

MMRC



**ANNUAL REPORT OF MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER, CHIBA UNIVERSITY 2020**

千葉大学 真菌医学研究センター 報告

24



目 次

Content

はじめに	
Preface for Annual Report for 2020	
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
感染免疫分野 高屋准教授 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	9
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	11
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	13
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	17
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	22
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	24
RNA 制御治療学共同研究部門 原口特任准教授 RNA 制御プロジェクト	
Project for RNA Regulation	28
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”	30
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	31
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	32

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”	34
COVID-19パンデミックに対する海外支援活動： COVID-19対策強化に向けた日伯合同症例カンファレンス及びブラジルに おける COVID-19検査拡大のためのパートナーシップ Oversea support activities for COVID-19 pandemic: Japan-Brazil Clinical conference on COVID-19 cases and Partnership for Accelerating COVID-19 Testing in Brazil (PACT Brazil)	36
感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE) Japanese Initiative for Progress of Research on Infectious Disease for Global Epidemic (J-PRIDE)	38
千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・リーディング研究育成プログラム 「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」 Leading Research Promotion Program, Institute for Global Prominent Research Advanced Research of Infection and Immunity Based on Integrative Understanding of Host-Microbe Interactions	39
2019年度 共同利用・共同研究報告 2019 Fiscal Year Cooperative Research Program Report	40
感染症研究グローバルネットワークフォーラム2019 The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity	59
2020年講演会 2020 Scientific Meetings & Seminars	61

はじめに

近年高齢者の著しい増加とともに、高度医療や生活習慣病に起因する日和見感染症や呼吸器疾患等により難治性の真菌感染症が増加しています。また経済活動や観光等のグローバル化に伴い、輸入真菌感染症等をはじめとするさまざまな感染症の脅威にも直面しています。このような背景で、我が国唯一の真菌感染症の研究・治療拠点である千葉大学真菌医学研究センターに求められる役割は以前にも増して重要になっています。

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

本センターでは、基礎研究とともに臨床研究及び医療活動を積極的に行っています。真菌感染症の臨床研究・治療学の拠点として、千葉大学附属病院に我が国初の真菌症専門外来を開設し、同時に全国の大学・医療機関の要請に応じてコンサルテーションや一般病院では行なえない特殊な検査も実施しています。さらに小児感染症においても、附属病院の小児科・感染症管理治療部・感染症内科と連携した活発な臨床研究を行っています。

本年は、COVID-19のパンデミックに伴い、大学付属病院の要請に応じて当センターのBSL-3施設を提供し、SARS-Cov-2のPCR検査を積極的に支援しました。同時に当センターの検査技師有資格者を附属病院検査部に派遣しPCR検査の支援体制を確立しました。一方国外においても、平成28年以来ブラジル・カンピーナス大学医学部と連携して地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS）を実施してきましたが、ブラジルにおけるCOVID-19の深刻な状況により、JICAからの要請を踏まえ、カンピーナス大学医学部を通じてCOVID-19の治療・検査に関する支援活動を行いました（詳細「COVID-19パンデミックに対する海外支援活動」を参照）。

本センターは、真菌感染症の研究を支える、世界レベルの規模と品質を誇る病原真菌・放線菌のバイオリソースを有しています。文科省より認定された「ナショナルバイオリサーチプロジェクト（NBRP）」の支援のもとで、病原真菌の収集、保存、分与、オミックス情報解析等を通じて、基礎・臨床研究、共同利用・共同研究拠点事業、国際共同研究等を支えています。

本年度は、COVID-19により人的交流が著しく制限されましたが、Web等を通じてブラジル、米国、ドイツ、英国、ポルトガル、チェコ共和国、中国、インドネシア等の真菌研究拠点と活発な国際共同研究を行いました。

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

令和3年1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 2020

Our country has already become a “super-aged” society, and the incidence of fungal infectious diseases has steadily risen due to increases in advanced medical care and lifestyle-related disorders in patients with opportunistic infections and respiratory diseases. The dramatic increase in worldwide trade and tourists from abroad, along with the spread of severe fungal infectious diseases, is a key issue within the aging population. Under these conditions, the mission of the Medical Mycology Research Center at Chiba University (MMRC), a unique center for basic and clinical research on fungal infectious diseases in Japan, has become more important than ever.

In 2011, MMRC was certified as a Joint Usage/Research Center by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). Since then, MMRC has been actively engaged in research in medical mycology and related fields, including infection immunology, infection biology, bioinformatics, and infectious disease science, through partnerships with universities, public institutions, medical institutions, hospitals, and pharmaceutical companies.

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

In 2014, we opened a specialized clinical research facility for fungal infectious diseases at Chiba University Hospital that is the only outpatient clinic for such diseases in Japan. In addition, we are actively conducting clinical research on pediatric infectious diseases in cooperation with the Hospital’s departments of pediatrics, infectious disease management and treatment, and infectious disease internal medicine.

This year, after the COVID-19 pandemic began, we made our BSL-3 facility available at the request of the clinical laboratory of the Chiba University Hospital and actively supported PCR testing for SARS-CoV-2. At the same time, we dispatched qualified testing engineers from MMRC to support PCR testing in the university hospital laboratory. In addition, in 2016, we implemented SATREPS (Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development) in collaboration with the Faculty of Medicine of the University of Campinas in Brazil. Due to the serious COVID-19 situation in Brazil, we provided support for treatment of patients with COVID-19 disease in the University of Campinas Hospital following a request from JICA. We also support the Partnership for Accelerating COVID-19 Testing in Brazil (PACT Brazil) to aid in efforts to increase testing using the rapid SARS-CoV-2 detection kit. This effort is also supported by JICA and Eiken Chemical Company, Ltd.

This year, the COVID-19 pandemic has limited face-to-face interaction, but we have held web-based meetings to conduct active joint research with members of the fungal research community in our country, as well as in Brazil, the US, Germany, the UK, Portugal, China, and Indonesia. These efforts have enabled us to remain productive in terms of research outcomes.

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

January, 2021

Chihiro Sasakawa PhD
Director of MMRC

米山 P I (感染応答) プロジェクト

Project for Immune Response in Infections Diseases

研究概要 (Summary)

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

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

教授	米山 光俊	Professor	Mitsutoshi Yoneyama
助教	尾野本浩司	Assistant Professor	Koji Onomoto
特任助教	小野口和英	Assistant Professor	Kazuhide Onoguchi
技術職員	青木 友那	Research Technician	Yuna Aoki (2020.10 ~)
技術補佐員	滝沢みゆき	Research Promotion Technician	Miyuki Takizawa

1. LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection.

Takahashi T¹, Nakano Y¹, Onomoto K², Yoneyama M², Ui-Tei K^{1, 3}

¹Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan.

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

³Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Chiba 277-8561, Japan.

During viral infection, viral nucleic acids are detected by virus sensor proteins including toll-like receptor 3 or retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLRs) in mammalian

cells. Activation of these virus sensor proteins induces type-I interferon production and represses viral replication. Recently, we reported that an RLR family member, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2), modulates RNA silencing by interacting with an RNA silencing enhancer, TAR-RNA binding protein (TRBP). However, the biological implications remained unclear. Here, we show that LGP2 enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes during viral infection. Sendai virus (SeV) infection increased LGP2 expression approximately 900 times compared to that in non-virus-infected cells. Then, the induced LGP2 interacted with TRBP, resulting in the inhibition of maturation of the TRBP-bound microRNA (miRNA) and its subsequent RNA silencing activity. Gene expression profiling revealed that apoptosis regulatory genes were upregulated during SeV infection: caspases-2, -8, -3 and -7, four cysteine proteases with key roles in apoptosis, were upregulated directly or indirectly through the repression of a

typical TRBP-bound miRNA, miR-106b. Our findings may shed light on the mechanism of apoptosis, induced by the TRBP-bound miRNAs through the interaction of TRBP with LGP2, as an antiviral defense system in mammalian cells.

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

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

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

We demonstrated that viral infection induces RLRs to accumulate in cytoplasmic granular-like structure, anti-viral stress granule (avSG). We further revealed that avSG plays a critical role as a platform for the initiation of RIG-I-mediated type I interferon production. We are analyzing several RBPs that play a role in the regulation of both RIG-I-mediated signal activation and avSG formation. We are also trying to identify novel RBPs involved in antiviral innate immune responses by several biochemical approaches. In addition, we have started to analyze molecular interaction between host factors and viral proteins produced in response to SARS-CoV-2 infection in the BSL-3 facility of MMRC.

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

Onoguchi K, Mochizuki Y, and Yoneyama M.

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

We are interested in how the ER stress-induced response communicates with RLR-mediated signaling in the virus-infected cells. We have identified a novel molecule that is involved in the activation of both signaling pathways, and analyzed how these two signaling cascades interact for regulation of antiviral immunity.

Publications

- 1) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K: LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection. *Nucleic Acids Res*, 48: 1494-1507, 2020.
- 2) Hayashi Y, Suzuki H, Nakajima W, Uehara I, Tanimura A, Himeda T, Koike S, Katsuno T, Kitajiri SI, Koyanagi N, Kawaguchi Y, Onomoto K, Kato H, Yoneyama M, Fujita T, Tanaka N: Cochlear supporting cells function as macrophage-like cells and protect audiosensory receptor hair cells from pathogens. *Sci Rep*, 10: 6740, 2020.

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

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

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

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

Shinobu Saijo and Fabio Seiti Yamada Yoshikawa

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. A new pathway which confers protection against invasive fungal infection.

Fabio Seiti Yamada Yoshikawa, Maki Wakatsuki, Kosuke Yoshida, Chihiro Yamashita, Rikio Yabe, and Shinobu Saijo

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

Invasive fungal infection is the most severe manifestation and occurs when the pathogen disseminates to peripheral sites, leading to host death. Although the immune system employs innate receptors, such as Dectin-1, to recognize fungal pathogens, the immunological networks that confer protection against invasive fungal infection remain to be fully elucidated. Here, we aimed to establish acute invasive aspergillosis in a murine model to investigate the role of innate receptor in the anti-fungal response. Unlike the classical inflammatory reactions driven by the innate immune receptor, mice lacking the receptor presented an enhanced inflammatory

response and increased production of inflammatory cytokines and neutrophil infiltration, subsequently succumbing to infection. We found a new effector function of the receptor in anti-fungal defense.

Publications

- 1) Yamaguchi K, Kanno E, Hiromasa Tanno H, Sasaki A, Kitai Y, Miura T, Takagi N, Shoji M, Kasamatsu J, Sato K, Sato Y, Niiyama M, Goto Y, Ishii K, Imai Y, Saijo S, Iwakura Y, Tachi M, Kawakami K. Distinct Roles for Dectin-1 and Dectin-2 in Skin Wound Healing and Neutrophilic Inflammatory Responses. *J Invest Dermatol.* 141: 164-176. 2020.

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 pathogenic infections, inflammatory bowel diseases and systemic disorders such as obesity and cancers. 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. 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 infections and cancers caused by the disruption of intestinal homeostasis.

准 教 授	後藤 義幸	Associate Professor	Yoshiyuki Goto
特 任 研 究 員	石其 慧太	Researcher	Keita Isisono
大 学 院 生	畢 蓓蓓	Graduate Student	Bei Bei Bi
大 学 院 生	白 旭	Graduate Student	Akira Haku
技 術 補 佐 員	藤本 恭子	Research Promotion Technician	Kyoko Fujimoto (~ 2020.4)
技 術 補 佐 員	堂前 清香	Research Promotion Technician	Sawako Domae (2020.9 ~)

1. Commensal bacteria and host immune system regulate fungal colonization in the gut

Haku Akira¹, Bei bei Bi¹, Keita Ishisono¹, Yoshiyuki Goto^{1,2}

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

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

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 infections and inflammatory bowel diseases, it is unclear how these commensal fungi colonize in the gut and regulate 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 identify that commensal bacteria prevent colonization of *C. albicans* in the gastrointestinal tract of mice. Furthermore, *C. albicans* colonizing in the gastrointestinal tracts was excluded by fecal microbiota transplantation, indicating the effective role of commensal bacteria in the prevention of infection by pathogenic fungi. We examine the more detail mechanism by which commensal bacteria and gut immune system regulate fungal colonization and develop novel therapeutic approaches for the treatment of infectious diseases.

2. Innate and acquired immune system regulates intestinal epithelial α 1, 2-fucosylation

Bei Bei Bi¹, 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

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 between commensal bacteria and the host through regulating the epithelial α 1, 2-fucosylation.

Publications

- 1) Yahiro K, Ogura K, Goto Y, Iyoda S, Kobayashi T, Takeuchi H, Ohnishi M, Moss J. Subtilase cytotoxin induces a novel form of Lipocalin 2, which promotes Shiga-toxicogenic Escherichia coli survival. Sci Rep. 10: 18943, 2020.
- 2) Nagao-Kitamoto H, Leslie JL, Kitamoto S, Jin C, Thomsson KA, Gilliland III MG, Kuffa P, Goto Y, Jenq RR, Ishii C, Hirayama A, Seekatz AM, Martens EC, Eaton KA, Kao JY, Fukuda S, Higgins PDR, Karlsson N, Young VB, Kamada N. Interleukin-22-mediated host glycosylation prevents Clostridium difficile infection by modulating the metabolic activity of the gut microbiota. Nat Med. 26: 608-617, 2020.
- 3) Takahashi I, Hosomi K, Nagatake T, Tobou H, Yamamoto D, Hayashi I, Kurashima Y, Sato S, Shibata N, Goto Y, Maruyama F, Nakagawa I, Kuwae A, Abe A, Kunisawa J, Kiyono H. Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by Stenotrophomonas maltophilia. Int Immunol. 32, 133-141, 2020.

高屋（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) 細菌病原性発現制御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 control of bacterial pathogenesis by AAA⁺ proteases allowed us to hypothesize that AAA⁺ proteases functions as key regulators of persister development. The compounds leading such uncontrolled proteolysis could be potential as a new class of antibiotics to treat chronic infection.**

兼任准教授 高屋 明子
技術補佐員 野村祐理子

Concurrent Associate Professor Akiko Takaya
Research Promotion Technician Yuriko Nomura

1. Exploration of *Salmonella* effector mutant strains on MTR4 and RRP6 degradation.

Akiko Takaya^{1,2}, and Nobuyoshi Akimitsu³

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

² Department of Natural Products Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

³ Isotope Science Center, The University of Tokyo

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*Salmonella*), a

pathogenic bacterium, is a major cause of foodborne diseases worldwide. *Salmonella* injects multiple virulence factors, called effectors, into cells and causes multiple rearrangements of cellular biological reactions that are important for *Salmonella* proliferation and virulence. Previously, we reported that *Salmonella* infection causes loss of MTR4 and RRP6, which are nuclear RNA degradation factors, resulting in the stabilization and accumulation of unstable nuclear RNAs. This accumulation is important for the cellular defense for *Salmonella* infection. In this study, we examined a series of *Salmonella* mutant strains, most of which are strains with genes related to effectors translocated by T3SSs encoded on

Salmonella pathogenic islands, SPI-1 and SPI-2, that have been depleted. Among 42 *Salmonella* mutants, 6 mutants' infections canceled loss of MTR4 and RRP6. Proliferation assay of *Salmonella* in the cell revealed that six mutants showed poor proliferation in the host cell, demonstrating that poor proliferation contributed to cancellation of MTR4 and RRP6 loss. This result indicates that certain events associated with *Salmonella* proliferation in host cells cause loss of MTR4 and RRP6.

2. Regulation of quinolone-induced persistence by Lon protease

Akiko Takaya^{1,2}, and Yuriko Nomura¹

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

² Department of Natural Products Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Quinolones are broad-spectrum antibiotics, which are used for the treatment of different infectious diseases associated with Enterobacteriaceae. However, the wide use as well as overuse of quinolones against diverse infections has led to the increased emergence of quinolone-resistant bacterial strains. The emergence of resistant bacteria is thought to be related to

the antibiotic-induced persistence. We focused on how ATP-dependent Lon protease regulates the quinolone-induced persistence because few colonies of Lon-deficient cells could be detected after treatment with quinolone. Single-cell imaging showed that the number of remained cells after treatment were not influenced by Lon-depletion. Lon-deficient cells treated with ciprofloxacin were able to divide in fresh medium, but the cell shape became significantly smaller than the strain untreated. These results suggests that Lon protease could regulate awakening from quinolone-induced persistence rather than the formation of persisters.

Publications

- 1) Sun X, Kawata K, Miki A, Wada Y, Nagahama M, **Takaya A**, Akimitsu N. Exploration of *Salmonella* effector mutant strains on MTR4 and RRP6 degradation. *Biosci Trends*, 14 255-262. 2020.
- 2) Nakamura Y, Takahashi H, **Takaya A**, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Shoji T, Takada S, Nakagawa S, Oguma R, Saito N, Ozawa N, Nakano T, Yamaide F, Dissanayake E, Suzuki S, Villaruz A, Varadarajan S, Matsumoto M, Kobayashi T, Kono M, Sato Y, Akiyama M, Otto M, Matsue H, Nunez G, Shimojo N. *Staphylococcus* Agr virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Sci Transl Med*, 12 eaay4068. 2020.

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	中野 恵子	Research Promotion Technician	Keiko Nakano
技 術 補 佐 員	津田 一恵	Research Promotion Technician	Kazue Tsuda

1. Deep-Sea Bacteria Harboring Bacterial Endosymbionts in a Cytoplasm?: 3D Electron Microscopy by Serial Ultrathin Sectioning of Freeze-Substituted Specimen.

Masashi Yamaguchi¹, Hiroyuki Yamada², Hiroji Chibana¹

¹ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

² The Research Institute of Tuberculosis, JATA (Japan Anti-Tuberculosis Association), Tokyo, Japan

In 2012, we discovered a unique microorganism (*Parakaryon myojinensis*) that has intermediate cellular structures between prokaryotes and eukaryotes from the deep sea off the coast of Japan. Observations of ultrathin sections of deep-sea specimens with electron microscopy often revealed bacteria that contained intracellular bacteria. Here, we carried out a three-dimensional analysis of one bacterium that contained several bacteria within its cytoplasm by serial ultrathin sectioning electron microscopy of freeze-substituted specimen. We found that the host bacterium was not intact

and the cell wall was broken; hence, the bacteria found inside of the host were not endosymbionts, but happen to be associated independently within cytoplasm of dead bacteria. This study emphasizes the importance of 3D analysis for understanding the interactions of microorganisms.

Publications

- 1) Pedro Pais, Susana Vagueiro, Dalila Mil-Homens, Andreia I Pimenta, Romeu Viana, Michiyo Okamoto, Hiroji Chibana, Arsénio M Fialho, Miguel C Teixeira: A new regulator in the crossroads of oxidative stress resistance and virulence in *Candida glabrata*: The transcription factor CgTog1. *Virulence* 11(1) 1522-538. 2020.
- 2) Azusa Takahashi-Nakaguchi, Erika Shishido, Misa Yahara, Syun-ichi Urayama, Akihiro Ninomiya, Yuto Chiba, Kanae Sakai, Daisuke Hagiwara, Hiroji Chibana, Hiromitsu Moriyama, Tohru Gono: Phenotypic and Molecular Biological Analysis of Polymycovirus AfuPmV-1M From *Aspergillus fumigatus*: Reduced Fungal Virulence in a Mouse Infection Model.

- Frontiers in Microbiology* 11. 2020.
- 3) Masashi Yamaguchi, Hiroyuki Yamada, Hiroji Chibana: Deep-Sea Bacteria Harboring Bacterial Endosymbionts in a Cytoplasm?: 3D Electron Microscopy by Serial Ultrathin Sectioning of Freeze-Substituted Specimen. *Cytologia* 85(3) 209-211. 2020.
 - 4) Pedro Pais, Raquel Califórnia, Mónica Galocha, Romeu Viana, Mihaela Ola, Mafalda Cavalheiro, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Hiroji Chibana, Geraldine Butler, Miguel C Teixeira: *Candida glabrata* Transcription Factor Rpn4 Mediates Fluconazole Resistance through Regulation of Ergosterol Biosynthesis and Plasma Membrane Permeability. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 64(9). 2020.
 - 5) Yao Huang, Keisuke Fujii, Xinyue Chen, Shun Iwatani, Hiroji Chibana, Soichi Kojima, Susumu Kajiwara: Fungal NOX is an essential factor for induction of TG2 in human hepatocytes. *Medical mycology* 58(5) 679-689. 2020.
 - 6) Yifan Jin, Michiyo Okamoto, Hiroji Chibana, Guoyu Liu, Xiao Dong Gao, Hideki Nakanishi: Functional characteristics of Sv13 and Pam1 that are required for proper cell wall formation in yeast cells. *Yeast* 37(7-8) 359-371. 2020.
 - 7) Masashi Yamaguchi, Masaki Taguchi, Katsuyuki Uematsu, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Michiyo Sato-Okamoto, Hiroji Chibana: Sandwich freezing device for rapid freezing of viruses, bacteria, yeast, cultured cells and animal and human tissues in electron microscopy. *Microscopy* (Oxford, England) 2020.
 - 8) Masashi Yamaguchi, Seiichiro Wakabayashi, Yuumi Nakamura, Hiroyuki Matsue, Takuya Hirao, Shigeki Aoki, Shohei Yamashina, Hiroyuki Yamada, Nobuya Mamizu, Hiromitsu Furukawa, Hiroji Chibana: Good Ultrastructural Preservation of Human Tissues and Cultured Cells by Glutaraldehyde Fixation, Sandwich Freezing, and Freeze-Substitution: *Cytologia* 85(1) 15-26. 2020.
 - 9) Kseniia V. Galkina, Michiyo Okamoto, Hiroji Chibana, Dmitry A. Knorre, Susumu Kajiwara: Deletion of CDR1 reveals redox regulation of pleiotropic drug resistance in *Candida glabrata*. *Biochimie* 170 49-56. 2020.
 - 10) Rui Santos, Mafalda Cavalheiro, Catarina Costa, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Michiyo Okamoto, Hiroji Chibana, Miguel C. Teixeira: Screening the Drug:H+ Antiporter Family for a Role in Biofilm Formation in *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 29-29. 2020.
 - 11) Azusa Takahashi-Nakaguchi, Erika Shishido, Misa Yahara, Syunichi Urayama, Kanae Sakai, Hiroji Chibana, Katsuhiko Kamei, Hiromitsu Moriyama, Tohru Gono: Analysis of an Intrinsic Mycovirus Associated With Reduced Virulence of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology* 10 3045-3045. 2020.
 - 12) Nishimura K, Okamoto M, Shibue R, Mizuta T, Shibayama T, Yoshino T, Murakami T, Yamaguchi M, Tanaka S, Toida T, Igarashi K: KLF4 is required for suppression of histamine synthesis by polyamines during bone marrow-derived mast cell differentiation. *PLoS ONE*, 15, e0229744, 2020.
 - 13) 永山國昭, 山口正視: 顕微鏡によるウイルス観察. 特別WEBコラム『新型コロナウイルス禍に学ぶ応用物理』. 公益社団法人応用物理学会. 2020.

亀井 P I 臨床感染症プロジェクト

Project of Clinical Investigation

研究概要 (Summary)

日本感染症学会、臨床微生物学会から先進的感染症検査が実施可能な施設として「先進的感染症検査施設」に指定されるなど、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診療サポートを行なっている。本年の前半はCOVID-19感染の流行により依頼件数が少なめであったが、秋口より急増し、結局400件あまりの依頼を全国の医療機関から受け入れた。この診療サポートにより全国の医療機関が一種のネットワークを形成し、菌株を含めた検体や貴重な臨床情報の収集と研究に役立っている。診療活動としては、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する一方で、附属病院に真菌症専門外来を設け、全国からの患者の診療を行なうなど精力的に臨床活動を行っている。研究面では国立感染症研究所をはじめ帯広畜産大、理科大、NHO東京病院、慶應大学病院、東海大学病院など国内のさまざまな研究機関、医療施設と協力して臨床・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。中でもアスペルギルス耐性株の疫学と耐性機構の研究では多くの画期的な論文を発表するなど高い成果を挙げ、感染機構の解明でも画期的な発見に至った。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 while seeing patients in the Specialty Clinic for Fungal Infections at the University Hospital. Working as the Reference Center for fungal infections, we were designated as an Advanced Progressive Laboratory by the Japanese Society for Infectious Diseases and Japanese Society for Clinical Microbiology and take consulting services on fungal diseases from all over the country (ca. 400 cases in 2020). Concerning research activities, we are investigating various aspects of systemic mycoses with many universities, hospitals, and medical institutions such as NIID. The main research topics are: the mechanisms of infection of intractable fungal diseases, the development of their diagnostic and therapeutic methods, and the epidemiology/mechanisms of antifungal resistance.

A collaborative study with Sao Paulo State University of Campinas, Brazil (SATREPS), which has started in 2016, has made the last topic as its primary 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	Tepei Arai
特任助教	ハジム O.A カリファ	Research Assistant Professor	Hazim O. Abdelgalil Khalifa
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	関 里亜	Research Promotion Technician	Rio Seki

技術補佐員 土屋由紀子
技術補佐員 古賀 育子
技術補佐員 井上 京子

Research Promotion Technician Yukiko Tsuchiya
Research Promotion Technician Yasuko Koga (2020.7 ~)
Research Promotion Technician Kyoko Inoue

1. **Drain outlets in patient rooms as sources for invasive fusariosis: an analysis of patients with haematological disorders. J Hosp Infect 105(3):518-526, 2020.**

Hino Y, Muraosa Y, Oguchi M, Yahiro M, Yarita K, Watanabe A, Sakaida E, Yokote K, Kamei K

Invasive fusariosis (IF) is a frequently fatal disease as there are few antifungals to treat it, making the prevention of IF crucial. However, fusarium infections have not been as thoroughly studied as other common pathogenic fungi such as *Aspergillus* or *Candida*.

To investigate the epidemiology of IF in patients with haematological diseases in Japan and to elucidate the infectious route of fusarium infection.

We retrospectively analysed 29 IF cases in patients with haematological diseases from 2009 to 2019 in Japan. To discover the infectious source of IF, we performed an indoor environment survey targeted at indoor air and drain outlets in medical institutions and residences using culture-based and metagenomic methods. Finally, we performed aerosol- and droplet-mediated dispersion studies.

The epidemiological study showed that the primary pathogen of IF was *Fusarium solani* species complex (FSSC), and the most common species was *Fusarium petrophilum*. Most patients were likely to develop IF during hospitalization. A fusarium culture was positive in 26 of 72 drain samples. Few fusarium were detected from air samples; by contrast, 29 of 108 isolates from the drain outlets were identified as fusarium. Furthermore, similar results were obtained in the metagenomic analysis. Interestingly, species belonging to FSSC were isolated from indoor drain outlets, which was similar to those of the IF patients. In the droplet-mediated dispersion study, eight to 17 colonies of fusarium were isolated.

Our study indicates that causative *Fusarium* spp. could

inhabit drain outlets in hospitals or residences, and droplet-mediated fusarium dispersion is a potential cause of IF.

2. **Genetic Basis of Azole and Echinocandin Resistance in Clinical *Candida glabrata* in Japan. Antimicrob Agents Chemother 64(9):e00783-20, 2020.**

Khalifa HO, Arai T, Majima H, Watanabe A, Kamei K

Infections caused by *Candida glabrata* have caused worldwide concern, especially when they are associated with increasing echinocandin and azole resistance. In this study, we analyzed the molecular mechanisms of azole and echinocandin resistance in *C. glabrata* isolates obtained from hospitalized patients in Japan from 1997 to 2019. All isolates were checked phenotypically for resistance and genotypically for mutations in *PDR1*, *ERG11*, hot spot 1 (HS1), HS2, and HS3 of *FKS1*, and HS1 and HS2 of *FKS2*, and all isolates were genotyped by multilocus sequence typing (MLST). Interestingly, 32.6% of the isolates were resistant to caspofungin, and 4.7% were resistant to micafungin. The isolates showed low rates of resistance to azoles, ranging from 2.3% to 9.3%, and only 4.7% of the isolates were non-wild type for flucytosine susceptibility. For the first time in Japan, 4.7% of the isolates were identified as multidrug-resistant strains. Nonsynonymous mutations in *PDR1*, including two novel mutations associated with azole resistance, were identified in 39.5% of the isolates, and a single nonsynonymous mutation was identified in *ERG11*. Nine isolates from the same patient harbored nonsynonymous mutations in HS1 of *FKS2*, and a single isolate harbored a single nonsynonymous mutation in HS1 of *FKS1*. MLST genotyping revealed 13 different sequence types (STs), with 3 new STs, and ST7 was the most prevalent among the patients (35%) and was associated with high resistance rates. Our results are of crucial clinical concern, since understanding

the molecular mechanisms underlying fungal resistance is imperative for guiding specific therapy for efficient patient treatment and promoting strategies to prevent epidemic spread.

Publications in English

- 1) Fujishita K, Oka S, Kamei K, Tani K, Fujisawa Y, Kitamura W, Machida T, Imai T. A Disseminated *Fusarium fujikuroi* Species Complex Infection Prior to Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Acta Med Okayama*. 74: 435-441. 2020.
- 2) Arai T, Majima H, Watanabe A, Kamei K. A Simple Method To Detect Point Mutations in *Aspergillus fumigatus* *cyp51A* Gene Using a Surveyor Nuclease Assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 64: e02271-19. 2020.
- 3) Nakamura A, Tawara I, Ino K, Matsumoto T, Hayashi A, Imai H, Muraosa Y, Kamei K, Katayama N. Achievement of long-term remission of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Med Mycol Case Rep*. 27: 25-28. 2020.
- 4) Yada Y, Koga Y, Ono H, Motomura Y, Esumi G, Kohashi K, Muraosa Y, Kamei K, Matsuura T, Oda Y, Ohga S. Acute isolated *Aspergillus appendicitis* in pediatric leukemia. *J Infect Chemother*. 26: 1229-1231. 2020.
- 5) Takahashi-Nakaguchi A, Shishido E, Yahara M, Urayama SI, Sakai K, Chibana H, Kamei K, Moriyama H, Gono T. Analysis of an Intrinsic Mycovirus Associated With Reduced Virulence of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol*. 10: 3045. 2020.
- 6) Pontes L, Beraquet CAG, Arai T, Pigolli GL, Lyra L, Watanabe A, Moretti ML, Schreiber AZ. *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Carrying CYP51A with TR34/L98H/S297T/F495I Substitutions Detected after Four-Year Retrospective Azole Resistance Screening in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 64: e02059-19. 2020.
- 7) Chihara Y, Tanaka Y, Izumi M, Hagiwara D, Watanabe A, Takegawa K, Kamei K, Shibata N, Ohta K, Oka T. Biosynthesis of β -(1 \rightarrow 5)-Galactofuranosyl Chains of Fungal-Type and O-Mannose-Type Galactomannans within the Invasive Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere*. 5: e00770-19. 2020.
- 8) Toyotome T, Arai T, Watanabe A, Kamei K. Detection of Substitutions at 98th, 121st, and 289th Amino Acid Residues in Cyp51A using Cycling Probes. *Med Mycol J*. 61: 7-10. 2020.
- 9) Hiramoto R, Miyachi M, Nitta Y, Yoshida H, Kuwahara Y, Tsuchiya K, Iehara T, Yarita K, Kamei K, Hosoi H. Detection of circulating fungal DNA by polymerase chain reaction in a fatal case of *Cunninghamella bertholletiae* infection. *IDCases*. 20: e00760. 2020.
- 10) Iwahashi J, Kamei K, Watanabe H. Disruption of *Aspergillus fumigatus* biofilm by *Streptococcus pneumoniae*: Mycelial fragmentation by hydrogen peroxide. *J Infect Chemother*. 26(8): 831-837. 2020.
- 11) Hoshino A, Tokoro S, Akashi T, Inoue M, Takagi M, Imai K, Kanegane H, Muraosa Y, Kamei K, Morio T. Disseminated fusariosis in a child after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Int*. 62: 419-420. 2020.
- 12) Hino Y, Muraosa Y, Oguchi M, Yahiro M, Yarita K, Watanabe A, Sakaida E, Yokote K, Kamei K. Drain outlets in patient rooms as sources for invasive fusariosis: an analysis of patients with haematological disorders. *J Hosp Infect*. 105: 518-526. 2020.
- 13) Izumikawa K, Takeyama H, Sakai F, Shibuya K, Sugita T, Takazono T, Takata T, Tashiro M, Teruya K, Nakamura S, Noguchi H, Hiruma M, Makimura K, Miyazaki T, Miyazaki Y, Yamagishi Y, Yoshida K, Watanabe A. Executive Summary of JSMM Clinical Practice Guidelines for Diagnosis and Treatment of Cryptococcosis 2019. *Med Mycol J*. 61: 61-89. 2020.
- 14) Harada S, Ohkushi D, Nakano K, Mitani H, Yamamoto Y, Kamei K, Hayama B. Fatal invasive pulmonary aspergillosis caused by voriconazole-resistant *Aspergillus tubingensis* in a patient with solid tumor. *J Infect Chemother*. 26: 301-304. 2020.
- 15) Khalifa HO, Arai T, Majima H, Watanabe A, Kamei K. Genetic Basis of Azole and Echinocandin Resistance in Clinical *Candida glabrata* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 64: e00783-20. 2020.

- 16) Furudate A, Hirose S, Abe K, Kawashima A, Hashimoto K, Yamazaki S, Kamei K, Ishiwada N, Hamada H, Sato M. Infantile *Aspergillus fumigatus* ventriculitis successfully treated with monitoring of plasma and cerebrospinal fluid voriconazole concentration level. *J Infect Chemother.* 26: 132-135. 2020.
- 17) Ohki Y, Okamoto Y, Iinuma T, Yamamoto H, Toyotome T, Yahiro M, Yonekura S, Sakurai D, Kamei K. Local fungus-specific Immunoglobulin E production in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rhinology.* 58: 136-144. 2020.
- 18) Nishimura Y, Shikanai T, Kawamoto S, Toh-E A. Step-wise elimination of α -mitochondrial nucleoids and mitochondrial structure as a basis for the strict uniparental inheritance in *Cryptococcus neoformans*. *Sci Rep.* 10: 2468. 2020.
- 19) Takatsuka H, Yamazaki S, Watanabe A, Yokoyama I, Suzuki T, Kamei K, Ishii I. Successful treatment of *Aspergillus empyema* using combined intrathoracic and intravenous administration of voriconazole: A case report. *J Infect Chemother.* 26: 847-850. 2020.
- 20) Takeda K, Suzuki J, Watanabe A, Matsuki M, Higa K, Inoue E, Akashi S, Shimada M, Kawashima M, Ohshima N, Fukami T, Masuda K, Yamane A, Tamura A, Nagai H, Matsui H, Tohma S, Kamei K. Species identification, antifungal susceptibility, and clinical feature association of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from the lower respiratory tract. *Med Mycol.* 58(3): 310-314, 2020.

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。さらに、ワクチンのリスク教育に関する研究にも取り組んでいる。

Our research focuses on 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. We also recently conduct the research on risk education for vaccination.

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

1. The effects of health education on health science teachers' intention to recommend adolescent HPV vaccine for female students in Japan.

Ishiwada N¹, Suzuki C², Hasebe S², Tsuchiya A², Takeuchi N¹, Hishiki H³, Sato Y⁴, Sugita K²

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

² Division of Child Health, Faculty of Education, Chiba University

³ Department of Pediatrics, Chiba University Hospital

⁴ Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University School of Medicine

Abstract

The Japanese government suspended proactive recommendation of human papillomavirus (HPV) vaccination due to several reports of adverse events related to it in 2013. After that, the immunization rate of HPV vaccine quickly declined in Japan. Health science teachers (HSTs) are qualified and licensed teachers in charge of health care and health education for students in Japanese schools. HSTs have not recommended HPV vaccination to female students, since active governmental recommendation for HPV vaccination was halted for 5 y. We conducted a primary survey targeting HSTs (N=39) and university students taking the HST training course (N=123). In each group, awareness regarding HPV vaccine and disease burden was evaluated and factors related to and barriers to HPV vaccine recommendation were identified. The primary survey found that many HSTs and university students recognized their insufficient knowledge

regarding the HPV vaccine. Based on the primary survey's results, infectious disease specialists, collaborating with Japanese HSTs, developed educational slide sets on HPV vaccine. A secondary survey was conducted before and after the lecture with HSTs (N=162), where we evaluated their intelligibility and intention to recommend HPV vaccination for female students. In the post-lecture, secondary survey, the number of HSTs who recommended the HPV vaccine to their students had statistically increased from 76 before the lecture, to 103 ($p < .05$). An educational lecture using appropriate materials improved HSTs' vaccine confidence and intention to recommend the HPV vaccine to their students, verifying the study's hypothesis.

2. Epidemiology of hospitalized paediatric community-acquired pneumonia and bacterial pneumonia following the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the national immunization programme in Japan.

Takeuchi N¹, Naito S², Ohkusu M¹, Abe K³, Shizuno K⁴, Takahashi Y⁵, Omata Y⁵, Nakazawa T⁵, Takeshita K², Hishiki H², Hoshino T⁶, Sato Y⁷, Ishiwada N¹

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

² Department of Paediatrics, Chiba University Hospital

³ Department of Paediatrics, Chiba Kaihin Municipal Hospital

⁴ Department of Clinical Laboratory, Chiba Kaihin Municipal Hospital

⁵ Department of Paediatrics, Seikeikai Chiba Medical Center

⁶ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital

⁷ Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University School of Medicine

Abstract

Studies on community-acquired pneumonia (CAP) and pneumococcal pneumonia (PP) related to the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) introduction in Asia are scarce. This study aimed to investigate the epidemiological and microbiological determinants of

hospitalised CAP and PP after PCV13 was introduced in Japan. This observational hospital-based surveillance study included children aged ≤ 15 years, admitted to hospitals in and around Chiba City, Japan. Participants had bacterial pneumonia based on a positive blood or sputum culture for bacterial pathogens. Serotype and antibiotic-susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates from patients with bacterial pneumonia were assessed. The CAP hospitalisation rate per 1,000 child-years was 17.7, 14.3 and 9.7 in children aged < 5 years and 1.18, 2.64 and 0.69 in children aged 5-15 years in 2008, 2012 and 2018, respectively. There was a 45% and 41% reduction in CAP hospitalisation rates, between the pre-PCV7 and PCV13 periods, respectively. Significant reductions occurred in the proportion of CAP due to PP and PCV13 serotypes. Conversely, no change occurred in the proportion of CAP caused by *H. influenzae*. The incidence of hospitalised CAP in children aged ≤ 15 years was significantly reduced after the introduction of PCV13 in Japan. Continuous surveillance is necessary to detect emerging PP serotypes.

3. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibody levels in Japanese young patients with hematological malignancies and asplenia

Takeshita K¹, Ishiwada N², Takeuchi N², Takahashi Y¹, Fukasawa C³, Hishiki H³, Hoshino T⁴, Shimajo N¹

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

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

³ Department of Paediatrics, Seikeikai Chiba Medical Center

⁴ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital

Abstract

Individuals with immunosuppressive condition have a high risk of invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) infection. In Japan, routine Hib vaccination program for children under 5 years old was introduced in December 2008. However, the national policy does not make provision for individuals aged ≥ 5 years who have medical conditions associated with a

high risk of invasive Hib disease to receive Hib vaccine. We measured serum anti-polyribosylribitol phosphate specific (anti-PRP) antibodies to Hib in patients aged ≥ 5 years with hematological malignancies and asplenia and evaluated their levels of anti-PRP antibodies in post administration of Hib vaccine era. A total of 65 patients (48 with hematological malignancies, and 17 with asplenia) were included in this study, of which 84% had not received Hib vaccine. In addition, 95.4% had short-term protective levels of anti-PRP antibodies (defined as ≥ 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 41.5% had long-term protective levels of anti-PRP antibodies (defined as ≥ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Five patients had low anti-PRP antibody levels despite a history of Hib vaccination. Our results suggest that young patients with underlying diseases such as hematological malignancies and asplenia may be at risk of invasive Hib disease. Hence, we recommend they should receive Hib vaccines even if they are over the age limit for routine Hib vaccination program.

4. Effect of a vaccine information statement (VIS) on immunization status and parental knowledge, attitudes, and beliefs regarding infant immunization in Japan

Saitoh A¹, Saitoh A², Katsuta T², Mine M², Kamiya H², Miyairi I², Ishiwada N², Oshiro M², Kira R², Shimizu N², Suga S², Tsugawa T², Fujioka M², Miyazaki C², Morioka I², Korematsu S², Nakano T², Tanaka-Taya K², Yoshikawa T², Iwata S², Kusahara K², Azuma H², Moriuchi H², Okabe N², Hosoya M², Tsutsumi H², Okada K²

¹ Department of Nursing, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

² The Committee on Immunization and Infectious Diseases, Japan Pediatric Society

Abstract

Background: Because of the overabundance of vaccination information on the internet, in the media, and on social media, providing clear and correct information on immunization is critical for parental decision-making. In 2018, the Japan Pediatric Society created and distributed a

Vaccine Information Statement (VIS) to provide appropriate immunization information to caregivers. The objectives of the present study were to evaluate the effect of the VIS on immunization rates, adherence to schedule, and parental understanding of immunization in Japan.

Methods: This cross-sectional study was conducted at 18 centers in 2 prefectures in Japan. Caregivers were assigned to an intervention group, which received the VIS and a questionnaire when their child reached the age of 1 month, and a control group, which received only the questionnaire. Using the self-reported questionnaires, we evaluated vaccination rates and schedule adherence at age 2 months, and parental knowledge, attitudes, and beliefs regarding immunization. Three months later, the questionnaires were returned, and the findings were compared between the 2 groups.

Results: We contacted 422 and 428 persons in the intervention and control groups, respectively, and 111/422 (26.3%) and 119/428 (27.8%) returned the surveys. Vaccination rates and adherence rates for the first dose of 4 recommended vaccines did not differ significantly ($P > 0.25$); however, there were some positive effects on items related to vaccine knowledge ($P = 0.03$), perceived benefits ($P = 0.02$), perceived barriers ($P < 0.001$), and perceived behavioral control ($P = 0.01$).

Conclusion: The VIS improved parent comprehension of infant immunization. Future studies should examine if the effects of such an intervention persist and affect vaccine uptake throughout childhood.

5. Antibiotics for hospitalized children with community-acquired pneumonia in Japan: Analysis based on Japanese national database

Yahaba M¹, Yamagishi K¹, Yamazaki S², Takayanagi S¹, Kawasaki Y³, Taniguchi T¹, Ishiwada N⁴, Igari H¹

¹ Division of Infection Control, Chiba University Hospital

² Division of Pharmacy, Chiba University Hospital

³ Biostatistics Section, Clinical Research Center, Chiba

University Hospital

⁴Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University

Abstract

Introduction: Community-acquired pneumonia (CAP) is one of the most common causes of pediatric infection requiring hospitalization. Antimicrobial resistance due to the inappropriate use poses a threat worldwide. Our objective is to analyze and optimize the trends of antibiotics used for pediatric inpatients with CAP in a claims database provided by the Ministry of Health, Labour and Welfare.

Methods: Our database randomly sampled 10% of the hospitalized patients every October from 2011 to 2014. Patients aged <15 years in whom antibiotic therapy was initiated within two days of admission were listed. Subsequently, we investigated the antibiotics administered on the first day of prescription.

Results: A total of 4,831 antibiotics were prescribed for 3,909 patients. Many patients aged \leq five years were treated with β -lactams alone whereas many patients aged \geq six years were treated with a single antibiotic, such as a macrolide, tetracycline, and quinolone, which covers atypical bacteria. Combination therapy was primarily used in children aged \geq six years (nearly 30%); the main combination was a β -lactam and non- β -lactam covering atypical bacteria. Ampicillin-sulbactam was the most frequently prescribed β -lactam in children of all ages other than infants. Ampicillin, however, was most often prescribed in infants, but its usage rate was low at other ages.

Conclusions: Antibiotics were appropriately prescribed and were similar to that recommended in the 2011 guidelines for pediatric inpatients with CAP. However, combination therapy was frequently prescribed in children aged \geq six years. According to the revised guidelines in 2017, ampicillin should be used more frequently for patients hospitalized with CAP.

6. Nationwide surveillance of bacterial pathogens isolated from children conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2017: General overview of pathogenic antimicrobial susceptibility

Ishiwada N¹, Fujimaki K¹, Matsumoto T², Kiyota H², Tateda K², Sato J², Hanaki H³, Takayanagi R¹, Yamaguchi Y¹, Hoshino T¹, Kuroki H¹, Iwata S¹, Tajima T¹, Horikoshi Y¹, Shiro H¹, Bamba M¹, Kawamura N¹, Ouchi K¹, Matsubara K¹, Okada T¹, Furuno K¹, Tsumura N¹

¹Pediatric Sub-committee and the Surveillance Committee of Japanese Society of Chemotherapy (JSC), The Japanese Association for Infectious Diseases (JAID), The Japanese Society for Clinical Microbiology (JSCM)

²The Surveillance Committee of JSC, JAID, JSCM

³Infection Control Research Center, The Omura Satoshi Memorial Institution, Kitasato University

Abstract

A nationwide surveillance of the antimicrobial susceptibility of pediatric patients to bacterial pathogens was conducted by Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in Japan in 2017. The isolates were collected from 18 medical facilities between March 2017 and May 2018 by the three societies. Antimicrobial susceptibility testing was conducted at the central laboratory (Infection Control Research Center, Kitasato University, Tokyo) according to the methods recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing was evaluated in 926 strains (331 *Streptococcus pneumoniae*, 360 *Haemophilus influenzae*, 216 *Moraxella catarrhalis*, 5 *Streptococcus agalactiae*, and 14 *Escherichia coli*). The ratio of penicillin-resistant *S. pneumoniae* was 0% based on CLSI M100-ED29 criteria. However, three meropenem or tosufloxacin resistant *S. pneumoniae* isolates were obtained. Among *H. influenzae*, 13.1% of them were found to be β -lactamase-producing ampicillin resistant strains, while 20.8% were β -lactamase non-producing ampicillin-resistant strains. No capsular type

b strains were detected. In *M. catarrhalis*, 99.5% of the isolates were β -lactamase-producing strains. All *S. agalactiae* and *E. coli* strains were isolated from sterile body sites (blood or cerebrospinal fluid). The ratio of penicillin-resistant *S. agalactiae* was 0%, while that of extended spectrum β -lactamase-producing *E. coli* was 14.3%.

Publications: original articles

- 1) Ishiwada N, Suzuki C, Hasebe S, Tsuchiya A, Takeuchi N, Hishiki H, Sato Y, Sugita K. The effects of health education on health science teachers' intention to recommend adolescent HPV vaccine for female students in Japan. *Hum Vaccin Immunother.* 2020; 16: 2752-2757.
- 2) Takeuchi N, Naito S, Ohkusu M, Abe K, Shizuno K, Takahashi Y, Omata Y, Nakazawa T, Takeshita K, Hishiki H, Hoshino T, Sato Y, Ishiwada N. Epidemiology of hospitalized paediatric community-acquired pneumonia and bacterial pneumonia following the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the national immunization programme in Japan. *Epidemiol Infect.* 2020; 148: e91.
- 3) Takeshita K, Ishiwada N, Takeuchi N, Hishiki Hoshino T, Shimojo N. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide antibody levels in Japanese young patients with hematological malignancies and asplenia. *J Infect Chemother.* 2020; 26: 959-62.
- 4) Saitoh A, Saitoh A, Katsuta T, Mine M, Kamiya H, Miyairi I, Ishiwada N, Oshiro M, Kira R, Shimizu N, Suga S, Tsugawa T, Fujioka M, Miyazaki C, Morioka I, Korematsu S, Nakano T, Tanaka-Taya K, Yoshikawa T, Iwata S, Kusuhara K, Azuma H, Moriuchi H, Okabe N, Hosoya M, Tsutsumi H, Okada K. Effect of a vaccine information statement (VIS) on immunization status and parental knowledge, attitudes, and beliefs regarding infant immunization in Japan. *Vaccine.* 2020; 38: 8049-8054.
- 5) Yahaba M, Yamagishi K, Yamazaki S, Takayanagi S, Kawasaki Y, Taniguchi T, Ishiwada N, Igari H. Antibiotics for hospitalized children with community-acquired pneumonia in Japan: analysis based on Japanese national database. *J Infect Chemother.* 2020 Nov9: S1341-321X(20)30381-0.
- 6) Ishiwada N, Fujimaki K, Matsumoto T, Kiyota H, Tateda K, Sato J, Hanaki H, Takayanagi R, Yamaguchi Y, Hoshino T, Kuroki H, Iwata S, Tajima T, Horikoshi Y, Shiro H, Bamba M, Kawamura N, Ouchi K, Matsubara K, Okada T, Furuno K, Tsumura N. Nationwide surveillance of bacterial pathogens isolated from children conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2017: General overview of pathogenic antimicrobial susceptibility. *J Infect Chemother.* 2020; Dec1: S1341-321X(20)30427-X.
- 7) Furudate A, Hirose S, Abe K, Kawashima A, Hashimoto K, Yamazaki S, Kamei K, Ishiwada N, Hamada H, Sato M. Infantile *Aspergillus fumigatus* ventriculitis successfully treated with monitoring of plasma and cerebrospinal fluid voriconazole concentration level. *J Infect Chemother.* 2020; 26: 132-5.
- 8) Yamada N, Nakamoto T, Takei H, Shoji T, Takahashi K, Sato J, Takeuchi N, Ohkusu M, Ishiwada N. Two cases of bacterial meningitis due to meropenem-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a threat of serotype 35B, ST 558 lineage. *J Infect Chemother.* 2020; 26: 745-8.
- 9) Takeuchi N, Ohkusu M, Hishiki H, Fujii K, Hotta M, Murata S, Ishiwada N. First report on multidrug-resistant non-encapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from a patient with pneumonia. *J Infect Chemother.* 2020; 26: 749-51.
- 10) Muraki K, Kusama, Y, Takeuchi N, Ishiwada N. Secondary osteomyelitis from contiguous intrapelvic hematoma. *Pediatr Int.* 2020; 62: 1301-3.

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	全 真知子	Research Promotion Technician	Machiko Zen
技 術 補 佐 員	道 格道	Research Promotion Technician	Getong Dao
技 術 補 佐 員	八原あずさ	Research Promotion Technician	Azusa Yahara

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

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

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

2. Systems biology for understanding the stress responses in bacteria

Jun-ichi Ishihara, Hiroki Takahashi

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

Publications

- 1) Imashimizu M, Tokunaga Y, Afek A, Takahashi H, Shimamoto N, Lukatsky DB. Control of transcription initiation by biased thermal fluctuations on repetitive genomic sequences. *Biomolecules*, 10(9): E1299, 2020.

- 2) Yoshioka I, Takahashi H, Kusuya Y, Yaguchi T, Kirimura K. Draft genome sequence of *Aspergillus tubingensis* WU-2223L, a citric acid-producing filamentous fungus belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Microbiol Resour Announc*, 9(33): e00702-20, 2020.
- 3) Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Katayama Y, Kusuya Y, Shoji T, Takada S, Nakagawa S, Oguma R, Saito N, Ozawa N, Nakano T, Yamaide F, Dissanayake E, Suzuki S, Villaruz A, Varadarajan S, Matsumoto M, Kobayashi T, Kono M, Sato Y, Akiyama M, Otto M, Matsue H, Núñez G, Shimojo N. *Staphylococcus Agr* virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Sci Transl Med*, 12(551): eaay4068, 2020.

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	伴 さやか	Assistant Professor	Sayaka Ban
技 術 職 員	伊藤 純子	Research Technician	Junko Ito
技 術 補 佐 員	長村 由美	Research Promotion Technician	Yumi Osamura
技 術 補 佐 員	樋口芳緒美	Research Promotion Technician	Kaomi Higuchi

1. Molecular and metabolic strategies for postharvest detection of heat-resistant fungus *Neosartorya fischeri* and its discrimination from *Aspergillus fumigatus*.

Pertile G¹, Frac M¹, Fornal E², Oszust K¹, Gryta A¹, Yaguchi T³.

¹ Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Lublin, Poland

² Department of Pathophysiology, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

³ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

Heat Resistant Fungi (HRF) and toxigenic fungi are considered as a serious problem both in the agricultural field and for human health, due to ascospores and mycotoxins production, which can contaminate fruit and, as a consequence, adversely affect the agricultural food chain. One strategy to identify these fungi is the use of modern molecular method, which include the analysis of DNA target regions for differentiation of the fungal species. However, previously developed methods included only the identification of pure

strains but not the detection of *Neosartorya fischeri* in artificially contaminated food samples, such as fruit or juices. Therefore, the aim of presented study was to develop a detection method of *Neosartorya fischeri* in contaminated strawberry fruit and juice. The other strategy is the use of phenotypic assays to determine the metabolic profile of the fungi in order to facilitate a qualitative and quantitative detection of microorganisms based on specific substrates utilization and mycotoxins production. Accordingly, the study included an evaluation of the differences in phenotype profile between *N. fischeri* and the phylogenetically close fungus *Aspergillus fumigatus*, as a strategy of their differentiation and identification. PCR detection assay was developed that revealed the presence of *N. fischeri* DNA in all tested contaminated samples of fruit and juice. Therefore, it can be concluded that this rapid molecular method is an important tool for the evaluation of the postharvest quality of agricultural raw materials. Moreover, the results suggest that specific metabolic and mycotoxin patterns may be used as *N. fischeri* detection markers and strategy in discrimination of this fungus from *A. fumigatus*. The results indicated that *N. fischeri* and *A. fumigatus* had a different time period of carbon sources utilization, and particularly *N. fischeri* presented a

more efficient carbon meta-bolism. Mycotoxins, verruculogen and fumitremorgin C, were detected after 4 days incubation of *N. fischeri*. Although metabolic assays are not such fast as molecular detection approach, they allow to deeper insight into the pathways activated by heat-resistant and toxigenic fungi. Therefore, both molecular and metabolic strategies of heat-resistant fungus detection and identification are complementary and can be used to measure postharvest quality of fruit and their products.

2. Identification and functional characterization of *Penicillium marneffe* major facilitator superfamily (MFS) transporters.

Utami S¹, Indriani C^{1,2}, Bowolaksono A², Yaguchi T³, Chen X¹, Niimi K¹, Niimi M¹, Kajiwara S¹.

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

² Department of Biology School of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

³ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

Penicillium marneffe is a thermally dimorphic fungus that causes penicilliosis, and become the third-most-common opportunistic fungal infection in immunocompromised patients in Southeast Asia. Azoles and amphotericin B have been introduced for the treatment, however, it is important to investigate possible mechanisms of azole resistance for future treatment failure. We identified 177 putative MFS transporters and classified into 17 subfamilies. Among those, members of the Drug:H⁺ antiporter 1 subfamily are known to confer resistance to antifungals. Out of 39 paralogs, three (encoded by PmMDR1, PmMDR2, and PmMDR3) were heterologously overexpressed in *S. cerevisiae* ADΔ conferred resistance to various drugs and compounds including azoles, albeit to different degrees. PmMDR1-expressing strain showed resistance to the broadest range of drugs, followed by the PmMDR3, and PmMDR2 conferred weak resistance to a limited range of drugs. We conclude that PmMDR1 and PmMDR3, may be able to serve as multidrug efflux pumps.

3. Isolation and characterization of *Fusarium* species and fumonisins contamination in maize from lower eastern and rift valley regions of Kenya.

Koskei P¹, Karanja S¹, Mashedi O², Matsuzawa T³, Gono T⁴, Yaguchi T⁴, Bii C².

¹ School of Public Health, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Kenya

² Mycology Laboratory, Kenya Medical Research Institute, Nairobi, Kenya

³ Siebold Campus, University of Nagasaki, Nagasaki, Japan

⁴ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

Maize serves as a staple food in many Sub-Saharan African (SSA) Countries. It is mostly susceptible to mycotoxins including aflatoxin and fumonisin contamination. Fumonisins are produced by the *Fusarium* species, predominantly *Fusarium verticillioides*. Fumonisins' health hazards are documented in many parts of the world. However, few studies exist on fumonisin contamination in maize locally. The presence of *Fusarium* species and the associated fumonisin contamination of maize grown in Rift Valley and Lower Eastern regions of Kenya were assessed. Maize samples were collected from randomly selected households in three Counties from each of the two regions. Isolation and characterization of *Fusarium* species was done using Daniel et al., (2011) protocol. Envirologix Quick Tox Kit was used to quantify fumonisin levels. *Aspergillus* species was the most prevalent fungi species isolated (50.3%) followed by *Fusarium* species (39.3%) with *F. verticillioides* accounting for 80.8% of all *Fusarium* spp. Of the 200 samples analyzed, 133 (65.5%) had fumonisin levels below the level of detection (<0.1 ppm), 63 (31.5%) had fumonisin level of between 0.1 ppm-4.0 ppm and 4 (2.0%) sample had fumonisin levels of more than 4.0 ppm. Lower Eastern Region had higher proportion of samples with detectable fumonisin levels compared to Rift Valley Region (55.4% vs 11.1%). In conclusion *Fusarium verticillioides* commonly associated with fumonisin contamination of maize was a common fungus isolated in the study regions. It also showed that some of the maize samples

consumed by the respondents have fumonisin levels that are above the internationally accepted levels. These results suggest that people are likely to be exposed to fumonisins that has been associated with adverse health hazards.

Publications

- 1) Elshamy AI, Yoneyama T, Trang TV, Son NT, Okamoto Y, Ban S, Noji M, Umeyama A. A new cerebroside from the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps longiissima*: Structural-electronic and antioxidant relations. Experimental and DFT calculated studies. *J Mol Struct.* 1200: 127061, 2020.
- 2) Hirose M, Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kano R, Yaguchi T, Fujimoto N, Satoh T, Ihn H. Ungual hyalohyphomycosis caused by *Fusarium cugenangense*. *Clin Case Rep.* 8(12): 3532-3537, 2020.
- 3) Ito Y, Tanigawa M, Yaguchi T, Toyoshima H, Iwamoto K, Nigi A, Itani H, Kondo S, Tokui T, Sasano H. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia blacklokliae* in an immunocompetent patient. *Respirat Med Case Rep.* 29: 101005, 2020.
- 4) Iwahashi C, Eguchi H, Hotta F, Uezumi M, Sawa M, Kimura M, Yaguchi T, Kusaka S. Orbital abscess caused by *Exophiala dermatitidis* following posterior subtenon injection of triamcinolone acetonide: a case report and a review of literature related to *Exophiala* eye infections. *BMC Infect Dis.* 20: 566, 2020.
- 5) Kanai T, Samejima Y, Noda Y, Kim S-H, Tamura K, Umakoshi T, Shimizu K, Kashiwa Y, Morishita H, Ueda K, Kawahara K, Yaguchi T, Matsuoka H. Invasive tracheobronchial aspergillosis with bronchial ulcers complicated by nontuberculous mycobacterial disease: A Case Rep. *Intern Med.* 59(9): 1189-1194, 2020.
- 6) Kaplan E, Gonca S, Kandemir H, Döğen A, Hilmioglu-Polat S, Ilkit M, Tanaka R, Yaguchi T, Uhrlaß S, Nenoff P. Genes encoding proteolytic enzymes fungalsin and subtilisin in dermatophytes of human and animal origin: A comparative study. *Mycopathologia.* 185(1): 137-144, 2020.
- 7) Kanegae H, Tomino N, Nakamura Y, Minakawa T, Yaguchi T, Izawa T, Sano A, Itano EN, Ueda K. *Parengyodontium album* isolated from cutaneous lesions of a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) during treatment for paracoccidioidomycosis ceti. *Mycopathologia.* 185(6): 1021-1031, 2020.
- 8) Kobayashi N, Hara Y, Arai AM, Hara S, Gonoï T, Yaguchi T, Ishibashi M. Isolation of Inohanalactone, a γ -Butyrolactone, from *Nocardia inohanensis* IFM0092^T. *Heterocycles.* 101(1): 312-317, 2020.
- 9) Koskei P, Karanja S, Mashedi O, Matsuzawa T, Gonoï T, Yaguchi T, Bii C. Isolation and characterization of *Fusarium* species and fumonisins contamination in maize from lower eastern and rift valley regions of Kenya. *Afri J Educa Sci Technol,* 6(1): 19-28, 2020.
- 10) Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kano R, Yaguchi T, Ihn H. Non-dermatophyte mould onychomycosis in Japan. *Med Mycol J.* 60(2): 22-31, 2020.
- 11) Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kano R, Yaguchi T, Fukushima S, Ihn H. Onychomycosis caused by *Trichosporon cacaoliposimilis*. *J Dermatol.* 47(5): e193-e195, 2020.
- 12) Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kano R, Yaguchi T, Fukushima S, Ihn H. Ungual hyalohyphomycosis caused by *Fusarium proliferatum* successfully treated with fosravuconazole. *J Dermatol.* 47(7): e251-e253, 2020.
- 13) Pertile G, Frac M, Fornal E, Oszust K, Gryta A, Yaguchi T. Molecular and metabolic strategies for postharvest detection of heat-resistant fungus *Neosartorya fischeri* and its discrimination from *Aspergillus fumigatus*. *Postharv Biol Technol.* 161: 111082, 2020.
- 14) Sato T, Asahina Y, Toshima S, Yaguchi T, Yamazaki K. Usefulness of wood's lamp for Diagnosis and treatment follow-up of onychomycosis. *Med Mycol J.* 60(2): 17-21, 2020.
- 15) Takeshige A, Nakano M, Kondoh D, Tanaka Y, Sekiya A, Yaguchi T, Furuoka H, Toyotome T. Adiaspore development and morphological characteristics in a mouse adiaspiromycosis model. *Vet Res.* 51: 119, 2020.
- 16) Takeshima R, Asahina Y, Yaguchi T, Sato T. Tinea barbae due to *Trichophyton rubrum* successfully treated using oral fosravuconazole L-lysine ethanolate. *J Dermatol.* 47(7): e254-255, 2020.

- 17) Tamura T, Saito S, Hamada M, Kang Y, Hoshino Y, Gono T, Mikami Y, Yaguchi T. *Gordonia crocea* sp. nov. and *Gordonia spumicola* sp. nov. isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 70(6): 3718–3723, 2020.
- 18) Tanaka H, Kiko K, Watanabe Y, Yaguchi T, Oya D, Shiojiri T. Miliary cerebrospinal lesions caused by *Nocardia beijingensis* in an immunocompetent patient. *IDCases.* 20: e00737, 2020.
- 19) Toyotome T, Saito S, Koshizaki Y, Komatsu R, Matsuzawa T, Yaguchi T. Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens and their antifungal susceptibility: A five-year single-center study in Japan. *J Infect Chemoth.* 26(2): 321–323, 2020.
- 20) Utami S, Indriani C, Bowolaksono A, Yaguchi T, Chen X, Niimi K, Niimi M, Kajiwara S. Identification and functional characterization of *Penicillium marneffei* major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Biosci Biotechnol Biochem.* 84(7): 1373–1383, 2020.
- 21) Yoshioka I, Takahashi H, Kusuya Y, Yaguchi T, Kirimura K. Draft genome sequence of *Aspergillus tubingensis* WU-2223L, a citric acid-producing filamentous fungus belonging to *Aspergillus* Section *Nigri*. *Microbiol Resour Announc.* 9(33): e00702–20, 2020.

原口 P I (RNA 制御) プロジェクト

Project for RNA Regulation

研究概要 (Summary)

遺伝子発現の制御ネットワークは、その細胞の発生、分化、増殖に関する特異性はもちろん、真菌・細菌・ウイルス等の寄生体に対する宿主の応答性や competency をも規定している。令和 2 年 7 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、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 に注目する。そして発現の異常亢進により遺伝子制御ネットワークの乱れの原因となる miRNA を同定し、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がんを初めとしたヒト疾患の制圧をめざす。

Gene regulatory networks determine not only cellular specificity of development, differentiation, and proliferation but also cellular response or competency to virus, bacterial, and mycete. This project, which has started in July 2020, concentrate on miRNA, which suppresses expression of many genes at the post-transcriptional level, to develop translational research of new therapeutic strategies for human diseases such as cancer.

特 任 准 教 授	原 口 健	Research Associate Professor	Takeshi Haraguchi
特 任 助 教	小 林 和 善	Specially Appointed Assistant Professor	Kazuyoshi Kobayashi
技 術 補 佐 員	桜 井 典 子	Research Promotion Technician	Noriko Sakurai
技 術 補 佐 員	相 川 尚 美	Research Promotion Technician	Naomi Aikawa
客 員 教 授	伊 庭 英 夫	Visiting Professor	Hideo Iba

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

Takeshi Haraguchi, Kazuyoshi Kobayashi and Hideo Iba

Joint 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 as TuD (Tough Decoy) and expressed from viral vectors. S-TuD (Synthetic TuD), which mimics the unique secondary structure of TuD was also developed as RNA medicine. It has been further improved as Super-S-TuD, which showed 3-7 folds enhancement in its specific activity of the target miRNA inhibition. For the efficient delivery of systemically

administrated Super-S-TuD into tumor tissues is the major challenge at present. We previously established basic formulation for Lipid nanoparticle (LNP) preparation using COATSOME-X (developed by NOF) and Super-S-TuD 141/200c (suppresses the entire miR-200 family) encapsulated by such LNPs was shown to suppress the formed tumors efficiently when intravenously administrated into nude mice bearing tumors formed by a human tumor cell line.

For innovative therapy for broad spectrum of tumors, we now target miR-21, which is expressed in almost all the epithelial tumors at very high levels and has been shown to be strong causative of cancer through inhibition of many important tumor suppressor genes simultaneously. Since miR-21 is one of the most abundant miRNA species in cancer cells, both high dosage of Super-S-TuD21 (targeting miR-21) and efficient DDS would be required. However, high dosage of Super-S-TuD encapsulated by COATSOME-X was

toxic to nude mice. We therefore used COATSOME-Y instead, which shows very effective intracellular delivery and much lower toxicity in mice. We optimized method of preparing LNP composed of COATSOME-Y, helper lipids and PEGylated lipids and established the formulation of LNP encapsulating Super-S-TuD21. This LNP encapsulating

Super-S-TuD21 is about 30nm and can fully suppress miR-21 activity in cancer cell lines at the dosage of 300nM (Nucleic acids). Such LNP showed high retentivity in blood and good pharmacokinetics with specific accumulation of LNP into tumor tissues, when administrated into tail vein of tumor bearing mice.

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。

本年はコロナ禍の影響を受けたが、その中での活動を模索している。

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.

This year, this project was influenced by the COVID-19, but we are looking for activities within 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てきました。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た。さらに環境中のアスペルギルス症原因菌種の抗真菌薬に対する耐性、耐性部位などの調査も行っている。

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

本年はコロナ禍の影響で、ケニアへの渡航ができなかったが、これまで収集した菌株の解析、日本産株との

比較を実施した。

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

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

Although it was not possible to travel to Kenya this year due to the COVID-19, we analyzed the strains collected until now and compared them with Japanese ones.

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、現在世界中を混乱に陥れているCOVID-19感染に多くのアスペルギルス症の合併（CAPA：COVID-Associated Pulmonary Aspergillosis）がみられたことから、その重要性は世界的に再認識された。我が国では、アスペルギルス症の中でも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の頻度が高く、社会的意義が大きい。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すものである。

耐性菌はアスペルギルスにおいてもきわめて深刻な問題となりつつあるが、耐性菌研究には、数多くのさまざまな症例からの最新の検体と臨床情報の収集が不可欠である。当センターは昨年、日本感染症学会及び日本臨床微生物学会により「先進的感染症検査施設」に認定され、真菌症リファレンスセンターとして全国の医療施設から種々の検査依頼、診療サポートを引き受けていることから、多くの検体を集めることが出来ている。今年前半はCOVID-19の流行により依頼が少なかったが、秋口より急速に増加して、結局、検査依頼は約410件に達した。これらに加えて、慶應大学呼吸器内科／感染制御部・感染制御センター及びNHO東京病院も加えたより緻密な共同研究ネットワークを構築し、アスペルギルス症難治化の一因である *Aspergillus fumigatus* 耐性化の研究を続けている。今年アゾール薬耐性の主要なメカニズムとして知られている Cyp51A（アゾール系抗真菌薬の標的遺伝子）に変異を持たないアゾール耐性株の解析を行ない、HMG-CoA reductase の変異がアゾール耐性に関与していることをCRISPR/Cas9システムを用いた解析により証明した（論文準備中）。また脂質代謝に関与す

る別のタンパクの変異によりアゾール耐性を惹起する可能性についても新たに見出した。現在詳細を解析中である。一方、難治化克服のための基礎研究として、これまでに病原因子の新たな候補であるアスペルギルス細胞壁タンパク質の存在を示唆してきたが、今年更に研究を進めて宿主の自然免疫がアスペルギルス細胞壁タンパク質によって誘導される機序を *in vitro* および *in vivo* の実験によって証明するなど、多くの画期的な知見を得ることが出来た（論文準備中）。

また、慶應大学病院等との国内共同疫学研究では、我が国の慢性肺アスペルギルス症では、アゾール系抗真菌薬を投与されている患者から検出された *A. fumigatus* 株は投与されていない患者からの株と比較してアゾール薬耐性が多いことを明らかとし、論文報告を行った（Medical Mycology 2020）。現在収集した薬剤耐性菌株についてさらに詳細な解析を進めている。

新生児領域における研究に関しては、これまでに新生児深在性真菌感染症発症状況全国調査を実施し、国内の実態を明らかにした。また、乳児の胃液の真菌培養による糸状菌感染症診断を試みたところ、真菌に易感染性を示すことで知られる慢性肉芽腫症の乳児肺炎症例から *Rasamsonia piperina* の分離に成功し、論文を公表した。また、新生児の *Aspergillus fumigatus* による髄膜炎・脳室炎症例に対して、血中と髄液中のポリコナゾール濃度を経時的に測定することで、適切な治療を行うことが出来た症例を経験し、論文公表した。本年は、別の新生児侵襲性アスペルギルス感染症症例から分離された *Aspergillus fumigatus* 株と上記髄膜炎・脳室炎症例の分離株についてSTRs（microsatellite）解析を実施したが、異なる株と判断された。いずれの症例も、超早産・超低出生体重児で、皮膚症状を初発症状としており、新生児集中治療室（NICU）の管理方法、環境中の真菌に関する調査を行うことを計画している。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ものである。

This project aims to cope with the intractable fungal disease, aspergillosis, particularly in elderly, by investigating the epidemiology, exacerbating factors and obstacles for treatment such as drug resistance. Fungal infections in neonates have been an unexplored field of investigation, and is another target of this project.

The development of azole-resistance among *Aspergillus fumigatus* has become a growing serious threat. Mutation in Cyp51A is known to be one of the critical mechanisms of azole resistance in *A. fumigatus*, but a significant number of resistant isolates show no mutation in the gene.

Using the CRISPR/Cas9 system, we showed that mutations in HMG-CoA reductase genes have a significant role in the resistance. We also found that another mutation concerning lipid metabolism may also be engaged, and further analysis is now underway.

The investigation into the mechanism of the development of aspergillosis is critical to prevent its exacerbation. To this end, we have been analyzing proteins in the fungal cell wall as candidates for exacerbation. This year, we clarified how the fungal cell wall proteins interact with the host's innate immune system. (in preparation for submission).

Through collaboration with Keio University and some other major domestic hospitals, we found that the rate of azole-

resistant isolates was significantly higher among patients who received azoles than those who did not. We are carrying out further analysis on the detail of the resistant isolates.

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. Based on this background, we reported the utilize of gastric aspirate fungal culture for the diagnosis of infantile fungal pneumonia caused by *Rasamsonia piperina*. We also reported neonatal meningitis and ventriculitis caused by *Aspergillus fumigatus*. The continuous monitoring of serum and cerebral fluid voriconazole concentration was useful for the appropriate treatment of this severe case. In this year, we analyzed another *Aspergillus fumigatus* strain isolated from neonatal invasive deep-seated mycosis. We compared above two strains using STRs analysis and found two strains were different in background. This fact indicates environmental fungal survey in neonatal intensive care unit is needed for preventing deep-seated mycosis in extremely premature and low birth weight infant. Above study results gave us the important information for the establishment of diagnosis, and treatment for aspergillosis and the other mycoses in neonate patients.

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

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

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

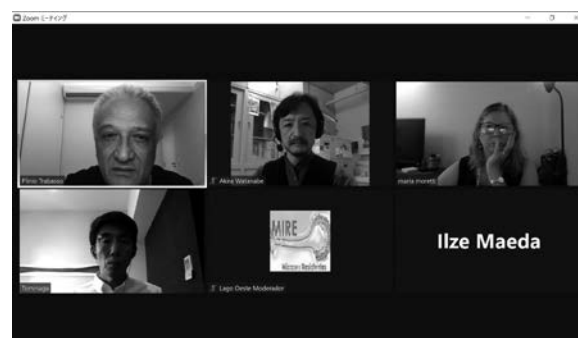
“The establishment of a research and reference collaborative system for the diagnoses of
fungal infections including drug-resistant ones in Brazil and Japan”

真菌感染症患者数は近年増加の一途をたどっている。その背景として、免疫抑制薬の投与、造血幹細胞移植や固形臓器移植を受けている等による全身的免疫低下患者、また慢性肺疾患（肺結核症や肺気腫など）を基礎疾患に有する患者等の局所的免疫低下患者などが増えており、そのような患者の発症頻度が高いことが挙げられる。さらに新型コロナウイルス感染症（COVID-19）患者に合併した深在性真菌症症例が多数報告され、ますます重要視されている。一般に深在性真菌症は難治で致死率が高いことが知られており、その意味で、真菌感染症のインパクトは医療分野のみならず社会的にも極めて高いと言える。

さらに加えて近年、ヨーロッパ諸国を皮切りに抗真菌薬に対する耐性を有した多種多様な真菌が問題となりつつある。2019年、米国CDCは、最も差し迫った脅威となる5種の微生物のうちの一つに薬剤耐性真菌をリストアップした。薬剤耐性真菌の出現、増加は疾病の難治化、致死率の上昇に直結することが予想される。実際、薬剤感性真菌による感染症よりも薬剤耐性真菌による感染症の方が致死率が高いとの報告もある。一方で、ブラジルを含めた南米での状況はほとんど調査されておらず、不明のままであったため、その早急な実態解明はまさに社会的要請である。

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

今般のCOVID-19の世界的な蔓延のため、遠隔ビデオシステムを用いた研究ミーティングや実験手技共有を積極的に行っている。



これまでに、ブラジルでの臨床検体から検出された真菌のうち、最も重篤な感染症を引き起こす *Aspergillus fumigatus* 株をもちい、アゾール系抗真菌薬の標的である Cyp51A の遺伝子変異の解析を行い論文として発表した。一方で我が国においては薬剤の標的遺伝子の変異パターンが欧州及びブラジルとは大きく異なることをすでに我々は見出している。すなわち、抗真菌薬耐性のメカニズムは国や地域によって異なる可能性が示唆され、耐性遺伝子検出法を開発するうえで国情を考慮すべきであることが確認された。

以上のようなブラジルの状況を踏まえ、耐性遺伝子検出法の開発を開始している。ブラジルで検出された遺伝子変異タイプの耐性株を用い、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法による検出法を確立した。この知見については現在論文準備中である。さらに環境における耐性菌の状況を把握するため、園芸用の植物球根から検出される

真菌について、薬剤感受性試験及び耐性遺伝子の解析を行い論文として発表した。また近年抗真菌薬耐性が問題となっている *Candida glabrata* の臨床分離株について、その耐性メカニズムについて解析を行い、論文発表を行った。

ブラジル国内の研究ネットワークのツールとして導入した、REDCap (米国 Vanderbilt 大学が開発したデータ集積管理システム) を基盤とした真菌症の症例データベースは、多施設共同で真菌症の症例が集積されつつあり、これまでに200症例を超える症例数が登録されている。



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

The number of fungal infections has been increasing in recent years because of clinical practice advances such as hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation. Also, patients with chronic lung disease (pulmonary tuberculosis, COPD, and others) are generally susceptible to pulmonary fungal infection. Recently, many cases of invasive fungal infection in COVID-19 patients have been reported, and researchers put considerable emphasis on fungal infections. In general, fungal infections are refractory diseases, and their mortality is high. In these aspects, the impact of fungal infections is too high, not only in the medical field but also in society.

Recently, various fungi possessing resistance to antifungals have become a severe problem. In 2019, CDC in the US had listed drug-resistant fungi as one of the five “urgent threats.” The emergence and increase of drug-resistant fungi are expected to lead to refractory disease and increased mortality directly. It has been reported that infections caused by

drug-resistant fungi have a higher mortality rate than the ones caused by drug-sensitive fungi. However, South America, particularly in Brazil, has been little investigated and remains unclear. Given these situations, this project was started between the Medical Mycology Research Center, Chiba University, and the University of Campinas.

Due to the COVID-19 pandemic worldwide, we are actively conducting research meetings and sharing experimental procedures using remote video systems. Using clinical strains of *Aspergillus fumigatus* isolated in Brazil, we analyzed the gene coding Cyp51A (target of azole antifungals) and reported it as the first paper in Brazil.

On the other hand, we have already found that mutation patterns of drug target genes in Japan are significantly different from those in Europe and Brazil. In other words, it was suggested that the mechanism of antifungal drug resistance might differ depending on the region/country, and it was confirmed that each situation should be considered when developing a method for detecting a resistance gene.

We are developing resistance gene detection methods based on LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification). Using several resistant strains, we partially established the detection method by LAMP. A manuscript regarding this study is in preparation. Furthermore, we analyzed resistant fungal strains isolated from several horticulture plant bulbs and published these data to know the situation on antifungal resistance of environmental fungi. Besides, we examined clinical isolates of *Candida glabrata*, whose antifungal resistance is becoming an emerging issue worldwide, and have reported their antifungal susceptibilities and genetic analysis on the antifungal mechanisms.

As a research network tool in Brazil, REDCap®, a system for data collection and management developed by Vanderbilt University, was introduced to the University of Campinas. Several medical institutions in Brazil have participated in a multi-center database of mycosis cases, and more than 200 cases have already been enrolled.

Besides, using this consortium, a bio-resource bank for fungal strain has been established, and the fungal preservation was already started. The strains to be preserved will include clinical isolates and environmental isolates (from the soil, air, plants, water).

COVID-19パンデミックに対する海外支援活動：

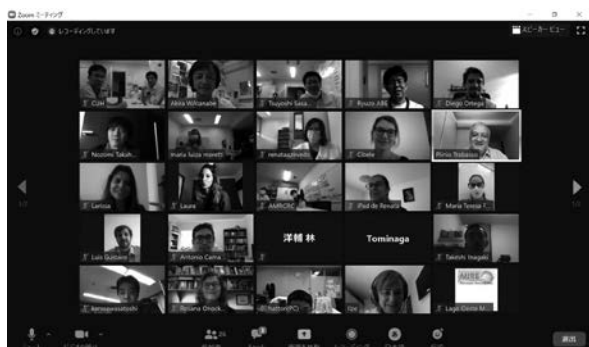
COVID-19対策強化に向けた日伯合同症例カンファレンス及び
ブラジルにおける COVID-19検査拡大のためのパートナーシップ

Oversea support activities for COVID-19 pandemic:

Japan-Brazil Clinical conference on COVID-19 cases
and Partnership for Accelerating COVID-19 Testing in Brazil (PACT Brazil)

2020年12月現在、ブラジルは世界第3位のCOVID-19感染者数、第2位の死亡者数を記録し、深刻な状況が続いている。

当センターは平成29年よりAMED/JICAの支援の下ブラジルのサンパウロ州立カンピーナス大学 (UNICAMP) との薬剤耐性真菌についての地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) を実施しているが (34ページ)、今般のブラジルの深刻なCOVID-19感染状況を踏まえたJICAからの要請により、本SATREPSで培った両国間の交流関係を基盤とした、日本・ブラジル両国におけるCOVID-19診療・対策強化に向けた合同カンファレンスを、遠隔会議システムを利用して本年6月より開始した。



当センター臨床系教員による呼びかけにより、本カンファレンスにはこれまでにSATREPSに関わっていた研究者らに加えて、国立国際医療研究センター病院国際感染症センターの医師、薬剤師、千葉大学医学部附属病院感染症内科、集中治療部、精神神経科、小児科の医師、看護師らと、UNICAMP 附属病院の様々な診療科の医療スタッフが参加している。これまでにCOVID-19重症例

の検討、血栓症を含めた合併症への対応、メディカルスタッフのメンタルケア、COVID-19後遺症、小児科領域におけるCOVID-19等のテーマについて活発な討論が行われ、12月までに計11回開催された。

また、このプロジェクトの実施機関である千葉大学、UNICAMP、JICA 専門家、栄研化学株式会社 (栄研化学) による産官学連携により、栄研化学が開発した新型コロナウイルス検出試薬 “Loopamp (TM) SARS-CoV-2 Detection Kit” の性能評価試験をブラジルにて実施することとした。この取組みにあたり、JICA、UNICAMP、栄研化学、千葉大学は四者覚書「ブラジルにおける新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 検査拡大のためのパートナーシップ (PACT Brazil: Partnership for Accelerating COVID-19 Testing in Brazil)」を締結し、11月に調印式を行った。



本取り組みがブラジルのみならず日本におけるCOVID-19診療体制の強化につながる重要な一歩となることが期待されている。

As of December 2020, the third-highest number of

COVID-19 patients and the second-highest number of deaths worldwide are recorded in Brazil. The situation in the country continues to be serious.

Since 2017, MMRC has been implementing the Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) program for drug-resistant fungi with the University of Campinas (UNICAMP) in Brazil under the support of AMED/JICA (page 34). In the light of these serious situations in Brazil and based on a request from JICA, the joint clinical conference on COVID-19 between Japan and Brazil was started in June using a video conference system. This conference lies at the foundation of the relationship developed through the SATREPS project, and we are aiming to strengthen COVID-19 management and countermeasure in both Japan and Brazil.

In addition to the researchers who have been involved in the SATREPS project, medical doctors, infection nurses, and pharmacists at the National Center for Global Health and Medicine, Chiba University Hospital (Department of Infectious Diseases, Intensive care Unit, Psychiatry and Neurology, and Pediatric) and medical staff from various

clinical departments of UNICAMP Hospital are attending the conference. We have already held the conferences 11 times and vigorously discussed “severe COVID-19 cases”, “management of COVID-19 complications including systemic thromboembolism,” “mental health care for medical staff,” “persistent symptoms after acute COVID-19,” and “pediatric COVID-19 cases.”

Based on the research consortium, Chiba University, the University of Campinas, Eiken Chemical Co., Ltd. (Eiken), and JICA have launched an international joint research project. This project aims to evaluate the performance of Loopamp™ SARS-nCoV-2 detection kits, which Eiken developed in Brazil. In November, a launching ceremony brought together JICA, UNICAMP, Eiken, and Chiba University on a video conference system, and a Memorandum of Cooperation on Partnership for Accelerating COVID-19 Testing in Brazil (PACT Brazil) was exchanged. It is expected that this initiative will be an essential step leading to the strengthening of COVID-19 management not only in Brazil but also in Japan.

感染症研究革新イニシアティブ (J-PRIDE)

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

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

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

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* have not been fully elucidated yet. Of critical importance is further understanding of the mechanisms behind infections with *A. fumigatus*. In this project, we addressed the quantitative effect of environmental conditions related with adaptation in *A. fumigatus*. We explored the statistical modelling framework to decipher the phenotypic heterogeneity of *A. fumigatus*. We utilize both clinical isolates and strains obtained by experimental evolution to derive and validate the model, where phenotypic heterogeneity can be explained by transcriptome data.

千葉大学グローバルプロミネント研究基幹・ リーディング研究育成プログラム

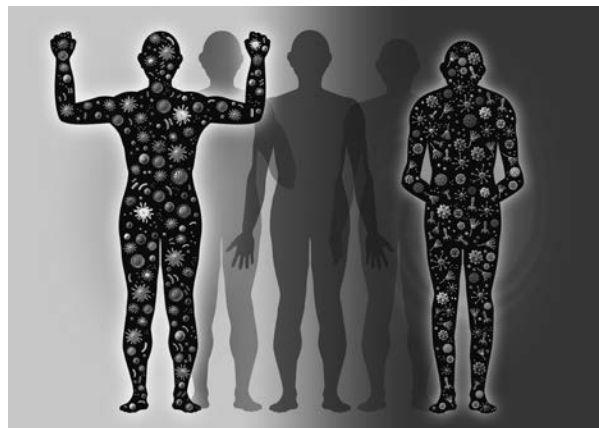
「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」

Leading Research Promotion Program, Institute for Global Prominent Research

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

千葉大学では、学内での研究の核となる新たな研究グループの創出を目指す「グローバルプロミネント研究基幹」を設置しており、当センター教員が中心となった研究プロジェクト「“超個体”の統合的理解に基づく次世代型「感染制御学」研究推進拠点」が、リーディング研究育成プログラムに採択され、活動を実施している。本プログラムでは、感染免疫分野の教員が中心となり、医学研究院、薬学研究院、附属病院の研究者と連携し、共生微生物と宿主である個体の免疫システムとの相互作用、そこへ侵入する病原体による恒常性の破綻と感染症の発症機序などについての基礎研究を、皮膚、呼吸器、消化器など各種器官でのモデル実験系を用いて解析し、そこから得られる成果を統合的に理解することで、感染症・免疫制御の分子メカニズムを明らかにする次世代型の「感染制御学」を創出し、我々の健康維持と感染症などの克服へつながる新規イノベーション創生を目指している。また、2020年1月には、本プログラムメンバーである後藤准教授を中心に、微生物叢と宿主免疫制御をテーマにした感染症グローバルネットワークフォーラム2019を開催した。

The research group, composed of the researchers in MMRC, School of Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and University Hospital, was selected as the Leading Research Promotion Program of Chiba University. The members focus on the understanding of molecular interactions between hosts and microbes, especially commensal fungi and bacteria, using the model assay systems targeting the skin, respiratory, and digestive organs. The members aim to reveal the molecular machinery underlying the disruption of homeostatic balance in the hosts by invasive pathogens, which induce infectious diseases. The findings obtained from the project will help to create innovative achievements in therapeutics of infectious diseases and lead to the improvement of human health. In January 2020, “The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity; Microbiome” was organized by Associate Prof. Yoshiyuki Goto, a member of this program.



2019年度 共同利用・共同研究報告

2019 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

研究課題 '19-1

microRNAを介したウイルス応答の制御によるヒトの新しい生体防御機構の解析

程久美子・高橋朋子

(東京大学大学院理学系研究科)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of human defense system via microRNA-regulated viral response

Kumiko Ui-Tei, Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

ヒトの細胞にウイルスが感染すると、ウイルスセンサータンパク質がウイルス特有の構成成分を認識しI型インターフェロン (IFN) の発現を誘導する。細胞内ウイルスセンサータンパク質の1つであるLaboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) は、IFNの誘導に必要なシグナル伝達に関わるタンパク質領域を持たないことから、これまで機能が不明であった。

本研究では、まずセンダイウイルスを感染させたヒト培養細胞において、LGP2が約900倍発現増加すること、また、発現増加したLGP2がRNAサイレンシングの促進因子であるTAR-RNA binding protein (TRBP) と相互作用することで、TRBPが結合する特定のmicroRNA (miRNA) の成熟化を抑制することを見出した。その結果、センダイウイルス感染細胞では、TRBPが結合する特定の成熟型miRNA量の減少が引き起こされた。次にCRISPR/Casシステムにより樹立したヒトLGP2ノックアウト細胞およびTRBPノックアウト細胞を用いて、マイクロアレイによりウイルス感染細胞における遺伝子発

現プロファイルを解析した。その結果、LGP2とTRBPの相互作用を介して、アポトーシスに関与する一連の遺伝子群が発現増加することを見出した。さらにTRBPが制御するmiRNAの一つであるmiR-106bは、イニシエーターカスパーゼを含む複数のカスパーゼを直接的または間接的に制御しており、TRBP結合miRNAの機能制御を介して、ウイルス感染細胞の細胞死が誘導されることを明らかにした。本研究により明らかとなったウイルスセンサータンパク質がmiRNAを介して細胞死を誘導する仕組みは、ウイルス感染細胞における新しい生体防御機構として機能していると考えられる。本研究の成果は、抗ウイルス治療や、近年臨床応用への期待が非常に高い核酸医薬開発への応用が期待される。

発表論文

- 1) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K: LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection. *Nucleic Acids Res* 48: 1494-1507, 2020.
- 2) Takahashi T, Ui-Tei K: Mutual regulation of RNA silencing and the IFN response as an antiviral defense system in mammalian cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21: E1348, 2020.

研究課題 '19-2

真菌感染防御におけるLTi-like細胞の機能解析

澤新一郎

(九州大学生体防御医学研究所)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

The role of LTi-like cells in the regulation of fungal infection

Shinichiro Sawa

(Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Lymphotoxin (LT) α はパイエル板や腸管膜リンパ節など、2次リンパ組織の形成や上皮バリアの維持に重要な役割を果たすTNFファミリーサイトカインである。これまで、LT α は自然リンパ球の一種である、Lymphoid Tissue inducer (LTi) 細胞に強く発現することが知られていたが、真菌感染症における免疫応答、特にLTi細胞やLTi細胞が発現するLT α の役割は明らかとなっていない。

本研究では、LT α 発現細胞を可視化するためにCRISPR/cas9ゲノム編集技術を用い、Lta遺伝子開始コドン直下にtetracycline transactivator (tTA) 遺伝子をノックインした遺伝子改変マウスを樹立し、Lta-tTAマウスをLC-1マウス、Rosa26tdTomatoマウスと交配し、3重変異マウスを作出することで、LT α を発現する細胞をDoxycycline依存的に標識、追跡することを目指した。

本年度はBacterial artificial chromosome (BAC) DNAからマウスLta遺伝子開始コドン上流1 kb、下流1 kbのクローニングを行った。さらに、tTA遺伝子とタンデムに結合したコンストラクトLta-ttAを作成し、プラスミドを精製した。現在は、CRISPR/cas9ゲノム編集技術を用いたマウス胚相同組換えの準備を進めている。本年度内で遺伝子改変マウスの作製には至らなかったが、引き続き遺伝子改変マウスの作製および真菌感染時におけるLTi細胞の免疫学的な意義の解明を目指し、共同研究を進める計画である。

研究課題 '19-3

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。2019年度では、CRISPR/cas9ゲノム編集技術による変異導入のためのプラスミドベクターを改良し、プラスミドライブラリの作製に着手した。

昨年度まで、CRISPR/cas9ゲノム編集技術を *A. fumigatus* で応用し、次世代シーケンサーと組み合わせたCRISPRスクリーニングを行うことによって、血清存在下の生育に必須と予想される遺伝子の取得を試みていた。本年度は、ライブラリ作製の効率を上げるために、プラスミドサイズの縮小とハイグロマイシン耐性マーカーへの置換を行った。分生子の緑色の色素生産を担う *pksP* 遺伝子への変異導入による色素の消失を指標として、改良ベクターの変異導入効率を比較したところ、従来のベクターと同等の変異導入効率であったことを確認できた。また、CRISPRライブラリに挿入する変異導入標的配列として、Af293株のゲノム配列にコードされていると予想される全9,840遺伝子のうち9,807遺伝子について設計し、pooled oligo DNAを合成した。今後、改良ベクターと合成したpooled oligo DNAを用いて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。

研究課題 '19-4

Aspergillus fumigatus のガラクトマンナン合成酵素の機能解明

岡 拓二

(崇城大学応用微生物工学科)

田中 大・柴田信之

(東北薬科大学感染生体防御学研究室)

渡辺 哲・萩原大祐・亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Functional analysis of the enzymes involved in galactomannan biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*

Takuji Oka

(Department of Applied Microbial Technology, Sojo University)

Yutaka Tanaka, Nobuyuki Shibata

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

Akira Watanabe, Daisuke Hagiwara, Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

糖鎖は一般的に細胞外や細胞の表層に局在することから、病原性真菌の「宿主細胞と最初に接触する分子」であると言える。このことから細胞表層の糖鎖は、病原性真菌の感染機構や毒性の発揮に関与していると考えられている。ガラクトマンナン (GM) は、 β -(1 \rightarrow 5)- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトフラノース残基と α -(1 \rightarrow 2)- α -(1 \rightarrow 6)-マンノース残基で構成される糖鎖であり、糸状菌細胞壁の最表層を覆っている。GMには2種類が知られており、1つは、真菌型ガラクトマンナン (FTGM) と呼ばれ、もう1つは、O-マンノース型ガラクトマンナン (OMGM) と呼ばれる。GMは子囊菌門のうちチャワンタケ亜門に属する菌種のみが有する糖鎖で糸状菌の正常な生育に必要不可欠である。また、ヒトを含む脊椎動物

や植物には存在しないため、GMの生合成を阻害する化合物は副作用のない新規な抗真菌薬となることが期待されている。我々は、以前の研究により GfsA が β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース鎖の生合成に関与する β -ガラクトフラノシド β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノシルトランスフェラーゼであることを明らかにした。しかしながら、 Δ *gfsA* 株においても GM 中の β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース残基が残存することから他の β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノシルトランスフェラーゼの存在が示唆されていた。本研究では、*Aspergillus fumigatus* の β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース鎖の生合成の全貌を明らかにした。*A. fumigatus* には、GfsB と GfsC の2つのパラログが存在している。生化学的および遺伝学的分析により、GfsB と GfsC は、GfsA と同様に β -ガラクトフラノシド β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノシルトランスフェラーゼであることが明らかになった。また、高効率なガラクトフラノース転移酵素活性測定法の開発を行った。開発した酵素活性測定法を用いて *in vitro* における GfsA, GfsB, および GfsC のガラクトフラノース転移活性を検出したところ、それぞれ7個、3個、および5個の長さの β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノシルオリゴマーが合成されることが明らかになった。さらに、 Δ *gfsB* 株、 Δ *gfsC* 株、 Δ *gfsAC* 株、および Δ *gfsABC* 株から抽出した GM の構造解析により、GfsA および GfsC が FTGM および OMGM のすべての β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース残基を合成することを明らかにすることができた。一方、GfsB は *in vivo* では、ほとんど機能していないことが明らかになった。さらに、 β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース糖鎖の欠失は、菌糸成長速度と分生子形成能力を低下させ、異常な菌糸分岐構造と細胞表面の疎水性を増加させた。しかしながら、抗真菌剤に対する感受性と感染マウスへの毒性には影響しなかった。

本研究は1930年代にその構造が明らかにされてから長らく不明であった糸状菌の β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース残基の生合成の全貌を明らかにしたものである。糸状菌の細胞壁形成プロセスは非常に複雑であり、糖転移酵素に関する知見はその理解に不可欠なものである。 β -(1 \rightarrow 5)-ガラクトフラノース糖鎖生合成の理解により、病原性糸状菌の複雑な細胞壁構造の形成と毒性に関する重要な新しい洞察が得られることが期待される。

発表論文

- 1) Chihara Y, Tanaka Y, Izumi M, Hagiwara D, Watanabe A, Takegawa K, Kamei K, Shibata N, Ohta K, Oka T: Biosynthesis of β -(1 \rightarrow 5)-Galactofuranosyl Chains of Fungal-Type and O-Mannose-Type Galactomannans within the Invasive Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere*, 5 (1). pii: e00770-19, 2020.

研究課題 '19-5

新規手法を用いたアスペルギルス・フミガーツスバイオフィルムの抗真菌薬感受性評価

豊留孝仁

(帯広畜産大学)

八尋真希・亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* biofilm by a newly developed method

Takahito Toyotome

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Maki Yahiro, Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

*Aspergillus fumigatus*のバイオフィルム形成能が近年明らかとなり、感染においてどのような役割を果たしているかが注目されている。我々はこれまでに真菌生育ウェル内の除去可能な培地容量からバイオフィルム形成量を迅速かつ簡便に定量する方法を検討してきた。本研究ではこの新たな方法を用いて、バイオフィルム形成前(孢子)および形成後の*A. fumigatus*に対して、抗真菌薬による生育阻害効果を定量的に評価することを試みた。本研究では*A. fumigatus* IFM49896株を用いた。ポリコナゾールおよびアムホテリシンBでバイオフィルム形成前後の*A. fumigatus*への抗真菌効果を定量的に評価することができた。バイオフィルム形成前の*A. fumigatus*に対してはポリコナゾール0.063 μ g/mL存在下で90%以上の生育阻害が見られた。一方、バイオフィルム形成後の

*A. fumigatus*生育はポリコナゾール0.125 μ g/mL存在下で抑制された。一方、アムホテリシンBではバイオフィルム形成前の*A. fumigatus*に対しては2 μ g/mL存在下で90%以上の生育阻害が見られたのに対し、バイオフィルム形成後の*A. fumigatus*生育は0.5 μ g/mL存在下で抑制され、アムホテリシンBはポリコナゾールと異なり、*A. fumigatus*孢子よりもバイオフィルムに対して低濃度で有効である可能性が示唆された。一方、すでに形成されたバイオフィルム構造を破壊し得るか検討してみると、本研究で用いた各薬剤の最高濃度(0.5 μ g/mLポリコナゾール, 8 μ g/mLアムホテリシンB)存在下においてもバイオフィルム容量の減少は見られず、いずれの薬剤もバイオフィルム構造を破壊する効果は認められなかった。今後はこの新たな定量方法の一層の確立を進めて、*A. fumigatus*バイオフィルムに有効な薬剤のスクリーニングなどに応用したいと考えている。

研究課題 '19-6

Transcription regulation of antifungal drug resistance and biofilm formation in *Candida glabrata*: 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

Biofilm formation and drug resistance are two key pathogenesis traits exhibited by *Candida glabrata* as a human pathogen. Interestingly, specific pathways appear to be in the crossroad between the two phenomena, making them promising targets for drug development. In this study, the 10 multidrug resistance transporters of the Drug: H⁺ Antiporter family of *C. glabrata* were screened for a role in biofilm formation. Besides previously identified players in this process, namely CgTpo1_2 and CgQdr2, two others are shown to contribute to biofilm formation: CgDtr1 and CgTpo4. The deletion of each of these genes was found to lead to lower

biofilm formation, in both SDB and RPMI media, while their expression was found to increase during biofilm development and to be controlled by the transcription factor CgTecl, a predicted key regulator of biofilm formation. Additionally, the deletion of CgDTR1, CgTPO4, or even CgQDR2 was found to increase plasma membrane potential and lead to decreased expression of adhesin encoding genes, particularly CgALS1 and CgEPA1, during biofilm formation. Although the exact role of these drug transporters in biofilm formation remains elusive, our current model suggests that their control over membrane potential by the transport of charged molecules, may affect the perception of nutrient availability, which in turn may delay the triggering of adhesion and biofilm formation.

発表論文

- 1) Santos R, Cavalheiro M, Costa C, Takahashi-Nakaguchi A, Okamoto M, Chibana H, Teixeira MC. Screening the Drug: H+ Antiporter Family for a Role in Biofilm Formation in *Candida glabrata*. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Feb 4; 10: 29. doi:10.3389/fcimb.2020.00029. eCollection 2020.

研究課題 '19-7

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

柴田信之・佐々木雅人・伊藤文恵・田中 大
(東北医科薬科大学感染生体防御学教室)
知花博治・山口正視
(千葉大学真菌医学研究センター)

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

Nobuyuki Shibata, Masato Sasaki, Fumie Ito,
Yutaka Tanaka
(Tohoku Medical and Pharmaceutical University)
Hiroji Chibana, Masashi Yamaguchi
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

千葉大学真菌医学研究センターにおいて作製された *Candida glabrata* の組み換え体の中から細胞壁糖鎖生合成に関与する各種の遺伝子欠損株について細胞壁の構造および性質の解析を行い、特に大きく変化の見られた *alg6* Δ 株と *mnn2* Δ 株について細胞壁に与える影響を詳細に解析した。細胞壁グルカンはアルカリ可溶性画分、酸可溶性画分、アルカリ・酸不溶性画分に画分解析した。キチンの定量はエルソン・モルガン法により行った。グルカン結合性キラートキシンに対する感受性は増殖阻止円の測定により行った。マンナンの構造解析はアセトリシス, 1H NMR 分析, メチル化分析により行った。細胞壁グルカン層およびマンナン層の形態変化は透過型電子顕微鏡により解析した。

alg6 Δ 株は SDS, Calcofluor white 等の薬剤感受性, β-1, 3-グルカナーゼ感受性が上昇し, TEM でもマンナン層が薄く不鮮明になっていた。しかし, micafungin およびキラートキシンに対する感受性は逆に低下し, キチン含量は野生株の 2 倍以上に増加していた。*alg6* Δ 株はマンナンの構造に変化が見られなかったが分子サイズは低下していた。*mnn2* Δ 株はマンナンの側鎖が失われ α-1, 6-結合の直鎖構造に変化していた。しかし, 薬剤感受性等に著しい変化は見られなかった。千葉大学において実施されたカイコを用いた感染実験の結果, *alg6* Δ 株は野生株と比較して大きく病原性の低下していることが明らかとなった。これらの結果は特に *alg6* Δ 株では細胞壁合成系の酵素活性の低下が生じ, 細胞壁 integrity の低下から病原性の低下につながっていることを示唆している。細胞壁構造の変化が免疫系細胞による認識に影響を与えている可能性も検討している。

研究協力者

川上和義 (東北大学大学院医学系研究科)

研究課題 '19-8

白癬菌が産生する抗生物質とその生合成遺伝子の探索

萩原大祐
(筑波大学生命環境系)
矢口貴志
(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of antibiotics produced by *Trichophyton* and the biosynthetic genes

Daisuke Hagiwara

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

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

世界中で多くの人々が罹患する白癬は、皮膚角質層に感染する真菌である白癬菌が原因となる。高いケラチン分解能が本菌の病原因子として挙げられるが、その他に感染や病態に関わる因子については知見が乏しい。感染部位の皮膚には多数の微生物が常在しており、白癬菌と常在微生物の相互作用が想像されるが、感染への影響については解析されていない。そこで本研究では、白癬菌の産生する二次代謝産物からの抗菌活性を示す化合物を探索し、本化合物の感染過程における機能を明らかにすることを目的とした。

千葉大学真菌医学研究センターが保有する *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* の5菌種をサブロー寒天培地で培養し、培養抽出物を用いて枯草菌に対する抗生物質活性を試験した。その結果、*M. canis*を除く菌株の培養抽出物に活性が認められた。*T. rubrum*において本活性を示す画分を分離精製し、精密質量や評品との比較などから本化合物が viomellein であることを明らかにした。viomellein は、これまでに *Aspergillus ochraceus* や *Penicillium citreoviride* などから産生の報告がある赤色色素化合物であり、肝腎毒性、抗グラム陽性細菌活性、殺虫性などが報告されている。この viomellein 以外にも、xanthomegnin や semi-vioxanthin といった類似の化学構造を有する化合物の産生も認められた。30株の臨床分離株を対象に、上記化合物の産生を確認したところ、*M. canis*を除くいずれの株でも viomellein の産生が認められた。

viomellein の生合成遺伝子の同定を目指し、本化合物の生産条件および非生産条件による培養から *T. rubrum* の RNA を抽出し、RNA-sequencing 解析を実施した。その結果、29個の二次代謝コア遺伝子のうち5つが化合物の産生量に相関した発現パターンを示し、これらのうち2つの PKS 遺伝子が構造的観点から生合成遺伝子の候

補として考えられた。これらの遺伝子が viomellein の生合成に関与しているか、CRISPR/cas9 システムの導入により今後検証を進めていく。

研究課題 '19-9

小児臨床検体由来の主要病原細菌の抗菌薬感受性と薬剤耐性、および病原遺伝子に関する検討

星野 直

(千葉県こども病院感染症科)

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)

Analysis of antimicrobial susceptibility, drug resistance, and pathogenic genes of major pathogenic bacteria derived from pediatric clinical specimens

Tadashi Hoshino

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

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi, Misako Ohkusu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

2010年4月から2018年12月まで、千葉県こども病院で15歳以下の小児患者から分離された TFLX の MIC が 0.5 μ g/mL 以上の、MALDI TOF-MS および遺伝子的にインフルエンザ菌と同定された26株について、キノロン耐性決定領域 (*gyrA*, *parC*) の変異、莢膜型 typing, Bio typing (生物型), MLST 解析を実施した。検出部位は下気道が20株、上気道が4株、血液が1株、中耳浸出液が1株であった。同一患者から検出された同一株と思われる重複株を除いた18患者からの19株についてみると、 β ラクタマーゼ産生については、3株のみ陽性であり、MIC 上、BLNAS は3/19、10/19が BLNAR、3/19が Low-BLNAR、1/19は BLPAR、2/19は BLPACR であった。TFLX については、MIC = 0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL の株がそれぞれ 8、4、7株であった。TFLX の MIC = 0.5 μ g/mL の2株と MIC = 1 μ g/mL の1株を除く16株にキノロン標的部位

にアミノ酸変異を認めた。MIC = 0.5µg/mL の 3 株は *gyrA* の Ser84 に 1 つ、3 株は *gyrA* の Ser84 と *parC* の Ser84 の 2 つの変異を認めた。MIC = 1µg/mL の 3 株は *gyrA* の Ser84 と *parC* の Ser84 の 2 つの変異を認めた。MIC = 2µg/mL の 7 株すべてに *gyrA* の Ser84 と *parC* の Ser84 の 2 つの変異を認めた。MLST 解析結果や、患者の居住地から、すでに変異の入った株が広がっている可能性も示唆され、MIC = 2µg/mL の株の中には血液由来の株も含まれており、TFLX の前投与はなく、注意を要すると思われた。

この他、小児保菌由来インフルエンザ菌 e 型株の解析と小児市中肺炎喀痰由来株のインフルエンザ菌・肺炎球菌株の血清型、薬剤感受性試験等を実施し、報告した。

発表論文

- 1) Hoshino T, Takeuchi N, Ohkusu M, Hachisu Y, Hirose S, Fukasawa C, Kubota T, Ishida M, Watanabe H, Oishi K, Ishiwada N. Identification of *Haemophilus influenzae* serotype e strains missing the *fucK* gene in clinical isolates from Japan. J Med Microbiol. 2019; 68: 1534-9.
- 2) Takeuchi N, Naito S, Ohkusu M, Abe K, Shizuno K, Takahashi Y, Omata Y, Nakazawa T, Takeshita K, Hishiki H, Hoshino T, Sato Y, Ishiwada N. Epidemiology of hospitalized paediatric community-acquired pneumonia and bacterial pneumonia following the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in the national immunization programme in Japan. Epidemiol Infect. 2020 Apr 17; 1-53. doi: 10.1017/S0950268820000813.

研究課題 '19-10

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

野中健一

(北里大学北里生命科学研究所)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

Kenichi Nonaka

(Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

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

陸上由来糸状菌(土壌糸状菌・冬虫夏草類・昆虫腸管生息菌類・菌寄生菌類・植物表在菌類・植物内生菌類) 840 株を 4 種の培地で培養した糸状菌培養液 3,360 サンプルを利用し、ペーパーディスク法で抗真菌活性物質の探索を行った。

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

2 次スクリーニングを通過した 18 株の内 *Chaetomium globosum* FKJ-0196 株 (トカラ列島沖深海), *Trichoderma* sp. FKJ-0225 株 (相模湾深海), *Penicillium macrosclerotiorum* FKJ-0285 株 (相模湾深海) および *Aspergillus cejpaii* FKJ-0334 (相模湾深海) の計 4 株の再培養を行った。これらの培養物から活性物質の単離・構造解析を行った結果、新規ペプチド系化合物が 1 成分, Xanthocillin を始めとする既知化合物が 6 成分を活性成分として取得した。

研究課題 '19-11

日本産スエヒロタケ臨床分離株のゲノム解析

松前ひろみ・今西 規

(東海大学医学部分子生命科学)

浅野浩一郎

(東海大学医学部呼吸器内科)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Genome analysis of *Schizophyllum commune* isolated from clinical samples in Japan

Hiromi Matsumae, Tadashi Imanishi

(Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University)

Koichiro Asano

(Division of Pulmonary Medicine, Tokai University School of Medicine)

Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

環境真菌のスエヒロタケは、同時に古典的な発生等のモデル生物として利用されてきた歴史をもつ。それ故に欧米の環境分離株のゲノムが解読されているが、遺伝的な地域差が著しく、その多様性は遺伝子のアミノ酸領域にまで及んでおり、これまで調べられている生物種で最も種内の多型が多いとされている。つまり、仮に海外で有効な薬剤療法が発見されても、日本の患者から分離される株には有効でない可能性も考えられる。そこで基礎的背景として (1) 日本と欧米のスエヒロタケの集団遺伝学に基づきゲノムの違いを分析する (2) 発病に寄与する遺伝領域を探索する目的で臨床分離株と環境分離株の遺伝的差異を分析する、という二つの課題を設定した。2019年度は、日本のスエヒロタケの次世代シーケンサー (NGS) を用いた全ゲノム解析を行うことを目的とした実験系の構築を行った。当初、代表者の所属研究室で使用していた微生物叢解析のDNA抽出法を試みたが、細胞壁の破壊、夾雑物の除去、DNA量が課題となった。そこで千葉大にて臨床分離株11株を複数の培養条件で大量培養を行って貰った。最終的に共同研究先・横浜市立大学にて、植物や真菌のNGS解析で実績のある手法を用い、一部の臨床分離株の高品質なゲノムDNAを得た。予備解析として、臨床分離株2株を2種類のNGS (イルミナ・NextSeqおよびナノポア・MinION) で解析した所、いずれもスエヒロタケのゲノムサイズに対してカバレッジが100x以上となる十分なリード配列を得ることができた。特にDNA抽出物に夾雑物が含まれると

シーケンシングが阻害されるMinIONでデータを得られたことには一定の意義があり、今後の解析に弾みがあった。この2株は今後データ解析を進めてゆく。残りの株は、コロナウイルスの感染拡大に伴い年度末の実験が中止されたため、2020年度にDNA抽出とNGS解析を進める予定である。

研究課題 '19-12

腸内微生物により構築される粘膜免疫システムの解明

佐野晃之

(イリノイ大学シカゴ校)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

Understanding the roles of intestinal immune systems orchestrating by gut microorganism

Teruyuki Sano

(University of Illinois at Chicago, Collage of Medicine, Department of Microbiology and Immunology)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本研究は、健常人及び腸内環境が関係する免疫疾患を発症する患者個人でどのような微生物が検出されるかを解析し、これらの微生物が免疫細胞にどのように影響を及ぼすか無菌マウスを用いて解析することを目的とした。はじめに、ヒト糞便の大規模なスクリーニングの条件検討を行うため、健常人3人から糞便を入手し、無菌マウスに経口投与した。4-6週間後、ヒト糞便中に存在したヒト腸内細菌がどれくらいの頻度で、種の異なる無菌マウス内で定着するかを16s Sequenceにより解析した。Operational taxonomic unit (OUT) ではヒト糞便中に存在したヒト腸内細菌のうち約75%が無菌マウス内で安定に定着することがわかった。また最も多いマウスでは104種の異なるOUTで示されるヒト腸内細菌が定着していた。また同時に、ヒト糞便を飲ませたマウスから大腸粘膜固有層の免疫細胞を回収し、どのような免疫細胞

が大腸内で分化誘導されたかを Multi-color flow cytometry を用いて解析した。テストした全ての健常者由来の糞便を飲ませたマウスで ROR γ t 陽性 Th17 細胞の分化誘導が観察された。また ROR γ t Foxp3 両陽性の制御性 T 細胞細胞や ROR γ t 陽性自然リンパ球の誘導及び活性化も観察された。この結果からヒトの糞便に含まれるヒト腸内細菌の大部分は無菌マウスにおいて安定的に定着し、さらにマウスの種々の免疫最奥の分化誘導や活性化を促進できることがわかった。

また、ヒト糞便検体の数及び種類を増やすため、UIC Institutional Review Board (IRB) の許可を取得し、UIC 内で健常人の糞便のストックを開始した。また関節リウマチなどの膠原病を発症する患者及び日本における健常人コントロールの糞便を入手するため、京都大学の橋本求博士と共同研究を開始し、京都大学関連病院で膠原病を発症する患者の糞便のストックを開始した。

研究課題 '19-13

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

名木 稔

(国立感染症研究所)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Identification of promotor regions of *CgATG32* in *Candida glabrata*

Minoru Nagi

(National Institute of Infectious Diseases)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

病原真菌 *Candida glabrata* は鉄欠乏下でミトコンドリア選択的オートファジー (マイトファジー) を活性化させるが、その活性調節機構は不明である。鉄欠乏下で発現量が増加し、マイトファジーに必須である ATG32 に着目し、ATG32 の発現調節機構を解明することを本研究の目的とした。2018 年度において、PCR によって様々な長さに調

整した ATG32 の上流領域を用いてレポーターアッセイを行い、ATG32 の発現調節に関与する領域を探索した結果、鉄依存的リプレッサーの結合領域を同定した。2019 年度は、同定された領域を含むプロンプに鉄依存的に結合するタンパク質を質量分析 (LC-MS/MS) によって複数同定した。現在、各候補タンパク質の遺伝子破壊株を作製し、ATG32 発現調節における役割を調べている。

研究課題 '19-14

サルモネラ全身感染制御における腸内細菌叢の影響

高屋明子

(千葉大学大学院薬学研究院)

後藤義幸・山本友子

(千葉大学真菌医学研究センター)

Effect of gut microbe on *Salmonella* systemic infection

Akiko Takaya

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University)

Yoshiyuki Goto, Tomoko Yamamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Clostridium butyricum の有する腸管病原性細菌感染に対する抑制効果は広く知られた事実であるが、サルモネラ属細菌等の細胞寄生性細菌による全身感染症並びに持続感染症発症における感染制御作用については、いまだ不明である。そこで、プロバイオティクス効果を発揮する *C. butyricum* (Cb) 株がサルモネラの全身感染及び持続感染成立に影響する可能性について検討した。Cb を投与したマウスにサルモネラ病原性株を腹腔内投与したところ、Cb 非投与群と比較して、腹腔内特異的マクロファージの消失が遅くなることが示唆された。詳細な解析の結果、腹腔内マクロファージがサルモネラを貪食後、腹腔から大網に移動し、脾臓などへのサルモネラ移行に寄与していることを見出した。細胞内寄生性を有するサルモネラは、脾臓等のミエロイド細胞内で生存して長期にわ

たる持続感染を引き起こすことから、Cbによるプロバイオティクス効果は、サルモネラの全身伝播を抑制する可能性を考えた。我々が構築したサルモネラ *lon* 欠損弱毒株は、マウスに長期にわたり持続感染する。そこで、*lon* 欠損弱毒株持続感染成立におけるプロバイオティクス効果の影響について検討した。感染 7, 14, 21 日目の臓器内菌数を比較したが、Cb 投与により臓器内菌数は変化しなかった。また、各臓器内のミエロイド細胞の分布についても Cb 投与による変化は見出せなかった。以上より、Cb によるプロバイオティクス効果は感染初期のサルモネラ伝播には寄与するものの、感染後期の全身感染成立には影響しない可能性が考えられた。

発表論文

- 1) Takaya A, Yamamoto T, Tokoyoda K.: Humoral Immunity vs. *Salmonella*. Front Immunol. 10:3155. (2020)

研究課題 '19-15

病原性真菌が産生する新規分泌性環状ペプチド群の生理機能解明

梅村舞子

(産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

萩原大祐

(筑波大学生命環境系)

豊留孝仁

(帯広畜産大学獣医学研究部門)

渡辺 哲・亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Biological function analysis of secretory cyclic peptides produced by infectious fungi

Maiko Umemura

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

Daisuke Hagiwara

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

Takahito Toyotome

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

Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

真菌において近年見出された分泌性環状ペプチド生成分因子は、ほぼ全てのカビ・キノコに広く保存されているが、その生存戦略上の機能は未知である。これまで病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* が有する 2 つの同因子について、破壊株を用いてヒト肺上皮細胞への侵入性試験や免疫抑制マウスへの感染性試験を行ってきた。うち 1 因子について、限定的ながら有意な作用が観察されたが、真菌病原性における決定的な役割は不明なままであった。この結果を踏まえ 2019 年度は、*Aspergillus flavus* が産生する 3 つの当該化合物について、プロモーターを強化する等により生産性を向上させた上で化合物を精製し、*A. fumigatus* Af293 および *A. nidulans* A4 株に対する抗真菌活性を試験した。最終濃度 1 mM から 8 段階希釈した化合物を含む培地に孢子懸濁液を添加・培養し、24 時間毎に 72 時間まで 600 nm での吸光度観察を行ったが、どの化合物にも顕著な真菌生育阻害活性は見られなかった。一方、Fungi 界に属する 1461 株のゲノム情報を対象とした詳細な当該因子ドライ解析から、本因子群の有性孢子形成への関与が示唆されたことから、今後、当該化合物の線虫への生理活性を観るとともに、真菌医学研究センター保有真菌株を用いて、有性孢子形成における本因子の影響を検証する予定である。

発表論文

- 1) Umemura M, Kuriwa K, Dao L. V, Okuda T, Terai G: Promoter Tools for Further Development of *Aspergillus oryzae* as a Platform for Fungal Secondary Metabolite Production. Fungal Biol. Biotechnol. 2020, 7, 3.
- 2) Tamano K, Kuninaga M, Kojima N, Umemura M, Machida M, Koike H: Use of the *kojA* Promoter, Involved in Kojic Acid Biosynthesis, for Polyketide Production in *Aspergillus oryzae*: Implications for Long-Term Production. BMC Biotechnol. 2019, 19, 1-10.

研究課題 '19-16

Candida glabrata 遺伝子組み替え体ライブラリーを用いた抗真菌薬シーズの探索

岩月正人・野中健一・大村 智

(北里大学北里生命科学研究所)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

Search for anti-fungal seeds using genetically engineered *Candida glabrata* library

Masato Iwatsuki, Kenichi Nonaka, Satoshi Omura

(IMC, Lab. Head, Microbial Chemistry)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

令和元年度より千葉大学真菌医学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。令和元年度には、600種類の天然化合物コレクション(大村ライブラリー)に対してカンジダ・グラブラータの薬剤高感受性株を用いて生育阻害活性を指標に一次スクリーニングを実施した結果、80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、48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標的分子の同定を行う。

研究課題 '19-17

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・再生医科学研究所)

加藤博己

(ボン大学)

高橋清大

(学習院大学理学部)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

Innate immune responses against pathogen infection

Takashi Fujita

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

Hiroki Kato

(University Hospital of Bonn, Germany)

Kiyohiro Takahashi

(Department of Life Science, Gakushuin University)

Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究では、高等脊椎動物における抗ウイルス自然免疫において重要な役割を担うウイルス感染センサーであるRIG-I-like受容体(RLR)に着目し、それらによるウイルスRNA検知の分子機構と生理機能について継続して解析を行っている。

2019年度の研究では、RLRの下流のシグナルアダプター分子であるIFN- β promoter stimulateo-1 (IPS-1)が、ウイルス非感染時に不活性型で維持されるために必要な分子内ドメインの同定を行った。IPS-1の各種リコンビナント変異体を作成し、活性化の指標である多量体形成をゲルろ過クロマトグラフィーで検討したところ、IPS-1のアミノ酸180~349の領域が、自己抑制ドメイン(AD)として機能し得ることを明らかにした。また、IPS-1を介したシグナル伝達に必須なcaspase recruitment domain (CARD)とADを結合させた変異体において、

量ドメインをプロテアーゼで強制的に切断することにより、自己抑制が解除されたことから、IPS-1の活性化に分子内相互作用を介した自己活性化の抑制の分子機構があることが示唆された。さらに、ADを欠失したIPS-1はIFNレポーターの活性化を増強したことから、ADがIPS-1を介した抗ウイルスシグナル活性化の調節に重要な役割を果たすことが示唆された。上記の成果について、以下の論文にて報告した。

発表論文

- 1) Takahasi K, Onomoto K, Horiuchi M, Kato H, Fujita T, Yoneyama M: Identification of a new autoinhibitory domain of interferon-beta promoter stimulator-1 (IPS-1) for the tight regulation of oligomerization-driven signal activation. *Biochem Biophys Res Commun* 517: 662-669, 2019.

研究課題 '19-18

Bacterial analysis of *S. pneumoniae* isolated from pediatric invasive disease in Yogyakarta

Eggi Arguni

(Department of Child Health, Faculty of Medicine, Public Health and Nursing Universitas Gadjah Mada, Indonesia)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

The purpose of the research is to observe invasive pneumococcal disease (IPD) incidence, serotype distribution, and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from pediatric IPD patients in Yogyakarta, Indonesia. This study will be act as baseline data of clinical profiles of pediatric IPD in Dr. Sardjito General Hospital in Yogyakarta, Indonesia. Bacterial analysis of *S. pneumoniae* isolates from IPD patients will be performed in Eijkman Institute in Jakarta, the national reference center of *S. pneumoniae* in Indonesia. Dr. Dodi Safari is responsible for the bacterial analysis in Eijkman Institute in Jakarta. This study will be able to estimate the impact of pneumococcal

conjugate vaccine introduction in Indonesia based on the established active surveillance system of pediatric IPD in Japan. In September 2019, Dr. Ishiwada visited to Dr. Sardjito General Hospital and Eijkman Institute, and discussed this research project with Dr. Arguni, Dr. Safari and other collaborators in Indonesia. We confirmed the study design and the tentative schedule of this research project. The study is an observational cohort prospective study. Hospital-based surveillance of pediatric IPD in Yogyakarta is performed and the clinical data of IPD is collected during the study period. *S. pneumoniae* strains are collected from the children with IPD. Samples then will be transferred to Clinical Pathology Laboratory Dr. Sardjito Hospital for specimen culture procedures. Positive *Streptococcus pneumoniae* colonies will be stored and collectively transferred to Eijkman Institute for further genotyping and serotyping procedures.

研究課題 '19-19

病原性 *Aspergillus* 属による生分解性ポリマー分解速度の検討とエステラーゼ活性測定

山本章太・長谷部光泉

(東海大学医学部専門診療学系画像診断学／付属八王子病院画像診断科)

亀井克彦・渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

Digestibility of the biodegradable polymer by *Aspergillus* spp. and esterase activity

Shota Yamamoto, Terumitsu Hasebe

(Department of Radiology, Tokai University Hachioji Hospital, Tokai University School of Medicine)

Katsuhiko Kamei, Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本年度は、*A. fumigatus*を用いて実験を行った。ポリカプロラクトン(分子量15,000及び45,000)とポリ乳酸(分子量220,000)のペレットを卓上型ホットプレス機で圧力350kgf/cm²、温度75度で加圧成形し、急冷して厚さ

150umのシートを作製する。そこから長さ50mm, 幅50mmに切り出し試験片を作成した。分光光度計で菌量を調整した*A. fumigatus*と試験片と滅菌蒸留水20mlをスクリー管瓶に入れ, 恒温振盪水槽(37度)に留置し設定日数での試験片の乾燥重量と破断強度を確認した。ポリ乳酸の試験片では10日目までに2%の分子量減少を認め, 破断速度は試験前と比較して50%に減少した。ポリカプロラクトンの試験片では10日目までに5%の分子量減少を認め, 破断速度は試験前と比較して20%に減少した。ポリ乳酸は結晶性ポリマーであり, ポリカプロラクトンは半結晶性ポリマーである。分解初期の分子量減少が乏しいことから, *A. fumigatus*の有する酵素によって初期には結晶間のタイ分子の切断が起こっているものと推測された。その後はいずれの試験片でもなだらかな分子量減少が見られ, 特に20-40日にかけて急激な分子量減少が認められた。試験前と比較して, 60日後ではポリ乳酸試験片は42%, ポリカプロラクトン試験片は58%の分子量減少が認められた。溶液中の糸状菌数(/cfu)は, ポリ乳酸試験片で40日ごろ, ポリカプロラクトン試験片で20日ごろにピークが認められた。これらの結果より*A. fumigatus*はいずれの生分解性ポリマーも資化する能力があり, 結晶間のタイ分子の強さによって分解速度が異なる可能性が示された。

研究課題 '19-20

室内に分布するダニおよび真菌の増殖に関する研究

橋本一浩・福富友馬

(国立病院機構相模原病院)

矢口貴志・伴さやか

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺麻衣子・高橋治男

(国立医薬品食品衛生研究所)

川上裕司・小田尚幸

(エフシージー総合研究所)

Study on the relativeness of simultaneous growth among mite and fungi in house

Kazuhiro Hashimoto, Yuma Fukutomi

(Hospital Organization Sagami National Hospital)

Takashi Yaguchi, Sayaka Ban

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Maiko Watanabe, Haruo Takahashi

(National Institute of Health Sciences)

Yuji Kawakami, Hisayuki Oda

(FCG Research Institute, Inc.)

研究成果

真菌が室内のダニの増殖に関与することについてのエビデンスを得ることを目的として実験を行った。室内に分布する主な真菌6種(*Candida* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Eurotium* sp. および *Penicillium expansum*)と室内塵における優占種であるコナヒョウヒダニを用いた。また, 真菌が増殖に関与するとの報告があるケナガコナダニを陽性対照として用いた。真菌1種とダニ1種を共培養することでダニの増殖数を評価した。直径1.5cm濾紙をPDAまたはM40Y培地上に置き, 孢子懸濁液を塗抹して, 25℃で7日間培養し, 濾紙上に真菌が生育した真菌濾紙を作製した。真菌濾紙1菌種をガラス試験管に2片ずつ加え, ダニを10-13頭ずつ接種した。試験管上部を通気性のあるフィルムで覆い, 湿度75%・25℃の暗所に静置した。2ヵ月後, 凍結殺虫し, 試験管内に増殖したダニ数を計数した。この操作をコナヒョウヒダニは5回繰り返して実施し, ケナガコナダニは1回実施した。結果, コナヒョウヒダニの平均頭数±S. E. は, *Candida*が 290 ± 79.9 , *Cladosporium*が 33.4 ± 10.0 , *A. fumigatus*が 142 ± 57.6 , *A. versicolor*が 27.4 ± 6.58 , *Eurotium*が 62.6 ± 18.5 , *P. expansum*が 14.6 ± 2.82 , blank(濾紙のみ)が 11.4 ± 2.69 であった。平均値の差を統計学的に比較すると, *Candida*と他6群(真菌5群およびblank 1群)の組合せに有意差が見られたが, *Candida*を除く6群同士の組合せでは有意差は認められなかった(ペリの方法による多重比較, 有意水準 $\alpha = 0.05$)。このことからコナヒョウヒダニは今回供試した6菌種のうち*Candida*に対して特異的に増殖する可能性が考えられた。また, ケナガコナダニの数は, *Candida*が 626 , *Cladosporium*が 596 , *A. fumigatus*が 200 , *A. versicolor*が 223 , *Eurotium*が 60 , *P. expansum*が 188 , blank(濾紙のみ)が3であり, *Candida*の増殖数が最高値となった。寝具のダストからは酵母類が高頻度に検出されることが知られ

ており、*Candida*をはじめとした酵母の存在が、室内塵性ダニにとってより発育しやすい好適条件の一因となっている可能性が示唆された。しかし、カビとダニ増殖の関連性については不明な点が多く、更なる調査データの収集が必要である。

研究課題 '19-21

新規抗菌剤の抗菌活性、体内動態及び薬理評価の研究

椎名 勇

(東京理科大学理学部第一部応用化学科)

亀井克彦・石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

Antibacterial/antimicrobial activity and pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) analysis of a newly developed agent

Isamu Shiina

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

Katsuhiko Kamei, Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

これまで共同研究で、カンジダ、アスペルギルスなどの真菌とMRSAなどの多剤耐性グラム陽性菌に対するユーシェアライド類縁体の発育阻止効果を確認し学会発表ならびに論文発表を実施した。論文発表に関してはプレスリリースを行なった。MIC測定結果と構造活性相関解析結果に基づき、有効性と構造の新規性の観点から、ユーシェアライド類縁体(EU-N)を候補化合物として選定した。2019年度は候補化合物の大量供給法の確立を図るとともに、その代謝安定性の試験を企画した。EU-Nはラセミ混合物(光学異性体の1対1の混合物)であるため、ラセミ混合物のまま試験に供するか、あるいは光学活性体として単品を試験に供するかで薬剤開発の方針が大きく異なる。そこで2019年度は、予め光学活性体をそれぞれ不斉合成し活性試験を実施することとした。実際に、S型の立体構造を有する光学活性

体(EU-NS)を不斉合成し、その活性試験を行なっていただいたところ、EU-Nとはほぼ同一の薬理活性を示すことが分かった。一方、EU-NSの鏡像異性体であるR型の立体構造を有する光学活性体(EU-NR)の全合成は終了間際であり、不斉合成が完了し次第、活性試験を行なっていただく予定である。EU-NS, EU-NR, およびそれらの等量混合物であるラセミ体のEU-Nに大きな薬理活性の違いが見られない場合には、ラセミ体のEU-Nを用いて合成を実施することが最も効率が高いことになり、新規抗菌薬候補化合物を絞り込みが完了する。2019年度は椎名研究室にてラセミ体のEU-Nの大量合成も実施した。この化合物を用いて、薬物動態試験の予備検討を行なったところ、静注投与および経口投与いずれの投与方法を用いても用量依存的に血中にEU-Nが残存することが分かった。また、静注投与の場合には経口投与の100倍程度の血中濃度が観測されることが明らかとなった。

発表論文

- 1) Tonoï T, Inohana T, Sato T, Noda Y, Ikeda M, Akutsu M, Murata T, Maekawa Y, Tanaka A, Seki R, Ohkusu M, Kamei K, Ishiwada N, Shiina I. Total Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 23-Demethyleushearilide and Extensive Antimicrobial Evaluation of All Synthetic Stereoisomers of (16Z, 20E)-Eushearilide and (16E, 20E)-Eushearilide. *Molecules*. 2019 Sep 22; 24(19). pii: E3437. doi: 10.3390/molecules24193437.

研究課題 '19-22

天然化合物ライブラリーを用いた抗真菌薬の開発研究

五十嵐雅之

(微生物化学研究所第2生物活性研究部)

知花博治・佐藤美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Development of antifungal drugs from natural chemical compound library

Masayuki Igarashi

(IMC, Lab. Head, Microbial Chemistry)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

本共同研究は平成29年度より開始し、今回2年度目の報告となる。本研究計画では、微生物化学研究所が保有する放線菌や真菌由来の天然化合物ライブラリーを分与し、千葉大学真菌医学研究センターにおいて、抗真菌活性物質をスクリーニング、得られた抗真菌活性物質についてヒト培養細胞を用いた毒性試験と薬剤標的分子を同定することを目的としている。平成29年度は、1,000種類の化合物のうち644種類について、一次スクリーニングでは、カンジダ・グラブラータの薬剤高感受性株（薬剤排出ポンプ制御因子欠損株）を用いて生育阻害活性を測定した結果、140サンプルに生育阻害活性（IC50<100μM）が確認された。二次スクリーニングでは、8種類の病原性真菌について、生育阻害活性を測定し、それぞれの菌種について生育阻害活性を測定し、62サンプルを選抜した。平成30年度は、1,000種類の化合物のうち残る356サンプルの一次スクリーニングならびに二次スクリーニングを実施し、41サンプルを選抜し、前年度分を合わせて103サンプルの抗真菌活性物質を見いだすことができた。それら103サンプルについて培養細胞を用いた呼吸阻害活性を測定し、低毒性物質33サンプルを抗真菌薬シーズ候補として選抜した。それらシーズの中にムーコルに対して生育阻害活性を示す化合物が見つかり令和元年に特許を出願した。現在、標的分子同定作業と同工程に必要なサンプル量の調整を進めている。

特許出願

「ムーコル症治療薬」特願2020-032263

研究課題 '19-23

ホタテガイ分離真菌が産生する二次代謝産物の解析

清水公德・久保田雅大

(東京理科大学基礎工学部)

知花博治・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of secondary metabolites produced by the filamentous fungi isolated from the scallops.

Kiminori Shimizu, Masahiro Kubota

(Department of Biological Science and Technology,
Tokyo University of Science)

Hiroji Chibana, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

東京理科大学がキャンパスを有する長万部町および近隣地域産ホタテガイから分離された真菌が生産する二次代謝産物から有用物質のシードとなり得る化合物の取得を試みた。北海道産ホタテガイ（成貝または稚貝）から分離された *Penicillium* 属, *Trichoderma* 属, *Pichia* 属, *Cladosporium* 属, *Rhodotorula* 属, *Cystobasidium* 属, *Debaryomyces* 属, *Candida* 属, *Rhodospiridium* 属, *Trichosporon* 属, *Cutaneotrichosporon* 属, *Hypocrea* 属菌を複数の培養条件で培養し、培養物から代謝産物を抽出した。抽出物の抗菌活性について、糸状菌 *Aspergillus nidulans*, *A. flavus*, 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* および *Cryptococcus neoformans*, 大腸菌 *Escherichia coli* を用いてアッセイしたが、明確に生育阻害を示すものを見出すことはできなかった。今後は、今回供試した微生物種以外の菌を用いた抗菌活性のアッセイを行い、分離した菌類からの有用物質の取得を目指したい。

研究課題 '19-24

マウス細菌性肺炎モデルにおけるトロンボモジュリンによる炎症反応制御

渡邊栄三

(千葉大学大学院医学研究院総合医科学講座)

齋藤大輝

(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 thrombomodulin in murine bacterial pneumonia model

Eizo Watanabe

(General Medical Science, Chiba University)

Daiki Saito

(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) の効果を明らかにする目的で、以下の検討を行った。6 - 8 週齢の C57BL/6N マウスに対し、気管内に菌液 ((血清型19A) 2×10^7 CFU) を投与することにより肺炎モデルを作成した。その菌液注入3時間後に rTM (10mg/kg BW) を腹腔内投与した。その後 rTM 投与による全身炎症反応制御と、肺血管内皮細胞表面の glycocalyx layer 保護効果判定のため、rTM 投与の有無で、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の肺炎球菌培養コロニー数、血清 cytokine 濃度、flow cytometry (FACS) による肺血管内皮系細胞群における cytokine 発現率を比較した。また、電子顕微鏡を用いて肺血管内皮細胞表面の glycocalyx layer の形態学的評価を行った。それらの結果、rTM の投与のみでは、肺炎マウスの BALF 中の肺炎球菌培養のコロニー数に変化はなく、rTM の bacterial clearance は認めなかった。他方、肺炎マウスにおいて、rTM 投与によって菌液注入24時間後における血清 HMGB1 (high mobility group box protein1) は著明に低下、血清 TNF と IL-10 濃度は低下傾向となった。また、菌液注入12時間後では、rTM 投与によって肺血管内皮細胞における TNF 発現率は低下傾向、IL-10 発現率は有意に上昇した。したがって、血中および肺血管内皮における rTM の抗炎症効果が示唆された。さらに rTM 投与によって、肺炎マウスの肺血管内皮細胞表面の glycocalyx layer は保護される傾向を認めた。同肺炎モデルにおいて、glycocalyx layer の構成糖鎖の一つである Syndecan-1 の血中濃度は、rTM 投与によって有意に低下していることも前年度までの結果より判明しており、今回形態学的にその現象の裏付けが得られた。以上より、同肺炎モデルに対する rTM の抗炎症作用は、glycocalyx layers 傷害の軽減にも寄与している可能性が示唆された。現在、研究成果について論文作成中である。

研究課題 '19-25

メタボローム解析による真菌類の薬剤耐性と産生成分の調査

細江智夫・武田 尚・若菜大悟

(星薬科大学生物制御科学研究室)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

Correlation between drug resistance and secondary metabolites of fungi by metabolomics

Tomoo Hosoe, Hisashi Takeda, Daigo Wakana

(Department of Bioregulatory science, Hoshi University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

我々は、薬剤耐性菌株と感受性菌株を化学成分の観点から判別することが可能ではないかと考え、これまでに AMPH 耐性及び感受性 *Aspergillus fumigatus* 培養エキスの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたメタボローム解析により、感受性株にのみ観測される特徴的なシグナルの存在を見出した。また、*A. fumigatus* の隠蔽種である *A. udagawae* 及び *A. viridinutans* についても同様の検討を行い、各菌株においても耐性菌株と感受性菌株間で産生成分が異なる傾向が観測された。

本年度は AMPH 感受性 *Aspergillus fumigatus* が特徴的に産生する物質および、薬剤耐性が異なる *A. udagawae*, *A. lentulus* 及び *A. viridinutans* の化学成分による分離について検討した。

・AMPH 感受性株 *Aspergillus fumigatus* IFM54729 株が産生する物質

A. fumigatus IFM54729 株を PDB 培地にて 37°C で 1 週間培養した後、培養液を酢酸エチルで抽出した。得られた抽出物はクロロホルム、酢酸エチル、1-ブタノールを用いて液液分配を行った後、感受性株に特徴的なシグナルの所在を明らかにするために、各抽出エキスについて $^1\text{H-NMR}$ 測定を行った。その結果、目的とするシグナルはクロロホルム画分に観測されたが、成分量が少なく化

化合物の同定には至らなかった。

・薬剤感受性が異なる *A. udagawae*, *A. lentulus* 及び *A. viridinutans* の化学成分による分類

azol系抗真菌薬感受性が異なる上記3菌種各8菌株 (MIC 0.25~>8µg/mL) をPDB培地にて培養後、酢酸エチルで抽出し、各抽出物について¹H-NMデータを用いたメタボローム解析を行った。その結果、3菌種の違いによって分類される傾向は観測されたが、薬剤感受性との相関は認められなかった。

研究課題 '19-26

基礎疾患のある小児患者における侵襲性肺炎球菌感染症予防法の評価

宮入 烈

(国立成育医療研究センター感染症科)

石和田稔彦・竹内典子

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

Isao Miyairi

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

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)の定期接種化以降、PCV13非含有血清型の肺炎球菌による感染症の増加(serotype replacement)が問題となっている。本年度は基礎疾患を有する7症例の侵襲性肺炎球菌感染症分離株について解析を行い、PCV13含有血清型分離例の回復期の抗体測定、オプソニン活性測定を行った。結果は、2歳(PCV13接種済)血清型19A、13歳(PCV13接種済)血清型11A、1歳(PCV13未接種)血清型23A、2歳(PCV13接種済)血清型35F、1歳(PCV13接種済)血清型35B、20歳(PCV13未接種)血清型24B、1歳(PCV13接種済)血清型24Fであり、6例がPCV13非含有株による感染症で

あった。血清型19A感染例の回復期の血清では、他の血清型に比べ19Aの特異抗体価とオプソニン活性は高値であったが、急性期の血清がなく、ペア血清での評価は出来なかった。基礎疾患のある小児では、PCV13非含有血清型の肺炎球菌による感染症が主体であった。なお、2018年度に解析を行った基礎疾患のない血清型10A sequence type (ST) 11189のペニシリン耐性肺炎球菌による髄膜炎例に関して、日本小児感染症学会で報告したが、Young Investigate Award候補演題に選出され、現在、論文投稿中である。

研究課題 '19-27

細胞壁の形成に必要な酸化還元酵素様タンパク質の解析

中西秀樹

(中華人民共和国江南大学糖化学生物技術研究科)

知花博治・佐藤(岡本)美智代・高橋 梓

(千葉大学真菌医学研究センター)

Analysis of oxidoreductase-like proteins that are involved in cell wall formation

Hideki Nakanishi

(Jiangnan Univ Carbohydrate Chem and Biotech)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、Svl3とPam1タンパク質の機能の喪失は、細胞壁におけるキチン沈着のレベルおよび温度感受性の増加を引き起こし、細胞壁形成への両タンパクの関与を示唆していた。両タンパクには、2-デヒドロパント酸 2-レダクターゼと思われるドメインを持つN末端部分が含まれおり、Svl3では、この部分を酵母の2-dehydropantoate 2-reductase, Pan5で置き換えることが可能であったことから、Svl3とその同族体が2-dehydropantoate 2-reductaseの機能を仲介できることを示唆した。Svl3の機能と局在は、このリジンが豊富な領域の損失によって抑制されるが、その局在は遺伝子欠損によって完全に抑制はされなかったことから別の局在シ

グナルが適切な輸送を可能にすると推察された。Svl3およびPam1オーソログは、真菌種の細胞に存在し、特に *Candida glabrata* の Svl3 オーソログは、*S. cerevisiae* における Svl3 と Pam1 の欠損を補うことが示された。Svl3 および Pam1 オーソログ遺伝子を欠く *C. glabrata* 細胞は、Svl3 Δ Pam1 Δ *S. cerevisiae* 細胞で観察されるものと同様の表現型を示した。したがって、Svl3 ホモログは、真菌細胞における細胞壁の構築に一般的に必要とされる可能性が今回示された。

発表論文

- 1) Yifan Jin, Michiyo Okamoto, Hiroji Chibana, Guoyu Liu, Xiao-Dong Gao, Hideki Nakanishi. Functional characteristics of Svl3 and Pam1 that are required for proper cell wall formation in yeast cells. *Yeast*, 2020 Jul; 37(7-8): 359-371.

研究課題 '19-28

保育園児から分離される肺炎球菌株の病原性解析

和田紀之

(和田小児科医院)

黒澤サト子

(くろさわ子ども&内科クリニック)

石和田稔彦・竹内典子・大楠美佐子

(千葉大学真菌医学研究センター)

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

Noriyuki Wada

(Wada Shounikaiin)

Satoko Kurosawa

(Kurosawa Kodomo & Naika Clinic)

Naruhiko Ishiwada, Noriko Takeuchi, Misako

Ohkusu

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

2019年度、都内の保育園4施設に通う保育園児31名の

上咽頭の保菌調査を行い、上咽頭培養から分離された肺炎球菌について、凝集法、莢膜膨化法およびPCR法を用い莢膜血清型同定を行った。肺炎球菌は60株分離された。莢膜型3の1株を除く59株(98.3%)が13価肺炎球菌ワクチン(PCV13)非含有株であった。莢膜型別で見ると、34が17株、10Aが9株、35Bが7株、23Bが5株、11Aと15Aが各4株、23Aが3株、21と6Cが各2株、3、37、15B、15C、24F、7Cが各1株であった。無莢膜株は1株分離された。

また、これまで継続した保菌調査から *cpsA* 遺伝子(莢膜多糖体)を有さず無莢膜株と同定された株について、MLST解析、一部の無莢膜株が持つとされる表面蛋白である *pspK* 遺伝子の有無、バイオフィーム産生能、薬剤耐性遺伝子保有状況について検討したところ、保育園児から分離された肺炎球菌無莢膜株は、多様性はあるものの、全て *pspK* 遺伝子を有しており、同一の保育園で同じST型が分離されたことから、園児間の水平伝播が示唆された。また、無莢膜株は莢膜株と比較し、バイオフィーム産生能が高く、薬剤耐性遺伝子を保有する株が多いことから、今後呼吸器感染症の原因菌としての重要性が増すことが懸念され、報告を行った。

発表論文

- 1) Takeuchi N, Ohkusu M, Wada N, Kurosawa S, Miyabe A, Yamaguchi M, Moon H, Nahm MH, Ishiwada N. Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Japan. *J Infect Chemother* 2019; 25: 750-7.

研究課題 '19-29

カビ毒ホモピン産生菌の機能解析および生態学的研究

古屋俊樹

(東京理科大学理工学部)

矢口貴志・伴さやか

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺麻衣子・高橋治男

(国立医薬品食品衛生研究所)

橋本一浩

(国立病院機構相模原病院)

中川博之

(農業・食品産業技術総合研究機構)

Characterization and ecological survey of phomopsin-producing fungi

Toshiki Furuya

(Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science)

Takashi Yaguchi, Sayaka Ban

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Maiko Watanabe, Haruo Takahashi

(National Institute of Health Sciences)

Kazuhiro Hashimoto

(National Hospital Organization Sagami National Hospital)

Hiroyuki Nakagawa

(National Agriculture and Food Research Organization)

研究成果

ホモプシン類は、真菌 *Diaporthe toxica* の代謝産物として単離・構造決定されたカビ毒で、産生菌の着生したマメ科植物を家畜が摂取すると肝障害を引き起こすことが知られている。欧州食品安全機関 (EFSA) の報告によると、「ヒト及び家畜のホモプシン類への暴露量を可能な限り低く抑えることが望ましい」とされており、近年その安全性が注目されている。しかしながら、ホモプシン類産生菌の国内における分布はほとんど調査されていない。そこで本研究では、国内のマメ科植物を中心にホモプシン類産生菌の存在を調査することを目的とした。本年度は、ホモプシン類産生菌およびホモプシン類を検出するための基盤技術を確立した。具体的には、ホモプシン類産生菌の検出においては、ホモプシン類合成遺伝子を検出可能なプライマーを設計し、実際に微生物保存機関から入手した複数の菌株に当該遺伝子が存在することを明らかにした。また、ホモプシン類の検出においては、微生物培養液からホモプシン類を固相抽出法により濃縮し、LC-MSにより検出する一連の手法を確立した。今後は、確立した手法を微生物保存機関の菌株やマメ科植物からの分離株に対して適用し、ホモプシン類産生菌の存在を広く調査する。

感染症研究グローバルネットワークフォーラム2019

The 8th Global Network Forum on Infection and Immunity

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

【Poster Session】

日時：令和2年1月10日 14：30～16：30

場所：千葉大学医学部附属病院3階 セミナー室3

【Oral Presentation】

日時：令和2年1月11日 9：50～17：15

場所：千葉大学医学部附属病院3階 ガーネットホール

世話人：

大野博司（理化学研究所）

松木隆広（ヤクルト中央研究所）

笹川千尋・後藤義幸・米山光俊（千葉大学真菌医学研究センター）

研究成果

「感染症研究グローバルネットワークフォーラム」は感染症研究のネットワーク構築を目指し、当センターが中心となって平成24年度から開始され、2019年度で第8回目を迎えることとなった。本年度の国際フォーラムは、理化学研究所の大野博司博士が世話人となり、「共生微生物と宿主の相互作用」をテーマとし、現在世界的に注目されている腸管マイクロバイオーーム研究を牽引する国内外の著名な研究者を招聘した。腸内微生物叢の形成機序から腸内微生物による宿主の病態形成機構まで、また研究の対象となる宿主は昆虫からヒトに至るまで幅広い分野で世界最先端の研究成果について、ご講演いただいた。さらに、腸管局所における宿主と細菌の相互作用のみならず、腸内細菌が脳神経など宿主の全身系組織に与える影響、メカニズムについてもご紹介いただき、大変内容の濃いフォーラムとなった。

初日はポスター57題の発表が、二日目は招待講演8題

（日本、ドイツ、米国）の発表が行われた。二日間で延べ220人の参加があり、活発な議論を通じて新しい国際ネットワーク形成を目指した有意義な意見交換が行われた。

【開会の挨拶】

大野博司（理化学研究所）

徳久剛史（千葉大学学長）

【午前の講演】

座長：松木隆広（ヤクルト中央研究所）

1. Elaine Y. Hsiao (UCLA, USA)

“Host microbiome interactions through the gut serotonergic system”

2. 大野博司（理化学研究所）

“Gut microbiota and host diseases, especially autoimmune diseases”

3. Noah Palm (Yale University, USA)

“Illuminating the ‘dark matter’ of the gut microbiota metabolome”

【午後の講演1】

座長：大野博司（理化学研究所）

4. Andreas Diefenbach (Charité - Berlin University of Medicine, Germany)

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

5. Jakob von Moltke (University of Washington, USA)

“Intestinal tuft cells: Sentinels and effectors of the type 2 immune response”

6. 佐々木伸雄（慶應義塾大学）

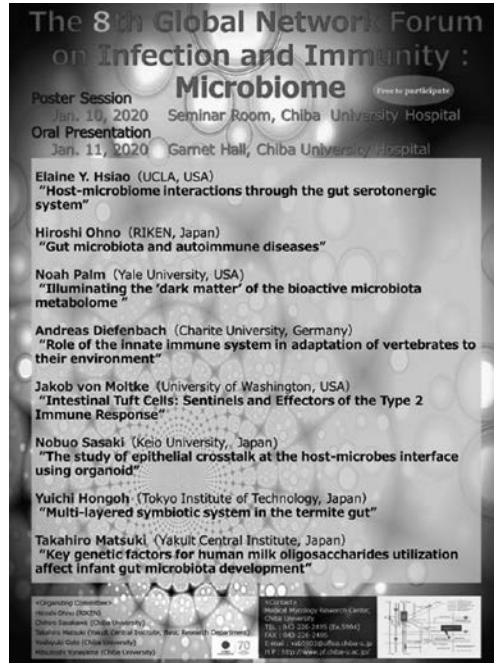
“The study of epithelial crosstalk at the host microbes interface using organoid”

【午後の講演2】

座長：後藤義幸（千葉大学真菌医学研究センター）

- 7. 本郷裕一（東京工業大学）
“Multi layered symbiotic system in the termite gut”
- 8. 松木隆広（ヤクルト中央研究所）
“Key genetic factors for human milk oligosaccharides utilization affect infant gut microbiota development”

【閉会の挨拶】
 笹川千尋（千葉大学真菌医学研究センター長）



2020年講演会

2020 Scientific Meetings & Seminars

「真菌医学研究センター セミナー」

全てオンライン開催

1. 令和2年9月23日(水) 16:00~17:00

Fábio Seiti Yamada Yoshikawa

(千葉大学真菌医学研究センター 特任研究員)

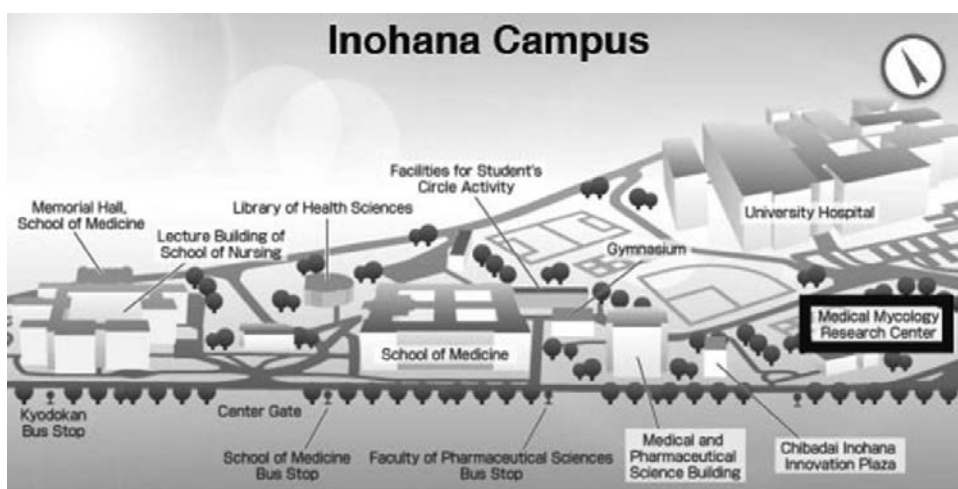
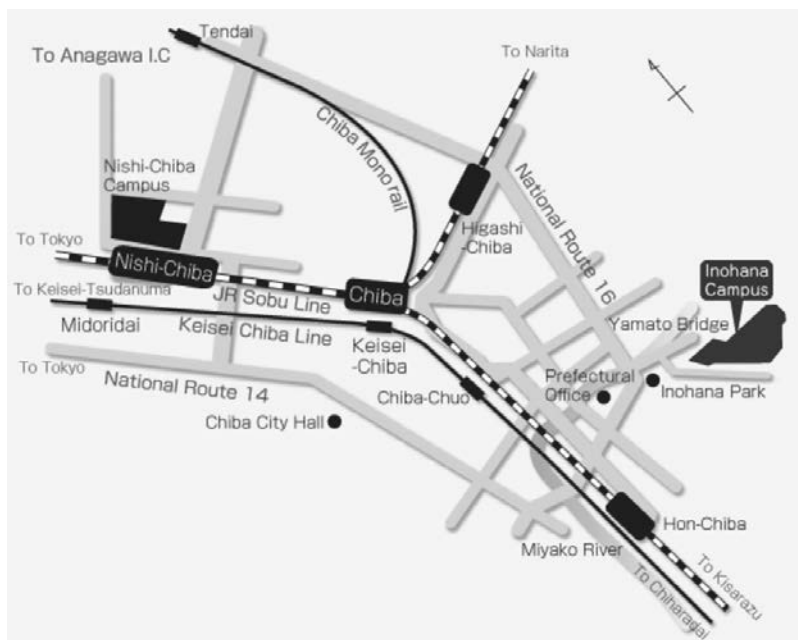
「Differential roles played by C-type lectin receptors in the anti-aspergillus defense」

2. 令和2年12月1日(火) 16:00~17:00

長谷耕二

(慶應義塾大学薬学部 教授)

「腸内細菌と栄養シグナルによる腸管免疫系の制御」



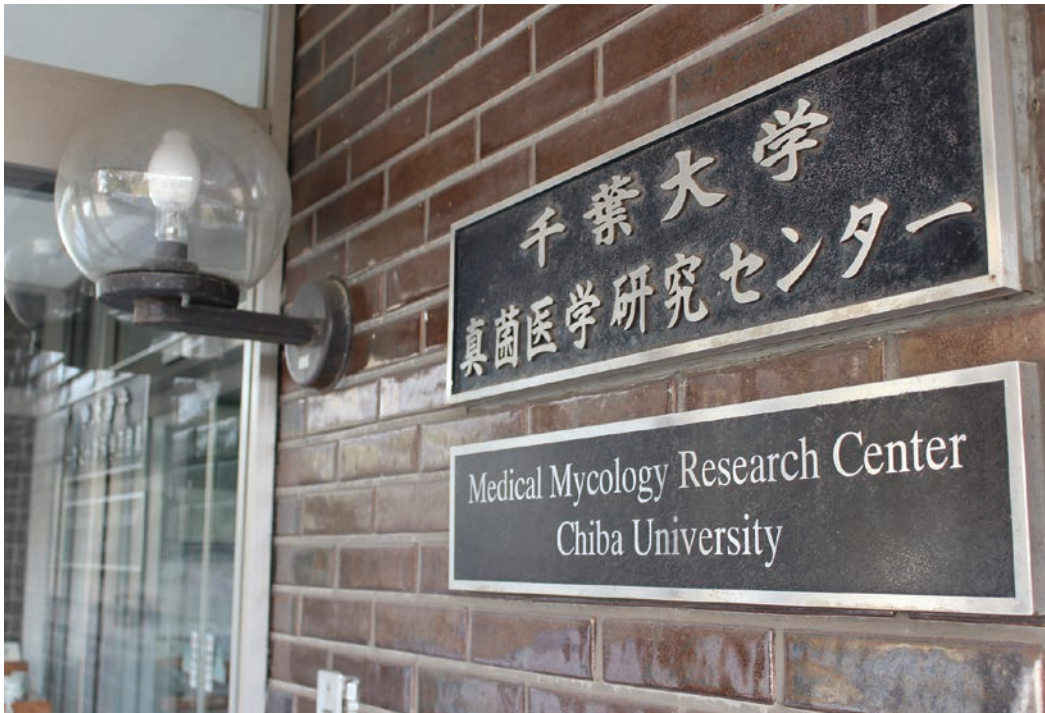
令和 3 年 3 月 発行

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)

Mar 2021

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
2020