

MMRC



**ANNUAL REPORT OF MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER, CHIBA UNIVERSITY 2018**

千葉大学 真菌医学研究センター 報告

22



目 次

Content

はじめに	
Preface for Annual Report for 2018	
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	9
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	11
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「病原微生物」	
Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology National	
BioResource Project “Pathogenic Eukaryotic Microorganisms”	33
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	34
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	35

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”	37
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)	39
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	40
平成29年度 共同利用・共同研究報告 2017 Fiscal Year Cooperative Research Program Report	41
感染症グローバルネットワークフォーラム2017 The 6th Global Network Forum on Infection and Immunity	60
2018年講演会 2018 Scientific Meetings & Seminars	61

はじめに

我が国はすでに超高齢社会に突入し、高度医療や生活習慣病に起因した日和見感染症や呼吸器疾患を基礎疾患として、真菌感染症は増加の一途を辿っています。また経済と観光のグローバル化に伴う輸入真菌感染症等、真菌症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。このような背景から、我が国唯一の真菌症の研究拠点に求められる役割は以前にも増して重要となります。したがって本センターでは、病原真菌の研究を基軸に、感染症、免疫、創薬、情報生命科学等を含む領域の共同利用・共同研究拠点として、国内外の大学はもとより、研究機関、医療機関、企業等とも活発な共同研究を展開しています。

本センターでは、千葉大学附属病院と連携して臨床活動を積極的に行っています。我が国初の真菌症専門外来を開設するとともに、小児科とも連携して小児感染症の臨床研究も行っています。また米国、ドイツ、英国、ポルトガル、中国、ブラジル等の真菌感染症研究拠点とも活発な共同研究を実施しています。この一環として、臨床感染症分野は、ブラジル・カンピーナス大学医学部と連携して、平成28年度の日本医療研究開発機構（AMED）における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、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、若手研究者の交流も含め積極的に共同研究を推進しています。

微生物資源分野は、世界レベルの規模を有する病原真菌バイオリソースを有し、病原真菌の収集、保存、分与、オミックス解析等を通じて、共同利用・共同研究拠点活動および国際共同研究を支えています。平成30年度には、旧ラジオアイソトープ実験室をバイオリソース管理室としてリニューアルし、真菌講習会およびバイオリソースのさらなる機能強化を目指しています。

本センターでは、感染症、免疫、病原真菌、情報生命科学等の基礎的研究も若手研究者を中心に活発に行われ、本年度も国際的に注目される多くの研究成果を得ることができました。また真菌感染症をテーマに、第7回感染症研究グローバルネットワークフォーラム2018を開催し、その結果国内の真菌コミュニティはもとより、海外真菌研究拠点との連携も一段と強化され、多くの国際共同研究が立ち上がりました。

本年度も、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、グランドフェローはじめ、国内外の多くの共同研究者による御指導、御支援に対して心より感謝致します。

平成31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 2018

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 recognized as a key issue within the aging population. The Medical Mycology Research Center (MMRC) at Chiba University has become increasingly important because it serves two functions: as a research organization and as a promoter of educational activities aimed at raising public awareness.

MMRC has been certified as a Joint Usage/Research Center by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) since 2011. Since then, MMRC has been actively engaged in medical mycology research and related fields, such as infection immunology, infection biology, information biology, 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, which is the only outpatient clinic for such diseases in Japan.

We are also enthusiastic about promoting international collaborations with several outstanding fungal research groups in the US, UK, China, Portugal, and Brazil. 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 led a collaboration with the fungal research team in Campinas University in Brazil aimed at investigating the impact of drug resistance on fungal infectious diseases in Brazil.

Finally, we wish to highlight that in 2018, MMRC received high commendation by MEXT for our research, as well as our collaborative research activities. Accordingly, 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, which will ultimately advance the field of medical mycology.

April, 2019

Chihiro Sasakawa

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
技術補佐員	滝沢みゆき	Research Promotion Technician	Miyuki Takizawa

1. LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs.

Takahashi T¹, Nakano Y¹, Onomoto K², Murakami F³, Komori C¹, Suzuki Y³, Yoneyama M², Ui-Tei K^{1,3}.

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

²Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University

³Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

We show that virus sensor protein, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2), regulates gene expression network of endogenous genes mediated by TAR-RNA binding protein (TRBP)-bound microRNAs (miRNAs). TRBP is an

enhancer of RNA silencing, and functions to recruit precursor-miRNAs (pre-miRNAs) to Dicer that processes pre-miRNA into mature miRNA. Viral infection activates the antiviral innate immune response in mammalian cells. RLRs, including RIG-I, melanoma-differentiation-associated gene 5 (MDA5), and LGP2, function as cytoplasmic virus sensor proteins during viral infection. RIG-I and MDA5 can distinguish between different types of RNA viruses to produce antiviral cytokines, including type I interferon. However, the role of LGP2 is controversial. We found that LGP2 bound to the double-stranded RNA binding sites of TRBP, resulting in inhibition of pre-miRNA binding and recruitment by TRBP. Furthermore, although it is unclear whether TRBP binds to specific pre-miRNA, we found that TRBP bound to particular pre-miRNAs with common structural characteristics. Thus, LGP2 represses specific miRNA activities by interacting with TRBP, resulting in selective regulation of target genes. Our findings show that a novel

function of LGP2 is to modulate RNA silencing, indicating the crosstalk between RNA silencing and RLR signaling in mammalian cells.

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, Miyamoto E, Kuroki Y, Tsutsuba C, Watanabe Y, Onoguchi K, and Yoneyama M.

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

3. Recognition of viral ribonucleoprotein complex (RNP) by RLRs.

Jogi M, and Yoneyama M.

It is unclear how RIG-I detects viral ribonucleoprotein complex (RNP), which consists of viral genomic RNA and viral proteins, in the virus-infected cells. As a model RNP, we prepared artificial influenza A virus (IAV) RNP generated in HEK293T cells, and examined whether the viral RNP can

be recognized by RIG-I *in vitro*. We are now trying to identify a regulatory molecule(s) that can be involved in RNP-recognition by RIG-I.

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

Onoguchi K, Mochizuki Y, and Yoneyama M.

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

These works were supported by JSPS KAKENHI, Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (18H02660) and for Young Scientists (B) (17K15699).

Publications

- 1) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Murakami F, Komori C, Suzuki Y, Yoneyama M, Ui-Tei K: LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs. **Nucleic Acids Res**, 46: 9134-9147, 2018.
- 2) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K: Virus sensor RIG-I represses RNA interference by interacting with TRBP through LGP2 in mammalian cells. **Genes**, 9: E511, 2018.

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
特 任 助 教	矢部 力朗	Research Assistant Professor	Rikio Yabe
技 術 補 佐 員	峰 良子	Research Promotion Technician	Ryoko Mine
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.

Shinobu Saijo and Rikio Yabe

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. In this review, we briefly revisit the structures, ligands, signal transduction and functional roles of Dectin-1 and Dectin-2 in host defense against fungal infection.

2. Suppression of IL-17F, but not of IL-17A, provides protection against colitis by inducing Treg cells through modification of the intestinal microbiota

Ce Tang^{1,2}, Shigeru Kakuta^{2,3}, Kenji Shimizu^{1,2,4}, Motohiko

Kadoki^{1,2,5}, Tomonori Kamiya^{1,2,6}, Tomoyuki Shimazu^{1,7}, Sachiko Kubo^{1,2}, Shinobu Saijo^{2,8}, Harumichi Ishigame^{2,9}, Susumu Nakae² and Yoichiro Iwakura¹

¹ Center for Animal Disease Models, Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science, Noda-shi, Chiba, Japan.

² Center for Experimental Medicine and Systems Biology, Institute of Medical Science, the University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan.

³ Department of Biomedical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.

⁴ Division of Immune Regulation, Institute for Genome Research, Tokushima University, Tokushima-shi, Tokushima, Japan.

⁵ Center for Computational and Integrative Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

⁶ Department of Pathophysiology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka-shi, Osaka, Japan.

⁷ Department of Food, Agriculture and Environment, Miyagi University, Sendai-shi, Miyagi, Japan.

⁸ Medical Mycobiology Research Center, Chiba University, Chiba-shi, Chiba, Japan.

⁹ RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Kanagawa, Japan.

The cytokines IL-17A and IL-17F have 50% amino-acid identity and bind the same receptor; however, their functional differences have remained obscure. Here we found that *Il17f*^{-/-} mice resisted chemically induced colitis, but *Il17a*^{-/-} mice did not, and that *Il17f*^{-/-} CD45RB^{hi}CD4⁺ T cells induced milder colitis in lymphocyte-deficient *Rag2*^{-/-} mice, accompanied by

an increase in intestinal regulatory T cells (T_{reg} cells). Clostridium cluster XIVa in colonic microbiota capable of inducing T_{reg} cells was increased in both *Il17f*^{-/-} mice and mice given transfer *Il17f*^{-/-} T cells, due to decreased expression of a group of antimicrobial proteins. There was substantial production of IL-17F, but not of IL-17A, not only by naive T cells but also by various colon-resident cells under physiological conditions. Furthermore, antibody to IL-17F suppressed the development of colitis, but antibody to IL-17A did not. These observations suggest that IL-17F is an effective target for the treatment of colitis.

Publications

- 1) Tang C, Kakuta S, Shimizu K, Kadoki M, Kamiya T, Shimazu T, Kubo S, Saijo S, Ishigame H, Nakae S, Iwakura Y. Suppression of IL-17F, but not of IL-17A, provides protection against colitis by inducing T_{reg} cells through modification of the intestinal microbiota. *Nat Immunol.* 19: 755-765. 2018
- 2) Hashiguchi Y, Yabe R, Chung SH, Murayama MA, Yoshida K, Matsuo K, Kubo S, Saijo S, Nakamura Y, Matsue H, Iwakura Y. IL-36 α from Skin-Resident Cells Plays an Important Role in the Pathogenesis of Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis by Forming a Local Autoamplification Loop. *J Immunol.* 201: 167-182. 2018
- 3) Kamiya T, Tang C, Kadoki M, Oshima K, Hattori M, Saijo S, Adachi Y, Ohno N, Iwakura Y. β -Glucans in food modify colonic microflora by inducing antimicrobial protein, calprotectin, in a Dectin-1-induced-IL-17F-dependent manner. *Mucosal Immunol.* 11: 763-773. 2018

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	松尾 謙蔵	Graduate student	Kenzo Matsuo
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, Kenzo Matsuo¹, 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.

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	野村祐理子	Research Promotion Technician	Yuriko Nomura
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

1. A Method for Obtaining Serial Ultrathin Sections of Microorganisms in Transmission Electron Microscopy

Yamaguchi M, Chibana H

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

Observing cells and cell components in three dimensions at high magnification in transmission electron microscopy requires preparing serial ultrathin sections of the specimen. Although preparing serial ultrathin sections is considered to be very difficult, it is rather easy if the proper method is used. In this paper, we show a step-by-step procedure for safely obtaining serial ultrathin sections of microorganisms. The key points of this method are: 1) to use the large part of the specimen and adjust the specimen surface and knife edge so that they are parallel to each other; 2) to cut serial sections in groups and avoid difficulty in separating sections using a pair

of hair strands when retrieving a group of serial sections onto the slit grids; 3) to use a 'Section-holding loop' and avoid mixing up the order of the section groups; 4) to use a 'Water-surface-raising loop' and make sure the sections are positioned on the apex of the water and that they touch the grid first, in order to place them in the desired position on the grids; 5) to use the support film on an aluminum rack and make it easier to recover the sections on the grids and to avoid wrinkling of the support film; and 6) to use a staining tube and avoid accidentally breaking the support films with tweezers. This new method enables obtaining serial ultrathin sections without difficulty. The method makes it possible to analyze cell structures of microorganisms at high resolution in 3D, which cannot be achieved by using the automatic tape-collecting ultramicrotome method and serial block-face or focused ion beam scanning electron microscopy.

Publications

1. Cavalheiro M, Costa C, Silva-Dias A, Miranda I,

- Wang C, Pais P, Pinto S, Mil-Homens D, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Silva R, Mira N, Fialho A, Chibana H, Rodrigues A, Butler G, Teixeira M: A Transcriptomics Approach To Unveiling the Mechanisms of In Vitro Evolution towards Fluconazole Resistance of a *Candida glabrata* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents Chemother*, 00995-18, 2018.
2. Hirao T, Yamaguchi M, Kikuya M, Chibana H, Ito K, Aoki S: Altered intracellular signaling by imatinib increases the anti-cancer effects of tyrosine kinase inhibitors in CML cells. *Cancer Science*. 109(1): 121-131, 2018.
 3. Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gonoï T. *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cell Microbiol*. 20(3): e12802, 2018.
 4. Stepanova A, Vasilyeva N, Yamaguchi M, Chibana H, Bosak, Filippova L: Ultrastructural patterns of interactions between murine lung macrophages and yeast cells of *Cryptococcus neoformans* strains with different virulence. *Med Mycol J*, 59(1)E1-E6, 2018.
 5. Tanaka Y, Sasaki M, Ito F, Aoyama T, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Shibata N: Cooperation between ER stress and calcineurin signaling contributes to the maintenance of cell wall integrity in *Candida glabrata*. *Fungal Biol*, 122(1): 19-33, 2018
 6. Yamaguchi M, Chibana H: A Method for Obtaining Serial Ultrathin Sections of Microorganisms in Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp*. (131): e56235, 2018.
 7. Salazar S, Wang C, Münsterkötter M, Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Lopes M, Güldener U, Mira N: Comparative genomic and transcriptomic analyses unveil novel features of azole resistance and adaptation to the human host in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res*. 18(1), 2018.
 8. Naito S, Takeuchi N, Ohkusu M, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Imuta N, Nishi J, Shibayama K, Matsuoka M, Sasaki Y, Ishiwada N: Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases, Japan, 2008-2015. *J Clin Microbiol*, 25; 56(7), 2018.
 9. Tanaka Y, Sasaki M, Ito F, Aoyama T, Sato-Okamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Shibata N: Cooperation between ER stress and calcineurin signaling contributes to the maintenance of cell wall integrity in *Candida glabrata*. *Fungal Biol*, 122(1): 19-33, 2018.
 10. Yamada H, Yamaguchi M, Igarashi Y, Chikamatsu K, Aono A, Murase Y, Morishige Y, Takaki A, Chibana H, Mitarai S: *Mycobacterium smegmatis*, *Basonym Mycobacterium smegmatis*, Expresses Morphological Phenotypes Much More Similar to *Escherichia coli* Than *Mycobacterium tuberculosis* in Quantitative Structome Analysis and CryoTEM Examination. *Front Microbiol*, 11;9: 1992, 2018.
 11. Takahashi-Nakaguchi A, Hagiwara D, Takahashi H, Sakai K, Toyotome T, Watanabe A, Kamei K, Gonoï T: Investigation of Virulence Factors by “Omics” Approaches. *Med Mycol J*. 59(2): J35-J40. Review. Japanese. 2018.

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, 遺伝子検査などの特殊検査を受け入れているが, その件数は年々増加し, 毎年400-500件あまりに達している. これと並行して, 全国から寄せられる真菌症のコンサルテーションに対応している. 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特に力を入れ, 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 also take 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	Teppei Arai
研究員	東江 昭夫	Researcher	Akio Toh-e
グランドフェロー	田口 英昭	Grand Fellow	Hideaki Taguchi
技術職員	鎗田 響子	Research Technician	Kyoko Yarita
技術補佐員	八尋 真希	Research Promotion Technician	Maki Yahiro
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
外国人研究者	賀 丹	Foreign Visiting Researcher	Dan He

1. Detection of mutation *cyp51A* of Azole drug-resistant *Aspergillus fumigatus* using Surveyor Nuclease

Teppei Arai, Hidetaka Majima, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* has been detected throughout the world. Two types of Azole-resistant strain have been reported. Azole-resistant strain is thought to be a major cause of the decrease in drug affinity due to an amino acid mutation in CYP51A of the drug target molecule. And it is known that the azole-resistant pattern shows different due to the difference of mutated amino acids. For this reason, detection of the mutation pattern of CYP51A is considered to be important data for early treatment of aspergillosis and elucidation of the mechanism provided azole resistance. In addition, in order to prepare epidemiological data including the detection frequency of azole-resistant strains, screening work to select strains having a mutation in CYP51A from many environmental and clinical isolates is necessary. There are many mutation sites conferred azole resistance in CYP51A, and the existence of an unknown mutation is also conceivable.

In this study, we tried a detection method of *cyp51A* mutation using Surveyor Nuclease which is an endonuclease. Surveyor Nuclease recognizes and cleaves mismatches due to the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) or small insertions or deletions. Detection of mutant *cyp51A* by Surveyor Nuclease could be used as a screening method. By this method, the time required to obtain mutation information on azole resistance could be shortened. In addition, because multiple mutations can be detected with one primer set, it is fit for primary screening in which mutation is detected from a large amount of sample. Furthermore, new mutations within the targeted region could be detected.

2. Study on the relationship between the causative *Fusarium* species of human fusariosis and environmental fungal flora

Yutaro Hino, Yasunori Muraosa, Maki Yahiro, Kyoko Yarita,

Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

Fusarium is a large genus of filamentous fungi, widely distributed in soils and plants. Currently, the genus *Fusarium* comprises at least 300 phylogenetically distinct species and 20 species complexes. Human fusariosis has mainly two types of infection, invasive fusariosis (IF) and superficial fusariosis (SF). IF occurs mostly in immunocompromised patients. The infection route of IF is suspected to be the airborne infection in the patient's room but remains unclear. SF occurs mainly in immunocompetent patients after injury of eye, skin and nail, mostly if the injury was caused by plant material such as branches of the tree. In our previous study of *Fusarium* species causing IF and SF in Japan between 1998 and 2015. *Fusarium solani* species complex (FSSC) was predominately isolated from both patients with IF and SF (IF, 77.8% and SF, 67.6%). Distribution of the species belonging to FSSC isolated from patients with IF and SF exhibited different spectra; specifically, *F. keratoplasticum* (25.0%) was the most frequent isolate from patients with IF, whereas *F. falciforme* (32.4%) was the most frequent isolate from patients with SF. *Fusarium* sp. (FSSC 5) was the second most frequent isolate from both patients with IF and SF (IF, 22.2% and SF, 24.3%). Notably, *F. petroliphilum* was isolated only from patients with IF (Muraosa et al., 2017). In the present study, we investigated the relationship between the causative *Fusarium* species of fusariosis and fungal flora in the residential environments.

We isolated filamentous fungi from the indoor air and drain ports at 6 medical institutions and 15 residences in Chiba prefecture. Fungal isolates were pre-identified by morphological observation and *Fusarium*- and FSSC-specific real-time PCR (Muraosa et al., 2014). *Fusarium* isolates were identified by the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal RNA and elongation factor 1 (EF1)- α gene sequencing. Non-*Fusarium* isolates were identified by the ITS sequencing.

A total of 142 and 108 filamentous fungi were isolated from the air and drain ports, respectively. Two *Fusarium* were isolated from in the air (2/142 isolates, 1.4%), whereas 29 *Fusarium* were isolated from in the drain ports (29/108 isolates, 27%). In the *Fusarium* isolates from the drain ports,

F. petroliphilum (a member of the FSSC) was predominately isolated following by *F. keratoplasticum* (a member of the FSSC). Distribution of the *Fusarium* species isolated from drain ports exhibited similar spectra of that isolated from patients with IF, suggesting that the indoor drain ports are critical infectious sources of IF.

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

Yasunori Muraosa, Takahito Toyotomea (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan), 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 the cell wall and extracellular matrix. In a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis, survival did not differ between $\Delta ldpA/B$ and wild-type infection; however, further studies are required to reveal their functions in fungal-host interactions.

4. Metal transporter (Nramp/SMF1) is a major determinant of cadmium-resistance in *Cryptococcus neoformans* species complex and *Cryptococcus gattii*

Akio Toh-e, Misako Ohkusu, Naruhiko Ishiwada, Akira

Watanabe, Katsuhiko Kamei

A portion of the environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* and related species stored in Medical Mycology Research Center, Chiba University were subjected to examination for their response to cadmium (Cd^{2+}). We found serotype A strains are generally more tolerant to Cd^{2+} than serotype D strains. The common highly conserved Cd^{2+} detoxification mechanism is operating in *Cryptococcus*. Internalized Cd^{2+} is detoxified by a series of steps including formation of a conjugate with glutathione, followed by sequestration in vacuole. Mutants in the detoxification pathway displayed the Cd^{2+} -sensitive phenotype. Cd^{2+} -resistant mutants were isolated from the wild type strain of *Cryptococcus neoformans* (serotype D). Ten mutants were randomly picked up and we found that they were independent mutants and belonged to one and the same complementation group. We identified *SMF1* as the gene responsible for the Cd^{2+} -resistant phenotype of the mutants. Smf1, a metal transporter, is a counterpart of Nramp1 of mouse. We analyzed the Cd^{2+} -resistant trait of H99 and found that Smf1 of H99 is partially defective. We found that *Cryptococcus gattii* R265, a Vancouver outbreak strain, possesses the partially defective *SMF1* gene. The tendency that virulent strains have a defective allele of *SMF1* prompted us to examine whether the *SMF1* gene may have some roles in expression of virulence using the mouse infection model. We observed that mice tail vein injected with the smf1 mutant of the serotype D strain began to express the disease symptoms earlier than those injected with the wild-type strain, implying that the *SMF1* gene down-regulates the virulence of *Cryptococcus* at an early stage of infection.

Publications

1. Oguma T, Taniguchi M, Shimoda T, Kamei K, Matsuse H, Hebisawa A, Takayanagi N, Konno S, Fukunaga K, Harada K, Tanaka J, Tomomatsu K, Asano K: Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Japan: A nationwide survey. *Allergol Int* 67(1): 79-84, 2018.
2. Ishiwada N, Kitajima H, Morioka I, Takeuchi N, Endo N, Watanabe A, Kamei K: Nationwide survey of

- neonatal invasive fungal infection in Japan. *Med Mycol* 56(6): 679-686, 2018.
3. Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K: Novel biosynthetic pathway for sulfur amino acids in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet* 64(3): 681-696, 2018.
 4. Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gonoï T: *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cell Microbiol* 20(3): e12802, 2018.
 5. Kohashi S, Toyama T, Hashimoto N, Sakurai M, Kato J, Kikuchi T, Koda Y, Sugita K, Hasegawa N, Yarita K, Kamei K, Okamoto S, Mori T: Sinusitis caused by *Exserohilum rostratum* after cord blood transplantation for myelodysplastic syndrome: A case report and literature review. *Transpl Infect Dis* 20(1): e12805, 2018.
 6. Toyotome T, Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K: A simple method to detect the tandem repeat of the *cyp51A* promoter in azole-resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 56(8): 1042-1044, 2018.
 7. Okada K, Endo T, Hashimoto D, Saga T, Ara T, Ogasawara R, Yasumoto A, Ibata M, Takahata M, Shigematsu A, Kondo T, Muraosa Y, Nomura T, Kanno-Okada H, Hashino S, Tanaka S, Kamei K, Teshima T: Disseminated fusariosis emerged from prolonged local genital infection after cord blood transplantation. *J Infect Chemother* 24(8): 660-663, 2018.
 8. Moretti ML, Busso-Lopes AF, Tararam CA, Moraes R, Muraosa Y, Mikami Y, Gonoï T, Taguchi H, Lyra L, Reichert-Lima F, Trabasso P, de Hoog GS, Al-Hatmi AMS, Schreiber AZ, Kamei K: Airborne transmission of invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies. *PLoS One* 13(4): e0196426, 2018.
 9. Ishiguro T, Kawai S, Kojima A, Shimizu Y, Kamei K, Takayanagi N: Occupational hypersensitivity pneumonitis in a koji brewer. *Clin Case Rep* 6(3): 461-464, 2018.
 10. Mitomo H, Sakurada A, Matsuda Y, Notsuda H, Watanabe T, Oishi H, Niikawa H, Maeda S, Noda M, Sado T, Amemiya T, Yoshida Y, Kikuchi T, Kamei K, Okada Y: Endobronchial topical amphotericin B instillation for pulmonary chromomycosis after lung transplantation: a case report. *Transplant Proc* 50(3): 939-942, 2018.
 11. Sturaro LL, Gonoï T, Busso-Lopes AF, Tararam CA, Levy CE, Lyra L, Trabasso P, Schreiber AZ, Kamei K, Moretti ML: Visible DNA microarray system as an adjunctive molecular test in identification of pathogenic fungi directly from a blood culture bottle. *J Clin Microbiol* 56(5): e01908-17, 2018.
 12. Uemura S, Tamura A, Yamamoto N, Saito A, Nakamura S, Fujiwara T, Tahara T, Kozaki A, Kishimoto K, Ishida T, Hasegawa D, Muraosa Y, Kamei K, Kosaka Y: Successful combination therapy of liposomal amphotericin B and caspofungin for disseminated fusariosis in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Infect Dis J* 37(10): e251-e253, 2018.
 13. Kakeya H, Yamada K, Kaneko Y, Yanagihara K, Tateda K, Maesaki S, Takesue Y, Tomono K7, Kadota JI, Kaku M, Miyazaki Y, Kamei K, Shibuya K, Niki Y, Yoshida M, Sei Y: National trends in the distribution of *Candida* Species causing candidemia in Japan from 2003 to 2014. *Med Mycol J* 59(1): E19-E22, 2018.
 14. Umeyama T, Hayashi Y, Shimosaka H, Inukai T, Yamagoe S, Takatsuka S, Hoshino Y, Nagi M, Nakamura S, Kamei K, Ogawa K, Miyazaki Y: CRISPR/Cas9 genome editing to demonstrate the contribution of Cyp51A Gly138Ser to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 62(9): e00894-18, 2018.
 15. Hagiwara D, Arai T, Takahashi H, Kusuya Y, Watanabe A, Kamei K: Non-*cyp51A* azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with mutation in HMG-CoA reductase. *Emerg Infect Dis* 24(10): 1889-1897, 2018.
 16. Watanabe A, Kamei K: International joint research on antifungal resistant fungi: collaborative studies with the University of Campinas, Brazil. *JDR* 13(4): 751-753, 2018.
 17. Asano K, Kamei K, Hebisawa A: Allergic

- bronchopulmonary mycosis - pathophysiology, histology, diagnosis, and treatment. *Asia Pac Allergy* 16(3): e24, 2018.
18. Kurata K, Nishimura S, Ichikawa H, Sakai R, Mizutani Y, Takenaka K, Kakiuchi S, Miyata Y, Kitao A, Yakushijin K, Kawamoto S, Yamamoto K, Ito M, Matsuoka H, Tokimatsu I, Kamei K, Minami H: Invasive *Scopulariopsis alboflavescens* infection in patient with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 108(6): 658-664, 2018.
 19. Tashiro A, Nei T, Sugimoto R, Watanabe A, Hagiwara J, Takiguchi T, Yokota H, Kamei K: Kodamaea ohmeri fungemia in severe burn: case study and literature review. *Med Mycol Case Rep* 20(22): 21-23, 2018.
 20. Abe N, Fujieda Y, Nagaoka K, Ohkusu M, Yasuda S, Kamei K, Atsumi T: Disseminated cryptococcosis with bronchiolitis and cellulitis. *Am J Respir Crit Care Med* 199(2): 235-236, 2019.
 21. Fujimoto M, Inaba Y, Takahashi T, Nakanishi G, Muraosa Y, Yahiro M, Kamei K, Murata SI: Image gallery: granulomatous dermatitis due to infection with the chlorophyllic green alga *Desmodesmus*. *Br J Dermatol* 179(4): e167, 2018.
 22. Onoue T, Tanaka Y, Hagiwara D, Ekino K, Watanabe A, Ohta K, Kamei K, Shibata N, Goto M, Oka T: Identification of two mannosyltransferases contributing to biosynthesis of the fungal-type galactomannan α -core-mannan structure in *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep* 8(1): 16918, 2018.
 23. Ozawa K, Mochizuki K, Takagi D, Ishida K, Sunada A, Ohkusu K, Kamei K, Hashimoto A, Tanaka K: Identification and antifungal sensitivity of two new species of *Diaporthe* isolated. *J Infect Chemother* 25(2): 96-103, 2019.
 24. Toyotome T, Hamada S, Yamaguchi S, Takahashi H, Kondoh D, Takino M, Kanasaki Y, Kamei K: Comparative genome analysis of *Aspergillus flavus* clinically isolated in Japan. *DNA Res*, in press.
 25. Hagiwara D, Takahashi H, Takagi H, Watanabe A, Kamei K: Heterogeneity in pathogenicity-related properties and stress tolerance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates. *Med Mycol J* 59(4): E63-E70, 2018.

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 Tomoko Yamamoto
Research Promotion Technician Yuriko Nomura

1. Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs

Imamura K¹, Takaya A¹, Ishida YI², Fukuoka Y³, Taya T³, Nakaki R⁴, Kakeda M⁵, Imamachi N⁵, Sato A⁵, Yamada T^{2,5}, Onoguchi-Mizutani R⁵, Akizuki G⁵, Tanu T⁵, Tao K⁵, Miyao S², Suzuki Y⁶, Nagahama M², Yamamoto T⁷, Jensen TH⁸, Akimitsu N⁵

School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

² Laboratory of Molecular and Cellular Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

³ Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan.

⁴ Rhelixa, Inc., Tokyo, Japan

⁵ Isotope Science Center, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

⁶ Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

⁷ Project for Host Response Network of Bacterial Infection,

¹ Laboratory of Microbiology and Immunology, Graduate

Medical Mycology Research Center, Chiba University

⁸Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus C, Denmark

Cytoplasmic mRNA degradation controls gene expression to help eliminate pathogens during infection. However, it has remained unclear whether such regulation also extends to nuclear RNA decay. Here, we show that 145 unstable nuclear RNAs, including enhancer RNAs (eRNAs) and long noncoding RNAs (lncRNAs) such as NEAT1v2, are stabilized upon *Salmonella* infection in HeLa cells. In uninfected cells, the RNA exosome, aided by the Nuclear EXosome Targeting (NEXT) complex, degrades these labile transcripts. Upon infection, the levels of the exosome/NEXT components, RRP6 and MTR4, dramatically decrease, resulting in transcript stabilization. Depletion of lncRNAs, NEAT1v2, or eRNA07573 in HeLa cells triggers increased susceptibility to *Salmonella* infection concomitant with the deregulated expression of a distinct class of immunity-related genes, indicating that the accumulation of unstable nuclear RNAs contributes to antibacterial defense. Our results highlight a fundamental role for regulated degradation of nuclear RNA in the response to pathogenic infection.

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

Tomoko Yamamoto¹, Yuriko Nomura¹, Akiko Takaya²

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

²Laboratory 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* SiiE prevents an efficient humoral immune response by interfering with IgG⁺ plasma cell persistence in the bone marrow

Akiko Takaya¹, Christian Männe², Tomoko Yamamoto³, Koji Tokoyoda²

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

²Rheumatism Research Center Berlin, Germany

³Project for Host Response Network of Bacterial Infection, Medical Mycology Research Center, Chiba University

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, 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 anti-microbial activity can kill a variety of bacteria under certain condition.

Publications

1. Imamura K, Takaya A, Ishida Y, Fukuoka Y, Taya T, Nakaki R, Kakeda M, Imachi N, Sato A, Yamada T, Onoguchi-Mizutani R, Akizuki G, Tanu T, Tao K, Miyao S, Suzuki Y, Nagahama M, Yamamoto T, Jensen TH, Akimitsu N. Diminished nuclear RNA decay upon *Salmonella* infection upregulates antibacterial noncoding RNAs. *EMBO J.* 37(13) e97723, 2018.
2. Xu J, Suita K, Okuno K, Takaya A, Yamamoto T, Isogai E. Membrane vesicle protein PagC as a novel biomarker for detecting pathogenic *Salmonella* in the viable but not culturable state. *J Vet Med Sci.* 80(1): 133-137, 2018.

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)

インフルエンザ菌の病原性解析ならびにインフルエンザ菌感染症、肺炎球菌感染症、B群溶血性レンサ球菌感染症の疫学調査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型株による病原因子の解析を行い、新たな予防法の開発を目指す。BCG感染症の迅速診断、黄色ブドウ球菌の病原性解析も行っている。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、附属病院における小児科・感染症内科での診療活動及び学内外でのコンサルテーションを行っている。

Our research focuses on sero-epidemiology and pathogenesis of *Haemophilus influenzae* *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae*. The pathogenic analysis of *Staphylococcus aureus* and the rapid diagnosis of BCG infection are also our research theme. We organize several clinical researches for the development of diagnostic and therapeutic methods for respiratory infectious diseases and also care for patients in the clinic of the University Hospital.

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

1. A nationwide population-based surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* diseases in children after the introduction of the *Haemophilus influenzae* type b vaccine in Japan.

Suga S¹, Ishiwada N², Sasaki Y³, Akeda H⁴, Nishi J⁵, Okada K⁶, Fujieda M⁷, Oda M⁸, Asada K¹, Nakano T⁹, Saitoh A¹⁰, Hosoya M¹¹, Togashi T¹², Matsuoka M³, Kimura K³, Shibayama K³

¹ Infectious Disease Center and Department of Clinical Research, National Hospital Organization Mie Hospital

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

³ Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

⁴ Okinawa Prefectural Nanbu Medical Center & Children's Medical Center

⁵ Kagoshima University Graduate School of Medical and

Dental Sciences

⁶ Fukuoka Nursing College

⁷ Department of Pediatrics, Kochi Medical School, Kochi University, Kochi, Japan.

⁸ Okayama University Graduate School of Health Sciences

⁹ Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School

¹⁰ Department of Pediatrics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

¹¹ Department of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine

¹² Hokkaido Anti-Tuberculosis Association

Background

Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine was introduced as a voluntary vaccine in December 2008 and was included in the national routine immunization program in April 2013 in Japan. Currently, no nationwide data are available to evaluate the effectiveness of Hib vaccine in Japan.

Methods

To evaluate the effectiveness of Hib vaccine in Japan, nationwide active population-based surveillance of culture-proven invasive infections caused by *H. influenzae* in children was performed in 2008-2017 in 10 prefectures in Japan (covering approximately 23% of the total Japanese population). Clinical data were recorded on a standardized case report form. Capsular type and antimicrobial susceptibility of the *H. influenzae* isolates were examined. The incidence rate ratio (IRR) and its confidence interval (CI) were calculated to compare data from 5 years before and that from after the introduction of the national routine Hib vaccine immunization program.

Results

During the 10-year study period, 566 invasive *H. influenzae* disease cases including 336 meningitis cases were identified. The average number of invasive *H. influenzae* disease cases among children <5 years of age during 2013-2017 decreased by 93% (IRR: 0.07, 95%CI 0.05-0.10, $p < 0.001$) compared with those occurring during 2008-2012. Hib strains have not been isolated from invasive *H. influenzae* disease cases since 2014; however, non-typeable *H. influenzae* and *H. influenzae* type f isolates have been noted as causes of invasive *H. influenzae* diseases among children <5 years in the post-Hib vaccine era.

Conclusions

After the governmental subsidization of the Hib vaccine, invasive Hib disease cases decreased dramatically in the study population, as per our surveillance. Continuous surveillance is necessary to monitor the effectiveness of Hib vaccine and for detecting any emerging invasive capsular types.

2. Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases in Japan from 2008 to 2015.

Naito S¹, Takeuchi N², Ohkusu M², Takahashi-Nakaguchi A², Takahashi H², Imuta N³, Nishi J³, Shibayama K⁴, Matsuoka M⁴, Sasaki Y⁴, Ishiwada N²

¹ Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine

² Medical Mycology Research Center, Chiba University,

Chiba, Japan

³ Department of Microbiology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

⁴ Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases

Haemophilus influenzae type b (Hib) conjugate vaccines have led to dramatic reductions in Hib disease among young children worldwide. Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) is now the major cause of invasive *H. influenzae* infections. We investigated the clinical characteristics of invasive NTHi diseases among children in Japan, to clarify the pathogenicity of isolated NTHi strains. The mortality rate was 10.7%, with deaths occurring mainly among children with underlying comorbidities. Biotypes II and III were the most common, and most strains (64.3%) had multiple amino acid substitutions at the Asp-350, Ser-357, Ser-385, and/or Met-377 sites of penicillin-binding protein 3. Two strains were β -lactamase positive and ampicillin-clavulanate resistant. Biofilm indices varied widely, and IS1016 was detected in 10.7% of the strains tested. Moreover, there was wide variation in the characteristics of invasive NTHi strains. NTHi strains, showing great genetic diversity, are responsible for most invasive *H. influenzae* infections in children in the postvaccine era. Continuous monitoring of NTHi strains responsible for invasive diseases in children is important to detect changes in the epidemiology of invasive *H. influenzae* infections in the postvaccine era.

3. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.

Takeuchi N¹, Segawa S², Ishiwada N³, Ohkusu M¹, Tsuchida S⁴, Satoh M⁴, Matsushita K², Nomura F⁴

¹ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center

² Division of Laboratory Medicine and Clinical Genetics

³ Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center

⁴ Division of Clinical Mass Spectrometry, Chiba University

Hospital

Haemophilus influenzae is a major pathogenic bacteria causing invasive disease, which is classified into six capsular serotypes (a-f) and non-typeable (NT) strains. Capsular serotyping of *H. influenzae* is traditionally determined by serological methods and more recently by PCR methods. However, these methods are time-consuming and expensive. In the present study, matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was evaluated as an alternative method for capsular serotyping of *H. influenzae* clinical strains. We created an in-house database of all six serotypes and NT *H. influenzae* strains using the main spectrum creation standard method set to the default parameters in MADI-TOF MS. We evaluated the performance of the in-house database using 79 clinical strains already identified by PCR and 58 prospectively collected clinical strains. Measurements were performed using the Bruker MALDI BioTyper system. The peak list was matched against the reference library using the integrated pattern algorithm of the software. The best-matched spectrum was considered the serotyping result. All 137 test strains were correctly identified as *H. influenzae* using MALDI-TOF MS. The sensitivity and specificity for identification for type b, type e, and type f capsular serotypes and NT *H. influenzae* using MALDI-TOF MS were 100%/94.3%, 94.7%/97.9%, 97.4%/97.9%, and 85.5%/99.2%, respectively. Our findings indicate that MALDI-TOF MS is a useful alternative method for capsular serotyping of *H. influenzae* strains. This method is faster and more cost-effective than traditional methods and will therefore be useful for routine applications in clinical laboratories.

4. Isolation rate of *Neisseria meningitidis* in Japanese children with respiratory tract infections.

Takei H^{1,2}, Ishiwada N³, Takeuchi N³, Ohkusu M³, Hoshino T⁴, Murata S⁵, Sato H⁶, Abe K⁷, Shizuno K⁸, Hishiki H¹, Shimajo N¹

¹ Department of Pediatrics, Chiba University Graduate School of Medicine

² Department of Emergency and General Paediatrics, Shizuoka Children's Hospital

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

⁴ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital

⁵ Division of Clinical Laboratory, Chiba University Hospital

⁶ Division of Clinical Laboratory, Chiba Children's Hospital

⁷ Department of Pediatrics, Chiba Kaihin Municipal Hospital

⁸ Department of Clinical Laboratory, Chiba Kaihin Municipal Hospital

Although invasive meningococcal disease is rare in Japan (0.028 cases per 100,000 population), its incidence is 10 times greater in many other countries. Colonization is a prerequisite for invasive meningococcal disease. However, no study in Japan has involved specifically analyzing the carriage rate of *Neisseria meningitidis* in children. During 5 months in 2015, the respiratory tract specimens of patients who presented to 3 hospitals with respiratory symptoms were cultured. The bacteria were identified in selective media using a meningococcal detection kit and the serogroup was identified using polymerase chain reaction analysis. In 389 patients aged ≤15 years with respiratory symptoms, the *N. meningitidis* isolation rate was 0.26% (1/389). The serogroup of the only child who tested positive was Y. In this study, we detected a low meningococcal isolation rate in pediatric patients. Due to increasing globalization, the risk of invasive meningococcal disease is likely increasing in Japan. Accordingly, invasive meningococcal diseases should be continuously monitored in Japan. Future large-scale studies should assess meningococcal isolation rates and corresponding serogroups.

5. Nationwide survey of neonatal invasive fungal infection in Japan.

Ishiwada N¹, Kitajima H², Morioka I³, Takeuchi N¹, Endo M⁴, Watanabe A¹, Kamei K¹

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

² Department of Neonatology, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health

³ Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine

⁴ Department of Pediatrics, Chiba University Hospital

Invasive fungal infection (IFI) is a life-threatening infectious disease in high-risk neonates. Strategies for the treatment and prevention of IFI in neonates in Japan remain unclear. We conducted a nationwide retrospective survey to determine IFI incidence between January 2014 and October 2015. Primary survey questionnaires were submitted to 309 medical facilities that regularly treat high-risk neonates. The questionnaire assessed IFI incidence during the study period, methods for preventing fungal infection in early delivery neonates, and methods for preventing mother-to-child fungal transmission. The secondary questionnaire was for facilities that had IFI cases and replied to the primary questionnaire. In total, 128 medical facilities (41.4%) completed the primary questionnaire, 17/128 facilities recorded 23 proven or probable IFI cases. Estimated annual IFI incidence was 0.33/1000 live births of hospitalized neonates. Patient data at IFI onset were available for all 23 patients. Birth weight was < 1000g in 18 patients. Causative microorganisms were identified in 22 patients. *Candida* species (n = 21) were the most common pathogens, and one patient had mucormycosis. The mortality rate was 17.4%. Regarding neonatal fungal prophylaxis, 55/128 facilities (43.0%) reported administering therapy. The most frequently used prophylactic drugs were fluconazole, then micafungin. Fungal prophylaxis for mothers who showed fungal colonization was performed in 30/128 facilities (23.4%). Oxiconazole vaginal tablets were most commonly used as prophylaxis for high-risk mothers. In Japan, the diagnosis, treatment, and prevention of neonatal IFI varied. Continuous surveillance and treatment regimen for neonatal IFI are required to improve outcomes in high-risk neonates.

Publications: original articles

- 1) Ishiwada N, Kitajima H, Morioka I, Takeuchi N, Endo M, Watanabe A, Kamei K. Nationwide survey of neonatal invasive fungal infection in Japan. *Med Mycol* 56: 679-686, 2018
- 2) Takei H, Ishiwada N, Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Murata S, Sato H, Abe K, Shizuno K, Hishiki H, Shimojo N. Isolation rate of *Neisseria meningitidis* in Japanese children with respiratory tract infections. *Jpn J Infect Dis* 71: 244-246, 2018
- 3) Takeshita K, Ishiwada N, Takeuchi N, Takahashi Y, Naito S, Nagasawa K, Hishiki H, Hoshino T, Shimojo N. Pneumococcal IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in Japanese children with a medical history of hematopoietic neoplasms and solid tumors. *JJA* 71: 13-21, 2018
- 4) Sano T, Suzuki T, Nishigori A, Miyatake C, Koizumi S, Kaizu K, Fujita A, Kamisago M, Chang B, Ishiwada N, Asano T. The incidence of pediatric invasive bacterial diseases in Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital before and after the introduction of conjugate vaccines. *J Nippon Med Sch* 85: 34-38, 2018
- 5) Nagasawa K, Takeshita K, Taniguchi H, Suzuki H, Naito S, Hishiki H, Hoshino T, Kimura H, Suzuki, Shimojo N, Ishiwada N. Microfloral analysis of pediatric respiratory syncytial virus infection, with and without the use of antibiotics. *JJA* 71: 81-91, 2018
- 6) Takeuchi N, Segawa S, Ishiwada N, Ohkusu M, Tsuchida S, Satoh M, Matsushita K, Nomura F. Capsular serotyping of *Haemophilus influenzae* by using matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Infect Chemother.* 24: 510-514, 2018
- 7) Naito S, Takeuchi N, Ohkusu M, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Imuta N, Nishi J, Shibayama K, Matsuoka M, Sasaki Y, Ishiwada N. Clinical and bacteriologic analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from children with invasive diseases, Japan, 2008-2015. *J Clin Microbiol* 56: e00141-18, 2018.
- 8) Suga S, Ishiwada N, Sasaki Y, Akeda H, Nishi J, Okada K, Fujieda M, Oda M, Asada K, Nakano T, Saitoh A, Hosoya M, Togashi T, Matsuoka M, Kimura K, Shibayama K. Nationwide population-based surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* diseases in children after the introduction of the *Haemophilus influenzae* type b vaccine in Japan. *Vaccine* 36: 5678-5684, 2018

- 9) Toh-E A, Ohkusu M, Shimizu K, Ishiwada N, Watanabe A, Kamei K. Novel biosynthetic pathway for sulfur amino acids in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Genet.* 64: 681-96, 2018
- 10) Omura Y, Kusama Y, Takeuchi N, Ishiwada N. Mediastinal subcutaneous and multiple muscular abscesses after esophageal perforation caused by group B streptococcus serotype VIII in a type 2 diabetes mellitus patient *J Infect Chemother* 24: 401-403, 2018
- 11) Abe N, Fujieda Y, Nagaoka K, Ohkusu M, Yasuda S, Kamei K, Atsumi. Disseminated Cryptococcosis with Bronchiolitis and Cellulitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018 [Epub ahead of print]

伊庭 P I (RNA 制御) プロジェクト

Project for RNA Regulation

研究概要 (Summary)

細胞内でみられる遺伝子発現の制御ネットワークは、その細胞のもつ発生、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。そして疾患の原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 in a cell 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; 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
特任助教	原口 健	Research Assistant Professor	Takeshi Haraguchi
特任研究員	小林 和善	Research Fellow	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. Establishment of RNA medicine for cancer therapy using Super-S-TuD

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. Importantly, we previously established basic formulation for Lipid nanoparticle (LNP) preparation using COATSOME-X. Such LNPs was used to encapsulate Super-S-TuD 141/200c (suppresses the entire miR-200 family) and was systemically administrated into nude mice bearing tumors formed by a human mammary tumor cell line and was shown to suppress the formed tumors efficiently.

For innovative therapy for epithelial 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 important causative of cancer through inhibition of many important

tumor suppressor genes such as PDCD4, PTEN, SPRY1/2, FOXO1 and RECK, simultaneously. We will specifically target such refractory cancers as pancreatic and lung cancer. For this purpose, we encapsulate Super-S-TuD21 using a new synthetic lipid, COATSOME-Y, developed by DDS Research Institute of NOF very recently and introduce these LNPs intravenously into tumor bearing nude mice. We have been screening optimum formulations of LNP by evaluating its disposition after introduction. We found a few LNP formulations, which can deliver Super-S-TuD21 specifically into tumor tissues with a limited delivery to liver, kidney and spleen. We are now further optimizing the formulation by changing particle diameter of LNP, the species and contents of accessory lipids and PEGylated lipids. Importantly, some COATSOME-Y-based LNPs have shown to have much superior properties such as lower toxicity and high targeting activity to tumor tissues when compared with the previous COATSOME-X.

2. Isolation of small-molecular weight NF- κ B inhibitors

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. It is also constitutively activated in many epithelial tumors can be a promising target for cancer therapy. But most of the currently available NF- κ B inhibitors do indirectly target NF- κ B, such as IKKs. 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 further that the d4-family proteins are promising targets that directly suppress trans-activation activity of NF- κ B.

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 using a compound library from Takeda Pharmaceutical Company as an index, we have already screened binding compounds to DPF1 and DPF3a proteins, which were expressed and purified from *E. coli*. By monitoring the inhibitory effects of the obtained a hundred of binding compounds on the induction of NF- κ B target genes, such as *IL6* and *IL-8* after stimulating A549 cells with TNF- α , we have now isolated several compounds that effectively inhibit NF- κ B activity at the dosage of 1 μ M. Most of them were shown to simultaneously inhibit anchorage independent growth of several tumor cell lines. We will continue the project by structural expansion of these compounds to isolate compounds with higher specific activity for useful medicine for inflammation and cancer.

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 glioblastoma primary cells originated from patients (TGS-O1) 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.

This year, 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. We finally selected shDPF1-3'UTR#4 and shDPF3a-3'UTR#4, respectively, and both were integrated into G47 Δ in Todo lab. We have further analyzed basic virological properties of these armed G47 Δ , T-h7SK-shDPF1 and T-h7SK-shDPF3a and found no difference in cell-killing activity and induction kinetics viral protein synthesis after infection into TGS01, between parental G47 Δ and these two viruses. These results indicate that insertion of these shRNA expression units never affects

its oncolytic activity of the parental G47 Δ . We expect these shDPF1 and DPF3a efficiently function to prevent survival of cancer stem cells that are escaped from lytic infection by the immunological response induced by oncolytic virus infection. To obtain *in vitro* proof that siDPF1 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 will be used to introduce into the tumor bearing nude mice subcutaneously after encapsulating into lipid nanoparticles using a newly developed non-cationic lipid, COATSOME-X.

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
技 術 補 佐 員	八原あずさ	Research Promotion Technician	Azusa Yahara
技 術 補 佐 員	辺 彩	Research Promotion Technician	Cai Bian (~ 2017/9)

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. 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 novel tools to help us more deeply understand and more efficiently extract biological meanings from the data. DPartite is able to detect *de novo* transcription factor binding motifs.

Publications

- 1) Hara S, Hara Y, Arai AM, Kusuya Y, Takahashi H, Yaguchi T, Ishibashi M. Isolation of nabscessin C from *Nocardia abscessus* IFM10029T and a study on biosynthetic pathway for nabscessins. *Chem Pharm Bull*

- (Tokyo). 66(10):976-982. 2018.
- 2) Hagiwara D, Takahashi H, Takagi H, Watanabe A, Kamei K. Heterogeneity in Pathogenicity-related Properties and Stress Tolerance in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates. *Med Mycol J.* 59(4): E63-E70. 2018.
 - 3) Hagiwara D, Arai T, Takahashi H, Kusuya Y, Watanabe A, Kamei K. Clinical isolates of non-cyp51A azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring a mutation in *hmg1* gene encoding HMG-CoA reductase. *Emerg Infect Dis.* 24(10):1889-1897. 2018.
 - 4) Toyotome T, Hagiwara D, Takahashi H, Watanabe A, Kamei K. Emerging Antifungal Drug Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Among Other Species of *Aspergillus*. *Current Fungal Infection Reports.* 12(3): 105-111. 2018.
 - 5) Naito S, Takeuchi N, Ohkusu M, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Imuta N, Nishi J, Shibayama K, Matsuoka M, Sasaki Y, Ishiwada N. Clinical and Bacteriologic Analysis of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Children with Invasive Diseases in Japan from 2008 to 2015. *J Clin Microbiol.* 56(7), pii: e00141-18. 2018.
 - 6) Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T. *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cellular Microbiology.* 20(3). 2018.

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	山中 美花	Research Promotion Technician	Mika Yamanaka

1. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: comparison of two *in vitro* methods.

Lyskova P^{1,2}, Hubka V^{1,3,4}, Svobodova L¹, Barrs V⁵, Dhand N⁵, Yaguchi T⁶, Matsuzawa T⁷, Horie Y⁶, Kolarik M^{3,4}, Dobias R^{1,8}, Hamal P¹

¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

² Laboratory of Medical Mycology, Department of Parasitology, Mycology and Mycobacteriology Prague, Public Health Institute in Usti and Labem, Prague, Czech Republic

³ Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴ Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology of the CAS, Prague, Czech Republic

⁵ Sydney School of Veterinary Science and Marie Bashir Institute of Infectious Diseases and Biosecurity, University of Sydney, Camperdown, NSW, Australia

⁶ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

⁷ University of Nagasaki, Nagasaki, Japan

⁸ Laboratory of Clinical Mycology, Institute of Public Health, Ostrava, Czech Republic

Cryptic species of *Aspergillus fumigatus*, including the *Aspergillus viridinutans* species complex, are increasingly reported to be causes of invasive aspergillosis. Their identification is clinically relevant, as these species frequently have intrinsic resistance to common antifungals. We evaluated the susceptibilities of 90 environmental and clinical isolates from the *A. viridinutans* species complex, identified by DNA sequencing of the calmodulin gene, to seven antifungals (voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B, anidulafungin, micafungin, and caspofungin) using the reference European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) method. The majority of species demonstrated elevated MICs of voriconazole (geometric mean [GM] MIC, 4.46 mg/liter) and itraconazole (GM MIC, 9.85 mg/liter) and had variable susceptibility to amphotericin B (GM MIC, 2.5 mg/liter). Overall, the MICs of posaconazole and the minimum effective concentrations of echinocandins were low. The results

obtained by the EUCAST method were compared with the results obtained with Sensititre Yeast One (YO) panels. Overall, there was 67% agreement (95% confidence interval [CI], 62 to 72%) between the results obtained by the EUCAST method and those obtained with YO panels when the results were read at 48 h and 82% agreement (95% CI, 78 to 86%) when the results were read at 72 h. There was a significant difference in agreement between antifungals; agreement was high for amphotericin B, voriconazole, and posaconazole (70 to 86% at 48 h and 88 to 93% at 72 h) but was very low for itraconazole (37% at 48 h and 57% at 72 h). The agreement was also variable between species, with the maximum agreement being observed for *A. felis* isolates (85 and 93% at 48 and 72 h, respectively). Elevated MICs of voriconazole and itraconazole were cross-correlated, but there was no correlation between the other azoles tested.

2. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*) : opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization.

Hubka V^{1,2,3}, Barrs V⁴, Dudová Z^{1,3}, Sklenář F^{1,2}, Kubátová A¹, Matsuzawa T⁵, Yaguchi T⁶, Horie Y⁶, Nováková A², Frisvad JC⁷, Talbot JJ⁴, Kolařík M²

¹ Department of Botany, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

² Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology of the CAS, Prague, Czech Republic

³ First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

⁴ Sydney School of Veterinary Science, Faculty of Science, and Marie Bashir Institute of Infectious Diseases & Biosecurity, University of Sydney, Camperdown, NSW, Australia

⁵ University of Nagasaki, Nagasaki, Japan

⁶ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

⁷ Department of Biotechnology and Biomedicine, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark

Aspergillus is a speciose genus with almost 400 species classified into six subgenera and approximately 25 sections (Samson et al. 2014, Jurjević et al. 2015, Hubka et al. 2016, 2017, Chen et al. 2016, 2017, Kocsubé et al. 2016, Sklenář et al. 2017, Tanney et al. 2017). The species are widely distributed in nature and have a significant economic impact in human and animal health (causative agents of aspergillosis; allergies and respiratory problems associated with presence of fungi in the indoor environment), the food industry (source of enzymes and organic acids for fermentation, food and feed spoilage, production of hazardous mycotoxins), biotechnology and pharmacology (production of bioactive substances, heterologous proteins) (Pitt & Hocking 2009, Meyer et al. 2011, Frisvad & Larsen 2015, Sugui et al. 2015, Gautier et al. 2016). *Aspergillus* sect. *Fumigati* includes approximately 60 species occurring predominantly in soil (Hubka et al. 2017). Many are of considerable medical importance as they cause human and animal infections (Balajee et al. 2005, 2009, Katz et al. 2005, Yaguchi et al. 2007, Hubka et al. 2012, Talbot & Barrs 2018). *Aspergillus fumigatus* is usually reported as both the most common member of the section in soil worldwide and the most common cause of aspergillosis (Klich 2002, Domsch et al. 2007, Mayr & Lass-Flörl 2011). A series of recent studies highlighted the high prevalence (11–19%) of so-called cryptic *Aspergillus* species in clinical samples (Balajee et al. 2009, Alastruey-Izquierdo et al. 2013, Negri et al. 2014, Sabino et al. 2014). Their identification is clinically relevant since many demonstrate drug resistance to commonly used antifungals, thus their recognition influences therapeutic management. Reliable identification of clinical isolates to the species level and susceptibility testing by reference methods is thus warranted (Lyskova et al. 2018). Many of these less common pathogens belong to sect. *Fumigati* and the highest numbers of infections are attributed to *A. lentulus*, *A. thermomutatus* (syn. *Neosartorya pseudofischeri*) and species from *A. viridinutans* species complex (AVSC) (Balajee et al. 2005, 2006, Sugui et al. 2010, 2014, Barrs et al. 2013, Talbot & Barrs 2018).

3. *Moniliella sojae* sp. nov., a species of black yeasts isolated from Vietnamese soy paste (tuong), and reassignment of *Moniliella suaveolens* strains to *Moniliella pyrgileucina* sp. nov., *Moniliella casei* sp. nov., and *Moniliella macrospora* emend. comb. nov.

Thanh VN¹, HienDD¹, Yaguchi T², Sampaio JP³, Lachance M-A⁴

¹ Center for Industrial Microbiology, Food Industries Research Institute, 301-Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

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

³ UCIBIO-REQUIMTE, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal

⁴ Department of Biology, University of Western Ontario, London, Canada

The presence of yeasts at different steps of Vietnamese soy paste production was studied. Yeast growth occurred during primary soybean fermentation, with the cell density reaching 4.106 cfu/ml and terminated during brine fermentation. The dominant species were *Pichia kudriavzevii* and *Millerozyma farinosa*. Over the span of 14 years, nine strains of *Moniliella* were isolated. The strains had identical PCR fingerprints generated with primer (GAC) 5 and identical D1/D2 and internal transcribed spacer (ITS) sequences. A D1/D2-based phylogeny indicated that the strains were closest to a group of four previously assigned as *Moniliella suaveolens* strains. Together they form a new lineage that is well separated from all known species, including *M. suaveolens* (over 12.7% divergence). ITS sequences indicated the presence of four species differing from each other by 9-57 nt. The name *Moniliella sojae* sp. nov. is proposed to accommodate the strains isolated from Vietnamese soy paste, *Moniliella pyrgileucina* sp. nov. is proposed for PYCC 6800 and *Moniliella casei* sp. nov. is proposed for CBS 157.58. An emended combination *Moniliella macrospora* is proposed for CBS 221.32 and CBS 223.32. The type strains and MycoBank numbers are: *M. sojae* sp. nov., SS 4.2^T=CBS

126448^T=NRRL Y-48680^T and MB 822871; *M. pyrgileucina* sp. nov., PYCC 6800^T=CBS 15203^T and MB 823030; *M. casei* sp. nov., CBS 157.58^T=IFM 60348^T and MB 822872; *M. macrospora* emend. comb. nov., CBS 221.32^T (=MUCL 11527^T) and MB 822874.

Publications

- 1) Furuya M, Kobayashi H, Baba M, Ito T, Tanaka R, Nakatani Y. Splice-site mutation causing partial retention of intron in the FLCN gene in Birt-Hogg-Dube syndrome: a case report. BMC Med Genomics. 11: 42, 2018.
- 2) Hara Y, Arai AM, Sakai K, Ishikawa N, Gono T, Yaguchi T, Ishibashi M. Dehydropropylpantothenamide isolated by a co-culture of *Nocardia tenerifensis* IFM 10554^T in the presence of animal cells. J Nat Med. 72: 280-289, 2018.
- 3) Hara Y, Arai AM, Toume K, Masu H, Sato T, Komatsu K, Yaguchi T, Ishibashi M. Co-culture of a pathogenic actinomycete and animal cells to produce nocarjamide, a cyclic nonapeptide with Wnt signal-activating effect. Organic Letters. 20: 5831-5834, 2018.
- 4) Hirose M, Noguchi H, Yaguchi T, Matsumoto T, Hiruma M, Fukushima S, Ihn H. Onychomycosis caused by *Aspergillus subramanianii*. J Dermatol. 45: 1362-1366, 2018.
- 5) Hubka V, Barrs V, Dudová Z, Sklenář F, Kubátová A, Matsuzawa A, Yaguchi T, Horie Y, Nováková A, Frisvad JC, Talbot JJ, Kolařík M. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. Persoonia. 41: 142-174, 2018.
- 6) Inoue N, Wakana D, Takeda H, Yaguchi T, Hosoe T. Production of an emericellin and its analogues as fungal biological responses for Shimbu-to extract. J Nat Med. 72: 357-363, 2018.
- 7) Inoue N, Wakana D, Takeda H, Yaguchi T, Hosoe T. Effect of Shakuyaku-kanzo-to for sterigmatocystin production in *Emericella nidulans*. JSM Mycotoxins. 68: 19-25, 2018.
- 8) Ishikawa K, Wakana D, Itabashi T, Takeda H, Yaguchi

- T, Kawai K, Hosoe T. Four cyclodipeptides, asnovolenins A-B and asnovozines A-B, from *Aspergillus novofumigatus*. *Heterocycles*. 96: 1053, 2018.
- 9) Kato I, Furuya M, Matsuo K, Kawabata Y, Tanaka R, Ohashi K. Giant cell tumours of bone treated with denosumab: Histologic, immunohistochemical, and H3F3A mutation analyses. *Histopathology*. 72: 914-922, 2018.
 - 10) Kobayashi M, Kitahara H, Yaguchi T, Sato T. A case of Tinea corporis on the arm caused by *Nannizzia gypsea* with dermatoscopic images. *J Deutschen Dermatol Gesellschaft*. 16: 784-786, 2018.
 - 11) Lyskova P, Hubka V, Svobodova L, Barrs V, Dhand N, Yaguchi T, Matsuzawa T, Horie Y, Kolarik M, Dobias R, Hamal P. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: comparison of two *in vitro* methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 62: pii: e01927-17, 2018.
 - 12) Matsumoto K, Udaka N, Hasumi H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Tanaka R, Kato I, Yao M, Furuya M. Histopathological analysis of aggressive renal cell carcinoma harboring a unique germline mutation in fumarate hydratase. *Pathol Int*. 68: 473-478 2018.
 - 13) Nasu S, Sato S, Shimizu K, Matsuno O, Morishita H, Yaguchi T, Kawahara K, Matsuoka H. Spontaneous regression of allergic bronchopulmonary mycosis due to *Curvularia lunata*. *Intern Med*. 57: 243-246, 2018.
 - 14) Nishi M, Okano I, Sawada T, Hara Y, Nakamura K, Inagaki K, Yaguchi T. Chronic bursitis of the ankle caused by *Kirschsteiniothelia*: the first case report of human infection. *BMC Infect Dis*. 18: 236-240, 2018.
 - 15) Noguchi G, Furuya M, Okubo Y, Nagashima Y, Kato I, Matsumoto K, Tanaka R, Hisasue S, Yao M, Kishida T. Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer without cutaneous manifestations in two Japanese siblings. *Int J Urol*. 25: 832-835, 2018.
 - 16) Notarte KIR, Yaguchi T, Suganuma K, dela Cruz TE. Antibacterial, cytotoxic and trypanocidal activities of marine-derived fungi isolated from Philippine macroalgae and seagrasses. *Acta Botanica Croatica*. 77: 141-151.
 - 17) Shigeyasu C, Yamada M, Aoki K, Ishii Y, Tateda K, Yaguchi T, Okajima Y, Hori Y. Metagenomic analysis for detecting *Fusarium solani* in a case of fungal keratitis. *J Infect Chemother*. 24: 664-668, 2018.
 - 18) Takahashi-Nakaguchi A, Sakai K, Takahashi H, Hagiwara D, Toyotome T, Chibana H, Watanabe A, Yaguchi T, Yamaguchi M, Kamei K, Gono T. *Aspergillus fumigatus* adhesion factors in dormant conidia revealed through comparative phenotypic and transcriptomic analyses. *Cellular Microbiol*. 20: e12802, 2018.
 - 19) Thanh VN, HienDD, Yaguchi T, Sampaio JP, Lachance M-A. *Moniliella sojae* sp. nov., a species of black yeasts isolated from Vietnamese soy paste (tuong), and reassignment of *Moniliella suaveolens* strains to *Moniliella pyrgileucina* sp. nov., *Moniliella casei* sp. nov., and *Moniliella macrospora* emend. comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 68: 1806-1814, 2018.

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ます。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ました。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ました。また現地に滞在する米国医師らと協力し、エイズ患者の命を奪う主な原因である真菌感染症、特にクリプトコッカス属菌による感染を中心に疫学的調査を計画しています。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始めました。海外での研究は、現地の研究者や監督官庁と信頼関係を築き、許可を得るなど多くの問題を解決しなければ前進できません。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重ねています。

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. A new project for epidemiological study of *Cryptococcus* in HIV-infected patients was launched in collaboration with Kenya Medical Res. Institute (KEMRI) and doctors from UCSF, USA. Furthermore, we have examined the resistance properties against antifungals and resistance mechanism on the isolates causative aspergillosis in the environment.

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者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ことから、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いる。

当センターの真菌症リファレンスセンターを通じたネットワークに慶應大学呼吸器内科および感染制御部・感染制御センターも加えた共同研究を継続しており、アスペルギルス症難治化の一因である *Aspergillus fumigatus* における耐性化率が著しい上昇していること、さらにこれまでに知られていなかった新しい耐性機構（HMG-CoA reductase の変異によるもの）などの新規知見を見出したが、本年度はこの新規耐性機構とこれを裏付けるエルゴステロール産生量のデータを加え、米国CDCの発行する Emerging Infectious Diseases 誌（IF 7.42）にて公表した。また、慶應大学病院等との国内共同疫学研究では、患者の基礎疾患としての慢性肺疾患をこれまでのCOPDに加え、肺結核・肺非結核性抗酸菌感染症後遺症についても解析の対象として拡大し、薬剤耐性株が検出されたほぼ全症例に抗真菌薬投与歴があることが明らかになった。一方、慢性肺アスペルギルス症の起原因菌種の解析では、欧米を含めた諸外国とは異なり *Aspergillus* section *Nigri* が極めて多いことが確認された。現在さらに同大学から供与された株及び本センター保存株を用い、未知の耐性機構を持つ菌株について解析を進めている。

一方、新生児領域における研究に関しては、日本新生児育成医学会・感染対策予防接種委員会の協力を得て実施した新生児深在性真菌感染症発症状況調査において、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、病原診断の難しさが根底にあるのではないかと考えた。そこで、本年は、乳児結核の診断で有用とされる胃液検査が新生児の糸状菌感染症の診断に有用でないかと考え臨床検討を行った。その結果、原発性免疫不全症の代表的な疾患であり、且つ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に対して、胃液真菌培養を行うことで、糸状菌のひとつである *Rasamsonia piperina* の分離に成功した。さらに分離菌の薬剤感受性に基づいた治療により臨床症状の改善が認められた。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。上記の点に関して学会発表を行い、論文公表を予定している。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。

We found a novel antifungal-resistant mechanism (due to a mutation of HMG-CoA reductase) of *Aspergillus fumigatus* last year. We additionally analyzed the production of ergosterol of resistant and susceptible *A. fumigatus* strains and published a paper regarding this antifungal-resistant mechanism in Emerging Infectious Diseases. Furthermore, we are investigating an unknown resistant mechanism using the fungal strains stored in MMRC. Collaborative studies with other domestic hospitals such as Keio University Hospital, we enrolled the cases with non-tuberculous mycobacteriosis in addition to the cases with COPD. We found in almost all cases isolated antifungal-resistant strains had a history of antifungal exposure. We also found that the spectrum of causative fungi of chronic pulmonary aspergillosis in Japan is distinct from the ones in European countries or US; i. e., *Aspergillus* section *Nigri* is comparatively major as a responsible pathogen in our country.

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 (Medical Mycology 56: 679-686, 2018). 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. In this year, we experienced the case of a 2 month-old boy with chronic granulomatous disease which was diagnosed fungal pneumonia using gastric aspirate culture. *Rasamsonia piperina*

was isolated from gastric aspirate. The patient was treated with micafungin based on the drug susceptibility test and clinically improved. We also experienced 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. 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”

SATREPS (感染症分野)とは、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) と独立行政法人国際協力機構 (JICA) が共同で実施している、地球規模課題解決と将来的な社会実装に向けて日本と開発途上国の研究者が共同で研究を行う研究プログラムである。本課題は平成28年に採択、事業は平成29年度から開始されている。

真菌感染症患者は世界的に急増している。なかでも薬剤耐性真菌による感染症は致死率が極めて高い。真菌が耐性を獲得するメカニズムについては十分に解明されていないが、農地に散布される農薬 (抗真菌薬類似の成分を含む) の影響によるもの、慢性真菌感染症患者に対するアゾール系抗真菌薬の長期使用などが原因として考えられている。その一方、ブラジルでは薬剤耐性真菌の実態は十分解明されていない状況にある。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。ブラジルにおいてはカンピーナス大学附属病院とサンパウロ州の複数の医療機関との研究ネットワークが始動し、平成30年よりRedCapデータベースを用いた真菌症の症例登録、菌株収集が開始された。平成30年3月には研究代表者を含めた日本人研究者チームが参加し、カンピーナス大学において第一回Joint Coordinating Committeeが開催された。また平成30年8～9月、同11～12月にはそれぞれ3名のブラジル人研究者が来日し、約1か月間真菌研究に関する講義や研修を受けるとともに

第7回Global Network Forum on Infection and Immunityにおいてブラジル人研究者2名のポスターによる研究発表およびブラジル側project managerのMoretti ML教授による招請講演が行われた。

SATREPS is a Japanese government program that promotes international joint research. The program is structured as a collaboration between the Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) which provides competitive research funds for science and technology projects, and the Japan International Cooperation Agency (JICA) which provides development assistance (ODA). Based on the needs of developing countries, the program aims to address global issues and lead to research outcomes of practical benefit to both local and global society. Our proposal was selected in 2016, and the project started in 2017FY.

The incidence of fungal infections is increasing worldwide. The fungi's drug resistance has strengthened along with the increased frequency, and the mortality rate of the patients having contracted drug-resistant fungal infections is high. The mechanism how fungi gain drug resistance has not been clarified. For example, it could be through the exposure to pesticides containing ingredients similar to medical antifungal drugs in the fields (fungicides), or in the body of a patient with chronic fungal infection who has undergone a treatment using azole-based drugs for a long time. Moreover, there are few public data within Brazil that shows the frequency of identification regarding fungal strains that cause drug resistance. In this situation, we planned our project in collaboration with

the State University of Campinas in Brazil (UNICAMP). Aims of our project are to clarify the epidemiology of drug-resistant fungi causing drug resistance in Campinas Metropolitan area, develop a new detection method for the drug-resistant fungi and establish an optimum treatment system and research network regarding the drug-fungi centered in UNICAMP.

The research network between UNICAMP and several medical institutes in Sao Paulo State has already established and enrolling clinical cases of fungal infection and collecting clinical

fungal strains were started using RedCap database. In March 2018, 1st Joint Coordinating Committee was held at UNICAMP. Six Brazilian researchers visited and stayed in Japan for about 1 month to receive lectures and training on fungal research (from August to September and from November to December). During their stay in Japan, on 7th Global Network Forum in Infection and Immunity, 2 Brazilian researchers gave poster presentations and Prof. Moretti ML, the project manager of this program, delivered an invited lecture.



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)

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。我々はこれまでに、臨床分離株と次世代シーケンサー (NGS) 技術を活用して、*A. fumigatus* が感染中に薬剤耐性のみならず、高温耐性能を獲得するという環境適応進化ともいべき現象を明らかにしてきた。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す。「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。

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

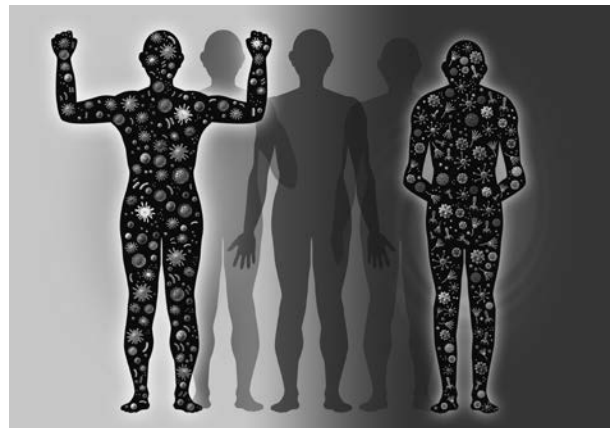
千葉大学では、学内での研究の核となる新たな研究グループの創出を目指す「グローバルプロミネント研究基幹」を設置しており、当センターの教員が中心となった研究プロジェクト「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」が、リーディング研究育成プログラムに採択され、活動を実施している。本プログラムでは、感染免疫分野及び微生物資源分野の教員が中心となり、医学研究院、薬学研究院、附属病院の研究者と連携して、共生微生物と宿主である個体の免疫システムとの相互作用、そこへ侵入する病原体による恒常性の破綻と感染症の発症機序などについての基礎研究を、皮膚、呼吸器、消化器など各種器官でのモデル実験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

provides protection against colitis by inducing Treg cells through modification of the intestinal microbiota. *Nat Immunol*, 19, 755-765, 2018.

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. In this program, the members focus on the understanding of molecular interactions between hosts and microbes, especially commensal fungi and bacteria, using the model assay systems targeting 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 the infectious diseases and lead to the improvement of human health.

主な発表論文

- 1) Otsubo R, Mimuro H, [Ashida H](#), Hamazaki J, Murata S, Sasakawa C. Shigella effector IpaH4.5 targets 26S proteasome subunit RPN13 to dampen cytotoxic T lymphocyte activation. *Cell Microbiol*, e12974, 2018.
- 2) Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kageyama T, [Tamachi T](#), Takatori H, Suzuki K, [Hirose K](#), Ohara O, Lefebvre V, Nakajima H. Sox12 promotes T reg differentiation in the periphery during colitis. *J Exp Med*, 217, 2509-2519, 2018.
- 3) Tang C, Kakuta S, Shimizu K, Kadoki M, Kamiya T, Shimazu T, Kubo S, [Saijo S](#), Ishigame H, Nakae S, Iwakura Y. Suppression of IL-17F, but not of IL-17A,



平成29年度 共同利用・共同研究報告

2017 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '17-1

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、健康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* (CG) と *C. neoformans* (CN) 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、*Cryptococcus* spp. が有する主要なT細胞抗原である98kDa manno protein (MP98) を認識する抗原受容体遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (CnT-II) の作成に成功している。本研究では、このマウスを用いることで以下のことが明らかとなっ

た。1) CnT-IIマウスの肺内に本真菌を感染させたところ、CGではCNに比べ肉芽腫反応に乏しく、菌体が肺腔内を充満していた。2) CGでは感染後のTh1免疫応答が低下した。3) CGの菌体成分が本真菌特異的なTh1細胞の分化誘導を抑制した。

一方で、本真菌の病原性に重要な莢膜多糖からCTAB非結合分画を採取し、さらにConA-sepharose 4Bカラムに結合する成分を精製しDectin-2との応答性を解析したところ、以下のことが明らかになった。1) CN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、CG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。

以上の結果から、*C. gattii* と *C. neoformans* はDectin-2への異なる刺激活性を示すことで、その後のTh1免疫応答が異なり、このことが両真菌の病原性の違いに関与する可能性が示唆された。両真菌種で異なるDectin-2のリガンド候補としてMPの可能性が考えられ、今後はその構造の違いとの関連性についてさらに解析を進める予定である。これらの成果は、第46回日本免疫学会学術集會にて報告した。

研究課題 '17-2

真菌病原性発現機構と宿主自然免疫応答の解析

倉田祥一郎

(東北大学大学院薬学研究科)

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)

Study of fungal pathogenicity and host innate immune responses

Shoichiro Kurata

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

日和見感染症に代表される感染症を引き起こす病原真菌の病原性発現機構は、依然として不明であり、大きな脅威となっている。真菌医学研究センター知花准教授は、*Candida glabrata*を用いて、5150遺伝子を組換えた変異体ライブラリーを作成している。このリソースを用いると、病原性の発現に関わる遺伝子をゲノムワイドに探索できる。しかしながら、マウスなどの哺乳動物を宿主として用いて網羅的に解析することは、現実的に不可能である。一方、自然免疫研究によく利用されているショウジョウバエは、生活環が短く網羅的解析に優れている。そこで、本研究では、センターの有する真菌のリソースを利用して、ショウジョウバエでの解析から、病原真菌の病原性発現機構の解明と、新たな抗真菌薬の標的の同定を目指した。

そのために、平成26年度に確立したショウジョウバエ網羅的感染実験系を用いて（採択番号14-11）、平成27年度に通常の培養条件では生育に必須ではない遺伝子を欠損した変異体2026系統を解析し、ショウジョウバエに対する病原性が低下した系統を57系統同定した（採択番号15-13）。平成28年度は、これらの内、宿主体内での増殖能が低下していた11系統を解析し、宿主体内での増殖に必要な遺伝子を同定した（採択番号16-6）。そこで、本年度は、ショウジョウバエを用いて同定したこれらの遺伝子が、マウスを宿主とした際にも、体内での増殖に関わるのかどうか検討すると共に、ショウジョウバエを用いた宿主の自然免疫応答を解析した。ショウジョウバエでは、真菌に対する免疫応答は、NF- κ B経路であるToll経路が制御している。当研究室では、このToll経路を制御する新規受容体を同定しているが、今回、この新規受容体は真菌に対する抵抗性の発現には関わらない事が明らかとなった。

研究課題 '17-3

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

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

加藤博己

(京都大学ウイルス・再生医学研究所)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Hiroki Kato

(Institute for Virus Research, Kyoto University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

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。特に近年は、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解析しており、これまでにPumilioの機能解析など複数の報告を行ってきた(*PLoS Pathogens*, 2016, 2014; *Curr Opin Immunol*, 2015)。本年度は、昨年度に同定した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実施した。これまでの解析から、このRBPの遺伝子破壊細胞においてRNAウイルス感染に応答したI型インターフェロン(IFN)遺伝子誘導すなわち抗ウイルス自然免疫応答が顕著に減弱していたことから、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ていた。さらにこの分子は、ウイ

ルス非感染細胞でRLRの一つであるLGP2と構成的に会合しており、ウイルス感染刺激に応答して両者の会合が減弱する結果が得られている。これまでにLGP2がウイルス非感染細胞で複数のRBPと会合していることを報告しており、ウイルス感染に応答したこの複合体の変化が、抗ウイルス応答に関与することが予想された。現在、これに注目した生化学的な解析および会合しているRNAの同定を含めた解析を実施している。一方で、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が進行中である。

研究課題 '17-4

Aspergillus fumigatus リボソーム標的薬剤耐性株における二次代謝活性化機構の解明

浅井禎吾

(東京大学大学院総合文化研究科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Activation of secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus* strains with resistance to ribosome-targeting chemicals

Teigo Asai

(Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Tetsu Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Daisuke Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

昨年度、化学変異源を用いて *Aspergillus fumigatus* のハイグロマイシンB耐性株を作製し、二次代謝が活性化した変異株を見出した。今年度は、化学変異源の濃度、処理時間、選抜時のハイグロマイシンBの濃度を変化させ、ハイグロマイシンB耐性株を20株程度取得した。それぞれ培養すると、二次代謝の活性化の様式がいくつかのパターンに分類された。それぞれ、数株ずつピックアップして、次世代シーケンサーを用いて網羅的な変異解析を行った。どの株でも数十の変異が導入されていたため、容易にどの変異が二次代謝活性化に寄与しているかは特定することが難しかったものの、耐性株間に共通する変異もいくつか見出しており、現在それらについて詳細な解析を行っている。また、他の *Aspergillus* 属菌についてもハイグロマイシンB耐性株の中に二次代謝活性化株を見出している。今後これらの株の変異解析を行い、種を越えて共通の変異を見出すことで、ハイグロマイシンB耐性化と二次代謝活性化に寄与する変異を特定して行く予定である。

研究課題 '17-5

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

Candida glabrata はアゾール低感受性であるために近年患者数が増加しているが、耐性機序において、未解明な点が多い。そこで当研究課題では、トランスクリプトーム解析によって *C. glabrata* におけるアゾール耐性新規メカニズムの探索を目的にしている。*C. glabrata* 臨床分離株を用いて、ポサコナゾール、クロトリマゾール、フルコナゾール、ボリコナゾールに20-45日間暴露すること

によって、各アゾールに対してそれぞれ感受性が低下した株（進化株）を取得することができた。生化学的解析の結果、いずれ株もエルゴステロール合成量には変化がなく、アゾールの細胞内蓄積量に減少が確認された。ゲノム解析並びにトランスクリプトーム解析の結果、4つアゾールに対して耐性を示した株では、多剤耐性排出ポンプを制御因子である *RDR1* に突然変異が確認された。ポサコナゾール／クロトリマゾール耐性株では *Epa3* 付着因子の高発現が確認された。*Epa3* はバイオフィルム形成に必要な遺伝子であり、アゾール耐性に関する報告はこれまでになく、新しい知見となった。以上の結果をまとめ、Antimicrobial Agents and Chemotherapyへ投稿した。現在、revise version を作成中である。

発表論文

- 1) Mafalda Cavalheiro, Catarina Costa, Ana Silva-Dias, Isabel M. Miranda, Can Wang, Pedro Pais, Sandra N. Pinto, Dalila Mil-Homens, Sato-Okamoto Michiyo, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Raquel M. Silva, Nuno P. Mira, Arsénio Fialhol, Hiroji Chibana, Acácio R. Gonçalves, Geraldine Butler, Miguel C. Teixeira: Unveiling the mechanisms of in vitro evolution towards fluconazole resistance of a *Candida glabrata* clinical isolate: a transcriptomics approach. Submitted to Antimicrobial Agents and Chemotherapy.
- 2) Romão D, Cavalheiro M, Mil-Homens D, Santos R, Pais P, Costa C, Takahashi-Nakaguchi A, Fialho AM, Chibana H, Teixeira MC. A New Determinant of *Candida glabrata* Virulence: The Acetate Exporter CgDtr1. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Nov 14; 7: 473. doi:10.3389/fcimb.2017.00473. eCollection 2017.

研究課題 '17-6

真菌細胞壁成分に対する自然免疫応答機構の解析

河合太郎

(奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

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成分の一つである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。うち4種類 (LysM1-4とする) は、互いに高い相同性を示すことから、まずこの4つに着目して解析を行った。本年度 CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、これら4種類をそれぞれ欠損するマウス樹立に成功した。キチン投与後の自然免疫応答について、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) の発現を中心に解析を行っている段階である。予備的ではあるが、これら遺伝子欠損マウスと野生型に大きな差は認められなかった。そこで、これら4種類すべてを欠損する四重欠損マウスの樹立を現在行なっている。2種類 (LysM2, 4) を欠損する二重欠損マウスの樹立に成功したが、このマウスにおいても免疫細胞の集積に差は認められなかった。また、残りの2種類 (LysM5, 6) についても遺伝子欠損マウスの樹立を行なっているところである。

研究課題 '17-7

Candida glabrata 細胞壁構築関連遺伝子欠損が菌体の性質に及ぼす影響

柴田信之・佐々木雅人・伊藤文恵・田中 大

(東北医科薬科大学)

知花博治・山口正規

(千葉大学真菌医学研究センター)

Deletion effect of genes related to the cell wall architecture of *Candida glabrata*

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Ito,
Yutaka Tanaka

(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)

Hiroji Chibana, Masaki Yamaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年、病原性酵母 *Candida glabrata* の細胞壁は、環境ストレス応答をきっかけにダイナミックにヘテロ再構築されること、またこの現象が既存の抗真菌薬への耐性や致死的な環境ストレスからの防御などの面で有利に働くことが相次いで報告された。このことは、細胞壁構造最適化 (Cell Wall Integrity: CWI) の仕組みと *C. glabrata* の病原性、および抗真菌薬耐性とのあいだに密接な関わりがあることを示唆している。我々は、*C. glabrata* CBS138 株の全遺伝子について作製した変異株ライブラリの中から、特に i) 小胞体-ゴルジ体-分泌経路をコードする遺伝子、および ii) 糖タンパク質の品質管理に関わるシャペロン遺伝子群の欠損株を中心に、細胞壁糖鎖構造構築と環境ストレス応答能、および CWI に及ぼす影響について解析している。

我々は昨年度までに、小胞体局在型分子シャペロンタンパク質 Kre5p をコードする *KRE5* 遺伝子の発現抑制により、①細胞壁βグルカン構造の異常・含量低下、②細胞壁キチン含量の代償的な増加、③MAPキナーゼタンパク質 Slt2p のリン酸化亢進、④小胞体 (ER) ストレス応答活性化、⑤免疫抑制剤 FK-506 に対する超高感受性がそれぞれ観察されることを明らかにしていた。しかし、これらの現象にそれぞれ相関があるかどうかはよくわかっていなかった。従って今年度は、細胞壁βグルカンへのダメージが ER ストレス応答を誘導し、Slt2p MAPキナーゼの活性化を経てキチン生合成を活性化するという仮説モデルを立て、様々な遺伝子欠損株ライブラリを用いて仮説モデルを検証した。

CNE1 は糖タンパク質品質管理を担うカルネキシン型分子シャペロン Cne1p をコードしている。*Cne1* 遺伝子欠損株の細胞壁を解析した結果、*KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様に、β1-6グルカン含量の減少と、細胞壁キチン含量の増加が認められた。加えて、Slt2 MAPキナーゼのリン酸化亢進、小胞体ストレスマーカー遺伝子 *KAR2* や *BAG7* の mRNA 転写活性化も同時に認められた。興味深いことに、カルシニューリン阻害剤 FK-506 を処理したところ、これら変異株における細胞壁キチン含量はさらに増大し、かつ CWI を司る MAPキナーゼである Slt2p のリン酸化が極端に亢進することがわかった。加えて、*cne1* 遺伝子欠損株に FK-506 を処理したところ、細胞周期の停止および細胞死と異形細胞凝集像が観察された。以上のことから、*cne1* 遺伝子欠損株も *KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様の表現型を示し仮説モデルに沿った細胞応答を示すことがわかった。次に、小胞体-ゴルジ体-分泌経路が細胞壁生合成に重要な働きをしていることに着目し、各オルガネラに局在して細胞壁生合成に関与する遺伝子を選抜して解析した。小胞体に局在してカルネキシンシャペロンを補助する *ROT2*、ゴルジ体に局在して細胞壁マンナン生合成を担う *MNN2*、*MNN11*、*HOC1*、細胞膜上~ペリプラスム間隙に局在してβグルカン合成を担う *KRE1*、*KRE11* のそれぞれ遺伝子欠損株を解析したところ、*mnn2*、*mnn1*、*hoc1* 遺伝子欠損株は上記①~⑤のいずれの表現型も示さなかった一方で、*rot2*、*kre1*、*kre11* 遺伝子欠損株では、*KRE5* 遺伝子発現抑制株や *cne1* 遺伝子欠損株と同様に、細胞壁構造の異常や FK-506 高感受性が観察された。これらのことは、*C. glabrata* の CWI は MAPキナーゼシグナル伝達を中心として、小胞体ストレス応答やカルシニューリン経路がこれを制御している、という仮説モデルを支持するものと考えられる。

ン酸化亢進、小胞体ストレスマーカー遺伝子 *KAR2* や *BAG7* の mRNA 転写活性化も同時に認められた。興味深いことに、カルシニューリン阻害剤 FK-506 を処理したところ、これら変異株における細胞壁キチン含量はさらに増大し、かつ CWI を司る MAPキナーゼである Slt2p のリン酸化が極端に亢進することがわかった。加えて、*cne1* 遺伝子欠損株に FK-506 を処理したところ、細胞周期の停止および細胞死と異形細胞凝集像が観察された。以上のことから、*cne1* 遺伝子欠損株も *KRE5* 遺伝子発現抑制株と同様の表現型を示し仮説モデルに沿った細胞応答を示すことがわかった。次に、小胞体-ゴルジ体-分泌経路が細胞壁生合成に重要な働きをしていることに着目し、各オルガネラに局在して細胞壁生合成に関与する遺伝子を選抜して解析した。小胞体に局在してカルネキシンシャペロンを補助する *ROT2*、ゴルジ体に局在して細胞壁マンナン生合成を担う *MNN2*、*MNN11*、*HOC1*、細胞膜上~ペリプラスム間隙に局在してβグルカン合成を担う *KRE1*、*KRE11* のそれぞれ遺伝子欠損株を解析したところ、*mnn2*、*mnn1*、*hoc1* 遺伝子欠損株は上記①~⑤のいずれの表現型も示さなかった一方で、*rot2*、*kre1*、*kre11* 遺伝子欠損株では、*KRE5* 遺伝子発現抑制株や *cne1* 遺伝子欠損株と同様に、細胞壁構造の異常や FK-506 高感受性が観察された。これらのことは、*C. glabrata* の CWI は MAPキナーゼシグナル伝達を中心として、小胞体ストレス応答やカルシニューリン経路がこれを制御している、という仮説モデルを支持するものと考えられる。

発表論文

- 1) Yutaka Tanaka, Masato Sasaki, Fumie Ito, Toshio Aoyama, Michiyo Sato-Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Nobuyuki Shibata: Cooperation between ER stress and calcineurin signaling requires maintaining the cell wall integrity in *Candida glabrata*, *Fungal Biology*, 122(1): 19-33
- 2) Fumie Itoh, Shizuka Takahashi, Yutaka Tanaka, Atsushi Kudoh, Masato Sasaki, Michiyo Okamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Masashi Yamaguchi, Kazuyoshi Kawakami, Hiroji Chibana and Nobuyuki Shibata: Glycosyltransferase Alg6 is required for cell wall integrity and virulence of *Candida glabrata*, *FEBS Journal* (Under revision)

研究課題 '17-8

薬剤耐性および感受性 *Aspergillus fumigatus* 株の代謝産物のメタボローム解析

細江智夫

(星薬科大学薬化学教室)

武田 尚

(星薬科大学薬化学教室)

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)

Metabolome analysis based on fungal metabolites of drug-resistant mutant *Aspergillus fumigatus*

Tomoo Hosoe

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Hisashi Takeda

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Daigo Wakana

(Department of Organic chemistry, Hoshi University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々は、近年発生し問題となっている *Aspergillus fumigatus* の薬剤耐性株を、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。昨年度は、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、上記検討を拡大し、当センターが保有するアゾール系薬物耐性菌 *A. fumigatus* 類縁菌、*A. lentulus*、*A. udagawae* 及び *A. viridinutans* を対象に、その培養及び HPLC プロファイル解析を実施し、耐性株の相似性に関与する化学成分の探索を行った。

A. lentulus、*A. udagawae* 及び *A. viridinutans* 各 8 菌株を

PDB 培地及び米固体培地、25℃ でそれぞれ 1 週間もしくは 2 週間培養を行い、得られた培養エキスを HPLC 分析した。培養の結果、両培地とも菌の発育は観測されたものの、PDB 培地培養では特徴的な代謝産物は観測されなかった。米固体培地培養では保持時間 25.7 分のピークがほぼすべての菌株で共通して観測された。また、*A. viridinutans* と *A. lentulus* は共通性の高い HPLC プロファイルを示したが、*A. udagawae* は上記 2 菌種とは異なり、高極性化合物を多数産生することが明らかとなった。

今後、更に培地種、培養温度等の検討を行い最適な培養条件を設定した後、各菌株の培養エキスについて ¹H-NMR スペクトルを用いたメタボローム解析を行う予定である。

研究課題 '17-9

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29年度では、前年度までにCas9/CRISPRゲノム編集技術を用いたスクリーニングで得られた、血清存在下での生育に必須と予想される遺伝子の検討を行った。

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26種類の候補遺伝子を前年度までに取得していた。得られた遺伝子が予想通りに血清存在下で必須かどうかを確認するために、26種類全ての遺伝子について、*A. fumigatus* Afs35株を宿主として、ハイグロマイシン耐性遺伝子の挿入による遺伝子破壊を行った。それぞれの遺伝子破壊株を血清存在下で培養し生育を比較したが、いずれの破壊株も生育の低下を示すものは確認できなかった。この結果を踏まえて、今後、Cas9/CRISPR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、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) Takashi Umeyama, Yuta Hayashi, Hisaki Shimosaka, Tatsuya Inukai, Satoshi Yamagoe, Shogo Takatsuka, Yasutaka Hoshino, Minoru Nagi, Shigeki Nakamura, Katsuhiko Kamei, Kenji Ogawa, Yoshitsugu Miyazaki: Cas9/CRISPR genome editing to demonstrate the contribution of Cyp51A Gly138Ser to azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. bioRxiv. May 1, 2018. (DOI: 10.1101/311712).

研究課題 '17-10

新規抗真菌剤の合成および活性評価研究

椎名 勇

(東京理科大学理学部第一部応用化学科)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Enantioselective synthesis of new antibacterial and antifungal agents and evaluation of its activity

Isamu Shiina

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science)

Minehiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Katsuhiko Kamei

(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リライド天然物(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リライド類縁体(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。さらに、2017年には置換基を天然のものから違えた構造に変換した非天然型のユーシェアリライド類縁体の合成を実施し、数種類の人工化合物の製造を行なった。平成29年度の共同研究では、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リライド立体異性体(8種類)の発育阻止効果試験に加え、上記非天然型ユーシェアリライドを用いた真菌とバクテリアに対する発育阻止効果試験を実施した。その結果、天然物よりも抗真菌活性と抗細菌活性ともに高い人工型のユーシェアリライド類縁体があることを確認した。平成30年度の共同研究においても、これら新規化合物を用いた真菌とバクテリアに対する活性調査試験を継続する予定である。

発表論文

- 1) Takayuki Tono, Inohana, Takehiko Inohana, Teruyuki Sato, Tomoki Yoshida, Isamu Shiina: Total Synthesis and Antimicrobial Activities of All Stereoisomers of (16Z, 20E)-Eushearilide and (16E, 20E)-Eushearilide: The Journal of Organic Chemistry 83, 印刷中(doi: 10.

1021/acs.joc.8b00774).

研究課題 '17-11

アゾール系農薬テブコナゾールによる選択で得られた耐性 *Aspergillus fumigatus* 株の解析

豊留孝仁

(帯広畜産大学獣医学研究部門)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of azole-resistant *A. fumigatus* clones selected with a fungicide, tebuconazole

Takahito Toyotome

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

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

近年、*Aspergillus fumigatus* のアゾール薬耐性化が問題となってきている。農地等外部環境中で用いられているアゾール系抗カビ剤が耐性化成因の一つとして挙げられている。農薬での選択で生じる耐性化は十分に明らかとなっておらず、今後も新たな耐性菌の出現が懸念される。我々はこれまでに日本で使用量が最も多いアゾール系抗カビ剤テブコナゾールを用いて *A. fumigatus* の選択を行い、テブコナゾールに対する感受性の低下した4クローンを取得してきた。本研究ではこれらクロンの耐性化要因の解明を行った。

まず、これまでに得られているクロンの医療用アゾール薬に対する感受性を評価した。その結果、テブコナゾール耐性株はいずれもボリコナゾールに耐性を示すことが明らかになった。また、株によってはイトラコナゾールに対しても耐性を示すことが明らかとなった。標的酵素である Cyp51A のプロモーター領域およびコード領域を解析したが、いずれも変異は認められなかった。これらの結果から、Cyp51A に依らない未知の機構によりアゾール系抗真菌薬への耐性を獲得していることが推測された。

現在、他競争的資金にて引き続き解析を進めており、耐性クローンにおいてゲノムワイドでの解析を行い、複数の変異箇所を同定済みである。4株共通して major facilitator superfamily (MFS) タンパク質に点変異を生じていることが明らかになっている。今後このタンパク質の薬剤耐性への寄与について解析を進める予定である。

研究課題 '17-12

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

千葉大学が保有する1,000種類のオリジナル合成化合物のうち450種類の化合物については、一次スクリーニングを終了した。その結果、6種類の化合物について特許出願中である(特願2016-058951)。平成28年度は残る550種類の化合物について、*Candida albicans*, *C. glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* 等の主要な病原真菌に対して生育阻害活性が確認された。次にこれらの化合物について、マウスの培養細胞を用いて呼吸阻害活性を指標とした細胞毒性を測定したところ、1種類の化合物に細胞毒性が確認されず、抗真菌薬「シーズ候補」とし、現在作用点の解析を進めている。

研究課題 '17-13

Aging associated tissues dysfunction through regulation of microbiota and metabolites

早野元詞

(Genetics Department, Harvard Medical School)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

Motoshi Hayano

(Genetics Department, Harvard Medical School)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

腸内細菌叢と肥満、がん、炎症などについてはさまざまな報告があがってきているが、一方で老化と腸内細菌叢の関係は不明である。本研究は腸内細菌による記憶や筋肉など多臓器への影響を含む「老化」制御の可能性を探り、腸内細菌やメタボライトの制御を介した臓器機能の回復を検討することを目標とした。

I-PpoIと呼ばれるエンドヌクレースを用いたDNA損傷誘導型のエピゲノム変化による早老症モデル、ICE (Inducible changed in Epigenome) マウスはHarvard Medical SchoolのDavid A. Sinclair研究室において構築されている (unpublished data)。ICEマウスでは野生型の老化マウス同様に記憶や筋肉における機能低下が観察され、FOXOやCTCF結合領域特異的なH3K27ac, H3K56acそしてDNA methylationの変化が観察される。今回、千葉大学真菌医学研究センターにおいて、ICEマウスや野生型の老化マウスの脳において、炎症マーカーであるマイクログリアやアストロサイトの上昇、そしてFluoro Jade C stainingによるNeuronal Degenerationが確認された。これらの結果からICEマウスにおいて記憶障害は異常な炎症応答を介していることが明らかになった。今後、この炎症惹起の要因について、腸内細菌叢と代謝産物について検討するとともに、腸管の感染制御に関わる α 1, 2-フコース発現とそれに対する*S. Typhimurium*や*Citrobacter rodentium*感染がどのように老化を制御するかを引き続き検討する。特に老化において腸内細菌叢による代謝産物が体全体のDNAやヒストン修飾をどのように制御し、疾患を誘導するかに焦点をあてて、共同研

究を進展させる。

研究課題 '17-14

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を欠損する(Trem2^{-/-})マクロファージは、真菌受容体であるC型レクチンを介したサイトカイン/ケモカイン応答が増強することを見出した。そこで、カンジダ感染防御におけるTrem2の生理的役割を明らかにするため、Trem2^{-/-}マウスを用いた*Candida albicans*感染試験を貴センター実験施設にて実施した。初回の感染実験において、Trem2^{-/-}マウスは野生型コントロールマウスに比べて有意に死亡率の減少が観察された。感染臓器内(感染後4日目)でTNFの上昇とIL-10産生の減少の傾向が見られた。2回目の感染試験においても、有意差は無いものの、やはりTrem2欠損マウスで死亡率の改善が観察されたが、感染臓器内(感染後7日目)でのサイトカイン産生に有意な差は認められなかった。従って次年度は、この実験結果の追試を実施し、さらに詳細に経時的にカンジダ感染後のマウスを解析し、カンジダ感染防御におけるTrem2シグナルの役割をより明確にするるとともに、Trem2によるCLRシグナル抑制の分子メカニズムの解明を目指す。

研究課題 '17-15

哺乳類特異的な自然免疫応答機構とRNAサイレンシング機構における相互作用の解明

程久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Molecular interaction between gene silencing and innate immune responses in mammalian cells

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々は、RNAによって惹起されるという点で共通の分子機構であるRNAサイレンシングと抗ウイルス応答の両方の経路に関わる初めての分子としてTAR-RNA binding protein (TRBP)を同定した。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、抗ウイルス応答においては細胞内ウイルスセンサーであるRIG-I-like receptors (RLRs)の1つであるLGP2とも相互作用する。抗ウイルス応答によりRLRsの発現量が上昇すると、LGP2とTRBPは相互作用し、TRBPのRNAサイレンシング促進機能を抑制すると考えられる結果を得ていたが、その作用機序は不明であった。しかし、我々は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を明らかにした。すなわ

ち、LGP2がTRBPと相互作用することで、それまでTRBPが結合していたRNAサイレンシングに関わるmicroRNAを遊離することが明らかになった。そこで、TRBPが結合するmicroRNA (miRNA)を同定するためにRNA免疫沈降シークエンスをおこない、TRBPと共免疫沈降するmiRNAを網羅的に同定した。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への生合成過程が阻害されているがノーザンブロットによって明らかになった。さらに、それらの標的遺伝子群を情報科学的に推定し、実際にそれらの遺伝子の発現が上昇することもRT-PCR法によって証明した。

今後は抗ウイルス応答によりRNAサイレンシングが抑制される生物学的意義について、ゲノムワイドな遺伝子発現変動の解析により明らかにする。

なお、本研究成果の一部は、現在論文投稿中である。

研究課題 '17-16

臨床検体から分離されたテルビナフィン低感受性(耐性)白癬菌株における耐性化メカニズムの解明

山田 剛

(帝京大学医真菌研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

田中玲子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene.

Tsuyoshi Yamada

(Teikyo University Institute of Medical Mycology)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Reiko Tanaka

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

申請者らとスイス・ローザンヌにある Centre Hospitalier Universitaire vaudois (CHUV) の共同研究グループは、2013年～2016年にかけてCHUVを拠点に収集した臨床分離白癬菌2,056株を対象に、白癬の治療に広く使用されているテルビナフィン (TBF) を含むサブローデキストロース寒天培地を用いた簡易培養試験を行い、17株の培養陽性株を見出した。これらのTBF低感受性株では、TBFの作用標的であるスクワレンエポキシダーゼをコードする *SQLE* 遺伝子のORF内にアミノ酸置換を生じる幾つかの点変異 (SNP) が認められた。そこで、TBFに感受性を示す白癬菌 *Arthroderma vanbreuseghemii* に遺伝子操作を行い、内在性の *SQLE* 遺伝子に同様のSNPを導入した複数の変異株を作出した。これらの *SQLE* 変異株の幾つかについて、CLSI法によるTBF感受性評価を行ったところ、全ての変異株で明確な感受性低下が認められた。これより、本研究で見出された臨床分離白癬菌株における薬剤耐性化の主要原因は、*SQLE* 遺伝子に生じた点変異によるタンパク質のアミノ酸変異に伴う立体構造の変化であることが示唆された。

一方、今回見出された臨床分離TBF低感受性白癬菌株の中には、*SQLE* タンパク質内に Phe³⁹⁷ → Leu 変異を有する複数の株が含まれていた。これらの株について、CLSI法によるTBF感受性評価を行ったところ、TIMM20,092株のみ、その他の株に比べ、より一層の感受性低下が認められた。これより、TIMM20,092株のTBF低感受性化には、*SQLE* 遺伝子に生じた点変異に加え、別の要因が関与している可能性が示唆された。現在、薬剤の排出に関わるトランスポーター遺伝子の発現レベルの解析を行っているところである。

発表論文

- 1) Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(7): e00115-17, 2017.

研究課題 '17-17

アスペルギルス症原因菌が産生する環状ペプチドの宿主免疫応答反応への影響

梅村舞子

(産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

豊留孝仁

(帯広畜産大学動物・食品検査診断センター)

亀井克彦・渡辺 哲・萩原大祐

(千葉大学真菌医学研究センター)

Effect of cyclic peptides produced by pathogenic *Aspergillus* species on host immune response

Maiko Umemura

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

Takahito Toyotome

(Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe, Daisuke

Hagiwara

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

アスペルギルス症の原因菌である糸状菌 *Aspergillus flavus* において、近年、カビで初めてのリボソームペプチド生合成経路が研究代表者によって見出された。本経路では環状ペプチド化合物の骨格構造が前駆体遺伝子に直接書き込まれており、ほぼすべてのカビ・キノコに保存されている。また生合成される環状ペプチドの一つである ustiloxin は強い微小管重合形成阻害活性を有することから、宿主の正常な免疫反応を抑制する可能性が高い。そこで本研究では、本リボソームペプチド生合成経路で生合成される環状ペプチドが新規病原因子として機能するかを、当該経路遺伝子破壊株を用いた動物細胞感染実験等から検証する。

Aspergillus fumigatus Af293株は、ust-RiPS経路における前駆体ペプチド様遺伝子を2つ保有する (*rps1a* および *rps2a* と呼称)。これまでの Transwell システムを用いたヒ

ト肺上皮細胞 (Calu-3) への侵入試験および免疫抑制マウスへの感染実験から, *rps2a*破壊株において細胞侵入活性が優位に低く, またマウス肺増殖率が低い傾向が見られた. そこで本年, マクロファージ食作用に対する本経路の影響を観察するため, マウスのマクロファージ RAW264.7細胞に *A. fumigatus rps1a* および *rps2a*破壊株を作用させて, 食作用アッセイを行った. FITCで染色した胞子をガラスボトムプレート上で培養した RAW264.7細胞に添加して, 37度で1時間5% CO₂培養器にて培養した. 細胞を固定化した後, マクロファージ細胞を CellMaskにて染色し, 共焦点顕微鏡にて細胞内に取り込まれた胞子の数をカウントした. 結果, *rps1a*破壊株, *rps2a*破壊株ともに, 捕食された胞子の割合は親株と有意な差を示さなかったことから, 本経路はマクロファージによる食作用に影響を及ぼさないと結論付けた. しかし本経路による細胞傷害性とマウス肺内における増殖性への影響が見られていることから, 引き続き他の真菌に数多く存在する同経路を分類した上で, 宿主への作用を調べる予定である.

発表論文

- 1) Hagiwara, D., Sakai, K., Umemura, M., Nogawa, T., Kato, N., Osada, H., Watanabe, A., Kawamoto, S., Gono, T., Kamei, K., Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*, PLoS One, 12, e0177050, 2017 (doi: 10.1371/journal.pone.0177050).

研究課題 17-18

*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)

亀井克彦・渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

萩原大祐

(筑波大学・生命環境系・糸状菌相互応答講座)

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)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Daisuke Hagiwara

(Laboratory of Fungal Interaction and Molecular Biology, Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

Yutaka Tanaka, Nobuyuki Shibata

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

研究成果

今年度の特筆すべき成果として Gal₇転移酵素活性測定系を改良したことが挙げられる. Gal₇転移酵素活性の検出に用いる UDP-Gal₇は不安定な稀少物質であり, 且つ, 試薬として販売されていない. そこで, これまでは UDP-Gal₆から UDP-Gal₇を合成する酵素である Gif の組換え体を作製し, UDP-Gal₆から生合成したものを HPLC によって精製して使用していた. そのため, UDP-Gal₇を準備することが研究推進における律速因子となっていた. この状況を打破するために, 反応系に UDP-Gal₇を入れる代わりに UDP-Gal₆と Gif を添加する方法を考案した. 反応条件を最適化したところ, この連続反応系を用いることで UDP-Gal₇を準備することなく Gal₇転移酵素活性の検出が可能となった. この連続反応系を用いて, GfsA および GfsC の Gal₇転移酵素活性を検出したところ, 両酵素共に単独の酵素で Gal₇を最大で5個まで転移する活性を有することが明らかになった. また, $\Delta gfsC$, $\Delta gfsAC$ およびそれらの相補株に焦点を当てて FTGM の解析を ¹H-NMR 解析およびメチル化分析によって実施した. その結果, $\Delta gfsC$ 株では β 1, 5-Gal₇残基が著しく減少し, $\Delta gfsAC$ 株では, β 1, 5-Gal₇残基が全く検出されなくなることが明らかになった. 以上の結果から, *Aspergillus fumigatus*の全ての β 1, 5-Gal₇糖鎖は GfsA と GfsC が協調的に働くことで生合成されることを明らかにすることができた. また, ガラクトマンナン中のコア

マンナン鎖合成を担う α 1, 2-マンノース転移酵素が CmsAであることを明らかにし, Δ cmsA株では各種の抗真菌薬に対する感受性が増加していることを共同研究によって明らかにすることができた. この成果は現在 *Scientific Reports* 誌に投稿中であり, 査読を受けるところである.

発表論文

- 1) Oka T. Biosynthesis of galactomannans found in filamentous fungi belonging to Pezizomycotina. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2018)82, 183-191.
- 2) Katafuchi Y, Li Q, Tanaka Y, Shinozuka S, Kawamitsu Y, Izumi M, Ekino K, Mizuki K, Takegawa K, Shibata N, Goto M, Nomura Y, Ohta K, Oka T. GfsA is a β 1, 5-galactofuranosyltransferase involved in the biosynthesis of the galactofuran side chain of fungal-type galactomannan in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology.* (2017)27, 568-581.
- 3) Matsunaga E, Higuchi Y, Mori K, Yairo N, Toyota S, Oka T, Tashiro K, Takegawa K. Characterization of a PA14 domain-containing galactofuranose-specific β -D-galactofuranosidase from *Streptomyces* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2017)81, 1314-1319.

研究課題 '17-19

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

平成29年度より千葉大学真菌研究センターとの共同研究を開始し, 初年度分を報告する. 深在性真菌症の適応薬は, 核酸合成を阻害するピミジン系, エルゴステロールと結合するポリエン系, エルゴステロール合成酵素の阻害剤であるアゾール系, 細胞壁合成阻害剤であるエキノキャンディン系の4系統しかなく, いずれも副作用や耐性菌の出現が問題になっており, 新規の作用機序をもつ抗真菌薬の開発が必要である. そこで, 本研究計画では, 微生物化学研究所が保有する化合物ライブラリーを用いたスクリーニングによって得られた候補化合物の薬剤標的分子を同定し, 新規抗真菌薬の創出をめざしている. 平成29年度は, 本研究で使用する化合物について, 提供機関との打合せメールなどでの打合せを進め, MTAの締結に至った. 解析予定の1,000種類の化合物のうち今年度は644種類について一次スクリーニングならびに二次スクリーニング終了した. 一次スクリーニングでは, カンジダ・グラブラータを用いて生育阻害活性を指標にした. その結果, 140サンプルに生育阻害活性が確認され, 二次スクリーニングへと移行した. 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MICを決定した. さらに, 培養細胞を用いた呼吸阻害活性を測定した. これらの結果より, 6サンプルが抗真菌薬シーズ候補として選抜することができ, 今年度の研究計画を順調に進めることができた. 次年度は, 得られた抗真菌活性物質の作用分子の同定と未解析化合物からの抗真菌活性物質のスクリーニングを継続する.

研究課題 '17-20

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、医薬品リ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験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2個の新規マンザミン関連アルカロイドを、*Hippospongia* 属海綿から2個の新規メロテルペノイド関連化合物を、*Pseudoceratina* 属海綿から2個の新規プロモチロシナルカロイドを、*Hyrtilis* 属海綿から2個の新規インドールアルカロイドを、*Dysidea* 属海綿から2個の新規ポリヒドロキシステロールを、*Symbiodinium* 属渦鞭毛藻から2個の新規マクロリドを、*Amphidinium* 属渦鞭毛藻から2個の新規マクロリドを、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 '17-21

BCG 東京株による感染症の迅速診断と病原性に関する研究

大楠清文
(東京医科大学 微生物学)
石和田稔彦・大楠美佐子・竹内典子
(千葉大学真菌医学研究センター)

Rapid diagnosis and pathogenicity of the infection caused by BCG Tokyo strain.

Kiyofumi Ohkusu
(Department of microbiology, Tokyo Medical University)
Naruhiko Ishiwada, Misako Ohkusu, Noriko Takeuchi
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

結核の中蔓延国である日本ではBCG(ワクチン)接種率が高く、小児の重症結核予防効果は高いが、接種後の副反応としてリンパ節腫脹や皮膚疾患、稀に骨炎や全身感染症が問題となる。症状が重篤な場合には、ヒト型結核菌との鑑別を行った上で、抗結核薬による治療が考慮されるが、現在、検査室で通常実施しているPCR法ではヒト型結核菌とBCGの鑑別は出来ない。私たちは、BCG特異プライマーによるPCRおよび日本で使用されているBCG東京株特有の塩基配列欠損があることが知られているRD16領域のシーケンス解析を行うことで、BCGとヒト型結核菌を迅速に鑑別出来る方法を確立した。実際に、リンパ節炎の生検組織、膿汁、骨髄炎の骨髄などの検体から直接BCG東京株を検出することが可能であった。検査結果は、臨床経過や病理組織像、培養検査結果と一致していた。本解析方法は検体から直接解析することにより、検体採取から数日以内に結果が判明するために、臨床的にも大変有用な検査法と考えられた。

発表論文

- 1) Otsuka T, Hosokai R, Watanabe T, Ishiwada N, Saitoh A. Subcutaneous chest wall abscess as a complication of BCG vaccination. *Pediatr Int.* 2017 Oct 3. doi: 10.1111/ped.13382.

研究課題 '17-22

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・竹下健一
(千葉県こども病院 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)

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, Kenichi Takeshita

(Chiba Children's Hospital)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

無脾症は、肺炎球菌・インフルエンザ菌莢膜株に感染すると重症化しやすいため、海外ではHibワクチン、肺炎球菌ワクチンの接種による予防が推奨されている。国内における無脾症患者のリスクとワクチン接種推奨に関する評価をする目的で小児無脾症患者23名の肺炎球菌血清型特異IgG抗体（血清型1・3・5・6A・7F・19A）と抗PRP抗体（Hib）の測定を行った。その結果、いずれかの血清型に対する肺炎球菌特異抗体価が陽性基準値（0.35 μ g/ml）以下であった症例が10例認められた。また、抗PRP抗体が陽性基準（1 μ g/ml）以下であった症例が13例認められた。この中には、定期接種対象外の年齢層の症例も含まれていた。日本小児感染症学会会員を対象とした免疫不全状態の小児（無脾症含む）に対するHibワクチン、肺炎球菌ワクチン接種の実態調査を行ったところ、施設間に差が認められたことから、これらの基礎疾患を有する小児に対する接種勧奨と具体的な接種スケジュールの提示が必要と考えられた。

発表論文

- 1) Takeshita K, Ishiwada N, Takeuchi N, Takahashi Y, Naito S, Nagasawa K, Hishiki H, Hoshino T, Shimojo N. Pneumococcal IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in Japanese children with a medical history of hematopoietic neoplasms and solid tumors. 71: 13-21, 2018

研究課題 17-23

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

松浦 彰

(千葉大学大学院理学研究院/大学院融合科学研究科)

久保田俊介

(千葉大学大学院融合科学研究科)

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)

Shunsuke Kubota

(Graduate School of Advanced Integration 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、環状プラスミドが維持できない、遺伝子ターゲティングの効率が悪く、導入された直鎖状DNA断片の末端に高頻度でテロメア反復配列が付加される、などDNA修復に関連するユニークな性質をもつことが明らかにされている (Edman, 1992)。本研究では、*C. neoformans* 染色体末端近傍でのゲノム変化に注目し、テロメア末端およびDNA損傷末端で作用する分子の機能とゲノム変化、感染サイクルとの関連を明らかにするとともに、それを標的とした新規治療戦略の開発を目指している。

これまでに、DNA末端を維持・修復する過程に関する *C. neoformans* 特有の現象を主として遺伝学的、分子生物学的手法を用いて解析をしている。前年度までに、我々が同定した染色体末端を伸長する酵素であるテロメラーゼの触媒サブユニット *CnEST2* の欠損細胞が、一倍体で致死性を示すことを見出した。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考えられた。

そこで、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相関して増殖の低下がみられることが明らかになった。さらに、薬剤添加時の遺伝子発現変化をRNA-Seqにより調べたところ、テロメラーゼ阻害剤の添加に対する特異的な遺伝子発現変化が見出され、テロメラーゼを標的とする*C. neoformans*特異的な治療戦略の有効性が確認された(論文準備中)。

現在入手可能なテロメラーゼ阻害剤は、*C. neoformans*のテロメラーゼ活性を阻害する活性が低いことが示唆されている。千葉大学分子キラリティー研究センターの化合物ライブラリーを用いて、より特異的に*C. neoformans*のテロメラーゼを阻害する化合物の候補を探索したところ、類似構造をもついくつかの候補化合物が単離された。今後は、この化合物による阻害機序の解明、およびより活性の高い阻害剤の探索を行う予定である。

研究課題 '17-24

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

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Tomoko Yamamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

感染症の理解には、病原微生物と宿主細胞との相互作用により引き起こされる相互の遺伝子発現やタンパク質産生の変化を解明することが重要である。サルモネラの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を行うため、蛍光タンパク質を恒常的に発現するサルモネラ(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)を用いて宿主内感染細胞での動態を検討し、分取することを試みた。サルモネラを腹腔内に投与し、経時的に腹腔内の免疫担当細胞を解析したところ、感染初期にはLarge Peritoneal Macrophage (LPM)に特異的に感染するものの、感染24時間後にLPMが完全に消失した。腹腔内マクロファージとしてLPMと共に骨髄由来のSmall Peritoneal Macrophage (SPM)が検出されるが、SPMも感染3日後には消失していた。一方、単球の数は増加しており、感染3日後には単球内にサルモネラが局在していた。又、脾臓内のサルモネラも単球に局在していた。SPMは炎症性マクロファージであり、細菌感染においては単球から分化する。これまでサルモネラの感染では、マクロファージ内で増加するといわれてきたが、本研究から、単球内で増加することで炎症性マクロファージへの分化抑制に寄与する可能性が示唆された。

感染早期に誘導されるLPMの消失が、サルモネラ感染による細胞死によるものが検討したが、特異的な細胞死の誘導はみられなかった。LPMはLPS等の刺激を受けるとリンパ節の一つとして考えられるOmentumに移動する。そこで、標識したLPMを含む細胞とサルモネラを同時に投与したところ、投与24時間後に標識したLPMがOmentumで検出された。このことから、腹腔内に投与されたサルモネラはLPMに特異的に貪食された後、LPMの移動に伴ってOmentum内に移行することができると考えられる。

研究課題 '17-25

腸内細菌叢と腸内真菌の相互作用により構築される粘膜免疫システムの解明

佐野晃之

(ニューヨーク大学医学部スカボール研究所)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

Understanding the intestinal immune responses orchestrating by gut microbiota and mycobacteria

Teruyuki Sano

(New York University, School of Medicine Skirball
Institute of Biomolecular Medicine)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本研究では、抗生物質で腸内細菌叢を攪乱したマウスの腸管における真菌の増殖および宿主免疫細胞に対する影響について解析を試みた。野生型マウスに代表的な病原性真菌の一つである *Candida albicans* を経口投与したところ、約1ヵ月後に腸管から完全に排除された。一方、事前にβ-ラクタム系抗生物質の一つであるアンピシリンを処理したマウスに *C. albicans* を経口投与したところ、消化管である胃、小腸、盲腸、大腸のいずれの部位においても多数の *C. albicans* が検出されたことにくわえ、3か月以上経過しても腸管における *C. albicans* の数量は維持されていた。一方、メトロニダゾールやストレプトマイシン処理したマウスでは、野生型マウスと同様に *C. albicans* は腸管から排除された。以上の結果から、特定の抗生物質で腸内細菌叢が攪乱されると *C. albicans* が腸管に定着することが示され、特定の腸内細菌が *C. albicans* の消化管における定着を制御していることが示唆される。

次に *C. albicans* が腸管に定着したマウスにおいて宿主免疫細胞の動態を解析したところ、腸管膜リンパ節中で観察されるCD4陽性T細胞数が非定着マウスと比較して増加していたことにくわえ、腸管粘膜固有層におけるIgA陽性細胞ならびにRoryt陽性のTh17細胞の割合が増加していることを見出した。一方、樹状細胞やマクロファージなどの自然免疫系細胞の割合に変化は見られなかった。これまでに、Th17細胞は喘息をはじめとするアレルギー反応の誘導にも寄与していることが報告されており、真菌の定着によって誘導される腸管Th17細胞と宿主のアレルギー応答の関係性については大変興味深く、今後の検討課題と考えられる。

研究課題 '17-26

Candida glabrata におけるミトコンドリア選択的オートファジー活性検出系の開発

名木 稔

(国立感染症研究所)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

Measurement of mitophagic activity in *Candida glabrata*

Minoru Nagi

(National Institute of Infectious Diseases)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究の初年度における報告である。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)は病原性と鉄欠乏環境における生存の維持に関与している事が明らかにされたが、病原性における詳細な役割はわかっていない。また、*C. glabrata* ではマイトファジー活性の検出系が未確立であり、その点がマイトファジーの役割を解明することの妨げとなっている。本研究では、マイトファジー活性を効率よく検出することを目的とし、出芽酵母の液胞内プロテアーゼをコードするPEP4の *C. glabrata* におけるホモログであるCAGL0M02211gの破壊株(真菌センター分与株)にミトコンドリア移行シグナルとGFPを付加したジヒドロ葉酸リダクターゼ(mtDHFR-GFP)を高発現させた菌株を作製した。マイトファジーが活性化した場合、ミトコンドリアに局在したmtDHFR-GFPはミトコンドリアと共に液胞へと運ばれて分解を受けるが、CAGL0M02211gの破壊株では液胞内へと運ばれた後分解を受けずに液胞内に蓄積したため、このタンパク質のGFPシグナルを観察することでマイトファジー活性化の有無を確認することができた。以上のように、蛍光顕微鏡観察によって効率よくマイトファジー活性を測定することができる実験系を確立した。今後これらの株を用いて、感染臓器内におけるマイトファジー活性の測定を進めていく。

研究課題 '17-27

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・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, Rui Kawaguchi

(Department of 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投与3時間後にrTMを腹腔内投与し、菌液投与24時間後に犠牲させたマウスにおいて、rTM投与の有無につき、血清cytokine濃度、HMGB1, syndecan-1, 肺血管内皮, 上皮, 血球系細胞群におけるcytokine発現率を経時的に比較検討した。その結果、肺炎球菌注入群において、rTM投与によって血清TNF, IL-10濃度はいずれも低下傾向となった。HMGB1はrTM投与で有意に低下, syndecan-1もrTM投与で低下傾向を認めた。一方、肺血管内皮細胞において菌液注入後12時間でIL-10発現率は低下し、rTM投与によって上昇した ($p < 0.05$)。また菌液注入24時間後では、肺血管内皮および血球系細胞群両方で、rTM投与によってTNF発現率は低下, IL-10発現率は血管内皮細胞のみで上昇傾向を示した。以上のことからマウス肺炎球菌肺炎モデルに対するrTMの抗炎症作用が認められた。またrTM投与によって、glycocalyx layer障害が軽減される可能性も示唆された。

研究課題 '17-28

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

本年度は伊豆諸島神津島の自然環境中における*Aspergillus*属相を明らかにした。2017年10月に神津島の7地点において5-10 m間隔で12箇所、計84箇所において土壌試料を採取した。各土壌試料について滅菌したコロンを用いたベイト法により*Aspergillus*属の分離培養を行った。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、3節9種 (sect. Fumigati: *A. fumigatus*, *A. felis*; sec. Flavi: *A. nomius*; sect. Nigri: *A. neoniger*, *A. brasiliensis*, *A. tubingensis*, *A. japonicus*, *A. welwitschiae*, *A. brunneoviolaceus*) の分布が確認された。*Aspergillus fumigatus* 関連種の*A. felis*は、森林環境に比べ荒原環境における出現頻度が著しく高かった。本種11菌株について、イトラコナゾールに対する薬剤感受性をEtestにより評価した結果、36%にあたる4株でMICが12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示すことが明らかとなった。*Aspergillus felis*を除く8種に関しては森林環境における出現頻度が高く、sect. Nigriの種については加えて低標高の地域で出現頻度が高い傾向がみられた。sect. Nigriの各種に関してもイトラコナゾールに対する薬剤感受性を評価した結果、*A. neoniger*と*A. tubingensis*においてそれぞれ54%と53%の株でMICが4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示すことが明らかとなった。

研究課題 '17-29

保育園児から分離される肺炎球菌無莢膜株の病原性解析

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 non-encapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from nursery school

Noriyuki Wada

(Wada Pediatric Clinic)

Satoko Kurosawa

(Kurosawa Children's and Internal Medicine Clinic)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi, Misako Ohkusu
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

肺炎球菌結合型ワクチン導入後、東京都内の保育園5か所に通園している児から分離されるようになった肺炎球菌無莢膜株に関する検討を行った。保育園児からの肺炎球菌無莢膜株の分離率(保菌率)は12%であった。MLST解析を行ったところ複数のSequence typeに分類されたが、同じ保育園で同じ時期に分離されるST型は一致しており、無莢膜株の水平伝播が疑われた。無莢膜株は、 β -ラクタム系抗菌薬、マクロライド系抗菌薬の耐性に関与する遺伝子を保有しており、莢膜株と比較しバイオフィーム産生能が高い株が有意に多かった。今回の検討から肺炎球菌無莢膜株は、今後呼吸器感染症の起炎菌になる可能性があり、また、難治化に関与する可能性が示唆された。継続して保育園児から分離される無莢膜株の病原性解析を進めると同時に、治療、予防対策に関しても検討していく必要があると思われた。

感染症グローバルネットワークフォーラム2017

The 6th Global Network Forum on Infection and Immunity

主催：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」

共催：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」

日時：平成29年10月29日 9:30~17:30

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：

松江弘之（千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 教授）

松岡悠美（千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 助教）

鈴木敏彦（東京医科歯科大学 教授）

植松 智（千葉大学医学研究院粘膜免疫学 教授）

米山光俊（千葉大学真菌医学研究センター 教授）

研究成果

感染症研究のネットワーク構築を目指し、平成24年度から開始された「千葉大学感染症研究ネットワーク」は、平成29年度で第6回目の開催となった。本年度は、千葉大学附属病院皮膚科学の松江弘之先生に世話人をお願いし、国内外の著名な研究者を招聘し、すべてを英語での国際フォーラムとして開催した。特に、宿主と微生物との相互作用についての最先端の研究成果についての発表がなされ、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：松江 弘之

（千葉大学大学院医学研究院皮膚科学）

1. 天谷雅行（慶應義塾大学医学部皮膚科）

“Stratum corneum as niche to control skin microbiota”

座長：西城 忍

（千葉大学真菌医学研究センター）

2. Dr. Gordon Brown (University of Aberdeen, UK)

“MeLec: A new player in antifungal immunity”

3. Dr. Glen N. Barber (University of Miami, USA)

“The STING controlled innate immune signaling pathway, infectious disease, inflammation and cancer”

【午後の部】(International forum)

座長：高橋弘喜

（千葉大学真菌医学研究センター）

1. 富田秀太（岡山大学医歯薬学総合研究科）

“Comparative genomics with strain-level resolution”

2. 松岡悠美（千葉大学大学院医学研究院皮膚科学）

“Cutaneous acquisition of Staphylococcus quorum-sensing agr mutations protects against atopic dermatitis development”

3. 中島沙恵子（京都大学医学部附属病院皮膚科）

“Candida albicans skin colonization exacerbates the inflammation of imiquimod induced psoriasis-like dermatitis in mice”

座長：後藤義幸

（千葉大学真菌医学研究センター）

4. 鎌田信彦（University of Michigan, USA）

“The mouth-gut axis in gastrointestinal diseases”

5. 植松 智（千葉大学大学院医学研究院粘膜免疫学）

“Comprehensive analysis of intestinal virome”

6. 清野 宏（東京大学医科学研究所炎症免疫学分野）

“Gut Multi-ecosystem of Epithelial Cells, Immune Cells and Commensal Microbiota for Symbiosis and Inflammation”

2018年講演会

2018 Scientific Meetings & Seminars

The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity

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 9:30~16:15

場所：千葉大学医学部附属病院3階 ガーネットホール

【特別講演】

【International Speakers】

Alistair Brown (University of Aberdeen, UK)

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

Matthew C. Fisher (Imperial College, UK)

「Emergence of antifungal resistance – challenges to human health」

Ruoyu Li (Peking University, China)

「CARD9 deficiency and dematiaceous fungal infections」

Maria Luiza Moretti (University of Campinas, Brazil)

「Neglected endemic mycoses in Brazil」

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

「Functional genomics identification of novel pathways of human antifungal immune responses」

【Japanese Speakers】

Daisuke Hagiwara (Tsukuba University)

「Discovery of a novel regulator of azole drug response in *Aspergillus fumigatus*」

Daigo Hashimoto (Hokkaido University)

「Crosstalk between microbiota and host immune system affects the outcomes of hematopoietic stem cell transplantation」

Koichi Hirose (International Health and Welfare University)

「Roles of Dectin-1 in allergic airway inflammation」

Taiga Miyazaki (Nagasaki University)

「Translational research on invasive candidiasis」

Kiminori Shimizu (Tokyo University of Science)

「Involvement of PMT2 gene of the human pathogen *Cryptococcus neoformans* in fungal taxonomy」

Takahito Toyotome (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

「Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*」

Keigo Ueno (National Institute of Infectious Diseases)

「A dendritic cell-based systemic vaccine induces long-lived lung-resident memory Th17 cells and ameliorates pulmonary cryptococcosis」

「東京大学医科学研究所—千葉大学真菌医学研究センター 共同利用・共同研究拠点事業 平成29年度 合同成果報告会」

日時：平成30年3月6日(火)

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】

山崎 晶

(大阪大学微生物病研究所)

「レクチン受容体を介する病原体認識機構」

【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》

椎名 勇

(東京理科大学)

「新規抗真菌剤ユーシェアライド類の合成および活性評価研究」

山田 剛

(帝京大学)

「スイス・ローザンヌで分離された複数のテルピナフィン低感受性白癬菌株と薬剤感受性低下要因の解析」

鈴木 純子

(国立病院機構東京病院呼吸器センター)

「*Aspergillus*呼吸器検体臨床分離株の菌種同定・薬剤感受性の検討」

程 久美子

(東京大学)

「RIG-I様受容体を介した自然免疫応答におけるmicroRNAによる遺伝子発現制御機構」

《感染症・免疫共同研究領域》

中川 良

(東京大学医科学研究所)

「抗腫瘍免疫リガンドMICAの新規制御剤探索」

杉田 征彦

(沖縄科学技術大学院大学)

「エボラウイルス・ヌクレオキャプシドの極低温電子顕微鏡解析」

廣松 賢治

(福岡大学)

「肺炎クラミジア感染細胞からのFABP4の分泌, および, その制御機構」

一戸 猛志

(東京大学医科学研究所)

「内在性自己RNAである, small nuclear RNAの免疫賦活

性の検討」

鈴木 志穂

(東京医科歯科大学)

「細菌感染時におけるインフラマソーム活性化の制御メカニズム」

新澤 直明

(東京医科歯科大学)

「類鼻疽菌の細菌競合と宿主病原性の関連性, およびそれに関わる遺伝子領域の解明」

東 秀明

(北海道大学)

「*Bacillus anthracis*病態発症に係る毒素合成機構の解明」

三室 仁美

(東京大学医科学研究所)

「*H. pylori*の病原性に関わる形態変化の遺伝的基盤の解析」

佐藤 慎太郎

(大阪大学微生物病研究所)

「ヒト正常上皮細胞層を用いた, ヒトノロウイルスの侵入に関与するレセプターの同定, および侵入様式の解明」

朴 恩正

(三重大学)

「老化に伴う腸上皮バリア機能障害の分子基盤の解明」

大森 深雪

(東京女子医科大学)

「アレルギー反応を調節する樹状細胞サブセットの同定および機能解析」

「真菌医学研究センター市民向け公開セミナー」

日時：平成30年3月17日 14:00~16:00

場所：千葉大学医学部附属病院3階 セミナー室3

「怖いカビの話」

講演1 「カビは退治できるの？」

矢口貴志(真菌医学研究センター 准教授)

講演2 「エッ!カビで病気?」

亀井克彦 (真菌医学研究センター 教授)

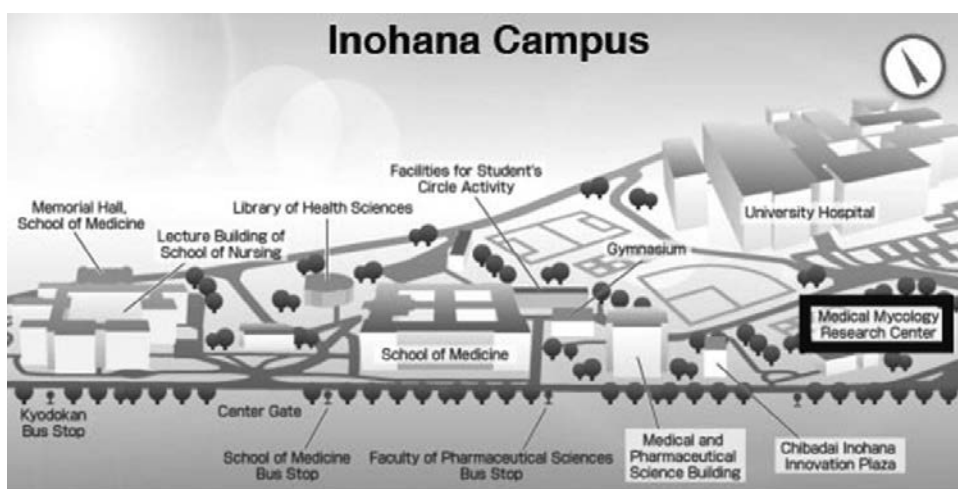
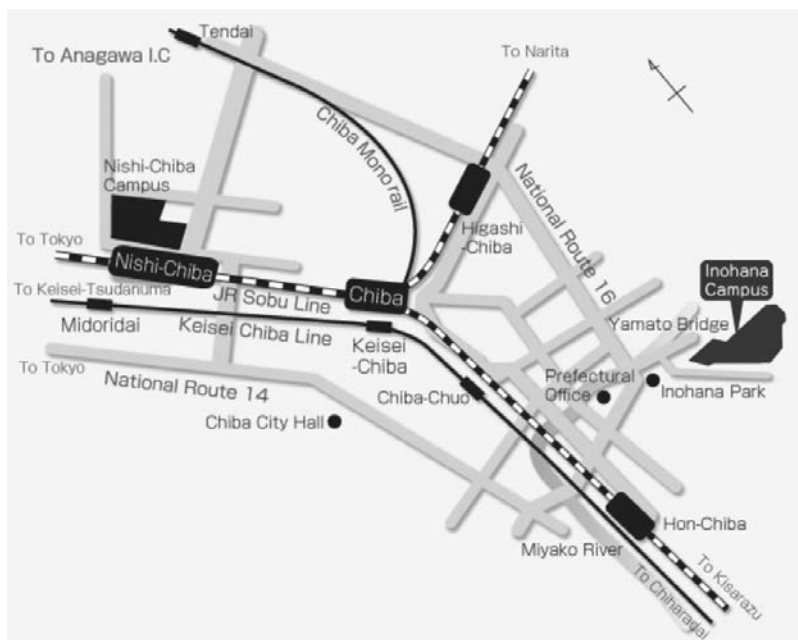
「真菌医学研究センターMonthlyセミナー」

場所：真菌医学研究センター 大会議室

- 1) 日時：平成30年4月10日 16:00～17:00
遠藤 剛 (千葉大学大学院理学研究院教授)
DA-Rafによるがん抑制と肺胞形成の機構：肺腺がんの抑制とCOPDの治療に向けて
- 2) 日時：平成30年4月16日 16:00～17:00
Mounira Chelbi-Alix
(Université Paris Descartes, Paris, France)
「Role of PML nuclear bodies in protein degradation and antiviral defense」
(千葉大学GP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」第3回感染制御学セミナーと共催)
- 3) 日時：平成30年5月22日 16:30～17:30
Eggi Arguni
(Eliminate Dengue Project Yogyakarta, Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada)
「Wolbachia Aedes aegypti: an alternative strategy in dengue elimination」
- 4) 日時：平成30年6月28日 17:00～18:30
Gabriel Nuñez
(Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA)
「Role of the Microbiota in Intestinal Pathogen

Colonization and Inflammatory Disease」

- (千葉大学GP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」第4回感染制御学セミナーと共催)
(※開催場所：薬学部創立120周年記念講堂)
- 5) 日時：平成30年7月24日 11:00～12:00
常世田 好司
(ドイツリウマチ研究センター・グループリーダー)
「免疫記憶を制御する」
(千葉大学GP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」第5回感染制御学セミナーと共催)
- 6) 日時：平成30年11月7日 18:00～19:00
Nobuhiko Kamada
(Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, The University of Michigan Medical School
「The Gut Microbiota and IBD: Moving from Correlation to Causation」
(千葉大学GP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」第6回感染制御学セミナーと共催)
- 7) 日時：平成30年11月20日 17:00～18:00
Glen N. Barber
(Department of Cell Biology, University of Miami School of Medicine, USA)
「STING: Innate immune signal, inflammation and cancer」
(千葉大学GP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」第7回感染制御学セミナーと共催)



平成 31 年 3 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)

March 2019

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
2018