

MMRC



**ANNUAL REPORT OF MEDICAL MYCOLOGY
RESEARCH CENTER, CHIBA UNIVERSITY 2025**

千葉大学 真菌医学研究センター 報告

29



Content

目 次

Preface for Annual Report for 2025 はじめに	
Organization 機構図	
Project for Immune Response in Infections Diseases 感染免疫分野 米山教授 感染応答プロジェクト	4
Project for Cytokine Research 感染免疫分野 西城准教授 サイトカインプロジェクト	6
Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis 感染免疫分野 後藤准教授 微生物・免疫制御プロジェクト	9
Project for Control of Infectious Diseases 感染免疫分野 高屋教授 感染症制御開発プロジェクト	12
Project for Innate Immunity 感染免疫分野 三宅特任教授 自然免疫プロジェクト	14
<i>Candida</i> Phenome Project 病原機能分野 知花准教授 カンジダフェノームプロジェクト	16
Project to Link Basic Sciences and Clinical Researches 臨床感染症分野 渡邊教授 臨床感染症プロジェクト	19
Project for Infection Control and Prevention 感染症制御分野 石和田教授 感染症制御プロジェクト	22
Project for Systems Biology of Microorganisms 微生物資源分野 高橋教授 微生物創生プロジェクト	27
Management Unit of Microbiological Resources 微生物資源分野 矢口室長 バイオリソース管理室	29
Project for RNA Regulation 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	36
Merged Project of Respiratory Pathophysiology and Pathobiology 呼吸器生体制御学寄附研究部門 磯野特任教授・呼吸器生体制御解析プロジェクト	38
Project for Evolution and Reproduction 進化生殖学寄附研究部門 生水特任教授 進化生殖学プロジェクト	42
Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology National BioResource Project “Pathogenic Microorganisms” 文部科学省 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」	44
International collaboration to combat neglected tropical diseases in Africa 長崎大学熱帯医学研究拠点特定領域共同研究 アフリカにおける顧みられない熱帯病対策のための国際共同研究プログラム	46

Generating research infrastructure and novel technologies for anti-infective drug and vaccine discovery, AMED-CREST “Study of the molecular mechanism of persistent infection and identifying novel privileged molecular structures for the next-generation antibacterial drug discovery” 日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業 感染症創薬に向けた研究基盤の構築と新規モダリティ等の技術基盤の創出： 「難治性感染症制御に資する細菌持続感染機構解明と次世代型抗感染症化合物の創出」	48
Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) Japan Initiative for World-leading Vaccine Research and Development Centers Chiba University “Synergy Institute for Futuristic Mucosal Vaccine Research and Development” AMED ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業 ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点群 千葉シナジーキャンパス (千葉大学 未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点)	49
Research Institute of Disaster Medicine 災害治療学研究所	50
The training course of pathogenic fungi 真菌医学研究センター病原真菌講習会	51
miRaX Therapeutics K. K. ミラックスセラピューティクス株式会社	52
Electron microscope facility 電子顕微鏡施設	53
2024 Fiscal Year Cooperative Research Program Report 令和6年度 共同利用・共同研究報告	55
2025 Scientific Meetings & Seminars 2025年講演会	75

Preface for the FY2025 Annual Report

In recent years, our country has rapidly become one of the world's leading super-aged societies. Along with an increase in respiratory diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cancer, opportunistic infections are also rising due to age-related immune decline, advances in medical care, and the growing prevalence of chronic diseases. Among these, fungal infections are increasingly recognized worldwide as a serious public health concern. Economic globalization has further increased the risk of fungal diseases being introduced from overseas. In addition, difficult-to-treat and life-threatening fungal infections have emerged as global challenges, including COVID-19-associated pulmonary aspergillosis, high-fatality mucormycosis, and, more recently, infections caused by *Candida auris*. In response, the World Health Organization (WHO) in October 2022 identified fungal infections as an international threat and published the *Fungal Priority Pathogens List*. In 2025, the WHO also reviewed research trends and challenges in antifungal drug development and called for stronger research efforts. Against this background, the role of the Medical Mycology Research Center at Chiba University is expanding, with growing expectations for its contributions to basic research, clinical practice, and international collaboration.

The Center was re-accredited by MEXT in FY2021 as a joint-use and joint-research hub for infectious disease science, integrating mycology with immunology, microbiology, and bioinformatics. Since then, including FY2025, it has promoted collaborative research with universities, medical institutions, and industry, while advancing education in infectious diseases and immunology and contributing to clinical activities at the affiliated hospital. Internationally, the Center has continued active collaborative research through frameworks such as SATREPS. As part of MEXT's National BioResource Project (NBRP), it manages the collection, preservation, genomic analysis, and distribution of pathogenic fungi and actinomycetes and also conducts training programs, with the 37th course held in FY2025. In parallel, basic, translational, and clinical research by individual groups and outpatient infectious disease services at the affiliated hospital have been maintained.

The Center also collaborates across the university to strengthen research and education in infectious diseases, immunology, vaccines, and antimicrobial resistance, and contributes to graduate and undergraduate teaching, including a systematic immunology lecture series started in FY2025. Through joint research, bioresource activities, multidisciplinary studies, and education, the Center seeks continued development.

We sincerely thank the members of the Steering Committee, visiting professors and associate professors, and all collaborators for their support, and we look forward to their continued cooperation.

February 2026

Chihiro Sasakawa PhD,
Director of the Medical Mycology Research Center, Chiba University

はじめに

我が国は、近年人口の高齢化が急速に進展し、今や世界でも有数の超高齢社会にあります。超高齢社会においては、慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの呼吸器疾患やがんの増加に加え、先進医療の進展や慢性疾患の増加に伴う免疫機能低下を背景として、日和見感染症の発生リスクも高まり、なかでも真菌感染症は、国際的にも重大な公衆衛生上の脅威として認識されつつあります。経済のグローバル化により、海外由来の真菌症が国内へ流入するリスクが増大しているほか、新型コロナウイルス感染症に合併する肺アスペルギルス症、致死率の高いムコール症、さらに近年ではカンジダ・アウリス感染症など、難治性かつ重篤な真菌感染症が国際的な課題となっています。こうした状況を受け、WHO（世界保健機関）は2022年10月に真菌感染症を国際的な脅威として位置づけ、危険度の高い真菌を体系的に整理した「真菌優先病原体リスト」を公表しました。さらに2025年には、真菌感染症に関する研究動向および抗真菌薬開発の現状と課題を総括し、研究体制の一層の強化が必要であることを提言しています。このような国際的・社会的背景のもと、千葉大学真菌医学研究センターに求められる役割は、基礎から臨床、さらには国際連携に至るまで、従来にも増して拡大・高度化しています。

本センターは、病原真菌を中心とした感染症学、免疫学、微生物学、情報生命科学等を包含する多分野融合型の共同利用・共同研究拠点として、2021年度に文部科学大臣より再認定を受けました。以降、2025年度においても、大学、医療機関、企業等と連携した共同利用・共同研究を推進するとともに、感染症・免疫分野に関する学内教育や、附属病院における医療活動を積極的に展開してきました。国際研究活動においては、これまでSATREPSをはじめとする国際共同研究を通じて構築してきた国際連携体制を活用し、2025年度も国際共同研究を継続的かつ積極的に実施しました。さらに本センターは、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）の一環として、病原真菌および放線菌の収集・保存、ゲノム情報解析、分与、ならびに人材育成を目的とした講習会等の事業を担っています。2025年度には、第37回講習会を実施しました。一方で、独立研究グループによる基礎研究、開発研究、臨床研究も活発に推進されており、附属病院においては、臨床感染症分野および感染制御分野の2分野が連携した外来診療を継続的に実施しています。

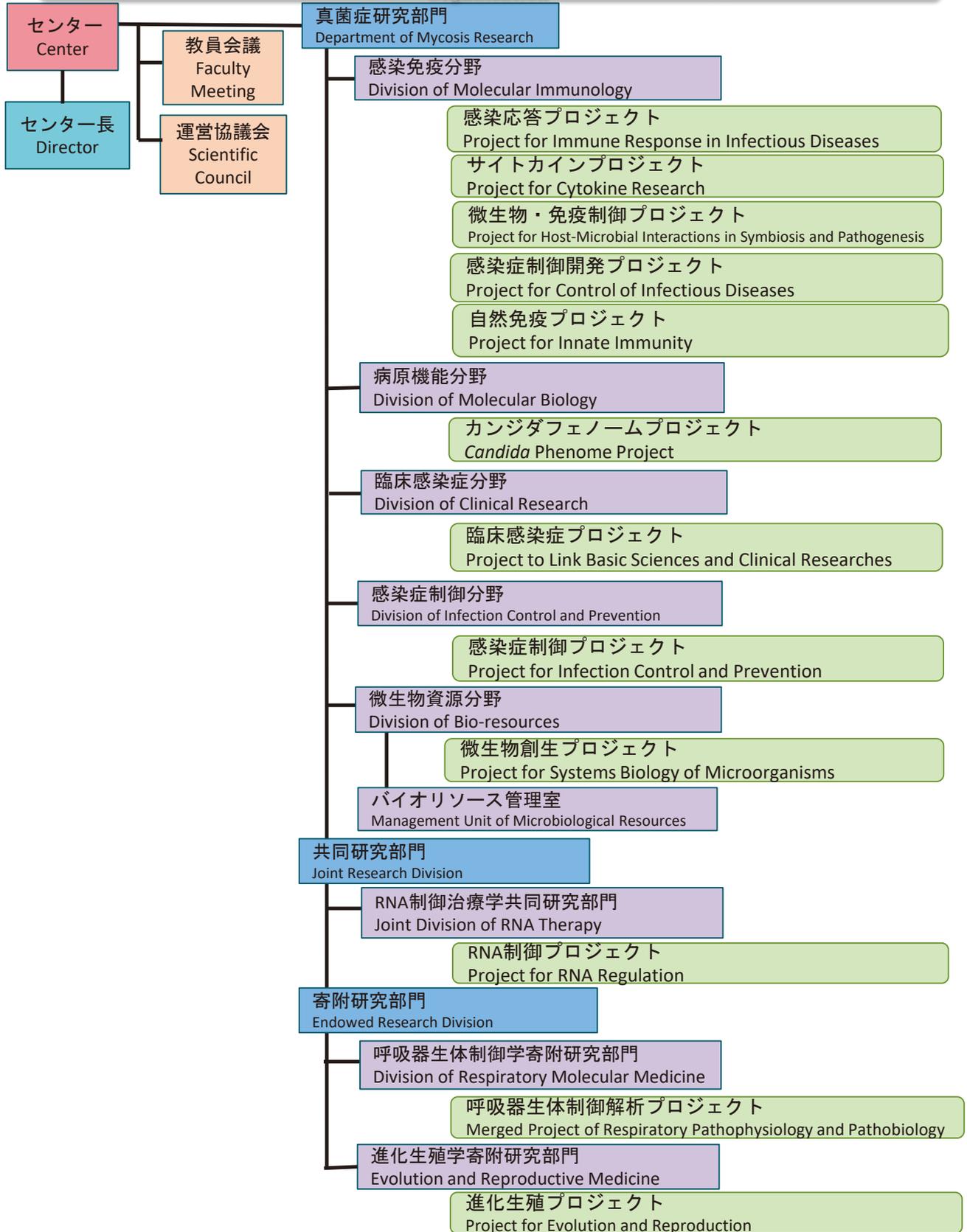
本センターの教員は、学内の災害治療学研究所、未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点、未来粘膜ワクチン研究開発センター等にも参画し、感染症・免疫・ワクチン・薬剤耐性等の研究強化を目指して、医学研究院、附属病院、薬学研究院、理学研究院等と共同研究を行っています。また大学院・学部の講義にも積極的に参加し、2025年度より理学部において初めて免疫学の系統講義を担当しています。

以上のように、本センターは「共同利用・共同研究拠点事業」、「バイオリソース中核拠点事業」、「感染症・病原体・免疫・ゲノム情報を包含する多分野融合型研究」、「大学院・学部教育」を柱とした活動を通じて、今後さらなる発展を目指して活動してまいります。最後に、運営協議会委員、客員教授・准教授をはじめ、多くの共同研究者の方々に深く感謝申し上げますとともに、引き続きご協力とご指導を賜りますようお願い申し上げます。

2026年2月

千葉大学真菌医学研究センター長
笹川千尋

機構図 Organization



Project for Immune Response in Infectious Diseases

米山 P I (感染応答) プロジェクト

Summary (研究概要)

The innate immune system plays a crucial role in defending the host against infection by various pathogens. We focus on antiviral innate immunity, particularly the molecular machinery for detecting viral RNA via retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), including RIG-I, MDA5, and LGP2, as well as the 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.

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機構に注目し、RNA センサー RIG-I-like 受容体 (RLR: RIG-I, MDA5, LGP2 の 3 種) によるウイルス由来非自己 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シグナル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につながる知見を得ることを目指す。

Professor	Mitsutoshi Yoneyama	教授	米山 光俊
Assistant Professor	Koji Onomoto	助 教	尾野本浩司
Research Technician	Yuna Aoki	技 術 職 員	青木 友那
Research Promotion Technician	Haruko Munakata	技 術 補 佐 員	宗像 晴子

1. Regulatory mechanisms of RLR-mediated signaling via virus-inducible antiviral stress granule (avSG) formation.

Onomoto K, Sakai M, Ban M, and Yoneyama M.

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

Stress granules (SGs) are dense aggregates of RNA and proteins that form in response to various cellular stresses. Virus-induced SGs, known as antiviral SGs (avSGs), play a crucial role in regulating retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLRs)-mediated antiviral innate immunity. However, the regulation of avSG formation remains not fully understood. In this study, we demonstrate that TAR-RNA binding protein (TRBP), an RNA silencing regulator, negatively regulates type I interferon (IFN) expression by inhibiting avSG formation in response to RNA virus

infection. Overexpression of TRBP inhibits both IFN- β promoter activity and avSG formation following viral infection or the viral RNA mimic, polyinosinic-polycytidylic acid transfection. TRBP knockout cells exhibit enhanced phosphorylation and activation of IFN regulatory factor-3 (IRF-3) and increased IFN- β mRNA expression compared

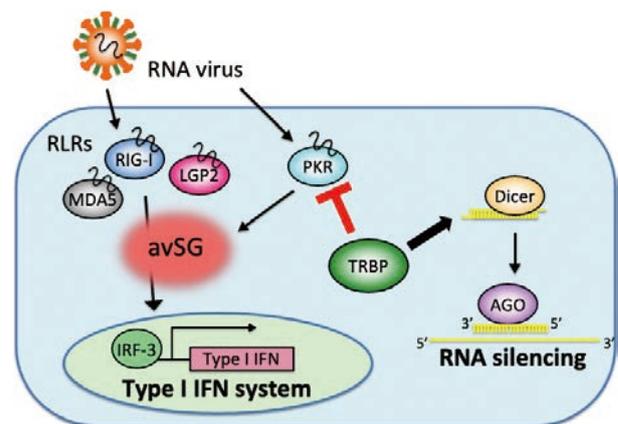


Figure1. TRBP modulates RLR signaling by inhibiting PKR-mediated antiviral stress granule formation.

to wild-type cells. Additionally, depletion of G3BP1 and G3BP2, which are essential for SG formation, abolishes the inhibitory effect of TRBP on IRF-3 phosphorylation. Mechanistically, TRBP physically interacts with double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase R (PKR), a key kinase involved in avSG formation, via its dsRNA-binding domains, and inhibits PKR activation. In summary, our findings reveal a novel function for TRBP as a negative regulator of RLR-mediated signaling through PKR-dependent inhibition of avSG formation (Figure 1).

2. Regulation of RLR-mediated antiviral signaling by inhibiting MAVS degradation

Suzuki Y, Onomoto K, and Yoneyama M.

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

Type I and III IFNs are essential in the antiviral innate immune responses against diverse viral infections. In response to RNA virus infection, RLRs detect virus-derived non-self RNA in the cytoplasm and activate the downstream signaling via direct interaction with the adaptor molecule, mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS). The RLR/MAVS pathway is tightly regulated by protein modifications such as ubiquitination. We demonstrated that one member of ubiquitin-specific proteases (USPs) was involved in enhancing IFN-induced signaling by deubiquitinating MAVS and thereby increasing its stabilization. The enforced expression of this USP protein increased MAVS expression in a de-ubiquitination activity-dependent manner and enhanced IFN gene expression. Conversely, deficiency of the USP significantly attenuated IFN mRNA levels. Interestingly, the USP accumulated in

stress granule-like aggregates, avSG, in response to viral infection. These observations suggest that the USP might stabilize MAVS by interaction at the interface between avSGs and mitochondria.

3. Identification of natural compounds targeting viral replication.

Aoki Y, Onomoto K, and Yoneyama M.

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

We screened for antiviral activity against viruses, including influenza A virus (IAV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), using a library of over 300 natural compounds prepared by the Faculty of Pharmaceutical Sciences at Chiba University. As a result, we found that several compounds showed significant antiviral activity against various viruses. Among them, three compounds inhibit viral replication without affecting the activity of two proteases and RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2. This suggests that these compounds may inhibit viral proliferation via a novel molecular mechanism(s). We are conducting analyses to identify the viral or host factors these natural compounds target.

Publications

- 1) [Onomoto K](#), [Sakai M](#) (equal contribution), [Watanabe M](#), [Fukao A](#), [Sakamura Y](#), [Miyao M](#), [Tomohiro T](#), [Yamashita A](#), [Fujiwara T](#), [Takahashi T](#), [Ui-Tei K](#), [Yoneyama M](#)*: TRBP modulates RLR signaling by inhibiting PKR-mediated antiviral stress granule formation. *Sci Rep*, 15(1):20678, 2025.

Project for Cytokine Research

西城 P I (サイトカイン) プロジェクト

Summary (研究概要)

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.

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。

Associate Professor

Shinobu Saijo

准 教 授 西城 忍

Research Assistant Professor

Fabio Seiti Yamada Yoshikawa

助 教 Fabio Seiti Yamada Yoshikawa

Research Promotion Technician

Junko Minakuchi

技 術 補 佐 員 水口 潤子

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

Saijo S and Yoshikawa YFS

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. The C-type lectin receptor Dcir (*Clec4a2*) restrains *Aspergillus fumigatus* elimination by limiting the degranulatory activity of neutrophils

Fabio Seiti Yamada Yoshikawa¹, Rikio Yabe^{1,2}, Shota Torigoe^{3,4,5}, Sho Yamasaki^{1,3,6,7}, Shinobu Saijo¹

¹ Division of Molecular Immunology, Medical Mycology

Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

² Cancer Immunology Project, Department of Diseases & Infection, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

³ Laboratory of Molecular Immunology, Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan.

⁴ Department of Mycobacteriology, Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

⁵ Research Center for Biosafety, Laboratory Animal and Pathogen Bank, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

⁶ Department of Molecular Immunology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka, Japan.

⁷ Center for Infectious Disease Education and Research (CiDER), Osaka University, Osaka, Japan.

C-type lectin receptors (CLRs) are innate sensors crucial for antifungal and antimycobacterial responses, contributing to host defenses against pathogens, including the ubiquitous mold *Aspergillus fumigatus*. Dendritic cell immunoreceptor (Dcir) modulates immune responses by limiting the development of inflammation and autoimmunity; however, its involvement in fungal infections has not been previously established.

Wild-type and Dcir-knockout C57BL/6J mice were infected with *A. fumigatus* intratracheally to establish a model of pulmonary aspergillosis. For *in vitro* analysis, neutrophils were purified from the bone marrow and incubated with *A. fumigatus* hyphae.

Mice lacking Dcir exhibited improved clearance of *A. fumigatus* from the lungs, while tissue inflammation-assessed by phagocyte recruitment and inflammatory cytokine levels within the lungs-did not change significantly compared to Dcir competent mice. Neutrophils from Dcir-deficient mice exhibited enhanced killing of *A. fumigatus* hyphae, attributed to higher degranulatory activity, triggered by intracellular Ca²⁺ mobilization.

The results indicate a potential association between Dcir and downregulation of signalling pathways associated with neutrophil exocytosis. Thus, Dcir is a potential novel fungal sensor that, unlike other CLR family members, primarily fine-tunes host effector responses.

3. Dectin-1 and dectin-2 drive protection against *Sporothrix brasiliensis* in experimental sporotrichosis

Fabio Seiti Yamada Yoshikawa¹, Sandro Rogerio de Almeida², Shinobu Saijo¹, *

¹Division of Molecular Immunology, Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan.

² School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The emerging fungal pathogen *Sporothrix brasiliensis* has been responsible for epidemic outbreaks of sporotrichosis in Latin America, particularly Brazil, in recent years. The higher aggressiveness of the infection and its zoonotic nature are hallmarks of the pathogen, but the immunological markers of protection are not fully characterized. The C-type lectin receptors - dectin-1 and dectin-2 - drive key antifungal responses, and here we aimed to uncover their contribution against *S. brasiliensis* in a murine model of disseminated sporotrichosis. Wild-type, Dectin-1 and/or Dectin-2 knockout, and IL-17A/F knockout C57BL/6J mice were challenged with *S. brasiliensis* in a model of systemic infection. Animals were monitored for parameters as survival and body weight loss. Immunological analyses as assessment of cytokines and immune cell profiling were conducted in the livers. We showed that the receptors are essential for host survival, necessary to limit the fungal dissemination, and that their main effector functions can be related to shaping the T cell response, notably the cytotoxic CD8+ and Treg cell populations, instead of a conventional TH17 profile. While we also observed a contribution of IL-17 in the host defense, the cytokine is not involved in the restriction of the fungal growth.

Publications

1) Yoshikawa FSY, de Almeida SR, Saijo S. Dectin-1 and dectin-2 drive protection against *Sporothrix brasiliensis* in experimental sporotrichosis. *Front Immunol.* 25;16:1668445. 2025

- 2) Yoshikawa FSY, Yabe R, Torigoe S, Yamasaki S, Saijo S. The C-type lectin receptor Dcir (*Clec4a2*) restrains *Aspergillus fumigatus* elimination by limiting the degranulatory activity of neutrophils. *Front Immunol.* 16:1639400. 2025
- 3) Kurosaka S, Tanno H, Hirose M, Kamada W, Takayashiki R, Sone I, Sato Y, Watanabe T, Ishi S,

Shoji M, Imai Y, Sato K, Ishii K, Hara H, Yamasaki S, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K, Kanno E. Contribution of CARD9 signaling to wound healing in skin promoted by topical administration of heat-killed *Enterococcus faecalis* strain KH2 and the involvement of Dectin-2. *Front Immunol.* 16:1550934. 2025

Project for Host-Microbial Interactions in Symbiosis and Pathogenesis

後藤 P I (微生物・免疫制御プロジェクト)

Summary (研究概要)

The gastrointestinal tract is a unique organ that is constitutively exposed to various antigens, including dietary materials, commensal bacteria, and fungi. To exclude pathogens and create a symbiotic environment for non-pathogenic microorganisms, intestinal epithelial cells (ECs) and immune cells contribute to maintaining homeostasis of the intestinal microenvironment. Disruption of a symbiotic relationship between host and commensals predisposes to the development of pathogenic infections, inflammatory bowel diseases, and systemic disorders such as obesity and cancers. Therefore, it is essential to understand the mechanisms underlying symbiotic and homeostatic systems 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 establishing intestinal homeostasis and develop novel therapeutic approaches to treat diseases, including bacterial and fungal infections, that result from disruption of this homeostasis.

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、宿主と腸内細菌や腸内真菌との共生機構を明らかにし、腸内微生物による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、特に細菌や真菌感染症の治療法の開発を目的としている。

Associate Professor	Yoshiyuki Goto
Post Doctoral Fellow	Bonita McCuaig
Research Promotion Technician	Sayaka Hasegawa
Research Promotion Technician	Minami Hirayama
Research Promotion Technician	Miyuki Yamaguchi

准 教 授	後藤 義幸
特 任 研 究 員	ボニータ マクアギ
技 術 補 佐 員	長谷川 さや香
技 術 補 佐 員	平山 南
技 術 補 佐 員	山口 美雪

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

Bonita McCuaig¹, Qiongyuan Zhang¹, Daichi Mori¹, Yoshiyuki Goto¹

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

An extensive number of microorganisms colonize the host's gut. Several specific fungi, including *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, have been reported to reside in the human gut. Although commensal bacteria modulate gut homeostasis and dysbiosis triggers various host diseases, including infections and inflammatory bowel diseases, it is unclear how these commensal fungi colonize the gut and regulate host physiology. In addition, *C. albicans* is known to cause disease in immunocompromised hosts and to disseminate to systemic compartments, a process termed

invasive candidiasis, one of the most serious infectious diseases worldwide. Importantly, colonization of the gut by *C. albicans* triggers invasive candidiasis. Therefore, it is crucial to identify how *C. albicans* colonizes in the gut. In this study, we aim to elucidate the mechanisms by which commensal fungi colonize the gut and influence the development of host diseases. We find that commensal bacteria prevent *C. albicans* colonization in the gastrointestinal tract of mice. Furthermore, *C. albicans* colonizing in the gastrointestinal tracts was excluded by fecal microbiota transplantation, indicating the critical role of commensal bacteria in preventing infection by pathogenic fungi (Fig. 1). We examine the more detailed mechanism by which commensal bacteria and the gut immune system regulate fungal colonization and develop novel therapeutic approaches for the treatment of infectious diseases.

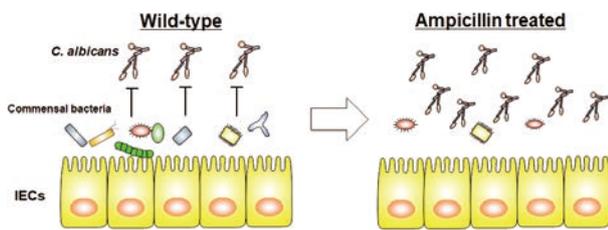


Fig 1. Commensal bacteria prevent the colonization of *C. albicans* in the gut

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

Daichi Mori¹, Yoshiyuki Goto¹

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

α 1, 2-fucosyl linkages located on the terminal carbohydrate moiety expressed on intestinal epithelial cells are catalyzed by fucosyltransferase 2 (Fut2). Epithelial α 1, 2-fucosylation is a symbiotic factor that mediates host-microbiota interactions. 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 in both mice and humans and predisposes to the development of

inflammatory diseases, such as Crohn's disease. Despite the importance of intestinal and systemic homeostasis, the molecular and cellular mechanisms underlying 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 (Fig. 2). In addition, IL-10-producing CD4⁺ T cells negatively regulate intestinal epithelial α 1, 2-fucosylation (Fig. 2). 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.

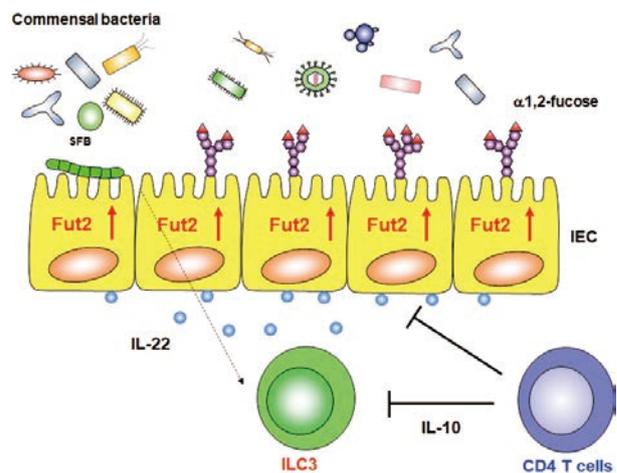


Fig 2. The inductive and regulatory mechanism of epithelial α 1, 2-fucose

3. Resident microbes in the gut induce host antibody responses

Bonita McCuaig¹, Tomone Ikai¹, Momoko Kaneko¹, Yoshiyuki Goto¹

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

Fecal IgA levels, as well as the number of T helper 17

(Th17) cells and intraepithelial lymphocytes (IELs) in germfree mice, are dramatically reduced compared with wild-type mice, indicating that resident commensal microbes stimulate the host immune system in the gut. Although segmented filamentous bacteria (SFB) have been identified as one of the commensal bacteria capable of inducing IgA, the mechanism by which SFB stimulates IgA induction is still unclear. In addition, the characteristics of microbes that induce IgA are not yet fully understood. This study aims to identify microbes, especially resident bacteria and fungi, that induce IgA in the gut using next-generation sequencing techniques combined with immunological and bacteriological approaches. We also investigate whether commensal microbes stimulate antigen-specific mucosal IgA and systemic IgG immune responses. These studies will lead to the development

of novel strategies for optimal mucosal vaccines.

Publications

- 1) Amatsu S, Matsumura T, Morimoto C, Keisham S, Goto Y, Kohda T, Hirabayashi J, Kitadokoro K, Katayama T, Kiyono H, Tateno H, Zuka M, Fujinaga Y. *Nat Commun.* 16: 10442, 2025
- 2) Suzuki K#, Goto Y#, Otomo A, Shimizu K, Abe S, Moriyama K, Yasuda S, Hashimoto Y, Kurushima J, Mikuriya S, Imai FL, Adachi N, Kawasaki M, Sato Y, Ogasawara S, Iwata S, Senda T, Ikeguchi M, Tomita H, Iino R, Moriya T, Murata T. Na⁺-V-ATPase inhibitor curbs VRE growth and unveils Na⁺ pathway structure, *Nat Struct Mol Biol.* 32: 450-458, 2025 (# Contributed equally)

Project for Control of Infectious Diseases

高屋 P I (感染症制御開発) プロジェクト

Summary (研究概要)

Excessive antibiotic exposure can induce bacteria into a dormant state, enabling survival in harsh environments. This phenomenon, attributed to “persister” cells, contributes significantly to the emergence of drug-resistant strains and the pathogenesis of intractable conditions such as chronic bacterial infections. In this project, we aim to elucidate the molecular mechanisms regulating persister formation and maintenance, utilizing models of systemic and persistent infections, to facilitate the development of novel compounds targeting dormant cells. In the current fiscal year, we established a methodology for analyzing antibiotic-exposed bacteria at the single-cell level using fluorescently labeled antimicrobial compounds and fluorescent protein expression. This approach allowed us to identify novel roles of key factors involved in bacterial survival and recovery.

細菌感染症で用いられる抗菌薬を細菌に曝露すると休眠状態となり、過酷な環境でも生存することができる。この現象は薬剤耐性菌出現や細菌持続感染などの難治性細菌感染症の原因ともなる。本プロジェクトでは、病原細菌の全身感染症発症と持続感染機構研究を通して休眠制御の分子機構を解明し、休眠細胞を制御できる新たな化合物の創出を目指している。本年度は、蛍光標識した抗菌化合物や蛍光タンパク質発現株を利用して、抗菌薬に曝露された細菌を一細胞レベルで解析する手法を確立した。この手法により、細菌の生存と回復に関わる新規因子の役割を提示した。

Professor

Akiko Takaya

教授 高屋 明子

1. The Role of DnaJ in Regrowth after Fluoroquinolone Exposure

Masato Suzuki¹, Hiroki Takahashi^{2,3}, Akiko Takaya^{1,2,3}

¹ Department of Infection Control Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan

² Medical Mycology Research Center, Chiba University

³ Plant Molecular Science Center, Chiba University, Japan

Fluoroquinolones are indispensable in clinical practice, yet the rising prevalence of resistance remains a critical global concern. Prior to the acquisition of stable genetic resistance, bacterial survival strategies that enable persistence under lethal antibiotic concentrations likely facilitate the subsequent emergence of resistance. Antibiotic-induced protein aggregates (PAs) have been implicated in the transition to

dormancy, with current models suggesting that chaperone-mediated PA disaggregation upon antibiotic removal is essential for regrowth. Although PA clearance involves the DnaK chaperone system, the specific contribution of its co-chaperone, DnaJ, remains poorly defined. In this study, we investigated the role of DnaJ by analyzing PA dynamics in a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *dnaJ* deletion mutant during and after ciprofloxacin (CPFX) exposure. To decouple dormancy induction from regrowth recovery, we utilized a microfluidic platform combined with time-lapse fluorescence microscopy to track individual cell fates. During CPFX exposure, intracellular PA levels in the *dnaJ* mutant were comparable to those in the wild-type strain. However, striking phenotypic differences emerged following CPFX removal. While wild-type cells effectively managed existing PAs and resumed cell division, a significant proportion of *dnaJ* mutant cells failed to divide, instead undergoing

sustained filamentous elongation. Notably, these mutant cells exhibited the de novo formation and massive accumulation of multiple PAs during the post-exposure phase. These findings challenge the prevailing model that emphasizes the disaggregation of pre-existing PAs as the primary requirement for regrowth. Instead, our data suggest that DnaJ is critical for suppressing renewed PA formation and excessive accumulation during the metabolic reactivation phase. Collectively, these results demonstrate that while DnaJ is dispensable for limiting PA formation during initial antibiotic stress, it is essential during the recovery phase to prevent proteostatic collapse and ensure the successful resumption of bacterial proliferation.

2. Autoaggregation-associated Carbapenem Tolerance Mediated by *mrkH* Inactivation Identified from a Cohort of *Klebsiella pneumoniae* Species Complex Clinical Isolates

Natsuki Yamanaka¹, Hiroki Takahashi¹, Nozomi Takahashi², Hina Saito¹, Ryoya Yamamoto¹, Yoko Kusuya², Shota Murata¹, Kazuyuki Mataushita¹, Taka-Aki Nakada¹, Akiko Takaya^{1,3,4}

¹ Department of Infection Control Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba, Japan

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

³ Plant Molecular Science Center, Chiba University, Japan

⁴ Department of Emergency and Critical Care Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

⁵ Division of Clinical Laboratory, Chiba University Hospital, Chiba, Japan

This study aimed to elucidate the phenotypic and genetic basis of carbapenem tolerance in *Klebsiella pneumoniae* species complex bloodstream isolates not harboring carbapenemase genes, with a specific focus on the role of multicellular behaviors. Fifty clinical isolates from bloodstream infections were screened for reduced susceptibility to meropenem, resulting in the selection of five carbapenemase-negative strains (MIC 1-2 mg/L) for in-depth analysis. Through whole-genome sequencing, time-kill assays, and plasmid-

based gene expression assays, coupled with phenotypic assessments of autoaggregation and biofilm formation, three of these strains were identified as carbapenem-tolerant. Two strains carrying *bla*_{DHA-1} exhibited reduced meropenem activity and enhanced survival following drug exposure. Notably, one isolate showed sustained survival associated with a frameshift mutation in *mrkH*, which led to the downregulation of *mrkA* expression and enhanced autoaggregation. Complementation with wild-type *mrkH* successfully reduced this tolerance. Furthermore, the disruption of cellular aggregates significantly decreased bacterial survival, indicating that aggregation provides critical physical protection against meropenem. These findings identify *mrkH*-linked autoaggregation as a novel mechanism of carbapenem tolerance in *Klebsiella* isolates. Overall, this study underscores the significant role of multicellular behaviors in antibiotic resilience and highlights the clinical relevance of non-carbapenemase-mediated tolerance mechanisms.

Publications

- 1) Yazawa T, Nakajima M, Takaya A, Nemoto T. Bis-Pseudoindoxyls: A compact fluorophore with red-shifted absorption and fluorescence for bioimaging applications. *Org Lett.* 27(46):12892-12897, 2025
- 2) Lu Y, Seto Y, Hara Y, Takaya A, Uchida M, Kusuya Y, Ishibashi M, Nakamura Y, Takahashi H. Comparative genomics of *Nocardia tsunamiensis* IFM 10818, a new source of the antibacterial macrolide nargenicin A. *Microbiol Spectr.* 13(12):e0122025, 2025
- 3) Kuribara T, Yuba H, Saito H, Takaya A, Ishibashi M, Nemoto T. Total synthesis and antibacterial activity of 5-geranyloxy-7h-hydroxycoumarin and murrayacoumarin A. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 73(5):484-487, 2025
- 4) Ishikawa F, Takahashi K, Takaya A, Tanabe G, Homma M, Uchihashi T. Dynamic oligomerization processes of *Bacillus subtilis* ClpP protease induced by ADEP1 studied with high-speed atomic force microscopy. *ACS Omega.* 10(7):7381-7388, 2025
- 5) Hara Y, Nakamura A, Manome T, Takaya A, Takahashi H, Ban S, Yaguchi T, Ishibashi M. A new diterpenoid, carneadiol, isolated from *Nocardia carnea* IFM 12324. *J Nat Med.* 79(2):435-440, 2025.

Project for Innate Immunity

三宅 P I (自然免疫) プロジェクト

Summary (研究概要)

Toll-like receptors (TLRs) are innate immune sensors that recognize molecular structures of pathogens. While TLRs play a critical role in the early response to infection, they also recognize host-derived molecules as endogenous ligands and induce non-infectious chronic inflammation. Our research aims to elucidate the mechanisms by which endogenous ligands such as nucleic acids activate TLRs, and to develop therapeutic strategies for TLR-driven diseases.

Toll-like receptor (TLR) は、病原体の分子構造を認識する自然免疫系の受容体である。TLR は感染の初期応答に重要な役割を果たす一方で、宿主由来の分子を内因性リガンドとして認識し、非感染性の慢性炎症を引き起こすことが知られている。我々は、核酸などの内因性リガンドが TLR を活性化するメカニズムの解明と、TLR によって誘導される疾患の治療方法開発を目指している。

Professor	Kensuke Miyake	特任教授	三宅 健介
Associate Professor	Ryutaro Fukui	特任准教授	福井 竜太郎
Research Assistant Professor	Ryota Sato	特任助教	佐藤 亮太
Assistant Clerk	Haruyo Moriya	事務補佐員	森谷 晴世

1. Anti-human TLR7 antibody for therapeutic intervention in systemic lupus erythematosus

Ryutaro Fukui^{1,12,13}, Yusuke Murakami^{1,2}, Atsuo Kanno¹, Yuji Motoi^{1,12}, Atsushi Manno³, Tomohiro Honda⁴, Shinnosuke Yamada⁴, Jun Ishiguro⁵, Takashi Kagari⁶, Kensuke Nakamura⁷, Michinori Kadokura⁷, Takashi Isobe⁸, Yoshiaki Tomimori⁹, Jun Tanaka⁴, Giorgio Senaldi¹⁰, Toshiyuki Shimizu¹¹, and Kensuke Miyake^{1,12,13}

¹ Division of Innate Immunity, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

² Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences & Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Musashino University, Tokyo, Japan

³ Discovery Research Laboratories II, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

⁴ Translational Science Department II, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

⁵ Discovery Research Laboratories V, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

⁶ Discovery Research Laboratories I, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

⁷ Modality Research Laboratories II, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

⁸ Translational Research Laboratories, Daiichi Sankyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

⁹ Translational Science, Daiichi Sankyo, Inc., Basking Ridge, NJ, United States of America

¹⁰ Clinical development, Daiichi Sankyo, Inc., Basking Ridge, NJ, United States of America

¹¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan

¹² Synergy Institute for Futuristic Mucosal Vaccine Research and Development, Chiba University, Chiba, Japan

¹³ Medical Mycology Research Center, Chiba University, Chiba, Japan

Toll-like receptor 7 (TLR7) is an endosomal sensor that

responds to both pathogen-derived and self-derived single-stranded RNA (ssRNA). Responses of TLR7 to self-derived ssRNA have been implicated in the development of autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE). TLR7 antagonists and inhibitory anti-TLR7 monoclonal antibodies (mAbs) can protect lupus-prone NZBWF1 mice from lethal nephritis. However, less is known about TLR7 dependence and activation in human SLE, as both TLR7 and TLR8 respond to ssRNA in humans. Here, we analyzed public databases and found that TLR7 gene signature scores consistently elevated across datasets, races, and SLEDAI scores compared to TLR8, suggesting a deeper involvement of TLR7 in SLE pathogenesis. To specifically inhibit human TLR7 responses, we developed inhibitory mAbs against human TLR7. Utilizing an inhibitory clone, we generated the humanized mAb, DS-7011a. DS-7011a effectively inhibited TLR7-mediated responses in plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and B cells. Furthermore, DS-7011a was internalized in a TLR7-dependent manner and accumulated in B cells, pDCs, conventional dendritic cells (cDCs), and monocytes/macrophages. In this study, we describe the generation and preclinical development of DS-7011a, which has the potential to be a therapeutic option for the treatment of SLE.

Publications

- 1) Hirano Y, Ezaki W, Sato R, Ohto U, Miyake K, Shimizu T*. Mechanistic insights into single-stranded DNA degradation by lysosomal exonucleases PLD3 and PLD4 from structural snapshots. *Nat Commun.* 2025 Dec 11;16(1):11431. doi: 10.1038/s41467-025-66261-2. PMID: 41381514.
- 2) Shibata T, Okabe-Kibe K, Chen H, Yamaguchi K, Koga D, Taoka M, Motoi Y, Sato R, Hsiao HW, Fukui R, Kaneko N, Wang Z, Li Y, Wei W, Cai Z, Furukawa Y, Nishimura EK, Kawano S, Moriyama M, Nakamura S, Miyake K*. TLR7 responses to nucleosides drive sialadenitis in Slc29a3-deficient mice. *Int Immunol.* 2025 Dec 3:dxaf073. doi: 10.1093/intimm/ dxaf073. Epub ahead of print. PMID: 41332187.
- 3) Fukui R*, Murakami Y, Kanno A, Motoi Y, Manno A, Honda T, Yamada S, Ishiguro J, Kagari T, Nakamura K, Kadokura M, Isobe T, Tomimori Y, Tanaka J, Senaldi G, Shimizu T, Miyake K*. Anti-human TLR7 antibody for therapeutic intervention in systemic lupus erythematosus. *Int Immunol.* 2025 Sep 2:dxaf046. doi: 10.1093/intimm/ dxaf046. Epub ahead of print. PMID: 40910948.
- 4) Miyake K*, Shibata T, Sato R, Fukui R. Innate immune responses to lysosomal nucleic acid stress. *J Biochem.* 2025 Jul 31;178(2):89-96. doi: 10.1093/jb/mvaf011. PMID: 40037613; PMCID: PMC12319223.
- 5) Matsuo-Dapaah J, Alshaweesh J, Lee MSJ, Hayashi T, Dash R, Kuroda M, Tainaka K, Ozawa M, Kuratani A, Yamamoto M, Liu K, Fukui R, Miyake K, Kobiyama K, Rénia L, Ishii KJ, Coban C*. IFN γ -inducible Gbp4 and Irgb6 contribute to experimental cerebral malaria pathology in the olfactory bulb. *mBio.* 2025 Aug 13;16(8):e0124925. doi: 10.1128/mbio.01249-25. Epub 2025 Jul 3. PMID: 40607809; PMCID: PMC12345229.

Candida phenome project

知花 P I (カンジダフェノーム) プロジェクト

Summary (研究概要)

Pathogenic yeasts, *Candida glabrata* and *Candida auris*, have attracted increasing attention as major challenges in infectious disease treatment due to the recent rise in antimicrobial resistance. In particular, *C. auris* has caused outbreaks in healthcare settings worldwide, and its control and prevention have become an urgent international public health issue. To address these challenges, our laboratory has utilized an original genome-wide mutant platform of *C. glabrata* to advance the development of novel antifungal agents and to identify and functionally characterize genes involved in pathogenicity.

In November 2025, we were invited to present our research on antifungal drug development at a symposium of APCCMI 2025 (The 20th Asia Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection) held in Bangkok. In fiscal year 2025, we published a paper describing CRISPR-Cas9-based genetic engineering technologies applied to four pathogenic *Candida* species, including *C. auris*. In addition, we conducted comparative analyses of the pathogenicity of *C. auris* and *C. glabrata*, with particular emphasis on evaluating the efficacy of antifungal agents against *C. auris* following phagocytosis by macrophages. This study provided new insights into how adaptation mechanisms within the macrophage environment influence antifungal resistance and pathogenicity. Furthermore, we identified growth-inhibitory compounds against *C. auris* and are continuing studies to elucidate their mechanisms of action and assess potential side effects.

In terms of education, we accepted one research student and provided research training to foster the development of early-career researchers. Ongoing research projects are supported by external funding, including one Grant-in-Aid for Scientific Research (B), two Grants-in-Aid for Scientific Research (C), one Grant-in-Aid for Exploratory Research, one JSPS Research Fellowship, one AMED grant, and three private research grants. Using these funds, we have promoted functional analyses of previously uncharacterized genes involved in pathogenicity. In addition, we have advanced analyses of microbial structural features and pathogenesis through the development of electron microscopy-based techniques, collaborative research, technical training, and research support.

As outcomes of these efforts, we published two original research articles led by our laboratory and one co-authored article, thereby providing foundational insights that contribute to the advancement of research in infectious disease therapeutics.

病原性酵母である *Candida glabrata* および *Candida auris* は、近年の薬剤耐性菌の増加に伴い、感染症治療における重要な課題として注目されている。特に *C. auris* は、世界各地の医療現場においてアウトブレイクが報告されており、その制御と対策は国際的にも喫緊の課題となっている。これらの問題に対応するため、本研究室では独自に構築した *C. glabrata* の全遺伝子改変株プラットフォームを活用し、新規抗真菌薬の開発ならびに病原性に関与する遺伝子の同定と機能解析を進めてきた。

2025年11月にバンコクで開催されたAPCCMI 2025 (The 20th Asia Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection) のシンポジウムに招待され、抗真菌薬開発に関する研究成果を発表した。令和7年には、*C. auris* を含む病原性 *Candida* 属4菌種を対象としたCRISPR-Cas9を用いた遺伝子改変技術に関する論文を発表した。また、*C. auris* と *C. glabrata* の病原性を比較解析し、特にマクロファージ貪食後における *C. auris* に対する抗真菌薬の薬効評価を行った。本研究により、マクロファー

ジ内環境への適応機構が薬剤耐性および病原性に及ぼす影響について新たな知見を得た。さらに、*C. auris*に対する生育阻害化合物を見出し、その作用機序の解明および副作用評価に関する研究を継続している。

教育面では研究生1名を受け入れ、研究指導を通じて若手研究者の育成を行った。外部資金としては、科研費基盤研究B(1件)、基盤研究C(2件)、萌芽研究(1件)、特別研究員事業(1名)、AMED(1件)、民間助成金(3件)による研究課題が進行中である。これらの研究資金を活用し、病原性に関与する未知遺伝子群の機能解明を推進した。また、微生物の構造的特徴と病態形成に関する解析について、電子顕微鏡を用いた技術開発、共同研究、技術者教育および研究支援を展開した。

これらの成果として、研究室主体による原著論文2報および共著論文1報を発表し、感染症治療研究の発展に資する基盤的知見を提供した。

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

CRISPR-Cas9 RNP-mediated deletion of *ERG25* in non-*albicans* *Candida* species including *Candida auris*

Michiyo Okamoto, Kaname Sasamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Zhao Fujiang, Masashi Yamaguchi and Hiroji Chibana

The infections caused by non-*albicans* *Candida* (NAC) species, such as *Candida glabrata* and *Candida tropicalis*, increased recently. *Candida auris* has also emerged as a multidrug-resistant species, posing a serious global health threat. To treat the increasing number of drug-resistant fungi, it is essential to advance basic research such as genetic manipulation techniques for NAC species to continuously develop antifungal agents with new modes of action. The advancements using the CRISPR-Cas9 system have improved genetic analysis of NAC species. The RNP-based system, where the Cas9-gRNA complex is assembled *in vitro* and introduced into cells, simplifies genetic modifications by avoiding the need for species-specific plasmids. Previous research identified *ERG25* gene, encoding C-4 sterol methyl oxidase, as a promising antifungal target in *C. glabrata*. This

study demonstrated that deleting *ERG25* homologue in *C. glabrata* and *C. auris* using the RNP-based CRISPR-Cas9 system. The deletion of *ERG25* in *C. auris* and *C. glabrata* indicated that Erg25 is essential for survival within the host in these pathogenic yeasts. We also have successfully deleted the *ERG25* alleles in *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, demonstrating the effectiveness of using both the CRISPR-Cas9 and Cre-loxP systems in these species for the first time.

Fungicidal Efficacy of Amphotericin B and Micafungin Against *Candida auris* Within Macrophage

Fujiang Zhao, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Michiyo Okamoto, Kaname Sasamoto, Masashi Yamaguchi, and Hiroji Chibana

Candida auris poses a significant therapeutic challenge due to its resistance to azoles echinocandins and amphotericin B (AMPH-B). While *C. auris* strains are known to exhibit high survival rates within macrophages the susceptibility of phagocytosed cells to antifungal agents remains unclear. To address this, we evaluated the fungicidal effects of AMPH-B

and micafungin (MCFG) on *C. auris* strains from four distinct clades within macrophages. Our results suggested that both AMPH-B and MCFG retain fungicidal activity against the *C. auris* strains after being phagocytosed by macrophages providing insights into the intracellular activity of these antifungal agents.

Publications

- 1) The transcription factor CgHaa1 plays a role in virulence of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. Salazar SB, Pedro NA, Silva S, Mil-Homens D, Pimenta A, Wlodarczyk M, Szwed-Georgiou A, Sasamoto K, Chibana H, Michlewska S, Rudnicka K, Fialho A Mira NP. FEMS Yeast Res. Jan 3025:foaf054. doi: 10.1093/femsyr/foaf054. 2025.
- 2) CRISPR-Cas9 RNP-mediated deletion of *ERG25* in non-albicans *Candida* species including *Candida auris*.

Michiyo Okamoto, Kaname Sasamoto, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Zhao Fujiang, Masashi Yamaguchi, Hiroji Chibana. Medical Mycology Journal. 66(2):35-43. doi: 10.3314/mmj.24-00023. 2025

- 3) Fungicidal Efficacy of Amphotericin B and Micafungin Against *Candida auris* Within Macrophage. Fujiang Zhao, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Michiyo Okamoto, Kaname Sasamoto, Masashi Yamaguchi, and Hiroji Chibana. Medical Mycology Journal. Med Mycol J. 66(2):45-50. doi: 10.3314/mmj.24-00029. 2025.

Invited lecture

- 1) Antifungal Development with Molecular Biology. Hiroji Chibana, The 20th Asia Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection. Bangkok, Thailand. 2025 11 2-4.

Project to Link Basic Sciences and Clinical Researches

渡邊 P I (臨床感染症) プロジェクト

Summary (研究概要)

We have been conducting basic and clinical research, primarily on fungal infections, while examining patients in the Specialty Clinic for Fungal Infections at the University Hospital. Working as the Reference Center for fungal diseases, we were designated as an Advanced Progressive Laboratory by the Japanese Society for Infectious Diseases and the Japanese Society for Clinical Microbiology, and we provide consulting services on fungal diseases from all over the country (ca. 400 cases in 2024). Regarding our research activities, we are investigating various aspects of systemic mycoses in collaboration with numerous universities, hospitals, and medical institutions, including the NIID, JIHS. The main research topics are:

The mechanisms and the epidemiology of antifungal resistance of *Candida* sp., *Aspergillus* sp., and *Scedosporium* spp.

The development of their diagnostic methods and new treatment strategies.

The SATREPS project between São Paulo State University of Campinas, Brazil (UNICAMP), and MMRC was completed in 2022; however, we continue a collaborative study with UNICAMP, including the acceptance of Brazilian students.

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, MIC測定, 血清診断(輸入真菌症, スエヒロタケなどを含む), 検体からのPCR検査などの特殊検査を受け入れるとともに, 並行して診療サポートも行なっており, 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」に指定されている。2025年の全国の医療機関からの依頼件数は400件あまりに達した。この診療サポートにより全国の医療機関によるネットワークが形成され, 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つとともに, 多くの共同研究を生む母体ともなっている。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国際医療福祉大学, 東京理科大, NHO東京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, 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。中でもカンジダ症, アスペルギルス症およびスケドスポリウム症の原因菌について, 耐性株の疫学と耐性機構や感染機構, 診断法や新たな治療戦略についての研究を進めている。

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)は2022年に事業終了したが, その後もブラジルから留学生を受け入れる等, 積極的に研究交流を継続している。

Professor (R06.10 ~)	Akira Watanabe	教 授	渡 邊 哲
Asistant professor (R06.10 ~)	Hidetaka Majima	助 教	馬 嶋 秀 考
Research Assistant Professor	Tepei Arai	特 任 助 教	新 居 鉄 平
Grand Fellow	Hideaki Taguchi	グランドフェロー	田 口 英 昭
Research Promotion Technician	Yukiko Tsuchiya	技 術 補 佐 員	土 屋 由 紀 子

Research Promotion Technician Yasuko Koga
Research Promotion Technician Kyoko Inoue

技術補佐員 古賀 育子
技術補佐員 井上 京子

1. RttA, a Zn₂-Cys₆ transcription factor in *Aspergillus fumigatus*, contributes to azole resistance.

Toyotome T, Takahashi H, Watanabe A, Hagiwara D.

Aspergillus fumigatus is a common environmental fungus and the leading cause of aspergillosis, an opportunistic infection in humans and animals. The mortality rate of aspergillosis remains high despite antifungal treatments, with azole antifungals, such as voriconazole, being the primary treatment. However, resistance to azoles is increasing, partly because of environmental exposure to agricultural fungicides. In a previous study, we identified the protein RttA to be involved in azole susceptibility. To further understand the role of RttA in azole resistance, we conducted RNA-Seq analysis and functional analyses by constructing RttA deletion and overexpression strains. The transcriptome data revealed that RttA contains a Zn₂-Cys₆ domain and may function as a transcription factor. Furthermore, six genes, including a γ -glutamyl transpeptidase gene (*ggtA*) and a homolog of factor C (*facC*), were shown to be putatively regulated by RttA. These findings suggest that RttA is involved in azole resistance by regulating several genes, highlighting its potential as a target for developing antifungal strategies against *A. fumigatus*.

2. Cyp51A Dysfunction Leads to Higher Susceptibility to Azoles Including Fluconazole in *Aspergillus fumigatus*.

Majima H, Arai T, Maruguchi N, Kamei K, Watanabe A.

Azoles target Cyp51A and Cyp51B in *Aspergillus fumigatus*. Mutations in *cyp51A* are known as the primary mechanisms of azole resistance. However, not all of them cause azole resistance. Among them, mutations related to improved susceptibility have not been reported so far. We found that two isolates that carry frameshift or nonsense mutations in

cyp51A are more susceptible to azoles, even to fluconazole (FLCZ) (IC₅₀: frameshift, 32 μ g/mL; nonsense, 32 μ g/mL) compared to other azole-susceptible strains (IC₅₀: > 256 μ g/mL). We investigated the contribution of these two mutations to azole sensitivity and their effect on Cyp51A functions.

We transformed an experimental strain, AfS35, by replacing *cyp51A*^{WT} with each of the mutated *cyp51A* and measured its MICs to azoles. We also evaluated the functions of mutated Cyp51A after suppression of Cyp51B, based on the notion that Cyp51A and Cyp51B complement each other.

Induction of mutated *cyp51A* in AfS35 led to higher susceptibility to FLCZ (IC₅₀: frameshift, 32-64 μ g/mL; nonsense, 32 μ g/mL). Transformants carrying either of the mutated *cyp51A* could not survive when *cyp51B* was suppressed, indicating that these *cyp51A* mutations result in Cyp51A dysfunction. Furthermore, a *cyp51A*-deleted mutant strain also showed increased susceptibility to FLCZ (IC₅₀: 32 μ g/mL), similar to *cyp51A* dysfunctional strains, while a *cyp51B*-deleted mutant strain showed unchanged susceptibility (IC₅₀: > 256 μ g/mL) from AfS35.

It was suggested that FLCZ can inhibit Cyp51B rather than Cyp51A and that this unequal inhibition leads to higher azole susceptibility of the two isolates harbouring Cyp51A dysfunction.

3. Genomic Analysis of Terbinafine Resistance in *Microsporum canis* Isolated from a Feline Dermatophytosis.

Noji H, Watanabe A, Makimura K, Kano R.

Terbinafine (TBF)-resistant anthropophilic dermatophytes have recently been isolated from human patients around the world. Almost all TBF-resistant strains of dermatophytes have the amino acid substitution in the squalene epoxidase (*SQLE*) gene. In this study, we performed whole genome

sequencing of a TBF-resistant *Microsporium canis* strain (designated 47C) to clarify the mechanisms underlying TBF-resistance conferred by genetic mutations. Strain 47C, isolated from a cat with feline dermatophytosis in China in 2018, was previously identified as the first TBF-resistant *M. canis*. Approximately 2.5 µg of genomic DNA sample was extracted from growing mycelium of 47C and sequenced using a PacBio Sequel IIe system. We mapped the 23.2 Mb genome against the reference *M. canis* CBS 113480 strain (assembly ASM15114v1 in GenBank) and identified 1,455 genetic variations, including substitutions, insertions and deletions (INDELs). Our analysis initially focused on whether mutations existed in the *SQLE* gene, which is known to encode *SQLE*. We discovered a T→C mutation at 1183 bp (F395L mutation) in the putative *SQLE* gene of strain 47C. In contrast, seven TBF-susceptible strains exhibited no mutations in their *SQLE* genes. The F395L mutation likely reduces the affinity of TBF for *SQLE* in *M. canis*, similar to the F397L mutation found in TBF-resistant *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*.

Publications in English

Original articles

- 1) Toyotome T, Takahashi H, Watanabe A, Hagiwara D: RttA, a Zn²⁺-Cys⁶ transcription factor in *Aspergillus fumigatus*, contributes to azole tolerance. *Microbiol Spectr*, 13(10), 2025.
- 2) Arai T, Majima H, Maruguchi N, Ban S, Yaguchi T, Watanabe A*. Report of four azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates in Japan with TR₃₄ or TR₄₆ mutations referred to a mycosis reference center for examination. *Med Mycol J* 66(3):131-137, 2025.
- 3) Majima H, Arai T, Maruguchi N, Kamei K, Watanabe A*. Cyp51A dysfunction leads to higher susceptibility to azoles including fluconazole in *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 68(4):e70052, 2025.
- 4) Nojo H, Watanabe A, Makimura K, Kano R. Genomic analysis of terbinafine resistance in *Microsporium canis* isolated from a feline dermatophytosis. *Med Mycol J* 66(1):17-20, 2025.

Case reports

- 1) Ohyama K, Hida Y, Kondo Y, Watanabe A: Pulmonary fungus ball due to *Scedosporium apiospermum* mimicking aspergilloma: a case report. *Infection*, in press.
- 2) Nakanishi Y, Saito T, Akieda S, Nishino R, Watanabe M, Kitaguchi S, Watanabe A, Sugahara F: Allergic Bronchopulmonary Mycosis Caused by *Nigrosporus vinosus*: A Case Report. *Intern Med*, in press.
- 3) Tashiro H, Kuwahara Y, Kurihara Y, Yaguchi T, Ban S, Watanabe A, Takahashi K: Remarkable response to dupilumab in refractory allergic bronchopulmonary mycosis with a giant mucus plug due to *Aspergillus udagarwae*. *Respir Investig* 63(6):1037-1041, 2025.
- 4) Ito Y, Miwa S, Watanaba A, Shirai M: Clinical characterization of immunocompetent patients with *Scedosporium* detected in respiratory samples: A Case series. *Respir Med Case Rep* 57: 102256, 2025.
- 5) Nakamoto K, Hagiya H, Fukushima S, Oguni K, Yokoyama Y, Iio K, Hirano S, Yaguchi T, Ban S, Watanabe A, Okunobu H, Suyama A, Kawaguchi M, Sazumi Y, Otsuka. Cerebellar abscess caused by *Cladophialophora bantiana* involving an elderly Japanese woman. *J Mycol Med* 35(2):101548, 2025.
- 6) Inaba T, Minami K, Ishioka H, Sekiguchi K, Watanabe A, Hatakeyama S. Isolated brain abscess caused by *Aspergillus tubingensis* in a patient with alcoholic liver cirrhosis. *J Infect Chemother* 31(5):102691, 2025.
- 7) Fukushima S, Hagiya H, Ban S, Yaguchi T, Watanabe A, Tanaka S, Sugimoto S. Secondary pneumothorax due to *Aspergillus welwitschiae* in a lung transplant recipient. *Int J Infect Dis* 154:107863, 2025.
- 8) Miyashita A, Shibata M, Funakoshi H, Tame T, Mori T, Yaguchi T, Ban S, Watanabe A, Horikoshi Y. First report of catheter-related bloodstream infection caused by *Filobasidium magnum*. *Pediatr Infect Dis J* 44(4):e148-e149, 2025.

Project for Infection Control and Prevention

石和田 P I (感染症制御) プロジェクト

Summary (研究概要)

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

インフルエンザ菌, 肺炎球菌, B群レンサ球菌の病原性解析ならびに各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. 黄色ブドウ球菌, A群レンサ球菌, 大腸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.

Professor	Naruhiko Ishiwada	教授	石和田稔彦
Assistant Professor	Noriko Takeuchi	特任助教	竹内典子
Research Technician	Misako Ohkusu	技術職員	大楠美佐子
Adjunct Research Technician	Mihoko Ohata	非常勤技術職員	大畑美穂子
Visiting Professor	Katsuhiko Kamei	特任教授	亀井克彦
Visiting Lecturer	Akio Toh-E	特別協力研究員	東江昭夫

1. Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in children in Japan (2014-2022) : Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and COVID-19 pandemic

Takeuchi N¹, Chang B², Ishiwada N¹, Cho Y³, Nishi J⁴, Okada K⁵, Fujieda M⁶, Oda M⁷, Saitoh A⁸, Hosoya M⁹, Ishiguro N¹⁰, Takahashi K¹¹, Ozawa Y¹¹, Suga S¹²

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

² Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

³ Division of Pediatric Infectious Disease, Department of Pediatrics, Okinawa Prefectural Nanbu Medical Center and Children's Medical Center

⁴ Department of Microbiology, Kagoshima University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

⁵ Fukuoka Nursing College

⁶ Department of Pediatrics, Kochi Medical School, Kochi University

⁷ Okayama University

⁸ Department of Pediatrics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

⁹ Department of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine

¹⁰ Department of Infection Control and Prevention, Hokkaido University Hospital

¹¹ Biostatistics section, Clinical Research Center, Chiba University Hospital

¹² Department of Pediatrics, National Hospital Organization Mie National Hospital

Background: Nationwide surveillance was conducted in Japan

to clarify the status of pediatric invasive pneumococcal diseases (IPD) after introducing a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13).

Methods: Detailed clinical and epidemiologic information of IPD cases in children aged <15 years was collected from 10 of 47 prefectures in Japan from January 2014 to December 2022. *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from sterile body sites were analyzed including capsular serotypes, multi-locus sequence typing (MLST), and antimicrobial susceptibility testing. The serotype-specific IPD incidence was calculated by imputing the serotypes for missing isolates to serotypes assumed based on the distribution of known serotypes.

Results: During the study period, 1033 IPD cases were reported. The incidence rate of total IPD in patients aged <5 years from 2014 to 2019 declined by 21.3% compared with the rate from 2011 to 2013 before the introduction of PCV13. Compared with the incidence of total IPD from 2014 to 2019 and from 2020 to 2022, during the COVID-19 pandemic, the incidence of IPD among children aged <5 years declined by 49.7%. In total, 932 IPD cases were identified as capsular serotypes. Among children aged <5 years, the most frequent serotype was 24F, followed by 15A, 12F, 15C, 15B, and 10 A. Since 2014, after replacement with PCV13 in 2013, the rate of IPD by PCV13 minus PCV7 serotypes decreased, and non-PCV13 serotypes further increased. The serotype causing IPD in children aged <5 years, with PCV15-unique serotypes and PCV20-unique serotype were 8.6% and 22.5%, respectively. In terms of antimicrobial susceptibility, strains resistant to penicillin and cefotaxime decreased, whereas the meropenem non-susceptible strains increased in the post-PCV13 era.

Conclusion: PCV13 introduction and the COVID-19 pandemic have had a significant impact on pediatric IPD in Japan. It is important to continuously monitor the epidemiological characteristics of pediatric IPD after the introduction of PCV20.

2. Multicentre, prospective, single-arm, non-controlled, open-label trial to evaluate the safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in paediatric patients with atopic dermatitis undergoing dupilumab therapy: a protocol

Kobayashi T¹, Sato H¹, Nagasawa K¹, Hayata E¹, Tanaka S¹, Kurihara E¹, Yamamoto T¹, Nakano T¹, Ozawa Y², Yamaide F³, Inoue Y^{4,5}, Suzuki S⁶, Arima T⁷, Tomiita M⁸, Hamada H¹, Ishiwada N⁹

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

² Biostatistics Section, Clinical Research Centre, Chiba University Hospital

³ Department of Pediatrics, International University of Health and Welfare Narita Hospital

⁴ Department of General Medical Science, Graduate School of Medicine, Chiba University

⁵ Department of Pediatrics, Eastern Chiba Medical Center

⁶ Department of Pediatrics, National Hospital Organization Shimoshizu National Hospital

⁷ Department of Pediatrics, Kimitsu Chuo Hospital

⁸ Department of Allergy and Rheumatology, Chiba Children's Hospital

⁹ Department of Infectious Disease, Medical Mycology Research Center, Chiba University

Abstract

Introduction: Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin condition that impairs the quality of life of affected paediatric patients and their families. Dupilumab, an antagonist of the shared alpha chain subunit of the cytokines interleukin-4 and interleukin-13, has revolutionised the management of moderate-to-severe AD by effectively targeting type 2 inflammation. However, live attenuated vaccines, including live attenuated influenza vaccines (LAIVs), are contraindicated during dupilumab therapy owing to limited safety data. This restriction poses challenges to immunisation strategies, particularly in paediatric populations. This study aims to evaluate the safety and efficacy of LAIV in paediatric patients with AD undergoing

dupilumab therapy.

Method and analysis: This multicentre, prospective, single-arm, open-label trial will enrol 50 paediatric patients aged 2-18 years with AD undergoing dupilumab treatment. The participants will receive intranasal LAIV, followed by a 25-week observation period after vaccination. The primary outcome is the proportion of participants with a four-fold or greater increase in haemagglutination inhibition titres against influenza strains A(H1N1), A(H3N2) and B at 4 weeks post vaccination. The secondary outcomes include the incidence of influenza and systemic or local adverse events, such as injection site reactions, fever and other influenza-like symptoms observed within 4 weeks of vaccination. Exploratory endpoints include the evaluation of immunosuppressive markers such as neutrophil counts, lymphocyte subsets and serum immunoglobulin G levels. Safety analyses will assess the frequency of each adverse event, whereas efficacy analyses will focus on immunogenicity and influenza incidence during the 25-week follow-up period. This study aims to provide critical safety and immunogenicity data to guide immunisation strategies in biologically treated paediatric patients with AD.

Ethics and dissemination: This study complies with the principles of the Declaration of Helsinki and received ethics approval from the Institutional Review Board of Chiba University Hospital as a specified clinical trial. Informed consent and assent will be obtained as appropriate based on the participants' ages. These findings will be disseminated through peer-reviewed journals and scientific conferences to inform clinical vaccination strategies for biologically treated populations.

Trial registration number: jRCTs031240442.

3. Nationwide surveillance of bacterial pathogens isolated from children by the surveillance committee of the Japanese society of chemotherapy, Japanese association for infectious diseases, and Japanese society for clinical microbiology between April 2021 and March 2024: General overview of pathogenic antimicrobial susceptibility

Ishiwada N¹, Nishi J², Fujimaki K³, Takahashi S³, Matsumoto T³, Sato J³, Watanabe M⁴, Kakuya F⁵, Oikawa

J⁶, Mori T⁷, Takayanagi R⁸, Yamaguchi Y⁹, Hoshino T¹⁰, Shinjoh M¹¹, Miyashita H¹², Tajima T¹², Funakoshi H¹³, Narabayashi A¹⁴, Oishi T¹⁵, Okano R¹⁶, Okada T¹⁷, Furuno K¹⁸, Tanaka Y¹⁹, Ishii S²⁰, Yamatou T²¹

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

² Department of Microbiology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

³ The Surveillance Committee of JSC, JAID, JSCM

⁴ MicroSKY Lab, Inc

⁵ Department of Pediatrics, Furano Kyokai Hospital

⁶ Department of Pediatrics, Teine-Keijinkai Hospital

⁷ Department of Pediatrics, NTT Medical Center Sapporo

⁸ Department of Pediatrics, Tohoku Rosai Hospital

⁹ Department of Pediatrics, Infection and Allergy, NHO Tochigi Medical Center

¹⁰ Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital

¹¹ Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine

¹² Department of Pediatrics, Hakujikai Memorial Hospital

¹³ Division of Infectious Diseases, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center

¹⁴ Department of Pediatrics, Kawasaki Municipal Hospital

¹⁵ Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School Hospital

¹⁶ Department of Pediatrics, Hiroshima City Funairi Citizens Hospital

¹⁷ Department of Pediatrics, Shikoku Medical Center for Children and Adults

¹⁸ Department of General Pediatrics and Interdisciplinary Medicine, Fukuoka Children's Hospital

¹⁹ Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University of Medicine

²⁰ Department of Pediatrics, Miyazaki Prefectural Miyazaki Hospital

²¹ Department of Pediatrics, Kanoya Medical Center

Abstract

A nationwide surveillance program was conducted in Japan between April 2021 and March 2024 to assess the antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*

influenzae, and *Moraxella catarrhalis* in pediatric patients aged <15 years with respiratory tract infections. A total of 1498 clinical isolates were collected from 18 medical institutions. Among 384 *S. pneumoniae* isolates, vaccine serotype coverage was 4.4% for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine, 9.1% for the 15-valent pneumococcal conjugate vaccine, and 30.2% for the 20-valent pneumococcal conjugate vaccine. Serotype 35B was the most frequently isolated serotype. The proportion of *S. pneumoniae* isolates with penicillin G minimum inhibitory concentration ≥ 0.125 $\mu\text{g/mL}$ increased compared with the 2017 survey, with serotypes 23A and 15A being the most common among less susceptible penicillin strains. Among 530 *H. influenzae* isolates, 9.2% were β -lactamase-producing and 35.3% were β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant (BLNAR) strains, indicating a rise in BLNAR prevalence compared with the 2017 survey. Almost all of the *H. influenzae* isolates (98.3% [521/530]) were non-encapsulated, and no capsular type b strain was detected. All 584 *M. catarrhalis* isolates were β -lactamase-producing strains, and one macrolide-resistant strain was identified for the first time in our surveillance program. These findings underscore the ongoing shifts in antimicrobial resistance and serotype distribution and provide information that will inform future treatment and prevention strategies.

Publications

- 1) Takeuchi N, Chang B, Ishiwada N, Cho Y, Nishi J, Okada K, Fujieda M, Oda M, Saitoh A, Hosoya M, Ishiguro N, Takahashi K, Ozawa Y, Suga S. Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in children in Japan (2014-2022): Impact of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and COVID-19 pandemic. *Vaccine*. 54:127138, 2025
- 2) Ito Y, Yamagishi T, Ikenoue C, Ishiwada N, Ito K, Iwatani S, Ouchi K, Kawana K, Shimizu H, Shinjoh M, Takeuchi N, Tsugawa T, Funaki T, Furuichi M, Hoshino T, Mikamo H, Miyairi I, Moriuchi H, Morioka I, Yamagishi Y, Mori M. Clinical Practice Guidelines for the Management of Congenital Syphilis in Japan, 2023: Executive Summary. *Pediatr Infect Dis J*. 44(3):e90-e94, 2025
- 3) Kobayashi T, Sato H, Nagasawa K, Hayata E, Tanaka S, Kurihara E, Yamamoto T, Nakano T, Ozawa Y, Yamaide F, Inoue Y, Suzuki S, Arima T, Tomiita M, Hamada H, Ishiwada N. Multicentre, prospective, single-arm, non-controlled, open-label trial to evaluate the safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in paediatric patients with atopic dermatitis undergoing dupilumab therapy: a protocol. *BMJ Open*. 15(8):e101050, 2025
- 4) Mori M, Ito Y, Ishiwada N, Ito K, Shinjoh M, Tsugawa T, Funaki T, Furuichi M, Hoshino T, Miyairi I, Kondo T, Hinoki A, Wada M, Okada K, Korematsu S, Tanuma N, Hasegawa H, Hosoi K, Yoshizaki K, Ishige M; Working Group for 'Guidelines for the use of palivizumab in Japan for additional indications'. Risks and prevention of severe respiratory syncytial virus infection among infants and children with pulmonary hypoplasia, airway stenosis, congenital esophageal atresia, inborn errors of metabolism, or neuromuscular diseases in Japan. *J Infect Chemother*. 31(3):102588, 2025
- 5) Yasui S, Toki T, Ito T, Nonoda Y, Hirata Y, Ishiwada N, Ishikura K. First report of pediatric bacterial meningitis caused by *Haemophilus influenzae* serotype e in Japan: A case report. *Pediatr Int*. 67(1):e70217, 2025
- 6) Okumura N, Yamamoto R, Akazawa-Kai N, Tsuge K, Ohkusu M, Ishiwada N, Itoh N. Bacterial enteritis caused by *Salmonella* Kedougou after returning from Thailand: A case report. *J Infect Chemother*. 31(4):102625, 2025
- 7) Niwa T, Matsumoto T, Ohkusu M, Ishiwada N, Fukushima K, Hiramoto S, Uchida A, Tsunekawa K, Oshima K, Kimura T. Invasive pneumococcal disease caused by CO₂-dependent *Streptococcus pneumoniae* serotype 24F sequence type 162: A case report. *J Infect Chemother*. 31(4):102653, 2025
- 8) Watanabe T, Hoshino T, Yamamoto S, Kusano T, Mori H, Takeuchi N, Ohkusu M, Ishiwada N. Analysis of toxin-producing and antiseptic resistance genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*. 53(4):448-452, 2025
- 9) Hoshino T, Takeuchi N, Okada H, Takahashi K,

- Hirose S, Nagasawa K, Kitazawa K, Igarashi T, Asano T, Obinata K, Ishiwada N; Chiba Pediatric Infectious Disease Conference. Clinical features of pediatric invasive *Escherichia coli* disease: A study at seven facilities in Chiba prefecture in Japan. *J Infect Chemother.* 31(11):102825, 2025
- 10) Yokoyama K, Okamoto A, Ohkusu M, Ishiwada N. False-Positive Detection of *Haemophilus influenzae* by a Multiplex PCR Panel in a Neonate With Late-Onset Group B Streptococcal Bacteremia. *Cureus.* 17(6):e86997, 2025
- 11) Ishiwada N, Nishi J, Fujimaki K, Takahashi S, Matsumoto T, Sato J, Watanabe M, Kakuya F, Oikawa J, Mori T, Takayanagi R, Yamaguchi Y, Hoshino T, Shinjoh M, Miyashita H, Tajima T, Funakoshi H, Narabayashi A, Oishi T, Okano R, Okada T, Furuno K, Tanaka Y, Ishii S, Yamatou T. Nationwide surveillance of bacterial pathogens isolated from children by the surveillance committee of the Japanese society of chemotherapy, Japanese association for infectious diseases, and Japanese society for clinical microbiology between April 2021 and March 2024: General overview of pathogenic antimicrobial susceptibility. *J Infect Chemother.* 31(10):102812, 2025
- 12) Okaba K, Motomura A, Saito N, Yamaguchi K, Ishii N, Hara S, Ohkusu M, Takeuchi N, Ishiwada N, Yajima D. A case of suspected transmission of group A Streptococcus from a dead body with streptococcal toxic shock syndrome to an autopsy worker. *Int J Legal Med.* 139(6):2789-2797, 2025
- 13) Shimizu H, Furuichi M, Takeuchi N, Ito K, Funaki T, Ito Y, Mori M, Moriuchi H, Yamagishi T, Shinjoh M. Risk Factors and Diagnostic Indicators for Congenital Syphilis: A Nationwide Retrospective Survey. *Epidemiol Infect.* Oct 22: 1-30, 2025
- 14) Takeuchi N, Ohkusu M, Kusuya Y, Takahashi H, Yamaguchi M, Omata Y, Nakazawa T, Ishiwada N. Comparative genomic and morphological analyses of capsular and capsular-deficient pneumococcal strains simultaneously isolated from a patient with invasive pneumococcal disease. *J Infect Chemother.* 31(1):102486, 2025
- 15) Nemoto H, Hino M, Aoki T, Yamashita Y, Okunushi T, Nagasawa K, Ishiwada N, Watanabe A, Yamazaki S, Hamada H: Effectiveness of isavuconazole in invasive cerebral aspergillosis during hematopoietic stem cell transplantation in a pediatric patient with myelodysplastic syndrome: A case report. *J Infect Chemother, J Infect Chemother.* 31(1):102478, 2025
- 16) Motohashi T, Sekiya M, Sakamoto S, Fukuda K, Nakamura Y, Sasaki M, Tochigi N, Yaguchi T, Kamei K, Kishi K. Successful treatment by switching from benralizumab to dupilumab in a patient with allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Schizophyllum commune*. *Respir Investig.* 63(3):311-313, 2025
- 17) Shibata S, Uchida M, Ban S, Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Hubka V, Takahashi H. *Aspergillus latus*: A cryptic causative agent of aspergillosis emerging in Japan. *Med Mycol.* 2025 Jun 5;63(6):myaf052, 2025
- 18) Majima H, Arai T, Maruguchi N, Kamei K, Watanabe A. Cyp51A Dysfunction Leads to Higher Susceptibility to Azoles Including Fluconazole in *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses.* 68(4):e70052, 2025
- 19) Fujikawa Y, Katsuta Y, Shibata Y, Akai K, Kamei K. Fatal *Trichosporon asabii* Fungemia Following Polymicrobial Bacteremia in a Non-neutropenic Elderly Patient: A Case Report. *Cureus.* 17(8):e89531, 2025

Project for Systems Biology of Microorganisms

高橋 P I (微生物創生) プロジェクト

Summary (研究概要)

Our research areas are Bioinformatics and Molecular Biology. We aim at unravelling the molecular mechanisms underlying pathogenicity and drug resistance in pathogenic fungi by integrating bioinformatics with molecular biology. Our Bioinformatics approach aims to deeply and clearly understand massive biological experiment data, e. g., sequence data by next generation sequencers.

我々は病原真菌の感染機序と薬剤耐性について研究を展開している。宿主との相互作用を含めた感染機序、並びに薬剤耐性機構について分子レベルでの解明を目指している。バイオインフォマティクスを駆使したアプローチも取り入れて、生命現象を俯瞰的に捉えて真に重要な因子の探索も展開している。

Professor	Hiroki Takahashi	教授	高橋 弘喜
Research Assistant Professor	Saho Shibata	特任助教	柴田 紗帆
Research Assistant Professor	Momotaka Uchida	特任助教	内田 百岳
Postdoctoral Fellow	Puccetti Guido (2025/11 ~)	博士研究員	Puccetti Guido
Research Promotion Technician	Machiko Zen	技術補佐員	全 真知子
Research Promotion Technician	Emi Shirai	技術補佐員	白井 江美

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

Saho Shibata, Momotaka Uchida, Guido Puccetti, Xiaohui He, Nan Wang, Yu Lu, Hiroki Takahashi

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

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

Momotaka Uchida, Hiroki Takahashi

Since NGS development, genome and omics data are rapidly accumulating. We collaborate with several researchers to analyze their own genome and omics data, and give the overview of the data by using multivariate, statistical and machine-learning analysis.

Publications

- 1) Rivelli Zea SM, Nakaya Y, Takahashi H, Nagamine T, Yaguchi T, *Toyotome T. Identification of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus pseudoniviae* as causative agents of aspergillosis in endangered Okinawa Rails. *Front Vet Sci* 12:1675145, 2025.
- 2) Lu Y, Seto Y, Hara Y, Takaya A, Uchida M, Kusuya Y, Ishibashi M, Nakamura Y, *Takahashi H. Comparative genomics of *Nocardia tsunamiensis* IFM 10818, a new

- source of the antibacterial macrolide nargenicin A1. *Microbiol Spectr* 13(12):e0122025, 2025.
- 3) Uehara S, Takahashi H, Nishino Y, Takahashi Y, Chiba T, Yokoyama K, Miyake H, Sadamasu K, *Hagiwara D. Genetic analysis of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolated from domestic and imported tulip bulbs in Japan. *J Glob Antimicrob Resist* 44:306-313, 2025.
 - 4) *Toyotome T, Takahashi H, Watanabe A, Hagiwara D. RttA, a Zn²⁺-Cys⁶ transcription factor in *Aspergillus fumigatus*, contributes to azole resistance. *Microbiol Spectr* 13(10):e0181025, 2025.
 - 5) *Kashiwaba A, Mitani A, Sonoda T, Shigemune N, Takahashi H. Strain-level typing of *Wickerhamomyces anomalus* using Fourier transform infrared spectroscopy and whole-genome sequencing. *J Microbiol Methods* 236:107184, 2025.
 - 6) Shibata S, Uchida M, Ban S, Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Hubka V, *Takahashi H. *Aspergillus latus*: A cryptic causative agent of aspergillosis emerging in Japan. *Med Mycol* 63(6):myaf052, 2025.
 - 7) Murakami S, Takahashi H, Shimizu K, *Yamasaki T. Global identification of AGO3-RNA interactions reveals targets of small RNA-mediated gene regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 66(6):940-955, 2025.
 - 8) *Hara Y, Nakamura A, Manome T, Takaya A, Takahashi H, Ban S, Yaguchi T, Ishibashi M. A new diterpenoid, carneadiol, isolated from *Nocardia carnea* IFM 12324. *J Nat Med* 79(2):435-440, 2025.
 - 9) *Takeuchi N, Ohkusu M, Kusuya Y, Takahashi H, Yamaguchi M, Omata Y, Nakazawa T, Ishiwada N. Comparative genomic and morphological analyses of capsular and capsular-deficient pneumococcal strains simultaneously isolated from a patient with invasive pneumococcal disease. *J Infect Chemother* 31(1):102486, 2025.

Management Unit of Microbiological Resources

バイオリソース管理室

Summary (研究概要)

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.

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。

Associate Professor	Takashi Yaguchi	准教授	矢口 貴志
Assistant Professor	Sayaka Ban	助教	伴 さやか
Research Technician	Junko Ito	技術職員	伊藤 純子
Post Doctoral Fellow	Isato Yoshioka	特任研究員	吉岡 育哲
Research Promotion Technician	Akiko Kota	技術補佐員	甲田 暁子
Research Promotion Technician	Yu Uehara	技術補佐員	上原 ゆう
Research Promotion Technician	Kuniko Shimamura	技術補佐員	島村具仁子

1. Simultaneous detection of four *Madurella* species using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for eumycetoma diagnosis

Yoshioka I¹, Fahal AH², Sow D³, Kaneko S^{4,5}, Mori Y¹, Ban S¹, Yaguchi T^{1*}

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

² Mycetoma Research Centre, University of Khartoum, Khartoum, Sudan

³ Service de Parasitologie-Mycologie, UFR Sciences de la Santé, Université Gaston Berger, Saint-Louis, Senegal

⁴ School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

⁵ Department of Ecoepidemiology, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Eumycetoma is a neglected tropical disease caused primarily by a *Madurella mycetomatis* infection, besides other related

species. In this study, we designed a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer set capable of simultaneously detecting four *Madurella* species (*M. mycetomatis*, *M. pseudomycetomatis*, *M. tropicana*, and *M. fabalii*). Genomic sequencing of *M. pseudomycetomatis* strain and comparative genome analysis revealed the candidate genes that were common among and specific to *Madurella* species. The 3 LAMP primer sets targeting these genes detected up to 1 pg of the genomic DNA of all 4 *Madurella* species, exhibiting no cross-reactivity toward other pathogenic fungi. Among these, one primer set showing better reactivity was selected as a candidate used for diagnosis. Therefore, we developed novel primer sets which enabled the simultaneous detection of four *Madurella* species. Our present findings will lead to a faster and simpler diagnostic tool for eumycetoma detection, especially in rural clinical settings.

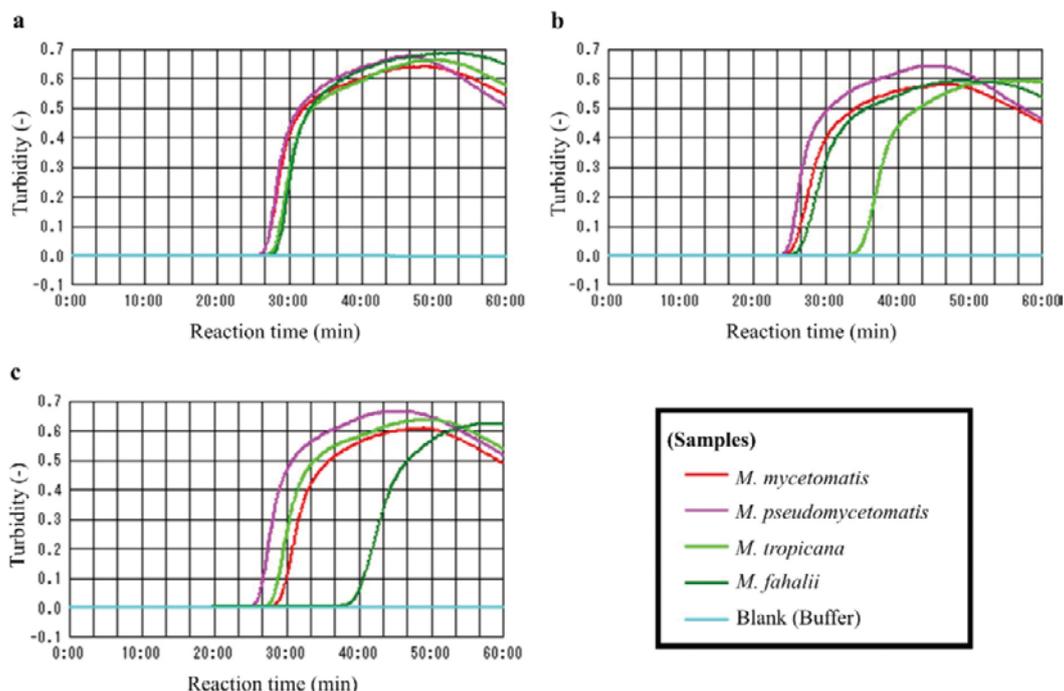


Fig. The specificity of designed LAMP primers, a #1 (for MMYC01_204841), b #2 (for MMYC01_205181) and c #3 (for MMYC01_210211). 1 pg of the extracted genomic DNAs derived from *Madurella* spp. were used as templates. The red, magenta, yellow-green, and green plots represent the data for *M. mycetomatis* IFM 46458, *M. pseudomycetomatis* IFM 46460, *M. tropicana* CBS 201.38 T, and *M. fahalii* CBS 129176 T, respectively. The light blue plot indicates a blank reaction mixture, in which Tris-HCl buffer was used as a template instead of DNA

2. Itraconazole resistance in *Madurella fahalii* linked to a distinct homolog of the gene encoding cytochrome P450 14- α sterol demethylase (CYP51)

Yoshioka I^{1,2}, Fahal AH³, Kaneko S^{4,5}, Cao W², Yaguchi T^{1*}

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

² Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

³ Mycetoma Research Centre, University of Khartoum, Khartoum, Sudan

⁴ School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

⁵ Department of Ecoepidemiology, Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University, Nagasaki, Japan

Background

Mycetoma is a deep fungal infection caused by several

microorganisms, with *Madurella mycetomatis* being the most common causative agent. Another related species, *Madurella fahalii*, is also known to cause eumycetoma. However, unlike *M. mycetomatis*, *M. fahalii* exhibits resistance to itraconazole, the standard treatment for eumycetoma, and the underlying cause of this resistance remains unknown. Therefore, understanding the mechanism of this resistance is critical for developing more effective therapies.

Principal Findings

Using the high-quality draft genome sequence of *Madurella fahalii* IFM 68171, we identified two copies of the gene encoding cytochrome P450 14- α sterol demethylase (CYP51), the target enzyme of itraconazole. These include a gene conserved among *Madurella* species (Mfcyp51A1) and a *M. fahalii*-specific gene (Mfcyp51A2). Both genes are actively transcribed in *M. fahalii* and are upregulated in response to itraconazole. Furthermore, heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* revealed that transformants carrying the Mfcyp51A2 gene exhibited

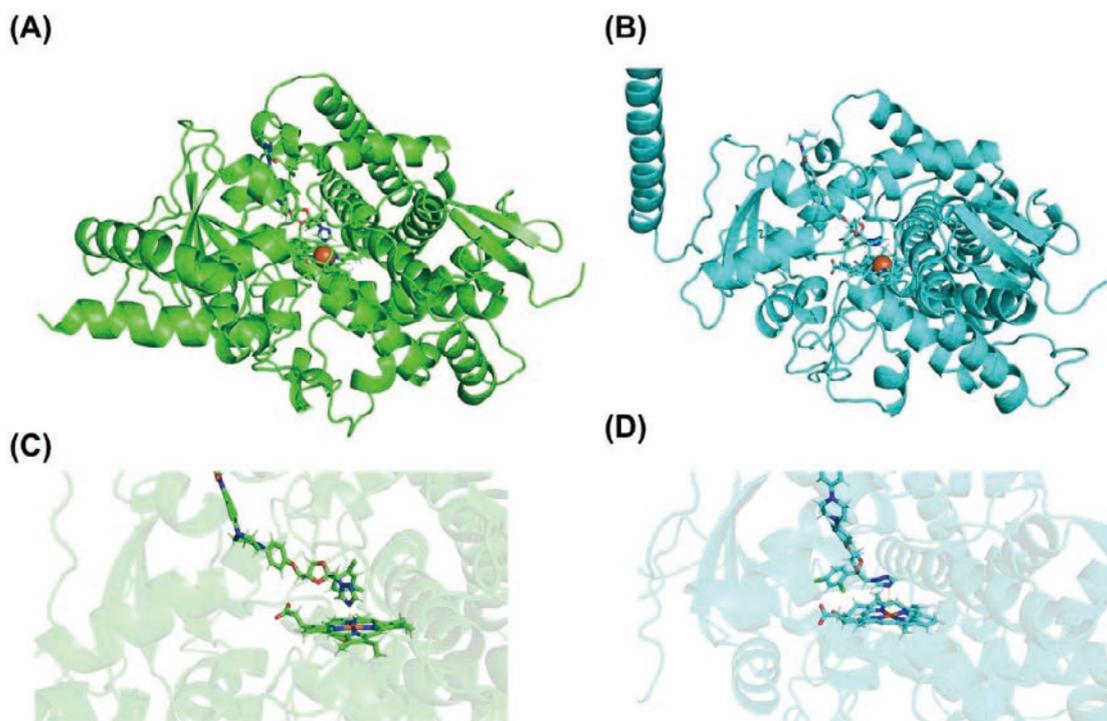


Fig. Representation of the models of MFCYP51A (A, C) and MFCYP51A2 (B, D). In each panel, itraconazole and heme are illustrated in a stick representation at the upper and bottom part, respectively. (A) and (B) represent the overall structure of CYP51 proteins. The active centers of (A) and (B) were enlarged with their protein backbones translucent to produce (C) and (D), respectively

reduced susceptibility to itraconazole compared to those with Mfcyp51A1.

Conclusion

We demonstrated that itraconazole resistance in *M. fabalii* may be attributed to the presence of an additional CYP51 gene. This study represents the first report on the physiological characteristics of *Madurella* species using genetic engineering techniques.

3. Large-Scale Expansion of the MALDI-TOF MS Library for Comprehensive Identification of Yeasts and Filamentous Fungi in Clinical and Sanitary Contexts

Ban S^{1*}, Endoh R^{2*}, Hayashi M³, Ito J¹, Uehara Y¹, Kota A¹, Yamashita K¹, Horiyama M², Miwa K², Oowada T², Yaguchi T¹, Tanaka K³, Ohkuma M²

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

²Microbe Division, RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Ibaraki, Japan

³Center for Conservation of Microbial Genetic Resource, Gifu University, Gifu, Japan

The rapid and accurate identification of fungal isolates remains a critical challenge in both clinical diagnostics and hygiene monitoring in food and environmental settings due to limitations in preprocessing and incomplete reference spectra in current MALDI-TOF MS libraries. In this study, we constructed a substantially expanded MALDI-TOF MS reference database (EMALiMB) encompassing 643 fungal species across 152 genera—including extensive coverage of clinically relevant Ascomycota and Basidiomycota yeasts and filamentous fungi—alongside six Prototheca species. Strategic selection of strains prioritized taxa that were underrepresented or absent in existing libraries, and methodological improvements such as bead-crushing enhanced ionization of previously refractory basidiomycetous yeasts and dermatophytes. Validation with 384 clinical and environmental

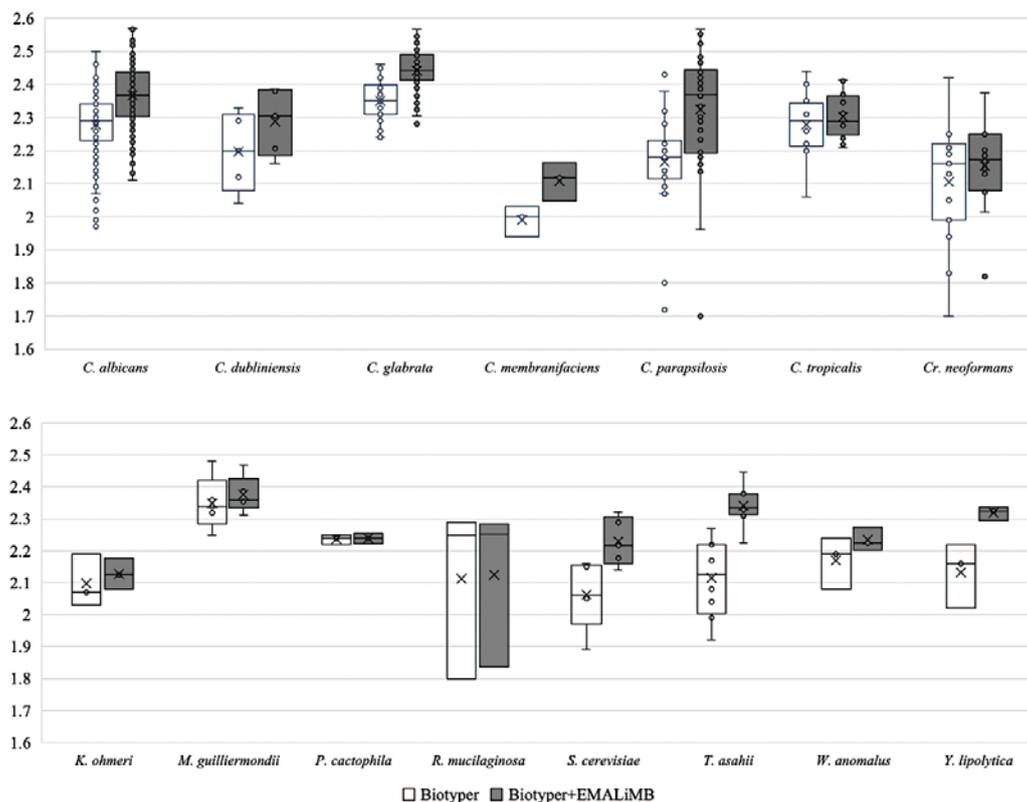


Fig. Box plot of identification scores for each yeast species, comparing Biotyper v. 5 and after add-on EMALiMB v2. The cross symbol (x) indicates the average value.

isolates demonstrated improved identification performance, with accuracy increasing from 85.20% to 87.28% and mean score values from 2.15 to 2.27; coverage for clinically relevant species increased from 80% to 88.57%, and environmental isolates from 52.38% to 76.19%. These advancements in spectral reference depth and preprocessing protocols significantly strengthen the utility of MALDI-TOF MS for fungal diagnostics, promising faster and more reliable organism identification in both medical and sanitary laboratories.

4. Co-culture of *Aspergillus niger* IFM 59706 and RAW264 cells enhances the production of aurasperone A with NO inhibitory activity.

Arai M^{1*}, Ujie Y¹, Saito S¹, Banno T¹, Yaguchi T²

¹ Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology, Keio University, Yokohama, Japan

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

Most actinomycetes and fungi have a multitude of silent biosynthetic genes whose activation could lead to the production of new natural products. Our group recently designed and used a co-culture method to isolate new natural products, based on the idea that pathogens might produce immune suppressors to avoid attack by immune cells. Here, we searched for compounds produced by the co-culture of immune cells with pathogenic fungi isolated from clinical specimens. The production of dimeric naphtho- γ -pyrone aurasperone A (1) was enhanced by the co-culture of pathogenic fungus *Aspergillus niger* IFM 59706 and RAW264 mouse macrophage-like cells. The absolute configuration of 1 was confirmed by comparison with the reported electronic circular dichroism spectrum. This is the first report of the inhibitory activity of 1 on nitric oxide production, an inflammatory mediator.

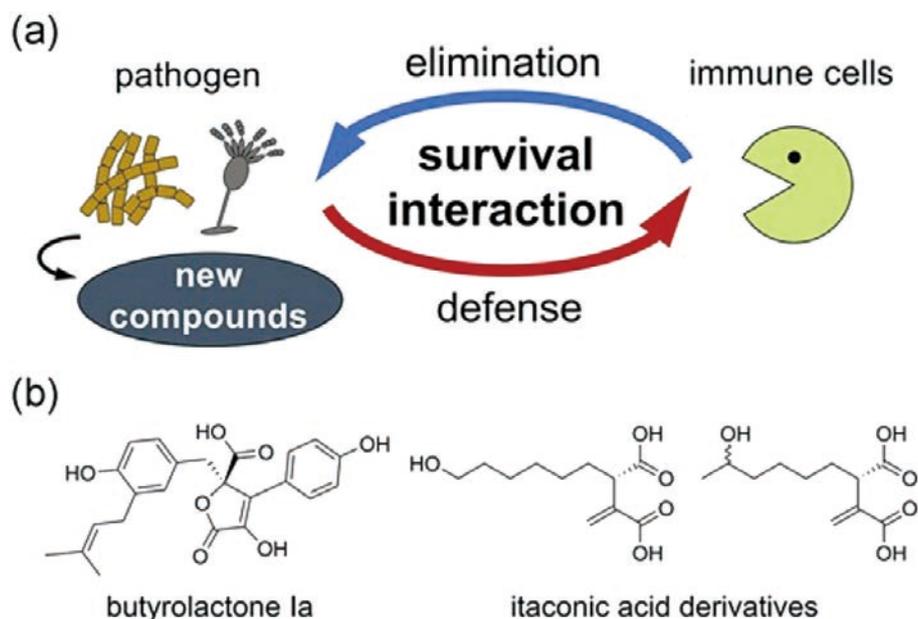


Fig. Concept behind the co-culture system, and the compounds isolated. (a) Concept behind the co-culture of pathogen and immune cells. (b) Secondary metabolites previously isolated from co-cultures of filamentous fungus and immune cells.

Publications

- 1) Arai M, Ujie Y, Saito S, Banno T, Yaguchi T. Co-culture of *Aspergillus niger* IFM 59706 and RAW264 cells enhances the production of aurasperone A with NO inhibitory activity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 89: 541-547, 2025.
- 2) Arai T, Majima H, Maruguchi N, Ban S, Yaguchi T, Watanabe A. Report of four azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates with TR34 or TR46 mutations referred to a mycosis reference center for examination. *Med Mycol J*. 66: 131-137, 2025.
- 3) Ban S*, Endoh R*, Hayashi M, Ito J, Uehara Y, Kota A, Yamashita K, Horiyama M, Miwa K, Oowada T, Yaguchi T, Tanaka K, Ohkuma M. Large-scale expansion of the MALDI-TOF MS library for comprehensive identify, 2025. cation of yeasts and filamentous fungi in clinical and sanitary contexts. *Med Mycol J*. 66: 113-123, 2025.
- 4) Fukushima S, Hagiya H, Ban S, Yaguchi T, Watanabe A, Tanaka S, Sugimoto S. Secondary pneumothorax due to *Aspergillus welwitschiae* in a lung transplant recipient. *Int J Infect Dis*. 154: 107863, 2025.
- 5) Fukuto A, Mitoma K, Nakamura K, Tadera K, Chikama T, Yaguchi T. Fungal keratitis caused by *Humicola sardiniae*. *Mycopathologia*. 23: 190: 4, 2025.
- 6) Hara Y, Nakamura A, Manome T, Takaya A, Takahashi H, Ban S, Yaguchi T, Ishibashi M. A new diterpenoid, carneadiol, isolated from *Nocardia carnea* IFM 12324. *J Nat Med*. 79: 435-440, 2025.
- 7) Hasegawa A, Tone K, Baba Y, Saito Z, Akutsu T, Kitayama T, Inaki S, Gochi M, Yaguchi T, Makimura K, Takagi M, Araya J. Nodular-bronchiectatic pattern in pulmonary nocardiosis: Immune status and treatment outcomes in a multicenter retrospective study. *Respir Med*. 237: 1079222024, 2025.
- 8) Hiraoka Y, Ogasawara T, Tajima Y, Yaguchi T, Watanabe A, Teruya K, Nagasaki K, Matsuyama W, Niwa M, Ozawa Y, Sato J. Spontaneous remission of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia followed by severe pulmonary nocardiosis in a patient with HIV Infection: A case report. *J Infect Chemother*. 31: 102609, 2025.
- 9) Ishii M, Ishikawa K, Mikami K, Ichinose K, Miyashita A, Yaguchi T, Yamada T, Ohata S. Synergistic effects of Cyp51 isozyme-specific azole antifungal agents on fungi with multiple *cyp51* isozyme genes. *Antimicrob Agents Chemother*. e00598-25, 2025.

- 10) Itagaki S, Noguchi H, Hiruma M, Yaguchi T, Satoh Y, Okuno S, Hashimoto T, Satoh T. Trauma-induced phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium crousii* presenting as a punched-out ulcer. *Mycopathologia*. 190: 25, 2025.
- 11) Kitaya S, Watanabe A, Yaguchi T, Nakade J, Otani H, Matsuda Y, Kubo T, Azuma T, Ikehata Y, Otani H, Yamazaki H, Miyashita D, Tanaka Y, Takahashi Y, Zaimoku Y, Oshima M, Wada T, Taniguchi T, Kanamori H. Pediatric pneumonia involving *Penicillium rolfsii* isolated from sputum culture following a plunge pool near-drowning incident. *J Med Mycol*. 35:101589, 2025.
- 12) Kurata Y, Kimizuka Y, Yaguchi T, Ito K, Yamamoto T, Serizawa Y, Hamamoto T, Tanigaki T, Hongo Y, Watanabe A, Suzuki K, Kazushige T, Kawana A. Detection of *Bjerkandera adusta* as a causative agent of invasive chronic rhinosinusitis: A case report. *Emerging Infect Dis*. 31: 355-358, 2025.
- 13) Miyashita A, Shibata M, Funakoshi H, Tame T, Mori T, Yaguchi T, Ban S, Watanabe A, Horikoshi Y. First report of catheter related bloodstream infection caused by *Filobasidium magnum*. *Pediatr Infect Dis J*. 44: e148-e149, 2025.
- 14) Mori Y, Yamada T, Ban S, Yoshioka I, Yaguchi T*. Survey on the prevalence of terbinafine-resistant *Trichophyton* spp. with squalene epoxidase mutations. *Med Mycol J*. 66: 125-130, 2025.
- 15) Motohashi T, Sekiya M, Fukuda K, Nakamura Y, Sakamoto S, Sasaki M, Yaguchi T, Tochigi N, Kamei K, Kishi K. Successful treatment by switching from benralizumab to dupilumab in a patient with allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Schizophyllum commune*. *Respir Investig*. 63: 311-313, 2025.
- 16) Nakamoto K, Hagiya H, Fukushima S, Oguni K, Yokoyama Y, Iio K, Hirano S, Yaguchi T, Ban S, Watanabe A, Okunobu T, Suyama A, Kawaguchi M, Sazumi Y, Otsuka F. Cerebellar abscess caused by *Cladophialophora bantiana* involving an elderly Japanese woman. *J Med Mycol*. 35: 101548, 2025.
- 17) Ninomiya A, Masuda K, Yamada T, Kuroki M, Ban S, Yaguchi T, Urayama S, Hagiwara D. Rediscovery of viomellein as an antibacterial compound and identification of its biosynthetic gene cluster in dermatophytes. *Appl Environ Microbiol*. 91: e02431-24, 2025.
- 18) Ohara S, Noguchi H, Matsumoto T, Kubo M, Hayashi D, Kashimada-Nakamura K, Yaguchi T, Kano R. Emerging antifungal-resistant onychomycosis in dermatology clinic in Kumamoto, Japan. *Med Mycol J*. 66: 61-67, 2025.
- 19) Okuyama C, Iwasawa MT, Miyachi H, Togawa Y, Matsue H, Yaguchi T. First Japanese case of chromoblastomycosis caused by *Phialophora europaea*. *Med Mycol J*. 66: 213-217, 2025.
- 20) Saito R, Shimizu T, Kondoh A, Matsuyama T, Hisada A, Yaguchi T, Sato T, Mabuchi T. A case of phaeohyphomycosis caused by *Exophiala xenobiotica* in an immunocompromised host. *Med Mycol J*. 66: 7-10, 2025.
- 21) Shibata S, Uchida M, Ban S, Kamei K, Watanabe A, Yaguchi T, Hubka V, Takahashi H. *Aspergillus latus*: a cryptic causative agent of aspergillosis emerging in Japan. *Medical Mycology*. 63: myaf052, 2025.
- 22) Yamamoto T, Hosoya K, Ban S, Yaguchi T*. Assessment of polyhexamethylene biguanide hydrochloride-resistance in *Purpureocillium* species and development PCR-based detection method. *Med Mycol J*. 66: 97-103, 2025.
- 23) Yamazaki K, Horio Y, Hatanaka K, Yaguchi T, Kozaburo S, Umamoto K, Hattori S, Tomomatsu K, Hayama N, Ito Y, Oguma T, Asano K. *Aspergillus* bronchitis at localized mucus plug in an immunocompetent patient. *Respirol Case Rep*. 13: e70104, 2025.
- 24) Tashiro H, Kuwahara Y, Yaguchi T, Ban S, Watanabe A, Takahashi K. Remarkable response to dupilumab in refractory allergic bronchopulmonary mycosis with giant mucus plug due to *Aspergillus udagawae*. *Respir Investig*. 63:1037-1041, 2025.
- 25) Ujie Y, Saito S, Iwata C, Kuwahara R, Kishimoto S, Watanabe K, Goto Y, Ogawa K, Hara Y, Kusuya Y, Takahashi H, Yaguchi T, Ishibashi M, Arai M. Host-pathogen interaction activated biosynthesis of natural products. *J Nat Prod*. 88: 2204-2215, 2025.
- 26) Yoshioka I, Fahal AH, Cao W, Kaneko S, Mori Y, Ban S, Yaguchi T*. Simultaneous detection of four *Madurella*

- species using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for eumycetoma diagnosis. *Mycopathologia*. 190: 105, 2025.
- 27) Yoshioka I, Fahal AH, Kaneko S, Cao W, Yaguchi T*. Itraconazole resistance in *Madurella fabalii* linked to a distinct homolog of the gene encoding cytochrome P450 14-A sterol demethylase (CYP51). *PLOS Negl Trop Dis*. 19: e0012623, 2025.
- 28) Zea SR, Nakaya Y, Takahashi H, Nagamine T, Yaguchi T, Toyotome T. Identification of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus pseudonomiae* as causative agents of aspergillosis in endangered Okinawa Rails. *Front Vet Sci*. 10. 3389/fvets. 2025. 1675145, 2025.

Project for RNA Regulation

原口 P I (RNA 制御) プロジェクト

Summary (研究概要)

Gene regulatory networks determine not only cellular specificity of development, differentiation, and proliferation but also cellular response or competency to viruses, bacteria, and mycetes. In this project, we concentrate on miRNA which suppresses expression of many genes at the post-transcriptional level to develop basic research of new therapeutic strategies for human diseases such as cancer.

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。本プロジェクトでは、多数の遺伝子群の発現を post-transcriptional レベルで一括して負に制御する miRNA の制御法の開発を行い、がんなどのヒト疾患の制圧への基盤研究を展開する。

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

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 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 showed very effective intracellular delivery and much lower toxicity in mice. We optimized the 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 Conc.). 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.

For pharmaceutical applications, it is important to preserve LNP from the time of manufacturing to the time of use without loss of its biological activity. Therefore, we investigated the cryopreservation method of LNP encapsulating

Super-S-TuD using various buffer solutions as solvents for freezing LNP. Particle properties of LNP that were frozen, stored at -80°C and thawed were evaluated. There was no loss in the recovery rate and encapsulation rate. Furthermore, no significant increase in particle size and no changes in zeta potential were observed. We also evaluated the biological activity of LNP that were frozen and thawed and observed that the LNP exhibited high nucleic acid delivery efficiency *in vitro*. These technologies constitute the foundation of nucleic acid therapeutics.

Merged project of respiratory pathophysiology and pathobiology

磯野史朗・並木隆雄（呼吸器生体制御解析）プロジェクト

Summary（研究概要）

In clinical respiratory medicine, refractory infections, including those caused by fungi, are problematic because, in addition to the issues with the causative pathogen, they often occur in a host whose biological structure is morphologically and/or functionally impaired. The control of refractory respiratory conditions, including refractory respiratory infections, requires the elucidation of the regulatory mechanisms of the respiratory biological system and therapeutic strategies aimed at recovery/regeneration from their impairment.

As a Respiratory Biological System Control Analysis Project, it is necessary to gain insights into the biological regulation of respiratory diseases from a wide perspective by conducting basic and clinical research across the broad field of respiratory medicine.

1. Novel therapeutic strategies for refractory respiratory diseases
2. Elucidation of the pathology of sleep and respiratory dysregulation and development of novel therapeutic methods from the perspective of neurotransmitters
3. Biological system control from the perspective of traditional Chinese medicine (Kampo medicine)

プロジェクトの目的

難治性呼吸器疾患（特に真菌などの難治性感染症を含む）は、単に強力な病原体（pathogen）の問題だけでなく、宿主（host）側の生体構造が形態的・機能的に障害を受けているために発症し、治療が困難になるという問題があります。本プロジェクトの究極的な目標は、呼吸器生体制御機構を深く解明し、その障害からの回復／再生を目指した新しい治療戦略を確立することである。

研究アプローチ

呼吸器領域における基礎的・臨床的研究を幅広く実施し、多角的な視点から呼吸器疾患の生体制御に関する知見を獲得します。

3つの主要な研究課題

プロジェクトは、以下の3つの柱から構成されます。

1. 難治性呼吸器疾患に対する新規治療戦略

概要：感染症だけでなく、慢性炎症や免疫異常を伴う難治性の呼吸器疾患全般に対し、従来の治療法に替わる、あるいは補完する新しい治療標的や薬剤を見出し、開発を目指します。

2. 睡眠および呼吸調節障害の病態解明と神経伝達物質の観点からの新規治療法の開発

概要：睡眠時無呼吸症候群（SAS）などに見られる呼吸調節の障害のメカニズムを解明します。

特に、神経伝達物質の異常や関与に着目し、その知識を基にした新しい薬物療法の開発や、呼吸中枢を制御する新たな治療アプローチを追求します。

3. 漢方医学的観点からの生体制御

概要：漢方薬が持つ、単一の成分ではなく複数の作用を組み合わせた多面的な生体制御作用に着目します。難治性呼吸器疾患の病態（炎症、免疫応答、体質改善など）に対して、漢方医学的な知見を取り入れ、新たな治療薬や治療戦略としての可能性を科学的に検証します。

Research Professor
Research Professor
Research Assistant Professor

Shiroh Isono
Takao Namiki
Keiko Yamamoto

特任教授 磯野 史朗
特任教授 並木 隆雄
特任助教 山本 慶子

1. **Peptidylarginine deiminase 4 deficiency suppresses neutrophil extracellular trap formation and ameliorates elastase-induced emphysema in mouse lung.**

Katsumata M, Ikari J*, Urano A, Suzuki E, Kugou K, Hasegawa Y, Tatsumi K, Suzuki T.

Neutrophil extracellular traps (NETs) are associated with the extracellular release of nuclear chromatin decorated with cytoplasmic proteins. Excessive release of NETs has been reported in chronic lung diseases, including chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, the role of NETs in the pathogenesis of COPD remains unclear. Peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) contributes to NET formation. Therefore, in an elastase (ELS)-induced emphysema mouse model, we examined the role of PAD4 using *Padi4* gene knockout (KO) mice. First, we confirmed that ELS induced NET formation in the parenchyma of the lungs. PAD4 deficiency suppressed ELS-induced NET expression and tended to ameliorate the lung tissue injury. The cellular profile of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) did not differ between the two groups. Additionally, PAD4 deficiency ameliorated emphysema and apoptosis in lung cells. Finally, we examined the effects of PAD4 on comprehensive gene expression signatures using RNA sequencing. Enrichment analysis of the transcriptomic data revealed that the expression of several genes associated with COPD pathogenesis was altered in the KO mice. Overall, the results suggest that PAD4 deficiency improves NET formation and emphysema in the lungs; this pathway can be a potential therapeutic target for the treatment of COPD.

2. **Effects of riluzole on sevoflurane-induced gasping in adult mice.**

Tajji S*, Nishino T, Jin H, Hashida M, Isono S.

The inhalation of a high sevoflurane concentration under hyperoxia induces gasping, similar to the breathing patterns observed during hypoxia-induced gasping in mice. This observation, coupled with the understanding that burster neurons in the pre-Bötzinger complex, which rely on a persistent sodium current, play a crucial role in generating hypoxia-induced gasping, led us to investigate whether sevoflurane-induced gasping could be triggered by activating this current within the brainstem. To this end, we evaluated the dose-dependent effects of intraperitoneal administration of riluzole, a blocker of persistent sodium channels, on sevoflurane-induced gasping in adult mice. We used ten tracheally intubated, spontaneously breathing, sevoflurane-anesthetized mice. Seven mice randomly received three doses of intraperitoneal riluzole (6, 12, and 18 mg/kg ip) with an interval of approximately 4 wk. The test trials to elicit the sevoflurane-induced gasping were conducted before and after administering each dose of riluzole by a sudden rise in inspired concentration of sevoflurane from 0.8 MAC (minimum alveolar concentration; 2.5%-2.7%) to 2 MAC (6.4%-6.6%). In the other three mice, the test trials for eliciting the hypoxia-induced gasping were performed before and after administering 18 mg/kg riluzole. The administration of the increasing dose of riluzole demonstrated an apparent and dose-dependent attenuation of sevoflurane-induced gasping. The administration of 18 mg/kg of riluzole completely abolished the hypoxia-induced gasping. These results indicate that sevoflurane-induced gasping, like hypoxia-induced gasping, could be generated by activating a persistent sodium current within the brainstem. **NEW & NOTEWORTHY** The inhalation of a high sevoflurane concentration induces specific ventilation similar to hypoxia-induced gasping. Riluzole is known to inhibit hypoxia-induced gasping dose-dependently by blocking persistent sodium channels. This study showed that riluzole dose-dependently attenuates sevoflurane-induced gasping in mice. Persistent sodium

channels could be important in generating sevoflurane- and hypoxia-induced gasping.

Publications

- 1) Ikeda N*, Masaki K, Hosokawa K, Funakoshi K, Taniguchi Y, Adachi S, Inami T, Yamashita J, Ogino H, Tsujino I, Hatano M, Yaoita N, Shimokawahara H, Tanabe N, Kubota K, Shigeta A, Ogihara Y, Horimoto K, Dohi Y, Kawakami T, Tamura Y, Tatsumi K, Abe K. Insights into balloon pulmonary angioplasty and the WHO functional class of chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients: findings from the CTEPH AC registry. *Cardiovasc Interv Ther.* 2025 Jan 22. doi: 10.1007/s12928-025-01095-9. PMID: 39841385
- 2) Nakamura J*, Tsujino I, Masaki K, Hosokawa K, Funakoshi K, Taniguchi Y, Adachi S, Inami T, Yamashita J, Ogino H, Hatano M, Yaoita N, Ikeda N, Shimokawahara H, Tanabe N, Kubota K, Shigeta A, Ogihara Y, Horimoto K, Dohi Y, Kawakami T, Tamura Y, Tatsumi K, Abe K. Cancer as an independent mortality risk in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 2025 Mar;44(3):339-348. doi: 10.1016/j.healun.2024.10.022. PMID: 39486772
- 3) Tamura Y, Tamura Y*, Takemura R, Taniguchi Y, Tsujino I, Inami T, Matsubara H, Shigeta A, Hatano M, Adachi S, Tahara N, Sakurai K, Horimoto K, Yaoita N, Abe K, Dohi Y, Kimura K, Kubota K, Kikuchi N, Yasuoka H, Baba Y, Shinke T, Amino M, Yamaguchi N, Ikeda S, Sato T, Ishida M, Sera F, Nakanishi N, Konishi H, Kinugawa K, Kashimura T, Dohi K, Nakamura K, Usui S, Tanaka S, Kubota S, Ikeda N, Yoshikawa M, Odagiri K, Tasaka S, Takeishi Y, Sugano T, Sugimura K, Tatsumi K, Kuwana M; Japan Pulmonary Hypertension Registry Network. Immunosuppressive therapy for pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases: Insights from Japanese Registry. *Adv Ther.* 2025 Oct 9. doi: 10.1007/s12325-025-03389-z. PMID: 41065903
- 4) Yamanaka M, Ushiki A*, Tatsumi K, Gemma A, Hattori N, Tanaka Y, Saito Y, Hanaoka M. Clinical characteristics of drug-induced interstitial pneumonia in Japan. *Respir Investig.* 2025;63(4):524-531. doi: 10.1016/j.resinv.2025.04.015.
- 5) Katsumata M, Ikari J*, Urano A, Suzuki E, Kugou K, Hasegawa Y, Tatsumi K, Suzuki T. Peptidylarginine deiminase 4 deficiency suppresses neutrophil extracellular trap formation and ameliorates elastase-induced emphysema in mouse lung. *Int J Mol Sci.* 2025;26(12):5573. doi: 10.3390/ijms26125573.
- 6) Isobe S, Tu L, Dohi Y, Hiraide T, Adachi S, Komura N, Tsujino I, Inami T, Sera F, Kato Y, Hatano M, Ueno S, Ogo T, Orihara Y, Fujii H, Amano K, Montani D, Guignabert C, Humbert M, Tatsumi K, Tamura Y*. Long-term outcomes of Qing-Dai-induced pulmonary arterial hypertension. *ERJ Open Res.* 2025 Dec 15;11(6):00675-2025. doi: 10.1183/23120541.00675-2025. eCollection 2025 Nov. PMID: 41403416.
- 7) Murai Y, Kawasaki T*, Imamoto T, Ishii D, Yoshioka K, Hasegawa Y, Ohara O, Tatsumi K, Suzuki T. Differential transcriptomic features of peripheral blood mononuclear cells in pulmonary sarcoidosis with and without extrapulmonary lesions in an east Asian population. *Biomedicines.* 2025 Dec 7;13(12):2998. doi: 10.3390/biomedicines13122998. PMID: 41463010.
- 8) Taiji S, Nishino T*, Jin H, Hashida M, Isono S. The activity of suprahyoid muscles during sevoflurane-induced gasping in mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2025 Jan; 331: 104355. doi: 10.1016/j.resp.2024.104355. PMID: 39369927
- 9) Himuro K, Uzawa A*, Kawaguchi N, Kanai T, Isono S, Kuwabara S. Quantitative Assessment of Dysphagia in Myasthenia Gravis. *Intern Med.* 2025 May 15;64(10):1503-1509. doi: 10.2169/internalmedicine.4303-24. PMID: 39428532
- 10) Kawauchi A*, Maeda S, Nagao Y, Kubo H, Yokoyama M, Sato Y, Isono S. Impact of Obesity on Hypoxemia During Deep Dental Sedation for Paediatric and Adult Patients With Intellectual Disabilities: CT90 as an Outcome. *J Intellect Disabil Res.* 2025 Jun; 69(6):510-517. doi: 10.1111/jir.13232. PMID: 40111414
- 11) Yamada T*, Ishibashi K, Sakaguchi Y, Kawakami S, Nozaki-Taguchi N, Sato Y, Isono S. Increased cuff-leak

- pressure after abdominal and spine surgeries: a simple and novel cuff-leak test for tracheal extubation. *J Anesth*. 2025 Jun;39(3):445-455. doi: 10.1007/s00540-025-03487-w. PMID: 40131470
- 12) Kondo M*, Nagashima K, Isono S, Sato Y. Weighted Repeated Measures Correlation Coefficient: A New Correlation Coefficient for Handling Missing Data With Repeated Measures. *Stat Med*. 2025 May; 44(10-12): e70046. doi: 10.1002/sim.70046. PMID: 40407109
- 13) Hashida M, Nishino T*, Taiji S, Jin H, Isono S. Augmented activity of suprahyoid muscles during hypothermia in sevoflurane-anesthetized mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2025 Aug-Sep;336:104452. doi: 10.1016/j.resp.2025.104452. PMID: 40436086
- 14) Furuhashi A, Yoshida K*, Isono S. Factors Influencing the Effectiveness of Botulinum Toxin Therapy in Bruxism Management. *Toxins (Basel)*. 2025 Jul 31;17(8):384. doi: 10.3390/toxins17080384. PMID: 40864060
- 15) Taiji S*, Nishino T, Jin H, Hashida M, Isono S. Effects of riluzole on sevoflurane-induced gasping in adult mice. *J Appl Physiol (1985)*. 2025 Nov 1;139(5):1148-1155. doi: 10.1152/jappphysiol.00347.2025. PMID: 41015483
- 16) Khandaker R, Jahantighi AB, Schwarz J, Himes C, Isono S, Eikermann M*, Fassbender P. Perioperative management of patients taking glucagon-like peptide-1 receptor agonists: a restrictive fasting regimen is not necessary. Comment on *Br J Anaesth* 2025; 135: 48-78. *Br J Anaesth*. 2025 Dec;135(6):1816-1818. doi: 10.1016/j.bja.2025.09.027. PMID: 41125490
- 17) Sakuma T*, Sugiura T, Yamamoto K, Naito A, Sekine A, Shigeta A, Suzuki T. A Case Report of Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Successfully Treated With Riociguat. *Cureus*. 2025 Oct 8;17(10):e94152. doi: 10.7759/cureus.94152. eCollection 2025 Oct. PMID: 41216071

Project for Evolution and Reproduction

生水P I（進化生殖学）プロジェクト

Summary（研究概要）

Reproduction is fundamental to living organisms. Over the course of evolution, reproductive strategies have shifted—from producing numerous offspring with low survival rates to having fewer offspring and nurturing them to increase their chances of survival. In mammals, the number of eggs produced at one time has drastically decreased, from millions in fish to a single egg in humans. However, humans generate nearly 7 million oocytes during fetal development and support the growth of over 30 follicles per cycle in adulthood. This suggests that humans have acquired a specialized mechanism to limit the number of offspring, which may contribute to the reduction of the oocyte reserve with age. If this mechanism can be overridden, it may be possible to preserve the oocyte reserve and enhance female fertility. Our research aims to explore this process, with the hope of developing new strategies for infertility treatment.

生殖は生物の本質に関わる機能であり、生物進化にともない生殖戦略は大きく変化してきた。低コストで多くの子孫を作る戦略から、少ない子孫を生みコストをかけて育てる方向への進化である。哺乳類においても、一度に生む卵子数は魚類の数百万からヒトの1個にまで漸減した。しかし、ヒト胎児は700万個に迫る数の卵子を有しており、月経周期当たり30個以上の卵胞が発育することなどから、進化の過程で積極的に子供の数を減らす特別な機序を獲得してきたと考えられる。この産子数減少は、加齢に伴う卵子減少にも作用している可能性がある。われわれは、この機序を明らかにすることで、不妊症治療にあらたな展開をもたらすことが出来ると考えて研究をおこなっている。

Professor

Makio Shozu

特任教授 生水真紀夫

Professor

Hisao Osada

特任教授 長田久夫

1. Symbiosis with Commensal *Candida* During Pregnancy.

Vaginal candidiasis is characterized by itching, vaginal discharge, and vulvar lesions. Although commensal *Candida* has no established benefit in the vagina, intestinal *Candida* commensalism has been shown to confer immunological advantages. Vaginal *Candida* colonization is common in women of reproductive age, particularly during pregnancy, and is detected in 10-40% or more of asymptomatic pregnant women.

In Japan, universal screening for vaginal infections, including *Candida*, is performed in early pregnancy. Using these screening data, we investigate the prevalence of asymptomatic commensal *Candida*, its association with bacterial vaginosis, its contribution to vaginal symptoms, and

its potential impact on pregnancy outcomes.

2. A Female-Specific Adverse Effect of the COVID-19 Vaccines.

Messenger RNA (mRNA) COVID-19 vaccines effectively prevent severe disease, but post-implementation surveillance has identified rare adverse events, including pericarditis, cerebral venous sinus thrombosis, and Guillain-Barré syndrome. Sex differences are observed in both COVID-19 incidence and vaccine-related adverse effects, potentially due to differences in endocrine and immune responses.

We investigated vulvar ulcers as a previously unrecognized adverse effect of COVID-19 vaccination. Analysis of publicly available data from the Vaccine Adverse Event Reporting

System (VAERS) and the COVID Data Tracker revealed a strong association between vaccination and vulvar ulcers. These findings suggest that acute vulvar ulcers are a rare but distinct vaccine-associated adverse event, particularly in young women.

3. Novel Therapy for Autoantibody-Associated Infertility

Autoantibodies can impair reproductive function. Antiphospholipid autoantibodies cause recurrent pregnancy loss, while antinuclear autoantibodies are implicated in oocyte loss and premature ovarian insufficiency; however, the pathogenic roles of specific antinuclear antibodies remain poorly understood.

We identified a positive association between anti-centromere antibodies and embryonic developmental failure during IVF/ICSI. Although anti-centromere antibodies are characteristic of scleroderma, affected infertile patients lacked clinical or immunologic features of the disease, suggesting a distinct pathogenic mechanism.

Using a mouse oocyte model, we demonstrated that anti-centromere antibodies enter oocytes and disrupt meiotic chromosome segregation. Based on this foundational research, we have developed a novel therapeutic approach employing *in vitro* fertilization with centromere antibody-neutralizing antibodies. We are currently conducting Phase I and Phase II clinical trials to evaluate this treatment.

Publications

- 1) Piao H, Ishikawa H, Kobayashi T, Kitajo K, Yamaguchi A, Koga K, Shozu M. Progesterone improves motor coordination impairments caused by postnatal hypoxic-ischemic brain insult in neonatal male rats. *Pediatr Neonatol.* 2025 May;66(3):216-222. doi: 10.1016/j.pedneo.2024.03.012. Epub 2024 Aug 22. PMID: 39181832.
- 2) Matsuoka A, Mitsuhashi A, Usui H, Otsuka S, Nishikimi K, Tate S, Okuya R, Yazawa T, Shozu M, Koga K. Resolution of pelvic postoperative spindle cell nodule with sarcomatous onset after 9 years of follow-up. *J Obstet Gynaecol Res.* 2025 Feb;51(2):e16238. doi: 10.1111/jog.16238. PMID: 39965797.
- 3) Habu Y, Usui H, Hanawa S, Otsuka S, Okuya R, Katayama E, Matsuoka A, Nakamura N, Sakai N, Nishikimi K, Tate S, Ozawa Y, Hanaoka H, Shozu M, Koga K, Mitsuhashi A. Evaluation of the usefulness of sentinel lymph node mapping using indocyanine green in patients with cervical and endometrial cancers: A single-center prospective exploratory study. *J Obstet Gynaecol Res.* 2025 Feb;51(2):e16254. doi: 10.1111/jog.16254. PMID: 39988469.
- 4) Kaneko M, Ishikawa H, Kaneko T, Sato A, Shozu M, Koga K. Remnant ureter abscess linked to obstructed hemivagina and ipsilateral renal anomaly syndrome. *J Obstet Gynaecol Res.* 2025 Jan;51(1):e16171. doi: 10.1111/jog.16171. Epub 2024 Nov 28. PMID: 39605170
- 5) Tate S, Seki T, Nishikimi K, Unno Y, Itoi M, Ikeda S, Yoshikawa N, Akashi H, Suzuki E, Tanaka N, Hirakawa T, Kajiyama H, Takano H, Yoshihara K, Koga K, Okamoto A, Shozu M. Bevacizumab in frontline chemotherapy improved the survival outcome for advanced ovarian clear cell carcinoma: a multicenter retrospective analysis. *J Gynecol Oncol.* 2025 Sep;36(5):e80. doi: 10.3802/jgo.2025.36.e80. Epub 2025 Mar 10. PMID: 40150913; PMCID: PMC12426751.
- 6) Fujita M, Nagashima K, Shimazu M, Suzuki M, Tauchi I, Sakuma M, Yamamoto S, Hanaoka H, Shozu M, Tsuruoka N, Kasai T, Hata A. Ripple effect of temporary self-sampling HPV test on screening uptake in the next round: A secondary analysis of the ACCESS randomized controlled trial. *J Med Screen.* 2025 Jun 26: 9691413251352999. doi: 10.1177/09691413251352999. Epub ahead of print. PMID: 40567147.
- 7) Parental origin of chromosome sets in human embryos derived from tri-pronuclear zygotes Maki Fujita, Hirokazu Usui, Saori Nakahashi, Hiroshi Ishikawa Tatsuya Kobayashi, Naoki Aoyama, Yasunori Sato Yasuhito Michikura, Keiichi Kato, and Makio Shozu *Chiba Medical J.* 101E, 39-48, 2025, doi:10.20776/S03035476-101E-3-P39

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

文部科学省 ナショナルバイオリソースプロジェクト「病原微生物」

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 FY2022, the fifth phase has started.

Chiba University’s Medical Mycology Research Center (MMRC) is the “NBRP Center” for pathogenic microorganism, and this project is carried out by MMRC (pathogenic fungi/actinomycetes) and Nagasaki University’s Institute of Tropical Medicine (pathogenic protozoa). Working 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. Furthermore, in order to utilize the data for quality control of stored strains, we are collaborating with the RIKEN BioResource Center and the Center for Conservation of Microbial Genetic Resources, Gifu

University to maintain MALDI-TOF MS data.

The project aims to establish a reliable and sufficient at the collection to deal with infectious diseases carried by any pathogenic 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もの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, 2022年度より第5期が開始された.

NBRP病原微生物中核機関である千葉大学真菌医学研究センター (病原真菌・放線菌) 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. さらに, 保存株の品質管理に活用するため, 理化学研究所バイオリソースセンター, 岐阜大学微生物遺伝資源保存センターと連携し, MALDI-TOF MS のレファレンスライブラリー整備を行っている.

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微生物コレクションを目指している.

TABLE 1. Results for the fourth quarter of NBRP (strains).

Number of strains	FY2021	FY2022	FY2023	FY2024	FY2025*
Collection	837	702	688	985	235
Preservation	26, 591	24, 689	25, 322	26, 307	26, 566
Provision	1, 319	846	1, 161	1, 458	542

*: to 31th Aug., 2024



FIG. 1. Exhibition at the Annual Meeting of the Mycology Society of Japan in Chiba and the Society for Biotechnology, Japan in Hiroshima.

International Collaborative Research Program for Tackling the NTDs (Neglected Tropical Diseases) Challenges in African Countries

“Research on the diagnostics of early or latent eumycetoma: Search for new biomarkers, POC diagnostics, and development of a clinical epidemiology platform”

アフリカにおける顧みられない熱帯病 (NTDs) 対策のための 国際共同研究プログラム

「早期・潜在性真菌腫診断に関する研究：バイオマーカーの探索・POC診断と
臨床疫学プラットフォームの開発」

This research program is led by Prof. Satoshi Kaneko, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, in collaboration with the Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University, Tokai National Higher Education and Research System, the Medical Mycology Research Center, Chiba University, the Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University, and the Mycetoma Research Center, University of Khartoum. The goals of the project are as follows:

- (1) Identification of metabolites detected in mycetoma patients that can be used as a guide for early diagnosis and completion of treatment, and development of diagnostic tools targeting the identified metabolites
- (2) Development and evaluation of a rapid PCR diagnostic method using the LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) method that can be performed at rural medical facilities with limited facilities.
- (3) Establishment of a technique for measuring environmental DNA from soil to determine the geographic distribution of mycetoma-causing fungi for diagnosis and prevention measures, and development of a system for measuring geographic distribution.

The Center will be responsible for (2). Sharing mycetoma-causing fungi and their information with the University of Khartoum, designing LAMP primers and creating a prototype LAMP diagnostic kit with the support of Eiken Chemical

Co, Ltd. Furthermore, guidelines will be developed for implementation at medical institutions in areas where facilities are not available.

本研究プログラムは、長崎大学熱帯医学研究所 金子聰先生がプロジェクトリーダーとなり、名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所、千葉大学 真菌医学研究センター、神戸大学大学院 人間発達環境学研究科、ハルツーム大学 マイセトーマ研究センターが協力し推進する。その目標は以下の通りである。

- (1) 早期診断・治療終了の目安となるマイセトーマ患者から検出される代謝物の特定と特定された代謝物を標的とした診断ツール開発に向けての検討
- (2) LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法を用いた設備の整わない地方の医療施設において実施可能な迅速PCR診断法の開発と評価
- (3) 診断並びに予防対策に向けてのマイセトーマ原因真菌の地理的分布を把握するための土壌から環境DNA測定技術の確立と地理分布測定に向けての仕組みの開発

当センターは、(2) を担当する。ハルツーム大学とマイセトーマ原因菌とその情報の共有し、LAMP法プライマーの設計と栄研化学(株)の支援によるLAMP診断キットのプロトタイプを作成する。さらに、設備の整わない地域の医療機関での実施に向けたガイドラインを作成する。

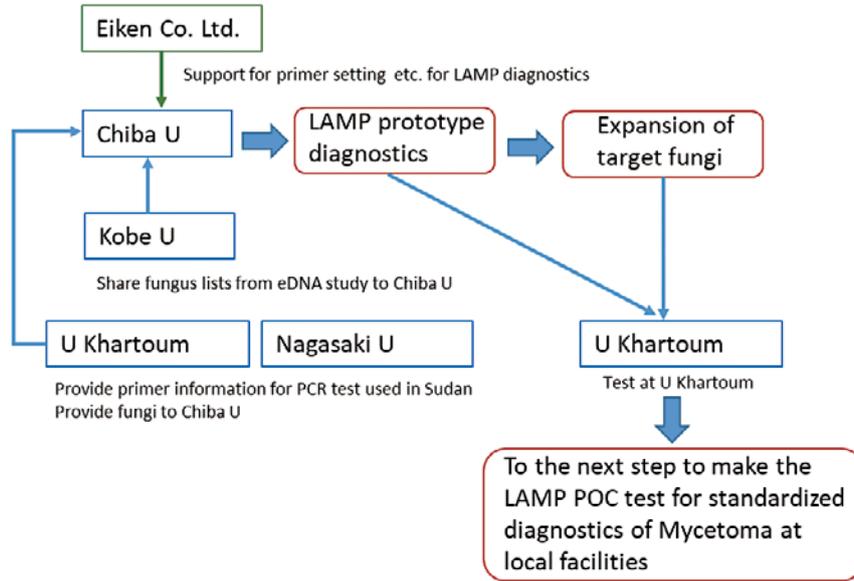


FIG. 1. Finding POC diagnosis using LAMP method of mycetoma infection.



FIG. 2. The cooperative institutions of Mycetoma Research Center, University of Khartoum and Symptoms of mycetoma.

Generating research infrastructure and novel technologies for anti-infective drug and vaccine discovery, AMED-CREST

“Study of the molecular mechanism of persistent infection and identifying novel privileged molecular structures for the next-generation antibacterial drug discovery”

日本医療研究開発機構革新的先端研究開発支援事業

感染症創薬に向けた研究基盤の構築と新規モダリティ等の技術基盤の創出：
「難治性感染症制御に資する細菌持続感染機構解明と次世代型抗感染症化合物の創出」

Bacteria that endure harsh environmental changes, such as antibiotic treatments and host immune responses, acquire genetic mutations while adapting to their surroundings. This adaptation enables them to survive and multiply, leading to persistent infections that are difficult to treat. Among these bacteria are “persisters” that withstand antibiotic exposure and pathogens responsible for long-term persistent infections within hosts. However, the mechanisms behind these adaptations remain unclear.

To address this gap, we conducted research aimed at developing innovative treatments for infectious diseases. Our approach involved analyzing the molecular mechanisms that allow bacteria to survive environmental changes and identifying compounds that target bacterial proteins acting as regulatory factors. We obtained the following results:

1. We successfully synthesized 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin and its derivatives, which were identified as antibacterial substances in a natural product library. We subsequently elucidated the structural requirements essential for their antibacterial activity. Furthermore, we developed a novel method for analyzing the accumulation of these antibacterial compounds within single cells by measuring their inherent fluorescence.
2. Using *Salmonella typhimurium* that constitutively expresses an acid-resistant GFP, we demonstrated that monocytes, not macrophages, are the primary host cells infected by *Salmonella* during persistent infection or following antibiotic treatment *in vivo*.

抗菌薬投与や宿主免疫応答等の過酷な環境変化に耐えて生存する細菌は、環境に適応し生存・増殖を繰り返す間に遺伝子変異を獲得し、難治性感染症の原因となる。環境に適応する細菌には、抗菌薬曝露でも生き残る“パーシスター”や、宿主内で長期間持続感染する病原菌があるが、これらの適応機構は未だ明らかではない。そこで、細菌が環境変化に耐えて生存する分子機構を解析し、制御因子となる細菌蛋白質を標的とした化合物を同定・有効性を検証することで、革新的な感染症治療薬を創成することを目的に研究を進めている。

これまでに次のような結果を得た。

- (1) 天然物ライブラリーから見出した新規抗菌化合物 5-geranyloxy-7-hydroxycoumarin とその誘導体の合成に成功し、抗菌活性に必要な構造を明らかにした。また、本化合物の蛍光性を利用した一細胞での抗菌化合物蓄積の解析法の確立に取り組んだ。
- (2) 酸耐性 GFP を恒常的に発現するサルモネラのマウス感染モデルにより、持続感染する主な細胞は単球であることを実証した。

Japan Agency for Medical Research and Development (AMED)

Japan Initiative for World-leading Vaccine Research and Development Centers
Chiba University “Synergy Institute for Futuristic Mucosal Vaccine Research and Development” (cSIMVa)

AMED ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業

ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点群 千葉シナジーキャンパス
(千葉大学 未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点)

As revealed by the recent COVID-19 pandemic, research on infectious diseases and vaccine development in Japan lagged behind that of Western countries. In addition to infectious disease research during non-pandemic periods, AMED will continue to support research and development using cutting-edge approaches over the long term to prepare for future pandemics. In fiscal 2022, AMED launched the “Japan Initiative for World-leading Vaccine Research and Development Centers.”

Currently, most developed vaccines are injectable and elicit blood IgG antibodies alone, which are not effective at preventing pathogen invasion of mucosal surfaces. As one of the synergy institutes, Chiba University will develop and implement mucosal vaccines that are expected to both prevent infection and prevent disease exacerbation, based on an understanding of the mechanisms of pathogen infection at mucosal sites, such as the respiratory and intestinal tracts, and of the host mucosal immune system. In addition, we will promote the commercial licensing of mucosal vaccines and mucosal adjuvants developed through this research. We aim to implement and market mucosal vaccines as a new vaccine modality.

今般の新型コロナウイルスによるパンデミックで顕在化したように、我が国における感染症研究やワクチン開発は欧米諸外国に比して後塵を拝している状況にある。AMEDでは、今後のパンデミックに備えるため、平時から感染症研究に加え、最先端アプローチによる研究開発を長期継続的に支援する「ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業」を2022年度から開始した。

現在、開発されているワクチンのほとんどが注射型のワクチンであり、ワクチン接種によって誘導される血中IgG抗体だけでは粘膜面における病原体の侵入は効果的に防げていない。この課題に対し、千葉大学は本事業におけるシナジー拠点の一つとして、呼吸器や腸管などの粘膜面における感染性病原体の感染機序および宿主粘膜免疫システムの理解を基盤とした、病原体の感染阻止と重症化回避の両側面が期待できる粘膜ワクチンの開発と実装化を目的として研究に取り組む。さらに、本研究を通して開発された粘膜ワクチンや粘膜アジュバントの企業導出を進め、新規ワクチンモダリティとしての粘膜ワクチンの実用化と市場展開の実現を目指す。

Research Institute of Disaster Medicine

災害治療学研究所

In October 2021, Chiba University established the Research Institute of Disaster Medicine, which aims to protect the health and safety of the people, the environment, and social activities against threats such as natural disasters and pandemics. The Institute brings together researchers from diverse backgrounds within the departments of Chiba University to promote interdisciplinary research, conduct co-creative research and development, and facilitate social implementation through collaboration among industry, academia, and government.

Faculty members of the MMRC have joined this Institute as members of the Division of Pandemic and Post-disaster Infectious Diseases and the Division of Infectious Disease Vaccine R&D in collaboration with the Department of Infectious Diseases of the Chiba University Hospital. We will conduct basic and clinical research on various infectious diseases, including severe respiratory disorders caused by SARS-CoV-2 infection, complex infectious diseases resulting from immune suppression, and respiratory infectious diseases associated with stress and dust inhalation resulting from natural disasters.

Prof. Goto's lab of the Division of Molecular Immunology manages the Biosafety Level 3 (BSL3) facility of the institute. Additionally, an animal BSL3 facility (ABSL3) will be scheduled to begin operations in the same building.

千葉大学では、2021年10月に災害治療学研究所を設立しました。本研究所では、自然災害やパンデミックなどによる社会的脅威に対して、国民の健康・安全および社会の環境・活動性を守ることができる「災害レジリエントな社会」を構築することを目標に、千葉大学が有する多様な部局から多彩なバックグラウンドを有する研究者が集結し、学際的研究の推進と、産学官が連動した共創的な研究開発と社会実装を目指しています。

真菌医学研究所の教員も本研究所に参画し、「災害感染症部門」及び「感染症ワクチン開発部門」のメンバーとして附属病院の感染制御部と連携し、新型コロナウイルス感染症に伴う重篤な呼吸器障害、免疫低下に起因する複合感染症や自然災害に伴うストレス・塵埃吸入等に起因する呼吸器感染症等の多様な感染症に関する基礎・臨床一体型研究を推進しています。

2023年に設置された新研究棟では、感染免疫分野の後藤研究室がバイオセーフティレベル3 (BSL3) 実験施設を管理しながら、研究活動を行っています。また同施設では、ABSL3施設が稼働する予定です。

URL: <https://www.ridm.chiba-u.jp/>

<https://www.ridm.chiba-u.jp/en/index.html>

The training course of pathogenic fungi

真菌医学研究センター病原真菌講習会

We annually held the training course of pathogenic fungi to learn knowledge and technique in order to treat pathogenic fungi and actinomycetes and the number of participants is 10. Every year, a number of application is over the participant and the course has been in a great demand. But due to the COVID-19, the course was cancelled in FY2020 and FY2021. From FY2022, the course content was reviewed and the number of participants was limited to 8.

Practice/Lectures: Pathogenic yeasts, pathogenic *Aspergillus*, causative agents of dermatological mycoses, imported and emerging pathogenic fungi, pathogenic zygomycetes, pathogenic actinomycetes, pathogenic protozoan, drug susceptibility testing methods, MALDI-TOF MS rapid identification methods, strain preservation methods, infectious disease methods, etc.

病原真菌講習会は、病原真菌・放線菌の基本的取り扱いの知識と技術を習得するために、本センターが実習を中心に、年1回定員10名で開催していた。例年、定員大きく超える応募があり、大変好評を得ていたが、2020、21年度はコロナ禍の影響で講習会は中止となった。2022年度より、実施期間を3日に短縮、参加者を8名に限定するなど感染防止措置を万全にする代わりに、外部講師の招聘、講習内容の見直しを実施した。

実習・講義内容：病原性酵母、病原性アスペルギルス、皮膚科領域真菌症原因菌、輸入および新興病原真菌、病原性接合菌、病原性放線菌、薬剤感受性試験法、MALDI-TOF MS 迅速同定法、菌株保存法、感染症法など



FIG 1. Scenes from the training course of pathogenic fungi.

miRaX Therapeutics K. K.

ミラックスセラピューティクス株式会社

MiRaX Therapeutics K. K., established in May 2020, is a drug discovery venture company originated from Chiba University and the University of Tokyo. Our main targets are “Development of nucleic acid drugs using miRNA inhibition technology” and “Development of novel NF- κ B inhibitors”.

1. Development of nucleic acid drugs using miRNA inhibition technology

The miRNA inhibition technology developed by the founders is based upon RNA decoy with unique secondary structure and has already been licensed out as a research reagent in many countries. It is now highly evaluated for its strong and long-lasting inhibitory effects. Our mission is to apply this technology to pharmaceuticals and create nucleic acid medicine for several diseases including MASH and liver fibrosis.

2. Development of NF- κ B inhibitors

Since the transcription factor NF- κ B is constitutively activated in inflammatory diseases and cancers, it is a promising therapeutic target. Since currently available NF- κ B inhibitors affects several signal transduction pathways simultaneously, their biological effects are broad and not specific. To develop specific inhibitor for NF- κ B, we focus on d4 family proteins (DPF1, DPF2, DPF3a/b) which are crucial for NF- κ B transactivation as adaptor proteins connecting NF- κ B and SWI/SNF complexes. We identified compounds that bind to these adaptor proteins, and are in the process of verifying the inhibitory activity on NF- κ B.

当社は、2020年5月に設立された千葉大学・東京大学発の創薬ベンチャー企業です。主な事業は「miRNA阻害技術を活用した核酸医薬品開発」と「新規NF- κ B阻害薬の開発」です。

1. miRNA 阻害技術を活用した核酸医薬品開発

創業者らが開発した独自の2次構造をもったRNAデコイであるmiRNA阻害核酸は、すでに研究用試薬として世界各国で販売されております。これまでに阻害効果の強さや持続の長さで、高い評価を得ています。このmiRNA阻害核酸をDDS技術と組み合わせ、代謝機能障害関連脂肪肝・肝線維症を含む種々の疾患を対象に核酸医薬品の開発を行っています。

2. NF- κ B 阻害薬の開発

転写因子NF- κ Bは多くの炎症疾患やがんなどで構成的に活性化されているため、その活性化に至る経路は、これらの治療の有望な標的となると考えられます。しかし既存の多くのNF- κ B阻害剤は、多くのシグナル伝達経路を同時に抑制することから、その効果は広範囲に及び非特異的です。そこで我々はNF- κ BとSWI/SNF複合体をつなぐアダプタータンパク質として転写活性化を担うd4ファミリータンパク質(DPF1, DPF2, DPF3a/b)に着目しました。これまでに、低分子化合物のスクリーニングを行い、これらのアダプタータンパク質に結合する化合物の同定に成功しており、これらの化合物のNF- κ Bの阻害活性の検証を進めています。



HP: <https://www.mirax-t.co.jp>

Electron microscope facility

電子顕微鏡施設

Transmission electron microscope (JEOL JEM-1400) and scanning electron microscope (Hitachi S-3400N) are installed on the 1st floor in A building, and used for ultrastructural research of cells and tissues. An ultramicrotome, rapid-freezing device, critical point drying equipment, carbon coater is also installed, and all procedure from fixation of biological samples to observation with electron microscopes can be carried out.

Original research is promoted, and joint research with not only laboratory in the center but also outside the center such as faculty of medicine in Chiba university is conducted. Electron microscopy training courses are opened several times a year and people not only in Japan but also from abroad participate. Consultation on electron microscope observation is accepted at any time by contacting with yama@faculty.chiba-u.jp (Yamaguchi).

センターA棟1階には、透過電子顕微鏡（日本電子 JEM-1400）と走査電子顕微鏡（日立 S-3400N）が設置されていて、細胞、組織の微細構造研究に用いられている。超薄切片作製装置（ウルトラミクロトーム）、急速凍結装置、臨界点乾燥装置、凍結乾燥装置、イオンスパッタ装置、カーボンコーター等を揃え、現在千葉大学にて唯一生物試料の超微形態観察を行うことができる施設となっている。

独自の研究を推進するとともに、センター内だけでなく、千葉大医学部など多くの研究室と共同研究を実施している。また、日本顕微鏡学会の電顕技術講習会を毎年複数回実施しており、日本国内だけでなく、海外からも参加者を迎えている。電子顕微鏡観察に関するご相談は、随時受け付けておりますので、ご興味のある方は、メール yama@faculty.chiba-u.jp、またはお電話で（043-222-7171 内線5964 山口）、ご連絡ください。



FIG 1. Transmission electron microscope JEM-1400.



FIG 2. Scanning electron microscope H-3400N.

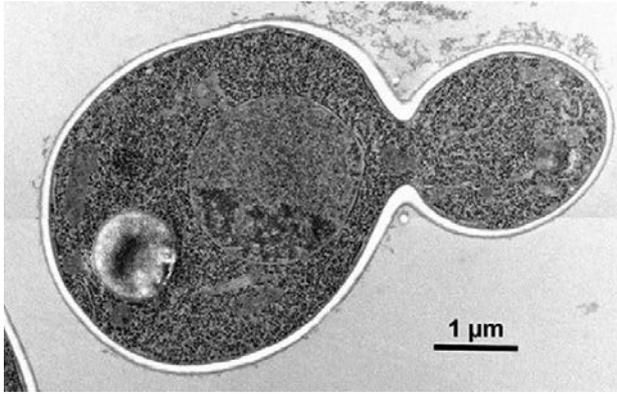


FIG 3. Ultrathin section of *Saccharomyces cerevisiae*.

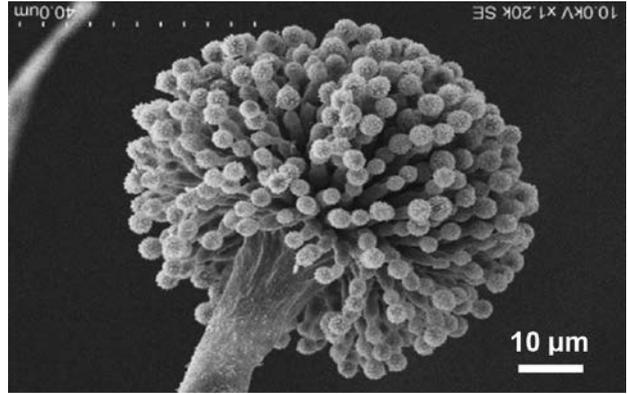


FIG 4. Spores of *Aspergillus*.

2024 Fiscal Year Cooperative Research Program Report

令和6年度 共同利用・共同研究報告書

研究課題 '24-01

Distinct sensing strategies of the viral RNA sensors via antiviral stress granules

Ji-Seung Yoo

(School of Life Sciences, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Summary

Infection by RNA viruses is detected by RIG-I-like receptor (RLR) family, RIG-I and MDA5, which function as intracellular sensors of viral RNA. Upon detection, these sensors induce the production of type I interferons (IFNs), which initiate the antiviral innate immune responses. Previously, we demonstrated that stress granule (SG)

formation, induced by the double-stranded (ds) RNA-dependent protein kinase (PKR), plays a critical role in enhancing RLR-mediated IFN signaling. In the present study, we evaluated the viral RNA sensor-mediated interferon signaling pathways induced by RNA ligands of different lengths. The results revealed that RNA length critically influences innate immune activation. Long dsRNAs engage both RIG-I/MDA5 and PKR to cooperatively trigger antiviral responses through antiviral SG (avSG) formation. In this context, even RNAs lacking a 5'ppp moiety can induce IFN signaling when the PKR-avSG axis is activated. In contrast, short RNAs preferentially activate RIG-I-mediated IFN responses in the absence of SGs. The PKR-RLR-avSG axis amplifies antiviral IFN signaling, whereas IFN responses elicited independently of PKR and avSGs are substantially weaker. In conclusion, RLRs utilize PKR to broaden sensing capacity and amplify IFN signaling via avSGs.

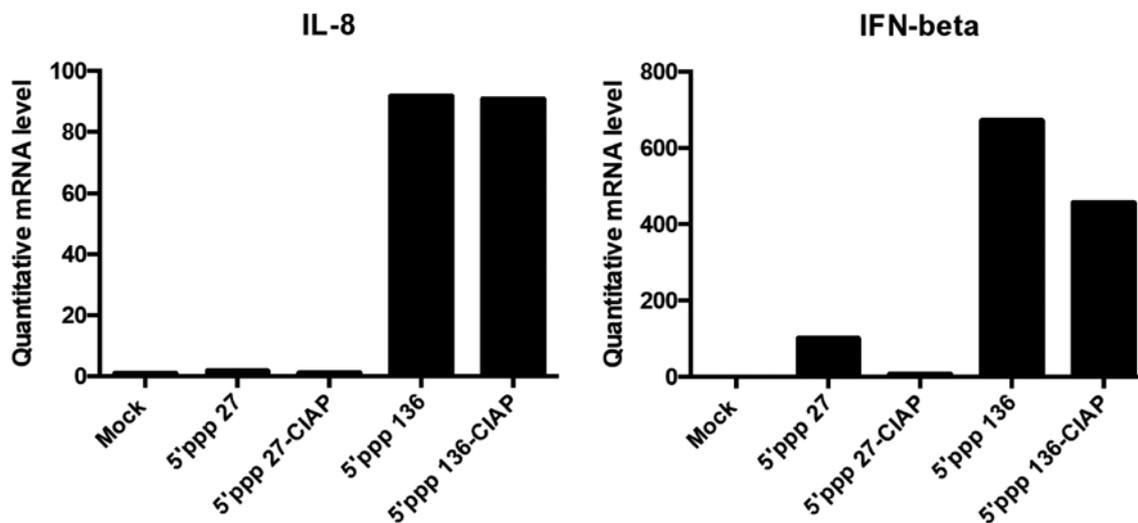


Figure 1. Short RNAs (27 bp) marginally induced IFN- β and IL-8 expression, while longer dsRNAs (136 bp) showed a significantly higher IFN and cytokine in EGFP-G3BP HeLa cell lines. CIAP-treated dsRNA that was devoid of a 5' triphosphate moiety was used as a control.

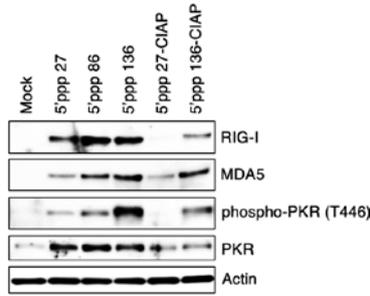


Figure 2. Long RNAs strongly induced PKR phosphorylation. Level of RIG-I and MDA5 was upregulated by short RNAs, suggesting ligand length-selective sensor expression and activation.

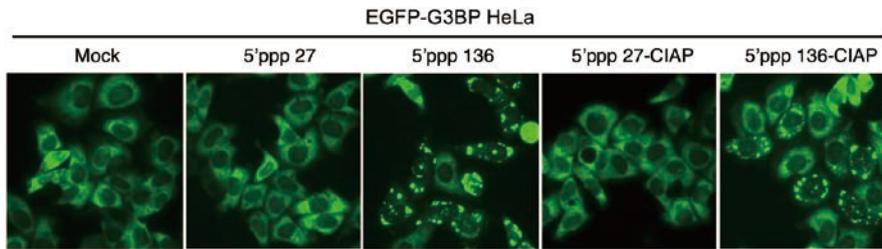


Figure 3. Long RNA ligands led to robust stress granule (SG) formation, while short RNAs failed to induce SGs.

研究課題 '24-02

Contribution of Dectin-2 and IL-17 to the host defense in experimental sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*

Sandro Rogerio de Almeida

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo)

Fabio Seiti Yamada Yoshikawa

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Shinobu Saijo

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Sporothrix brasiliensis is an emerging fungal pathogen responsible for a more aggressive form of sporotrichosis. In this project we aim to elucidate the immune mechanisms involved in the host defense against the infection. In our previous report we showed that Dectin-1, Dectin-2 and IL-17 are required for host protection.

In this period, we observed that the response profile is heavily influenced by the biological sex of the host (Figure

1). Male mice are highly susceptible to the pathogen, succumbing faster than female counterparts. This higher susceptibility is linked to a higher fungal burden in the males (Figure 2), indicating that they are unable to counter the fungal growth as efficiently as the females.

However, this bias is not dependent of classical antifungal immunity driven by lymphocytes and IL-17 since the same profile occurs with knockout animals (Figure 3). Even though the knockouts were weaker than the wild-type

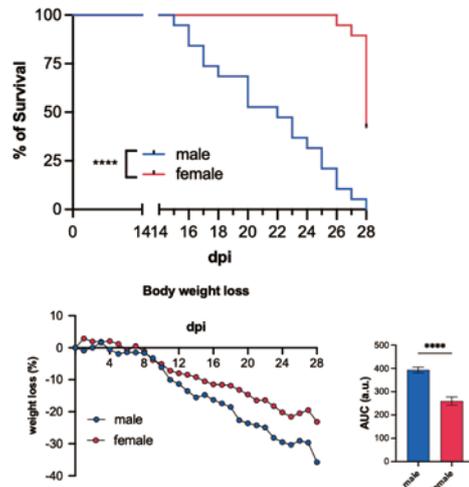


Figure 1. Sex bias in the outcome of *S. brasiliensis*.

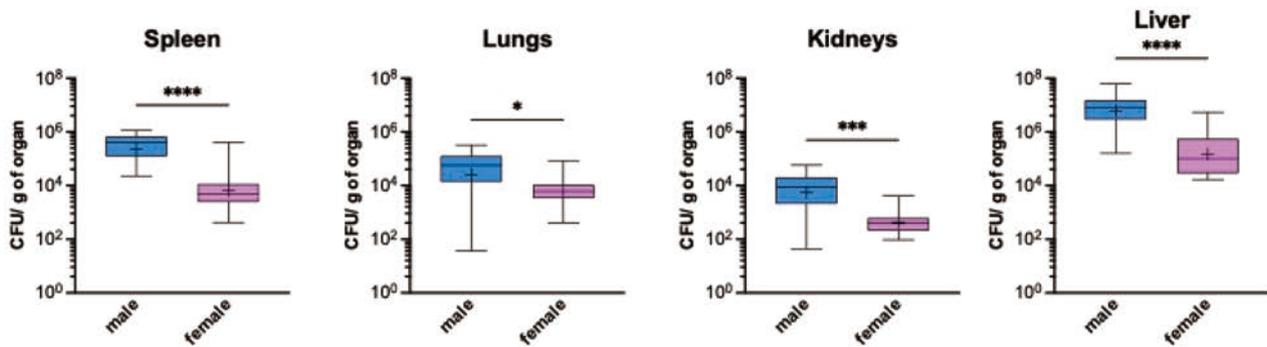


Figure 2. High fungal proliferation in the organs of male mice.

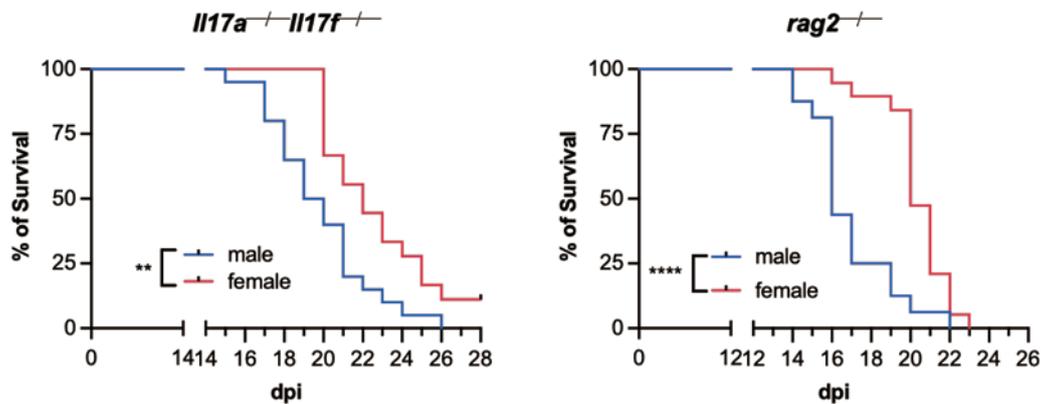


Figure 3. Sex bias phenotype is maintained even in knockout animals for IL-17 and lymphocytes.

animals, indicating that these elements are still required for optimal protection, females display, nevertheless, improved survival upon the challenge. Thus, the role of the sex is not relying on the shaping of the known antifungal immune response.

In our next steps we plan to investigate the why the sex is affecting the host defense.

発表論文

Yoshikawa, FSU., de Almeida, SR., Saijo S., Dectin-1 and dectin-2 drive protection against *Sporothrix brasiliensis* in experimental sporotrichosis. *Front. Immunol.*, 16:1639400., 2025.

研究課題 '24-03

Analysis of immunological mechanism for latent infection with *Cryptococcus neoformans* and its reactivation using a murine model

Tetsuji Aoyagi

(Department of Clinical Microbiology and Infection, Tohoku University Graduate School of Medicine)

Ko Sato

(Department of Clinical Microbiology and Infection, Tohoku University Graduate School of Medicine)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

潜在性クリプトコックス感染と内因性再燃の動物モデルにおける免疫学的機序の解析

青柳 哲史

(東北大学大学院医学系研究科感染病態解析学分野)

佐藤 光

(東北大学大学院医学系研究科感染病態解析学分野)

石和田 稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

クリプトコックスは莢膜を持った酵母型真菌であり、経気道的に肺に感染し肺クリプトコックス症を引き起こす。特に免疫の低下した宿主では、中枢神経系に播種し重篤な播種性クリプトコックス症に至る。

これまでクリプトコックス症は初感染時に発症すると考えられてきたが、近年結核と同様に潜在性感染から内因性再燃によって発症すると考えられるようになった。しかしながら、これを証明するための適切な動物モデルはほとんどなく、内因性再燃の際にどのような免疫応答が関与しているのか不明である。そこで、本研究では、当研究室で樹立した本真菌の主要なタンパク質抗原Cda2を認識するT細胞受容体を高発現するトランスジェニックマウス(CnT-II)にクリプトコックスを感染させた潜在性感染モデル、免疫抑制剤の1つであるフィンゴリモド(FTY720)を投与した内因性再燃モデルを作成し、免疫応答の解析を行った。

CnT-IIマウスにクリプトコックスを感染させた結果、2-3か月後に肉芽腫様応答及び肺内生菌数の定常化が観察された。このマウスにFTY720を投与した結果、肉芽腫様応答の低下、肺内生菌数が増加した。内因性再燃マウスでは肺でのTh1関連サイトカイン産生とエフェクターメモリーCD4⁺T細胞が低下した。Cda2-MHCクラスIIテトラマーを作成し、Cda2特異的なCD4⁺T細胞を解析した結果、この特異的なメモリーCD4⁺T細胞が減少していた。メモリーCD4⁺T細胞内のIFN- γ 発現量はコントロールと比較しFTY720投与群で差はなく、FTY720は数的にTh1型免疫応答を抑制していた。

以上の結果から、潜在性感染およびFTY720投与による内因性再燃モデルの樹立に成功し、この再燃にはTh1免疫応答低下が関与することが示唆された。今後、詳細な免疫機序を解明することで、潜在性感染の検出方法や内

因性再燃の予防法や治療法の確立を目指したい。

研究課題 '24-04

Elucidation of antiviral immune response regulated by microRNA regulatory factors

Tomoko Takahashi

(Graduate School of Science and Engineering, Saitama University)

Mitsutoshi Yoneyama

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Kumiko Ui-Tei

(Graduate School of Science, The University of Tokyo)

microRNA制御因子による抗ウイルス免疫応答の制御メカニズムの解明

高橋 朋子

(埼玉大学)

米山 光俊

(千葉大学真菌医学研究センター)

尾野 本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

程 久美子

(東京大学大学院理学系研究科)

研究成果

ウイルスが感染すると誘導される代表的な免疫応答としてI型インターフェロン(IFN)の分泌を伴う応答(IFN応答)とウイルス感染細胞のアポトーシスがある。受入教員である米山教授らが発見したRIG-I like receptors(RLRs)は、感染したウイルスのRNAを細胞内で感知しIFN分泌を誘導するウイルスセンサータンパク質であり、RIG-I, MDA5, LGP2からなる。本共同研究ではこれまでに、RLRsの一つであるLGP2が、ウイルス感染により発現量が増加すると、microRNA(miRNA)という小分子ノンコーディングRNAの制御因子であるTRBPと相互作用し、miRNA成熟化阻害を介して、ウイルス感染細胞のアポトーシスを促進することを明らかにしてきた

(Takahashi et al. 2018, 2020). 2024年度はウイルス感染によるTRBPの機能変換を介した、抗ウイルス免疫応答の新規制御機構を見出し、論文として報告した (Shibata et al. 2024). 本研究では、TRBPはウイルス感染により活性化したタンパク質切断酵素カスパーゼにより切断され、ウイルス感染細胞のアポトーシスをさらに促進するだけでなく、過剰なIFN分泌を抑制することを解明した。すなわち、我々が同定したLGP2-TRBP相互作用を中核とした分子機構により、ウイルス感染細胞における免疫応答のバランスは精密に制御されていると考えられる。

発表論文

1) Keiko Shibata, Harune Moriizumi, Koji Onomoto, Yuka Kaneko, Takuya Miyakawa, Shuhei Zenno, Masaru Tanokura, Mitsutoshi Yoneyama, Tomoko Takahashi, Kumiko Ui-Tei. Caspase-mediated processing of TRBP regulates apoptosis during viral infection. *Nucleic Acids Research*. 2024;52:5209-5225. doi: 10.1093/nar/gkae246

研究課題 '24-05

Comparative Study on Genotyping, Biofilm, and Antibiotic Tolerance among Indonesia and Japan *Streptococcus pneumoniae* Isolates

Dodi Safari
(Eijkman Research Center for Molecular Biology)
Naruhiko Ishiwada
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

研究成果

Whole genome sequencing (WGS) analysis of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Japan and Indonesia were performed at each laboratory, and the data was compared. Monthly web meetings were held to exchange information. So far, it has been revealed that Sequence types (ST) of serotype 15B/C differ between Japan and Indonesia, and ST 3280 that were previously isolated frequently in the United States have become more frequently isolated in Japan since the COVID-19 outbreak. As for serotype 3 isolates, it became clear that the ST types were also differ between Japan and

Indonesia, and that the drug resistance patterns were also differ between the two countries. The results of the comparative analysis will be published in a future.

研究課題 '24-06

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

Takashi Umeyama, Yoshitsugu Miyazaki
(Department of Fungal Infection, National Institute of Infectious Diseases)
Hiroki Takahashi
(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

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
(千葉大学真菌医学研究センター)

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。

2024年度では、*A. fumigatus* における新たなゲノム編集技術の開発と、それを用いた新規遺伝子スクリーニング系の構築に取り組んだ。主な成果は以下の通りである。

1. 簡便な遺伝子破壊法の開発：薬剤耐性マーカーを

用いない遺伝子破壊法として、2つのsgRNAを単一プラスミドから発現させ、短い一本鎖DNA (ssDNA) をリペアテンプレートとして利用する系を開発した。この手法をモデル遺伝子である分生子色素形成遺伝子 (*pksP*) に適用したところ、エレクトロポレーション法により高効率で相同組換えによる遺伝子破壊が起こることを実証した。一方で、ゲノム構造を解析した結果、一部のクローンでは意図しないゲノム再編 (逆位: Inversionや非同末端結合: NHEJによる修復) が生じることも確認した。この手法は、迅速な遺伝子機能解析に貢献すると期待される。

2. Prime Editing技術の導入と応用: DNA二本鎖切断 (DSB) を介さずに、より精密な塩基置換や短い欠失・挿入を可能にするPrime Editing技術の*A. fumigatus*への導入を試みた。Cas9ニッカーゼ融合逆転写酵素, pegRNA, ngRNAを発現するシステムを構築し、*pksP*遺伝子に対して意図した5塩基対の欠失を高効率で導入できることを示した。この技術は、DSBによる予期せぬ変異リスクを低減しつつ特定の変異を導入する際に有用である。
3. CRISPRライブラリ構築の継続: 本研究の主目的である新規遺伝子スクリーニングに向け、これらの基盤技術開発と並行して、全遺伝子を標的とするCRISPRライブラリの効率的な導入方法の構築を継続している。

これらのゲノム編集技術開発により、バイオフィルム形成や薬剤耐性に関わる遺伝子機能解析、および網羅的スクリーニングの基盤が強化された。今後は、構築を進めているCRISPRライブラリを用いたスクリーニングを実施し、目的とする新規関連遺伝子の同定を目指す。

発表論文

- 1) Ken Miyazawa, Takashi Umeyama, Akira Yoshimi, Keietsu Abe, Yoshitsugu Miyazaki *Aspergillus* cell surface structural analysis and its applications to industrial and medical use *Medical Mycology Journal*. 65(3): 75-82, 2024
- 2) Tomoya Sagawa, Seiko Ohno, Yoji Urata, Tamiko Takemura, Mamiko Niki, Yukihiro Kaneko, Shigeki Nakamura, Takashi Umeyama, Yoshitsugu Miyazaki,

Tatsuya Yuba, Chieko Takumi, Noriya Hiraoka A case of pulmonary co-infection with *Aspergillus fumigatus* and Mucorales in a patient with sarcoidosis. *Respiratory Medicine Case Reports*. 52: 102130, 2024

研究課題 '24-07

Molecular analysis of antimicrobial resistance (AMR) for animal dermatophytosis

Rui Kano

(Teikyo University Institute of Medical Mycology (TIMM))

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

動物由来抗真菌薬耐性 (AMR) 皮膚糸状菌症に対する分子生物学的解析

加納 塁

(帝京大学医真菌研究センター)

渡邊 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

帝京大学医真菌研究センター保存菌株で、2018年に北京のペットの猫皮膚糸状菌症から分離されたテルビナフィン (TBF) 耐性 *Microsporum canis* (47C株) は、分離時から現在に至るまで年に数回継代を繰り返し保存していた。本株は現在においてもTBFに対する最小発育阻止濃度は>32 mg/Lと耐性を示すことから、耐性機構が遺伝子変異を伴うことが推測された。そこで次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い、GenBankに登録される、*M. canis*のゲノム情報 (CBS 113480株, GenBank登録番号 ASM15114v1) と比較を行った。解析した47Cゲノムは、約23.2 Mbで、CBS 113480株とは1,455箇所の遺伝子変異を検出したが、そのなかでTBFの標的酵素遺伝子であるスクワレンエポキシダーゼ遺伝子F395Lの変異を確認した。この変異は皮膚糸状菌の *Trichophyton rubrum* および *T. interdigitale* のTBF耐性株に共通するアミノ酸変異であり、これがTBFの親和性を低下させ耐性化に至ったと推測された。*M. canis*におけるTBF耐性

およびスクワレンエポキシダーゼ遺伝子変異の発見は、本研究が初めての成果である。今後、動物由来の耐性株を集めるとともに、同じ変異を認めるかどうか疫学調査を実施する予定である。

発表論文

- 1) Nojo H, Watanabe A, Koichi Makimura I and Rui Kano. Genomic analysis of terbinafine resistance in *Microsporium canis* isolated from a feline dermatophytosis. Medical Mycology Journal. 2025;66(1):17-20. doi: 10.3314/mmj.24-00024.

研究課題 '24-08

Pathophysiological analysis of aspergilloma

Masato Tashiro

(Department of Infectious Diseases, Nagasaki University
Graduate School of Biomedical Sciences)

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Teppei Arai

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

アスペルギローマの病態解析

田代将人

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

新居鉄平

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

2024年度は、アスペルギローマ周囲に伴う血管新生機構を解明することを目的に、我々が確立したアスペルギローママウスモデルを用いて菌球内の血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 量と血管内皮マーカーであるCD31陽性面積を時系列解析した。菌球摘出後に調製したホモジネートについて、Luminex®マルチプレックスアッセイによりVEGF濃度を定量し、Galactomannan Indexで菌球量を補正し

た。その結果、0週中央値0.18に対し1-4週で1.27へ有意上昇 ($p<0.05$)、8-16週では2.63へさらに増加した ($p<0.01$)。並行して作製した連続切片をCD31抗体で免疫染色し、ImageJを用いて菌球周囲500 μm 帯域の陽性面積率を測定したところ、1-4週で4.3%から11.8%へ増大 ($p<0.05$)、8-16週では15.6%と高値を維持した。各時点 $n=6-8$ 匹、測定は三独立リピートで再現性を確認し、統計解析にはMann-Whitney U検定およびBonferroni補正を適用した。これらの結果は、死菌球が生体内で段階的かつ持続的にVEGF依存的血管新生を誘発し、線維化と相まって新たな微小環境を形成することを示唆する。本成果により、抗VEGF療法や線維化抑制剤を併用する新規治療戦略の検討基盤が得られた。今後はVEGF中和抗体投与とシングルセル解析を組み合わせ、血管新生制御メカニズムを精査する予定である。

発表論文

- 1) Tashiro M, Takazono T, Izumikawa K: Chronic pulmonary aspergillosis: comprehensive insights into epidemiology, treatment, and unresolved challenges. Ther Adv Infect Dis 11(20499361241253751), 2024.

研究課題 '24-09

Analysis of a molecular network regulating the expression of azole antifungal efflux pumps in dermatophytes

Tsuyoshi Yamada

(Institute of Medical Mycology, Teikyo University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Sayaka Ban

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

白癬菌においてアゾール系抗真菌薬排出ポンプの発現を制御する因子の解析

山田 剛

(帝京大学医真菌研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

伴さやか

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

近年、皮膚糸状菌症（白癬）において原因菌の薬剤耐性問題が拡大している。国内で発生する白癬の原因菌の大半を占める *Trichophyton rubrum* がアゾール系抗真菌薬（アゾール）に薬剤耐性化する主な原因は、アゾールを特異的に排出する薬剤排出トランスポーター（ポンプ）の過剰発現である。現在、申請者らは *T. rubrum* においてアゾール排出の中核的機能を果たしているポンプの制御機構を解析している。申請者らが分離したアゾール耐性 *T. rubrum* TIMM20092 は、MDR2, MDR3 などの薬剤排出ポンプ（ABC トランスポーター）が過剰発現している。令和 5 年度共同利用・共同研究（課題番号：'23-15）において、申請者らは MDR2 や MDR3 の制御に関与している可能性のある TERG_01042 遺伝子を見出した。そして、ゲノム編集技術を用いて TIMM20092 の TERG_01042 遺伝子座を破壊すると、本株のアゾール感受性が改善することが判明し、TERG_01042 が MDR2 や MDR3 のレギュレーターの一つである可能性が浮上した。

令和 6 年度共同利用・共同研究（課題番号：'24-09）では、TERG_01042 破壊株と親株の間で MDR2・MDR3 の発現量を比較解析し、TERG_01042 破壊株の MDR2・MDR3 発現量が親株のそれに比べ低下していることを見出した。また、TERG_01042 破壊株に TERG_01042 遺伝子を導入した Revertant を作成した。その他、ABC トランスポーターの制御に関わる可能性のある別の遺伝子（TERG_00615）を見出し、TIMM20092 の TERG_00615 遺伝子座を破壊した変異株を作成した。次年度共同利用・共同研究において、TERG_00615 破壊株のアゾール感受性を解析する予定である。

研究課題 '24-10

Development of novel therapeutic approach for systemic persister infections

Yumi Matsuoka

(Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

Hiroki Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akiko Takaya

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University)

皮膚を場としたパーシスター感染症克服法の開発

松岡悠美

(大阪大学・免疫学フロンティア研究センター)

高橋弘喜

(千葉大学真菌医学研究センター)

高屋明子

(千葉大学・大学院薬学研究院)

研究成果

本研究チームは、2021年度AMED-CREST「感染症創薬に向けた研究基盤の構築と新規モダリティ等の技術基盤の創出」（代表：高屋明子、2021-2026）に採択されており、皮膚、および全身 *Staphylococcus aureus* の感染モデルを本共同研究支援により確立することにより、パーシスターをターゲットとした候補薬剤の生体内での、評価が可能とした。また、これまでに、NICUなどで得られた院内黄色ブドウ球菌感染症と共通する菌の進化形態が、Agr クオラムセンシングの可逆性のサイレンシングによるものであることを発見した。この形質が、院内感染症のパーシスター発生や、抗生剤耐性獲得に関わっていることを見出した。一方、ヒト皮膚生着株においてはこのような機構を介した進化形態は見られなかった。本年度は、これらの院内定着に必要な形質が、*S. aureus* ゲノムメチル化によるものであることを見出し、このメチル化を制御するであろう候補遺伝子の欠損株を作成し、形質を確認したところ、メチル化酵素 *mraW* のゲノム上欠損株は Agr クオラムセンシングの可逆性のサイレンシングの形質を示し、さらにプラスミドを用いてメチル化酵素 *mraW* を補完した株を作成すると、Agr の発現はもとの野生型の形質に復帰することが明らかとなった。メチル化酵素 *mraW* は rRNA のメチル化も起こすため、この影響を除外するため Agr クオラムセンシングの可逆性のサイレンシング株の rRNA のメチル化についても解析し、rRNA のメチル化は Agr クオラムセンシングの可逆

性のサイレンシングに影響していないことを確認した。

発表論文

- 1) Nakamura Y(松岡悠美ペンネーム)*, ○Takahashi H* (受入教員), 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 and Shimojo N. Staphylococcus Agr virulence is critical for epidermal colonization and associates with atopic dermatitis development. *Science Translational Medicine* 12(551): eaay4068. 2020.
- 2) Tanaka D, Ishihara J, ○Takahashi H*, Kobayashi M, Miyazaki A, Kajiya S, Fujita R, Maekawa N, Yamazaki Y, Takaya A*, Nakamura Y, Furuya M, Sekiguchi T, Shoji S. High-Efficiency Single-Cell Containment Microdevices Based on Fluid Control. *Micromachines (Basel)*. 2023 14(5):1027. doi: 10.3390/mi14051027.
- 3) Aoyama R, Nakagawa S, Ichikawa Y, Inohara N, Yamazaki Y, Ito T, Sugihira T, Kono M, Akiyama M, ○Takahashi H*, Takaya A*, Ichikawa F, Nakano T, Tanaka S, Koyano Y, Fujimoto M, Núñez G, Shimojo N, Nakamura Y. Neonatal skin dysbiosis to infantile atopic dermatitis: Mitigating effects of skin care. *Allergy*. 2024. doi: 10.1111/all.16095.
- 4) Yamazaki Y, Ito T, Nakagawa S, Sugihira T, Kurita-Tachibana C, Villaruz AE, Ishiguro K, Salcman B, Li S, Takada S, Inohara N, Kusuya Y, Shibata A, Tamai M, Aoyama R, Inoue K, Murata S, Matsushita K, Miyabe A, Taniguchi T, Igari H, Ishiwada N, Taniguchi M, Nakada TA, Matsue H, Fujimoto M, Hishiki H, Osone Y, Hamada H, Shimojo N, Suzuki T, Otto M, Núñez G, ○Takahashi H*, Takaya A*, Nakamura Y*. Altered genomic methylation promotes Staphylococcus aureus persistence in hospital environment. *Nat Commun*. 2024, 15(1):9619. *: **co-senior authors**

研究課題 '24-11

Establishment of drug susceptibility test of non-spore forming filamentous fungi

Takahito Toyotome

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

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

孢子非形成糸状菌の薬剤感受性試験確立

豊留孝仁

(帯広畜産大学)

渡邊 哲

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

抗真菌薬感受性試験は、病原真菌に対して有効な薬剤を評価するための重要な手法である。現在広く用いられている微量液体希釈法は、酵母状真菌や胞子を形成する糸状菌に適用可能だが、アレルギー性気管支肺真菌症の原因であるスエヒロタケや、胞子形成が乏しい *Aspergillus lentulus* など、一部の病原真菌には適用が困難である。そのため、薬剤感受性試験の結果を求められても、対応できない場合がある。

本研究では胞子形成が困難な真菌に対する薬剤感受性評価法の確立を目的とし、千葉大学真菌医学研究センター保管の15株の *A. lentulus* 株を用いて検討を行った。アゾール系抗真菌薬イトラコナゾールとポリコナゾールを選び、*A. lentulus* の胞子ではなく、菌糸細胞を用いて、本研究で確立した新たな感受性評価法により検討を行った。*A. lentulus* に対してイトラコナゾールは0.25 µg/mLの濃度から強い生育阻害を示し、ポリコナゾールには2 µg/mLが必要であった。この結果は従来法で得られた最小発育阻止濃度の傾向と同様であった。

さらにスエヒロタケを用いて予備的検討を行い、イトラコナゾールに対する感受性は株間のばらつきが大きいものに対して、ポリコナゾールではいずれの株も0.5もしくは1 µg/mLの濃度で80%程度の生育阻害が認められた。このように、本研究では胞子を形成しない真菌に対

する感受性評価法の確立に向けて、一定の成果が得られた。さらなる検証と自動化等を進めることで現場レベルでも利用可能で臨床上重要な情報を提供できる方法を確立できると期待している。

研究課題 '24-12

Genetic analysis of SARS-CoV-2 variants and basic research for drug discovery against COVID-19

Kengo Saito

(Department of Molecular Virology, Graduate School of Medicine, Chiba University)

Eiji Ido

(Department of Infection Control, Chiba University Hospital)

Mitsutoshi Yoneyama, Koji Onomoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

SARS-CoV-2変異株の遺伝子解析と重症化を示すCOVID-19治療薬の探索

齋藤謙悟

(千葉大学大学院医学研究院・分子ウイルス学)

井戸栄治

(千葉大学医学部附属病院・感染制御部)

米山光俊・尾野本浩司

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

新型コロナウイルスによる急性呼吸器感染症(COVID-19)は2019年末に中国武漢市付近から突然発生し、瞬く間に世界中に感染拡大した。その後、今日に至るまで変異を繰り返しながら新しい株が世界各地において波状の流行を繰り返している。これに対抗する予防策として、2021年以降には各株に対応したmRNAワクチンなど種々のワクチンが開発され、その時々において少なからぬ感染予防効果、あるいは重症化阻止を示して来たのがこの5年間であった。一方、その誘導抗体価の持続性の短さや免疫逃避する変異株への対応など多くの問題点も指摘されている。本研究はmRNAワクチンを接種された千葉

大学ワクチンセンターのリソースを利用し、変異株に対する中和抗体の効果を比較評価すること、また、ワクチン耐性変異株に対する治療薬探索してウイルス増殖阻止効果を示す抗ウイルス薬化合物の探索を目的としている。

2024年度の実際の成果としては、第8波から第9波の流行時に千葉大学附属病院に入院した患者らの鼻腔拭い液を出発材料としてVERO-E6/TMPRSS2細胞を用いてウイルス分離を行った10株の代表的変異株(オミクロン変異株XBB. 1, GK. 1, BA. 2.86, JN. 1株など)と、今年度に分離した変異株Kp. 3など4株を加えたものに対し、WH株, BA. 2株等と比較しながら千葉大学ワクチンセンターのリソースの20検体を用いて中和抗体試験を行い中和抗体に耐性を示す株の検索を行った。

治療薬探索研究としては、2023年度に引き続き、治療現場への将来的実用性を念頭に、特に経口可能な薬剤に焦点を絞って調べた。その結果、昨年流行して分離したXBB株やJN. 1株に対して、ウイルスがコードする3CLプロテアーゼ阻害薬であるEnsitrelvirに加えて、投薬管理しやすい経口薬のRNAポリメラーゼ阻害薬VV116(国内では未承認)の抗ウイルス活性が非常に高いことを実験室レベルで確認した。またこれらの薬剤を組み合わせると、抗ウイルス効果を一段と増強できることが明らかとなり、複数の抗ウイルス剤を組み合わせる新しい併用療法の可能性が示されたものと考えている。

論文発表

- 1) Dynamic diversity of SARS-CoV-2 genetic mutations in a lung transplantation patient with persistent COVID-19. Igari H, Sakao S, Ishige T, Saito K, Murata S, Yahaba M, Taniguchi T, Suganami A, Matsushita K, Tamura Y, Suzuki T, Ido E. Nat Commun., 15(1):3604, 2024.
- 2) Antibody Responses and Infection Prevention Following the Sixth Vaccination Using the BA.1 Bivalent COVID-19 Vaccine Among Healthcare Workers During the XBB Variant Dominance in Japan. Yahaba M, Asano H, Saito K, Murata S, Kawasaki K, Chiba H, Yokota S, Yoshikawa H, Herai Y, Yamagishi K, Shiko Y, Matsushita K, Hanaoka H, Taniguchi T, Yokote K, Nakajima H, Ido E, Igari H. Jpn. J. Infect. Dis., 78:106-109, 2025.

研究課題 '24-13

Unveiling new effectors underlying the genomic evolution towards drug resistance and biofilm formation in *Candida glabrata*

Miguel C Teixeira

(Institute for Bioengineering and Biosciences, Instituto Superior Técnico/Bioengineering Department, University of Lisbon, Portugal)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

This collaborative project has significantly advanced our understanding of the genetic mechanisms underlying antifungal drug resistance and biofilm formation in *Candida glabrata*, an opportunistic yeast species and the second most common cause of candidaemia. Building on over a decade of successful collaboration—yielding 17 co-authored publications—this study aimed to dissect the genomic evolution and transcriptional regulation that drive phenotypic adaptations critical for persistent infection and treatment failure. Focusing particularly on the role of the Mediator Complex, we analyzed the function of selected subunits implicated in azole resistance and biofilm development.

Comparative transcriptomic profiling, performed through RNA sequencing of wild-type and single deletion mutants, revealed distinct transcriptional signatures in response to antifungal drug exposure. These analyses identified a set of differentially expressed genes associated with biofilm maturation and multidrug resistance, suggesting coordinated regulatory mechanisms mediated by specific components of the Mediator Complex. Further functional characterization of these mutants was conducted using standardized antifungal susceptibility assays, including the NCCLS M27-A2 protocol, which confirmed altered resistance profiles in strains lacking selected transcriptional regulators. The use of GFP-tagged constructs enabled real-time visualization of subcellular localization and trafficking patterns of candidate proteins, while co-immunoprecipitation assays supported evidence for direct protein-protein interactions relevant to regulatory

complex assembly. Moreover, directed evolution experiments, along with genomic comparisons of clinical isolates with varying biofilm-forming capacity, allowed us to identify novel genetic variants associated with enhanced biofilm production. These candidate effectors are now under functional validation. Preliminary data suggest that some of these newly discovered genes may act as key modulators of surface adhesion, matrix production, or antifungal tolerance. Importantly, comparative genomic and expression analyses across a large panel of clinical isolates have established correlations between specific polymorphisms and phenotypic resistance traits, reinforcing the clinical relevance of our findings. These insights contribute to a growing framework for understanding the adaptive genome plasticity of *C. glabrata* and pave the way for more targeted therapeutic strategies.

In conclusion, this collaborative effort has yielded substantial progress toward unraveling the molecular and evolutionary basis of drug resistance and biofilm development in *Candida glabrata*. The results obtained thus far are highly promising and have laid the groundwork for future translational applications in antifungal drug development and infection control. A manuscript detailing the major findings of this work is currently in preparation.

研究課題 '24-14

Antibacterial/antimicrobial activity analysis of newly developed antibiotics

Isamu Shiina

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

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Akira Watanabe

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

混合炭素鎖カップリング法による新規抗菌剤の合成ならびに抗真菌・抗細菌活性研究

椎名 勇

(東京理科大学 理学部第一部・教授・応用化学科)

石和田稔彦

(千葉大学 真菌医学研究センター 感染症制御分野)

渡邊 哲

(千葉大学 真菌医学研究センター 臨床感染症分野)

研究成果

これまでの共同研究で、ユーシェアライド(天然24員環マクロライド)と比較し、カンジダ、アスペルギルスなどに対する抗真菌活性およびMRSAを含むグラム陽性菌に対する抗細菌活性が、いずれも高いユーシェアライド類縁体(EU-N)を見出し、その供給法を確立した。さらに構造活性相関解析から、ユーシェアライドに含まれるホスホリルコリン基が活性の発現に必須の官能基であることを見出した。すなわち、活性発現の端緒となるユーシェアライド分子の細胞膜表面への静電的な結合におけるホスホリルコリン残基の関与が示唆された。

令和6年度は新たに混合炭素鎖カップリング法を開発することでリード化合物の大量合成を可能とし、得られた新規物質の構造活性相関研究を展開した。その結果、検討したユーシェアライド新規類縁体の被検菌(真菌): *Cryptococcus neoformans*ならびに(白癬菌): *Trichophyton interdigitale*に対する効果は、抗真菌化合物として知られるホスホリルコリン構造を持つ化合物Gentianaline Bと同程度であることが分かった。また、被検細菌(細菌): MRSA 0603, MSSA 07012, MSSA 1504, GAS 1102, GBS 15012, SP 16P62に対してGentianaline Bは全く活性を示さなかったが、新規化合物は良好な細菌成長阻害活性を示すことが明らかとなった。

研究課題 '24-15

Development of the detection for endobacteria within mycelia of *Rhizopus microsporus*, the causative agent of mucormycosis

Yusuke Takashima

(Research Center of Genetic Resources, National Agriculture and Food Research Organization)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Sayaka Ban

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

ムコール症の原因菌 *Rhizopus microsporus* のエンドバクテリアの検出技術確立の試み

高島勇介

(農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源研究センター)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

伴さやか

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

ムコール症の原因菌 *Rhizopus microsporus* には、抗真菌薬アムホテリシンBへの感受性を低下させる細胞内共生細菌(エンドバクテリア)の存在が報告されている。また、罹病組織から *R. microsporus* およびエンドバクテリアが同所的に検出された例が報告され、今後、*R. microsporus* におけるエンドバクテリアの有無がムコール症の感染・治療効果に関わるかもしれない。本研究では、質量分析計を用いた迅速・安価なエンドバクテリア検出法の確立を目的とした。はじめにエンドバクテリアの有無が既知の *R. microsporus* 7菌株について、受入教員が予備的にエンドバクテリアを含む菌糸そのままからギ酸を用いてタンパク質を抽出し、マススペクトルを取得し比較してみた結果、少数菌株の比較だが、菌糸そのままの解析でエンドバクテリアの有無の判別可能という結果が得られた。使用したギ酸を用いた手法は、質量分析計による糸状菌同定に用いる常法であり、特別な手順の追加

の必要がないという点で優れていた。そのため、菌糸そのままを出発材料としてタンパク質抽出およびマススペクトルの取得を行い、エンドバクテリアの有無を判別できるか更なる検証を行った。国内外から入手した36菌株（うち17株がエンドバクテリア保有）の菌糸よりマススペクトルを取得した結果、33菌株が1.70以上のスコアで“*R. microsporus*”と同定され、3株のみ（すべてエンドバクテリア保有株）で同定不能の判定となる1.70以下であった。このことは、エンドバクテリアの感染によりマススペクトルが大きく変化し、“*R. microsporus*”と同定不能になる可能性が低いことを示唆していた。また、MSPデンドログラムを作成した結果、エンドバクテリア保有株が単一クラスターを形成し、質量分析計により共生の有無が識別可能であることが示唆された。今後は、エンドバクテリア除去株のマススペクトルを取得し、エンドバクテリア保有株と比較することでクラスターの位置がエンドバクテリアの有無で変化するかを検証する予定である。

研究課題 '24-16

Identification of the transcriptional regulatory mechanism of *CgATG32*.

Minoru Nagi

(National Institute of Infectious Diseases)

Hiroji Chibana, Michiyo Sato, Azusa Takahashi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

*Candida glabrata*におけるマイトファジー関連遺伝子 *ATG32* の転写調節機構の解明

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)

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）を活性化させることでミトコンドリア機能恒常性を保っているが、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目的とした。2023年度までに、エキソリボヌクレアーゼ *XRN1* が鉄依存的に *ATG32* プロモータ領域に結合し、発現調節に関与することを見出した。また、*XRN1* の遺伝子破壊株ではミトコンドリア関連遺伝子、ミトコンドリア局在タンパク質、ミトコンドリア量が全て増加している一方で、マイトファジー活性の亢進も認められ、ミトコンドリアの新生及び分解が活性化していることが示唆された。

2024年度は、*XRN1* が関与するミトコンドリア機能の調節機構を明らかにするため、野生株および *XRN1* 遺伝子破壊株からミトコンドリアを単離し、ミトコンドリア機能指標に関する解析を行った。その結果、*XRN1* 遺伝子破壊株由来のミトコンドリアではATP合成能が顕著に低下している一方で、酸素消費速度は上昇していることが明らかとなり、*XRN1* が *ATG32* の発現調節を介してミトコンドリア機能調節に関与している可能性が示唆された。さらに、ミトコンドリア電子伝達系に関与する各複合体の活性を解析したところ、野生株と *XRN1* 遺伝子破壊株の間で有意な差は認められなかった。このことから、遺伝子破壊株におけるミトコンドリア機能低下の直接的な原因は明らかにされていない。

研究課題 '24-17

Establishment of a new method to discover a novel antifungal drug using a silkworm infection model

Hiroshi Hamamoto

(Yamagata University Faculty of Medicine)

Hiroji Chibana

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

カイコ感染モデルを用いた新規抗真菌薬の探索法確立

浜本 洋

(山形大学医学部感染症学講座)

知花博治

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

本年度において、千葉真菌センターから分与を受けた *Candida auris* 株を用いて病原性を検証し、アムホテリシンBに対する治療効果を検証した。アムホテリシンB耐性株は、カイコモデルにおいてもアムホテリシンBに対する治療効果が大きく低下することを明らかにした。また、*C. auris* 株を用いた阻止円形成法による抗真菌活性物質生産株の探索法について実施した。探索を進める際に、予備実験の経験よりも一般細菌による妨害が多いことが判明したことから、今年度において一般細菌の増殖を抑えるための添加する抗生物質の組み合わせについて検討を実施し、改善が認められた。今年度、山形県を中心として採取した土壌細菌から、阻止円法を用いて抗真菌活性物質を生産する株を分離した。並行して黄色ブドウ球菌に対する阻止円を形成する菌を分離した場合と比較して、生産菌が分離される率は10倍以上低く、抗真菌活性物質を生産する菌の比率はかなり低いことがわかった。現在、*C. auris* に対して抗真菌活性を示す株について収集を継続し、確立したカイコ感染モデルにおいて治療効果を示す化合物生産株の同定を行っている。また、アムホテリシンBに曝露した *C. auris* の遺伝子発現について解析を行った。現在、発現量が変動した遺伝子機能について解析を実施している。

発表論文

- 1) 浜本洋：ユニークな作用機序を有する次世代感染症治療薬の開発，日本細菌学雑誌，79: 275-281, 2024. [Article in Japanese]
- 2) Hamamoto H: Silkworm model of bacterial infection facilitates the identification of lysocin E, a potent, ultra-rapid bactericidal antibiotic, J Antibiot (Tokyo), 77: 477-485, 2024

研究課題 '24-18

Analysis of Sequence-Based Identification and Antifungal Susceptibility of *Aspergillus* from Clinical Respiratory specimens

Junko Suzuki, Keita Takeda

(Center for Respiratory Diseases, National Hospital Organization, Tokyo National Hospital)

Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Aspergillus 呼吸器検体臨床分離株の菌種同定・薬剤感受性の検討

鈴木純子

(国立病院機構東京病院呼吸器センター呼吸器内科 医長)

武田啓太

(国立病院機能東京病院呼吸器センター呼吸器内科 医員)

渡辺 哲

(千葉大学真菌医学研究センター教授)

亀井克彦

(千葉大学真菌医学研究センター特任教授)

研究成果

2013年の研究開始から2025年3月までの間に、国立病院機構東京病院の呼吸器疾患患者の下気道検体から検出された *Aspergillus* または担子菌の菌種同定・感受性を千葉大学真菌医学研究センターにて行い、これまで計482件同定している。当院慢性肺アスペルギルス症患者呼吸器検体から検出された *Aspergillus* の菌種同定薬剤感受性を検討し、*A. fumigatus* 陽性257株について、*A. fumigatus* のアゾール耐性株は20株、7.8%であった。

23年度は2022年までに提出し、同定・感受性検査を行った *A. fumigatus* 259株について ITCZ > 4 µg/ml, VRCZ > 4 µg/ml をアゾール耐性と定義し、耐性が確認された20症例21株について、菌の遺伝子解析結果とともに、診療録から検出患者の臨床所見、治療経過、予後を後方視的に検討した。耐性株が検出されたのは慢性肺アスペルギルス症16例、ABPA疑い2例、アスペルギルス膿胸1例、コロニゼーション疑い例1例であった。耐性菌検出例経過としては、外科的治療を行ったのは慢性肺アスペルギルス症と膿胸例の計8例で、うち7例は抗真菌薬の内服終了し再発なし。1例は慢性肺アスペルギルス症が進行した状態で手術を行っており、術後1年以上の経過で2型呼吸不全の進行で死亡した。非手術例の12例のうち慢性肺アスペルギルス症8例の転帰は死亡が3例、悪化が4例で手術例に比較し不良であった。耐性薬剤はアゾール治療歴のある患者で、未使用のアゾール薬に対し

て耐性を認めた例も多かった他、アゾール使用歴がなく耐性を認めた症例を2020年以降3例認め、いずれもITCZ感受性、VRCZ耐性であった。アゾール耐性機序は日本ではこれまでアゾール使用歴を有する例の報告が主であったが3例は環境由来の可能性もあり今後の結果に注意が必要である。耐性原因遺伝子の検討ではCyp51A遺伝子変異を12例に、hmg1遺伝子変異を4例に認め、hmg1遺伝子変異例はITCZ/VRCZ両者に耐性であった。今回の耐性例で経時的に*A. fumigatus*が検出されている症例は5例あり、菌株の遺伝子学的検討から、3例は同一菌株、2例は異なる株の検出であった。

2024年度に同定した*Schizophyllum commune*により菌球のある肺病変を呈した症例について治療経過におけるその抗体価とともに提示しCHEST pulmonaryに症例報告を行った。

発表論文

- 1) Kato T, Igei H, Morota M, Yotsumoto T, Fukami T, Kitani M, Hebisawa A, Suzuki J, Watanabe A, Ohshima N, Morio Y, Matsui H. A 59-Year-Old Man With a Pulmonary Cavity Containing Fungus Balls. CHEST Pulmonary, Volume 2, Issue 4, 100100

研究課題 '24-19

Screening of yeast protein synthesis inhibitor from Chiba University compound library

Koji Kasahara

(Department of Molecular Microbiology, Tokyo University of Agriculture)

Hiroji Chibana, Azusa Takahashi, Kaname Sasamoto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

千葉大学化合物ライブラリーを用いた酵母タンパク質合成阻害剤のスクリーニング

笠原浩司

(東京農業大学生命科学分子微生物学科)

知花博治, 高橋 梓, 笹本 要

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

本共同研究では、病原性酵母 *Candida glabrata* のタンパク質合成に関わる新規阻害剤の探索および作用機序の解明を目的として、千葉大学が保有する合成化合物ライブラリーと、真菌医学研究センター・知花准教授が保有する *C. glabrata* Tet抑制株コレクションを活用した共同研究を実施した。1,200化合物からなる合成化合物ライブラリーを用いて、リボソームタンパク質関連遺伝子のTet抑制株に対するスクリーニングを行い、いくつかの株で顕著な増殖阻害効果を示す化合物を同定した。なかでも1種の化合物は、リボソームタンパク質の機能阻害が示唆される非常に興味深い活性を有しており、候補化合物として注目された。

令和6年度には、同化合物のモデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に対する活性を評価したところ、同様の増殖抑制効果が確認された。さらに、この化合物の標的分子および作用機序を解明するため、耐性変異株の分離を行い、全ゲノムシーケンス (NGS) 解析を実施した。その結果、薬剤耐性に関連する特定の遺伝子変異箇所が同定され、化合物の標的候補となる遺伝子を絞り込むことに成功した。これらの結果は、リボソームの機能や合成過程を特異的に阻害する新規抗真菌薬の開発に向けた重要な知見であるとともに、真核生物におけるリボソーム合成制御の進化的多様性に対する新たな理解をもたらすものである。

現在、本研究成果に基づいた論文を準備中である。今後は、得られた候補化合物の最適化や、ヒト細胞に対する選択性の検討も視野に入れ、実用化に向けた展開を図っていく予定である。

研究課題 '24-20

Systematics of black yeast and related fungi

Akira Hashimoto

(Riken BioResource Research Center)

黒色酵母の体系学的整理とゲノム整備

橋本 陽

(理化学研究所バイオリソース研究センター)

研究成果

基礎疾患を有する患者の日和見病原菌として知られる黒色酵母は臨床上無視できない。しかしながら、本菌群は歴史的に臨床株の研究と野外生態の研究が独立して行われてきたため、感染経路はおろか病原性能力獲得の歴史的背景も未解明のままにある。当年度の本研究では、研究対象とするサンプルの正確な同定を行うため、供試菌株として利用した臨床株・動物由来株を含む *Scolecobasidium* 属菌11株と *Cladosporium* 属56株の再同定を行った。本研究でははじめに形態学的特徴およびITS-LSU領域に基づく系統解析から構成種数の把握を行った。結果としていずれも複数の国内未報告種および未記載種が含まれることが明らかとなった。加えて、臨床由来および動物由来の *Scolecobasidium* 属菌では4系統で独立して孢子形性能が失われていることが観察された。そのうち動物由来の未記載種においては顕著な厚壁細胞の形成が観察された。この現象は本属の種認識において興味深い知見を与える発見となった。一方で、培養下で孢子を形成しない *Scolecobasidium* 属菌には未記載種の系統も含まれるため、臨床上の鑑別や病原性の評価において正確な種の認識が求められる。したがって、今後も継続的な分類学的記載とそれを支える網羅的なデータ収集が必要不可欠である。*Cladosporium* 属は決定すべき領域が複数含まれるため、形態観察のみを終えた状態であるが、形態観察の段階で複数の未記載種と思われる系統は把握できている。本属については次年度以降分子系統解析を進める予定である。

研究課題 '24-21

Distribution and molecular phylogenetic analysis of *Macrorhabdus ornithogaster* causing Avian Gastric Yeast Disease in zoo-raised birds

Naoki Kobayashi

(School of Life and Environmental Science, Azabu University)

Takashi Yaguchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Sayaka Ban

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Maiko Watanabe

(Division of Microbiology, National Institute of Health Science)

Haruo Takahashi

(Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences)

(Current affiliation: School of Life and Environmental Science, Azabu University)

動物園飼育環境下の鳥類における Avian Gastric Yeast 症原因真菌の分布状況および分子系統分類に関する研究

小林直樹

(麻布大学)

矢口貴志

(千葉大学真菌医学研究センター)

伴さやか

(千葉大学真菌医学研究センター)

渡辺麻衣子

(国立医薬品食品衛生研究所)

高橋治男

(国立医薬品食品衛生研究所, 現・麻布大学)

研究成果

鳥類の Avian Gastric Yeast (AGY) 症の原因真菌 *Macrorhabdus ornithogaster* について、家庭飼育の愛玩鳥以外では、分布の実態が明らかになっていないことから、動物園飼育鳥種における分布実態の把握および菌種内の系統分類を行った。

協力動物病院および動物園から、症状の有無にかかわらず、延べ91個体の鳥糞試料の提供を受けた。糞試料から直接DNAを抽出し、そのDNAを鋳型にrDNA-ITS1領域をターゲットとしたNGSアンプリコンシーケンスを実施することで、本菌の検出を試みた。その後、検出されたrDNA-ITS1領域の塩基配列について、GenBankデータベースからのダウンロード配列とともに系統解析を行った。

その結果、新たに家庭飼育下罹患個体の1鳥種(セキセイインコ)1個体、および動物園飼育下個体の1鳥種(コガネメキシコインコ)4個体由来のサンプルから *M. ornithogaster* の塩基配列データの取得に成功した。日本国

内の動物園飼育個体において、同一動物園で飼育される同一鳥種の複数個体から *M. ornithogaster* が検出された例は初めてである（未発表）。当該動物園の飼育担当者に聞き取りを行ったところ、これら陽性個体は同一の海外ブリーダーから導入した直後の検疫中の個体であることから、ブリーダーの飼育環境における本菌の蔓延の可能性が考えられ、動物園では新規個体導入時の検疫や防疫の必要性が示唆された。また、昨年度までに取得されたデータとともに構築した分子系統樹から、サンプル採取機関または由来個体の飼育下・野生に関わらず、宿主鳥種の分類ごとに二つの単系統群「インコ目クレード」および「非インコ目クレード」を形成した。この結果は昨年度までの結果と一致しており、これら二つのクレードに属する *M. ornithogaster* は、それぞれ、「インコ目クレード」の菌株では宿主特異性が比較的高く、「非インコ目クレード」の菌株では宿主特異性が低く、インコ目以外の幅広い鳥の系統に感染するリスクがあるとした考察を支持した。

また、糞試料の検鏡から、*M. ornithogaster* の高濃度分布が確認された検体については、液体培養を行った。その結果、同一動物園飼育下のコガネメキシコインコ 3 個体の糞試料において菌の増殖が確認された。それらのうち 1 菌株は、新たな液体培地に菌培養液を加えることにより継代することができ、増殖性に優れた菌株の入手に成功した。

研究課題 '24-22

Elucidating the roles of commensal-specific T cell against invading fungus

Teruyuki Sano

(College of Medicine University of Illinois)

Yoshiyuki Goto

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

真菌感染に対する共生細菌特異的 T 細胞の役割

佐野晃之

(イリノイ大学医学部)

後藤義幸

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

本研究は、恒常的に活性化している共生細菌特異的 T 細胞が、体内に侵入した真菌に対する防御反応として共生細菌非特異的に機能することが可能か検討することを目的とした。

様々な哺乳類の回腸で検出されるセグメント細菌 (SFB) は、高い免疫原性を有しており、SFB 特異的な IL-17 産生 CD4⁺T 細胞 (Th17 細胞) を分化誘導することが知られている。イリノイ大学シカゴ校佐野研究室では、SFB 特異的な T 細胞受容体 (TCR (TCR^{SFB})) を過剰発現するトランスジェニックマウスを T 細胞/B 細胞欠損マウスである Rag KO マウスと交配することで、SFB 特異的な Th17 細胞のみを有する、SFB TCR^{7B8} 及び TCR^{1A2} Rag2 KO マウスを樹立した。どちらの TCR Tg も SFB に限定して発現している SFB_3340 protein に特異的であるが、その TCR を構成するアミノ酸配列は完全に異なり、認識する Epitope はオーバーラップするものの完全には一致しておらず、抗原特異的及び抗原非特異的な T 細胞の応答を調べる上で優れた Tool である。これらの animal lines を維持する過程で、本研究とは直接的に関係していないが、SFB TCR^{7B8} Rag2 KO マウスにおいて期待していなかった自己免疫疾患様の神経障害を伴う神経炎症を確認したため、急遽 TCR^{1A2} Rag2 KO マウスに切り替えて実験を継続した。樹立したマウスラインの各種免疫細胞に異常がないか確認するため、CD4 T 細胞や自然リンパ球細胞から産生される各種サイトカインの Base line を確認したところ、本実験のコントロールで使用する Rag2 KO マウスにおいて、3 型自然リンパ球細胞からの IL-22 の異常な過剰産生が確認された。Rag2 KO マウスでは CD4 T 細胞だけでなく、CD8 T 細胞や B 細胞、各種制御性細胞の分化に異常が出ることから、本研究で提案した実験を行うには、使用マウスを検討し直すことが必要であると結論づけた。今後は TCRa KO が実験に適切か検討し、適切と結論づいた場合、TCR^{1A2} TCRa KO の樹立を進める予定である。

研究課題 '24-23

Studying divergent virulence traits between *Candida albicans* and *Candida glabrata*

Chung-Yu Lan

(Department of Life Science, NTHU/Tsing Hua Distinguished Professor, Taiwan)

Hiroji Chibana, Kaname Sasamoto, Zhao Fujiang

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

In this collaborative study, we focused on LL-37, the only human-derived cathelicidin (a family of naturally occurring antimicrobial peptides) involved in our innate immune system. Our research, jointly presented at the 68th Congress of the Asia-Pacific Society for Medical Mycology (APSM), explored how LL-37 interacts with *Candida albicans* and how it suppresses fungal growth.

We found that LL-37 acts through multiple mechanisms. It damages the fungal cell membrane, increases the production of reactive oxygen species, disrupts calcium balance inside the fungal cell, and affects how the fungus regulates its genes. In response, *C. albicans* activates stress responses across different parts of its cell, such as mitochondria and the endoplasmic reticulum. We also analyzed how the fungus changes its gene expression patterns when exposed to LL-37 and found that it tries to adapt to these stressful conditions, though often unsuccessfully. These results provide valuable new insights into how the body's natural defenses work against fungal pathogens. They also highlight the potential of antimicrobial peptides like LL-37 to be developed into future antifungal drugs. Such peptides are attractive because they attack fungi in multiple ways, are less likely to cause drug resistance, and may also support the immune system. Our study yielded highly promising results, both scientifically and therapeutically. Following our successful presentation at APSM, we believe this research forms a foundation for future studies aiming to apply LL-37 and similar peptides in clinical settings to treat fungal infections more effectively.

研究課題 '24-24

Joint Research for Fight against Rubella in Chiba City by University, Health Center and Medical Association

Kazuto Tamai

(Infectious Disease Control Committee, Chiba City Medical Association)

Hiroaki Ochiai

(Chiba City Health Center)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

千葉市における大学・行政・医師会が連携した風疹対策共同研究

玉井和人

(千葉市医師会感染症対策委員会)

落合弘章

(千葉市保健福祉局)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

我が国の風疹に関する追加的対策である麻疹風疹ワクチン(MRワクチン)5期定期接種事業は2019年4月に開始され、3年間の延長を経て2025年3月末に終了した。一方、千葉市では市独自事業として、2014年4月から妊娠希望女性に抗体検査助成を開始し、風疹抗体価の低い妊婦やこれらの配偶者・同居家族を対象を拡大しながら継続するとともに、2018年11月からは風疹抗体価が低い全ての人を対象としたMRワクチン接種助成を行っている。我々は、それぞれの事業における抗体検査・ワクチン接種の実施率に関する経年的な推移を検証・評価してきた。本年度は実施率に影響を及ぼしたと考えられる社会的要因について検証した。

2025年1月時点までの国事業の抗体検査の実施件数は、概算で36%となっていた(実施件数:47,327件)。一方、千葉市事業は毎年一定数の利用があり、最近数年は穏やかな増加傾向が続いている。MRワクチンに関連した主な社会情勢の変化として以下があった。①新型コロナ

ナウイルス感染症が5類感染症へ移行するなど、法的にも心理的にも社会の行動制限が緩和傾向になった。②国内で麻疹患者発生について複数回報道があった。③MRワクチンの自主回収が複数回行われた結果ワクチン供給が不足し、MRワクチン接種の優先度について学会等から提言が出された。①や③の状況下において経時的に実施件数を検証したが国事業、千葉市事業への影響は認められなかった。一方、千葉市のMRワクチン接種事業において、②の麻疹患者発生の報道に伴い接種件数の増加を認めた。

新型コロナウイルス感染症に関連した受診控えなどの影響は少なくなっているはずだが、千葉市事業には反映されておらず引き続きMRワクチンの重要性について啓発が必要と考えた。また、感染症流行に関する報道は、ワクチン接種に対する行動変容へと繋がる重要なきっかけとなっていた。風疹は2019年以降大きな流行はないが、特にワクチン接種制度変遷のはざまにある世代を中心に感染が拡大するリスクは依然として高い。先天性風疹症候群を発生させないためにも、社会情勢に応じた対策をその都度立案し根気強く続けていく必要がある。国事業は課題を残したまま終了する見込みだが、一定の効果を維持している千葉市事業については今後も継続が望まれる。

共同研究の解析結果は毎月1回ニュースレターとして千葉市および千葉市医師会にフィードバックしている。また、第28回日本ワクチン学会学術集会において発表した。

研究課題 '24-25

Analysis of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*

Emiko Rimbara

(Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, JIHS)

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

インフルエンザ菌の薬剤耐性機構と薬剤感受性測定法に関する研究

林原絵美子

(国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所細菌第二部)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

本邦で2022-2024年に分離されたインフルエンザ菌株130株について、本共同研究として協議のうえ作成したドライプレートを用いた微量液体希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定しCLSIの基準に沿い判定した。その結果、アンピシリン(ABPC)耐性率は51.5%、アンピシリン・スルバクタム(ABPC/SBT)耐性率は53.1%、メロベネム(MEPM)非感受性率は13.1%、セフトキサシム(CTX)の耐性率は2.3%、セフトリアキソン(CTRX)の耐性率は0.0%、レボフロキサシンの耐性率は3.8%、クラリスロマイシン耐性率は11.5%、アジスロマイシン耐性率は5.4%であった。ABPC耐性株の内訳は、 β -lactamase positive ampicillin resistant strain (BLPAR)が16.9%、 β -lactamase negative ampicillin resistant strain (BLNAR)が34.6%であった。 β -ラクタム系抗菌薬についてE-test法でもMICを測定し、微量液体希釈法との比較を行ったところ、MEPM、CTX、CTRXについては、一致率はそれぞれ84.6%、96.9%、99.2%と良好であった。一方、ABPCとABPC/SBTについては両法の一貫率はそれぞれ72.3%と76.2%であった。ペニシリン結合たんぱく質3(PBP3)変異との関連を精査したところ、E-testでABPCの感受性がIntermediate(MIC:2 mg/L)、ABPC/SBTの感受性がSusceptible(MIC: \leq 2/1 mg/L)となる株の多くはPBP3のペニシリン結合モチーフ近傍に複数の変異をもつ β -ラクタマーゼ陰性株であり、これらの株は微量液体希釈法ではABPC/SBTの感受性がResistant(MIC: \geq 4/2 mg/L)となる傾向が明らかとなった。

研究課題 '24-26

Analysis of clinical, antimicrobial susceptibility, drug resistance, and pathogenic genes of *Escherichia coli* isolates derived from pediatric patients with invasive *E. coli* infections

Tadashi Hoshino

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

Naruhiko Ishiwada

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

Noriko Takeuchi

(Medical Mycology Research Center, Chiba University)

小児侵襲性大腸菌感染症に関する臨床的及び細菌学的検討

星野 直

(千葉県こども病院感染症科)

石和田稔彦

(千葉大学真菌医学研究センター)

竹内典子

(千葉大学真菌医学研究センター)

研究成果

2024年度は、保存していた小児侵襲性感染症由来大腸

菌44株(千葉県こども病院24株, 千葉大学20株)を対象に, MLST (Multi-locus sequence typing) 解析, およびPCR法によるO-genotyping (Og), K抗原 (K1, K5) の検出を実施した.

MLST解析では計23のST型が検出された. ST95 (10株) が最多で, 以下ST131 (6株), ST73 (4株), ST69 (3株) の順であった. Ogは, Og25 (9株) が最多で, Og6 (5株), Og1およびOgGp7 (各4株), Og16 (3株) と続いた. K1抗原陽性株は16株 (36.4%) で, 菌血症 (5株), 発熱性好中球減少症, 髄膜炎 (各3株) 由来株を多く認めた. K5抗原陽性株は13株 (29.5%) で, 尿路感染症由来株 (8株) が主体であった. ST型, Og, K抗原を組み合わせると, K1抗原陽性株は, Og1 (4株), OgGP7 (3株), Og25 (2株) のST95株が主体であった. また, 3例の髄膜炎患者のうち2例はOgGp7/ST95による発症であった. また, Og75/ST1193が胆管炎症例から1株分離された. K5抗原陽性株は, Og25/ST131が5株と多く, うち4株は尿路感染症由来であった.

今回の解析対象は, 2施設で分離された大腸菌に限定されたが, 菌の特性, 臨床背景に一定の傾向が確認された. 血清型分布は成人の侵襲性大腸菌感染症と類似し, K1抗原やST型の分布には疾患特異性を認めた. また, extended-spectrum β -lactamase 産生株などの薬剤耐性が問題となっているOg75/ST1193が検出されるなど, 注目すべき結果も得られた. 今後は, 解析対象を広げ, 小児侵襲性大腸菌感染症の疫学の解明や治療法の確立に繋がるデータの蓄積, 解析を継続して進めていく.

2025 Scientific Meetings & Seminars

2025年講演会

「真菌医学研究センターセミナー」

【第1回】

日時：令和7年9月30日（火）16時～17時
場所：真菌医学研究センター 大会議室, オンライン
(teams) ハイブリッド開催
講師：慶応義塾大学 理工学部 生命情報学科
荒井 緑 教授
「微生物－細胞共培養による二次代謝活性化と天然物様Notch阻害剤の創製」

【第2回】

日時：令和7年10月30日（木）16時～17時
場所：真菌医学研究センター 大会議室, オンライン
(teams) ハイブリッド開催
講師：東京科学大学 大学院医歯学総合研究科
金兼弘和 教授
「真菌感染症に潜む先天性免疫異常症」

【第3回】

日時：令和8年1月19日（月）16時～17時
場所：オンライン (teams)
講師：国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所
真菌部
上野圭吾 主任研究官
「病原性真菌クリプトコックスの免疫回避機構と宿主免疫の基盤研究」

【第4回】

日時：令和8年2月10日（火）16時～17時
場所：真菌医学研究センター 大会議室, オンライン
(teams) ハイブリッド開催
講師：九州大学医学部 視機能再生学分野
柴田健輔 准教授
「代謝産物による免疫制御」

【第5回】

日時：令和8年3月17日（火）16時～17時
場所：真菌医学研究センター 大会議室, オンライン
(teams) ハイブリッド開催
講師：横浜市立大学大学院医学研究科 感染症内科学
田代将人 主任教授
「アスペルギルス症における薬剤耐性とアスペルギローマ動物モデルを用いた病態解析」

「東京大学医科学研究所－千葉大学真菌医学研究センター 国際共同利用・共同研究拠点事業 2025年度成果報告会」

日時：令和8年2月24日（火）、25日（水）、27日（金）
場所：オンライン開催

令和8年2月25日（水）

【特別講演】

氣駕恒太朗（国立感染症研究所 治療薬開発研究部 室長）

【合同成果報告会（千葉大学真菌医学研究センター）】

加納 暁（帝京大学）

「動物由来抗真菌薬耐性（AMR）皮膚糸状菌症に対する分子生物学的解析」

浜本 洋（山形大学）

「カイク感染モデルを用いた新規抗真菌薬の探索法確立」

橋本 陽（理化学研究所）

「黒色酵母の体系的整理とゲノム整備」

林原絵美子（国立感染症研究所）

「インフルエンザ菌の薬剤耐性機構と薬剤感受性測定法に関する研究」

【領域3：感染症・免疫共同研究領域】

柴田弘紀（九州大学）

「ハブ毒液システムの遺伝子発現調節の解明」

田村大輔（自治医科大学）

「呼吸器に感染する病原体の小児体内の動態について」

上野貴将（熊本大学）

「HIV感染者における病態マーカーの探索」

松本祐介（鹿児島大学）

「全てのパラミクソウイルスに対応する弱毒ワクチン開発機構と新規ワクチンベクターへの応用」



CHIBA UNIVERSITY
2025