

理組織学的な解明はほとんどなされておらず、これまでの報告もわずかである。我々はこれまで CPA の病理組織学的解析を行ってきた。菌の局在についてはほとんど全例空洞内に菌塊を認めるが、その他連続する気管支にまばらに分布する他、空洞より離れた気道にはほとんど認めなかった。また空洞周囲や、末梢肺において広範な器質化が観察され、その原因としては何らかの菌に由来する可能性を推測してきた。今回の検討において、空洞壁、その周囲の気管支壁、さらに末梢の気道では程度の差はあるが、いずれも上皮障害と気腔への強い滲出反応・壊死性変化、さらに実質での器質化が観察された。つまり菌に由来する上皮障害と好中球反応が関与した組織障害（潰瘍・壊死）と慢性炎症が関与した器質化が同時に進行する病態と考えられた。

E. 結論

CPA においては、気道（気腔）の上皮障害、と強い滲出反応・壊死性変化が見られ、壁での慢性炎症と実質での器質化を生ずる。つまり菌に由来する上皮障害と好中球反応が関与した組織障害と慢性炎症に関連し器質化が進行する病態と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

1. 安藤常浩 肺真菌症と胸水 呼吸器内科 17(4):386-392, 2010
2. Greene R., Shibuya K., Ando T. Chapter 27 Histology and Radiology. Jean-Paul Latge, William J. Steinbach, *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis, ASM Press, Washington, DC. 353-62, 2009.
3. 安藤常浩、守屋敦子、渋谷和俊 アスペルギルス症 日本臨床 66 (12) 2345-2349, 2008
4. 守屋敦子、新井愛子、森本耕三、石川理恵、神宮浩之、安藤常浩、生島壮一郎、武村民子、折津愈 Voliconazole による慢性肺アスペルギルス症治療例の検討 日赤医学 59(2)429-434 2009

2 学会発表

国際学会

1. Ando T, Shibuya K. Histopathological study of Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis (CNPA) and possibility of biofilm formation. Biofilms in nosocomial fungal infections. Paris, France, 2011.
2. Ando T, Moriya A, Ikushima S, Oritsu M, Takemura T, Shibuya K. Histopathologic study of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis

(CNPA). 4th Advances Against Aspergillosis. Rome, Italy, 2010.

3. Ando T, Shibuya K. A case of infection mixed with aspergillus and zygomycetes confirmed by both in situ hybridization (ISH) and PCR using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections Focus on Fungal Infections 19. Florida, USA, 2009.

7. 安藤常浩：「肺真菌症の診断と治療」～臨床と病理像を中心に～肺機能講習会 軽井沢 2008年。

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

国内学会

1. 安藤常浩、渋谷和俊 慢性肺アスペルギルス症における病理組織学的病態の解析 第54回日本医真菌学会総会 東京 2010年。
2. 安藤常浩、渋谷和俊 症例にもとづく肺アスペルギルス症の病態 第31回関東医真菌懇話会 東京 2010年。
3. 安藤常浩 慢性肺アスペルギルス症の臨床と病理 第26回肺真菌症研究会学術集会 東京 2010年。
4. 守屋敦子、増尾昌宏、石川理恵、楠祐司、増永愛子、神宮浩之、安藤常浩、生島壮一郎、折津愈、武村民子：HTLV-1陽性患者に発症した侵襲性アスペルギルス症の1剖検例 真菌症フォーラム第10回学術集会 名古屋 2009年。
5. 安藤常浩、守屋敦子、増尾昌宏、石川理恵、楠祐司、増永愛子、神宮浩之、生島壮一郎、折津愈、武村民子 剖検にて接合菌とアスペルギルスの重複感染が確認された急性骨髄性白血病の1例 第52回日本医真菌学会総会 2008年。
6. 安藤常浩：「肺アスペルギルス症」臨床と病理像について 第83回結核病学会総会東京 2008年。

图 1

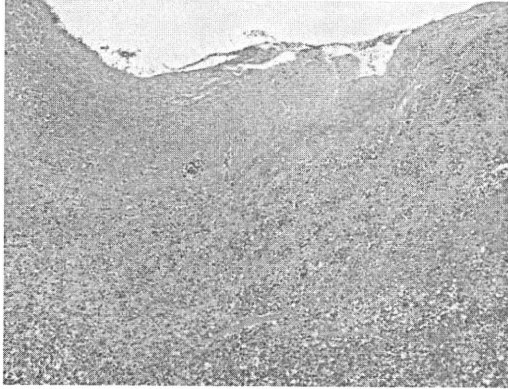


图 2

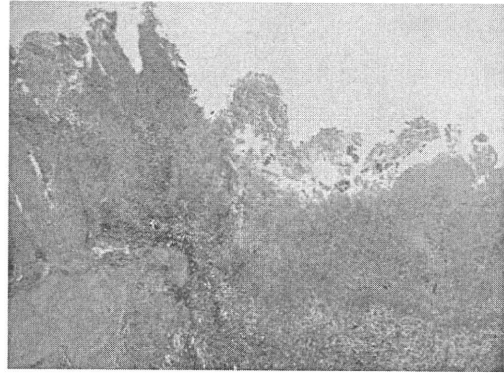


图 3

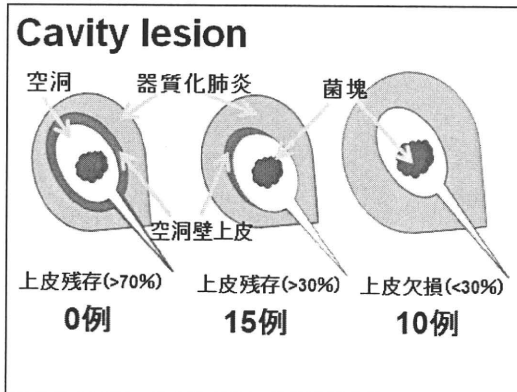


图 4

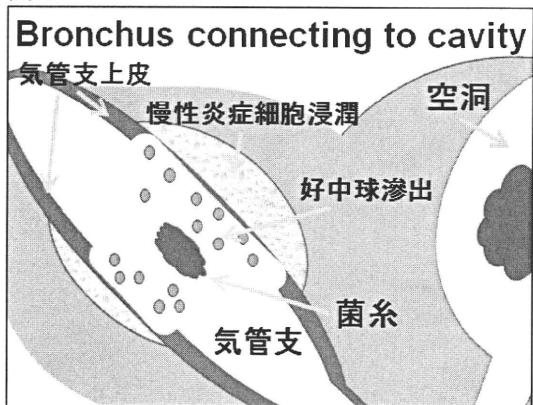
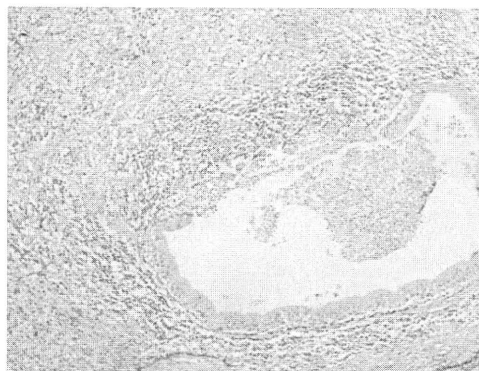


图 5



图 6



厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
「COPD 等における難治性感染症の病態把握等に関する研究」班
分担研究報告書

慢性壊死性肺糸状菌感染症における新たな抗原検索に関する研究

研究分担者 山越 智 国立感染症研究所 生物活性物質部

研究協力者

岡部智也	株式会社ACTGen	
梅山 隆	国立感染症研究所	生物活性物質部
田辺公一	国立感染症研究所	生物活性物質部
大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部
宮崎義継	国立感染症研究所	生物活性物質部

研究要旨 慢性壊死性肺アスペルギルス症は、COPD 等において致死性的となる場合がある。その診断ではアスペルギルスガラクトマンナン抗原検出法が比較的信頼性の高い検査として使用されているが、未だに感度、特異度など課題の多い検査である。前年度までに、哺乳類の細胞表層および分泌蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ(SST-REX)法を用い、*Aspergillus fumigatus* の膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行い 113 種類の遺伝子を得ることができた。その中から、バイオインフォーマティクスの手法と分子生物学的手法により 10 種類の蛋白質を診断等への応用が可能な新規抗原となりうる候補蛋白質として選択し、モノクローナル抗体を作製してきた。今年度は、その中から 2 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系構築を試み、これまで構築した ELISA 系と合わせて、マウス感染モデルでの検証を行った。今年度までの結果によりアスペルギルス症の新しい診断系への足がかりができた。

A. 研究目的

医療技術の進歩によりもたらされる免疫不全者の増加などに伴い深在性真菌症も近年増加傾向を示している。慢性壊死性肺アスペルギルス症は、COPD 等においてときに致死性である。現在、アスペルギルス感染症の早期診断を目的として使用されているガラクトマンナン抗原検出系は、血液悪性疾患の患者では約 80%の感度を有しているが、他の基礎疾患では特異度が低く、より感染実態を反映するアスペルギルス感染症の早期診断系の確立が求められている。

このような背景のもと、慢性壊死性肺アスペルギルス症の原因真菌で最も多い *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) を対象に、早期診断系の作製を念頭に新たな標的抗原の検索を行い、その検出系の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 大腸菌による組換え蛋白質の作製

SST-REX 法で得られた分泌蛋白質、膜蛋白質をコードすると考えられる遺伝子の中で、Y58 と B68 遺伝子の cDNA を

pGEX-6P-His6-FLAG、pMAL-c4X-Strep-tagII に入れ、大腸菌による大量培養を行った。GST あるいは MBP との融合蛋白質を、Glutathione Sepharose カラムあるいはアミロース resine カラムにより精製し、ウエスタンブロット、サンドイッチ ELISA のコントロールに使用した。

2. サンドイッチ ELISA 系の構築

モノクローナル抗体を NHS-LC-biotin (PIEACE 社) を用いビオチン化した。大腸菌で作製した蛋白質を 5 mg/ml 50 μ l/well で 96 穴マイクロプレートに吸着させ、抗原プレートを作製し、これを用いてビオチン化した抗体の力価を確認しサンドイッチ ELISA の 2 次抗体として濃度を検討した。

サンドイッチ ELISA の条件検討のため、修飾していない各濃度のモノクローナル抗体を用いた抗体感作プレートを作製し、1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 0.01 μ g/ml, 0 μ g/ml の各濃度の組換え体蛋白質を反応させ、さらに 2 次反応としてあらかじめ濃度を決めたビオチン化抗体を反応させた。3 次反応として Neutravidin-POD を反応させた後、酵素発色基質を加え発色させ、吸光度を測定した。

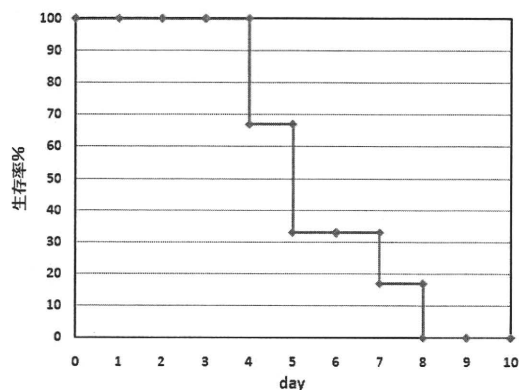


図 1. アスペルギルス感染モデル

3. アスペルギルス感染モデル

感染一日前より三日間酢酸コーチゾン 200 μ g/kg を連続皮下投与し免疫抑制をかけた ICR マウス気管にアスペルギルスのコニディア 1x10⁸ 個/ml 50 μ l を投与し、マウスの死亡率の経時変化を追った (図 1)。

C. 研究結果

1. モノクローナル抗体の作製

昨年度に引き続き Y58, B68 遺伝子産物についてモノクローナル抗体の作製を行った。SST-REX 法により作製された SST クローン (BA/F3 細胞にそれぞれの遺伝子が導入され、膜表面にその産物が提示されている細胞) を直接マウスに免疫して、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。Y-58, Y-68 遺伝子については複数のハイブリドーマが得られた (それぞれ 9 個、10 個)。それぞれのハイブリドーマの培養上清を用い、大腸菌で作製した融合蛋白質に対してウエスタンブロット法および ELISA 法を行い力価、特異性の検討をした。

2. Y58 蛋白質検出のためのサンドイッチ ELISA 系の構築

Y58 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系の構築を試みた。この蛋白質は、35kDa の分子量を有し、他のアスペルギルス属にもホモロジーを持つ蛋白質である。SST クローンのフローサイトメトリーによるスクリーニングにより約 300 種類のハイブリドーマから 9 種類を選び、さらに GST 融合蛋白質を用いた ELISA 系により 3 種類のモノクローナル抗体を選択した。この時、これまでに経験的に得られる値に比べ、抗原と抗体との親和力が数倍低いものであった (図 2)。6 通りのすべての組み合わせで構築を試みたが、Y58 蛋白質の濃度依存性を示す結果が得られなかった。

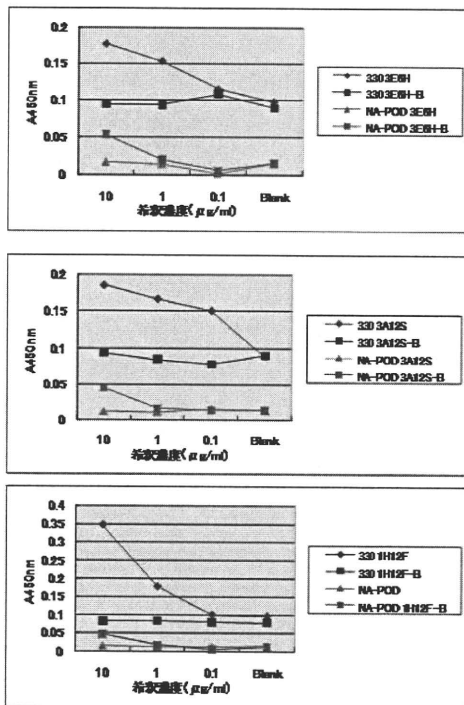


図 2. Y58 感作プレートによる ELISA 力価評価

3. B68 蛋白質検出のためのサンドイッチ ELISA 系の構築

B68 遺伝子産物に対するサンドイッチ ELISA 系の構築を試みた。この蛋白質は、42kDa の分子量を有し、*A. terreus* ではホモロジーを持つ蛋白質が存在するが、*A. niger*, *A. flavus* にはホモロジーを持つ蛋白質が存在しない。SST クローンのフローサイトメトリーによるスクリーニングにより約 800 種類のハイブリドーマから 8 種類を選び、さらに GST 融合蛋白質を用いた ELISA 系により 3 種類のモノクローナル抗体を選択した。6 通りのすべての組み合わせで構築を試み、その中で 6F8A3G10 を固層抗体、1H2B9D10 をビオチン化して検出抗体として構築した系が最も感度が高く数 ng/ml であった (図 3)。それを使い以下の検討を行った。

4. B68 サンドイッチ ELISA 系を用いた

A. fumigatus の培養上清中の B68 蛋白質量の測定

A. fumigatus を様々な種類の培地を用いて 30°C で振盪培養を行い、B68 蛋白質の量を B68 サンドイッチ ELISA 系を用いて測定した。その結果、昨年度の報告では、Y1 が検出できた同じ培養液において、B68 は検出できなかった。さらに、それぞれの培地に 10% の血清を加え培養した上清にも B68 蛋白質は検出できなかった。

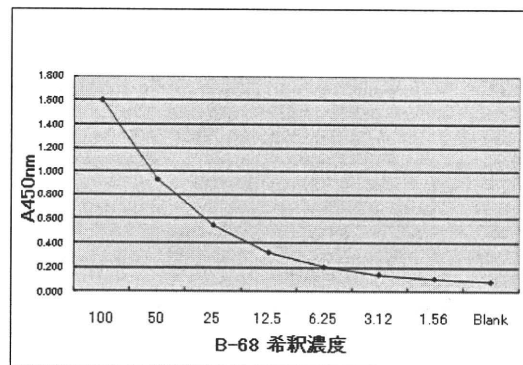


図 3. B68 サンドイッチ ELISA 系の構築

5. アスペルギルスマウス感染モデルにおける B68 蛋白質検出の試み

アスペルギルスマウス感染モデルを用い、感染後 2 日、3 日、4 日後のマウス血清を調整し、B68 蛋白質 ELISA に供した。ほとんど検出限界付近での測定のため問題はあるが、4 日目の血清で B68 蛋白質の値が、非感染マウスに比べて上昇傾向にあった (図 4)。

Y1 蛋白質については、昨年度構築した ELISA 系が、プレートのロットが変わったため感度が一桁低下した。その系を用いて感染マウスの血中の Y1 蛋白質濃度を検討したが検出できなかった。

D. 考察

昨年度は、Y1 蛋白質 ELISA 系を構築し、アスペルギルス培養上清を用いて測定した結果を報告した。今年度は、新たに Y58,

B68 蛋白質の ELISA 系の構築を試みた。Y58 蛋白質においては、得られた抗体の抗体価が低かった (図 2)。その原因として、もともとの免疫原は、目的の蛋白質を膜表面に発現した SST 細胞であり、それを直接マウスに免疫し、できた抗体を同細胞を用いたフローサイトメトリーにてスクリーニングをかけたもので、ELISA の固層に使った大腸菌由来蛋白質とは立体構造が違うという理由が考えられた。

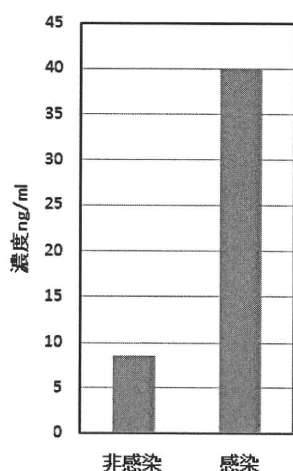


図 4. アスペルギルス感染モデル 4 日目の血清中の B68 蛋白質質量

B68 蛋白質のプロトタイプのスンドイッチ ELISA 系を構築し、感度が数 ng/ml 程度の系が得られた。マウスの感染モデルで血中の蛋白質質量を検討したところ、検出感度ぎりぎりのところではあるが、感染マウスで、非感染マウスに比べて ELISA の値が高かった。今後、バックグラウンドの軽減、感度の上昇を測るべく系を再構築し、再検討する予定である。

E. 結論

SST-REX 法を用いて得られた *A.fumigatus* の細胞外蛋白質のなかで 2 つの蛋白質について ELISA 系の構築を試み

た。うち一つの蛋白質についてプロトタイプのスンドイッチ ELISA 系を構築でき、アスペルギルス感染マウス血清で抗原が検出できる可能性のあるデータが得られた。今後、さらに系を条件検討し、診断への有効性を検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells* 16:80-89, 2011.

学会発表

国際学会

1. Ohno H, Tanabe K, Kaneko K, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Evaluation of two-stage PCR for diagnosis of Histoplasmosis. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore, 2010.

国内学会

1. 田辺公一、名木 稔、山越 智、大野秀明、宮崎義継：病原菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討、第 58 回日本化学療法学会総会 学術講演会、長崎、平成 22 年 6 月

2. 名木 稔、田辺公一、山越 智、大野秀明、宮崎義継：病原菌 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーターの機能解析、第58回日本化学療法学会総会学術講演会、長崎、平成22年6月
3. 樽本憲一、金城雄樹、山越 智、大野秀明、宮崎義継：*Candida albicans* の細胞壁分泌蛋白抗体による *in vitro* 増殖抑制効果の検討、第58回日本化学療法学会総会学術講演会、平成22年6月
4. 梅山 隆、山越 智、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継：アスペルギルス症の病原性に関する基盤研究、第31回関東医真菌懇話会、東京、平成22年7月
5. 山越 智、橋本ゆき、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継：*Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチELISA法によるアスペルギルス症診断系の構築、第31回関東医真菌懇話会、東京、平成22年7月
6. 田辺公一、大野秀明、山越 智、宮崎義継：タイにおける自然環境からの *Histoplasma capsulatum* の検出に関する検討、第59回日本感染症学会東日本地方会・第57回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会、平成22年10月
7. 宮崎義継、山越 智、金子幸弘、金城雄樹：感染局所におけるヒト線維芽細胞の線維化と炎症への役割、第59回日本感染症学会東日本地方会・第57回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会、東京、平成22年10月
8. 宮崎治子、小林 了、石川裕樹、栗野直樹、山越 智、宮崎義継、松本哲哉：大腸菌によるヒト線維芽細胞I型コラーゲン遺伝子プロモーター活性の誘導、第59回日本感染症学会東日本地方会・第57回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会、東京、平成22年10月
9. 山越 智、橋本ゆき、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継：*Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 Y-1 を標的としたELISA検出系の構築と病原性の検討：第54回日本医真菌学会総会、東京、平成22年10月
10. 宮崎義継、山越 智、金子幸弘、福田恵子、田辺公一、梅山 隆、大野秀明、金城雄樹：真菌感染局所におけるヒト線維芽細胞の線維化と炎症への影響、第54回日本医真菌学会総会、東京、平成22年10月
11. 山越 智、岡部智也、梶川益紀、梅山隆、田辺公一、橋本ゆき、石川 淳、大野秀明、宮崎義継：SST-REX法による病原酵母・糸状菌の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的解析。第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同学会、神戸、平成22年10月
12. Tanabe K, Nagi M, Nakayama H, Bard M, Aoyama T, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Ohno H, Miyazaki Y : Transcription factors *CgUPC2A* and *CgUPC2B* regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同学会、神戸、平成22年10月
13. Nagi M, Tanabe K, Nakayama H, Yamagoe S, Umeyama T, Oura T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y : Substrate specificity and

transcriptional regulation of a sterol transporter in *Candida glabrata*.

その他

特記事項なし。

第33回日本分子生物学会年会、第83

回日本生化学会大会合同学会、神戸、平成22年10月

14. 梅山 隆, 大野秀明, 棚町千代子, 橋本好司, 佐川公矯, 田辺公一, 山越 智, 宮崎義継: 福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコックス症多発発生例の疫学的検討. 第22回日本臨床微生物学会総会. 岡山、平成23年1月
15. 田辺公一、大野秀明、金子幸弘、梅山隆、山越 智、宮崎義継: ヒストプラズマ症の診断における臨床検体を対象とした2段階PCR法の有用性評価、第12回真菌フォーラム、東京、平成23年2月
16. 宮崎義継、山越 智、金子幸弘、福田恵子、田辺公一、梅山 隆、宮崎治子、松本哲哉、大野秀明、金城雄樹: 真菌感染の炎症局所における線維化要因についての検討、第12回真菌フォーラム、東京、平成23年2月
17. 山越 智、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、橋本ゆき、大野秀明、宮崎義継: *Aspergillus fumigatus*の細胞外蛋白質遺伝子の網羅的スクリーニングにより同定された分泌蛋白質B11およびそのホモログの病原性への関与、第12回真菌フォーラム、東京、平成23年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

特記事項なし。

実用新案登録

特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「COPD等における難治性感染症の病態把握等に関する研究」班
分担研究報告書

*Aspergillus fumigatus*のY1遺伝子の機能解析と病原性について

研究分担者	宮崎義継	国立感染症研究所	生物活性物質部
研究協力者	山越 智	国立感染症研究所	生物活性物質部
	梅山 隆	国立感染症研究所	生物活性物質部
	田辺公一	国立感染症研究所	生物活性物質部
	金子幸弘	国立感染症研究所	生物活性物質部
	大野秀明	国立感染症研究所	生物活性物質部

研究要旨 慢性壊死性肺アスペルギルス症（CNPA）は、COPD等においてときに致死的となる。その治療法は限られているため、新たな治療法の確立が求められている。CNPAの主要な原因真菌は*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) であるため、新たな治療法開発の標的として*A. fumigatus*の細胞外蛋白質を考えた。これまでにシグナルシーケンストラップ（SST-REX）法を用い、膜蛋白質、分泌蛋白質の網羅的同定を行い75種類の遺伝子を得ている。それらの中には病原性に関わる蛋白質も含まれると考えられ、その機能を解析し、病原性の発現機構を解明することは、新たな治療法の開発につながると期待される。同定された多くの遺伝子は機能不明であったため、その中で最も発現量が高いと考えられるY1蛋白質の病原性を調べることを目的として、前年度に引き続き*A. fumigatus*のY1遺伝子破壊株の解析を行った。さらにマウスアスペルギルス症モデルによりY1遺伝子が病原性に関わることが明らかとなった。

A. 研究目的

慢性壊死性肺アスペルギルス症（CNPA）は、COPD等においてときに致死的であり、合併する感染症として重要であるにも関わらず、その感染機構、病原因子についてはほとんどわかっていない。

CNPAの主要原因真菌である*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*)の細胞外蛋白質の中に、病原性に関与し、治療薬の標的になるものもあると考え、哺乳類の細胞外蛋白質を網羅的に同定できるシグナルシーケンストラップ（SST-REX）法を応用し、*A. fumigatus*の細胞外蛋白質

を網羅的に同定した。今回そのなかで最も発現量が高いと考えられるY1遺伝子破壊株について、昨年度に引き続き解析を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子改変に用いた*A. fumigatus*株

Fungal Genetics Stock Centerから臨床分離株D141に由来するAfs35を購入し、破壊株およびその遺伝子相補株作製に用いた。この株は*akuA*遺伝子が欠失されており相同組換えの頻度が高くなっている。

2. Y1遺伝子相補株の作製（Y1破壊株の作

製は昨年度の同報告書参照)

Y1 破壊株クローン 7 (Y1-7) を用い、Y1 遺伝子相補株を作製した。Y1 遺伝子のプロモーターを含む 5'領域および Y1 遺伝子の C 末端に 3xHA ペプチドタグを付加し、その下流に pyrithiamine 耐性遺伝子を連結したプラスミド pCR4-Y1comp-3HA-*ptrA* を作製し、それを鋳型として遺伝子導入に用いる DNA 断片を PCR 法によって作製した。DNA 断片を Afs35 株に導入し、pyrithiamine で選択した。30°C で培養し出現したコロニーを分離後、それぞれの胞子を直接 PCR にかけて遺伝子相補株を同定した。

3. サザンハイブリダイゼーション

親株 Afs35、遺伝子欠損株、遺伝子相補株から DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いゲノム DNA を調整し、制限酵素 BamHI にて消化し 1%アガロースゲル電気泳動にて分離後サザンブロット法に供した。プローブは図 1 の DNA 断片を用い AlkPhos direct labeling kit and CDP-Star reagent (GE healthcare) にて標識した。

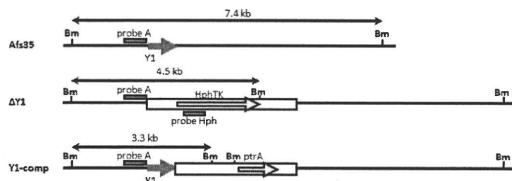


図 1.Y1 遺伝子改変株のマップ

4. RT-PCR による Y1 mRNA の検出

親株 Afs35、遺伝子欠損株、遺伝子相補株から RNAeasy Mini kit (Qiagen) を用い総 RNA を調整した。ReverTra Ace (Toyobo) にて逆転写し、得られた cDNA 断片をテンプレートとして、TaKaRa Ex Taq (Takara) にて PCR を行い、2%アガロースゲル電気泳動にて分離後、エチジウ

ムブロミドにて DNA を検出した。

5. 菌体からの細胞分画

菌体を液体窒素で凍結し破碎後、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、100 mM NaCl、10% Glycerol、protease inhibitor (Roche) に懸濁した。遠心により細胞壁面分を調整し SDS-PAGE に供した。ウエスタンブロット法により抗 Y1 ポリクローナル抗体で Y1 蛋白質を検出した。

6. 免疫染色

菌体を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、poly-L lysine コートしたガラスプレートに細胞を接着させた。メタノール固定後、ブロックキングを行い、Anti-Y1 polyclonal antibody を処理し、Alexa Fluor 488 Anti-mouse SFX kits にて Y1 蛋白質を検出した。

7. 胞子数の測定

親株 Afs35、遺伝子欠損株、遺伝子相補株を最少培地 (AMM) にて培養後、0.05% Tween80 PBS にて胞子を洗い落とし、血球計算版で胞子数を数えた。

8. アスペルギルスマウス感染モデル

親株 Afs35、遺伝子欠損株、遺伝子相補株 5×10^6 個の胞子を、それぞれ 7 個体の ICR マウス気管支に投与し、生存率を比較した。

C. 研究結果

1. Y1 遺伝子破壊株を用いた Y1 遺伝子相補株の作製

PCR およびサザンハイブリダイゼーション法による解析により 2 株が期待される相補株であることがわかった。親株 Afs35、遺伝子欠損株、遺伝子相補株の Y1 遺伝子領域の構造を図 1 に示した。

さらに、それぞれの株について遺伝子発現について調べた。

Y1 遺伝子破壊株 Y1-7 では予想通り Y1

mRNAは検出できなかったが、親株 Afs35、相補株 Y1-comp-4 では、Y1 の発現が見られた (図 2)。

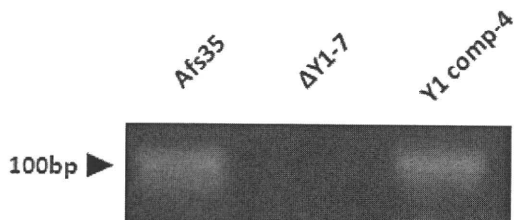


図 2.各遺伝子改変株の Y1 mRNA の発現

2. Y1 蛋白質は細胞壁に局在する

AMMにて37°Cで培養した菌体から細胞粗抽出液を調整し、細胞壁画分を分けた。それらサンプルを用い抗 Y1 ポリクローナル抗体にてウエスタンブロット法により Y1 蛋白質を検出した。その結果、図 3 の様に、細胞壁画分に分子量約 60kDa の Y1 蛋白質が検出された。

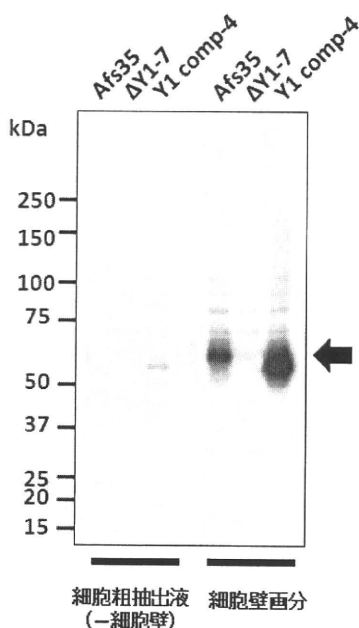
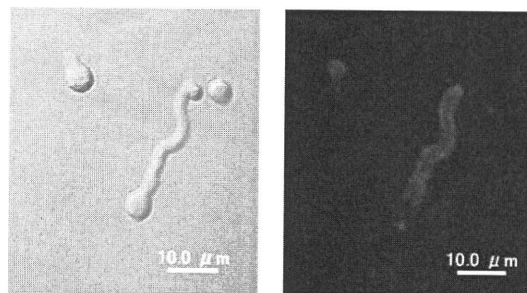


図 3.Y1 蛋白質の局在 (ウエスタンブロット法による検出)

さらに抗 Y1 ポリクローナル抗体を用い



た免疫染色により発芽した菌体の細胞壁が染まった像が得られた (図 4)。

図 4.免疫染色による Y1 蛋白質の検出 (右: 抗体による蛍光染色)

3. Y1 破壊株は孢子形成が低下する

昨年度、培地に 10%血清が含まれると、Y1 破壊株では、孢子形成能が低下することが示唆された。さらに温度依存性について調べたところ、血清の有無に関わらず、PDA 培地 25°Cで孢子形成の低下が観察された (図 5)。

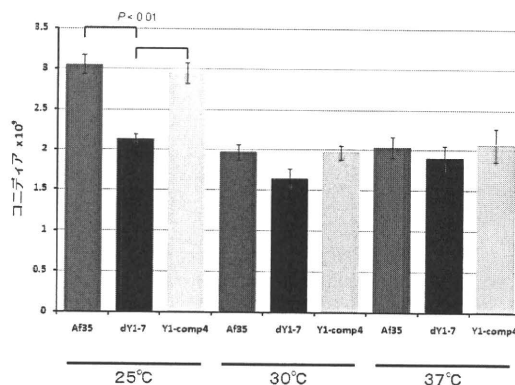


図 5. PDA 培地 25°Cでの孢子形成の低下

4. Y1 破壊株はマウス感染モデルでの病原性が低下する

アスペルギルスマウス感染モデルにおいて、Y1 破壊株接種群では、生存率の有意な上昇が見られた (図 6)。

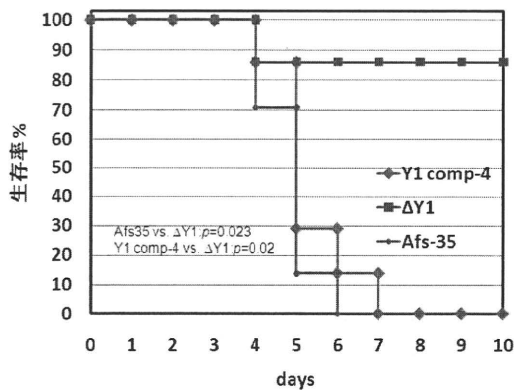


図 6. アスペルギルスマウス感染モデルを用いた Y1 遺伝子の病原性検討

D. 考察

今年度は、Y1 遺伝子破壊株のコントロールとして Y1 遺伝子相補株を作製し、昨年に引き続き Y1 遺伝子産物の機能解析を行った。

ウェスタンブロット法による解析、免疫染色による解析から Y1 蛋白質は細胞壁に存在することが明らかとなった。また、ウェスタンブロット法にて観察された分子量は、推定される Y1 の分子量 26KDa より大きく、糖鎖修飾が考えられた。これは今後の課題である。

昨年までに、Y1 破壊株では血清存在下での孢子形成能の低下が示唆されていたが、今年度は生育温度を検討することにより、血清の有無に関わらず、25°C で有意な孢子形成能の低下が見られ、30°C、37°C でも同様に孢子形成能が低下する傾向が見られた。細胞壁にある Y1 遺伝子が孢子形成にどのように関わるか今後調べる必要がある。

アスペルギルスマウス感染モデルでの Y1 破壊株の致死率の低下は、Y1 遺伝子産物が病原性に関わることを示しており、今後、Y1 に着目した菌体と宿主側の生体防御反応との関わりを検討する必要がある。

E. 結論

A. fumigatus の Y1 遺伝子改変株を用いて、Y1 遺伝子の機能を解析した。その結果、Y1 遺伝子は、細胞壁に局在する蛋白質をコードし、孢子形成に関与しており、マウス感染モデルでの病原性にも寄与することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Nagi M, Nakayama H, Tanabe K, Bard M, Aoyama T, Okano M, Higashi S, Ueno K, Chibana H, Niimi M, Yamagoe S, Umeyama T, Kajiwara S, Ohno H, Miyazaki Y. Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. *Genes Cells*. 16(1):80-89, 2010.
2. 金子幸弘, 宮崎義継. 河野茂編. 5 カンジダによる各臓器感染症の推奨治療と予防 3) 慢性播種性カンジダ症の治療. 米国感染症学会 IDSA ガイドライン 真菌症治療の UP-TO-DATE ~ 2008-2010 年のアスペルギルス, カンジダ, クリプトコックス IDSA GL 改訂版を踏まえて. 145-150, 2010.
3. 金子幸弘, 宮崎義継. 連載企画・感染対策 真菌感染症に必要な抗菌薬対策 ~ 注意すべき真菌症とその治療 ~ . 難病と在宅ケア. 16(2): 62-65, 2010.
4. 金子幸弘, 宮崎義継. ◇基礎編◇II 各論 11 耐性真菌 : *Candida*,

- Aspergillus*, *Cryptococcus*. 感染症診療の基礎と臨床～耐性菌の制御に向けて～. 123-134, 2010.
5. 金子幸弘, 宮崎義継. 特集・抗真菌薬の基礎と臨床—今日の考え方— 1. アゾール系抗真菌薬—その基礎—. 化学療法の領域. 26(4): 540-551, 2010.
 6. Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63(5): 355-357, 2010.
 7. Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-*Candida*-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90 related stress responses. *Med Mycol.* 48(4): 606-612, 2010.
 8. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Inter Med.* 49: 491-495, 2010.
 9. Hoshino Y, Fujii S, Shinonaga H, Arai K, Saito F, Fukai T, Satoh H, Miyazaki Y, Ishikawa J. Monooxygenation of rifampicin catalyzed by the rox gene product of *Nocardia farcinica*: structure elucidation, gene identification and role in drug resistance. *J Antibiot (Tokyo).* 63(1): 23-28, 2010.
 10. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 10(3):343-52, 2010.
 11. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and *Crz1* in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(4): 1639-43, 2010.
- 学会発表
国際学会
1. Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y. Antifungal agents alter the expression of genes related to antifungal resistance in *Candida* biofilms. *Biofilms in Nosocomial Fungal Infections, ESCMID Postgraduate Education Course.* Paris, France, 2011.
 2. Treepradab N, Pojana S, Piyawan T, Prasit T, Tanabe K, Ohno H, Miyazaki Y. Detection of *Histoplasma capsulatum* in soil contaminated with bat guano by nested PCR. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious

- Diseases. Singapore, Singapore, 2010.
3. Ohno H, Tanabe K, Kaneko Y, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Evaluation of two-stage PCR for diagnosis of Histoplasmosis.. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases. Singapore, Singapore, 2010.
 4. Miyazaki Y. Management of pulmonary fungal infectious diseases in Japan. 4th 301hospital Respiration Summit Symposium. Beijing, China 2010.
 5. Miyazaki Y. Current Approaches for Traveler's Invasive Fungal Infectious Diseases in NIID. The 7th Taiwan-Japan Symposium on Immunization and Travel Medicine. Taipei, Taiwan 2010.
 6. Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Voriconazole and micafungin induce chitin synthesis genes and reduce chitinase genes in *Candida* biofilms. 110th General Meeting of the American Society for Microbiology, San Francisco, USA 2010.
- 国内学会
1. 山越 智、岡部智也、梶川益紀、梅山 隆、田辺公一、橋本ゆき、石川 淳、大野秀明、宮崎義継 SST-REX 法による病原酵母・糸状菌の細胞表層および分泌蛋白質の網羅的解析 BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年。
 2. 名木 稔、田辺公一、中山晴雄、山越 智、梅山 隆、大浦隆弘、梶原 将、大野秀明、宮崎義継. Substrate specificity and transcriptional regulation of a sterol transporter in *Candida glabrata*. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年。
 3. 田辺公一、名木 稔、中山晴雄、Martin Bard、青山俊弘、新見昌一、山越 智、梅山 隆、大野秀明、宮崎義継 Transcription factors CgUPC2A and CgUPC2B regulate ergosterol biosynthetic genes in *Candida glabrata*. BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年。
 4. 田辺公一、大野秀明、梅山 隆、山越 智、宮崎義継 タイにおける自然環境からの *Histoplasma capsulatum* の検出に関する検討 第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 57 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2010 年。
 5. 筋野恵介、樽本憲人、山口敏行、前崎繁文、大野秀明、宮崎義継 ミカファンギン低感受性 *Candida famata* および *fermentati* 血症の 3 例 第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 57 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2010 年。
 6. 山越 智、橋本ゆき、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質を標的にしたサンドイッチ ELISA 法によるアスペギルス症診断系の構築 第 31 回関東医真菌懇話会 2010 年。
 7. 梅山 隆、山越 智、田辺公一、大野秀明、宮崎義継 アスペルギルス症の病

- 原性に関する基盤研究 第 31 回関東医真菌懇話会 2010 年。
8. 樽本憲人、金城雄樹、大川原明子、篠崎 稔、渋谷和俊、宮崎義継 播種性カンジダ症マウスモデルにおける糖脂質投与の影響 第 21 回日本生体防御学会学術総会 2010 年。
 9. 宮崎義継、山越 智、金子幸弘、金城雄樹、大野秀明 感染局所におけるヒト線維芽細胞の線維化と炎症への役割 第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 57 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2010 年。
 10. 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継 抗真菌薬投与下における *Candida* バイオフィルムのキチン合成・分解酵素遺伝子発現調節 第 54 回日本医真菌学会 2010 年。
 11. 山越 智、橋本ゆき、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継 *Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 Y-1 を標的とした ELISA 検出系の構築と病原性の検討 54 回日本医真菌学会総会 2010 年。
 12. 高園貴弘、泉川公一、行徳 宏、池田直樹、神田哲郎、宮崎泰可、関 雅文、掛屋 弘、山本善裕、柳原克紀、大野秀明、矢口貴志、宮崎義継、亀井克彦、河野 茂 軽症の糖尿病患者に発症した *Aspergillus udagawae* による気管支アスペルギルス症の 1 例 第 54 回日本医真菌学会総会 2010 年。
 13. 若山 恵、大久保陽一郎、篠崎 稔、中山晴雄、蜜田亜希、大野秀明、宮崎義継、中谷行雄、亀井克彦、渋谷和俊 *In situ hybridization* を用いたヒトヒストプラズマ症の組織診断の検討 第 54 回日本医真菌学会総会、2010 年。
 14. 宮崎義継、山越 智、金子幸弘、福田恵子、田辺公一、梅山 隆、大野秀明、金城雄樹 真菌感染局所におけるヒト線維芽細胞の炎症への影響と線維化要因についての検討 第 54 回日本医真菌学会総会 2010 年。
 15. 宮崎義継 国立感染症研究所の真菌症研究 第 21 回九州深在性真菌症研究会 2010 年。
 16. 宮崎 義継、梅山 隆、田辺公一、大野秀明 ヒストプラズマ等のアウトブレイク型真菌症への対策 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会 2010 年。
 17. 金子幸弘、大野秀明、河野茂、宮崎義継 *Candida albicans* の抗真菌薬治療抵抗性と Hsp90 関連ストレス応答 第 84 回日本感染症学会総会 2010 年。
 18. 田辺公一、大野秀明、宮崎義継 *Candida glabrata* のステロール取り込みと病原性の関係 第 84 回日本感染症学会総会 2010 年。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 特許取得
特記事項なし。
- 実用新案登録
特記事項なし。
- その他
特記事項なし。

新たな抗原検索と診断応用に関する研究

研究分担者 泉川公一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 感染免疫学

研究要旨 肺アスペルギルス症は、COPDや肺結核後遺症等の慢性呼吸器疾患を有する患者における難治性感染症の一つである。診断には真菌培養検査の他に、血清診断等があるが、その診断率は低いため、信頼性の高い新たな診断法の開発が必要である。そこで、新規診断法の樹立を目的として、臨床プロテオミクスの手法により、患者血清に特異的に検出される抗原を網羅的に検索した。検出された蛋白質のうち、アスペルギルス属に特異的な抗原として、アスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質を同定した。さらに、本蛋白質に対する新しい抗体を作製することに成功し、western blotting法により検証したが、特異性は低く、新規抗原検査としての可能性は低かった。今後、同様の手法で別の候補蛋白質を検討することで新たな抗原検索が可能と思われる。

A. 研究目的

COPD等における難治性感染症として肺アスペルギルス症があげられるが、その診断率は低く、精度の高い診断システムが求められている。本研究の目的は、臨床プロテオミクスの手法により、患者血清に特異的に検出されるアスペルギルス由来の蛋白質を同定し、肺アスペルギルス症の早期診断に有用な診断系を確立することである。

B. 研究方法

1) 候補蛋白質のスクリーニング

Ciphergen 社プロテインチップシステム（図1）を用いて、*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) MF13 菌体抽出物 (Fungus)、侵襲性肺アスペルギルス症患者血清 (IPA)、健康人血清 (Healthy) 中の蛋白を網羅的に比較した。

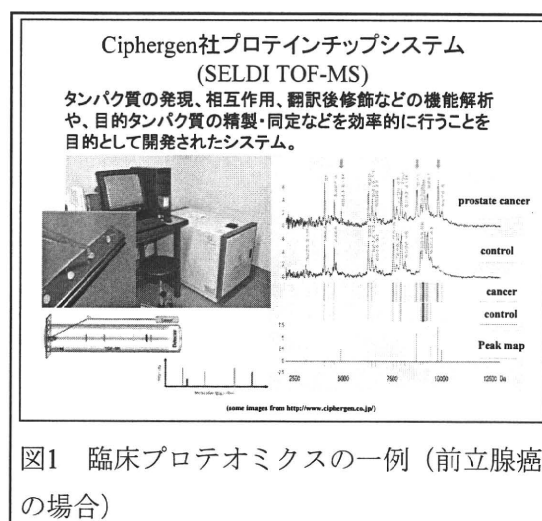


図1 臨床プロテオミクスの一例（前立腺癌の場合）

2) 候補蛋白質の汎用性・特異性の確認

a. アスペルギルス属間の比較

候補蛋白質が、アスペルギルス属の他の菌種にも応用可能であるかどうか、他の3菌種 (*A. niger*, *A. flavus*, *A. versicolor*) を用いて検討した。

b. 他の病原微生物との比較

候補蛋白質の特異性を確認するため、他の病原微生物 (MSSA (メチシリン感受性黄色ブドウ球菌)、MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)、緑膿菌、*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)、および *Candida albicans* (*C. albicans*)) を用いて検討した。

3) 標的蛋白質の同定

標的蛋白質を精製後、ポリアクリルアミドゲルを用いた二次元電気泳動法、peptide mass fingerprint 法、アミノ酸シークエンスにより、標的蛋白質を同定した。

4) 標的蛋白質に対する特異抗体の作製

アミノ酸配列から、標的蛋白質に特異的と推定されたタンデムな繰り返し配列に対する、標的蛋白質に対する抗体を作製した。さらに、抗体の特異性を確認するため、western blotting 法にて検証を行った。

C. 研究結果

1) 候補蛋白質のスクリーニング

Fungus、IPA、Healthy 中の蛋白質のプロファイリングを行った。

Fungus および IPA に共通し、かつ、Healthy には認めない特異的な蛋白質のピークを複数発見した (図 2)。

上記のうち最も顕著であったピークを示す蛋白質を候補蛋白質とした (図 2 の赤丸で示した部分)。

2) 候補蛋白質の汎用性・特異性の確認

アスペルギルス属の他菌種、および他の病原微生物由来の抽出蛋白質を比較した。候補蛋白質 (分子量: 8560 m/z) は、他のアスペルギルス属にも広く存在し、かつ、アスペルギルス属に特異的である可能性の高いことが示された (図 3)。

以上より、候補蛋白質の汎用性と特異性が推定されたため、この候補蛋白質を標的蛋白質とした。

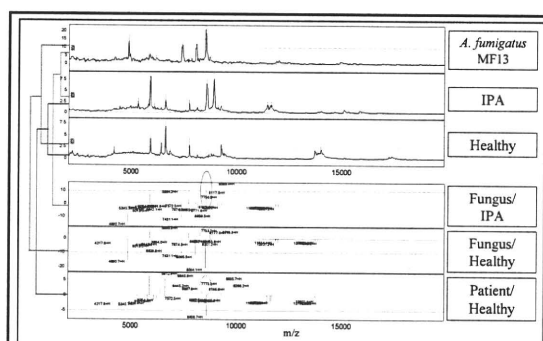


図 2 アスペルギルス菌体抽出物 (Fungus)、侵襲性アスペルギルス症患者の血清 (IPA)、健常人の血清 (Healthy) 中の蛋白質のプロファイリング。

上段 3 つは、各検体の各ピークを表す。

下段 3 つは、それぞれを比較 (例えば Fungus/IPA では Fungus と IPA) した場合。共通: +方向 (赤)、片方のみ: -方向 (青)。

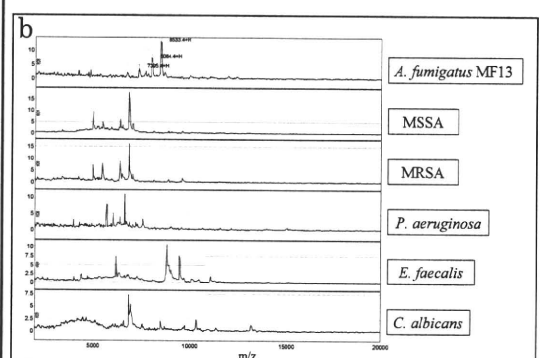
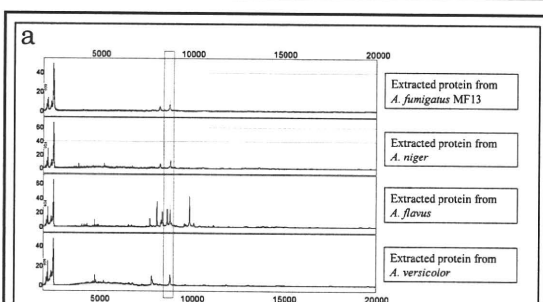


図 3 菌体抽出物中の蛋白質のプロファイリング

a. アスペルギルス属間の比較

標的蛋白質は、アスペルギルス属の他の菌種にも認められた。

b. *A. fumigatus* と他の病原微生物の比較

標的蛋白質は、他の病原微生物には認められなかった。

3) 標的蛋白質の同定

標的蛋白質を精製し、再度プロファイリングを行った (図4)。さらに、アミノ酸シーケンス等により、標的蛋白質がアスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質であることが判明した。

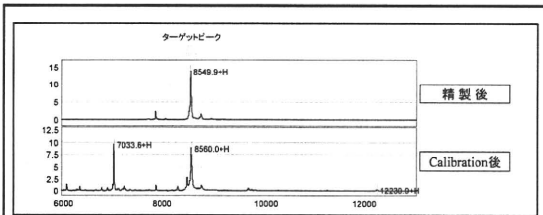


図4 標的蛋白質 (8560 m/z) 精製後のプロファイリング

4) アスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質に対する抗体の作製

アスペルギルス由来ユビキチンとヒト由来ユビキチンは図5のように極めて類似した構造である。しかしながら、つなぎ目の配列がタンデムに3回繰り返されている点で、ヒト由来とは異なっている。

図5に示す手法により、この繰り返し領域に対する特異的抗体の作製を試みた。

得られた複数のクローンの中から、2回のELISA法による特異度・感度の確認後、1種類の抗体に絞り込んだ (図6)。

1-1) ペプチド配列のデザイン
アスペルギルスユビキチンはヒトユビキチンとアミノ酸配列でわずか3残基しか違いがないが、この配列がタンデムに3回繰り返されている点がヒトユビキチンと異なる。

アスペルギルスユビキチン特異的なペプチドの候補
①ヒトと異なる3残基を含む領域
②タンデムに繰り返されるつなぎ目の領域

Aspergillus 1

MoI F VETLTGKTI TLEVESSDTI DNVKSKI QDKKQI PPDQQLI F AOKQI EDORTLSDYNI QKEI TL HL VLRLRGGMOI F VETLTGKTI

Human 1

MoI F VETLTGKTI TLEVESSDTI DNVKSKI QDKKQI PPDQQLI F AOKQI EDORTLSDYNI QKEI TL HL VLRLRGGMOI F VETLTGKTI

Human 2

1-2) ペプチドの修飾
ペプチドに関しては、C末端をビオチン化し、N末端にhis-tagを付加するとストレプトアビジンビーズやキレートビーズ、共有結合ビーズなど多様なビーズを試すことができ、抗体取得確率が高まると考えられる。

1-1)でデザインした配列のC末端をビオチン化し、N末端をhis-tag化することにする。

図5 アスペルギルス由来ユビキチンに特異的な抗体作製のためのデザイン

図5は、アスペルギルス由来ユビキチンとヒト由来ユビキチンのアミノ酸配列を示している。

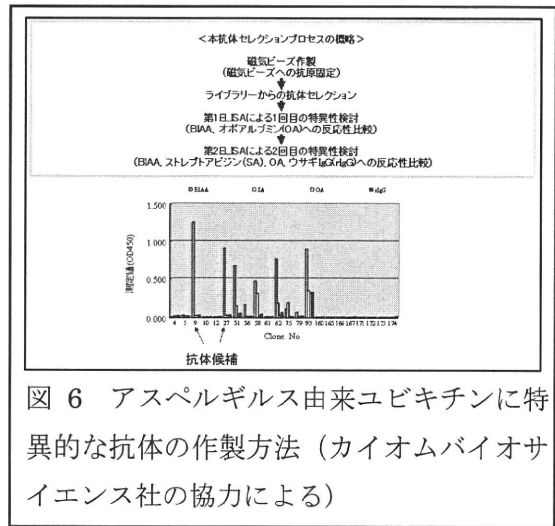


図6 アスペルギルス由来ユビキチンに特異的な抗体の作製方法 (カイオムバイオサイエンス社の協力による)

2種類の抗体 (BIAA_4#9, BIAA_4#27) の特異性を検証するために、western blottingを行った。コントロール培地およびコントロール Chicken IgMと比較したが、この候補抗体に特異的に反応するバンドは検出されなかった (図7)。

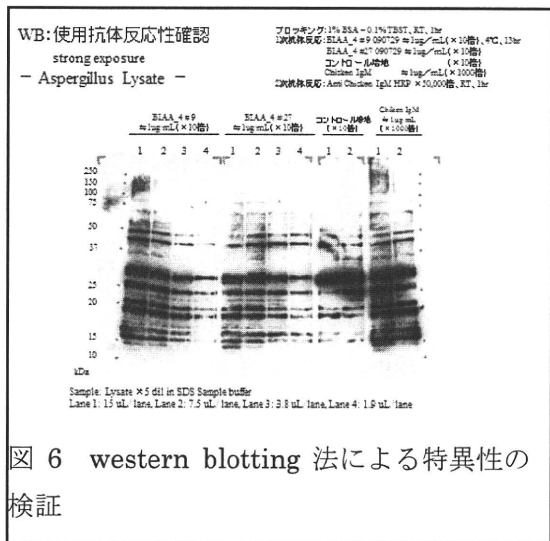


図6 western blotting 法による特異性の検証

D. 考察

臨床プロテオミクス的手法により、肺アスペルギルス症に特異的と推定される標的蛋白質を見出した。標的蛋白質は、理論上は、アスペルギルス由来ユビキチン様蛋白質であり、診断に有用な新規抗原となる可能性が示された。しかし、ユビキチンは進化的な保存性が高く、全ての真核生物で似