaccination or infection. We propose a new vaccine against *Salmonella* that would not impair humoral immunity, and which could also be used as a treatment for antibody-dependent autoimmune diseases to deplete pathogenic long-lived plasma cells, by utilizing the *Salmonella*'s own suppression mechanism of humoral immunity.

2. Secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2

Tomoko Yamamoto¹, Yuriko Nomura¹ and Akiko Takaya²

¹ Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

² Laboratory of Microbiology and Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

The bacterial type III secretion system (T3SS) delivers virulence proteins, called effectors, into eukaryotic cells. T3SS comprises a transmembrane secretion apparatus and a complex network of specialized chaperones that target protein substrates to this secretion apparatus. However, the regulation of secretion switching from early (needle and inner rod) to middle (tip/filament and translocators) substrates is incompletely understood. Here, we investigated chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the T3SS encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2), essential for systemic infection. Our findings revealed that the protein encoded by *ssaH* regulates the secretion of an inner rod and early substrate, SsaI. Structural modeling revealed that SsaH is structurally similar to class III chaperones, known to associate with proteins in various pathogenic bacteria. The SPI2 protein SsaE was identified as a class V chaperone homolog and partner of SsaH. A pulldown analysis disclosed that SsaH and SsaE form a heterodimer, which interacted with another early substrate, the needle protein SsaG. Moreover, SsaE also helped

stabilize SsaH and a middle substrate, SseB. We also found that SsaE regulates cellular SsaH levels to translocate the early substrates SsaG and SsaI and then promotes the translocation of SseB by stabilizing it. In summary, our results indicate that the class III chaperone SsaH facilitates SsaI secretion, and a heterodimer of SsaH and the type V chaperone SsaE then switches secretion to SsaG. This is the first report of a chaperone system that regulates both early and middle substrates during substrate switching for T3SS assembly.

3. *Salmonella* infection prevents an efficient humoral immune response by interfering with IgG⁺ plasma cell persistence in the bone marrow

Akiko Takaya¹ Tomoko Yamamoto² and Koji Tokoyoda³

¹ Laboratory of Microbiology and Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

² Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

³ Deutsches Rheuma-Forschungszentrum (DRFZ) Berlin, Germany

Serum IgG, which is mainly generated from IgG-secreting plasma cells in the bone marrow (BM), protects our body against various pathogens. We show here that the protein SiiE of *Salmonella* is both required and sufficient to prevent an efficient humoral immune response against the pathogen by selectively reducing the number of IgG-secreting plasma cells in the BM. Attenuated SiiE-deficient *Salmonella* induces high and lasting titers of specific and protective *Salmonella*-specific IgG, and qualifies as a novel efficient vaccine against *Salmonella*. A SiiE-derived peptide with homology to laminin β 1 is sufficient to ablate IgG-secreting plasma cells from the BM, identifying laminin β 1 as a novel component of niches for IgG-secreting plasma cells in the BM, and furthermore, qualifies it as a unique therapeutic option to selectively ablate IgG-secreting plasma cells in autoimmune diseases and multiple myeloma.

4. Identification and development of anti-persister compounds as a new class of antibiotics

Tomoko Yamamoto¹, Akiko Takaya², Yuriko Nomura¹, and Walid Houry³

¹ Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

² Laboratory of Microbiology and Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

³ Department of Biochemistry, University of Toronto, Canada

Chronic infections are difficult to treat with antibiotics, which kill bacteria by corrupting their targets but these are inactive in dormant persisters, leading to tolerance. We reasoned that a compound capable of corrupting a target in dormant, energy-deprived cells could kill persisters. Our previous studies on the energy-dependent ClpXP-protease allowed us to hypothesize that the dysregulation of proteolysis by activation of ClpP core in the absence of the regulatory ClpX ATPase may lead to corruption of bacterial physiology and eventually death of dormant cells. The compounds leading such uncontrolled proteolysis could be potential as a new class of antibiotics to treat chronic infection. To identify

those compounds, we established a system for evaluating ClpP proteolysis *in vitro*. Then, we have been conducting a high-through-put screening by exploiting various chemical libraries. Very recently, we have found that one of such compounds, ACPb1 (ACP: Activators of Self-Compartmentalizing Protease) originally showing no antimicrobial activity can kill a variety of bacteria under certain condition.

Publications

- 1) Männe, C., Takaya, A., Yamasaki, Y., Mursell, M., Hojyo, S., Wu, TY., Sarkander, J., McGrath, MA., Cornelis, R., Hahne, S., Cheng, Q., Kawamoto, T., Hiepe, F., Kaufmann, SHE., Yamamoto, T., Radbruch, A., Tokoyoda, K. (2019). *Salmonella* SiiE prevents an efficient humoral immune memory by interfering with IgG⁺ plasma cell persistence in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 116(15), 7425-7430.
- 2) Takaya, A., Takeda, H., Tashiro, S., Kawashima, H., Yamamoto, T. (2019). Chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Biol Chem*. 294(10), 3783-3793.

石和田（感染症制御）プロジェクト

Project for Infection Control and Prevention

研究概要 (Summary)

インフルエンザ菌, 肺炎球菌, B群レンサ球菌 (GBS) の病原性解析ならびにインフルエンザ菌感染症と肺炎球菌感染症, GBS 感染症の疫学研究を継続的に行っている. 結合型ワクチン導入後, 新しく問題となっているワクチン非含有株の病原因子の解析を行い, 新たな予防法の開発を目指す. また, 難治性呼吸器感染症の診断, 治療法開発のための臨床研究を実施している. 同時に, 附属病院における診療活動及び学内外でのコンサルテーションも行っている. さらに, ワクチンのリスク教育に関する研究にも取り組んでいる.

Our research focuses on epidemiology and pathogenesis of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae*. We organize several clinical researches for development of diagnostic and therapeutic methods of intractable respiratory infectious diseases collaborating with clinicians and care for the patients in Chiba University Hospital. We also recently conduct the research on risk education for vaccination.

准 教 授	石和田稔彦	Associate Professor	Naruhiko Ishiwada
特 任 助 教	竹内 典子	Assistant Professor	Noriko Takeuchi
技 術 職 員	大楠美佐子	Research Technician	Misako Ohkusu
非常勤技術職員	大畑美穂子	Adjunct Research Technician	Mihoko Ohhata

1. Two pediatric cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia diagnosed by polymerase chain reaction of gastric lavage.

Takei H¹, Ishiwada N², Hishiki H¹, Takeshita K¹, Naito S¹, Endo M¹, Shimojo N¹

¹ Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine

² Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University

Detecting *Pneumocystis jirovecii* by bronchoalveolar lavage or lung biopsy is the gold standard for diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia (PJP); however, these techniques are not always applicable in children because of their high invasiveness. We report two pediatric cases of PJP diagnosed by polymerase chain reaction (PCR) of gastric lavage that were successfully

treated. To date, there are no reported cases of using PCR of gastric lavage to diagnose PJP. On the day of PJP onset, both the infants required respiratory support and infiltrative shadows were observed in both lung fields on chest radiography. Furthermore, their (1→3)-β-D glucan levels were elevated. *P. jirovecii* was detected by PCR of gastric lavage and trimethoprim-sulfamethoxazole was administered for 3 weeks, following which their condition improved. They were long-term steroid users, but without any prophylaxis. PCR of gastric lavage in cases of suspected PJP may help in confirming the diagnosis in children who have mild to moderate airway symptoms, or have difficulty with invasive examination like bronchoscopy.

2. Usefulness of gastric aspirate culture for diagnosing congenital immunodeficiency in an infant with fungal pneumonia caused by *Rasamsonia piperina*.

Fujita Y^{1,2}, Ishiwada N³, Takei H¹, Suwabe S², Yarita K³, Ohkusu M³, Muraosa Y³, Kamei K³, Shimojo N¹.

¹ Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine.

² Department of Pediatrics, Kimitsu Chuo Hospital.

³ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University.

Chronic granulomatous disease (CGD) is a type of primary immunodeficiency disease, which increases susceptibility to recurrent bacterial and fungal infections. Sputum and bronchoalveolar lavage fluid are often obtained using bronchoscopy from adult patients for pathogenic diagnosis, although this approach is much more invasive for infants. We report the case of a 2-month-old boy with CGD, in which gastric aspirate culture was used to diagnose fungal pneumonia. *Rasamsonia piperina* was isolated from the gastric aspirate, and the patient was successfully treated with micafungin based on the drug susceptibility test results for the fungal isolate. The acid tolerance test revealed that *R. piperina* could grow at pH 2, indicating high acid resistance. Although we can only report our experience with a single case, gastric aspirate culture may be a useful tool for detecting fungal respiratory pathogens in children with primary immunodeficiency. Detecting these pathogens may help improve outcomes, as early diagnosis and appropriate treatment are extremely important for immunocompromised patients with respiratory infections.

3. Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan

Takeuchi N¹, Ohkusu M¹, Wada N², Kurosawa S³, Miyabe A⁴, Yamaguchi M⁵, Nahm MH⁶, Ishiwada N¹

¹ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology

Research Center, Chiba University

² Wada Pediatric Clinic.

³ Kurosawa Children's and Internal Medicine Clinic

⁴ Division of Laboratory Medicine and Clinical Genetics, Chiba University Hospital

⁵ Medical Mycology Research Center, Chiba University

⁶ Division of Pulmonary, Allergy & Critical Care Medicine, Department of Medicine, The University of Alabama at Birmingham

The prevalence of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* (NESp) has increased with the introduction of pneumococcal conjugate vaccines in children; however, the bacteriological characteristics of NESp have not been sufficiently clarified. In this study, NESp strains isolated from the nasopharyngeal carriage of children from four nursery schools in Japan were analyzed for molecular type, antibiotic susceptibility, and biofilm productivity. A total of 152 putative *S. pneumoniae* strains were identified by optochin-susceptibility analysis, of which 21 were not serotypeable by slide agglutination, quellung reaction, or multiplex PCR. Among these 21 strains, three were *lytA*-negative and, therefore, not *S. pneumoniae*. The remaining 18 strains were positive for *lytA*, *ply*, *pspK*, and bile solubility and were confirmed as NESp. Therefore, the isolation rate of NESp in the *S. pneumoniae* strains in this study was 12.0% (18/149). Molecular-typing analyses classified five strains as two existing sequence types (STs; ST7502 and ST7786), and 13 strains formed four novel STs. Horizontal spread was suspected, because strains with the same ST were often isolated from the same nursery school. The NESp isolates were generally susceptible to most antimicrobials, with the exception of macrolides; however, all isolates possessed more than one abnormal penicillin-binding protein gene. Furthermore, NESp strains were more effective than encapsulated counterparts at forming biofilms, which showed obvious differences in morphology. These data indicated that NESp strains should be continuously monitored as emerging respiratory pathogens.

4. Clonal spread of serotype 12F ST4846 *Streptococcus pneumoniae*

Ohkusu M¹, Takeuchi N¹, Ishiwada N¹, Ohkusu K²

¹ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center Chiba University

² Department of Microbiology, Tokyo Medical University

Introduction. In 2016-2017, there was an increase in the number of paediatric invasive pneumococcal disease (IPD) cases caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F in Chiba Prefecture, Japan. Serotype 12F is one of the major causative serotypes of IPD following the introduction of pneumococcal conjugate vaccine 13 (PCV13), and outbreaks of IPD caused by serotype 12F have recently been reported in several countries.

Aim. Our goal here was to clarify the relationship among local outbreak strains and the outbreak strains in other countries, and for this we analysed clinical isolates of serotype 12F using several genetic identification methods.

Methodology. All reported IPD cases caused by serotype 12F were reviewed and bacterial strains were collected and analysed. We also analysed *S. pneumoniae* serotype 12F strains isolated from other time periods, geographical areas, cases of adult IPD and respiratory specimens as control strains. Multi-locus sequence typing, PFGE and multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) were conducted on all isolates.

Results. All 26 *S. pneumoniae* serotype 12F isolates, including control strains, belonged to a single sequence type (ST4846) that was the specific ST in Japan. All tested strains demonstrated five MLVA patterns and two PFGE patterns.

Conclusion. We determined that the 2016-2017 outbreak of IPD in Chiba Prefecture was caused by clonally related isolates of serotype 12F. The continuous monitoring of IPD caused by serotype 12F is important for evaluating the impact of re-emerging pneumococcal serotypes following the PCV13 introduction era, and MLVA could be a useful tool for identification of outbreak strains.

5. Identification of *Haemophilus influenzae* serotype e strains missing the *fucK* gene in clinical isolates from Japan.

Hoshino T¹, Takeuchi N², Ohkusu M², Hachisu Y³, Hirose S^{1,4}, Fukasawa C¹, Kubota T⁵, Ishida M⁶, Watanabe H⁷, Oishi K⁸, Ishiwada N²

¹ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital

² Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University

³ Chiba Prefectural Institute of Public Health

⁴ Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical University Yachiyo Medical Center

⁵ Department of Hematology and Respiratory Medicine, Kochi Medical School, Kochi University

⁶ Department of Infectious Diseases, Chikamori Hospital

⁷ Department of Infectious Control and Prevention, Kurume University School of Medicine

⁸ Toyama Institute of Health

Abstract

Introduction. Certain nontypeable *Haemophilus influenzae* cannot be assigned a sequence type (ST) by Multilocus Sequence Typing (MLST) due to the lack of the *fucK* gene, one of seven MLST loci in *H. influenzae*, which encodes a fucose-operon enzyme.

Aims. To confirm whether the loss of *fucK* is also found in the encapsulated strains, we analysed clinical isolates of *H. influenzae* serotype e (Hie).

Methodology. We conducted MLST, PFGE, and antimicrobial susceptibility tests of 45 Hie strains; the majority (n=43) were derived from respiratory samples of pediatric patients at Chiba Children's Hospital between 2000 and 2016. The two remaining strains were obtained from the blood of elderly patients with invasive *H. influenzae* diseases (IHiDs) between 2015 and 2016 at general hospitals. For the *fucK*-negative strains, PCR analysis for fucose operon was also performed.

Results. Four STs (ST18, 122, 621 and 1758) were assigned to 13 strains, and remaining 32 (including one associated with IHiD) were *fucK*-negative, completely

missing the fucose operon. The allelic profiles of six other loci were identical among 31 strains and to that of ST18, 122 and 621, and these strains were genetically closely related. Forty of 45 isolates were ampicillin-sensitive.

Conclusions. The loss of *fucK* was frequently observed in clinical isolates of Hie from children. Moreover, *fucK*-negative Hie may be the cause of IHiD in adult patients. The majority of Hie, including *fucK*-negative strains, were shown to be clonally related and were ampicillin sensitive. This represents the first report examining *fucK* losses in encapsulated *H. influenzae*.

6. Total synthesis and antimicrobial evaluation of 23-demethyleushearilide and extensive antimicrobial evaluation of all synthetic stereoisomers of (16Z, 20E)-Eushearilide and (16E, 20E)-Eushearilide.

Tonoi T¹, Inohana T¹, Sato T¹, Noda Y¹, Ikeda M¹, Akutsu M¹, Murata T¹, Maekawa Y¹, Tanaka A¹, Seki R², Ohkusu M², Kamei K², Ishiwada N², Shiina I¹.

¹ Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science

² Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University

A novel stereoisomer of eushearilide, 23-demethyleushearilide, was synthesized, and the structure-activity relationships of this compound along with known eushearilide stereoisomers were investigated in order to design novel lead compounds for the treatment of fungal infections. It was discovered that all of these congeners, together with the natural product, exhibited a wide range of antimicrobial activity against not only fungi but also against bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE).

Publications: original articles

1) Yamazaki, S., Fujiwara, M., Inoue, C., Watanabe, M., Takayanagi, S., Taniguchi, T., Watanabe, A., Ishiwada, N., Igari, H. (2019). Adverse events after the introduction of quadrivalent influenza vaccine in

comparison with AH1pdm vaccine (2009) in Japan. *Yakugaku-Zasshi*. 139, 469-74.

- 2) Takeuchi, N., Ohkusu, M., Wada, N, Kurosawa, S., Miyabe, A, Yamaguchi, M., Nahm, MH., Ishiwada, N. (2019). Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan. *J Infect Chemother*. 25, 750-7.
- 3) Komatsu, K., Kinai, E., Sakamoto, M., Taniguchi, T., Nakao, A., Sakata, T., Iizuka, A., Koyama, T., Ogata, T., Inui, A., Oka, S. (2019). HIV-Associated Neurocognitive Disorders in Japanese (J-HAND) Study Group (The J-HAND Study Group). Various associations of aging and long-term HIV infection with different neurocognitive functions: detailed analysis of a Japanese nationwide multicenter study. *J Neurovirol*. 25, 208-20.
- 4) Ohkusu, M., Takeuchi, N., Ishiwada, N., Ohkusu, K. (2019). Clonal spread of serotype 12F ST4846 *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 68, 1383-90.
- 5) Hoshino, T., Takeuchi, N., Ohkusu, M., Hachisu, Y., Hirose, S., Fukasawa, C., Kubota, T., Ishida, M., Watanabe, H., Oishi, K., Ishiwada, N. (2019). Identification of *Haemophilus influenzae* serotype e strains missing the *fucK* gene in clinical isolates from Japan. *J Med Microbiol*. 68, 1534-9.
- 6) Tonoi, T., Inohana, T., Sato, T., Noda, Y., Ikeda, M., Akutsu, M., Murata, T., Maekawa, Y., Tanaka, A., Seki, R., Ohkusu, M., Kamei, K., Ishiwada, N., Shiina, I. (2019). Total and antimicrobial evaluation of 23-demethyleushearilide and extensive antimicrobial evaluation of all synthetic stereoisomers of (16Z, 20E)-Eushearilide and (16E, 20E)-Eushearilide. *Molecules*. 24(19). pii: E3437.
- 7) Takei, H., Ishiwada, N., Hishiki, H., Takeshita, K., Naito, S., Endo, M., Shimojo, N. (2019). Two pediatric cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia diagnosed by polymerase chain reaction of gastric lavage. *J Infect Chemother*. 25, 477-9.
- 8) Ogata, H., Nagasawa, K., Takeuchi, N., Hagiwara, S., Sawada, D., Umimura, T., Konno, Y., Yamaide, F., Takatani, R., Takatani, T., Nakano, T., Hishiki, H.,

- Ishiwada, N., Shimojo, N. (2019). Psoriasis and multiple venous thromboses caused by Pantone Valentine Leukocidin-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in a 12-year-old girl: A case report. *J Infect Chemother.* 25, 630-4.
- 9) Fujita, Y., Ishiwada, N., Takei, H., Suwabe, S., Yarita, K., Ohkusu, M., Muraosa, Y., Kamei, K., Shimojo, N. (2019). Usefulness of gastric aspirate culture for diagnosing congenital immunodeficiency in an infant with fungal pneumonia caused by *Rasamsonia piperina*. *Tohoku J Exp Med.* 247, 265-9.
- 10) Yamada, Y., Yamaguchi, H., Ito, Y., Takeuchi, N., Kasai, M. (2019). Pyogenic sacroiliitis caused by pneumococcal serotype 16F in a child. *Pediatr Int.* 61, 1267-1268.
- 11) Abe, N., Fujieda, Y., Nagaoka, K., Ohkusu, M., Yasuda, S., Kamei, K., Atsumi, T. (2019). Disseminated Cryptococcosis with bronchiolitis and cellulitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 199, 235-236.

伊庭 P I (RNA 制御) プロジェクト

Project for RNA Regulation

研究概要 (Summary)

遺伝子発現の制御ネットワークは、その細胞の発生、分化、増殖に関する特異性はもちろん、真菌・細菌・ウイルス等の寄生体に対する宿主の応答性や competency をも規定している。平成28年4月に開始された本プロジェクトではこのような制御ネットワークを形成する主要な因子として1) 各遺伝子のプロモーター上で作用する転写制御因子、2) クロマチンの活性化状態を規定するクロマチン構造変換因子、3) 多数の遺伝子群の発現を post-transcriptional レベルで一括して負に制御する miRNA の3者に注目する。そして病因となる遺伝子制御ネットワークの乱れの原因を解明し、それを制御する方法論を開発する橋渡し研究を展開して感染症、がんを初めとしたヒト疾患の制圧をめざす。

Gene regulatory networks determine not only cellular specificity of development, differentiation, and proliferation but also cellular response or competency to virus, bacterial, and mycete. Whereas gene expression patterns are regulated by many factors, this project, which has started in April 2016, concentrate on the following three factors that are closely related; 1) transcriptional factors, which operate on the promoter region of their target genes, 2) chromatin remodeling factors that modulate epigenetical states of these genes, 3) miRNA, which suppresses expression of many genes at the post-transcriptional level, to develop translational research of new therapeutic strategies for human infectious diseases and cancer.

特任教授	伊庭 英夫	Professor	Hideo Iba
特任准教授	原口 健	Research Associate Professor	Takeshi Haraguchi
特任助教	小林 和善	Research Assistant Professor	Kazuyoshi Kobayashi
技術補佐員	桜井 典子	Research Promotion Technician	Noriko Sakurai
技術補佐員	相川 尚美	Research Promotion Technician	Naomi Aikawa

1. Development of drug delivery system (DDS) of Super-S-TuD to establish RNA medicine for cancer therapy.

Takeshi Haraguchi, Kazuyoshi Kobayashi and Hideo Iba

Division of RNA Therapy, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

We previously developed the RNA decoy suppressing specific miRNA activity very efficiently, which was designated TuD (Tough Decoy) and expressed from viral vectors. S-TuD (Synthetic TuD), which mimics the unique secondary structure of TuD was also developed as RNA medicine. It has been further improved as Super-S-TuD, which showed 3-7

folds enhancement in its specific activity of the target miRNA inhibition. For the efficient delivery of systemically administrated Super-S-TuD into tumor tissues is the major challenge at present. We previously established basic formulation for Lipid nanoparticle (LNP) preparation using COATSOME-X (developed by NOF) and Super-S-TuD 141/200c (hybrid type Super-S-TuD that suppresses the entire miR-200 family) encapsulated by such LNPs was shown to suppress the formed tumors efficiently when intravenously administrated into nude mice bearing tumors formed by a human tumor cell line.

For innovative therapy for broad spectrum of tumors, we now target miR-21, which is expressed in almost all the epithelial tumors at very high levels and has been shown to be

strong causative of cancer through the inhibition of many important tumor suppressor genes simultaneously. Since miR-21 is one of the most abundant miRNA species in cancer cells, both high dosage of Super-S-TuD21 (targeting miR-21) and efficient DDS would be required. However, high dosage of Super-S-TuD encapsulated by COATSOME-X was toxic to nude mice. We therefore used newly developed COATSOME-Y instead, which shows very effective intracellular delivery and much lower toxicity in mice. By optimizing other LNP components such as accessory lipids and PEGylated lipids as well as the formulation of LNP, we can now fully suppress miR-21 activity in cancer cell lines by adding Super-S-TuD21 encapsulated by COATSOME-Y into the culture at the dosage of 300pM (Nucleic acids). Such LNP showed high retentivity in blood and good pharmacokinetics with specific accumulation of LNP into tumor tissues, when administrated into tail vein of tumor bearing mice.

2. Isolation of small-molecular weight compounds that inhibit NF- κ B activity

Kazuyoshi Kobayashi, Takeshi Haraguchi, and Hideo Iba^{1,2,4}

Division of RNA Therapy, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

The transcription factor NF- κ B is involved in many inflammatory responses and replication of microorganisms. Since it is constitutively activated in many solid tumors, leukemias and myelomas, NF- κ B can be a promising target for cancer therapy. But most of the currently available NF- κ B inhibitors do indirectly target NF- κ B by suppressing the upstream key molecules in the NF- κ B activating pathways. Since these molecules often locate at the cross-road of signal transduction pathway, their biological effects are inevitably broad and not specific. We previously reported that the d4-family proteins (DPF1, DPF2, DPF3a/b) function as adaptor proteins linking NF- κ B with the SWI/SNF complex. We have demonstrated that their N-terminal regions retain full adaptor function and the C-terminal regions include essential domains for NF- κ B activation and maintenance of

tumor proliferation, indicating that the d4-family proteins are promising targets cancer therapy.

In this project, we address the isolation of low-molecular weight inhibitors of NF- κ B. In collaboration with SEEDSUPPLY INC., which can perform high-throughput screening based on the binding of low molecular weight compounds to a certain protein using a compound library, we have now screening binding compounds to d4-family proteins.

3. Development of armed Oncolytic Virus by introducing shRNA expression unit

Takeshi Haraguchi¹, Kazuyoshi Kobayashi¹, Tomoki Todo² and Hideo Iba¹

¹ Division of RNA Therapy, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba 260-8673, Japan

² Division of Innovative Cancer Therapy, and Department of Surgical Neuro-Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

Glioblastoma is a highly malignant tumor and new therapeutic approach has been needed. We have previously shown that (1) in glioblastoma cells, a chromatin remodeling factor, the SWI/SNF complex associates with a novel corepressor complex including TLX and LSD1 forming a larger complex, (2) DPF1 or DPF3a (d4-family members) functions as an adaptor protein linking these two complexes, and (3) knockdown of either DPF1 or DPF3a in primary cells originated from glioblastoma patients (TGS01) strongly suppresses the neurosphere formation *in vitro*, a good marker of cancer stemness. In this project, we have introduced the shDPF1 or shDPF3a expression unit into the third-generation oncolytic herpes virus, G47 Δ to enhance its anti-oncogenic activity.

We designed several sequences of shDPF1 and shDPF3a, respectively and evaluated each knockdown efficiency without affecting expression levels of other d4-family members using lentivirus vectors carrying the corresponding shRNA expression unit. To obtain *in vitro* proof that knockdown of DPF1 or DPF3a can suppress tumors formed by TGS01 inoculation into nude mice, independent of G47 Δ infection.

We have now successfully designed siDPF1 and siDPF3a by modification of several nucleotides in the sequence of the corresponding shRNAs to give resistance to RNase in vivo without affecting their original knockdown efficiency. These

synthesized siRNA is now introduced into the tumor bearing nude mice intravenously after encapsulating siRNA into lipid nanoparticles using a newly developed non-cationic lipid, COATSOME-Y.

高橋 P I (微生物創生) プロジェクト

Project for Systems Biology of Microorganisms

研究概要 (Summary)

我々はコンピュータ解析によって、次世代シーケンサーを含む様々な生物実験で得られる大量データからの新規生物学的知見の創出、並びに、数理モデルアプローチによる生命現象の解明に取り組んでいます。大量データによる生命の「構成要素の理解」、数理モデルによる「挙動の理解」という二つのコンセプトの下、病原真菌を含む微生物を対象に細胞機能の分子レベルでの理解を目指しています。

Our research areas are Bioinformatics and Systems Biology. Our Bioinformatics approach aims to deeply and clearly understand massive biological experiment data, e. g., sequence data by next generation sequencers. Systems Biology aims to understand how biological systems work and help the experimental design mainly by mathematical modelling approach.

准 教 授	高橋 弘喜	Associate Professor	Hiroki Takahashi
特 任 助 教	楠屋 陽子	Research Assistant Professor	Yoko Kusuya
特 任 助 教	石原 潤一	Research Assistant Professor	Jun-ichi Ishihara
技 術 補 佐 員	守 涼子	Research Promotion Technician	Ryoko Mori (~ 2019.6)
技 術 補 佐 員	全 真知子	Research Promotion Technician	Machiko Zen

1. Investigation of the relationships between heterogeneity against environmental stresses and pathogenicity in pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus*

Yoko Kusuya, Cai Bian, Jun-ichi Ishihara, Hiroki Takahashi

Stress responses and pathogenicity have been extensively studied in *Aspergillus fumigatus*, the main causative pathogen of life-threatening aspergillosis. The heterogeneity in this pathogen has recently attracted increasing attention. In this project, we used more than 100 clinically isolated strains to investigate several properties relevant to the pathogenicity of *A. fumigatus*, namely, hypoxia growth, adaptation to nutrients such as copper, mimicking human lung. We compared these strains in whole genome level and tried to uncover genomic variations. In addition, we conducted comparative transcriptome analysis to uncover the genes underpin the heterogeneity.

2. Systems biology for understanding the stress responses in bacteria

Kengo Itadera, Jun-ichi Ishihara, Hiroki Takahashi

It is conceivable that the heterogeneity could be one of the adaptation mechanisms to a diverse of environments in bacteria. We address the heterogeneity of bacteria by two approaches; one is the systems biology approach where we derive the mathematical model and conduct the simulation of transcriptional regulation in metal response, and second is the microfluidic device to directly measure the single cell behavior of bacteria. We launched the assembling of device and succeeded the microfluidic device which could be useful to detect the single cell behavior.

3. Development for genome analysis tools and bioinformatic analysis for collaborative projects.

Mohammad Vahed, Jun-ichi Ishihara, Hiroki Takahashi

Since NGS development, genome and omics data are rapidly accumulating. We collaborate with several researchers to analyze their own genome and omics data, and give the overview of the data by using multivariate and statistical analysis. In addition, we developed software DIpartite. DIpartite enables *ab initio* prediction of conserved motifs based on not only PWM, but also DWM. We evaluated the performance of DIpartite by comparing it with freely available tools, such as MEME, BioProspector, BiPad, and AMD. Taken the obtained findings together, DIpartite performs equivalently to or better than these other tools, especially for detecting bipartite motifs with variable gaps. DIpartite requires users to specify the motif lengths, gap length, and PWM or DWM. DIpartite is available for use at <https://github.com/Mohammad-Vahed/DIpartite>.

Publications

- 1) Vahed, M., Ishihara, J. I., Takahashi, H. (2019). DIpartite: A tool for detecting bipartite motifs by considering base interdependencies. *PLoS One* 14, e0220207.
- 2) Ries, L., Steenwyk, J. L., de Castro, P., de Lima, P., Almeida, F., de Assis, L., Manfiolli, A., Takahashi-Nakaguchi, A., Kusuya, Y., Hagiwara, D., Takahashi, H., Wang, X., Obar, J., Rokas, A., Goldman, G. (2019). Nutritional Heterogeneity Among *Aspergillus fumigatus* Strains Has Consequences for Virulence in a Strain- and Host-Dependent Manner. *Front. Microbiol.* 10, 854.
- 3) Matsuo, K., Haku, A., Bi, B., Takahashi, H., Kamada, N., Yaguchi, T., Saijo, S., Yoneyama, M., Goto, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol. Immunol.* 63, 155-163.
- 4) Shimizu, M., Kusuya, Y., Alimu, Y., Bian, C., Takahashi, H., Yaguchi, T. (2019). Draft Genome Sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123NT. *Microbiol. Resour. Announc.* 8, e01453-18.
- 5) Toyotome, T., Hamada, S., Yamaguchi, S., Takahashi, H., Kondoh, D., Takino, M., Kanesaki, Y., Kamei, K. (2019). Comparative genome analysis of *Aspergillus flavus* clinically isolated in Japan. *DNA Res.* 26, 95-103.

バイオリソース管理室

Management of Unit of Microbiological Resources

研究概要 (Summary)

病原真菌・放線菌の「保存・管理・提供」体制を整備し、最新情報が付加された信頼できる菌株の提供を通じて、真菌症ならびにその原因菌の研究・教育の基盤を支援している。

We are developing a system for preservation, management and distribution of pathogenic fungi and actinomycetes. We support the base of research and education of mycoses and their pathogens in order to supply reliable strains that are added new information.

准 教 授	矢口 貴志	Associate Professor	Takashi Yaguchi
助 教	田中 玲子	Assistant Professor	Reiko Tanaka
助 教	伴 さやか	Assistant Professor	Sayaka Ban
技 術 職 員	伊藤 純子	Research Technician	Junko Ito
技 術 補 佐 員	長村 由美	Research Promotion Technician	Yumi Osamura
技 術 補 佐 員	樋口芳緒美	Research Promotion Technician	Kaomi Higuchi

1. *Aspergillus takadae*, a novel heterothallic species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from soil in China.

Matsuzawa T¹, Abliz P², Yaguchi T³, Gonoï T³, Horie Y⁴.

¹ University of Nagasaki, Siebold Campus, 1-1-1 Manabino, Nagayo-cho, Nishi-Sonogi-gun, Nagasaki, 851-2195, Japan

² Department of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, No.1 Liyushan Road, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830053, China

³ Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

⁴ Former Natural History Museum and Institute, Chiba, 955-2 Aoba-cho, Chuo-ku, Chiba-shi, Chiba, 260-86, Japan

Aspergillus takadae is characterized by its heterothallic reproduction, pale yellow cleistothecia, broadly lenticular ascospores with two short equatorial crests and smooth convex surfaces, and broadly ellip-soidal to ovate conidia with a

smooth wall. The validation of these novel species is supported further by the analyses of the β -tubulin, calmodulin, actin, and RPB2 sequences. In addition, the phylogenetic tree and DDBJ accession numbers of all the species of *Aspergillus* section *Fumigati* are presented. We report on the crossing of *A. takadae* species and the result of crossing *A. takadae* with a closely related species, *A. spatulatus*.

2. Genes encoding proteolytic enzymes fungalysin and subtilisin in dermatophytes of human and animal origin: A comparative study

Kaplan E^{1,2}, Gonca S¹, Kandemir H^{3,4}, Döğen A⁵, Hilmioglu-Polat S⁶, Ilkit M³, Tanaka R⁷, Yaguchi T⁷, Uhrlaß S⁸, Nenoff P⁸.

¹ Advanced Technology Education, Research, and Application Center, Mersin University, Mersin, Turkey

² Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Zonguldak Bülent Ecevit, Zonguldak, Turkey

³ Division of Mycology, Department of Microbiology, Faculty

of Medicine, University of Çukurova, Adana, Turkey

⁴ Centre of Expertise in Mycology, Radboud University Medical Centre/Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, The Netherlands

⁵ Department of Pharmaceutical Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Mersin, Mersin, Turkey

⁶ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Ege, Izmir, Turkey

⁷ Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

⁸ Laboratory for Medical Microbiology, Mölbis, Germany

Dermatophytes are among the most successful fungal pathogens in humans, but their virulence mechanisms have not yet been fully characterized. Dermatophytic fungi secrete proteases *in vivo*, which are responsible for fungal colonization and degradation of the keratinized tissue during infection. In the present study, we used PCR to investigate the presence of genes encoding fungalyisins (MEP) and subtilisins (SUB) in three dermatophyte species whose incidence is increasing in Europe: the anthropophilic *Trichophyton rubrum* (n = 58), zoophilic *Microsporum canis* (n = 33), and *Trichophyton benhamiae* (n = 6). MEP2 and SUB4 genes were significantly correlated with *T. rubrum*; MEP3 and SUB1 were mostly frequently harbored by *M. canis*; and MEP1, 2, and 4 and SUB3–7 were most frequently harbored by *T. benhamiae* isolates ($p < 0.05$). Furthermore, MEP1–5 and SUB1–3 genes were significantly more prevalent among human clinical isolates of *M. canis* (n = 17) than among asymptomatic cat isolates of *M. canis* (n = 16; $p < 0.05$). Unidentified MEP and/or SUB genes in some isolates in the current study may suggest that other gene repertoires may be involved in the degradation of keratin. The presented analysis of the incidence of MEP and SUB virulence genes in three dermatophyte species of diverse origins provides an insight into the host–fungus interaction and dermatophyte pathogenesis.

3. Draft genome sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123^{NT}.

Shimizu M, Kusuya Y, Alimu Y, Bian C, Takahashi H,

Yaguchi T.

Faculty of Science, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

Medical Mycology Research Center, Chiba University, 1-8-1, Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan

Molecular Chirality Research Center, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba, Japan

Species of the *Aspergillus* section *Nigri* are taxonomically very complex. The taxonomic assignment of *Aspergillus awamori* is unclear. Here, we present the draft genome sequence of *A. awamori* strain IFM 58123^{NT}.

Publications

- 1) Hama, M., Elshamy, A., Yoneyama, T., Kasai, Y., Yamamoto, H., Tanigawa, K., Oshiro, A., Noji, M., Ban, S., Imagawa, H., Umeyama, A. (2019). New alkaloidal metabolites from cultures of entomopathogenic fungus *Cordyceps takaomontana* NBRC 101754. *Fitoterapia*. 139, e104364.
- 2) Kaplan, E., Gonca, S., Kandemir, H., Döğen, A., Hilmioglu-Polat, S., Ilkit, M., Tanaka, R., Yaguchi, T., Uhrlaß, S., Nenoff, P. (2019). Genes encoding proteolytic enzymes fungalyisin and subtilisin in dermatophytes of human and animal origin: A comparative study. *Mycopathologia*. Published Online: 02 August 2019.
- 3) Kato, I., Furuya, M., Baba, M., Kameda, Y., Yasuda, M., Nishimoto, K., Oyama, M., Yamasaki, T., Ogawa, O., Niino, H., Nakaigawa, N., Yano, Y., Sakamoto, K., Urata, Y., Mikami, K., Yamasaki, S., Tanaka, R., Takagi, T., Kondo, T., Nagashima, Y. (2019). RBM10-TFE3 renal cell carcinoma characterised by paracentric inversion with consistent closely split signals in break-apart fluorescence in-situ hybridisation: study of 10 cases and a literature review. *Histopathology*. 75, 254-265.
- 4) Kurosawa, S., Sekiya, N., Doki, N., Yaguchi, T., Kishida, Y., Nagata, A., Yamada, Y., Konishi, T., Kaito, S., Yoshifuji, K., Shirane, S., Uchida, T., Inamoto, K., Toya, T., Igarashi, A., Najima, Y.,

- Muto, H., Kobayashi, T., Kakihana, K., Sakamaki, H., Ohashi, K. (2019). Emergence of rare nocardiosis following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of molecular taxonomy. *Int J Infect Dis.* 89, 154-162.
- 5) Matsuo, K., Haku, A., Bi, B., Takahashi, H., Kamada, N., Yaguchi, T., Saijo, S., Yoneyama, M., Goto, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol Immunol.* 63, 155-163.
- 6) Matsuzawa, T., Abliz, P., Yaguchi, T., Gonoi, T., Horie, Y. (2019). *Aspergillus takadae*, a novel heterothallic species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from soil in China. *Mycoscience.* 60, 354-360.
- 7) Miyashita, K., Matsuo, A., Johno, M., Noguchi, H., Matsumoto, T., Hiruma, M., Kimura, U., Kano, R., Yaguchi, T., Ihn, H. (2019). Subcutaneous cystic phaeocephalomycosis caused by *Exophiala jeanselmei*. *J Dermatol.* 46, e449-e451.
- 8) Noguchi, H., Matsumoto, T., Kimura, U., Hiruma, M., Kano, R., Yaguchi, T., Fukushima, S., Ihn, H. (2019). Fungal melanonychia caused by *Candida parapsilosis* successfully treated with oral fosravuconazole. *J Dermatol.* 46, 911-913.
- 9) Noguchi, H., Matsumoto, T., Hiruma, M., Kimura, U., Kano, R., Yaguchi, T., Fukushima, S., Ihn, H. (2019). Tinea unguium caused by terbinafine-resistant *Trichophyton rubrum* successfully treated with fosravuconazole. *J Dermatol.* 46, e446-e447.
- 10) Noguchi, H., Matsumoto, T., Hiruma, M., Kimura, U., Yaguchi, T., Hirose, M., Fukushima, S., Ihn, H. (2019). Interdigital hyalohyphomycosis caused by members of the *Fusarium solani* species complex. *Acta Dermato-Venereologica.* 99, 835-836.
- 11) Sato, T., Kitahara, H., Honda, H., Katsukawa, F., Hiruma, M., Yaguchi, T. (2019). Onychomycosis of middle finger of a Japanese Judo Athlete due to *Trichophyton tonsurans*. *Med Mycol J.* 60, 1-4.
- 12) Shimizu, M., Kusuya, Y., Alimu, Y., Bian, C., Takahashi, H., Yaguchi, T. (2019). Draft genome sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123^{NT}. *Microbiol Resour Announc.* 8, e01453-18.
- 13) Yamate, R., Matono, T., Yaguchi, T., Fujii, Y., Goto, Y., Tobino, K., Imura, H., Nagano, S. (2019). Disseminated nocardiosis with *Nocardia brasiliensis* bacteremia in a patient with rheumatoid arthritis using tocilizumab. *J Infect Chemother.* 25, 552-555.

文部科学省 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原真核微生物」

Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology National BioResource Project “Pathogenic Eukaryotic Microorganisms”

文部科学省では2002年度からナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）を開始し、国が戦略的に整備することが重要な生物資源について体系的に収集、保存、提供などを行うための体制を整備してきた。その後5年ごとの見直しを行い、2017年度より第4期が開始された。

第4期より病原細菌と病原真菌・原虫は別々に活動することとなり、NBRP病原真核微生物には千葉大学真菌医学研究センター（病原真菌・放線菌、中核機関）と長崎大学熱帯医学研究所（病原性原虫）は、相互の機関の連携を図り、これらの病原微生物株の収集・保存・提供体制を整備して、高度情報を賦与した信頼できる病原微生物株として提供し、感染症と病原体の教育・研究をする人々を支援している。

本プロジェクトは、今後いかなる感染症が発生しても対応できる病原真核微生物コレクションを目指している。

In FY2002, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) implemented the National

BioResource Project (NBRP) to construct the framework for systematic collection, preservation, and distribution of bioresources, with a focus on those that required strategic development by the national government. After the reviewing the NBRP every five years, in FY2017, the forth phase has started.

This project is carried out by Chiba University’s Medical Mycology Research Center (pathogenic fungi/actinomycetes), and Nagasaki University’s Institute of Tropical Medicine (pathogenic protozoa). Together, they cooperate in various efforts to support education and research pertaining to infectious diseases and pathogens. Specifically, they are developing a system for collection, preservation, and distribution of pathogenic microorganisms, and they supply reliable strains of pathogenic microorganisms that are backed by high-level information.

Even if any infection develops, the project aims at the pathogenic microorganism collection to deal with it.

長崎大学熱帯医学研究拠点特定領域共同研究

「アフリカで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と
形態学的, 生理学的, 分子生物学的解析」プロジェクト

Cooperative Research of Priority Areas with NEKKEN, Nagasaki University

Project for Collections, and morphological, physiological and molecular biological analysis
of human pathogenic fungi and actinomycetes in Africa

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点の助力を得て、ケニア国周辺の食糧のカビ毒汚染やヒト真菌症に関するプロジェクトを展開している。現在までにケニア全土の主要穀物（トウモロコシ, 小麦）やミルクなどを汚染するカビ毒（発がん性アフラトキシン他）とその生産菌の解析を進め、現地食物の多くが、世界の安全基準値を大きく上回るカビ毒で汚染されていることを明らかにしてきた。結果は、現地のマスコミにも取り上げられ、大きな反響を呼び起こした。さらに環境中のアスペルギルス症原因菌種の抗真菌薬に対する耐性、耐性部位などの調査も行っている。

海外での共同研究は、現地の研究者や監督官庁との信頼関係を築き、許可を得るなど多くの課題を解決しなければ推進できない。しかし、現地の医療に貢献し、人々の生活の質（QOL）の向上を図り、さらに日本との友好

を深めるために努力を継続している。

Under assistance of Kenya Research Station, Inst. NEKKEN, Nagasaki univ., we are analyzing toxins contaminating major local grains (maize, wheat) and milks, and also producer fungi. We found the local foods were contaminated by the toxins at concentrations far above the international standards. The result has been announced in newspapers, and received large attention. Furthermore, we have examined the resistance properties against antifungals and resistance mechanism on the isolates causative aspergillosis in the environment.

We are building develop trusting relationships with Kenyan researchers and regulatory agencies, and promoting collaborative research project while solving the problems.

高齢者・新生児アスペルギルス症制圧へ向けた 予防・診断・治療開発プロジェクト

The project for prophylaxis, diagnosis, and treatment for aspergillosis and the other mycoses in aged and neonate patients

先進各国と同様に、我が国で最も死亡者が多い深在性真菌症（内臓真菌症）はアスペルギルス症であり、その中でも特に高齢化や慢性閉塞性肺疾患（COPD）等の慢性肺疾患に好発する慢性肺アスペルギルス症が重要である。本プロジェクトはこれらの疾患の疫学、増悪因子、重要な難治化因子である薬剤耐性（とくに主力薬剤であるアゾール薬に対する耐性）に関する研究、さらに早産低出生体重児を中心とした新生児等の真菌症の解析により、新規診断法、治療法、予防法の開発を通じた本疾患の制圧を目指してきた。

これまで当センターは真菌症リファレンスセンターとして全国の医療施設からの高度な検査を引き受けるなどの活動をしてきたが、新たに日本感染症学会及び日本臨床微生物学会により「先進的感染症検査施設」に認定され、研究や症例収集のためのより強力なネットワークを形成することが可能となった。これに慶應大学呼吸器内科および感染制御部・感染制御センター及びNHO東京病院も加えた共同研究等を利用して、アスペルギルス症難治化の一因である *Aspergillus fumigatus* 耐性化の研究を続けている。Cyp51A変異を伴うアゾール耐性に関する研究と並行してCyp51Aに変異を持たないアゾール耐性株について研究を進めており、既にHMG-CoA reductaseの変異によるアゾール耐性の可能性を論文で示したが、本年はcyp51A遺伝子の変異とhmg1遺伝子の変異との両方を有する臨床分離株をもちい、CRISPR/Cas9システムによる変異導入株の作出により、hmg1遺伝子の変異が独立してアゾール薬耐性を付与することを証明した（論文準備中）。さらに難治化を克服するための研究アプローチとして新規病原因子の探索研究を行った。その結果、新たな病原因子の候補分子としてアスペルギルス細胞壁タンパク質である2種類のLysin motif (LysM) - domain proteinsを発見し、Scientific Reports (IF 4.525) に発表した。現在、さらに免疫学的アプローチを駆使し、これらの病原因子としての役割について解析を進めている。

また、慶應大学病院等との国内共同疫学研究では、昨年までの研究で、我が国の慢性肺アスペルギルス症では欧米と異なり *Aspergillus section Nigri* による症例が多いことを明らかにしたが、今回、症例の詳細な解析により、section *Nigri* の中でも高頻度に検出される *A. tubingensis* においてアゾール系薬感受性が低いこと、さらに定着例よりも感染症例が多いことを示し、実際の難治化に深く関与していることを確認した。現在収集した薬剤耐性菌株についてさらに詳細な解析を進めている。

新生児領域における研究に関しては、新生児深在性真菌感染症発症状況全国調査を実施し、国内の実態を明らかにしたが、本調査で糸状菌分離例の報告はなく、その背景として新生児・乳児における病原診断の難しさが根底にあると考えた。そこで、乳児では胃液のpHが比較的高く、また、採取が容易なことに着目し、胃液の真菌培養による糸状菌感染症診断を試みたところ、真菌に易感染性を示すことで知られる慢性肉芽腫症の乳児肺炎症例から糸状菌のひとつである *Rasamsonia piperina* の分離に成功し、論文を公表した。また、新生児の *Aspergillus fumigatus* による髄膜炎・脳室炎症例に対して、血中と髄液中のポリコナゾール濃度を経時的に測定することで、適切な治療を行うことが出来た症例を経験し、論文公表した。さらに、当センターに全国の医療機関からこれまでコンサルテーションを受け、菌株の解析を行った小児由来糸状菌の臨床背景、菌株情報についてのデータを分析し、学会発表を行った。その他、新生児集中治療室（NICU）の環境中の真菌に関する調査を行った。これらの検討結果は、新生児アスペルギルス症の診断・治療法策定において極めて重要な情報を提供するものである。

This project aims to cope with the intractable fungal disease, aspergillosis in elderly and neonates by investigating the epidemiology, exacerbating factors and obstacles for treatment such as drug resistance. Fungal infections in neonates have been

an unexplored field of investigation.

We developed a rapid detecting system of *cyp51A* mutation, which is a major factor of azole resistance, in *Aspergillus fumigatus* using surveyor nuclease (published in Antimicrobial Agents and Chemotherapy, in press. IF 4.715). For the azole-resistant aspergilli without *Cyp51A* mutations, we already proposed a hypothesis that mutations in HMG-CoA reductase could be another cause of resistance. Recently we found clinical isolates possessing both *cyp51A* gene mutation and *hmg1* gene mutation. Using the CRISPR / Cas9 system, we demonstrated that mutations in the *hmg1* gene independently confer azole-resistance. (paper in preparation). In the search for the exacerbating factors of aspergilli, we found two Lysin motif (LysM) -domain proteins in cell walls of the fungus, which could be new candidates for exacerbation (published in Scientific Reports: IF 4.525).

In the collaborative studies with other domestic hospitals such as Keio University Hospital, we previously found that *Aspergillus* section *Nigri* is a major pathogen through an analysis of chronic pulmonary aspergillosis in Japan. This year we investigated the lower respiratory tract specimens of these patients. We found that, among section *Nigri*, *A. tubingensis* had a tendency to cause pulmonary infection rather than

colonization, and was less susceptible to azoles. Detailed analysis of antifungal-resistant strains collected is in progress.

For the study of deep-seated mycosis among neonates, we conducted a nationwide retrospective survey in order to determine numbers of invasive fungal infections (IFI) in Japan. Through this surveillance, the situation of neonatal IFI in Japan was clarified. However, no neonatal mold infection was reported in this survey because of the difficulty of pathogenic diagnosis. Based on this background, we reported the utilize of gastric aspirate fungal culture for the diagnosis of infantile fungal pneumonia caused by *Rasamsonia piperina*. We also reported neonatal meningitis and ventriculitis caused by *Aspergillus fumigatus*. The continuous monitoring of serum and cerebral fluid voriconazole concentration was useful for the appropriate treatment of this severe case. We also performed epidemiological study of pediatric mycoses using database of clinical consultations to Medical Mycology Research Center. Furthermore, environmental fungal survey in neonatal intensive care unit was performed in this year. Above study results gave us the important information for the establishment of diagnosis, and treatment for aspergillosis and the other mycoses in neonate patients.

AMED/JICA 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)

「ブラジルと日本の薬剤耐性を含む真菌感染症診断に関する研究と
リファレンス協力体制強化プロジェクト」

AMED/JICA Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS)

“The establishment of a research and reference collaborative system for the diagnoses of
fungal infections including drug-resistant ones in Brazil and Japan”

真菌感染症患者数は近年増加の一途をたどっている。その背景として、免疫抑制薬の投与、造血幹細胞移植や固形臓器移植を受けている等による全身的免疫低下患者、また慢性肺疾患（肺結核症や肺気腫など）を基礎疾患に有する患者等の局所的免疫低下患者などが増えており、そのような患者での発症頻度が高いことが挙げられる。一般に深在性真菌症は難治で致死率が高いことが知られており、その意味で、真菌感染症のインパクトは医療分野のみならず社会的にも極めて高いと言える。

さらに加えて近年、ヨーロッパ諸国を皮切りに抗真菌薬に対する耐性を有した多種多様な真菌が問題となりつつある。最近、米国CDCは、最も差し迫った脅威となる5種の微生物のうちのひとつに薬剤耐性真菌をリストアップした。薬剤耐性真菌は全世界で広がりを見せており、まさに地球規模の問題となりつつある。薬剤耐性真菌の出現、増加は疾病の難治化、致死率の上昇に直結することが予想される。実際、薬剤感性真菌による感染症よりも薬剤耐性真菌による感染症の方が致死率が高いとの報告もある。一方で、ブラジルを含めた南米での状況はほとんど調査されておらず、不明のままであるため、その早急な実態解明はまさに社会的要請である。

本研究では、ブラジルのサンパウロ州立カンピーナス大学と連携し、カンピーナス首都圏における耐性真菌による感染症の実態を明らかにし、耐性真菌の検出法を開発することを通じ、ブラジルにおける難治性真菌感染症の治療戦略を構築するとともにブラジルにおけるカンピーナス大学を中心とした耐性真菌感染症研究拠点研究ネットワークの構築を目指す。

これまでに、ブラジルでの臨床検体から検出された真菌のうち、最も重篤な感染症を引き起こす *Aspergillus fumigatus* を解析したところ、抗真菌薬の一種であるアゾール系薬に耐性を有する菌株を見出した。これらの株は薬剤の標的遺伝子の5'プロモーター領域に特徴的な繰り返し配列を有していることが明らかとなった。このタイプの遺伝子変異は欧州に多く見られるものであるが、ブラジルでの状況は不明であった。我々のグループはこの知見についてブラジルで初めて論文発表を行った。一方で我が国においては薬剤の標的遺伝子の変異パターンが欧州及びブラジルとは大きく異なることをすでに我々は見出している。すなわち、抗真菌薬耐性のメカニズムは国や地域によって異なる可能性が示唆され、耐性遺伝子検出法を開発するうえで国情を考慮すべきであることが確認された。

以上のようなブラジルの状況を踏まえ、耐性遺伝子検出法を開発を開始した。ブラジルで検出された遺伝子変異タイプの耐性株を用い、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法による検出について検討を重ね、手法を確立した。この知見については現在論文準備中である。また、Surveyor Nuclease とよばれる、2本鎖DNA内のミスマッチ箇所特異的なエンドヌクレアーゼを応用し、耐性遺伝子内の点突然変異 (point mutation) を検出する迅速簡便な方法を確立し、論文発表を行った。この手法はすでにブラジルにおいて実際の臨床株において施行開始されている。

ブラジル国内の研究ネットワークのツールとして、REDCap (米国Vanderbilt大学が開発したデータ集積管

理システム)をカンピーナス大学に導入し、これを基に真菌症の症例データベースを構築した。現在南米初の試みとして、ブラジルの複数の医療機関が連携し、多施設共同で真菌症の症例データベースが構築されつつあり、これまでに160症例を超える症例数が集積されている。

また、このコンソーシアムを利用し、研究機関も含めた真菌株保存バンクを設立し、実際に菌株の保存を開始した。保存する菌株としては複数の医療機関からの臨床分離株に加え、環境(土壌、空気、植物、水など)からの分離真菌も含める予定である。

The number of fungal infections has been increasing in recent years because of the advances in clinical practice such as hematopoietic stem cell transplantation, solid organ transplantation. Also, patients with chronic lung disease (pulmonary tuberculosis, COPD, etc.) are generally susceptible to pulmonary fungal infection. In general, fungal infections are refractory diseases and their mortality is high. In these aspects, the impact of fungal infections is extremely high, not only in the medical field but also in society.

Recently, various fungi possessing resistance to antifungals have become a serious problem. Recently, CDC in the US has listed drug-resistant fungi as one of the five “urgent threats.” The emergence and increase of drug-resistant fungi are expected to directly lead to refractory disease and increased mortality. In fact, it has been reported that infections caused by drug-resistant fungi have a higher mortality rate than the ones caused by drug-sensitive fungi. However, the situation in South America, particularly in Brazil, has been little investigated and remains unclear. Given these situations, this project was started between Medical Mycology Research Center, Chiba University and the University of Campinas.

Among clinical strains of *Aspergillus fumigatus* isolated in Brazil, we found azole-resistant strains. These strains have a tandem repeat in the promoter region upstream of the antifungal target gene. This type of mutation is known to be common in Europe. We have published the first paper in Brazil on this finding.

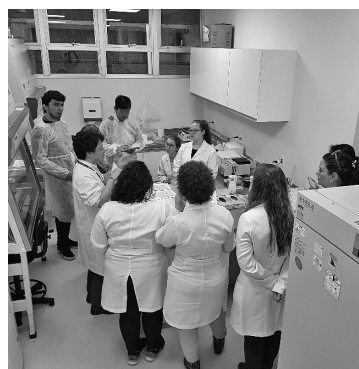
On the other hand, we have already found that mutation patterns of drug target genes in Japan are significantly different from those in Europe and Brazil. In other words, it was suggested that the mechanism of antifungal drug resistance

might differ depending on the region/country, and it was confirmed that each situation should be considered when developing a method for detecting a resistance gene.

We are developing some resistance gene detection methods. Using several resistant strains, we partially established the detection method by LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification). A manuscript regarding this study is in preparation. We also established a simple and rapid method to detect point mutations in resistance genes using Surveyor Nuclease, a mismatch site-specific endonuclease in double-stranded DNA, and published a paper. This assay has already been implemented in Brazil for clinical strains.

As a research network tool in Brazil, REDCap®, a system for data collection and management developed by Vanderbilt University, was introduced to the University of Campinas. Four medical institutions in Brazil have participated in a multi-center database of mycosis cases, and more than 160 cases have been already enrolled.

In addition, using this consortium, a bio-resource bank for fungal strain has been established, and the fungal preservation was already started. The strains to be preserved will include not only clinical isolates but also environmental isolates (from the soil, air, plants, water).



感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE)

Japanese Initiative for Progress of Research on Infectious Disease for Global Epidemic

病原真菌 *Aspergillus fumigatus* によるアスペルギルス症は先進国を中心に増加傾向にある。既存の抗真菌薬の抗菌力は十分とは言えず極めて難治であるため、新規治療薬開発が求められている。本プロジェクトでは、自然環境中での形質変化をモデル化することで病原性を規定する形質の同定を目指している。「どのような形質変化がどのような環境因子によって生み出されるか」を明らかにして、病原性と環境因子を繋げることを計画している。

これまでに、本菌の環境応答能を分子レベルで解析するとともに、表現形質を徹底的に調べた。調べた限りの菌株においては、系統的に近縁であっても、株間で異なる表現型を示す可能性があり、本菌の環境応答能を遺伝的系統などから簡便に推定することの難しさを浮き彫りにした。このことは、本菌の病原性が複雑な表現形質の総体によっていることを改めて教示する結果であった。

また、大学院生を英国の研究グループに長期に滞在させるなど、国際研究協力を進めた。

Aspergillus fumigatus is a major cause of aspergillosis from allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) to invasive pulmonary aspergillosis (IPA), particularly in immunocompromised individuals. The efficacy of antifungal therapy is, however, incomplete, because of emergence of resistance strains worldwide. Besides, the molecular mechanisms of pathogenicity in *A. fumigatus* has not been fully elucidated yet. Of critical importance is further understanding of the mechanisms behind infections with *A. fumigatus*. In this project, we propose the elucidation of the quantitative effect of environmental conditions related with adaptation in *A. fumigatus*. Toward this goal, we explore the statistical modelling framework to decipher the phenotypic heterogeneity of *A. fumigatus*. We utilize both clinical isolates and strains obtained by experimental evolution to derive and validate the model, where phenotypic heterogeneity can be explained by transcriptome data.

千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・ リーディング研究育成プログラム

「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」

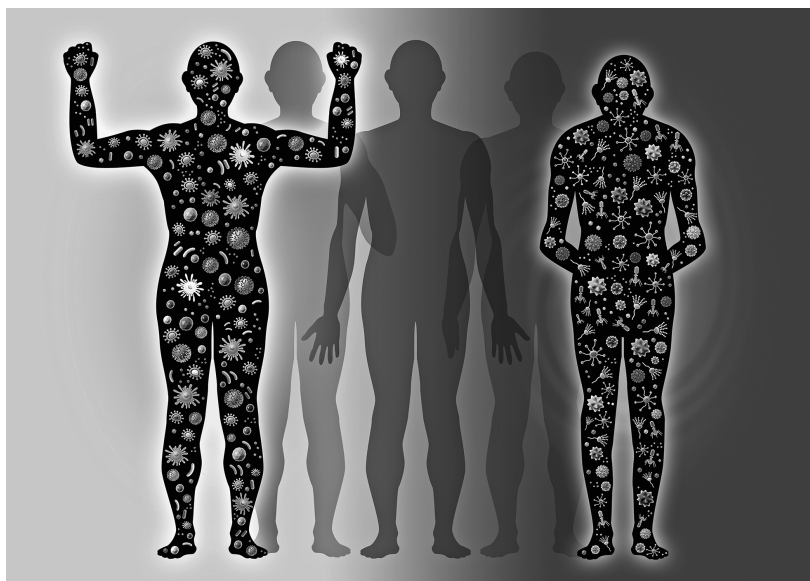
Leading Research Promotion Program, Institute for Global Prominent Research

Advanced Research of Infection and Immunity Based on Integrative Understanding of Host-Microbe Interactions

千葉大学では、学内での研究の核となる新たな研究グループの創出を目指す「グローバルプロミネント研究基幹」を設置しており、当センター教員が中心となった研究プロジェクト「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」が、リーディング研究育成プログラムに採択され、活動を実施している。本プログラムでは、感染免疫分野の教員が中心となり、医学研究院、薬学研究院、附属病院の研究者と連携し、共生微生物と宿主である個体の免疫システムとの相互作用、そこへ侵入する病原体による恒常性の破綻と感染症の発症機序などについての基礎研究を、皮膚、呼吸器、消化器など各種器官でのモデル実験系を用いて解析し、そこから得られる成果を統合的に理解することで、感染症・免疫制御の分子メカニズムを明らかにする次世代型の「感染制御学」を創出し、我々の健康維持と感染症などの

克服へつながる新規イノベーション創生を目指している。

The research group, composed of the researchers in MMRC, School of Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and University Hospital, was selected as the Leading Research Promotion Program of Chiba University. The members focus on the understanding of molecular interactions between hosts and microbes, especially commensal fungi and bacteria, using the model assay systems targeting the skin, respiratory, and digestive organs. The members aim to reveal the molecular machinery underlying the disruption of homeostatic balance in the hosts by invasive pathogens, which induce infectious diseases. The findings obtained from the project will help to create innovative achievements in therapeutics of infectious diseases and lead to the improvement of human health.



平成30年度 共同利用・共同研究報告

2018 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '18-1

Clostridium difficile 感染抵抗性における宿主粘膜炎糖鎖修飾の役割

鎌田信彦

(Division of Gastroenterology, University of Michigan Medical School)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

The role of host glycosylation in the prevention of *Clostridium difficile* infection

Nobuhiko Kamada

(Division of Gastroenterology, University of Michigan Medical School)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ヒト腸内の常在細菌叢は *Clostridium difficile* 感染抵抗性に重要な役割を果たしており、抗生剤の乱用は本病原細菌により惹起される偽膜性腸炎のリスクと密接に関連している。申請者らの研究グループは、真菌医学研究センター後藤義幸准教授のグループと共に、腸内細菌の定着により活性化される宿主 Interleukin (IL)-22 が宿主粘膜炎上皮・粘液の糖鎖修飾を介して *Clostridium difficile* 感染抵抗性に重要であることを見出した。IL-22 刺激による宿主糖鎖修飾は腸内細菌叢の構成を変化させ、*C. difficile* の腸管内増殖に必要なコハク酸やアミノ酸といった腸管内代謝物濃度を減少させることが分かった。その結果、*C. difficile* は腸管内で効率よく増殖・定着できず、感染を成立させることができない。本共同研究成果は現在、国際誌に原著論文として投稿中である。また、ヒトの腸内には細菌以外に真菌も常在しており、特に日本人の腸内には *Candida albicans* や *Saccharomyces cerevisiae* が存在すること

が知られている。本研究で、Fut2欠損マウスに *C. albicans* を経口投与しても野生型マウスと同様に腸管から排除された。このことから、腸管上皮細胞における糖鎖 α 1, 2-フコースは *C. albicans* の腸管定着には影響しないと考えられた。一方、申請者は後藤准教授と共同で、腸内細菌が *C. albicans* の腸管における定着を阻害する機能を有していることを見出した。

発表論文

- 1) Matsuo, K., Haku, A., Bi, B., Takahashi, H., Kamada, N., Yaguchi, T., Saijo, S., Yoneyama, M., Goto, Y. (2019). Fecal microbiota transplantation prevents *Candida albicans* from colonizing the gastrointestinal tract. *Microbiol Immunol.* 63(5), 155-163.

研究課題 '18-2

感染に応答した自然免疫誘導の分子機構の解析

藤田尚志・加藤博己

(京都大学ウイルス・再生医科学研究所)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Innate immune responses against pathogen infection

Takashi Fujita, Hiroki Kato

(Institute for Frontier Life and Medical Science, Kyoto University)

Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究では、高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において重要な役割を担うウイルス感染センサーである RIG-I-like 受容体 (RLR) に着目し、それらによ

るウイルスRNA検知の分子機構と生理機能について継続して解析を行っている。2018年度には、これまで行ってきた細胞内ストレス顆粒 (SG) の形成を介したRLR活性化の分子機構について、昨年度までに同定したSGに局在する新規RNA結合タンパク質 (RBP) についての機能解析を進めた。CRISPR/Cas9系を用いたこの分子のノックアウトマウスを作出し、*in vivo*における抗ウイルス応答への関与について検討したところ、A型インフルエンザウイルス感染に応答したI型インターフェロン (IFN) 遺伝子誘導が有意に減弱していることを示唆する結果が得られたことから、この分子が抗ウイルス応答を正に制御する因子であることが強く示唆された。現在並行して、RBPである当該分子が、どのような分子と会合しているのかについての生化学的な解析および結合するRNAの網羅的な解析を含め、どのように抗ウイルス応答シグナルに関与しているかについて解析を実施している。一方で、学習院大学のグループとの共同研究で、RLRの下流のシグナルアダプター分子であるIPS-1が、ウイルス非感染時に不活性型で維持されるために必要な分子内ドメインの同定を行い、当該分子が分子内相互作用を介して自己活性化の抑制を行うという分子機構を明らかにし、論文投稿を行い、2019年度内での論文報告を目指している。

研究課題 '18-3

新興強毒性真菌 *Cryptococcus gattii* の高病原性機序の免疫学的解析

川上和義・石井恵子

(東北大学大学院医学系研究科)

亀井克彦・川本 進

(千葉大学真菌医学研究センター)

Immunological analysis of a mechanism for high pathogenicity of *Cryptococcus gattii*

Kazuyoshi Kawakami, Keiko Ishii

(Tohoku University Graduate School of Medicine)

Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

1999年にカナダのバンクーバー島で *Cryptococcus gattii* によるクリプトコックス症のアウトブレイクが発生し、その後アメリカ合衆国の北西沿岸地域を中心に拡大しつつある。2007年には、わが国でも国内感染と考えられる *C. gattii* によるクリプトコックス症例が報告され、その後も症例が増加している。通常の *C. neoformans* によるクリプトコックス症と異なり、健常者でも中枢神経感染症を発症し、その高い致死率から高病原性クリプトコックス症とも呼ばれており、今後新興感染症として重要な問題に発展することが懸念される。本研究では、*C. gattii* と *C. neoformans* に対する免疫応答性を比較することで、本感染症の病態解明の手掛かりを探ることを目的とした。

これまでに我々は、本真菌の病原性に重要な莢膜多糖とC型レクチン受容体のDectin-2との応答性を解析し、以下のことを明らかにした。1) *C. neoformans* 由来ではDectin-2への結合性、Dectin-2レポーター細胞の活性化、骨髄由来樹状細胞の活性化を示したのに対して、*C. gattii* 由来ではいずれの活性も低下していた。2) ConAに結合する莢膜多糖成分として galactoxylomannan (GalXM), mannoprotein (MP) が知られているが、抗GalXM抗血清、精製GalXMを用いた解析から目的の活性はGalXMとは異なる可能性が示唆された。3) 本真菌の主要なMPである chitin deacetylase によってDectin-2レポーター細胞の活性化が観察された。これらの結果から、本真菌の細胞壁多糖とDectin-2との相互作用が病原性の違いに関与する可能性が示唆された。

樹状細胞は、抗原を提示することでナイーブT細胞を活性化し、感染防御に重要なTh1細胞への分化を誘導する。その第一ステップとして、樹状細胞による本真菌の貪食が重要となる。そこで本研究では、両真菌種の病原性の違いに、樹状細胞による本真菌の貪食へのDectin-2の役割を解析することにした。野生型 (WT) マウスに比べDectin-2遺伝子欠損 (KO), CARD9KOマウス由来の骨髄由来樹状細胞による *C. neoformans* の貪食は有意に低下した。また、*C. neoformans* より精製されたDectin-2リガンドを添加することで貪食は抑制された。シグナル伝達分子のSykを阻害するとDectin-2存在下でのみ貪食の抑制がみられ、PI3Kを阻害すると貪食が完全に抑制された。貪食に重要なアクチン重合をサイトカラシンDによって阻害すると、*C. neoformans* の貪食は完全に抑制され、貪食時にみられるアクチン重合はWTマウスに比

べて Dectin-2KO マウスで有意に低下した。

以上の結果より, Dectin-2は *C. neoformans* に対してスカベンジャー受容体のように直接的に貪食を誘導する可能性が示唆された。さらに, Dectin-2がアクチン重合及び貪食を誘導する際に Syk-PI3K を介したシグナル伝達経路が重要なことも示唆され, *C. neoformans* 感染免疫応答における Dectin-2の新たな機能が明らかとなった。

研究課題 '18-4

白癬菌が産生する二次代謝産物の体系的解析研究

萩原大祐

(筑波大学生命環境系)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Functional analysis of secondary metabolism in dermatophytic fungi

Daisuke Hagiwara

(Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

足白癬(水虫)などの原因となる皮膚糸状菌 *Trichophyton* 属が産生する二次代謝化合物に関して, 現在までにほとんど知見が無く, 皮膚感染における本属菌の分泌代謝物の役割は全く不明である。本研究はその端緒を拓く基盤情報を提供することを目的とし, 1) 利用可能な複数の *Trichophyton* 属菌ゲノムから, 二次代謝遺伝子を同定し, 比較, 分類する。2) 培養液から抗菌活性など活性を示す物質の単離を行う。3) ゲノム, トランスクリプトームデータと照合して該当する生合成遺伝子の同定を目指す。

ゲノム情報が利用可能であった, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* の5菌種の二次代謝コア遺伝子(NRPS, PKS, PKS-NRPS)を同定した。その結果, それぞれ計29, 32, 28, 44, 36個の因子が見出された。続いて, 千葉大学真菌医

学研究センター所蔵の各菌の臨床分離株をサブロー寒天培地で培養し培養抽出物を用いて枯草菌に対する抗生物質活性を試験した。その結果, *M. canis*を除く菌株の培養抽出物に活性が認められた。*T. rubrum*において本活性を示す画分を分離精製し, 精密質量や評品との比較などから本化合物が viomellein であることが明らかになった。Viomelleinは赤色色素化合物であり, 肝腎毒性, 抗グラム陽性細菌活性, 殺虫性などが報告されている。これまでに, *Aspergillus ochraceus*や *Penicillium citreoviride*などから産生の報告があるが, 白癬菌による産生は初めて確認された。また, 枯草菌に活性を示した他の3種でも, 同様に培養液中に viomellein の産生が認められた。

*T. rubrum*をサブロー寒天培地に植えて, シールでシャーレの通気を遮断した場合, 本化合物の産生は阻害された。また, サブロー液体培地での培養においても, viomellein の産生は認められなかった。そこで, これらの産生条件および非産生条件における培養菌体からRNAを抽出し, RNA-sequencing解析を行い, viomellein生合成遺伝子の推定を試みた。その結果, 29個の二次代謝コア遺伝子のうち5つが化合物の産生量に相関した発現パターンを示し, これらのうち構造的に可能性の高いPKS遺伝子を2つ見出している。今後, この2つの遺伝子が viomellein の生合成に関与しているか検証する予定である。

研究課題 '18-5

Antifungal drug resistance in *Candida glabrata* from transcriptional control to drug extrusion: aiming improved diagnosis and therapeutics

Miguel C Teixeira

(Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico/Bioengineering Department)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

In order to new molecular mechanisms behind azole resistance, a transcriptomics analysis of the evolution of a *Candida glabrata* clinical isolate (isolate 044) from azole susceptibility to posaconazole resistance (21st day), clotrimazole resistance (31st day), and fluconazole and voriconazole

resistance (45th day), induced by longstanding incubation with fluconazole, was carried out. All the evolved strains were found to accumulate lower concentrations of azole drugs than the parental strain, while the ergosterol concentration remained mostly constant. However, only the population displaying resistance to all azoles was found to have a gain-of-function mutation in the *C. labrata PDR1* gene, leading to the upregulation of genes encoding multidrug resistance transporters. Intermediate strains, exhibiting posaconazole/clotrimazole resistance and increased fluconazole/voriconazole MIC levels, were found to display alternative ways to resist azole drugs. Particularly, posaconazole/clotrimazole resistance after 31 days was correlated with increased expression of adhesin genes. This finding led us to identify the Epa3 adhesin as a new determinant of azole resistance. Besides being required for biofilm formation, Epa3 expression was found to decrease the intracellular accumulation of azole antifungal drugs. Altogether, this work provides a glimpse of the transcriptomics evolution of a *C. glabrata* population toward multiazole resistance, highlighting the multifactorial nature of the acquisition of azole resistance and pointing out a new player in azole resistance.

発表論文

- 1) Cavalheiro, M., Costa, C., Silva-Dias, A., Miranda, IM., Wang, C., Pais, P., Pinto, SN., Mil-Homens, D., Sato-Okamoto, M., Takahashi-Nakaguchi, A., Silva, RM., Mira, NP., Fialho, AM., Chibana, H., Rodrigues, AG., Butler, G., Teixeira, MC. (2018). A Transcriptomics Approach To Unveiling the Mechanisms of *In Vitro* Evolution towards Fluconazole Resistance of a *Candida glabrata* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 63(1).

研究課題 '18-6

タイプ別アゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* 検出法の開発

豊留孝仁

(帯広畜産大学獣医学研究部門)

亀井克彦・渡辺 哲・新居鉄平

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of a simple method to differentiate the type of azole-resistant *Aspergillus fumigatus*

Takahito Toyotome

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Teppei Arai

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年, *cyp51A* 遺伝子のプロモーター領域に繰り返し配列(繰り返し塩基数によりいくつかのタイプに分類される)を獲得したアゾール耐性 *Aspergillus fumigatus* が海外の野外環境で拡散を続けており, 日本国内でもこれら耐性菌による感染症症例報告が増加している. アスペルギルス症の原因菌がアゾール耐性か否かを知ることは初期治療の薬剤選択に重要な情報となるが, 現在利用可能な迅速・簡便な検査方法は限られている. Toyotomeらはこれまでに繰り返し配列をターゲットとした検査法を開発してきた (*Med. Mycol.*, 2018). 本法によって繰り返し配列の有無により全タイプの耐性菌を検出することが出来る. 一方でどのタイプであるかを決定することは出来ない. そこで本研究では各タイプに付随して存在する塩基置換をサイクリングプローブ法を用いて検出する方法を検討した.

34塩基対繰り返し配列とともに存在するL98H変異もしくは46塩基対繰り返し配列とともに存在するY121FおよびT289A変異を標的として, プライマーセットおよびプローブを設計した. これらプライマーセットおよびプローブ, 増幅により得られた標的配列を用いて変異の検出を試みたところ, 標的配列が数十コピーという少コピー数でも検出することが可能であった. また, 感受性株および耐性株のゲノムDNAを用いた検討においても対象配列内変異を特異的に検出することが可能であった. このように本法を用いることにより各繰り返し配列タイプとともに現れる変異を特異的に検出することが可能であった. 更に既報の繰り返し配列を検出する方法と組み合わせることにより, より確実な耐性菌検出とどのタイプであるかを決定できるという二つのメリットを得られ

ると期待する。

研究課題 '18-7

*Cryptococcus neoformans*のユニークなゲノム維持機構を標的とした新規治療戦略の開発に向けて(その2)

松浦 彰

(千葉大学大学院理学研究院)

渡邊凌人

(千葉大学理学部)

高橋弘喜・亀井克彦・川本 進・東江昭夫

(千葉大学真菌医学研究センター)

Towards development of novel therapeutic strategies targeting the unique mechanism of genome maintenance in *Cryptococcus neoformans*

Akira Matsuura

(Graduate School of Science, Chiba University)

Ryoto Watanabe

(Faculty of Science, Chiba University)

Hiroki Takahashi, Katsuhiko Kamei, Susumu Kawamoto, Akio Toh-e

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

*Cryptococcus neoformans*は環境に常在する担子菌酵母であり、主に免疫機能の低下した人に感染し重篤なクリプトコックス症を引き起こす日和見感染真菌として知られている。本菌は、染色体末端に存在するテロメア配列の維持に関連するユニークな性質を有することが報告されている (Edman, 1992), 本研究では, *C. neoformans*のこの性質の分子機構を解明し, これを標的とした新規治療戦略の開発を目指している。

これまで, 遺伝学的, 分子生物学的手法によりゲノムDNAを維持・修復する過程を解析し, *C. neoformans*の染色体末端の維持・修復に必須なテロメラーゼの触媒サブユニット *CnEST2* 遺伝子を同定している。さらに, *CnEST2*の欠損細胞が, 一倍体で致死性を示すという, ユニークな現象を発見した。他の多くの生物種では,

テロメラーゼの欠損は直ちには致死とはならないことから, この違いが *C. neoformans* 特異的な治療戦略として利用できる可能性がある。

既知のヒトテロメラーゼ阻害剤を増殖中の *C. neoformans* に投与したところ, *CnEST2* 遺伝子のコピー数と関連して増殖の低下がみられた。しかし, その増殖阻害活性は治療に用いるには十分ではなかったため, 本年度は以下の二つの戦略で研究を進めた。

① テロメラーゼホロ酵素を構成するRNAコンポーネントの同定: テロメラーゼの試験管内活性には, テロメラーゼ触媒サブユニット (*C. neoformans*では *CnEst2*) に加えてRNAコンポーネントが必須である。RNAコンポーネントをコードする遺伝子を単離し, 取り扱いが容易な多細胞種 (例えば出芽酵母 *S. cerevisiae*) で組換え体を発現させることで, *C. neoformans* テロメラーゼ特異的な阻害剤のスクリーニング系を構築することを目指した。鋳型配列として想定される十塩基程度の配列を元にゲノムをスクリーニングしたところ, タンパク質に翻訳されない転写産物をコードする, 複数の候補遺伝子が見つかった。そのうちの3遺伝子の破壊株を作成したものの, 単独破壊ではテロメア構造の異常が誘導されなかったため, RNAコンポーネントをコードしていると結論することはできなかった。

② *C. neoformans* テロメラーゼ活性測定法の確立: *C. neoformans* は厚い炭膜を持ち, 高いプロテアーゼ活性を有している。このため細胞抽出液中の酵素活性を測定するのは容易ではなく, 前年度まではテロメラーゼ活性の測定に成功していなかった。細胞破砕法を改変し, さらに活性測定に用いるオリゴヌクレオチドの3'配列を工夫することで, 細胞溶解液中のテロメラーゼ活性を測定することに初めて成功した。

今後, ②で確立した方法により, 増殖阻害活性を指標に単離した *C. neoformans* テロメラーゼ阻害剤候補の中から, より阻害活性の高い化合物を探索する予定である。

研究課題 '18-8

Candida glabrata 糖鎖合成遺伝子欠損株の自然免疫系との反応性の解析

柴田信之・佐々木雅人・伊藤文恵・田中 大

(東北医科薬科大学感染生体防御学教室)

知花博治・山口正視

(千葉大学真菌医学研究センター)

Reactivity of an innate immune system with carbohydrate transferase deletion mutant of *Candida glabrata*

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Ito,
Yutaka Tanaka

(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana, Masahi Yamaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原真菌の細胞壁は、宿主との接点であり免疫応答性に大きな影響を及ぼす。*Candida glabrata*の細胞壁糖鎖生合成に関与する各種の遺伝子欠損株について細胞壁の構造および性質の解析をこれまで続けてきた。今回は特に大きく変化の見られた *alg6*Δ株と *mnn2*Δ株について細胞壁に与える影響を詳細に解析した。*alg6*Δ株はSDS, Calcofluor white等の薬剤感受性、β-1,3-グルカナーゼ感受性が上昇し、TEMでもマンナン層が薄く不鮮明になっていた。しかし、micafunginおよびキラートキシンに対する感受性は逆に低下し、キチン含量は野生株の2倍以上に増加していた。*alg6*Δ株はマンナンの構造に変化が見られなかったが分子サイズは低下していた。*mnn2*Δ株はマンナンの側鎖が失われα-1,6-結合の直鎖構造に変化していた。しかし、薬剤感受性等に著しい変化は見られなかった。カイコを用いた感染実験の結果、*alg6*Δ株は野生株と比較して大きく病原性の低下していることが明らかとなった。これらの結果は特に*alg6*Δ株では細胞壁合成系の酵素活性の低下が生じ、細胞壁 integrity の低下から病原性の低下につながっていることを示唆している。以上のように細胞壁構築不全に関連する遺伝子は、抗真菌薬の新たなターゲットとなる可能性を示唆している。

研究課題 '18-9

*Aspergillus fumigatus*の病原性におけるガラクトフラノース含有糖鎖の機能解析

岡 拓二

(崇城大学応用微生物工学科)

萩原大祐

(筑波大学生命環境系)

亀井克彦・渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

田中 大・柴田信之

(東北薬科大学感染生体防御学研究室)

Functional analysis of galactofuranose-containing oligosaccharides in the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*

Takuji Oka

(Department of Applied Microbial Technology, Sojo University)

Daisuke Hagiwara

(Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Yutaka Tanaka, Nobuyuki Shibata

(Department of Infection and Host Defense, Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

研究成果

糸状菌の細胞壁を覆う真菌型ガラクトマンナン (FTGM) のマンナン主鎖の生合成を担う酵素の同定を試みた。申請者らは、これまでにGfsAがFTGM中のガラクトフラン側鎖の生合成を担うβ-1,5-ガラクトフラノース転移酵素であることを明らかにしてきた。しかし、FTGM中のマンナン主鎖の生合成を担う酵素は不明であった。病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* におけるマンナン主鎖生合成の候補遺伝子 *cmsA* 及び *cmsB* の遺伝子破壊株よりFTGMを抽出し、NMRによる構造解析およびゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量の定量を行ったところ、*cmsA* 及び *cmsB* の遺伝子破壊株由来のFTGMではマンナン主鎖

の構造が失われていることが明らかになった。また、組換え酵素 CmsA は GDP-マンノースを糖供与体として非還元末端のマンノース残基の 2 位の水酸基にマンノースを転移する酵素活性を有していた。CmsA はパラニトロフェノール-マンノース、 α -(1 \rightarrow 2)-マンノビオースおよび α -(1 \rightarrow 6)-マンノビオースを受容基質とすることができ、 α -(1 \rightarrow 6)-マンノビオースに対する比活性は α -(1 \rightarrow 2)-マンノビオースに対する比活性の 31 倍であった。以上のことから、CmsA および CmsB は FTGM のマンナン主鎖の生合成を担う α -(1 \rightarrow 2)-マンノース転移酵素であることを明らかにすることができた。cmsA 及び cmsB の遺伝子破壊株は、菌糸伸長速度および分生子形成能が著しく低下していた。また、菌糸を観察すると菌糸が膨潤した構造が高頻度に観察された。このことは、FTGM のマンナン主鎖が糸状菌の正常な細胞壁形成や分化に必要な不可欠な多糖であることを示している。

発表論文

- 1) Ota, R., Okamoto, Y., Vavricka, C.J., Oka, T., Matsunaga, E., Takegawa, K., Kiyota, H., Izumi, M. (2019). Chemo-enzymatic synthesis of *p*-nitrophenyl β -D-galactofuranosyl disaccharides from *Aspergillus* sp. fungal-type galactomannan. Carbohydr Res. 473, 99-103.
- 2) Onoue, T., Tanaka, Y., Hagiwara, D., Ekino, K., Watanabe, A., Ohta, K., Kamei, K., Shibata, N., Goto, M., Oka, T. (2018). Identification of two mannosyltransferases contributing to biosynthesis of the fungal-type galactomannan α -core-mannan structure in *Aspergillus fumigatus*. Sci Rep. 8, 16918.

研究課題 '18-10

Candida glabrata におけるマイトファジー関連遺伝子 ATG32 の転写活性化領域の同定

名木 稔

(国立感染症研究所)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Identification of promoter regions of *Cg*ATG32 in *Candida glabrata*.

Minoru Nagi

(National Institute of Infectious Diseases)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原真菌 *Candida glabrata* のミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) は、鉄欠乏条件において活性化する事が報告されているが、その活性調節機構は不明である。鉄欠乏条件においてマイトファジーに必須な遺伝子である ATG32 の発現量が増加することがわかっており、ATG32 の遺伝子発現調節によってマイトファジーの活性調節を行っていることが予想される。30 年度は、ATG32 の発現調節機構解明を目的とし、ATG32 の転写活性化に必要な領域の同定を試みた。まず、5'-RACE 法により、ATG32 の転写開始点が 1st ATG から 199 bp 上流部位であることを明らかにした。次に、ATG32 上流領域を用いたレポーターアッセイを行い、ATG32 の鉄依存的転写抑制因子結合配列を同定した。さらにこの配列を用いてゲルシフトアッセイを行い、鉄依存的にこの配列に結合するタンパク質の存在を確認し、初年度の研究目標を達成することができた。現在、質量分析を行い、この領域に結合するタンパク質の同定を試みており、前倒しで研究が進行中である。

研究課題 '18-11

自然免疫応答が RNA サイレncing による遺伝子ネットワークを制御する機構の解析

程久美子・高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of mechanism for regulating RNA silencing-mediated gene expression network by innate immune response

Kumiko Ui-Tei, Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) は、細胞内へ侵入したウイルスを外来のRNAと区別して感知する細胞内ウイルスセンサータンパク質の一つであり、ウイルスに対する初期応答システムとして重要な、自然免疫において機能すると想定されてきた。しかし、LGP2は下流因子へのシグナル伝達ドメインをもたないことから、その機能は不明であった。我々は、LGP2がRNAサイレンシング促進因子である TAR-RNA binding protein (TRBP) と相互作用し、RNAサイレンシング機構を制御することで、生体防御機構において機能することを見い出した。

TRBPはRNAサイレンシングに関わる Dicer タンパク質と相互作用する二本鎖RNA結合タンパク質であるが、TRBPが二本鎖RNAと結合する部位と同じ部位を介してLGP2と相互作用することが明らかになった。すなわち、LGP2はTRBPと相互作用することで、それまでTRBPが結合していたmicroRNA (miRNA) を遊離させる。TRBPと結合していたmiRNAを、TRBPを用いたRNA免疫沈降シークエンスにより同定したところ、TRBPは特徴的な二次構造を形成するmiRNAと結合しやすいことがわかった。これらのmiRNAはTRBPから遊離放出されることで、前駆体miRNAから成熟型miRNAへの生合成が阻害される。そのため、これらのmiRNAが制御する標的遺伝子は、LGP2の誘発によって、発現が増加することになる。このような発現増加する遺伝子群を情報科学的に推定し、実際に発現が上昇した遺伝子群を特定すると、アポトーシスに関連する遺伝子群であることがわかった。すなわち、LGP2は、TRBPとの相互作用を介して、ウイルス感染におけるアポトーシスという生体防御機構を制御しているウイルスセンサーであると考えられる。

発表論文

- 1) Takahashi, T., Nakano, Y., Onomoto, K., Yoneyama, M., Ui-Tei, K. (2018). Virus sensor RIG-I represses RNA interference by interacting with TRBP through LGP2 in mammalian cells. *Genes (Basel)* 9, 511.
- 2) Takahashi, T*, Nakano, Y*, Onomoto, K., Murakami,

F., Komori, C., Suzuki, Y., Yoneyama, M., Ui-Tei, K. (2018). LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 9134-9147. (*same contribution)

研究課題 '18-12

天然化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬の開発研究

五十嵐雅之

(微生物化学研究所第2生物活性研究部)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of antifungal drugs from natural chemical compound library

Masayuki Igarashi

(IMC, Lab. Head, Microbial Chemistry)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究は平成29年度より開始し、今回2年度目の報告となる。本研究計画では、微生物化学研究所が保有する放線菌や真菌由来の天然化合物ライブラリーを分与し、千葉大学真菌医学研究センターにおいて、抗真菌活性物質をスクリーニング、得られた抗真菌活性物質についてヒト培養細胞を用いた毒性試験と薬剤標的分子を同定することを目的としている。平成29年度は、1,000種類の化合物のうち644種類について、一次スクリーニングでは、カンジダ・グラブラータの薬剤高感受性株(薬剤排出ポンプ制御因子欠損株)を用いて生育阻害活性を測定した結果、140サンプルに生育阻害活性(IC₅₀<100μM)が確認された。二次スクリーニングでは、8種類の病原性真菌について、生育阻害活性を測定し、それぞれの菌種について生育阻害活性を測定し、62サンプルを選抜した。例えば興味深い物質の一つに、*Aspergillus fumigatus* のみ活性を持たず、その他の真菌には高い活性を示すサンプルが含まれており、それは*A. fumigatus*が産生するグリオトキシンであった。平成30年度は、1,000種類の化

化合物のうち残る356サンプルの一次スクリーニングならびに二次スクリーニングを実施し、41サンプルを選抜し、前年度分を合わせて103サンプルの抗真菌活性物質を見いだすことができた。それら103サンプルについて培養細胞を用いた呼吸阻害活性を測定し、低毒性物質33サンプルを抗真菌薬シーズ候補として選抜した。現在、標的分子同定作業と同工程に必要なサンプル量の調整を進めている。

研究課題 '18-13

病原性真菌が産生する新規分泌性ペプチドの生存戦略における機能解析

梅村舞子

(産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

萩原大祐

(筑波大学生命環境系)

豊留孝仁

(帯広畜産大学獣医学研究部門)

亀井克彦・渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

Survival strategy using secreted peptides in infectious fungi

Maiko Umemura

(Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

Daisuke Hagiwara

(Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

Takahito Toyotome

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々が近年カビで初めて見出したリボソームペプチド生合成経路は、分泌性の環状ペプチドを生合成するもので、その化合物の骨格構造となる前駆体ペプチド (ust-

RiPS因子)はFungi界全体に広く多様に保存されていることが分かってきた。本因子のカビの生存戦略における役割を知るため、本研究では、種俯瞰的かつ詳細なドライ解析に基づく機能推定と、機能発現している本因子の複数の手法による探索を行った。

公共データベース上で利用可能な857株のFungi界ゲノム情報に対して、インハウスアルゴリズムを構築し本因子を探索したところ、ほぼ全ての株に存在し、一株平均2.8個、合計2,423個検出された。化合物の骨格構造となる配列は1,500種類以上に分類され、その3割は酵母接合因子と相同性を持っていた。周辺構造の解析等から、本因子が自身の特定の機能を持つ細胞の分化を誘導する可能性が示唆された。

本因子が他生物に対して機能する可能性を考え、2種類の本因子 (*rps1a*および*rps2a*)を持つ*A. fumigatus*を他の2種類の糸状菌と共培養し、本因子遺伝子発現量の変化を見たところ、*rps1a*では作用させる株に応じて発現量の増減が見られた。一方、ヒト肺上皮細胞への侵入性および免疫抑制マウスへの感染性において有意な作用を示した*rps2a*については、十分な発現誘導が見られなかったことから、*rps1a*と*rps2a*は異なる機能を有する可能性がある。

また本因子が真菌の病原性に作用する可能性を考え、*A. flavus*臨床分離株10株における本因子遺伝子7種類の保存を見たところ、1種類1株での例外を除き、多少の欠損や繰返し回数の違いはあるものの、全10株で保存されていた。うち1株において発現を確認したところ、7種類のうち5つは強く発現しており、本因子の*A. flavus*臨床株における重要性が示唆された。今後、他の病原真菌に対象を広げ、本因子のカビ生存戦略における機能を明らかにしていく予定である。

発表論文

- 1) Ye, Y., Ozaki, T., Umemura, M., Liu, C., Minami, A., Oikawa, H. (2018). Heterologous production of asperipin-2a: proposal for sequential oxidative macrocyclization by a fungi-specific DUF3328 oxidase. *Org Biomol Chem.* 17, 39-43.

研究課題 '18-14

真菌細胞壁成分の認識ならびに自然免疫惹起に 関与する因子の探索

河合太郎

(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研
究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

Search for innate immune receptors for the fungal cell wall component

Taro Kawai

(Graduate School of Science and Technology, Nara
Institute of Science and Technology)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アレルギーや炎症を引き起こす真菌の構成成分キチンに対する自然免疫応答について解析を行った。植物のキチン受容体の一つとして知られる CERK1 受容体のキチン認識モチーフ Lysine motif (LysM) と相同性を示すヒト及びマウスの蛋白質をデータベース検索から 6 種類 (LysM1-6 とする) 見つけ出した。そのうち 4 つは、似たドメイン構造を有することからこれら 4 つに着目して解析を行った。2 種類 (LysM2, 4) を欠損する二重欠損マウスについてはキチン投与後の肺胞洗浄液中の免疫細胞 (好中球, 好酸球, マクロファージ等) の集積や炎症関連遺伝子 (IL-6 等) の発現については野生型と比べ有意な差は認められなかった。また, 今年度は CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により, 4 種類 (LysM1-4) をすべて欠損するクワドロノックアウトマウスの樹立に成功した。今後, このマウス系統の繁殖, 維持を行い, キチン投与後の自然免疫応答を中心に解析を行う。

研究課題 '18-15

メタボローム解析による真菌類の薬剤耐性と 産生成分の調査

細江智夫・武田 尚・若菜大悟

(星薬科大学 薬化学教室)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Correlation between drug resistance and secondary metabolites of fungi by metabolomics

Tomoo Hosoe, Hisashi Takeda, Daigo Wakana

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々は, 薬剤耐性 *Aspergillus fumigatus* を, 化学成分の観点から感受性株と判別することが可能ではないかと考え, その検討を試みている。これまでに, AMPH 耐性及び感受性 *A. fumigatus* を PDB 培地を用い, 25℃ もしくは 5 % CO₂ 条件下 37℃ の 2 種の条件での培養を行い, その代謝産物の ¹H-NMR スペクトルを用いメタボローム解析を行ったところ, 感受性株が特徴的に産生する芳香族化合物由来ピークから感受性株と耐性株の分類が可能と判断した。本年度は, アゾール系抗真菌薬に耐性を有する *A. fumigatus* の隠蔽種である *A. udagawae* 及び *A. viridutans* の培養条件の検討を行った。

A. udagawae 及び *A. viridutans* 各 8 菌株を PDB 培地及び Czapek-Dox yeast extract (CDY) 培地を 2mL ずつ 24 well plate の各 well に分注し, 対象菌を植菌後, 5, 8, 11, 14, 18 および 21 日間培養し, 得られた培養エキスの HPLC 分析を行った。

PDA, CDY 両培地とも培養 1 週間で十分な菌の発育が観測された。PDB 培地培養では培養期間 8 日で主要な産生成分が観測され, さらに培養日数を延長するに従い産生成分量, 種類の増加が観測され, 多くの菌株で培養期間 14 日間ではほぼ定常状態に達していた。また, MIC が 8µg/mL の耐性菌株では感受性菌株とくらべ, 今回の培養期間を通し産生成分が少ない傾向が見られた。

以上から、十分な産生成分を観測するためには培養期間14日間が必要であることが判明した。また、MIC8 μ g/mL以上の耐性菌株では感受性株と比較し明確に産生成分が少ないため、両者を化学成分の観点から分類できる可能性が強く示唆されたため、今後培地種や培養条件等をさらに検討後、メタボローム解析を行うことにより耐性株と感受性株を分類可能な成分の探索を試みる予定である。

研究課題 '18-16

Aspergillus fumigatus およびその関連菌を対象とした抗真菌薬シーズの探索

野中健一

(北里大学北里生命科学研究所)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Search for anti-fungal seeds against *Aspergillus fumigatus* and related species

Kenichi Nonaka

(Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原真菌である *Aspergillus fumigatus* およびその関連菌は薬剤感受性が異なるため、診療の現場のみならず創薬においても正確な分類が求められる。そのため、真菌医学研究センター・バイオリソース管理室で確立された分類法により正確に分類された臨床分離 *A. fumigatus* およびその関連菌 3 種を対象に、北里生命科学研究所・創薬グループが保有する糸状菌ライブラリーを用いて新たな抗真菌薬シード化合物の探索を目的とした。

本年度は、陸上および海洋由来糸状菌600株を4種の培地で培養した糸状菌培養液2,400サンプルを利用し、ペーパーディスク法にて以下の通過基準で抗真菌活性物質の探索を行った。

- ・ 1次スクリーニング通過基準：*A. fumigatus* に対し10 μ L/discで生育阻害を示す

- ・ 2次スクリーニング通過基準：4種の *Aspergillus* に対し10 μ L, 50 μ L/discで濃度依存的に生育阻害を示す

2次スクリーニング通過株の内 *Hypomyces* sp. FKI-9008株, *Penicillium* sp. FKI-9132株, 未同定糸状菌FKI-8979株の計3株から活性物質の単離・構造解析を行った。その結果、新規化合物が1成分、既知化合物が4成分を活性物質として見出した。

また単離化合物ライブラリーについてもスクリーニングを実施した。80化合物で評価した結果、10化合物が1次スクリーニングを通過し、5化合物が2次スクリーニングを通過した。その内の1つが *Trichoderma* sp. FKI-6626株が生産する新規cytosporone類縁体であった。

研究課題 '18-17

ITAM共役受容体Trem2のカンジダ感染防御における役割の解明

原 博満・豊永憲司

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

西城 忍

(千葉大学真菌医学研究センター)

Studies on the role of the ITAM-coupled receptor Trem2 in anti-fungal defense

Hiromitsu Hara, Kenji Toyonaga

(Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

DAPI2会合型ITAM共役受容体であるTrem2のカンジダ感染防御における役割を明らかにするため、Trem2^{-/-}マウスを用いた *Candida albicans* (SC5314株) 感染試験を実施した。その結果、死亡率、感染臓器内菌数およびサイトカイン産生について野生型コントロールマウスと明らかな差は認められなかった。In vitroにおける検討で、Trem2欠損マクロファージはDectin-2リガンド刺激後のサイトカイン産生は増強するが、Dectin-1リガンド刺激での応答は増強しないことから、Trem2はDectin-2に依

存した真菌感染初期防御の制御に重要である可能性がある。これを明らかにするため、今回はDectin-1非依存カンジダ株(ATCC18804)を用いた感染試験を行ってその役割を検討する予定である。

研究課題 '18-18

長万部および寿都産ホタテガイより分離される真菌が産生する二次代謝産物の解析

清水公徳・原田啓樹・久保田雅大
(東京理科大学基礎工学部)
知花博治・高橋 梓
(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of secondary metabolites produced by the filamentous fungi isolated from the scallops collected at Oshamanbe and Suttu

Kiminori Shimizu, Keijyu Harada, Masahiro Kubota
(Department of Biological Science and Technology,
Tokyo University of Science)
Hiroji Chibana, Azusa Takahashi
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

共同研究初年度、岩手県のホタテガイ(成貝)および北海道産のホタテガイ(成貝または稚貝)から中腸腺、腸管、肛門の3つの組織をそれぞれ取り出したのち培地に接種し、真菌を培養・分離した。分離した菌のDNA配列情報を取得し、BLAST解析により菌種同定を行った。その結果、岩手県産ホタテガイの腸管からは、*Geotrichum*属、*Galactomyces*属、*Candida*属、*Wickerhamomyces*属、*Pichia*属、*Trichoderma*属菌が、中腸腺からは、*Penicillium*属菌が、肛門からは、*Penicillium*属と*Wickerhamomyces*属菌が、北海道産ホタテガイ(成貝)の中腸腺は、*Penicillium*属、*Trichoderma*属、*Pichia*属菌が、腸管からは、*Penicillium*属、*Cladosporium*属、*Trichoderma*属、*Rhodotorula*属、*Cystobasidium*属、*Pichia*属、*Debaryomyces*属、*Candida*属、*Rhodospiridium*属、*Trichosporon*属菌が、肛門からは、*Penicillium*属、*Pichia*属、*Candida*属菌が、北海道産ホタテガイ(稚貝)の中腸腺からは、*Penicillium*属、*Pichia*属、*Debaryomyces*属、*Cutaneotrichosporon*属、*Trichosporon*属菌が、腸管からは、

*Penicillium*属、*Cutaneotrichosporon*属、*Trichosporon*属、*Debaryomyces*属菌が、肛門からは、*Trichoderma*属、*Hypocrea*属、*Cladosporium*属、*Trichosporon*属、*Cutaneotrichosporon*属、*Debaryomyces*属菌が分離された。これらの結果より、消化管から分離される菌種に地域的バックグラウンドおよび成貝・稚貝による差は認められず、幅広い真菌種が生息することが確認された。

研究課題 '18-19

新規抗菌剤の体内動態及び薬理評価

椎名 勇
(東京理科大学理学部第一部応用化学科)
亀井克彦・石和田稔彦
(千葉大学真菌医学研究センター)

Pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) analysis of a newly developed antibacterial/antimicrobial agent

Isamu Shiina
(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo University of Science)
Katsuhiko Kamei, Naruhiko Ishiwada
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

東京理科大学理学部第一部応用化学科椎名研究室では2016年に*Eupenicillium shearii*より単離・構造決定されたユーシェアライド天然物(24員環マクロライド)の全合成方法を確立した。また、独自の不斉合成技術によりユーシェアライド類縁体(光学異性体およびジアステレオマー)のライブラリーを構築している。また、2017年には置換基を天然のものから離れた構造に変換した非天然型のユーシェアライド類縁体の合成にも取り組み、数種類の人工化合物の製造を行なった。2016-2017年度までの共同研究では、カンジダやクリプトコッカスなどの真菌とMRSAなどの多剤耐性グラム陽性菌に対するユーシェアライド立体異性体(8種類)の薬剤感受性試験に加え、上記非天然型ユーシェアライドを用いた真菌と細菌に対する薬剤感受性試験を実施した。2018年

度の共同研究では、天然物よりも抗真菌活性と抗細菌活性ともに高い候補化合物を選定し、それを合成し、構造活性相関解析を実施した。また、予備的なPK試験を開始し、マウス投与時の体内残留時間を観測した。

発表論文

- 1) Tonoi, T., Inohana, T., Sato, T., Yoshida, T., Shiina, I. (2018). Total Synthesis and Antimicrobial Activities of All Stereoisomers of (16Z, 20E)-Eushearilide and (16E, 20E)-Eushearilide. *The Journal of Organic Chemistry*. 83(15), 7886-7899.

研究課題 '18-20

マウス感染時に起こる病原細菌遺伝子発現の網羅的解析

高屋明子

(千葉大学・大学院薬学研究院)

後藤義幸・高橋弘喜・山本友子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Transcriptome analysis of *Salmonella* Typhimurium during infection of mouse

Akiko Takaya

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University)

Yoshiyuki Goto, Hiroki Takahashi, Tomoko Yamamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

細胞内寄生細菌であるサルモネラは宿主に長期間持続感染することがあるが、サルモネラの記憶免疫応答からの回避機構については未だ解明されていない。我々が樹立したサルモネラ Lon 欠損株持続感染マウスモデルにより記憶免疫細胞動態を調べたところ、サルモネラによる骨髄IgG分泌プラズマ細胞を特異的に障害する機構を新たに見出した。サルモネラが分泌するタンパク質 SiiE は laminin β 1 と高い相同性を有する領域をもち、この領域が骨髄IgG分泌プラズマ細胞の integrin β 1 とストローマ細胞上の laminin β 1 との相互作用を特異的に阻害するこ

とにより、細胞障害を誘導することが示唆された。更に、SiiE はサルモネラ特異的な IgG 産生を低下させることによりワクチン効果を減弱させることを見出した。以上より、サルモネラは記憶免疫応答を抑制することで持続感染を成立させる機構があることが強く示唆された。

サルモネラの持続感染では、菌は臓器マクロファージ内で生存する。このマクロファージ内環境に反応すると、SiiE の発現が低下した。このことから、サルモネラは SiiE 以外にも記憶免疫応答を制御する因子を有すると考えられる。現在、サルモネラ Lon 欠損株以外のマウスに持続感染する弱毒株を用いて記憶免疫応答制御に関わる因子の同定と分子機構について研究を進めており、更に、持続感染を抑制する宿主因子についても検討している。

発表論文

- 1) Männe, C., Takaya, A., Yamasaki, Y., Mursell, M., Hojyo, S., Wu, TY., Sarkander, J., McGrath, MA., Cornelis, R., Hahne, S., Cheng, Q., Kawamoto, T., Hiepe, F., Kaufmann, SHE., Yamamoto, T., Radbruch, A., Tokoyoda, K. (2019). *Salmonella* SiiE prevents an efficient humoral immune memory by interfering with IgG⁺ plasma cell persistence in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 116(15), 7425-7430.
- 2) Takaya, A., Takeda, H., Tashiro, S., Kawashima, H., Yamamoto, T. (2019). Chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Biol Chem*. 8 ;294(10), 3783-3793.
- 3) Imamura, K., Takaya, A., Ishida, Y., Fukuoka, Y., Taya, T., Nakaki, R., Kakeda, M., Imamachi, N., Sato, A., Yamada, T., Mizutani, R., Akizumi, G., Tanu, T., Tao, K., Miyao, S., Suauki, Y., Nagahama, M., Yamamoto, T., Jensen, T., Akimitsu, N. (2018). Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. *EMBO J*. 37(13).

研究課題 '18-21

未利用微生物を素材とした新しい抗真菌薬シーズの探索

久保田高明

(昭和薬科大学)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Search for new antifungal drug seeds from unutilized microorganism

Takaaki Kubota

(Showa Pharmaceutical University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

海綿動物からは多くの生物活性天然物が単離、構造決定されており、それらをもとに新たな医薬品が開発されている。近年、メタゲノム解析により、これら生物活性天然物の真の生産者は海綿動物に共生する難培養性微生物であることが明らかになってきている。一方、微細藻類の一群である渦鞭毛藻は、他の生物種からは得られない特異な化学構造のマクロリドを生産するにも関わらず、医薬品シード化合物探索の素材としてあまり注目されていない。今回、沖縄で採取した数種の実海綿動物および渦鞭毛藻を対象に、深在性真菌症の原因真菌に対して抗真菌活性を示す新たな生物活性天然物の探索を行った。

その結果、Amphimedon属海綿から1個の新規ピリジンアルカロイドを、Theonella属海綿から1個の新規ポリケチドを、Symbiodinium属渦鞭毛藻から1個の新規マクロリドを、Stylissa属海綿から1個の新規環状ペプチドを、Plakortis属海綿から1個の新規ポリケチドを、Amphidinium属渦鞭毛藻から4個の新規ポリケチドを、Suberea属海綿から2個の新規プロモチロシナルカロイドを、Agelas属海綿から1個の新規ジテルペンアルカロイドを、Halichondria属海綿から1個の新規ステロイドを、それぞれ単離、構造決定した。

現在、これらの新規化合物および同時に得られた既知化合物の、深在性真菌症原因真菌に対する抗真菌活性の

評価に向けて準備を進めている。

研究課題 '18-22

アスペルギルスのバイオフィーム形成および抗真菌薬耐性に関連する新規遺伝子群の探索

梅山 隆・宮崎義継

(国立感染症研究所)

高橋弘喜・亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Screening of novel genes involved in biofilm formation and antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*

Takashi Umeyama, Yoshitsugu Miyazaki

(National Institute of Infectious Diseases)

Hiroki Takahashi, Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

深在性真菌症の中でも *Aspergillus fumigatus* を主要病原菌とするアスペルギルス症は増加傾向にあり、予後が非常に悪い。近年、アスペルギルスのバイオフィーム形成がアスペルギルス感染に関与することが示唆されている。特にアスペルギローマの菌糸塊に見られる菌糸周囲には厚い細胞外マトリクスが観察されている。このようなバイオフィームを形成する状態では、いくつかの抗真菌薬に対する感受性が低下する現象が示され、難治性の原因の1つになっていると考えられる。しかしながら、バイオフィーム形成、および、それによる抗真菌薬耐性の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、バイオフィーム形成に関わる新規遺伝子を同定し、抗真菌薬耐性との関連性を明らかにすることを目的とする。平成30年度では、Cas9/CRISPRゲノム編集技術による変異導入の効率を上げるためのプラスミドベクターを開発した。

昨年度まで、Cas9/CRISPRゲノム編集技術を *A. fumigatus* で応用し、次世代シーケンサーと組み合わせたCRISPRスクリーニングを行うことによって、血清存在下の生育に必須と予想される遺伝子の取得を試みていたが、最終

的に望む遺伝子の取得には至らず、その理由な1つとして、変異導入の効率が低いことが考えられた。そこで、プラスミドベクターの改良を行い、変異導入の高効率化を試みた。従来のプラスミドベクターではsingle-guided RNA (sgRNA) を発現するためのプロモータとして出芽酵母のSNR52プロモータを使用していたが、sgRNAの発現量を上げるために、tRNAをsgRNAと融合させ、転写後のプロセッシングによりsgRNAを生成させた。分生子の緑色の色素生産を担う*pksP*遺伝子への変異導入による色素の消失を指標として、改良ベクターの変異導入効率を比較したところ、従来のベクターでの8.3%に対し、改良ベクターでは93%にまで飛躍的に向上していた。この結果から、sgRNAの発現量が、CRISPR/Cas9による変異導入には必要であることが示唆された。

今後、Cas9/CRISPRによる変異導入の効率を上げたプラスミドベクターを用いて、新しく遺伝子ライブラリを作製し、CRISPRスクリーニング法を確立することにより、血清刺激に応答するシグナル伝達機構の解明を目指す。

発表論文

- 1) Umeyama, T., Hayashi, Y., Shimosaka, H., Inukai, T., Yamagoe, S., Takatsuka, S., Hoshino, Y., Nagi, M., Nakamura, S., Kamei, K., Ogawa, K., Miyazaki, Y. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing to demonstrate the contribution of Cyp51A Gly138Ser to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(9), e00894-18.

研究課題 '18-23

Aspergillus 呼吸器検体臨床分離株の菌種同定・薬剤感受性の検討

武田啓太・鈴木純子

(独立行政法人国立病院機構東京病院)

渡辺 哲・亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Species identification and antifungal susceptibility of *Aspergillus* species from the lower respiratory tract

Keita Takeda, Junko Suzuki

(National Hospital Organization Tokyo National Hospital)

Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

【目的】下気道検体による真菌培養で *Aspergillus section Nigri* と形態学的に同定された症例の細菌学的、臨床的特徴を検討する。

【対象と方法】2012年2月-2017年1月に東京病院で下気道検体から *Aspergillus section Nigri* が検出された44検体(43症例)について Internal transcribed spacer 領域, Domein1/Domein2 領域, β -tubulin 遺伝子を解析して菌種を同定し, Clinical and Laboratory Standards Institute M38 3rd edition に準じてアゾール系抗真菌薬の薬剤感受性試験を行い, 臨床背景を検討した。

【結果】菌種同定では *A. welwitschiae* が50%を占め, 次いで *A. tubingensis* が38.6%, *A. niger* が9.1%, *A. wvarum* が2.3%であった。MICがepidemiologic cutoff valuesを超えていたのは *A. tubingensis* 70.6%, *A. welwitschiae* 4.5%で, いずれもアゾール使用歴の影響は認めなかった。全43症例の病型はcolonizationが24例, 慢性肺アスペルギルス症(CPA)は17例, アレルギー性気管支肺アスペルギルス症が2例であった。Colonizationは *A. welwitschiae* が72.7%, CPAは *A. tubingensis* が58.8%と有意に多く検出された。

【結論】病型により *Aspergillus section Nigri* の菌種割合が異なることが示された。CPAでアゾール系抗真菌薬に多くが低感受性である *A. tubingensis* の割合が高いことは治療選択に注意が必要であることを示唆している。

研究課題 '18-24

マウス細菌性肺炎モデルにおけるシベレスタットとトロンボモジュリンによる炎症反応制御

渡邊栄三

(千葉大学大学院医学研究院総合医科学講座)

川口留以

(千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Regulation of inflammatory response with sivelestat and thrombomodulin in murine bacterial pneumonia model

Eizo Watanabe

(General Medical Science, Chiba University)

Rui Kawaguchi

(Emergency and Critical Care Medicine, Chiba University)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

マウス肺炎球菌肺炎モデルにおけるリコンビナント・トロンボモジュリン (rTM) の敗血症病態への効果を明らかにする目的で、マウスに肺炎球菌を気管内に注入し肺炎モデルを作成し検討を行った。肺炎モデルマウスに対し菌液 ((血清型19A) 2×10^7 CFU) 投与 3 時間後に rTM (10mg/kg BW) を腹腔内投与し、菌液投与24時間後に犠死させたマウスにおいて、rTM投与の有無につき、電子顕微鏡を用いて肺血管内皮細胞表面の glycoalyx layer の形態学的評価を行った。肺組織に対しては、硝酸ランタン含有固定液による灌流固定後、浸漬固定を施し、脱水・樹脂包埋処置を経て作成した超薄切片を、酢酸ウラニルで電子染色して観察した。その結果、rTM投与によって、肺炎球菌肺炎の肺血管内皮細胞表面における glycoalyx layer は、非投与の個体よりも温存される傾向を認めた。前年度までの結果から、同肺炎モデルにおいて、glycoalyx layer を構成する糖鎖のひとつである Syndecan-1 の血中濃度は、rTM投与によって有意に低下していることも判明しており、今回形態学的にその現象の裏付けが得られた。さらに、rTM投与によって血清 TNF, IL-10濃度はいずれも低下傾向であり、肺血管内皮および血球系細胞群の Flow Cytometry 解析では、rTM投与によって TNF 発現率は低下、IL-10発現率は上昇傾向を示していた。したがって、同肺炎モデルに対する rTM の抗炎症作用は、glycoalyx layer 障害の軽減にも寄与している可能性が示唆された。

研究課題 '18-25

千葉大学が保有するオリジナル化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬シーズの開発

荒井孝義

(千葉大学大学院理学研究科)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of antifungal seeds from chemical compound library owned by Chiba University

Takayoshi Arai

(Graduate School of Science, Chiba University)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本研究課題は、製薬企業の参画が生じたため情報開示事項を制限し報告する。

千葉大学が保有する合成化合物620サンプルのうち、12サンプルについて、*Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* に対する抗真菌活性 (IC₅₀<50μM) が認められた。それらサンプルのうち5サンプルでは、HepG2 (ヒト肝癌細胞) に対する毒性 (IC₅₀>400μM) が確認されず、4サンプルでは弱い毒性 (IC₅₀=100-400μM)、3サンプルで強い毒性が見られた (IC₅₀<80μM)。標的分子迅速探索法によって標的分子を解析したところ、2化合物については、各々 RNA ポリメラーゼ I とリボゾームタンパクを示唆する結果が得られた。それ以外の3化合物については、標的分子を示唆する結果が得られなかった可能性として、コード遺伝子が生育必須ではないか、あるいはタンパク質以外の分子であることが考えられる。今後、標的候補の遺伝子群に対して過剰発現株を作製し、耐性化を確認することにより標的を検証する。RNA ポリメラーゼ I については、ヒト遺伝子との相同性が高いため、抗真菌薬候補として適していないが、リボゾームタンパクは相同性が低く、抗真菌薬シーズ候補として敵合する可能性がある。

研究課題 '18-26

小児無脾症患者における肺炎球菌血清型特異IgG抗体・オプソニン活性,インフルエンザ菌b型特異抗体価保有状況に関する検討

星野 直

(千葉県こども病院感染症科)

竹下健一

(千葉大学大学院医学研究院小児病態学)

石和田稔彦・竹内典子

(千葉大学真菌医学研究センター)

The analysis of serotype specific IgG antibody, opsonophagocytic activity of *Streptococcus pneumoniae* and anti polyribosyl ribitol phosphate antibody of *Haemophilus influenzae* among children with asplenia

Tadashi Hoshino

(Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital)

Kenichi Takeshika

(Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

2016年2月から2017年4月の期間に千葉県こども病院外来通院中の小児無脾症患者18名について、肺炎球菌血清型特異IgG抗体をELISA法で測定した。13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)に含まれる6血清型(1, 3, 5, 6A, 7F, 19A)中、4血清型で対象者の幾何平均抗体価が健常小児の過去報告より有意に低値であることがわかった。23価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチンを1回接種し、PCV13が未接種である児に限定すると、6血清型のうち5血清型で有意に低値であり、PPSV単回接種では長期的な抗体維持ができない可能性が示唆された。インフルエンザ菌b型特異抗体に関しては、健常小児と比較して有意な低下は認めなかった。肺炎球菌に関しては、現在、血清型特異オプソニン活性の測定を試みている。ハイリスク

児における肺炎球菌・インフルエンザ菌b型の免疫原性を研究することで、これらの児におけるワクチン接種の必要性を検討していく。

研究課題 '18-27

基礎疾患のある小児患者における侵襲性肺炎球菌感染症予防法の評価

宮入 烈

(国立成育医療研究センター感染症科)

石和田稔彦・竹内典子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Evaluation of Preventable Measures Against Invasive Pneumococcal Disease in Children with Underlying Disease

Isao Miyairi

(Division of Infectious Diseases, National Center for Child Health and Development)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

肺炎球菌結合型ワクチン(PCV)の定期接種化以降、PCV13非含有血清型の肺炎球菌による感染症の増加(serotype replacement)が問題となっている。本年度は侵襲性肺炎球菌感染症4例の分離株について解析を加えた。3例に基礎疾患が有り、全例に肺炎球菌ワクチン接種歴があったものの、ワクチン非含有血清型の肺炎球菌による感染症を発症し、現行の予防方法では不十分である事が確認された。

基礎疾患のない1例は、国内では報告のない血清型10A sequence type (ST) 11189のペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)による髄膜炎例であった。生来健康な女児でPCV13は4回接種済みであった。1歳5か月時にRSウイルスに感染し、症状の改善がないため医療機関を複数回受診したのちに、血液検査で汎血球減少、CRP高値、髄液検査では細胞数上昇と髄液糖低下を認め、血液・髄液培養から、ペニシリンGのMIC=4μg/mLのPRSPが分離された。セフォタキシム、バンコマイシンで加療を

開始したが、患者はその後に硬膜下膿瘍、脳実質の複数の微小膿瘍を来し、複数回の穿頭ドレナージを要するなど、治療に難渋した。後に行った菌株解析では、ペニシリン結合蛋白 (PBPIA, 2X, 2B) に変異を認めていた。10A型はPCV13に含まれない血清型であり、本邦でもPCV13導入後、serotype replacementにより分離数が増加しているが、MLST解析ではST11189と国内ではこれまでに報告のない株であった。10A型は通常ペニシリンGに対するMICは低い株が多く、肺炎球菌のβ-ラクタム系薬耐性に重要なBPPに関しても、1~2か所の変異であるものが主であるとされていたが、今回は3つのすべてに変異を認めるgPRSPであったことが、治療に難渋した要因の一つであった可能性がある。今後の検出動向に注意が必要であると考えられた。本症例に関しては、学会発表、論文作成を検討中である。

研究課題 '18-28

保育園児から分離される肺炎球菌株の病原性解析

和田紀之

(和田小児科医院)

黒澤サト子

(くろさわ子ども&内科クリニック)

石和田稔彦・竹内典子・大楠美佐子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in nursery school

Noriyuki Wada

(Wada Shounikaiin)

Satoko Kurosawa

(Kurosawa Kodomo & Naika Clinic)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi, Misako Ohkusu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

2018年度、都内の保育園4施設に入園した0~1歳児に対して上咽頭の保菌調査を行い、分離された肺炎球菌株の莢膜血清型解析と薬剤感受性測定を行った。肺炎球

菌は70株分離され、莢膜型は全て13価肺炎球菌ワクチン(PCV13)非含有株であった。莢膜型別でみると、15Aが15株、23Bが9株、34と23Aが各7株、15Cが6株、35Bが5株、15Bと21が各4株、10Aが2株、11Aと22Fが各1株であった。無莢膜株は8株分離された。薬剤感受性については、PCG MIC $\leq 0.06\mu\text{g/ml}$ のPSSP株は57.1% (40/70)、MIC 0.12~1 $\mu\text{g/ml}$ のPISP株は35.7% (25/70)、MIC 2 $\mu\text{g/ml}$ 以下のPRSP株は7.1% (5/70)であった。PRSP株は莢膜型15Aと無莢膜株であった。また、これまで継続した保菌調査から*cpsA*遺伝子(莢膜多糖体)を有さず無莢膜株と同定された株について、MLST解析、一部の無莢膜株が持つとされる表面蛋白である*pspK*遺伝子の有無、バイオフィーム産生能、薬剤耐性遺伝子保有状況について検討したところ、保育園児から分離された肺炎球菌無莢膜株は、多様性はあるものの、全て*pspK*遺伝子を有しており、同一の保育園で同じST型が分離されたことから、園児間の水平伝播が示唆された。また、無莢膜株は莢膜株と比較し、バイオフィーム産生能が高く、薬剤耐性遺伝子を保有する株が多いことから、今後呼吸器感染症の原因菌としての重要性が増すことが懸念される。

発表論文

- 1) Takeuchi, N., Ohkusu, M., Wada, N., Kurosawa, S., Miyabe, A., Yamaguchi, M., Moon, H., Nahm, M.H., Ishiwada, N. (2019). Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan. *J Infect Chemother.* 25(10), 750-757.

研究課題 '18-29

Aspergillus fumigatus 関連種の日本国内における分布の実態解明

廣瀬 大

(日本大学薬学部)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Investigation of distribution on the related species of *Aspergillus fumigatus* in Japan

Dai Hirose

(School of Pharmacy, Nihon University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本年度は伊豆諸島三宅島の自然環境中における *Aspergillus fumigatus* 関連種の種多様性と種の分布特性を明らかにした。三宅島は限られた面積の中に異なる乾生遷移段階がみられることから、2018年6月に本島の異なる遷移段階を含む11地点において土壌を採取した。各地点では5m以上の間隔で15もしくは16試料（合計167試料）採取し、実験室に持ち帰った。土壌試料からの *Aspergillus* 属菌の分離培養は、滅菌トウモロコシ粒を用いたベイト法（培

養温度：35℃、培養期間：7-10日間）により行った。各分離菌株について形態観察およびカルモジュリン遺伝子の部分塩基配列に基づき種同定を行い、各地点における各菌種の出現頻度を算出した。それらの結果、4種 (*A. pseudoviridinutans*, *A. parafelis*, *A. felis*, *A. udagawae*) の分布が確認された。4種のうち *A. pseudoviridinutans* 以外の種の出現地点数や出現頻度は非常に低かった。*A. pseudoviridinutans* の出現頻度は、遷移後期の森林よりも遷移初期の裸地や荒原において著しく高かった。この分布特性は森林で出現率の高い *A. fumigatus* と対照的である。昨年度調査した神津島では *A. felis* の出現頻度が荒原において著しく高かったことから、*A. pseudoviridinutans* や *A. felis* を含む *A. viridinutans* complex の自然環境における分布の中心は遷移初期の裸地や荒原であると推測された。

感染症研究グローバルネットワークフォーラム2018

The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity

共催：国立感染症研究所，千葉大学真菌医学研究センター共同利用・共同研究拠点「真菌感染症研究拠点」，千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・リーディング研究育成プログラム「超個体」の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」

【Poster Session】

日時：平成30年11月30日 14：30～16：30

場所：千葉大学医学部附属病院3階 セミナー室3

【Oral Presentation】

日時：平成30年12月1日 9：00～16：15

場所：千葉大学医学部附属病院3階 ガーネットホール

世話人：

宮崎義継（国立感染症研究所真菌部）

坪井良治（東京医科大学皮膚科学教室）

倉島篤行（複十字病院呼吸器センター）

亀井克彦・西城 忍・渡邊 哲・知花博治・矢口貴志・石和田稔彦・高橋弘喜・米山光俊（千葉大学真菌医学研究センター）

研究成果

「千葉大学感染症研究ネットワーク」は感染症研究のネットワーク構築を目指し，当センターが中心となって平成24年度から開始された会であり，平成30年度で第7回目を迎えることとなった。本年度は，国立感染症研究所の宮崎義継先生に世話人をお願いし，真菌症研究を中心とした国内外の著名な研究者を招聘しすべての講演を英語で実施するという「国際フォーラム」として開催した。また，新たな取り組みとして，前日に若手研究者を中心とするポスターセッションを開催した。

初日はポスター57題の発表が，二日目は招待講演12題（日本，ブラジル，中国，英国，オランダ）の発表が行われた。二日間で延べ239人の参加があり，活発な議論を通じて新しい国際ネットワーク形成を目指した有意義な意見交換が行われた。

【午前の部】

【開会の挨拶】

徳久剛史（千葉大学学長）

座長：知花博治

（千葉大学真菌医学研究センター）

1. 橋本大吾（北海道大学大学院）

“Crosstalk between microbiota and host immune system affects the outcomes of hematopoietic stem cell transplantation”

2. Alistair J. P. Brown (University of Aberdeen, UK)

“Adaptation to specific host signals triggers immune evasion in *Candida albicans*, a major fungal pathogen of humans”

座長：高橋弘喜

（千葉大学真菌医学研究センター）

3. Matthew C. Fisher (Imperial College, UK)

“Emergence of antifungal resistance – challenges to human health”

4. Ruoyu Li (Peking University, China)

“CARD9 deficiency and dematiaceous fungal infections”

【午後の部】

座長：西城 忍

（千葉大学真菌医学研究センター）

5. Maria Luiza Moretti (University of Campinas, Brazil)

“Neglected endemic mycoses in Brazil”

6. Mihai G. Netea (Radboud University Medical Center, the Netherlands)

“Functional genomics identification of novel pathways of human antifungal immune responses”

座長：渡邊 哲

（千葉大学真菌医学研究センター）

7. 萩原大祐（筑波大学）

“Discovery of a novel regulator of azole drug response in

Aspergillus fumigatus

8. 廣瀬晃一（国際医療福祉大学病院）
“Roles of Dectin-1 in allergic airway inflammation”
9. 宮崎泰可（長崎大学大学院）
“Translational research on invasive candidiasis”

座長：亀井克彦

（千葉大学真菌医学研究センター）

10. 清水公德（東京理科大学）
“Involvement of PMT2 gene of the human pathogen
Cryptococcus neoformans in fungal taxonomy”

11. 豊留孝仁（帯広畜産大学）
“Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*”
12. 上野圭吾（国立感染症研究所）
“A dendritic cell-based systemic vaccine induces long-lived lung-resident memory Th17 cells and ameliorates pulmonary cryptococcosis”

【閉会の挨拶】

宮崎義継（国立感染症研究所）

2019年講演会

2019 Scientific Meetings & Seminars

The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity

Poster Session

日時：令和2年1月10日 14:30~16:30

場所：千葉大学医学部附属病院3階 セミナー室3

Oral Presentation

日時：令和2年1月11日 9:50~17:15

場所：千葉大学医学部附属病院3階 ガーネットホール

【特別講演】

Elaine Y. Hsiao (UCLA, USA)

「Host microbiome interactions through the gut serotonergic system」

大野博司 (理化学研究所)

「Gut microbiota and host diseases, especially autoimmune diseases」

Noah Palm (Yale University, USA)

「Illuminating the ‘dark matter’ of the gut microbiota metabolome」

Andreas Diefenbach (Charite-Berlin University of Medicine, Germany)

「Microbiota induced tonic type I interferons instruct a transcriptional, epigenetic and metabolic program that defines the basal state of conventional dendritic cells」

Jakob von Moltke (University of Washington, USA)

「Intestinal tuft cells : Sentinels and effectors of the type 2 immune response」

佐々木伸雄 (慶應義塾大学)

「The study of epithelial crosstalk at the host microbes interface using organoid」

本郷裕一 (東京工業大学)

「Multi layered symbiotic system in the termite gut」

松木隆広 (ヤクルト中央研究所)

「Key genetic factors for human milk oligosaccharides utilization affect infant gut microbiota development」

「東京大学医科学研究所—千葉大学真菌医学研究センター 国際共同利用・共同 研究拠点事業 平成30年度 合同成果報告会」

日時：平成31年3月5日

場所：東京大学医科学研究所 2号館2階 大講義室

【午後の部】

【特別講演】

新藏礼子 (東京大学定量生命科学研究所)

「腸管IgA抗体による腸内細菌制御機構の解析」

【合同成果報告会】

《千葉大学真菌医学研究センター成果報告》

豊留孝仁 (帯広畜産大学)

「迅速・簡便なアゾール耐性*Aspergillus fumigatus*検出法の開発」

田中 大 (東北医科薬科大学)

「*Candida glabrata* 遺伝子変異株コレクションを用いた真菌細胞壁保全機構の解析」

細江智夫 (星薬科大学)

「メタボローム解析による真菌類の薬剤耐性と産生成分の調査研究」

竹下健一 (千葉大学)

「小児無脾症患者における肺炎球菌抗体価に関する研究」

《感染症・免疫共同研究領域》

高村祥子（愛知医科大学）

「MD-1による脂質シグナル制御機構の解明」

岡野 翼（東京医科歯科大学）

「iPS細胞を用いた顆粒球・単球・樹状細胞系細胞の分化・機能探索に関する研究」

一戸猛志（東京大学医科学研究所）

「ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの制御」

森田英明（国立成育医療研究センター）

「二本鎖RNAに対する胎盤免疫応答機構の解明」

平石尚久（東京大学）

「肺線維症におけるIL-33, IL-25, TSLPの機能解析」

「真菌医学研究センター市民向け公開セミナー」

日時：令和元年6月4日 13:55～16:30

場所：ペリエホール（ペリエ千葉7階）

石和田稔彦（真菌医学研究センター 准教授）

「おとなに必要な予防接種のお話」

矢口貴志（真菌医学研究センター 准教授）

「身の回りのカビの危険性とその防ぎ方」

山口正視（千葉大学 グランドフェロー）

「深海微生物と真核生物の起源」

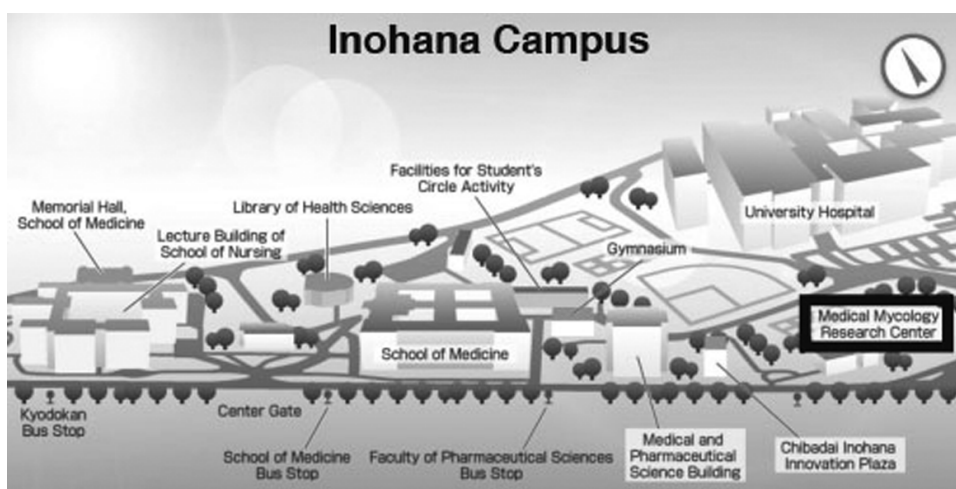
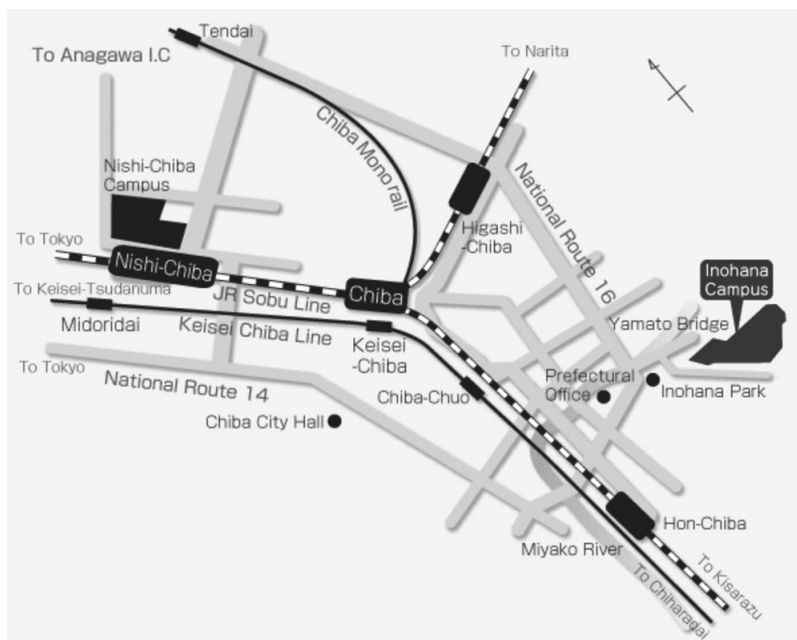
「真菌医学研究センター セミナー」

日時：令和元年11月19日 16:00～17:00

場所：千葉大学真菌医学研究センター 大会議室

山崎 晶（大阪大学微生物病研究所 教授, 千葉大学真菌医学研究センター客員教授）

「Bacterial lipids promote deleterious inflammation through C-type lectin receptors」



令和 2 年 6 月 発行

発行者 千葉大学真菌医学研究センター
 センター長 笹川 千尋
 〒260-8673 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
 電話 043-222-7171 (代表)

June 2020

Published by
 Chihiro Sasakawa, Ph.D.
 Director, Medical Mycology Research Center
 Chiba University
 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8673, Japan
 TEL: 81-43-222-7171

印刷 株式会社 正文社
 Printed by Seibunsha, Ltd. Chiba, Japan



CHIBA UNIVERSITY
2019