

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10040

研究課題名(和文)新規アスペルギルス症診断系の開発

研究課題名(英文) Characterization of Aspergillus derived extracellular vesicles and application to a diagnostics

研究代表者

宮崎 義継 (Miyazaki, Yoshitsugu)

国立感染症研究所・真菌部・部長

研究者番号：00311861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は侵襲性アスペルギルス症の主要な原因菌である *Aspergillus fumigatus* の菌体外に放出される分泌小胞が、感染時血中あるいは尿中に放出されることを予想し、診断に応用することを目的とした。分泌小胞に含まれるRNAとタンパク質を解析し、分泌小胞中のRNAを検出する系の構築はできたが、抗膜タンパク質抗体を用い分泌小胞を濃縮する系の構築には至らず今後の課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてアスペルギルス症の主要な原因菌である *Aspergillus fumigatus* でも他の真菌と同様に分泌小胞が確認され、さらにRNAの解析より様々な小分子RNAが同定された。人をはじめとする高等生物の分泌小胞の1つであるエクソソームでは、含まれる小分子RNAの種類が病気を反映すること、また、それがエクソソームを介して他の細胞に伝達され病気に関係することが分かってきており、アスペルギルス症においても、真菌の分泌小胞のRNAが、病態を反映するだけでなく病原性にも関与することも考えられ、本研究で得られた成果は、今後の真菌症の基礎および臨床研究に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The research object is to develop a new diagnostic method for invasive aspergillosis by detecting extracellular vesicles (EVs) on the basis of our presumption that EVs of *Aspergillus fumigatus* are secreted into blood and urine. We have analyzed proteins and RNAs in EVs prepared by ultracentrifugation. Finally, we have constructed detection systems of RNA by RT-PCR, but not reached to establish a concentration method of EVs by an antibody against membrane proteins of EVs.

研究分野：真菌症

キーワード：分泌小胞 RNA 膜タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者は、主要な深在性真菌症であるカンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコックス症の新しい診断薬の開発を行っている。感染後に血中に放出されるタンパク質を検出することを考え、それぞれの原因真菌の細胞壁、細胞膜、および分泌タンパク質を網羅的に同定、検出系を構築してきた。その概要は、真核生物の蛋白質細胞内輸送メカニズムは種を越えて保存されていることから、哺乳類で細胞膜および分泌蛋白質を網羅的に同定することができる SST-REX (signal sequence trap by retrovirus-mediated expression screening: Nature Biotechnology 17, 487 - 490, 1999) 法を、真菌の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的同定に応用した。レトロウイルスベクターを用いて真菌の cDNA 発現ライブラリーを作成し、動物細胞に感染させた。得られた細胞クローン中の cDNA を PCR で増幅後シーケンス解析し、菌体外蛋白質をコードする遺伝子をカタログ化した *A. fumigatus* において、発現量の多い分泌タンパク質 5 種類に対する抗体を作成し、サンドイッチ ELISA 検出系を構築しており、現在、臨床応用のために様々な検討を行っている (特許出願中 P (PCT/JP2011/068454): アスペルギルス・フミガーツス感染症の検査、予防及び治療のための方法並びに組成物、2011.8.12)。検出系構築の過程で感度が問題の 1 つとなり、それを克服するために新たに標的として考えたのが分泌小胞 (エクソソーム) であり、その中に含まれる特異的な RNA を PCR にて増幅し、新しい診断系開発に応用できないかと考えた。これまでに申請者らは、予備的に培養条件、遠心分離を検討し、培養上清に電子顕微鏡で直径数十 nm から 1 μm 程度の分泌小胞を確認し、SDS ゲル電気泳動にてタンパク質の存在、さらに低分子 RNA を含む RNA を検出している (次ページ図)。近年、動物細胞のエクソソーム (真菌の菌体外分泌小胞と同じと考えられる) が注目され、病原性真菌においても 2007 年以降、*Cryptococcus* 属、*Histoplasma* 属、*Paracoccidioides* 属等で次第に報告が増えており、宿主に対する病原性、自然免疫応答に関する研究がなされている。現時点で *Aspergillus* 属についての報告、また分泌小胞の真菌診断系への応用に関する報告はなされていない。

2. 研究の目的

深在性真菌症は、重篤化を避けるために早期の診断・治療が必要であるが現状では十分とはいえ、新しい診断系の開発が望まれている。そのなかで侵襲性アスペルギルス症は優先度が高いことから、本研究では、その主要な原因菌である *Aspergillus fumigatus* を標的とした新しい診断系の開発を目指す。そのために *A. fumigatus* 菌体外に放出する分泌小胞 (動物ではエクソソームと呼ばれる) の実体の解明をし、それが感染時血中に放出されることを想定し、その小胞および含まれる RNA 等の内容物を検出する系を構築し、診断に応用することを計画する。

3. 研究の方法

Aspergillus fumigatus の菌体外小胞の性状解析をする。そのために効率のよい培養法と調整方法の詳細な検討、さらに大きさ、密度等による分画方法を検討する。調整した菌体外小胞に含まれるタンパク質と RNA の網羅的解析をする。膜表面タンパク質に対する抗体を作成し、菌体外小胞を濃縮する系を構築する。さらにその中に含まれる特定の RNA を特異的に増幅する PCR の系を構築する。構築した系を用いて、侵襲性アスペルギルス症マウスモデルにて、血中に菌体外小

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

胞、およびそれに含まれる RNA が検出できるかどうか検討する。

4. 研究成果

本研究は侵襲性アスペルギルス症の主要な原因菌である *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) も他の真菌と同様に分泌小胞を放出することを確認し、それが感染時血中あるいは尿中に放出されることを想定し、診断に応用することを目的とした。そのために分泌小胞に含まれる RNA・タンパク質を解析し、抗膜タンパク質抗体を用いて分泌小胞を濃縮し、分泌小胞 RNA を検出する系の構築を目指した。

(1). 分泌小胞の検出と調整法の検討：複数の培地、培養条件を検討した。培養上清から超遠心法により真菌由来と考えられる分泌小胞を分離した。電子顕微鏡にて数十 nm から 1 μ m を超える大きさの異なる小胞が存在した。

(2). 分泌小胞に含まれるタンパク質の解析：SDS 電気泳動法にて分泌小胞に含まれるタンパク質を銀染色にて検出した。100kDa 以下のタンパク質が少なくとも十数種類含まれることが明らかとなった。同定を進める過程で、他のグループにより *A. fumigatus* の分泌小胞に含まれるタンパク質の網羅的解析が報告されたので、その中から、発現量の多い細胞膜タンパク質を選択し、ポリクローナル抗体をした。

(3). 分泌小胞に含まれる RNA の網羅的解析：分泌小胞から RNA を抽出し、次世代 RNA シークエンスにて small RNA 画分と large RNA 画分を解析した。small RNA では、登録されている各種 RNA に加えて、これまで報告のない small RNA も多数検出した。large RNA では、mRNA も検出されたが、rRNA が非常に多いのが特徴的であった。超遠心法によって得られた分泌小胞を、ゲルろ過クロマトグラフィーで精製し、RT-PCR 法にて分泌小胞中の RNA を検出できた。

以上のように、分泌小胞中の RNA を検出する系を構築できたが、分泌小胞を濃縮する系の構築は今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shogo Takatsuka, Tatsuya Inukai, Shun Kawakubo, Takashi Umeiyama, Masahiro Abe, Keigo Ueno, Yasutaka Hoshino, Yuki Kinjo, Yoshitsugu Miyazaki, Satoshi Yamagoe]	4. 巻 60
2. 論文標題 Identification of a Novel Variant Form of Aspergillus fumigatus CaIC and Generation of Anti-CaIC Monoclonal Antibodies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical mycology journal	6. 最初と最後の頁 11~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3314/mmj.18-00013	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 Tomohisa Uchida, Momoko Okamoto, Keita Fujikawa, Daisuke Yoshikawa, Akinari Mizokami, Tomo Mihara, Akira Kondo, Kazuo Ohba, Kazuhiro Kurohama, Masahiro Nakashima, Ichiro Sekine, Shigeki Nakamura, Yoshitsugu Miyazaki, Atsushi Kawakami]	4. 巻 98
2. 論文標題 Gastric mucormycosis complicated by a gastropleural fistula: A case report and review of the literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e18142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000018142	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 Ueda T, Takesue Y, Tokimatsu I, Miyazaki T, Nakada-Motokawa N, Nagao M, Nakajima K, Mikamo H, Yamagishi Y, Kasahara K, Yoshihara S, Ukimura A, Yoshida K, Yoshinaga N, Izumi M, Kakeya H, Yamada K, Kawamura H, Endou K, Yamanaka K, Yoshioka M, Amino K, Ikeuchi H, Uchino M, Miyazaki Y]	4. 巻 14
2. 論文標題 The incidence of endophthalmitis or macular involvement and the necessity of a routine ophthalmic examination in patients with candidemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS one	6. 最初と最後の頁 e0216956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0216956	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 Masato Tashiro, Takahiro Takazono, Tomomi Saijo, Kazuko Yamamoto, Yoshifumi Imamura, Taiga Miyazaki, Hiroshi Kakeya, Tsunehiro Ando, Kenji Ogawa, Kazuma Kishi, Issei Tokimatsu, Yuta Hayashi, Satoru Fujiuchi, Katsunori Yanagihara, Yoshitsugu Miyazaki, Kiyoshi Ichihara, Hiroshi Mukae, Shigeru Kohno, Koichi Izumikawa]	4. 巻 70
2. 論文標題 Selection of Oral Antifungals for Initial Maintenance Therapy in Chronic Pulmonary Aspergillosis: A Longitudinal Analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America	6. 最初と最後の頁 835~842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cid/ciz287	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 Umeyama Takashi, Hayashi Yuta, Shimosaka Hisaki, Inukai Tatsuya, Yamagoe Satoshi, Takatsuka Shogo, Hoshino Yasutaka, Nagi Minoru, Nakamura Shigeki, Kamei Katsuhiko, Ogawa Kenji, Miyazaki Yoshitsugu	4. 巻 62
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Genome Editing To Demonstrate the Contribution of Cyp51A Gly138Ser to Azole Resistance in <i>Aspergillus fumigatus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e00894-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.00894-18	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 Abe Masahiro, Nakamura Shigeki, Kinjo Yuki, Masuyama Yuka, Mitsuyama Junichi, Kaku Mitsuo, Miyazaki Yoshitsugu	4. 巻 74
2. 論文標題 Efficacy of T-2307, a novel arylamidine, against ocular complications of disseminated candidiasis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Antimicrobial Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1327 ~ 1332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkz020	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 Ota Hikari, et al	4. 巻 182
2. 論文標題 Successful Treatment of Pulmonary Mucormycosis Caused by <i>Cunninghamella bertholletiae</i> with High-Dose Liposomal Amphotericin B (10?mg/kg/day) Followed by a Lobectomy in Cord Blood Transplant Recipients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mycopathologia	6. 最初と最後の頁 847 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11046-017-0149-1	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 Kimura Muneyosh, et al	4. 巻 62
2. 論文標題 Micafungin Breakthrough Fungemia in Patients with Hematological Disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e02183 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AAC.02183-17	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27件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山越 智、犬飼達也、高塚翔吾、星野泰隆、岡本圭祐、上野圭吾、梅山 隆、宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusの細胞外小胞の解析
3. 学会等名 第13回アスペルギルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅山 隆、犬飼達也、山越 智、高塚翔吾、星野泰隆、宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusアゾール耐性株にみられるCyp51A SNPSのゲノム編集による直接検証
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 犬飼達也、星野泰隆、浦井 誠、梅山 隆、高塚翔吾、山越 智、東 祥嗣、阿部雅広、名木 稔、中村茂樹、宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus B11b破壊株の増殖を抑制する血清中の成分の同定
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高塚翔吾、林崎浩史、犬飼達也、山越智、梅山隆、星野泰隆、上野圭吾、宮崎義継
2. 発表標題 インフルエンザ続発性肺アスペルギルス症モデルの確立と重症化メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第63回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Umeyama, Tatsuya Inukai, Madoka Tateno, Satoshi Yamagoe, Shogo Takatsuka, Yasutaka Hoshino, Yoshitsugu Miyazaki
2. 発表標題 Genome editing technology to elucidate the antifungal resistance mechanisms in filamentous fungi
3. 学会等名 The Asia Pacific Society for Medical Mycology Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 壇辻百合香、星野泰隆、名木 稔、阿部雅弘、上野圭吾、中山靖子、橋本ゆき、東 祥嗣、犬飼達也、高塚翔吾、梅山 隆、山越 智、宮崎義継
2. 発表標題 2016～2018年3年間実施したBiosafety level 3対応が必要な真菌検査について
3. 学会等名 第31回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Umeyama, Tatsuya Inukai, Madoka Tateno, Satoshi Yamagoe, Shogo Takatsuka, Yasutaka Hoshino, Keiko Ishino, Yoshitsugu Miyazaki
2. 発表標題 CRISPR / Cas9 genome editing technology to verify the contribution of known mutations in the cyp51A gene and its promoter to azole resistance in <i>Aspergillus fumigatus</i> .
3. 学会等名 9th Advanecs Against Aspergillosis and Mucormycosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Teppeï Arai, Takashi Umeyama, Tatsuya Inukai, Akira Watanabe, Yoshitsugu Miyazaki, Katsuhiko Kamei
2. 発表標題 Hmg1 mutation conferring multi-azole resistance in <i>Aspergillus fumigatus</i>
3. 学会等名 9th Advanecs Against Aspergillosis and Mucormycosis (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 壇辻百合香、星野泰隆、名木稔、阿部雅広、上野圭吾、中山靖子、橋本ゆき、東祥嗣、犬飼達也、高塚翔吾、梅山隆、山越智、宮崎義継
2. 発表標題 注意すべき糸状菌
3. 学会等名 第31回 日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 犬飼達也、梅山 隆、山越 智、宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusの血清存在下での増殖機構
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野 圭吾、柳原 尚、清水 公德、山越 智、宮崎 義継
2. 発表標題 クリプトコックス症に対する新規経鼻ワクチンの開発とその作用機構：免疫賦活性に優れたワクチン株の作製
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅山隆、犬飼達也、山越智、名木稔、中村茂樹、小川賢二、宮崎義継、
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノム編集技術によるAspergillus fumigatusポリコナゾール耐性変異の検証
3. 学会等名 第92回日本感染症学会総会・学術講演会 第66回日本化学療法学会学術集会 合同学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星野泰隆, 宮崎義継
2. 発表標題 アスペルギルス・フミガタスのアゾール系抗真菌薬耐性株の解析
3. 学会等名 第62回 日本医真菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大飼達也, 梅山 隆, 山越智, 宇田晶彦, 星野泰隆, 高塚翔吾, 阿部雅広, 栃木直文, 篠崎稔, 渋谷和俊, 名木稔, 壇辻百合香, 中村茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 Aspergillus fumigatusの血清存在下の生育に必須な因子の同定と病原性解析
3. 学会等名 第12回アスペルギルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 壇辻百合香, 中村茂樹, 東祥嗣, 阿部雅広, 上野圭吾, 梅山隆, 山越智, 宮崎義継
2. 発表標題 パラフィン包埋試料を用いた真菌DNA検出状況に関する検討
3. 学会等名 第65回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Umeyama, Y. Hayashi, H. Shimosaka, T. Inukai, S. Yamagoe, M. Nagi, S. Nakamura, K. Ogawa, Y. Miyazaki
2. 発表標題 Mutations in the cyp51A gene of an azole resistant clinical isolate of Aspergillus fumigatus: direct proof using Cas9/CRISPR genome editing
3. 学会等名 8th Advances Against Aspergillosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎義継
2. 発表標題 侵襲性真菌症治療の新しい試み
3. 学会等名 第22回日本神経感染症学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村茂樹, 中山靖子, 壇辻百合香, 名木 稔, 浦井誠, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継
2. 発表標題 真菌感染症の新しい診断法
3. 学会等名 第91回 日本感染症学会総会・第65回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野圭吾, 金城雄樹, 浦井 誠, 宮崎義継
2. 発表標題 クリプトコックスの莢膜欠損株は何故病原性が低いのか? : 環境適応と免疫回避機構における莢膜合成の意義
3. 学会等名 第91回 日本感染症学会総会・第65回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村茂樹, 壇辻百合香, 犬飼達也, 名木 稔, 浦井誠, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継
2. 発表標題 クラリスロマイシンによる高病原性Cryptococcus gattiiの莢膜形成抑制作用に関する検討
3. 学会等名 第91回 日本感染症学会総会・第65回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山越 智, 高塚翔吾, 梅山 隆, 犬飼達也, 名木 稔, 中村茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 アスペルギルス症
3. 学会等名 第61回 日本医真菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名木 稔, 田辺公一, 上野圭吾, 中山浩伸, 中村茂樹, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継
2. 発表標題 病原性および鉄欠乏環境におけるCandida glabrataのマイトファジーの役割
3. 学会等名 第61回 日本医真菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野圭吾, 金城雄樹, 定本聡太, 篠崎 稔, 阿部雅広, 澁谷和俊, 宮崎義継
2. 発表標題 肺常在性記憶型Th17細胞は、高病原性肺クリプトコックス症を制御する
3. 学会等名 第61回 日本医真菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名木 稔, 田辺公一, 上野圭吾, 犬飼達也, 中村茂樹, 梅山 隆, 山越 智, 宮崎義継
2. 発表標題 Uptake of exogenous sterol promotes antifungal resistance in Candida glabrata
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田辺 公一, 名木 稔, 犬飼 達也, 中山 浩伸, 梅山 隆, 山越 智, 中村 茂樹, 宮崎義継
2. 発表標題 Exogenous sterol uptake: A potential cause of azole resistance
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷淑子, 上野圭吾, 柳原 尚, 浦井 誠, 清水公德, 宮崎義継, 金城雄樹
2. 発表標題 病原性真菌Cryptococcus gattii の新規感染機構: 莢膜多糖による抗原被覆作用について
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野圭吾, 柳原 尚, 大谷淑子, 清水公德, 宮崎義継, 金城雄樹
2. 発表標題 好中球は高病原性真菌Cryptococcus gattii の増殖を抑制するか?
3. 学会等名 第91回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2018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
研究 分担者	山越 智 (Yamagoe Satoshi) (00212283)	国立感染症研究所・真菌部・室長 (82603)	