

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07001

研究課題名（和文）真菌ゲノミクスによる薬剤耐性株出現機構と病原因子の解明

研究課題名（英文）Whole-genome analysis for drug-resistance and pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*

研究代表者

高橋 弘喜 (Takahashi, Hiroki)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：60548460

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）：環境中に普遍的に存在する真菌アスペルギルスフミガタスは、重篤な肺アスペルギルス症の原因菌である。近年、我が国を含む先進国を中心に肺アスペルギルス症が増加傾向にあり、主に治療に使用されているアゾール系抗真菌薬に対する耐性株も出現していることから、その治療戦略の確立が急務となっている。しかしながら、薬剤耐性株の分離頻度やその遺伝的背景の関連については明らかとなっていない。本研究では、日本で分離されたアスペルギルスフミガタス171株を収集し、それらの薬剤感受性とゲノム配列を明らかにして、世界で分離された菌株との統合解析によって、日本で分離された株のゲノムの特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスペルギルスフミガタスの薬剤耐性化に寄与する遺伝子座を同定した。このことにより、感染菌の系統を評価することで、薬剤耐性化が起こり得るかの予測にも繋げることが可能となる。さらに診断に応用されれば、治療中に薬剤耐性化のリスク評価が可能となり、治療方針の先鋭化につながるなど、医療への応用が期待される。一方で、真菌はペニシリンに代表される創薬資源として重要であるため、本研究で産生されたゲノムデータの利活用により、新規有用物質の発見が期待される。

研究成果の概要（英文）： *Aspergillus fumigatus* is a pathogenic fungus with a global distribution. Although azole-resistant TR-mutants are widely distributed, a few TR-mutants have been isolated in Japan. The emergence of azole-resistant *A. fumigatus* (ARAF) other than the TR-mutants is a problem in Japan. In this study, we analyzed the genome sequences of 171 strains from Japan as well as the antifungal susceptibility of these strains. Next, we conducted a population analysis of 876 strains by combining the available genomic data for strains isolated worldwide, which were grouped in six clades. We observed the geographic characteristics of clades such as Clade 2 where the strains from Japan were over-represented. Finally, the genomic loci associated with azole resistance were detected on the basis of a genome-wide association study. Thus, we revealed the complexity of the genomic mechanism underlying the emergence of ARAF strains as well as the genomic diversity of *A. fumigatus* in Japan.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：病原真菌 アスペルギルスフミガタス 薬剤耐性 ゲノム 集団構造

1. 研究開始当初の背景

環境中に普遍的に存在する糸状菌 *Aspergillus fumigatus* (ゲノムサイズ 29.4Mb) は、環境中の物質循環に貢献しているのみならず、重篤な肺アスペルギルス症の原因菌として最も多く分離されることから、病原菌としても我々と密接な関係にある。近年、我が国を含む先進国を中心に肺アスペルギルス症が増加傾向にあり、主に治療に使用されているアゾール系抗真菌薬に対する耐性株も出現していることから、その治療戦略の確立が急務となっている。

本菌の感染は、比較的長期(数ヶ月～数年)に渡ることから、治療中にアゾール薬への耐性化を含めて、その性状がしばしば変化することが知られている。我々も含めたこれまでの解析から、耐性化の原因遺伝子やその変異がいくつかのタイプに分類できることが明らかとなってきた。農薬暴露によって出現したアゾール薬耐性株は、マイクロサテライトによる系統解析によって、変異のタイプと遺伝的背景との関連が示唆されている。

我々は、次世代シーケンサー(NGS)解析をいち早く真菌領域へ応用し、感染中の性状変化とゲノム変化の関連について精力的に解析し、治療中にアゾール薬耐性となる原因遺伝子とその変異について明らかにしてきた。並行して、マイクロサテライトや全ゲノムによる系統解析を駆使して、臨床分離株の薬剤耐性型や病態に関連する遺伝的背景の特徴について探索を続けてきた。しかしながら、未だ薬剤耐性などの性状変化が起こる菌株とその遺伝的背景の関連については明らかとなっていない。近年、細菌や一部の真菌において、ゲノムワイド関連解析(GWAS)の有効性が示され、薬剤耐性などの表現型に関連する新たな因子が明らかとなっている。そこで、大規模なゲノム解析によって、系統情報を高精度化すれば、これまで見つかることの出来なかったゲノム領域の特定や、耐性化が誘発された高リスク系統の同定に繋がるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、臨床分離株と環境分離株の大規模な(>150株)ゲノムシーケンスを徹底して進め、高解像度の系統関係を構築する。得られた系統情報と薬剤耐性化などの菌株情報を組み合わせることで、(1)薬剤耐性化が起こる菌株に系統的な特徴はあるのか？(2)臨床分離株に系統的な特徴はあるのか？、という2つの高リスク系統に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

千葉大学真菌医学研究センターで収集・保存されている *A. fumigatus* 菌株の中から、約150株(臨床分離株100株、環境分離株50株)の全ゲノム配列を明らかにする。これらの菌株の薬剤感受性についても最小発育阻止濃度(MIC)試験で評価する。

全ゲノムに基づく系統解析を行い、薬剤耐性化歴、耐性化のタイプ、さらにはMIC値と関連する因子の探索を通じて、薬剤耐性化における高リスク系統の同定を進める。さらに、環境分離株との比較解析によって、病原性の高リスク系統についても同定を進める。得られた候補遺伝子については、その機能を実験的に検証することも計画している。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性株の収集

日本で分離された菌株171株を収集し、それらのイトラコナゾール(ITCZ)薬剤感受性を調査した(図1)。その結果、22株がITCZ耐性株であった。次に、既知の薬剤耐性遺伝子(*cyp51A*、*hmg1*)の変異の有無を調査したところ、20株については既知の変異を確認した。残りの2株(IFM 62628(土壌由来)、IFM 63772(ヒト由来))では、それらの変異が確認されなかったことから、未知の耐性化機構の存在が示唆された。未知の薬剤耐性機構の解明による耐性化機構の全容解明が求められる。

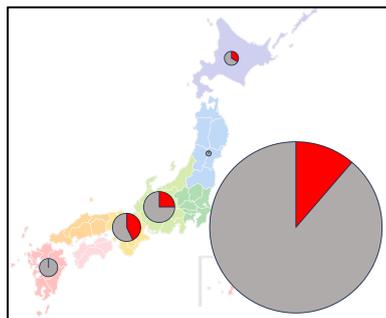


図1 分離された地域と薬剤耐性株の内訳

北海道(3株うち耐性株1株)、東北(1株)、関東(142株うち耐性株16株)、中部(8株うち耐性株2株)、近畿(7株うち耐性株3株)、九州(4株)

(2) *A. fumigatus* の集団構造の解明

収集した菌株のうち92株についてNGSによるゲノム配列データの取得し、171株全てのゲノ

ムデータを集積した。次に、我が国で分離された菌株の特徴を捉えるために、世界各地で分離された菌株のゲノムデータを収集した。計 876 株のゲノムデータを収集し、変異情報に基づいた集団構造解析を実施した。その結果、*A. fumigatus* は、6 つの系統群に分類されることが明らかとなった。6 つの系統群と分離地域との関連について調査したところ、*A. fumigatus* の遺伝型と地域との関連性が明らかとなった (図 2)。日本で分離された株は、その多くが系統群 2 に属していた。*A. fumigatus* の遺伝型には分離された地域の影響が大きいことが示唆された。さらに、系統群間の交雑度について評価したところ、ほとんど全ての組み合わせで交雑している痕跡を確認した。特に、菌株の交配には、ヒトやモノの移動による菌株の往来が影響している可能性が考えられた。

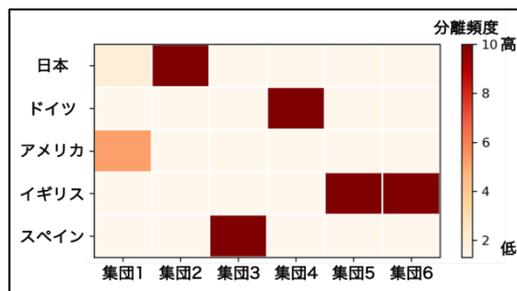


図 2 株の地域性の評価

(3) 高リスク系統に関わる遺伝的要因

日本系統群を含む 628 株の薬剤感受性データを用いて、耐性株出現に関与する遺伝子座の探索を行った。GWAS 解析の結果、薬剤耐性株に関連する 12 遺伝子座を同定した (図 3)。これらの候補の関連については、更なる調査が必要であるが、本解析により治療中に耐性化する高リスク系統の一端を解明できた。また、これまで報告されていた薬剤耐性化への関連遺伝子座とは異なっていたことから、日本株を含めた解析によって捉えることができたと考えられる。

次に、薬剤耐性化のモデル化を回帰分析によって試みたところ、SNP データで薬剤耐性化が表現できたものの、複数の遺伝子座が薬剤耐性化に寄与していることが示唆された。当初、薬剤耐性化は単一の遺伝子変異を想定していたが、本研究の結果、量的形質であることが見えてきた。

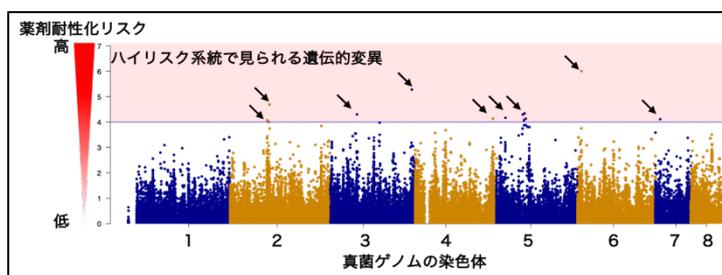


図 3 GWAS 結果

以上の結果から、我が国で分離された *A. fumigatus* の遺伝系統を明確化するとともに、病原真菌を対象に GWAS 解析を試行することで、薬剤耐性化に関連する遺伝子座を特定することができた。これまで日本分離株を大規模に解析した例はなく、我々のグループで先行して進めることができた。

本研究で取得した配列データは、GenBank に登録しており、*A. fumigatus* のもう一つの特徴である二次代謝産物探索などの研究への活用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 He Xiaohui, Kusuya Yoko, Hagiwara Daisuke, Toyotome Takahito, Arai Teppei, Bian Cai, Nagayama Masaki, Shibata Saho, Watanabe Akira, Takahashi Hiroki | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Genomic diversity of the pathogenic fungus <i>Aspergillus fumigatus</i> in Japan reveals the complex genomic basis of azole resistance | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 274 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-05902-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yoshioka Isato, Takahashi Hiroki, Kusuya Yoko, Yaguchi Takashi, Shibata Akira, Kirimura Kohtarō | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Aspergillus laticoffeatus</i> WU-2020, a Citric Acid Producer Suitable for Solid Culture That Belongs To <i>Aspergillus</i> Section <i>Nigri</i> | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e0109322 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01093-22 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Bian C., Kusuya Y., Sklenar F., D'hooge E., Yaguchi T., Ban S., Visagie C.M., Houbraken J., Takahashi H., Hubka V. | 4. 巻 102 |
| 2. 論文標題 Reducing the number of accepted species in <i>Aspergillus</i> series <i>Nigri</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Studies in Mycology | 6. 最初と最後の頁 95 ~ 132 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3114/sim.2022.102.03 | 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 Tsuji Masaharu, Ishihara Jun-ichi, Toyoda Atsushi, Takahashi Hiroki, Kudoh Sakae | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Genome Sequence of Basidiomycetous Yeast <i>Mrakia gelida</i> MGH-2, Isolated from Skarvsnes Ice-Free Area, East Antarctica | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e0106422 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01064-22 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kusuya Yoko, Bian Cai, Hagiwara Daisuke, Ban Sayaka, Takahashi Hiroki | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 A novel Zn ²⁺ -Cys ⁶ transcription factor clcA contributes to copper homeostasis in <i>Aspergillus fumigatus</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Current Genetics | 6. 最初と最後の頁 605 ~ 617 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-022-01250-2 | 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 Bian Cai, Kusuya Yoko, Hagiwara Daisuke, Ban Sayaka, Lu Yu, Nagayama Masaki, Takahashi Hiroki | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Dysfunction of Ras-GAP protein AfgapA contributes to hypoxia fitness in <i>Aspergillus fumigatus</i> | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Current Genetics | 6. 最初と最後の頁 593 ~ 603 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-022-01249-9 | 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 Tsuji Masaharu, Ishihara Jun-ichi, Toyoda Atsushi, Takahashi Hiroki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 High-Quality Genome Sequence of <i>Cystobasidium tubakii</i> JCM 31526T, Isolated from East Ongul Island, Antarctica | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e0074122 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00741-22 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Tsuji Masaharu, Ishihara Jun-ichi, Gotoh Yasuhiro, Hayashi Tetsuya, Takahashi Hiroki | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Five <i>Cystobasidium ongulense</i> Strains Isolated from Areas near Syowa Station, East Antarctica | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e0022422 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.00224-22 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Takahashi Hiroki, Oiki Sayoko, Kusuya Yoko, Urayama Syun ichi, Hagiwara Daisuke | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Intimate genetic relationships and fungicide resistance in multiple strains of <i>Aspergillus fumigatus</i> isolated from a plant bulb | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Environmental Microbiology | 6. 最初と最後の頁 5621 ~ 5638 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15724 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Majima Hidetaka, Arai Teppei, Kusuya Yoko, Takahashi Hiroki, Watanabe Akira, Miyazaki Yasunari, Kamei Katsuhiko | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Genetic differences between Japan and other countries in cyp51A polymorphisms of <i>Aspergillus fumigatus</i> | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Mycoses | 6. 最初と最後の頁 1354 ~ 1365 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/myc.13370 | 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 - |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 He Xiaohui, 楠屋陽子, 萩原大祐, 豊留孝仁, 新居鉄平, Bian Cai, 永山聖樹, 柴田紗帆, 渡邊哲, 高橋弘喜 |
| 2. 発表標題 病原真菌アスペルギルスフミガタスの遺伝系統の分布と薬剤耐性に関する遺伝型解析 |
| 3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 He Xiaohui, 楠屋陽子, 萩原大祐, 豊留孝仁, 新居鉄平, Bian Cai, 永山聖樹, 柴田紗帆, 渡邊哲, 高橋弘喜 |
| 2. 発表標題 我が国におけるアスペルギルスフミガタスの遺伝系統の分布と薬剤耐性に関する研究 |
| 3. 学会等名 第22回糸状菌分子生物学コンファレンス |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takahashi H |
| 2. 発表標題 Genomic diversity of the pathogenic fungus <i>Aspergillus fumigatus</i> in Japan reveals the complex genomic basis of azole resistance |
| 3. 学会等名 The 10th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Masaki Nagayama, Yoko Kusuya, Hiroki Takahashi |
| 2. 発表標題 <i>Aspergillus fumigatus</i> の大規模ゲノム解析による二次代謝遺伝子クラスターの探索 |
| 3. 学会等名 糸状菌分子生物学コンファレンス |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋弘喜 |
| 2. 発表標題 微生物ゲノム研究法の進展とその応用 |
| 3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Masaki Nagayama, Yoko Kusuya, Hiroki Takahashi |
| 2. 発表標題 Search for novel secondary metabolic gene clusters by large-scale genome analysis of <i>Aspergillus fumigatus</i> , |
| 3. 学会等名 The 9th Global Network Forum on Infection and Immunity |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 高橋 弘喜 |
| 2. 発表標題 病原真菌アスペルギルスフミガタスの遺伝型解析 |
| 3. 学会等名 第199回酵母細胞研究会例会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 千葉悠斗, 高橋弘喜, 楠屋陽子, 渡辺哲, 浦山俊一, 萩原大祐 |
| 2. 発表標題 Aspergillus fumigatusと感染ウイルスのdual-genomicsによる進化的な関係性の解析 |
| 3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 馬嶋秀考, 新居鉄平, 楠屋陽子, 高橋弘喜, 渡邊哲, 矢口貴志, 宮崎泰成, 亀井克彦 |
| 2. 発表標題 Aspergillus fumigatus感性株は本邦と欧州で異なったcyp51A遺伝子多型をもつ |
| 3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 萩原大祐, 老木紗予子, 楠屋陽子, 高橋弘喜 |
| 2. 発表標題 同一植物球根から分離された Aspergillus fumigatusの比較ゲノム解析と農薬感受性試験 |
| 3. 学会等名 第65回日本医真菌学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|