

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860314

研究課題名(和文) マイコウイルスによる病原性抑制メカニズムの解明と新規抗真菌薬の開発

研究課題名(英文) A novel dsRNA mycovirus reduces pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* in a mouse infection model.

研究代表者

高橋 梓 (Takahashi-Nakaguchi, Azusa)

千葉大学・真菌医学研究センター・技術職員

研究者番号：20607949

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)：マウスに対する*A. fumigatus*の病原性を抑制する4本鎖、5本鎖dsRNAをもつマイコウイルス2種を見出し、新規抗真菌薬としての応用を目指して研究を行った。本研究では、マイコウイルスのゲノム上に存在する、宿主の病原性抑制を担う遺伝子を特定するため、ウイルス遺伝子の発現量の比較およびウイルス遺伝子の強制発現による宿主への影響を解析した。

特定のORF強制発現株で生育抑制が観察された。さらに、これらのORFによる形質転換株を用いてマウス感染実験を行い、マウスにおける病原性を比較した。

研究成果の概要(英文)：In a screen of 44 clinical and environmental isolates of *A. fumigatus* for mycoviruses, four of the isolates were found to contain distinct groups of dsRNA segments. By using next-generation sequencer (Illumina, MiSeq), we have sequenced the dsRNA mycovirus genomes of these mycoviruses which are respectively members of the Chrysovirus genus, the Partitivirus genus, and 2 of novel mycoviruses. In this investigation, isogenic lines of virus-free and virus-infected *A. fumigatus* for each mycovirus infections have been compared with respect to phenotypic differences and effects on host fitness. Virulence assays in mouse model implicated that a novel mycovirus influence for normal pathogenesis. In addition, we also will report that mycovirus have influence on *A. fumigatus* characterization, such as, number of spores, mycelia morphology, adherence of *A. fumigatus* resting conidia to host pulmonary epithelial cells, and tolerance for macrophage phagocytosis.

研究分野：医真菌学

キーワード：マイコウイルス

1. 研究開始当初の背景

がんや細菌感染症を治療するために、アデノウイルスやレトロウイルスといったウイルスを、有用遺伝子を運ぶベクターとして利用するドラッグデリバリーシステムが実用化されている。農業分野において、真菌のウイルス、マイコウイルスを植物病原真菌に作用させて病原菌を死滅させる研究が始まっているが(Chiba,2010)、ヒト病原真菌のマイコウイルスの報告はごく少なく、マイコウイルスを利用してヒトの病原真菌症を制圧することに関しては、期待されつつもほとんど研究がなされていないのが現状である(van de Sande et al., 2010)。

2. 研究の目的

免疫抑制を伴う高度医療には常に感染症への対策が必要とされる。近年特に症例数が急増しているアスペルギルス症は、主に *A.fumigatus* によって引き起こされる。同菌は呼吸器疾患およびアレルギーの原因となるほか、全身臓器に播種して重篤化する。しかし医薬用抗真菌薬は種類が極端に少なく、副作用、薬剤耐性菌の出現といった問題を抱えており、新たな薬剤の開発が強く望まれている。

申請者は、*Aspergillus fumigatus* の病原性を抑制するマイコウイルスを発見した。マイコウイルスは真菌内部のみに存在し、哺乳動物細胞には感染しないとされている。本申請研究では、はじめに本ウイルスの性状解析および遺伝子解析を行うことにより、病原性抑制メカニズムの解明に取り組む。次に新規抗真菌薬としての創薬を目指し、動物体内に感染させた真菌細胞内へ、効率よくマイコウイルスを導入する手法の開発に取り組む

免疫力の低下した患者に発症し重篤化する深在性真菌症に対し、真菌選択的に作用させる

ベクターとしてマイコウイルスを用いるという、これまで報告されてきた抗真菌薬と全く概念の異なる独創的な研究である。さらにマイコウイルスの病原抑制機能を担うペプチドや siRNA を明らかにすることにより、これらを新規抗真菌薬として応用することも可能である。このように本申請課題は副作用の多い抗真菌薬に代わり、免疫抑制を伴う高度医療の強い助けになることが期待できる。

3. 研究の方法

(1)マイコウイルスによる *A.fumigatus* の病原性抑制機構の解明

マイコウイルスによる *A.fumigatus* への病原性抑制効果の性質の特定。

A. ウイルス保有株とウイルスフリー株をそれぞれマウスに経気道投与し、死亡率と体重変動、臓器における菌の増殖と炎症の進行(組織切片)を観察することにより、病原性抑制効果を比較評価する。

B. 病原性抑制効果の原因と考えられる宿主 *A.fumigatus* の性状変化を特定する。

a) 分生子および菌糸の形態観察(位相差顕微鏡/走査型電子顕微鏡/透過型電子顕微鏡)

b) 各ストレス(浸透圧・温度・薬剤・酸化・細胞壁)への耐性の比較評価。

c) 分泌型病原性因子(グリオトキシン等のカビ毒、タンパク質分解酵素など)に注目した二次代謝産物の比較。(HPLC,LC-MS/MS等)

d) 次世代シーケンサーIllumina社 Miseq を用いた比較発現解析(RNA-seq)。病原性抑制因子をつかさどるマイコウイルスの遺伝子の推定。

推定病原性抑制遺伝子から合成したペプチドもしくは siRNA の病原性抑制効果の検証。

(2) 真菌特異的に薬剤を作用させるドラッグデリバリーシステムの開発 アスペルギルス症は、*A.fumigatus* 等の分生子がヒトの肺へ吸入されることにより感染が起こる。そのほとんどは好中球やマクロファージにより排除されるが、エイズやがん治療、移植などにより免疫力が低下した患者では、*A.fumigatus* 菌が肺組織を侵襲し、全身性の疾患となる。肺や肝臓、脳などに定着した *A.fumigatus* を外科的に全て取り去ることは難しく、効果的な抗真菌薬が必要とされる。また抗真菌薬は、真菌がヒトと同じ真核生物であるために、原核生物である細菌に比べて副作用のある薬剤が多い。そこで本研究ではマイコウイルスの宿主範囲が狭いことを利用し、マイコウイルスを抗真菌薬として利用するための条件検討を行う。農業分野では、ウイルス保有菌を農場に散布し、菌同士の接合によりウイルスを水平伝播させる方法がとられているが、ヒトにウイルス保有菌を接種することができないため、ウイルスを外部から菌に感染させる方法を確立する必要がある。次に、さらに抗真菌効果を高めるため、そのまま投与すると副作用が強いが、高い抗真菌活性を示す、といった有用遺伝子をマイコウイルスゲノムに組み込み *A. fumigatus* 菌内で発現させる マイコウイルスを利用したドラッグデリバリーシステムの開発に着手する。

4. 研究成果

新たに見出したマイコウイルスのゲノムの全長を決定し、フリー化した株を用いて性状比較を行ったところ、新種の2株には *A.fumigatus* に対する病原抑制効果が認められた。そこで次にウイルスの各 ORF をウイルスフリーの基準株 KU にそれぞれ導入したところ、ある特定のウイルス ORF が *A.fumigatus* の病原性を抑制している

ことが明らかとなった。現在論文を2報執筆中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 28 件)

1. Azusa Takahashi-Nakaguchi, Yasunori Muraosa, Daisuke Hagiwara, Kanae Sakai, Takahito Toyotome, Akira Watanabe, Susumu Kawamoto, Katsuhiko Kamei, Tohru Gono, Hiroki Takahashi: *Genome sequence comparison of Aspergillus fumigatus strains isolated from patients with pulmonary aspergilloma and chronic necrotizing pulmonary aspergillosis*. Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology 05/2015; 53(4):353-60., DOI:10.1093/mmy/myv003 (査読あり)
2. Tsuyoshi Nakano, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Masafumi Yamamoto, Masahiko Watanabe: *Pierisins and CARP-1: ADP - ribosylation of DNA by ARTCs in butterflies and shellfish*. Current topics in microbiology and immunology 07/2014; 384. :127-49., DOI:10.1007/82_2014_416 (査読あり)
3. Azusa Takahashi - Nakaguchi, Yasuko Matsumoto, Masafumi Yamamoto, Kikuo Iwabuchi, Yukari Totsuka, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi: *Demonstration of Cytotoxicity against Wasps by Pierisin-1: A Possible Defense Factor in the Cabbage White Butterfly*.

PLoS ONE 04/2013; 8(4):e60539,
DOI:10.1371/journal.pone.0060539 (査 読
あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. 八原美沙, 高橋 梓, 森山裕充, 五ノ井透
「病原性真菌 *A. fumigatus* を弱毒化するマイコ
ウイルスの探索とその性状解析」
第 86 回日本細菌学会総会 千葉県千葉市・幕
張メッセ国際会議場 2013 年
2. 森山裕充・浦山俊一・太田智子・加藤 優・福
原敏行・高橋 梓・東江昭夫・五ノ井透・有江
力・寺岡 徹
「マイコウイルス由来タンパク質のイネいもち病
菌生育抑制機構の解析」
日本農薬学会 茨城県つくば市 筑波大学
2013 年
3. 高橋梓, 八原美沙, 五ノ井透
肺アスペルギルス症の病原性を抑制するマイ
コウイルス
真菌症フォーラム 東京都港区
第一ホテル東京 2014
4. 高橋梓, 八原美沙, 五ノ井透
肺アスペルギルス症の病原性を抑制するマイ
コウイルス
A novel dsRNA mycovirus reducing virulence of
human pathogenic fungus
日本細菌学会 東京都 江戸川区タワーホール
船堀 2014
5. 高橋梓, 八原美沙, 穴戸絵里香, 森山裕充,
五ノ井透

病原性糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の病原性
を抑制するマイコウイルス

日本顕微鏡学会 千葉市幕張メッセ国際会議
場 2014

6. 穴戸絵里香, 高橋梓, 亀井克彦, 五ノ井透
Aspergillus fumigatus の病原性を抑制するマ
イコウイルス遺伝子の特定

日本医真菌学会 神奈川県横浜市ワークピ
ア横浜 2014

7. 穴戸絵里香, 高橋梓, 森山裕充, 五ノ井透
病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化する
マイコウイルス遺伝子の同定

糸状菌分子生物学会 宮城県仙台市東北大学
川内北キャンパス 2014

8. 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化す
るマイコウイルスの遺伝子発現解析

穴戸絵里香, 高橋梓, 森山裕充, 五ノ井透
糸状菌分子生物学会 東京都府中市 2015

9. 病原真菌 *Aspergillus fumigatus* を弱毒化す
るマイコウイルス各遺伝子の発現量と機能解析

穴戸絵里香, 高橋梓, 酒井香奈江, 萩原大祐,
森山裕充, 五ノ井透
糸状菌分子生物学会 京都府宇治市 宇治お
うばくプラザ 2016

10. *Candida glabrata* における強酸耐性機構の
解析

高橋梓, 佐藤美智代, 宇野潤, 亀井克彦, 知花
博治
第 60 回日本医真菌学会総会 東京都台東区東

京都立産業貿易センター台東館 2016 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 梓(TAKAHASHI Azusa)

千葉大学・真菌医学研究センター・技術職員

研究者番号:20607949

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし()

研究者番号:

(4)研究協力者

浦山俊一 博士(URAYAMA Syun-ishi)

東京農工大学(当時)

八原美沙 氏 (YAHARA Misa)

千葉大学大学院生

穴戸絵里香 氏 (SHISHIDO Erika)

千葉大学大学院生

日比谷優子 博士 (HIBIYA Yuko)

国立がん研究センター