

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08439

研究課題名(和文) RNAiを用いた真菌血症に対する新たな治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategy for fungemia using RNA interference

研究代表者

平松 和史 (HIRAMATSU, Kazufumi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80301381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉の効果が期待されるsiRNAを合成し、Candida albicansに対する増菌抑制効果を検討した。8種類の配列のsiRNAを合成し、真菌内への取り込みを高効率とするためにコレステロール修飾したsiRNAも作成した。in vitroにおいてsiRNA存在下、非存在下でC.albicansの増菌を検討したが、明らかに菌の増殖を抑制するsiRNAを見出せなかった。一方で、増菌速度の遅い株に対しては一部のsiRNAで培養開始早期の時間では菌量が少ない傾向にあった。菌量やsiRNA量を調整することで、siRNAの増菌抑制効果を得られる可能性はあると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

siRNAを用いた真菌感染症に対する新しい治療法の開発を目的として、本研究を行った。明らかにC.albicansの増菌を抑制することのできるsiRNAを見出すことはできなかったが、菌量やsiRNA量を調整することで効果を得られる可能性が示された。薬剤耐性真菌の出現が懸念されている昨今、これまでの抗真菌薬に依存しない新しい真菌感染症の治療方法開発の足掛かりとなる可能性があり、学術的、社会的意義は大きいものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We synthesized siRNAs with potential RNA interference effects and examined their ability to inhibit fungal growth against Candida albicans. 8 different siRNA sequences were synthesized, and cholesterol-modified siRNAs were also created for highly efficient uptake into the fungus. We examined C.albicans growth in vitro in the presence and absence of siRNAs, but could not find any siRNAs that clearly inhibited the growth of the fungus. On the other hand, some siRNAs tended to reduce the amount of C.albicans in the early stage of culture for strains with a slow multiplication rate, so it is possible that the effect of siRNAs can be obtained by adjusting the amount of C.albicans and siRNAs.

研究分野：感染症内科学

キーワード：Candida albicans siRNA (1,3) -D-グルカン

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症等の各種疾患に対するステロイド薬などの免疫抑制剤による治療や臓器移植、さらに高齢化に伴い易感染宿主は増加し、深在性真菌感染症に罹患する患者は増加傾向にある。こうした背景のなか、アゾール系やカンディン系抗真菌薬などの比較的副作用の少ない抗真菌薬が開発され、抗真菌薬の使用頻度は増加している。一方で現在、細菌感染症では、多くの薬剤耐性菌が検出され、世界規模での耐性菌対策を取らなければならない事態となっている。今後さらに抗真菌薬が多く使用されるようになると、真菌においても細菌同様に薬剤耐性真菌が多く検出され、新しい抗真菌薬が必要となることが予想される。しかしながら新規の抗真菌薬の開発は容易ではなく、長い時間と労力が必要である。今後はこうした耐性真菌の出現と新規抗真菌薬の開発という悪循環を断ち切るためにも、これまでのような抗真菌薬による治療に依存しない新しい真菌感染症治療の開発を推進していく必要がある。

真菌の細胞壁は多糖類の微細繊維からなる網状構造で、細胞壁を構成する主な多糖に(1,3)- β -D-グルカンがある。真菌の増菌には細胞壁の合成が必要不可欠であり、我が国において頻用されているカンディン系抗真菌薬はグルカン合成に関与する酵素を阻害することが知られている。*Candida albicans*では *CaFKS1* がグルカン合成酵素の触媒サブユニットとして重要であることが明らかになっている¹⁾。こうした蛋白の合成を抑制することができれば、真菌の細胞壁合成を抑制し、その増殖を抑制できるのではないかと考えた。一方で、標的蛋白の合成を抑制する方法としてRNA干渉(RNAi)が注目され、主に抗ウイルス作用や抗癌作用について、様々な基礎的検討が行われている。真菌に用いられたものとしては、RNAiが *C. albicans* の菌糸形成を阻害したとの報告がある²⁾。こうした結果は、RNAiによって真菌の増菌において重要な(1,3)- β -D-グルカン産生を抑制し、真菌の増殖を制御することで真菌感染症の新しい治療戦略として応用できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

C. albicans の *CaFKS1* 遺伝子に対する short interfering RNA (siRNA) を合成し、*C. albicans* の増殖を抑制する siRNA を見出すことを目的とした。こうした siRNA を作成することができれば、抗真菌薬に依存しない新しい真菌感染症に対する治療となる可能性がある。また新たな薬剤耐性真菌が出現した場合でも同じ技術を用いて別の標的に対する siRNA を合成すれば、容易に新しい治療の開発に繋げることができ、本研究を推進する意義は大きいものと考えた。

3. 研究の方法

(1) *C. albicans* 菌株

C. albicans の ATCC 2091 株、ATCC 26790 株、ATCC 60193 株の3株を用いて実験を行った。

(2) siRNA の合成

公表されている *C. albicans* の *CaFKS1* 遺伝子配列データをもとに、Tushl Tらの方法を用いて表1の siRNA の設計を行った³⁾⁴⁾。siRNA の合成は、外部委託にて行った。また非修飾の siRNA に加えて、すべての siRNA で、*C. albicans* 内への取り込みが高効率になるようにコレステロールを付加した siRNA も作成した。

表1 合成した *CaFKS1* 遺伝子に対する siRNA

siRNA1	CUGAUUCAUCCAUUUAUUAU[dT][dT]
siRNA2	GGUACAUUGUUUGCAAGAA[dT][dT]
siRNA3	GUCUUUAAGAGAUCUUAUU[dT][dT]
siRNA4	AUGAAUUAGAAGGUGAUUA[dT][dT]
siRNA5	CUGAAUGUUUGUGUUACAU[dT][dT]
siRNA6	GAGAAUUUAUCCAAGAUU[dT][dT]
siRNA7	GUCAUUGUGAAAUGUUAGA[dT][dT]
siRNA8	CAUUGGUCGUUCAUUCUAU[dT][dT]

(3) siRNA による *in vitro* での増菌抑制効果の検討

合成した siRNA と *C.albicans* 株を *in vitro* において作用させた。*C.albicans* 株は 1 コロニーを釣菌し、サブロー液体培地で培養した。増殖期にある菌を 100CFU/ml となるように 3ml の 5 μ M siRNA 含有サブロー液体培地に接種し、37℃ で振とう培養条件下で培養した。また siRNA を含まない培地でも同様に培養を行い、コントロールとした。培養開始後、各検体から経時的に培養液を採取し、培養液中の菌量について測定した。

4. 研究成果

(1) *C.albicans* の増菌曲線の検討

siRNA 非存在下で今回実験に用いた ATCC 2091 株、26790 株、60193 株の増菌の違いについて検討を行った(図1)。ATCC 26790 株や 60193 株では増菌開始後 12~15 時間後に 1.2~1.9 x 10⁵ CFU/ml へと増菌し、40 時間を超えるとほぼ定常期に達していた。一方で、ATCC 2091 株では培養開始 15 時間後 1.8 x 10⁴ CFU/ml と ATCC 26790 株や ATCC 60193 株に比べてやや増菌速度が遅く、41 時間後には 7.6 x 10⁶ CFU/ml となり、定常期に到達していた。ATCC 2091 株の増菌能は、ATCC 26790 株や 60193 株に比べ低い傾向にあった。

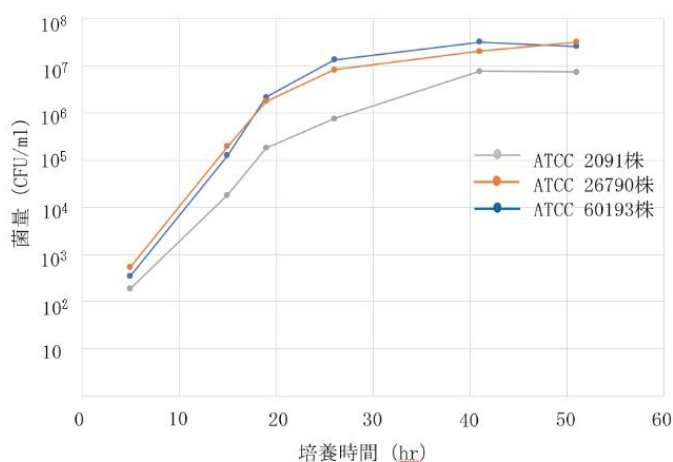


図1 各種 *C.albicans* の増菌曲線

(2) siRNA と各 *C.albicans* 株に対する増菌抑制効果の検討

合成したコレステロール修飾、コレステロール非修飾の siRNA1~8 について、3 種の *C.albicans* 株に対する増菌抑制効果について検討した。

ATCC 60193 株に対する siRNA2 Chol(+)の検討では培養開始 6、12、18 時間後では siRNA を含まないコントロールとほぼ同様の増菌を認めていたが、24 時間後にはコントロール 3.2 x 10⁷ CFU/ml であったのに対して、siRNA2 Chol(+)添加群では 1.8 x 10⁷ CFU/ml とおよそ半分の菌数となっていた(図2)。しかしながら 48 時間後にはコントロールと同様の菌数となっていた。その他の siRNA についてもコントロールとほぼ同様の増菌曲線を示しており、明らかな増菌抑制効果を認めなかった。

続いて ATCC 26790 株に対するコレステロール修飾、非修飾の siRNA の効果について検討した。siRNA1~6 ではコレステロール修飾、非修飾 siRNA いずれにおいてもコントロールと同様

の増菌曲線を示していた。一方で siRNA7 および 8 においてはコレステロール修飾群で 5 時間後、15 時間後ではコントロールと比較し、1/5~1/3 程度の菌数となっていたが、41 時間後や 51 時間後にはコントロールと同等の菌数となっており、明らかな増菌抑制効果は認めなかった(図 3)。

ATCC 2091 株に対しても同様に各 siRNA の効果を検討した。ATCC 2091 株においても ATCC 26790 株や ATCC 60193 株と同様に siRNA1~6 ではコレステロール修飾、非修飾いずれも増菌抑制効果は認めなかった。一方で、コレステロール非修飾の siRNA7 および 8 ではコントロールと比較し、有意な増菌抑制効果は認めないものの、わずかに増菌を抑制していた。(図 4)。また培養開始早期の時間(5 時間、15 時間)ではコレステロール修飾、非修飾の siRNA7、8 においても菌数は少ない傾向にあった。こうした傾向は増菌能力の弱い ATCC 2091 株において強く、他の 2 菌株に比べてやや高い傾向にあった。また siRNA7 および 8 は、明らかな増菌抑制効果は認めなかったものの、他の siRNA に比べて最も高い効果を示した。特に培養開始後早い時間でコントロールと比べて siRNA 添加群の方が菌数は低い傾向にあった。こうしたことは *C.albicans* 菌株が増菌すると相対的に siRNA 量が少なくなるため、明らかな増菌抑制効果が得られにくくなるのではないかと考えた。したがって、高濃度の siRNA を添加すると増菌効果が得られる可能性が考えられた。

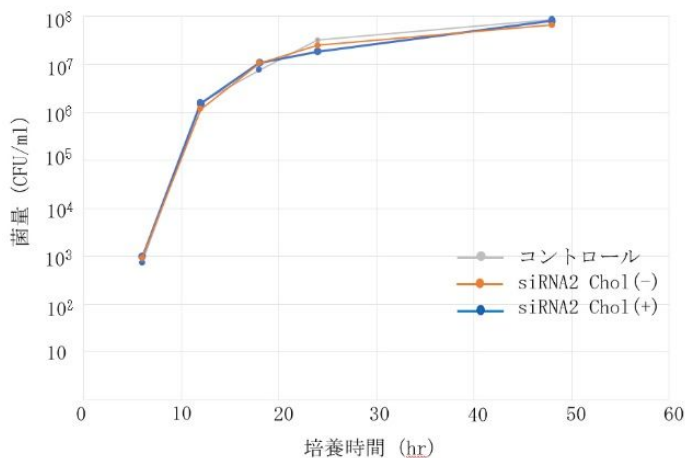


図2 ATCC 60193株に対するsiRNA2の効果

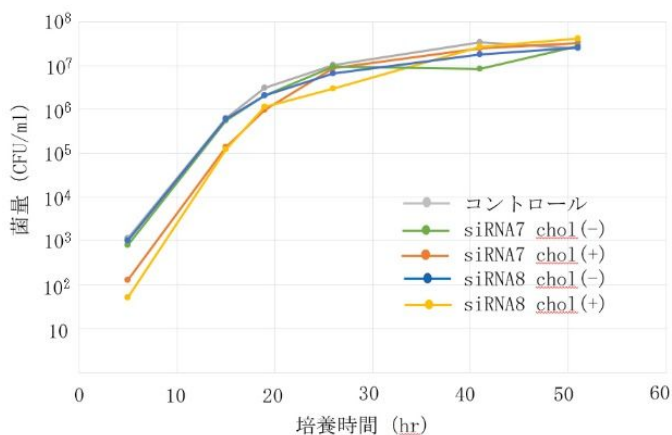


図3 ATCC26790株に対するsiRNA7および8の効果

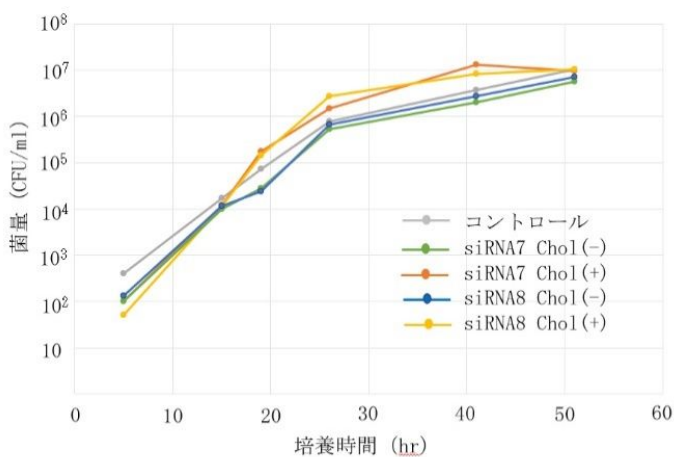


図4 ATCC 2091株に対するsiRNA7および8の効果

(3) siRNA 増量による増菌抑制効果の検討

各 *C.albicans* 株と siRNA による増菌抑制効果の検討で、比較的效果の見られやすかった菌株 ATCC 2091 株と siRNA7 および 8 のコレステロール修飾および非修飾の組み合わせで siRNA 添加量を増量し、検討を行った。siRNA 非添加のコントロール群、コレステロール修飾あるいは非修飾 siRNA7 あるいは 8 を 5 μ M 含有する培地で培養した群、コレステロール修飾あるいは非修飾 siRNA7 あるいは 8 を 50 μ M 含有する培地で培養した群、コレステロール修飾あるいは非修飾 siRNA7 あるいは 8 を 25 μ M 含有する培地で培養 6 時間後さらに 25 μ M を加え

て培養した群、の計4群で各 siRNA の効果を検討した。

図5に siRNA8 Chol(+)の ATCC 2091 株に対するそれぞれの群の効果を示す。いずれの条件下でも明らかな増菌抑制効果は認めなかったが、siRNA を増量した群ではコントロールと比較して1/2~1/4程度(41時間後)の減少を認めた。また培養開始早期の時間帯では菌数がコントロールに比べやや低い傾向は認められた。この結果は siRNA7 Chol(-)、siRNA7 Chol(+)、siRNA8 Chol(-)も同様で、いずれの siRNA でも培養開始早期にはやや菌数の減少を認めたが、明らかな増菌抑制効果は認めなかった。

本研究において明らかに増菌を抑制する効果を示す siRNA を見出すことはできなかったが、増菌速度の遅い株に対しては一部の siRNA で培養早期の時間では菌量が少ない傾向にあった。菌量や siRNA 量を調整することで、siRNA による増菌抑制効果を得られる可能性はあり、引き続き検討を進める必要があると思われる。

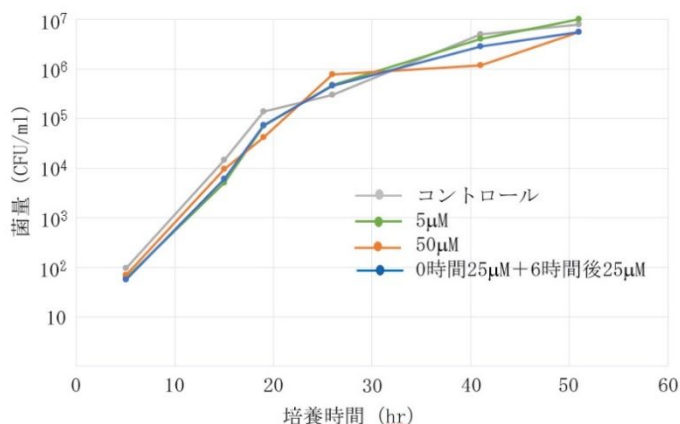


図5 ATCC 2091株に対するsiRNA8 Chol(+)の増量による効果

<引用文献>

- 1) Douglas CM, D'Ippolito JA, Shei GJ, Meinz M, Onishi J, Marrinan JA, Li W, Abruzzo GK, Flattery A, Bartizal K, Mitchell A, Kurtz MB. Identification of the *FKS1* gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Nov;41(11):2471-9.
- 2) Moazeni M, Khoramizadeh MR, Kordbacheh P, Sepehrizadeh Z, Zeraati H, Noorbakhsh F, Teimoori-Toolabi L, Rezaie S. RNA-mediated gene silencing in *Candida albicans*: inhibition of hyphae formation by use of RNAi technology. *Mycopathologia.* 2012 Sep;174(3):177-85.
- 3) Mio T, Adachi-Shimizu M, Tachibana Y, Tabuchi H, Inoue SB, Yabe T, Yamada-Okabe T, Arisawa M, Watanabe T, Yamada-Okabe H. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSC1/FKS1* and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* 1997 Jul;179(13):4096-105.
- 4) Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3191-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	門田 淳一 (KADOTA Jun-ichi) (50233838)	大分大学・医学部・特任教授 (17501)	
研究分担者	小宮 幸作 (KOMIYA Kosaku) (50727550)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	

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