

令和 3 年 8 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02653

研究課題名(和文) PATHOME解析による病原酵母カンジダ・グラブラータの病原性解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenicity in *Candida glabrata* by PATHOME analysis

研究代表者

知花 博治 (Chibana, Hiroji)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：30333488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：カンジダ・グラブラータは、有性世代が見つからない一倍体生物である。系統分類学的にパン酵母に近縁な種であるが、致死的な感染症の原因菌である。近年既存薬に対する耐性菌の増加が問題となっており、本菌の病原性の理解と薬剤開発は重要な研究課題である。生育に非必須な遺伝子の改変株を用いてマウス感染時における各遺伝子の感染における重要性を評価した。その結果、肝臓や腎臓などの臓器へ到達し維持されなかった株が見出された。これらの遺伝子について、様々な培養条件による生育状況を調査し、カンジダ・グラブラータの病原因子の特定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性カンジダ菌は、抗癌剤、抗生物質、ステロイドの長期投与、AIDS、高齢化などにより、易感染状態になった患者に対して重篤な日和見感染症を発症する。世界的な死亡者数は40万人/年に達しており、国内においても、カンジダ血症患者数は1万人、死亡者数は1,000-5,000人/年と推定されている。今後世界的な高齢化において易感染患者の増加は不可避であり、カンジダを原因とする疾患は益々大きな問題になると予測されている。カンジダ種の中でも特にカンジダ・グラブラータにおいて既存の抗真菌薬に対する耐性菌が増加しており、本菌の病原性の理解と薬剤開発は重要課題となっており、本課題の成果は多くの知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：Candida glabrata is a haploid organism for which no sexual generation has been found. It is a species closely related to baker's yeast in terms of phylogeny, but it is the causative agent of fatal infectious diseases. In recent years, the increase of resistant to existing drugs has become a problem and understanding the pathogenicity of this fungus and drug development are important research subjects. The importance of each gene in infection during mouse infection was evaluated using modified strains of genes that are not essential for growth. As a result, strains that reached organs such as the liver and kidneys and were not maintained were found. For these genes, the growth conditions under various culture conditions were investigated, and the virulence factors of *Candida glabrata* were identified.

研究分野：医真菌学

キーワード：真菌 病原性 薬剤標的

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病原性カンジダ菌は、腸管粘膜や、膣、泌尿器の粘膜に常在する真菌であるが、健常者では特に問題とはならない。しかし、臓器移植に伴う免疫抑制剤や癌患者への抗癌剤、抗生物質、ステロイドの長期投与、AIDS、高齢化などにより免疫力が低下し、易感染状態になった患者に対して重篤な日和見感染症を発症する。血流感染菌(細菌感染も含む)のうちカンジダは第4位(9%)に位置し(Shorr AF et al, Crit Care Med, 2007) 死亡者数は40万人/年に達している(Morgan J et al, Infect Control Hosp Epidemiol, 2005)。国内においても、カンジダ血症患者数は1万人、死亡者数は1,000~5,000人/年と推定され、生存者の予後も不良である。また、アルツハイマーにカンジダ等の真菌が関与することを強く支持する調査結果が報告されている(Pisa D et al, Nature, 2015)。さらに、川崎病は年間1万人の乳幼児で発症し、近年増加中であるが、その原因としてカンジダを示唆する結果が報告されており(Rodó X et al, PNAS USA, 2014)。これまで原因不明とされていた疾患にカンジダが関係していることが分かりつつある。今後、国内の超高齢化社会において易感染患者の今後、国内の超高齢化社会において易感染患者の増加は不可避であり、カンジダを原因とする疾患は益々大きな問題になると予測されている。

カンジダ属の中で注目すべきは、カンジダ・グラブラータ(*Candida glabrata*)である。本菌は、有性世代が見つかっていない一倍体生物である。系統分類学的にパン酵母に近縁な種である。本菌種はカンジダ属の中で臨床的な分離頻度は、現在2番目であるが、致死率は40-50%とカンジダ種の中で最も高く(Nevitt and Thiele, PLoS Pathog, 2011)、近年症例数が最も上昇し問題となっている(Pfaller MA et al, PLoS One, 2014)。その原因はカンジダ症の二大主要治療薬であるアゾールに対して自然耐性でありことと、エキノキャンディンに対する耐性株率が8%と高いためである。さらに内蔵真菌症では他に類がない耐性株の人から人への伝播が示唆されている(Vallabhaneni S et al, ASM microbe 2016)。しかし、これまでカンジダ・グラブラータの宿主への感染機構についての知見が少なく、現在、最も重要な研究対象である。

2. 研究の目的

カンジダの感染経路は、腸管粘膜に定着し、腸管粘膜の突破、血流浸入し全身感染へ移行すると考えられている。本研究計画では、カンジダ・グラブラータの組換え体コレクションを用いて腸管粘膜への定着、腸管粘膜の突破、血流感染、全身感染の各プロセスに必要な機能遺伝子スクリーニングし、抽出した遺伝子の生理的機能を解析する。これにより、感染に関与する遺伝子群の個々の機能と各感染プロセスとの因果関係を明らかにする。

3. 研究の方法

カンジダ・グラブラータの全ゲノム組換え体を混合し、易感染状態のマウスに経口及び静脈接種後、胃、大腸、血液、肝臓、腎臓の各臓器から組換え体を回収(in vivo スクリーニング)し、各感染プロセスでの機能遺伝子を選抜する。一方でデフェンシンや酸(胃酸)への耐性、マクロファージ内での増殖などに関与する遺伝子群を in vitro スクリーニングする。これにより各生理機能遺伝子を選抜し、各感染プロセスとの因果関係を明らかにする。混合状態における各組換え体の増減は、独自に開発した【NGS 占有率解析法】によって測定する。計画どおりに進まない場合には、各組換え体を個別に処理し、ハイスループット培養によって病原因子候補を選抜し、個別感染実験によって各感染プロセスとの因果関係を明らかにする。

4 . 研究成果

病原真菌で初となる 5,200 全遺伝子の 100%をカバーする組換え体コレクションを用いて腸管粘膜への定着、腸管の突破、血流感染、各臓器への各播種感染プロセスに必要な遺伝子を独自に開発した次世代シーケンサーを用いた優占率測定法によって選別した。次にこれら感染プロセスに必要な遺伝子の生理的機能解析を行なった。各感染プロセスに必要な機能を明らかにすることによりどのような因子が、どのような局面で、どのように機能するかを解明し、これを PATHOME 解析と呼ぶことを提案する。マウスを用いたカンジダ菌の「腸管粘膜への定着、腸管の突破、血流感染、各臓器への播種感染」実験モデルを確立しており、実験モデルの解析を改良し、マウスに置けるカンジダグラブプラータ感染後の生存率測定法を確立した。さらに次世代シーケンサーを用いた各組換え体占有率の測定法(NGS 占有率解析法)を開発した。NGS 占有率解析法を用いて、各種 *in vitro* 解析を実施し、さらに *in vivo*(マウス感染実験)を実施した。その結果、肝臓、腎臓に定着、感染のために必要な遺伝子のスクリーニングを実施した。現在これらのデータを解析し、論文投稿の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Santos R, Cavalheiro M, Costa C, Takahashi-Nakaguchi A, Okamoto M, Chibana H, Teixeira MC.	4. 巻 4
2. 論文標題 Screening the Drug:H+ Antiporter Family for a Role in Biofilm Formation in <i>Candida glabrata</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 10-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Galkina KV, Okamoto M, Chibana H, Knorre DA, Kajiwarra S.	4. 巻 170
2. 論文標題 Deletion of CDR1 reveals redox regulation of pleiotropic drug resistance in <i>Candida glabrata</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2019.12.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen X, Iwatani S, Kitamoto T, Chibana H, Kajiwarra S.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Lack of SNARE Protein Homolog Syn8 Influences Biofilm Formation of <i>Candida glabrata</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 50-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.607188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Cavalheiro M, Romao D, Santos R, Mil-Homens D, Pais P, Costa C, Galocha M, Pereira D, Takahashi-Nakaguchi A, Chibana H, Fialho AM, Teixeira MC.	4. 巻 29
2. 論文標題 Role of CgTpo4 in Polyamine and Antimicrobial Peptide Resistance: Determining Virulence in <i>Candida glabrata</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1376-1383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Pais P, Vagueiro S, Mil-Homens D, Pimenta AI, Viana R, Okamoto M, Chibana H, Fialho AM, Teixeira MC.	4. 巻 11
2. 論文標題 A new regulator in the crossroads of oxidative stress resistance and virulence in <i>Candida glabrata</i> : The transcription factor CgTog1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virulence	6. 最初と最後の頁 1522-1538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21505594.2020.1839231.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 知花博治
2. 発表標題 ゲノムカバー率99.9% <i>Candida glabrata</i> の組換え体コレクションを用いた抗真菌薬の開発
3. 学会等名 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋梓, 佐藤美智代, 知花博治
2. 発表標題 <i>Candida glabrata</i> における強酸耐性機構
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 (岡本) 美智代, 高橋梓, 手島健吾, 笹本要, 山口正視, 梶原将, 知花博治
2. 発表標題 Erg25pは病原性酵母 <i>Candida glabrata</i> のErg11p (アゾール標的分子) より優れた標的分子である
3. 学会等名 日本医真菌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋梓, 笹本 要, 佐藤美智代, 知花博冶
2. 発表標題 Candida glabrataにおける病原性関連遺伝子の網羅的解析法の開発
3. 学会等名 日本医真菌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------