

新興・再興感染症研究基盤創生事業「多分野融合研究領域」

第二回（合同）班会議

多分野融合による感染症の理解と予防・治療法の研究開発
～若手研究者たちの挑戦～

多分野融合研究
Interdisciplinary Cutting-edge Research

オンライン開催

日時：2021年 **3月8日** 月 9:00–16:25

3月9日 火 9:00–17:00

主催：



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

Japan Program for Infectious Diseases Research and Infrastructure

**新興・再興感染症研究基盤創生事業「多分野融合研究領域」
第二回（合同）班会議**

多分野融合による感染症の理解と予防・治療法の研究開発
～若手研究者たちの挑戦～

多分野融合研究

Interdisciplinary Cutting-edge Research

(Research group meeting)

プログラム	4
-------	---

ごあいさつ

神田 忠仁（プログラムスーパーバイザー）	7
----------------------	---

新規培養技術や解析技術、最新の情報を用いて病態の理解をめざす研究（9 課題）

パラミクソウイルス中枢神経感染の分子機構解明と治療法創出に関する研究開発 橋口 隆生（京都大学）	8
---	---

新規培養技術を用いた、扁平腺接合部細胞における高悪性度 HPV 18 型の潜伏持続感染および発癌機構の解明 田口 歩（東京大学）	9
---	---

肺炎球菌感染症において加齢および局所環境要因が重症化に果たす分子機構の解明 山口 雅也（大阪大学）	10
--	----

原子レベルで解明するトキソプラズマ寄生胞膜破壊と病原性因子によるその破綻 山本 雅裕（大阪大学）	11
---	----

病態進展に関与するウイルス叢の性状および進化機構の解明 福原 崇介（北海道大学）	12
---	----

先端的順逆遺伝学手法を用いた SARS-CoV-2 の伝播機構解明 牧野 晶子（京都大学）	13
--	----

液-液相分離を基盤としたインフルエンザウイルス増殖機構の解明 滝沢 直己（公益財団法人微生物化学研究会）	14
---	----

ウイルス蛋白質の非構造領域による液相制御の解明と治療への応用 齊藤 暁（宮崎大学）	15
--	----

細胞生物学的アプローチで高病原性ウイルスの細胞内動態を可視化する研究開発 高松 由基（国立感染症研究所）	16
---	----

病態、免疫応答の理解に情報科学、数理科学を活用する研究（3 課題）

ハイブリッドビックデータに基づいた B 型肝炎患者層別化と最適治療を実現する多分野融合研究基盤の創出 岩見 真吾（九州大学）	17
---	----

抗ウイルス中和抗体誘導の単位ドメインとなるリンパ節局所 B 細胞応答のシグナル幾何学 x 数値流体力学 (CFD) 的解析 山本 浩之（国立感染症研究所）	18
--	----

ウイルス-宿主インタラクトーム解析に基づく抗パラミクソウイルス薬の開発研究 加藤 大志（国立感染症研究所）	19
--	----

ウイルス持続感染症臨床検体のシングルセル解析など（5 課題）

単一細胞解析によるヘルペスウイルス持続感染の分子基盤の解明	20
有井 潤（神戸大学）	
シングルセル免疫動態解析によるHTLV-1感染状態・関連疾患における宿主－病原体相互作用の統合的理解	21
片岡 圭亮（国立がん研究センター）	
多層的シングルセル研究によるHTLV-1関連病態予測サロゲートマーカーの探索とその臨床応用	22
佐藤 賢文（熊本大学）	
EBV 感染・がん化機構解明のための多分野連携研究	23
村田 貴之（藤田医科大学）	
レトロウイルス病原性と持続感染の根源となる不均一な潜伏集団を生み出す宿主エピゲノム特性の解明と治療薬開発	24
山岸 誠（東京大学）	

感染症の予防、治療への臨床応用をめざす研究（4 課題）

グアニン四重鎖構造誘起による（+）ssRNA ウイルス阻害剤の探索研究	25
寺 正行（東京農工大学）	
乳児ボツリヌス症の包括的理解に向けた基礎的・臨床的研究	26
小林 伸英（金沢大学）	
インフルエンザウイルス感染に合併する細菌性肺炎の病態形成機構の解明と新規感染制御法の開発	27
住友 倫子（大阪大学）	
COVID-19関連血栓症のAI血栓識別法の確立と病態解明	28
西川 真子（東京大学）	

新規抗菌薬の開発および病原体の薬剤耐性に関する研究（4 課題）

薬剤耐性菌を殺菌する広宿主域バイオリジクスの開発	29
氣賀恒太郎（自治医科大学）	
革新的天然物創製法に基づく薬剤耐性菌に対する抗菌薬リード化合物の開発	30
浅井 禎吾（東北大学）	
複雑性創出型化学／生物ハイブリッド合成に基づく赤痢アメーバ治療薬創製	31
恒松 雄太（静岡県立大学）	
流行地マラリア原虫株を用いた遺伝学とビッグデータ解析を基盤とした多分野融合研究によるアルテミシニン耐性機構の解明	32
新澤 直明（東京医科歯科大学）	

Day 1

2021年3月8日(月) 9:00-16:25 (各発表25分+質疑応答5分)

9:00-9:05 挨拶

発表順	時間	課題名／研究代表者・所属
新規培養技術や解析技術、最新の情報を用いて病態の理解をめざす研究(9課題)		
1	9:05-9:35	パラミクソウイルス中枢神経感染の分子機構解明と治療法創出に関する研究開発 橋口 隆生(京都大学)
2	9:38-10:08	新規培養技術を用いた、扁平腺接合部細胞における高悪性度HPV18型の潜伏持続感染および発癌機構の解明 田口 歩(東京大学)
3	10:11-10:41	肺炎球菌感染症において加齢および局所環境要因が重症化に果たす分子機構の解明 山口 雅也(大阪大学)
4	10:44-11:14	原子レベルで解明するトキソプラズマ寄生胞膜破壊と病原性因子によるその破綻 山本 雅裕(大阪大学)
5	11:17-11:47	病態進展に関与するウイルス叢の性状および進化機構の解明 福原 崇介(北海道大学)
昼休憩(30分)		
6	12:20-12:50	先端的順逆遺伝学手法を用いたSARS-CoV-2の伝播機構解明 牧野 晶子(京都大学)
7	12:53-13:23	液-液相分離を基盤としたインフルエンザウイルス増殖機構の解明 滝沢 直己(公益財団法人微生物化学研究会)
8	13:26-13:56	ウイルス蛋白質の非構造領域による液相制御の解明と治療への応用 齊藤 暁(宮崎大学)
9	13:59-14:29	細胞生物学的アプローチで高病原性ウイルスの細胞内動態を可視化する研究開発 高松 由基(国立感染症研究所)
休憩(10分)		
病態、免疫応答の理解に情報科学、数理科学を活用する研究(3課題)		
10	14:40-15:10	ハイブリッドビックデータに基づいたB型肝炎患者層別化と最適治療を実現する多分野融合研究基盤の創出 岩見 真吾(九州大学)
11	15:13-15:43	抗ウイルス中和抗体誘導の単位ドメインとなるリンパ節局所B細胞応答のシグナル幾何学 x 数値流体力学(CFD)的解析 山本 浩之(国立感染症研究所)
12	15:46-16:16	ウイルス-宿主インタラクトーム解析に基づく抗パラミクソウイルス薬の開発研究 加藤 大志(国立感染症研究所)

16:16-16:25 挨拶(1日目総括)

Day2

2021年3月9日(火) 9:00-17:00 (各発表25分+質疑応答5分)

9:00-9:05 挨拶

発表順	時間	課題名／研究代表者・所属
ウイルス持続感染症臨床検体のシングルセル解析など（5課題）		
1	9:05-9:35	単一細胞解析によるヘルペスウイルス持続感染の分子基盤の解明 有井 潤（神戸大学）
2	9:38-10:08	シングルセル免疫動態解析による HTLV-1 感染状態・関連疾患における宿主－病原体相互作用の統合的理解 片岡 圭亮（国立がん研究センター）
3	10:11-10:41	多層的シングルセル研究による HTLV-1 関連病態予測サロゲートマーカーの探索とその臨床応用 佐藤 賢文（熊本大学）
4	10:44-11:14	EBV 感染・がん化機構解明のための多分野連携研究 村田 貴之（藤田医科大学）
5	11:17-11:47	レトロウイルス病原性と持続感染の根源となる不均一な潜伏集団を生み出す宿主エピゲノム特性の解明と治療薬開発 山岸 誠（東京大学）

昼休憩（30分）

感染症の予防、治療への臨床応用をめざす研究（4課題）

6	12:20-12:50	グアニン四重鎖構造誘起による（+）ssRNA ウイルス阻害剤の探索研究 寺 正行（東京農工大学）
7	12:53-13:23	乳児ボツリヌス症の包括的理解に向けた基礎的・臨床的研究 小林 伸英（金沢大学）
8	13:26-13:56	インフルエンザウイルス感染に合併する細菌性肺炎の病態形成機構の解明と新規感染制御法の開発 住友 倫子（大阪大学）
9	13:59-14:29	COVID-19 関連血栓症の AI 血栓識別法の確立と病態解明 西川 真子（東京大学）

休憩（10分）

新規抗菌薬の開発および病原体の薬剤耐性に関する研究（4課題）

10	14:40-15:10	薬剤耐性菌を殺菌する広宿主域バイオロジクスの開発 氣賀恒太郎（自治医科大学）
11	15:13-15:43	革新的天然物創製法に基づく薬剤耐性菌に対する抗菌薬リード化合物の開発 浅井 禎吾（東北大学）
12	15:46-16:16	複雑性創出型化学／生物ハイブリッド合成に基づく赤痢アメーバ治療薬創製 恒松 雄太（静岡県立大学）
13	16:19-16:49	流行地マラリア原虫株を用いた遺伝学とビッグデータ解析を基盤とした多分野融合研究によるアルテミシニン耐性機構の解明 新澤 直明（東京医科歯科大学）

16:49-17:00 全体総括、挨拶

※青字は二次公募の課題

多分野融合による感染症研究

プログラムスーパーバイザー

神田 忠仁

我々が免疫を持たない新規病原体が出現し、ヒトからヒトへの高い感染性・伝播性を持つ場合、COVID-19のように瞬く間に世界中に拡散する。感染症はまさに人類共通の脅威である。

感染性微生物、特にウイルスは長い進化の過程で特定の動物を自然宿主とし、病原性を示さずに共存している。動物を自然宿主とするウイルスが稀にヒトに感染・発症しても、患者から他のヒトに感染が拡大することはない。しかし、変異によってヒトへの高い感染性と伝播性を持つと、共存に向けた進化過程を経ていないため、病原性が示される。ウイルスの宿主域を決めている機構や宿主域拡大の分子機構を明らかにすることや、ヒトへの感染性を獲得し拡がって行く過程でどのようなウイルスが選択されるか、などを明らかにする研究が重要である。また、新規の人獣共通感染症の原因となる病原体候補を探索し、ヒトへの感染性を獲得する変異を調べておくこと、汎用性のある安全で効率良いワクチン抗原提示システムの準備も必要である。

一方、原因病原体は古くから明らかにされているが、現在でも有効な治療法がない感染症がある。HTLV-1による白血病やEBV感染症などは長期間にわたる潜伏・持続感染を経て発症する。先天性サイトメガロウイルス感染症やトキソプラズマ症は病原体が胎盤や血液脳関門を通過することで発症する。高齢化で免疫機能が低下すると感染が成立し、重篤化する感染症もある。これらの感染症の予防や治療には、病原体の体内侵入、標的臓器への侵入、ゲノムの複製と子孫の産生、免疫系とのせめぎ合いを経て潜伏・持続感染が成立維持される分子機構、胎盤や血液脳関門のバリア機能の破綻を起こす分子機構、免疫低下時の病原体と個体の相互作用を理解することが必要である。

この研究事業では、感染症の未解決の課題に対し、独自の作業仮説に基づいて臨床検体や動物・細胞モデルの生命指標を最新の技術で定量的に測定し、感染流行の発生と拡大の過程、持続感染やバリアの破綻による病態形成の全貌を理解する研究を支援する。医学や獣医学、薬学、工学、化学、数学などに加え、必要に応じて環境学、経済学、人間行動学などの専門家も交えた多分野連携によって、新たな観点からの研究が進展し、予防や治療につながる成果が期待できる。

パラミクソウイルス中枢神経感染の分子機構解明と治療法創出に関する研究開発

Drug developments based on the study of molecular mechanisms of paramyxovirus infections in the central nervous system



研究開発代表者

橋口 隆生 Takao Hashiguchi

京都大学 ウイルス再生医学研究所 教授

Kyoto University, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Professor

研究開発分担者

酒井 康成 Yasunari Sakai

九州大学 准教授
Kyushu University
Associate professor

黒田 大祐 Daisuke Kuroda

東京大学 講師
The University of Tokyo
Lecturer

渡辺 俊平 Shumpei Watanabe

岡山理科大学 准教授
Okayama University of Science
Associate professor

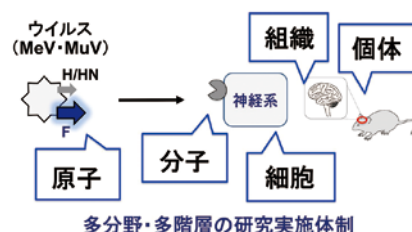
現在、世界的に流行が拡大中の麻疹（はしか）の原因である麻疹ウイルス (MeV) 及び本邦で年間数十万人から百万人を超える感染者が推計される流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）の原因であるムンプスウイルス (MuV) は、共にパラミクソウイルス科に属し、中枢神経系感染を起こすことがある。MeV は低頻度ながら極めて予後不良の亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) や麻疹封入体脳炎を引き起こし、MuV は神経指向性が強く、髄膜炎やムンプス脳炎・難聴といった重篤な合併症を引き起こす。

こうした中枢神経系感染・発症機構の大部分は未解明であるが、我々の研究チームは、MeV については2017-2019年度のJ-PRIDE事業、MuVについては2016-2018年度の新興・再興感染症事業を通じた多分野融合と国際連携による研究で、神経感染が可能な変異 MeV の同定や神経細胞特異的な MuV 糖鎖受容体の同定、神経感染に重要なウイルス蛋白質の構造解明など、両ウイルスの細胞侵入機構に関して分子機構の一部を解明し、小動物モデル構築や阻害剤の同定にも成功した【両事業の業績：PNAS 2報、J Virology 6報等】。現在、両感染症には特異的治療薬は存在せず、対処療法しかない。

そこで、本研究では、J-PRIDE事業で構築した研究チーム（ウイルス学・情報科学・実験動物学の基礎研究チーム）に小児科の臨床研究チームを加え、健常児およびSSPE患児由来iPS細胞を用いた脳オルガノイドの構築・検証とMeV感染時の比較解析、パラミクソウイルス神経感染に必要な宿主因子解析および構造解析、構造情報を活用した阻害剤デザインと合成、脳オルガノイドや小動物モデルを用いた新規阻害剤の効果検証等を行い、多分野融合による多段階の研究推進で、パラミクソウイルス中枢神経感染の詳細な分子機構解明と治療法創出を目的とする（図）。国際連携では、解析技術面を中心に世界5研究機関と協力する。

創薬研究では、化合物・ペプチド・抗体など創薬モダリティ基盤構築を行い、企業が研究成果を活用しやすい環境を整え治療薬開発を促す。感染・発症後にはワクチンでは治療効果はないため、本研究による神経感染機構解明と創薬は国民の健康向上に貢献し、今後出現する可能性がある類縁ウイルスによる将来のパンデミック対策にもつながる。

これまでの進捗として、MeV膜融合（F）蛋白質への網羅的変異導入実験により、F蛋白質構造上の特定の位置に変異が導入され膜融合能が亢進することで神経感染を起こす変異ウイルスが生じることを確認した。また構造情報を活用して、in vitroで効果の高い感染阻害分子をデザインすることにも成功した。



Measles virus (MeV) and mumps virus (MuV), members of the family *Paramyxoviridae*, are important human pathogens causing respiratory and neural infections. Globally, MeV has been causing outbreaks recently and over 200,000 deaths were reported in 2019. MeV usually causes acute measles, but in rare instances induces fatal and intractable neurological diseases such as subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). MuV causes epidemic parotitis, meningitis, encephalitis and deafness. Large outbreak of mumps occurs once every four to five years, and over a million individuals are estimated to be infected every year in Japan. Currently no licensed therapeutic agents are available for both viruses.

Although the mechanisms underlying MeV and MuV infections in the central nervous system (CNS) remain largely unknown, our group, through AMED projects, has successfully 1) revealed that hyperfusogenic MeVs can spread in human neurons and in the brains of small animal models, 2) determined structures of MeV-F, responsible for neuropathogenesis, alone and in complex with inhibitors, and 3) identified MuV glycan receptors expressed on neural cells. As results of this AMED project, we confirmed that mutations at specific positions in the MeV-F protein structure induce the generation of mutant viruses that cause neurological infections. We also succeeded structure-guided molecular designs of effective inhibitors for MeV in vitro.

Keywords 1. Infection mechanisms in the central nervous system 2. Viral encephalitis 3. Brain organoids
4. Modality in drug development 5. Measles virus (MeV) 6. Mumps virus (MuV) 7. Structural analysis
連絡先 橋口隆生 email : takaoh@infront.kyoto-u.ac.jp
研究室情報 URL : <https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab02/>

新規培養技術を用いた、扁平腺接合部細胞における 高悪性度HPV18型の潜伏持続感染および発癌機構の解明

Study of HPV-18 persistent infection and carcinogenesis in the squamocolumnar junction cells using novel culture technologies



研究開発代表者

田口 歩 Ayumi Taguchi

東京大学 産婦人科 助教

The University of Tokyo, Obstetrics and Gynecology, Assistant professor

研究開発分担者

石井 克幸 Yoshitaki Ishii

国立感染症研究所 主任研究官

National Institute of Infectious Diseases
Senior researcher

筆宝 義隆 Yoshitaka Hippo

千葉県がんセンター研究所 部長

Chiba Cancer Center
Director

曾根 献文 Kenbun Sone

東京大学 講師

The University of Tokyo
Lecturer

HPVは子宮頸部の扁平腺接合部（SCJ）基底層の細胞に感染し、持続感染を成立させ、子宮頸癌の原因となると考えられている。子宮頸癌の原因となる高リスクHPVタイプは13種類報告されている。その中でも特にHPV18型は急速な発癌により若年者で多く見られること、前がん病変で検出率が低く予防が困難であること、予後不良の腺癌になりやすいことから、臨床上特に問題となっている。一方で、その急速な発癌機構や組織型分化調整機構は不明であり、これらを解明することは、HPV18型感染の管理法や治療法の確立のため重要である。我々は、子宮頸部SCJからのオルガノイド培養を報告した。また、近年普及してきているiPS細胞技術は、細胞を種々の分化状態に誘導できる特徴をもつ。本研究ではこれらの技術に着目して、HPV18型の感染成立機構、発癌機構、分化調整機構を解明することを目的とし、以下の3つのプロジェクトを遂行中である。

① SCJオルガノイド培養の安定化とHPV感染検体のオルガノイド培養の樹立

SCJオルガノイド培養の安定化を行うとともに、HPV感染子宮頸部腫瘍のオルガノイド培養を試みた。子宮頸癌検体10症例を用いてオルガノイド培養を行い、HPV18型陽性症例1症例と、HPV16型陽性症例2症例のオルガノイド培養を樹立し、特にHPV16陽性の一症例では半年にわたり継代が可能であることを確認した。

② HPV18型標的細胞の探索

先行研究で、未分化細胞において、HPV18型はHPV16型に比較して、初期遺伝子発現が高く、HPV維持効率が高いことを報告した。その責任因子を探るため、HPV16/HPV18キメラ初期プロモーター領域(LCR)を作成することで、HPV18型の初期遺伝子発現に不可欠なシス領域を同定した。

HPVはSCJの基底層の幹細胞様細胞に感染を成立させると考えられているが、その標的細胞は未だ特定されていない。HPV18型標的細胞を同定するため、HPV18-LCR活性を持つ細胞でGFP蛋白を発現するHPV18-LCRレンチウイルスを作成した。この系を用いて、SCJオルガノイドに導入しHPV18-LCR活性を認める細胞の単離single cell解析を行うとともに、iPS細胞に導入し種々の分化条件でHPV18-LCR活性化（GFP蛋白の発現）を評価する予定である。

③ 臨床検体を用いた解析

HPV18型の分化調整機構や発癌機構を解明するためには、個体間の相違を排除することが重要である。このため、同一症例内に複数の組織型が混在する症例を対象に、それぞれの組織型部位をマイクロダイセクションで回収し、網羅的RNA解析を行った。その結果、組織型毎にヒト遺伝子発現パターンが異なり、その発現パターンは各組織型の特徴を反映していた。一方、ウイルス由来遺伝子発現の解析では、同一症例内でも組織型毎に異なる遺伝子産物が産生されていることがわかった。本検討より、腫瘍内組織不均一性の解析をすることで、HPV18型由来の混合癌は、その発癌の第一段階であるHPV18型由来遺伝子産物が異なることがわかり、発癌の極早期の段階で、異なるクローンによる発癌を呈している可能性が考えられた。

Abstract:

Human papillomavirus (HPV), a primary cause of cervical cancer, infects to the basal cells of squamo-columnar junction (SCJ) of the uterine cervix. Among thirteen high-risk HPVs, HPV18 has peculiar characteristics such as young-aged carcinogenesis, difficulty of detecting in the precancerous state, and highly frequency of adenocarcinoma. These peculiar characteristics of HPV18 make its management difficult. In addition, most of the mechanisms have not yet been elucidated.

With the aim of elucidating (a) establishment of persistent HPV18 infection, (b) its rapid carcinogenesis, and (c) its regulation of histodifferentiation, we are currently carrying out following three projects.

1. Establishment of the SCJ organoid model as well as the organoid culture model of HPV-infected clinical samples.
2. Identification of HPV18-target cells by developing experimental assays to assess activities of HPV18-long control region (LCR)
3. Analyses of HPV18-infected clinical samples with multiple histological types

Keywords Human papillomavirus (HPV) 18, organoid culture, tumor heterogeneity

連絡先 田口歩 email : ayttaguchi-ky@umin.ac.jp

研究室情報 URL : <http://plaza.umin.ac.jp/kyobgyn/recruit/>

肺炎球菌感染症において加齢および局所環境要因が重症化に果たす分子機構の解明

Investigation of the role of host aging and local environment in invasive pneumococcal disease



研究開発代表者

山口 雅也 Masaya Yamaguchi

大阪大学 大学院歯学研究科 講師

Osaka University, Graduate School of Dentistry, Associate Professor

研究開発分担者

奥崎 大介 Daisuke Okuzaki

大阪大学 特任准教授 (常勤)

Osaka University Specially Appointed Associate Professor (Full Time)

川西 邦夫 Kunio Kawanishi

筑波大学 助教

Tsukuba University Assistant Professor

内藤 裕子 Yuko Naito-Matsui

藤田医科大学 講師

Fujita Health University Senior Assistant Professor

解決をめざす感染症の課題・研究戦略と多分野研究者の役割分担、連携

肺炎球菌は、肺炎や敗血症、細菌性髄膜炎の主たる原因菌であり、薬剤耐性化が世界的な問題となっている。本研究では、侵襲性肺炎球菌感染症発症の機構を解明するため、病原細菌のみに着目するのではなく、宿主の加齢が引き起こす免疫応答の変化、感染局所の細菌叢構造による病態への影響、細菌側が利用する栄養の変化に基づく病原因子発現の変化といった要因について、細菌学 (山口、川端)、病理学 (川西)、糖鎖生物学 (内藤、川西)、次世代シーケンス解析 (奥崎)、臨床医学 (明田、濱口) の各分野の専門家の異分野連携によって解明を試みる。

本研究では、宿主の加齢が感染に及ぼす影響を解明するため、若齢マウスおよび老齢マウスを使った感染試験を行う。また、肺炎球菌は血中ではグルコースを利用し、肺などのグルコースが少ない環境では、自身の糖鎖分解酵素によりシアル酸やガラクトースを炭素源として利用する。そこで、糖鎖分解酵素が肺炎球菌の病原性発揮に寄与する機構を解明するとともに、宿主の糖鎖が感染時の炎症制御に果たす役割について遺伝子欠失マウスを用いて解明する。さらに、肺炎球菌は細菌叢を自身の遺伝子リザーバーとして利用している可能性が示されているため、細菌叢が持つ遺伝子群も併せて解析する。得られた成果を創薬につなげるため、核酸医薬や低分子化合物を用いた感染制御の可能性を検索する。

本研究計画は、肺炎球菌感染症の新規予防法・治療法開発の基盤となるとともに、他の感染症や炎症性疾患の制御に繋がる。また、複数分野の専門家が連携した解明手法は、今後の新たに生じる感染症を解明するための次代の研究体制の確立につながりうるものである。

研究分担者：川端 重忠 (大阪大学 教授)

明田 幸宏 (大阪大学 講師)

濱口 重人 (大阪大学 特任助教)

研究の進捗状況

研究計画の遂行を通じて、肺炎球菌の糖鎖分解酵素の一つである BgaA が血液感染時の病原因子として働くことを明らかにした。また、分子進化解析と BgaA の立体構造を統合した結果、活性部位の変異が進化的に許容されていないことが示された (Yamaguchi M. *et al. Front. Microbiol.* 2020)。現在、BgaA が病態形成に果たす役割について解析を進めている。

さらに、第一回班会議での指摘を踏まえ、肺炎球菌の大規模ゲノム解析を行うべくゲノム情報の収集と解析環境の構築を進めている。また、これまで報告がなかったミャンマーにおける肺炎球菌の臨床分離株を収集し、ゲノム配列の決定と系統解析ならびにパンゲノム解析を行った (Yamaguchi M. *et al. Microb. Genomics, in press.*)。

加齢や感染局所の微生物叢構造、宿主の糖鎖が感染に及ぼす影響についても解析を進めており、これらの解析結果を統合することで肺炎球菌感染症の重症化について多面的な理解を目指す。

Streptococcus pneumoniae, a major cause of pneumonia, sepsis, and meningitis. In this project, we focus on the effect of host aging on immune system, microbiome, and host local environment such as carbon source variety in pneumococcal infection. To investigate the complex problem, we team up with professional pathologist, glycobiologist, next generation sequencing scientist, and clinical physician.

In this project, to investigate the role of aging in the infection, we perform mouse infection assay using young and aged mice. *S. pneumoniae* utilizes glucose as a carbon source in blood, while the pathogen utilizes sialic acid and/or galactose in glucose-poor environment such as lung. Thus, we try to clarify the role of pneumococcal glycosidases and host glycan in the infection and immunity using gene knock out mice. Since *S. pneumoniae* has high capacity to import genes and could use host microbiome as a genetic reservoir, we analyze host microbiome. To verify a possibility of novel infection control strategy, we perform mouse infection assay using oligonucleotide therapeutics and low molecular weight chemicals.

It can be the basis for drug development to identify the underlying mechanism how host aging, microbiome and glycans affect pneumococcal infection. In addition, the collaboration of several professional scientists with microbiologists could be useful to establish next-generation infection research strategy.

Keywords *Streptococcus pneumoniae*, Aging, Glycobiology

連絡先 山口雅也 email : yamaguchi@dent.osaka-u.ac.jp

研究室情報 URL : <https://web.dent.osaka-u.ac.jp/mcrbio/>

原子レベルで解明するトキソプラズマ寄生胞膜破壊と病原性因子によるその破綻

Atomic-level elucidation of host defense to disrupt Toxoplasma-containing vacuole disruption and of the parasite counterdefense mechanism



研究開発代表者

山本 雅裕 Masahiro Yamamoto

大阪大学 微生物病研究所 教授

Osaka University, Research Institute for Microbial Diseases, Professor

研究開発分担者

仁田 亮 Ryo Nitta

神戸大学 教授
Kobe University
Professor

竹居 孝二 Kohji Takei

岡山大学 教授
Okayama University
Professor

スタンドレー ダロン Daron M. Standley

大阪大学 教授
Osaka University
Professor

トキソプラズマは未だに我が国において免疫不全患者で致死性の後天性トキソプラズマ症を引き起こし、また新生児や胎児に重篤な先天性の障害を誘発する病原性原虫である。トキソプラズマやマラリア原虫などの胞子虫類原虫は人類にとって重大な原虫症を引き起こす病原体を数多く含むが、感染後に宿主の免疫を逃れ慢性感染し、長期にわたって潜伏することがその理由の一つである。トキソプラズマやマラリア原虫などの胞子虫類原虫は感染宿主細胞内で寄生胞と呼ばれる膜構造体の中でのみ増殖する。慢性・潜伏感染するこれらの原虫を感染細胞内から排除するためには、宿主の細胞自律的免疫系がこの寄生胞膜を打ち破り原虫を殺傷する必要がある。山本は以前にインターフェロン(IFN)誘導性GTPaseであるGBPがトキソプラズマの感染細胞内での殺傷に重要であることを示し、さらに新規のIFN誘導性GTPaseであるIRGB6はトキソプラズマ感染細胞で最初に寄生胞を破壊し原虫を殺傷し、個体レベルで生体防御応答を担う重要な宿主因子であることが分かったが、一方、IRGB6が寄生胞膜を破壊する分子メカニズムの詳細については全く不明であり、「寄生胞膜破壊」の本質的理解のためのさらなる解析が必要である。このために本研究ではIRGB6はアミノ酸レベルで、エンドサイトーシス時の細胞膜の膜変形と破断に重要なGTPaseであるダイナミンに似ていることに着目し、ダイナミンの生化学の専門家である竹居と、構造生物学の専門家である仁田、そして、生物情報学の専門家であるDaron M. Standleyと共同研究を行いIRGB6の膜認識部位の試験管内、構造生物学的、そして、生物情報学的解析を行っている。今年度は、IRGB6の構造解析、特に、寄生胞膜認識部位(277-286のループ)が重要であることが分かった構造生物学的解析の結果を示す。その結果、他の領域と相互作用をして寄生胞膜認識部位の構造を安定化させる構造も見えてきたことから、原子レベルでの寄生胞膜認識機構の解明が一步進んだ。また、IRGB6に結合する分子であるPVM2を新たに同定した。PVM2欠損マウスはトキソプラズマ感染に高感受性を示すことから、今後はPVM2のIRGB6依存的な抗トキソプラズマ免疫応答における役割を検討する予定である。

Parasitic protozoa such as Toxoplasma and Plasmodium contain many pathogens that cause serious protozoa for humans, and one of the reasons is that they escape the immunity of the host after infection and become chronically infected and remain latent for a long period of time. Parasitic protozoans such as Toxoplasma gondii and Plasmodium malaria grow only in membrane structures called parasitophorous vacuole (PV) within the infected host cell. In order to eliminate these chronically and latently infected protozoans from the infected cells, the host's intracellular immune system must break through PV membrane (PVM) and kill the protozoans. We have shown that the novel IFN-induced GTPase IRGB6 is responsible for the defense response by destroying protozoans, but the details of the molecular mechanism by which IRGB6 destroys the PVM are completely unknown. This year, we show the results of structural analysis of IRGB6, especially structural biological analysis in which the PVM recognition site (277-286 loop) was found to be important. As a result, a structure that stabilizes the structure of the PVM recognition site by interacting with other regions has been revealed, and the elucidation of the parasite membrane recognition mechanism at the atomic level has proceeded. Moreover, we also newly identified PVM2, a molecule that binds to IRGB6. Since PVM2-deficient mice are highly susceptible to Toxoplasma gondii infection, we plan to investigate the role of PVM2 in the IRGB6-dependent anti-Toxoplasma immune response.

Keywords Toxoplasma gondii, IRGB6, Parasitophorous vacuole
連絡先 山本雅裕 email : myamamoto@biken.osaka-u.ac.jp
研究室情報 URL : <http://immpara.biken.osaka-u.ac.jp/>

病態進展に関与するウイルス叢の性状および進化機構の解明

Elucidation of properties and evolutionary mechanisms of virome involved in progression of pathogenesis



研究開発代表者

福原 崇介 Takasuke Fukuhara

北海道大学 医学研究院 教授

Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Professor

研究開発分担者

中村 昇太 Shota Nakamura

大阪大学 准教授
Osaka University
Associate Professor

吉住 朋晴 Tomoharu Yoshizumi

九州大学 准教授
Kyushu University
Associate Professor

浦山 俊一 Shyunichi Urayama

筑波大学 助教
Tsukuba University
Assistant Professor

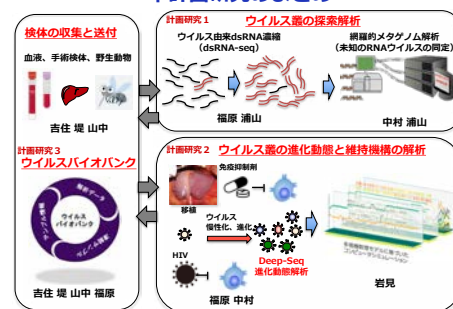
近年、様々な病態とウイルス感染の関連が解析され、癌や肝炎のみならず、糖尿病、腎疾患、Celiac病の発症に、RNAウイルス感染の関与が示唆され、ワクチンや抗ウイルス薬によって病態が改善できる可能性が相次いで報告されている。さらに、次世代シーケンサーによる網羅的解析の進展により、未同定のウイルスがヒトに多数感染し、ウイルス叢が形成されている可能性が示唆されている。このことは、内的要因だけではなく、ウイルスのような外的要因が病気の発症や進展に影響している可能性を示唆している。

申請者らはこれまでの研究班にて、高等動物の組織からRNAウイルスを効率的に探索する手法を確立した（特許出願準備中）。この手法を用いることでRNAウイルスの検出感度は1000倍以上向上し、これまで不可能であったRNAウイルスの網羅的探索が可能になった。今回の検討では、免疫応答とウイルス暴露のバランスが破綻したサンプルおよび動物サンプルを多検体解析することによって、病態に関与するウイルスの同定に繋げることができると考えている。さらに、経時的サンプルを用いてウイルス叢を構成するウイルスのゲノム配列をDeeq Sequenceで詳細に解析することで、進化動態の解明を行う。その結果をベースに擬似配列を用いた数理シミュレーションを行い、環境の変化に伴うウイルス叢の進化と維持への影響を明らかにする。以上の検討により、免疫とウイルス感染のバランスが破綻することによってどのようなウイルス叢が形成され、どのように進化し、維持されるかを解明することを目指す。（画像1）

これまでに、人の肝臓組織から2種類の既知のウイルスと3種類の新規ウイルス候補が、マウスの肝臓組織から既知の2種のウイルスが、ダニの成虫から4種類の新規ウイルス候補が同定されている。現在、これらのウイルスの全配列決定を試みている。また、人の肺や大腸、HIV患者の血液、カンクイザルの肝臓を用いた解析の準備を進めている。さらに、同定されたウイルスゲノム配列およびウイルス様ゲノム配列を載せたデータベースである「Replicating RNA virus genome database」の構築の準備を開始した。

本研究を推進することによって、病態に関連するウイルスを同定することにより、病態進展を抑制するためのウイルス排除という新たな治療戦略を考えることができる。さらに、これまでに確立したRNAウイルスを含むウイルス叢の探索技術（特許出願中）の実績を作ることで、本システムを広く周知しdsRNA-seqを用いることで、様々な分野でウイルス叢と病態の関与を検討する意義を明らかにできる。本会議では、得られた研究成果を中心に発表する。

本計画研究のまとめ



In recent years, many reports have shown the relationship between various disease states and viral infection. RNA virus infection is involved in the development of not only cancer and hepatitis but also diabetes, kidney disease, and Celiac disease, indicating that vaccines and antiviral drugs improve pathological progression of these diseases. Furthermore, with the progress of comprehensive analysis by next-generation sequencers, it has been suggested that virome may be composed of many unidentified or well-known viruses. There is a high possibility that properties of virome is involved in the occurrence or severity of diseases. We have established a novel method for efficiently searching for RNA viruses in animal tissues. By using this method, the detection sensitivity of RNA virus has been improved 1000 times or more, and comprehensive search for RNA virus, which was impossible until now, has become possible.

To date, known viruses and three new virus candidates from liver tissue of people, two known viruses from mouse liver tissue, four new virus candidates from adult mites were identified. Now, we are trying to determine the sequence. In addition, we are preparing for analysis using human lung and colon, HIV patients' blood and monkey's liver. Furthermore, we have started preparations for the construction of the "Replicating RNA virus genome database", which is a database containing the sequence data of viral genome and virus-like genome.

Keywords 1. Virome 2. Quasispecies 3. Virus evolution dynamics 4. Pathological progression
連絡先 福原崇介 email: fukut@pop.med.hokudai.ac.jp
研究室情報 URL: https://biseibutsu.med.hokudai.ac.jp/

先端的順逆遺伝学手法を用いた SARS-CoV-2 の伝播機構解明

Elucidation of SARS-CoV-2 transmission mechanism using advanced forward and reverse genetics



研究開発代表者

牧野 晶子 Akiko Makino

京都大学 ウイルス再生研 助教

Kyoto University, Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Assistant Professor

研究開発分担者

遊佐 宏介 Kosuke Yusa

京都大学 教授

Kyoto University, Professor

末次 正幸 Masayuki Suetsugu

立教大学 教授

Rikkyo University, Professor

解決をめぐる感染症の課題：2019年12月に発生した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の急速な拡大は、社会・経済活動の世界的混乱を招いており、同感染症への対策は喫緊の課題となっている。COVID-19の病原体であるSARS-CoV-2は、SARS-CoVと比較して致死率は低いものの、感染拡大の速さはSARSを上回っており、ヒト-ヒト間伝播効率が低いことが予測されている。そこで本研究は、ヒト-ヒト間伝播に重要な上気道におけるSARS-CoV-2の増殖性と伝播メカニズムを解明することで、SARS-CoV-2の複製制御とCOVID-19の拡大抑制をおこなうことを目的とする。研究戦略とそれを具体化するための多分野研究者の役割分担、連携：本研究では、先端的な研究手法を有する多分野の研究者を介することで、宿主およびウイルス側の両側面より順遺伝学と逆遺伝学の融合的アプローチをおこなう。宿主側からは、京都大学の遊佐らとともにCRISPR-Cas9システムによりヒトのゲノムに約2万個ある遺伝子を標的としたgRNAライブラリを用いて各遺伝子をノックアウトし、上気道におけるSARS-CoV-2の増殖に関わる宿主因子を探索する。スクリーニングで発見した遺伝子について、同ウイルスが増殖に宿主因子を利用するメカニズムを明らかにする。ウイルス側からは、立教大学の末次らとともにDNA断片から大腸菌を用いることなくシームレスに連結して環状DNAを増幅する技術を用いて、任意の配列を持つSARS-CoV-2のゲノムRNAを発現する環状DNAを簡便かつ迅速に作製する。SARS-CoV-2は動物に由来すると考えられており、コウモリからSARS-CoV-2に最も近縁のウイルス（RaTG13）が同定され、センザンコウからは両ウイルスに最も近い共通祖先ウイルス（Pangolin CoV）が検出されている。本研究では、動物のウイルスとSARS-CoV-2のキメラウイルスを作製して比較することで、ヒト上気道での増殖性に重要な遺伝子配列を同定する。研究の進捗状況：長鎖環状DNAを試験管内で連結、増幅することで、人工的にSARS-CoV-2を合成することに成功した。しかしながら作製された組換えウイルスには変異が導入されていたため、大腸菌でのクローニングと組み合わせることで改良をおこなっている。ヒトACE2安定過剰発現A549細胞を用いてSARS-CoV-2感染による細胞死を指標としてCRISPR-Cas9システムのgRNAライブラリスクリーニングをおこなったところ、ACE2を含む宿主因子が同定された。統計的に上位にあった遺伝子群についてノックアウト細胞を作出してウイルス動態への影響を評価している。ここまでの研究により、新たなウイルスの人工合成法が確立され、またSARS-CoV-2の増殖に関与する新規の候補因子が同定された。さらに研究を進めることで、SARS-CoV-2の複製と伝播機構の一端を解明できると考えている。

In this study, through a multidisciplinary researcher who has advanced research methods, a fusion approach of forward genetics and reverse genetics is performed from both the host and virus side. By knockout of about 20,000 genes in the human genome using the CRISPR-Cas9 system, host factors involved in SARS-CoV-2 growth in the upper respiratory tract will be identified. From the virus side, using a technology to amplify circular DNA by seamlessly docking DNA fragments without using Escherichia coli, a circular DNA that expresses the genomic RNA of SARS-CoV-2 can be easily and rapidly obtained. SARS-CoV-2 is thought to be of animal origin, and the virus closest to SARS-CoV-2 (RaTG13) in bats and the common ancestor virus (Pangolin CoV) closest to both viruses from pangolin have been detected. In this study, we will generate chimeric SARS-CoV-2 viruses with animal viruses to identify gene sequences that are important for growth in the human upper respiratory tract.

Keywords SARS-CoV-2, Virus transmission, Reverse genetics, CRISPR-Cas9

連絡先 牧野晶子 email : makino@infront.kyoto-u.ac.jp

研究室情報 URL : <https://t.rnavirus.virus.kyoto-u.ac.jp/>

液-液相分離を基盤としたインフルエンザウイルス増殖機構の解明

Elucidating the regulatory mechanism of influenza virus propagation by liquid-liquid phase separation



研究開発代表者

滝沢 直己 Naoki Takizawa

微生物化学研究所 第3生物活性研究部 上級研究員

Institute of Microbial Chemistry, Department of Virology, Researcher

研究開発分担者

野田 展生 Nobuo Noda

微生物化学研究所 部長

Institute of Microbial Chemistry, Laboratory head

熊谷 直哉 Naoya Kumagai

微生物化学研究所 主席研究員

Institute of Microbial Chemistry, Chief researcher

背景、目的

細胞内には脂質膜による区分なしでタンパク質やRNAが濃縮された膜のないオルガネラが存在するが、タンパク質などが液体の性質を残した状態で凝集し液滴形成を行う液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) がそれらの形成機構である事が近年明らかとなった。ウイルス感染においてもウイルスタンパク質の液滴形成がウイルス増殖を正に制御する機構が明らかにされ始めている。インフルエンザウイルスにおいてはウイルスゲノム-タンパク質複合体 (vRNP) が細胞質において液滴を形成するという報告があり、分節化したゲノムRNAが集合する場である考えられているが、vRNP液滴形成の意義は解明されていない。本研究ではウイルスRNAやウイルスタンパク質が液滴形成を行う意義について解明し、新規作用機序の抗ウイルス薬開発に繋げることを目的とする。

他分野研究者の役割分担、連携

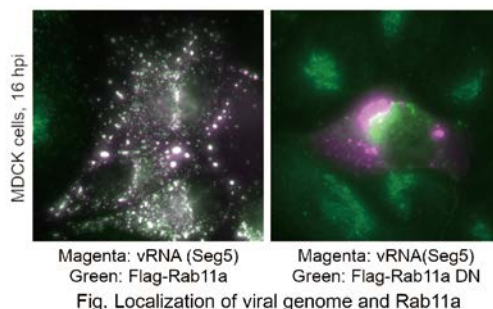
本研究では構造生物学を背景に持ちLLPSの役割解明で研究実績のある研究者と連携することで、高速AFMやcryo-EMを利用した解析も行い、ウイルスRNA-タンパク質複合体の液滴形成機構について明らかとする。また、プローブ、阻害剤開発のために有機化学の研究者と連携して機能解析を行うことで、将来的な抗ウイルス薬開発時にその知見を活かし円滑に開発を進めることができると期待される。

研究の進捗状況

ウイルスゲノム合成量が減少する変異インフルエンザウイルス感染細胞においてはvRNP液滴が小さくなり、vRNP量依存的に液滴形成が行われる事が示唆された。vRNPは小胞輸送に参与するタンパク質であるRab11aと共局在することが報告されているが、ドミナントネガティブなRab11a (Rab11DN) 発現細胞においてvRNPはRab11DNと共局在せず細胞内で異常凝集することを明らかにした(図)。これらの結果を元に、Rab11DN発現細胞内におけるvRNP間の網羅的相互作用同定系の構築を現在行っている。

vRNP構成タンパク質であるNPのN末部分をGFPに融合した組換えタンパク質は試験管内で液滴を形成した。現在、細胞内でのvRNP

液滴形成条件を参考に、人工リボソーム-Rab11a複合体を調製し、その複合体上でのvRNP液滴形成の条件検討を行っている。また、試験管内においてタンパク質のLLPSを促進、阻害する化合物をそれぞれ見出した。



Membrane-less organelles such as P granules assemble through the condensation of various proteins and RNAs into liquid droplets. This process is known as liquid-liquid phase separation (LLPS). LLPS yields malleable and dynamic liquid-like structures that facilitate various biological functions. Viral genome RNA with nucleoprotein (NP) and polymerases (viral ribonucleoprotein: vRNP) forms liquid droplets in influenza virus infected cells. However, the role of the liquid droplets is not well known. To reveal this, we utilize in vitro and in vivo analysis and chemical biological approach.

By using recombinant virus containing mutations that affect viral RNA synthesis, we revealed that formation and size of vRNP lipid droplet depended on the amount of vRNP. It has been reported that vRNP is co-localized with Rab11a which is associated with secretory pathways. We also revealed that vRNP was not co-localized with dominant negative form of Rab11a (Rab11DN) and formed large aggregate in cells expressing Rab11DN. We now try to determine the conditions for making vRNP LLPS in vitro and to identify global intersegment interactions in wild type and Rab11 DN expressing cells. In addition, we found compounds that inhibit or facilitate LLPS in vitro system. We plan to synthesize derivatives these compounds.

Keywords influenza virus; liquid-liquid phase separation; RNA-protein complex; segment assembly

連絡先 滝沢直己 email : takizawan@bikaken.or.jp

研究室情報 URL : <https://www.bikaken.or.jp/laboratories/virology/summary.html>

ウイルス蛋白質の非構造領域による液相制御の解明と治療への応用

Dissection of host liquid-phase as a target for antiviral therapy and vaccine development



研究開発代表者

齊藤 暁 Akatsuki Saito

宮崎大学農学部獣医学科 准教授

University of Miyazaki, Associate Professor

研究開発分担者

岡本 徹 Toru Okamoto

大阪大学微生物病研究所 教授
Osaka University, Professor

吉村 成弘 Shige H. Yoshimura

京都大学大学院生命科学研究科 准教授
Kyoto University, Associate Professor

解決を目指す感染症の課題

本研究開発課題では、フラビウイルスのコア蛋白質およびその他のウイルス蛋白質を対象とし、液相分離現象を利用したウイルス生存戦略の基盤原理を明らかにする。具体的には、以下の作業仮説を検証することで、液相分離を基軸としたウイルス戦略に関する新しい知見に基づき、抗ウイルス薬や弱毒性ワクチンを開発し、国内流入が危惧されるデング熱を代表とする熱帯病への対策に繋げる成果を得ることを目的とする。

- ・宿主内での新たな液相形成による宿主免疫システムからの回避・潜伏
- ・宿主細胞内の非膜液相小器官の構造・機能破綻による宿主機能の制御（乗っ取り）
- ・液相を利用した複製・梱包の効率化と増殖促進

研究戦略とそれを具体化するための多分野研究者の役割分担、連携

本研究課題では、ウイルス学を専門とする齊藤を中心に、細胞生物学を専門とする岡本、生物物理学を専門とする吉村の3チームが連携して異分野融合研究の遂行にあたる。

研究の進捗状況

これまでに、日本脳炎ウイルスのコア蛋白質が、細胞内非膜液相小器官である核小体に局在することに着目し、以下の2つの重要な結論を得た。

- ① コア蛋白質は、B23等の核小体蛋白質と同様、核内で「液-液相分離状態」にある。
- ② コア蛋白質は、Crm1依存的に核外に輸送され、細胞質で顆粒状構造を形成する。

具体的成果を以下に記す。I) 光刺激型蛍光タンパク質 (PA-GFP) を融合させたコア蛋白質を培養細胞内に発現させ、核小体に局在するフラクシオンに対して光刺激をおこなった後の局在変化をタイムラプスで観察した。その結果、コア蛋白質は、核小体と核質との間を1分程度の時定数で移動しており、いわゆる液相に近い挙動をしめすこと、また、核小体の構成タンパク質であるB23も液相の性質を示すが、その流動性はコア蛋白質と異なること、を示すことに成功した。II) 核小体を崩壊させる阻害剤を培養細胞に添加すると、コア蛋白質も核質に離散するが、阻害剤を除くと、核小体の再構成とともにコア蛋白質も核小体に局在する。よって、核小体内のコア蛋白質は、可逆的な動的平衡状態にある。III) 核小体に局在していたコア蛋白質は、エクスポーティン依存的に核外に輸送され、約30分程度で細胞質内の顆粒状の構造に局在する。しかし、B23は核内にとどまったままである。IV) 精製したコア蛋白質とB23を用いて試験管内で液相分離アッセイをおこなうと、コア蛋白質はそれ自体では液滴を形成（液相分離）しないが、B23が作る液滴には共局在する。以上の結果からは、コア蛋白質が、B23等が作る液相器官である核小体に局在し、その後、細胞質に輸送された後に顆粒状の構造体を形成するという特異な動きが見えてくる。現在、コア蛋白質が、何らかの核小体の構成要素とともに細胞質に移動しているかを検証中である。

In this project, we aim to clarify the impact of non-structured domain of viral proteins of flavivirus on formation and function of RNP bodies by focusing on their characteristics of liquid-liquid phase separation (LLPS). We will examine how viral proteins control and hijack intracellular membrane-less organelle formed by LLPS in the host cell. Since core protein is localized at stress granules and nucleolus, we will evaluate the effect of core protein on ribosomal biogenesis and formation of liquid-phases. We also aim to generate recombinant flaviviruses with mutations in non-structured domains of viral proteins to test their replication and pathogenesis in vivo, and examine the effects of our compounds on formation of liquid-phase. Since our candidate compounds targeting liquid phases strongly suppress flaviviruses propagation, we believe that liquid phases are promising target for drug development.

So far, we obtained the following achievements. i) Core protein of Japanese encephalitis virus (JEV), which mainly localizes in nucleolus, exhibited liquid-like behavior within the nucleus. ii) JEV Core protein is exported to cytoplasm by Crm1-dependent pathway and form granules in the cytoplasm, but does not carry nucleolar proteins such as B23. iii) Purified JEV core protein did not show LLPS by itself, but preferably co-localized in the liquid droplet formed by nucleolar protein B23 in vitro.

Keywords Flavivirus, Liquid-liquid phase separation, Disordered protein, Pathogenicity, Attenuated vaccine, Antivirals, Insect cells, Innate immunity

連絡先 齊藤暁 email : sakatsuki@cc.miyazaki-u.ac.jp

研究室情報 URL : https://srhumdb.miyazaki-u.ac.jp/html/100002260_ja.html

細胞生物学的アプローチで高病原性ウイルスの細胞内動態を可視化する研究開発

Revealing intracellular dynamics of highly pathogenic viruses by using cellular biological approach



研究開発代表者

高松 由基 Yuki Takamatsu

国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官

National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology I, Senior Researcher

研究開発分担者

野田 岳志 Takeshi Noda

京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授
Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University, Professor

加藤 輝 Kagayaki Kato

自然科学研究機構 特任助教
National Institutes of Natural Sciences
Assistant Professor

【本研究の背景と目的、解決を目指す感染症の課題】

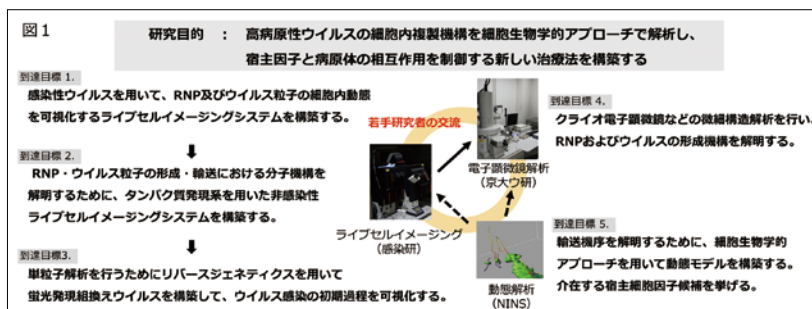
新興感染症を引き起こす病原体は、時にローカルな、時にグローバルなアウトブレイクの原因となる。前者の具体例として、アジア地域で重要な重症熱性血小板減少症は、2013年に本邦で報告されて以降、継続的に患者が発生しており、その致死率は30%に及ぶ。また後者については、現在最も深刻な公衆衛生上の脅威である新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が挙げられる。これらの病原体に対するワクチンおよび治療法の研究が急展開で進められている一方で、ウイルス学的な基礎研究はほとんど進んでいない。したがって新興感染症を引き起こす病原体の細胞内複製機構については、不明な点が数多く存在する。そこで我々はライブセルイメージングシステムを構築し、高病原性ウイルスの細胞内動態を宿主因子も含めて可視化したいと考えた。本研究の目的は、ウイルスと宿主因子の相互作用を解明し、ウイルス・RNPの形成及び輸送を制御する新たな作用機序の治療薬開発に貢献することである。

【研究戦略とそれを具体化するための多分野研究者の役割分担、連携】

申請者は前駆研究で、ウイルスタンパク質複合体の細胞内での形成過程・輸送経路を視覚化するライブセルイメージングシステムを構築し、RNAウイルスの細胞内動態を描出することに成功した。本研究では、このシステムを重症熱性血小板減少症候群ウイルス、新型コロナウイルスなどの高病原性ウイルスに応用する。その細胞内動態を解明するために、細胞内小器官(オルガネラ)の輸送パターンをモデルとして、介在する宿主因子の候補を推定するアプローチを試みたい。この過程で精製するウイルス検体を、クライオ電子顕微鏡をはじめとする微細構造解析に供することで、ウイルスRNPの形成機構、ウイルスゲノムの複製機構の解明につなげたい(役割分担・連携については、図1を参照)。

【研究の進捗状況】

本研究では、五つの到達目標を定めている(図1)。現在の進捗状況であるが、到達目標1と2の準備を完了した段階である。具体的には、タンパク質発現系を構築し、ライブセルイメージングデータの取得を開始した。さらに本研究資金のおかげで、BSL-3に高解像度ライブセルイメージング顕微鏡を導入することができ、感染細胞におけるウイルスタンパク質の挙動についても観察することが可能になった。今回の班会議では、本研究の背景と発想について詳細に説明し、取得したデータの一部を紹介すると共に、初期解析の結果を報告させて頂く。



Emerging infectious pathogens often cause local and global outbreaks. The former, Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: SFTSV is important in Asia. The latter, SARS-CoV2 is currently the most serious public health concern. While research on vaccines and therapies for these pathogens is proceeding rapidly, basic virological research has been not yet enough to understand their lifecycle. Therefore, we aimed to visualize the life cycle of highly pathogenic viruses in infected cells and reveal the molecular mechanisms of their intracellular dynamics to develop novel therapeutic approaches. We have previously constructed a live-cell imaging system to visualize assembly and transport of filovirus viral protein complexes (Takamatsu, et al. PNAS, 2018, Takamatsu, et al. J. Virol. 2020). In the current study, we apply this system to the other highly pathogenic viruses, such as SFTSV and SARS-CoV2. In order to elucidate the intracellular dynamics of these viruses, we would like to apply organelles as a model of host cellular protein candidate which mediate viral and host cellular transport machinery. The viral specimens are purified in these processes, will be used for cryo-electron microscopy to elucidate the mechanism of viral RNP assembly and transport. The roles of our group researchers are described in Figure 1.

Keywords Live cell imaging, SFTSV, SARS-CoV2, highly pathogenic viruses, intracellular dynamics, RNP assembly, RNP transport, organelle, cytoskeleton, electron microscopy, bio-image analysis
連絡先 高松由基 email: yukiti@nih.go.jp
研究室情報 URL: <https://www.niid.go.jp/niid/ja/vir1.html>

ハイブリッドビックデータに基づいたB型肝炎患者層別化と最適治療を実現する多分野融合研究基盤の創出

Interdisciplinary study for grouping HBV patients and finding an optimal drug strategy based on “Hybrid” big data



研究開発代表者

岩見 真吾 Shingo Iwami

九州大学 大学院理学研究院生物科学部門 准教授

Kyushu university, Department of Biology, Associate Professor

研究開発分担者

渡士 幸一 Koichi Watashi

国立感染症研究所 主任研究官
National Institute of Infectious Diseases
Senior Researcher

林 佐奈衣 Sanae Hayashi

熊本大学 特任助教
Kumamoto University
Project Assistant Professor

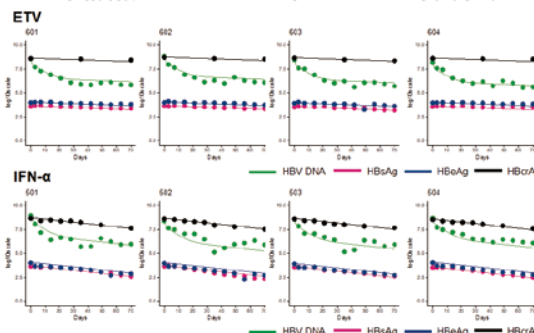
川上 英良 Eiryo Kawakami

千葉大学 教授
Chiba University
Professor

現在、HBV慢性感染者に対して核酸アナログ製剤を使用する事で、血中ウイルス量は検出限界値以下に抑えることが可能であるが、肝内の完全閉鎖二本鎖DNA (cccDNA) 量を減少させることは難しい。また、核酸アナログ製剤の使用を中断するとcccDNAからのウイルス形成が即座に開始され肝炎が再燃する症例が多数報告されている。一方で、インターフェロン (IFN) を用いた治療では40%程度の著効率であるがウイルスの完全排除を達成できる場合もある。しかし、どのような症例で著効が実現されているのかを明確に分類することは現時点ではできていない。また、HBV感染者におけるウイルス完全排除を達成するためには、molecular reservoirとして肝細胞核内に維持されるcccDNAの形成・分解ダイナミクスを定量的に理解し、cccDNAの高効率な分解を実現する必要がある。私たちは複数分野を高度に融合した異分野融合研究を展開しており、『1. 生体内におけるcccDNAの形成・分解ダイナミクスの定量』『2. IFNによるcccDNA分解促進メカニズムの分子レベルでの解明』『3. IFN治療症例の患者層別化』『4. IFN治療を念頭においた患者毎の最適治療戦略の提案』を目指している。

前回の班会議では、世界に先駆けて樹立した高効率HBV感染培養株から得られた実験データを数理モデルにより分析することで培養細胞内におけるcccDNAの形成・分解ダイナミクスを定量化し、さらにIFN処理によりそれらのバランスがどのように変化するかを報告した。今回の班会議では、より生体内の条件に近い初代ヒト肝細胞 (PHH) を用いて実施した感染実験の結果を報告する。なお、得られた実験データの解析は、PHHにおけるHBV感染を記述した数理モデルを用いて分析した。また、in vivoにおけるHBV感染を最も反映している動物モデルと考えられているヒト肝細胞を持つキメラマウスによるHBV感染実験の結果についても報告する。特に、キメラマウスの末梢血から経時的に計測した4つのバイオマーカー (HBV DNA, HBsAg, HBeAg, HBcrAg) を解析するための多階層数理モデルについて説明する。その後、これらのバイオマーカーを解析することで得られたHBV感染動態の定量的知見についても報告する (図1)。このような研究成果は、HBV関連疾患の病態の本質的な理解に繋がり、診断、治療の創出において基盤となる重要な知見となる。また、時間が許せば、数理モデリング、コンピューターシミュレーション、ハイブリッドビックデータ、機械学習を高次元で有機的に融合させるアプローチについても概説したい。

多階層数理モデルによる血中バイオマーカーの変動予測



Nucleos(t)ide analogs (NA) treatment to HBV-infected patients can reduce the serum viral load to under detection limit, but HBV covalently closed circular DNA (cccDNA), a template of viral replication, in the liver is not eliminated. And, after withdrawal of NA, HBV frequently produced from cccDNA, which makes the cessation of treatment difficult. Treatment with interferon- α (IFN- α) can sustainably eliminate HBV in around 40% of patients, but it has not still well been understood which factor is essential for achieving the viral response. To efficiently eliminate HBV from patients, it is necessary to quantitatively understand the production and degradation dynamics of cccDNA that is maintained in the nucleus in infected-hepatocytes. By taking advantage of the platforms including mathematical, clinical, experimental and artificial intelligence sciences, we propose a completely new idea for tackling the above HBV clinical problems. Our results will extend profound understanding of HBV infection, and provide solid scientific evidence for the establishment of novel prognosis, diagnosis, and treatment measures.

Keywords HBV, Mathematical Model, Data Analysis, Animal Experiments, Clinical Data

連絡先 岩見真吾 email: iwamishingo@gmail.com

研究室情報 URL: <http://bio-math10.biology.kyushu-u.ac.jp/>

抗ウイルス中和抗体誘導の単位ドメインとなるリンパ節局所B細胞応答のシグナル幾何学 x 数値流体力学 (CFD) 的解析

Signalogeometrical and computational fluid dynamics analysis of lymph node local B-cell responses as a basal domain of virus-neutralizing antibody induction



研究開発代表者

山本 浩之 *Hiroyuki Yamamoto*

国立感染症研究所 エイズ研究センター グループ長

National Institute of Infectious Diseases, AIDS Research Center, Group Leader

研究開発分担者

田中麻理子 *Mariko Tanaka*

東京大学 特任講師

The University of Tokyo, Project Lecturer

山本一樹 *Kazuki Yamamoto*

東京大学 特任助教

The University of Tokyo, Project Assistant Professor

抗体応答の定量 x 定性的性質を兼備したモデルの探索

抗ウイルス抗体応答は抗原量、病原性因子攪乱、ウイルス/宿主多型の各要素の総和として生じ、その定量的理解は抗体ベースの感染防御のデザイン上必須である。In vivo (中和) 抗体応答の基本単位はB細胞胚中心などのリンパ節微小環境である。その量論の構造は抗体応答全体の理解の要であり、把握には数学的視点に加え記述対象となる主要分子群への造詣が求められる。代表者はサル免疫不全ウイルス (SIV) 中和抗体誘導モデル解析の背景研究にて、B細胞シグナル攪乱とその流体的及び幾何学的条件を組合せた試作モデルが抗体誘導障害の根幹を全般的に説明可能である示唆を得た。これを端緒に、本研究は抗原-B細胞シグナル相互作用の幾何学的記述法の洗練を通し、Empirical→Designedな形で抗体誘導制御の進化を狙う。

戦略・多分野連携

代表シグナル分子群の動態による細胞内外の摂動を的確に表現したB細胞定量モデルの作出 (+ 描出済SIVモデルの援用) と、薬理介入を組合せたB細胞/抗体応答の定量的制御を両輪で進める。

(1) マウス抗体誘導の薬理修飾パラメータ包括取得 (代表+分担山本+分担田中)

抗原投与マウスに各種のB細胞シグナル促進・阻害剤を投与、抗体応答の摂動につき生化学・組織学・免疫学的パラメータを包括蓄積し、(2) 作出に供する。

(2) 局所B細胞応答定量モデルの高解像度版への改良 (代表)

代表的シグナル基軸の細胞・組織単位の幾何学的影響、及び抗原-抗体反応の広義の流体力学的条件に二重に支配されるB細胞応答の定量モデル (試作時着目した特定の支配方程式系を現在想定) を、(1) を踏まえスクラップ&ビルド的に作り込む。

(3) SIV中和抗体誘導モデルを再活用した薬理標的探索及び定量画像解析 (代表)

(1) 用の新規定量手法のテストベッドに供し、薬理標的の知見を増す目的に、SIVモデルの組織学及び分子病態解析を増設する。

進捗状況

(1) 増設 (3) の表現型PLA法解析にて、病原性蛋白質NefによるBCRシグナル系摂動の作用点としてZ分子群を特定した。その選択的修飾化合物を新規に薬理介入に供し (代表)、BCR経路動態のリン酸化プロテオミクス解析 (分担山本) を照合目的で並行している。

(2) B細胞定量モデルの改良を進めた (式展開フィールド形状改良)。

(3) リンパ節B細胞にSIVが来すシグナル障害の画像解析を、透明化型の免疫染色 (分担田中) 及びカスタマイズしたImage Stream X MKIIで行った (代表)。後者に注力し、測定蛍光情報のツリー下に付随パラメータを2種増設、追加2次元ゲートし精度向上を狙う手法を作出した。本手法は機械学習モジュール検証 (アジア圏初導入) によるターゲット分離能で最も優れた指標と合致し、上記含む3パラメータの導入により染色時ノイズ除去が高水準で達され、B細胞Nef侵襲がSIV感染リンパ節にて特異的B細胞に選択的に生じる状態を初めて描出した。本手法は新規性・汎用性共に高い形で提案・活用可能となった。

Antiviral antibody responses are modulated by antigen input, viral perturbation of host molecules and viral/host polymorphisms. Stoichiometrically unraveling this entity is essential for developing antibody-based protection strategies. The smallest canonical *in vivo* units of NAb responses are lymph node microcompartments such as germinal centers (GCs). Quantitative characterization at this level is important to understand antibody responses *in vivo*. This should require mathematical insight comprising biologically adequate choices of described network molecules. We have previously deduced from analysis of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific neutralizing antibody (NAb) induction that various types of NAb impairment may be commonly explained by a specific pattern of spatiotemporal constraint on B-cell immunosignaling equation systems in geometrical fields recapitulating GC B-cell regions, which we here designate approaches as "signalogeometry". Extended from these, this project will couple two approaches; one is obtaining a milieu of immunological data on mouse protein immunization, variously modulated pharmacologically for canonical axes of B-cell immunosignaling. Results serve as parameters in the second approach which is a 4-D reconstitution of *in vivo* antigen-B-cell interactions assisted by computational fluid dynamics analysis and geometrical approaches. Furthermore, we utilize our archived SIV model as a testbed for quantitative/pharmacological insights. Such combined approaches should generate a robust mechanistic platform of B-cell responses, widely applicable for viral infections and durable by continuous updating.

Keywords B cells, antibody responses, computational fluid dynamics, signalogeometry, SLN remodeling

連絡先 山本浩之 email: h-yamamoto@nih.go.jp

ウイルス-宿主インタラクトーム解析に基づく 抗パラミクソウイルス薬の開発研究

Development research on anti-paramyxoviruses based on virus-host interactome analysis



研究開発代表者

加藤 大志 *Hiroshi Katoh*

国立感染症研究所 ウイルス第三部 室長

National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology III, Chief

研究開発分担者

山地 俊之 *Toshiyuki Yamaji*

国立感染症研究所 室長

National Institute of Infectious
Diseases, Chief

関塚 剛史 *Tsuyoshi Sekizuka*

国立感染症研究所 室長

National Institute of Infectious
Diseases, Chief

竹田 誠 *Makoto Takeda*

国立感染症研究所 部長

National Institute of Infectious
Diseases, Director

パラミクソウイルスは、流行性耳下腺炎(ムンプス)や麻疹に代表される全身性感染症から、パラインフルエンザウイルスなどの呼吸器感染症、致死的なニパウイルス感染症など多彩かつ重大な病気を引き起こす。小児・高齢者、免疫不全者医療を中心にパラミクソウイルス感染症への対策は急務であるにも関わらず、特異的治療薬は存在しない。

ウイルスは細胞に侵入後、宿主細胞の生理機能を巧みに利用しながら自身のゲノムおよびタンパク質を合成、さらに子孫ウイルスを産生し、感染を拡大させていく。すなわちウイルス感染とは、時空間的に変動するウイルスおよび宿主因子の多彩な相互作用の総和である。本研究課題では感染細胞における宿主-ウイルス相互作用ネットワークの全体像を明らかにし、抗パラミクソウイルス薬の開発へとつなげる。パラミクソウイルス感染は細胞侵入、RNA複製、粒子形成の3つのステージを経て、子孫ウイルスの産生に至る。そこで代表的なパラミクソウイルスであるムンプスウイルス(MuV)をモデルに各増殖過程に関与する宿主因子を網羅的に探索する。まずウイルスの細胞侵入およびRNA複製の評価系を活用したCRISPRゲノムワイドスクリーニングシステムを構築し、それぞれの過程に関与する宿主因子の同定及び解析を行う。またそのためのin silico解析パイプラインの構築・改良も合わせて進める。次にRNA複製および粒子形成過程でウイルスタンパク質と相互作用する宿主因子を網羅的に取得し、インタラクトーム解析を実施する。得られた知見を統合することで、抗パラミクソウイルス薬の標的因子または細胞機能を導き出す。治療薬探索のため、標的候補因子または機能に対する化合物ライブラリーをカスタマイズし、蛍光タンパク質発現組換えMuVを用いてスクリーニングを実施する。ヒット化合物は、作用点の同定および作用機序の解析を行った上、特に候補として優れている化合物について、マウス/センダイウイルスの感染実験系を用いて、in vivoでの薬効や、薬物動態を解析する。研究班では、宿主因子探索のための網羅的スクリーニングシステムの構築を細胞工学を専門とする山地が行う。ウイルス学的解析は主に加藤大が行い、取得されたデータをバイオインフォマティクスが専門の関塚が総合的に解析することで、ウイルス感染という生命現象を高精度かつ定量的なシステムとして理解する。培養細胞および個体を用いた抗パラミクソウイルス薬の探索は竹田が担当する。

今年度はMuVのRNA複製過程におけるインタラクトーム解析を実施した。パラミクソウイルスのRNAは液-液相分離によって形成される封入体と呼ばれる細胞質領域で合成される。そこで近接依存性標識法を用いてMuVの封入体にリクルートされる宿主因子を網羅的に同定し、インタラクトーム解析によってウイルスタンパク質との相互作用ネットワークを描出した。

Paramyxoviruses cause a wide variety of serious diseases, from systemic infections such as measles and mumps to respiratory infections such as parainfluenza virus and fatal Nipah virus infections. However, no specific treatment for paramyxovirus infections has been developed. Viral infections progress through various steps from cell invasion to viral RNA replication and particle formation. Therefore, in order to fully understand the virus-host interactions, it is necessary to know when, where, and how much of each interaction is occurring. In this project, we will perform a meta-interactome analysis to integrate host-virus interactions at each step of viral growth using mumps virus, a typical paramyxovirus, to reveal a functional host-virus molecular network with spatiotemporal behavior. Specifically, we will identify factors involved in cell invasion or viral RNA replication using a genome-wide screening system. We will also conduct comprehensive identification of host factors that interact with viral proteins. Based on the data obtained, we will conduct interactome analysis to understand the biological phenomenon of viral infection as a highly accurate and quantitative system. Based on the knowledge obtained, we will select host factors or cell functions as therapeutic targets and search for antiparamyxovirus candidate compounds using a compound library. The candidate compounds will be evaluated for their antiviral activity in cultured cells and mice, which will lead to the development of anti-paramyxovirus drugs.

Keywords Paramyxoviruses, Mumps virus, Sendai virus, Antiviral drug development, Interactome analysis, Virus-host interaction, CRISPR screening, Compound screening

連絡先 加藤大志 email : kato0704@nih.go.jp

研究室情報 URL : <https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-vir3.html>

単一細胞解析によるヘルペスウイルス持続感染の分子基盤の解明

Elucidation of molecular basis of persistent infection by herpesviruses through single cell analysis



研究開発代表者

有井 潤 Jun Arie

神戸大学 医学研究科 特命准教授

Kobe University, Graduate School of Medicine, Associate professor

研究開発分担者

原田 哲仁 Akihito Harada

九州大学

Kyushu University

末永 忠広 Tadahiro Suenaga

福島県立医科大学

Fukushima Medical University

西村 光広 Mitsuhiro Nishimura

神戸大学

Kobe University

ヘルペスウイルスは、我々人類にとってもっとも身近に存在を認識できるウイルスのひとつである。ヒトヘルペスウイルス（HHV）は、9種存在が知られているが、いずれもヒトに終生潜伏感染を成立させる。潜伏したHHVは、ストレスや免疫抑制などに伴って再活性化し、さまざまな疾患を引き起こす。抗ヘルペスウイルス剤は広く使われているが、一度潜伏したHHVを排除することは不可能である。すなわち、度々再活性化するHHVに対し抗ウイルス剤は対症療法に留まっており、アンメットメディカルニーズが高い感染症といえる。一方で、疾患が顕在化していない状態でも、HHVは慢性的に再活性化を繰り返し、宿主免疫と相互作用し続けている。近年、このようなHHVによる持続感染や慢性感染が、アルツハイマー病や多発性硬化症（MS）など宿主免疫と関わる多くの疾患に関連すると報告されているが、その具体的な発病メカニズムはいずれも不明である。持続感染における疾患局所では、ウイルス粒子産生を行う溶解感染細胞とともに、潜伏感染細胞および非感染細胞が混在し、さらに免疫細胞が浸潤した、複雑な環境が維持されていると考えられる。「HHV持続感染関連疾患」のメカニズムを明らかにするためには、ヒト体内におけるHHV感染状態の詳細を細胞ごとに明らかにすることが不可欠である。本研究では、研究代表者の専門であるウイルス学に加え、免疫学（末永）、構造生物学（西村）およびバイオインフォマティクスに基づいたトランスクリプトーム解析の研究者（原田）のチームを構成し、以下の研究を遂行する予定である。

まず「シングルセルRNA-seqによる、ヒト試料におけるHHVと宿主細胞双方のRNA発現の解析」を行い、非感染細胞、溶解感染細胞および潜伏感染細胞の比較から、「HHVの持続感染を規定する因子の同定と解析」を行う。さらにHHV持続感染部位において絶えず起こるウイルスと免疫細胞との攻防を理解するために「HHV糖タンパク質と免疫受容体との相互作用の解析」を行う。これらの解析を通して、HHVによる持続感染を可能にするウイルス・宿主間相互作用の分子基盤と、持続感染状態にあるHHVが病態発症を引き起こす分子機構を1細胞レベルで解明し、治療標的を明らかにすることを目指す。

現在、HHVを感染させた臍帯血由来細胞の単一細胞解析を行うことで、ヒト臨床検体におけるウイルス遺伝子発現状況およびそれと関連する細胞因子の同定を試みている。また、HHV増殖に貢献する新規細胞因子を複数同定し、HHV脳炎モデルを用いることで治療標的となりうることを明らかにした。さらに核内でゲノム複製を行うHHVが、細胞を破壊させることなく増殖する機構が、遺伝性疾患である早老症においても機能していることを明らかにし、HHVの治療標的が早老症の治療標的にもなりうる可能性を示した。

Human herpesviruses (HHVs) establish life-long latent infection in humans. During latency, only a limited number of viral proteins are expressed, and no viral progeny are produced. Reactivation can be caused by host stimuli and may cause various diseases. The persistent reactivation of HHVs in the infected area may interact with the host immune response for a long time, without causing any apparent disease but is involved in immune-mediated diseases. In the affected area, lytic infected cells, which produce progeny viruses, coexist with latently infected cells, uninfected cells, and infiltrating immune cells. Thus, it is necessary to identify the state of each individual cell in the pathological area in order to understand the persistent infection caused by HHVs.

This study involves the collaboration of virologists, immunologists, structural biologists and transcriptome experts. Our team will seek to (i) analyze viral and cellular transcriptomes in human samples by single cell RNA-seq to compare lytic and latently infected cells, (ii) identify and analyze the factors that regulate the persistent infection of HHVs, and (iii) investigate the association between HHV glycoproteins and immune receptors to understand the interaction between infected cells and immune cells at the local infection site. These studies are expected to reveal the molecular basis of HHV-host interactions and the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of persistent infection by HHVs at the single cell level.

Keywords Herpesvirus, single cell analysis, Persistent infection.

連絡先 有井潤 email : jarii@med.kobe-u.ac.jp

研究室情報 URL : <https://www.med.kobe-u.ac.jp/virol/index.html>

シングルセル免疫動態解析による HTLV-1 感染状態・関連疾患における宿主－病原体相互作用の統合的理解

Single-cell analysis of immune dynamics in HTLV-1 infection and its related disorders



研究開発代表者

片岡 圭亮 *Keisuke Kataoka*

国立がん研究センター 研究所 分野長

National Cancer Center, Research Institute, Chief

研究開発分担者

松岡 雅雄 *Masao Matsuoka*

熊本大学 教授

Kumamoto University
Professor

下田 和哉 *Kazuya Shimoda*

宮崎大学 教授

University of Miyazaki
Professor

梅北 邦彦 *Kunihiko Umekita*

宮崎大学 准教授

University of Miyazaki
Associate professor

成人T細胞白血病リンパ腫（ATL）および他のHTLV-1関連疾患（HAMやHTLV-1陽性RA）における免疫動態の理解は重要な臨床的課題である。また、ATLにおける遺伝子解析においても、遺伝子異常が免疫関連分子に集積することが示されている（*K Kataoka, Nat Genet, 2015*; *K Kataoka, Nature, 2016*）。しかし、このような免疫動態について限定的な研究があるものの、その全体像や各病態の違いは十分に明らかでない。最近、申請者は、免疫動態を包括的に調べる方法として、多数の表面マーカー解析とトランスクリプトーム解析・TCR/BCRレパトア解析を同一の単一細胞で実現できる技術を開発した。本研究では、このシングルセル免疫動態解析技術を用いて、HTLV-1感染状態・関連疾患の免疫動態の解明を試みる。

1. HTLV-1 キャリア・ATL 検体の予備的検討データを用いたシングルセル免疫動態解析の最適化

取得済みのHTLV-1キャリア・ATLの予備的データを用いて、免疫動態データ解析方法の開発・最適化を実施する。さらに、HTLV-1抗原に対するMHCマルチマーを用いてHTLV-1特異的T細胞の解析方法を開発する。

2. シングルセル免疫動態解析によるHTLV-1 関連疾患における免疫異常の網羅的解明

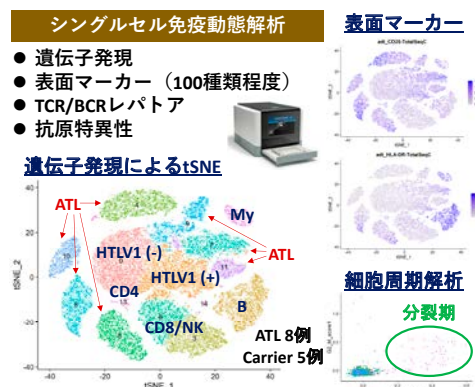
HTLV-1感染状態および関連疾患（ATL、HAM、HTLV-1陽性RA）における免疫動態の網羅的解析を試みる。HTLV-1関連疾患間の比較、重症度の違いによる比較、遺伝子異常の違いによる比較を行い、細胞分画の変化や、各細胞分画における遺伝子発現・表面マーカー・BCR/TCRレパトアの変化を解明する。

3. 免疫異常をマーカーとしたHTLV-1 関連疾患の発症・進展リスク予知法の検討

HTLV-1キャリアの予備的検討で、一部の症例で単クローン性拡大が生じ、それに伴い複数の免疫関連分子が活性化されることを見出している。多数例におけるデータ解析により、このような免疫異常の臨床的意義を検証する。

4. HTLV-1 に特徴的な免疫異常の分子病態の解明と新規治療標的として検証

様々な実験系を用いて、免疫異常の分子病態の解明と新規治療標的として検証を実施する。



HTLV-1 infection is associated with various human diseases including adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and non-neoplastic inflammatory diseases, such as HTLV-1-associated myelopathy (HAM) and HTLV-1-positive rheumatoid arthritis (RA). Opportunistic infection frequently occurs due to immune suppression in ATL. Moreover, an efficient cytotoxic T-lymphocyte response to HTLV-1 limits the proviral load and the risk of associated inflammatory diseases. Thus, the immune system is believed to play an important role in the pathogenesis of HTLV-1-related disorders, which is supported by our integrated genetic study of ATL, demonstrating the enrichment of genetic alterations in immune-related molecules, (*K Kataoka, Nat Genet, 2015*; *K Kataoka, Nature, 2016*). However, the entire picture of immune alterations and the differences among these disorders have not been fully elucidated. Recently, we have developed a new analytical technique, enabling the combined analysis of transcriptome, cell surface markers, and TCR/BCR repertoires at a single-cell level. Therefore, in this study, we propose to examine immune dynamics of HTLV-1 infection and its related disorders using this new single-cell analysis technique.

Keywords Adult T-cell leukemia/lymphoma, HTLV-1, single-cell

連絡先 片岡圭亮 email : kekataok@ncc.go.jp

研究室情報 URL : https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular_oncology/index.html

多層的シングルセル研究による HTLV-1 関連病態予測サロゲートマーカーの探索とその臨床応用

Identification of surrogate markers for the prediction of HTLV-1-related diseases by multiple-layered single cell analysis



研究開発代表者

佐藤 賢文 Yoritumi Satou

熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター 教授

Kumamoto University, Joint Research Center for Human Retrovirus Infection, Professor

研究開発分担者

山野 嘉久 Yoshihisa Yamano

聖マリアンナ医科大学 教授
St. Marianna University
School of Medicine, Professor

山本 拓也 Takuya Yamamoto

医薬基盤・健康・栄養研究所 プロジェクトリーダー
National Institutes of Biomedical Innovation,
Health, and Nutrition, Project Leader

岩見 真吾 Shingo Iwami

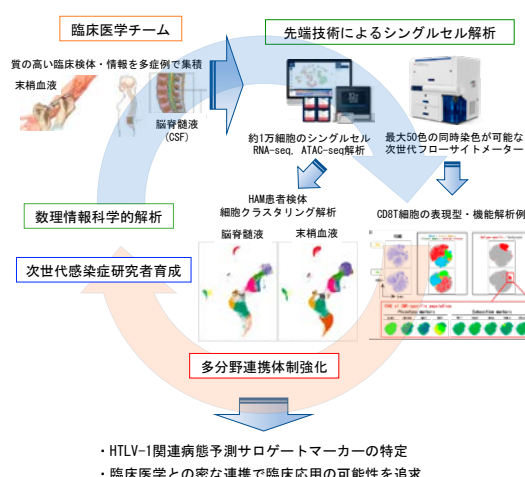
九州大学 准教授
Kyushu University
Associate Professor

ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）感染者は日本に約80万人存在しており、その大部分（約95%）は無症候性キャリアである。約5%の感染者で成人T細胞白血病（ATL）を発症するが、その予後は不良であるため、早期診断法や発症予防法や確立が急務である。無症候性キャリアの末梢血単核球（PBMC）中には感染細胞が数%から十数%と高い割合で存在し、ウイルス抗原に対する細胞障害性Tリンパ球や抗体応答が認められる。つまり、ウイルスの潜伏及び持続感染の成立維持にはウイルス抗原発現と抗ウイルス免疫応答のバランスが重要と考えられる。

上記背景を踏まえ、本研究課題ではHTLV-1感染者検体を用いた、多層的シングルセル研究を推進し、HTLV-1感染によってT細胞が本来持っている分化や活性化、恒常性維持機構がどのように攪乱され、病原性を発揮しているのかを明らかにすることが目的である。

その目的を達成するため、ウイルス学、臨床医学、免疫学、生物数理科学の異分野の研究者で研究チームを編成し、多分野融合研究を推進する事でブレークスルーとなる新知見創出を目指している（画像1）。

これまでに、HTLV-1感染者14例（無症候性感染者AC5例、ATL患者9例）、非感染者コントロール3例の末梢血単核球（PBMC）のシングルセルトランスクリプトームデータ取得を行った。1検体あたり約6,000細胞、1細胞あたり約1,000遺伝子の発現情報が取得された。最初にPBMCサブセットクラスタリングを行ったのち、HTLV-1の主な感染細胞であるCD4T細胞に注目した。HTLV-1感染の特徴は、感染細胞クローンがクローン性に増殖することであり、同じ感染クローンは共通のT細胞受容体（TCR）を持つ。今回の解析結果をみると、ATL症例では特定のTCRを持つT細胞クローンがクローン性に増殖していたが、健康人や無症候性感染者ではそれを認めなかった。本研究によって、T細胞が本来持っているT細胞運命（分化）決定や恒常性維持機構がHTLV-1感染によってどのように攪乱され、ウイルスの持続潜伏感染を許容し、病原性を発揮しているのか、高精度に観察出来る可能性が示されている。



There are about 800,000 people are infected with HTLV-1 in Japan. Most of them are asymptomatic carriers, but a part of them develop a leukemia of HTLV-1-infected cells, adult T-cell leukemia (ATL), or an inflammatory disease, HTLV-1 associated myelopathy (HAM). In this research project, we are analyzing high-quality clinical samples and obtain precise clinical information from the collaborators. We utilize two different cutting-edge technology, 10x Genomics droplet single cell analysis and next generation multi-color flowcytometry, which enables us to detect around 50 different fluorescent protein at the same time. We are characterizing PBMCs from HTLV-1-infected individuals with super high resolution by using these mutually complementary single cell techniques. Since the data we will obtain in this study is super high dimensional one, we are going to collaborate with researcher with expertise regarding bioinformatics and mathematical modelling in order to extract biologically and pathologically important molecules and genes which play a crucial role in the pathogenesis of HTLV-1 infection. We are aiming to identify surrogate markers for HTLV-1 related human diseases, ATL and HAM, and use them to establish new clinical diagnosis method that evaluate status of HTLV-1-infected individuals.

Keywords 1. HTLV-1 2. Adult T-cell leukemia/lymphoma 3. HTLV-1 associated myelopathy 4. Single cell analysis
5. Bioinformatics 6. Chronic viral infection 7. International collaboration
連絡先 佐藤賢文 email : y-satou@kumamoto-u.ac.jp
研究室情報 URL : <https://kumamoto-u-jrchri.jp/satou/index.html>

EBV 感染・がん化機構解明のための多分野連携研究

Multidiscipline research of EBV infection and oncogenesis



研究開発代表者

村田 貴之 Takayuki Murata

藤田医科大学 医学部 教授

Fujita Health University, School of Medicine, Professor

研究開発分担者

木村 宏 Hiroshi Kimura

名古屋大学 教授
Nagoya University
Professor

佐藤 賢文 Yorifumi Satou

熊本大学 教授
Kumamoto University
Professor

岩見 真吾 Shingo Iwami

名古屋大学 教授
Nagoya University
Professor

Epstein-Barr virus (EBV)は伝染性単核症の原因となるほか、バーキットリンパ腫、NK/T細胞リンパ腫、胃癌、上咽頭癌などのがんを引き起こすヒトがんウイルスの1つである。しかしながら、EBVによる発がん機構については未解明な点が多く、EBVに対する抗ウイルス薬や予防法も確立されていない。特に慢性活動性EBV感染症（CAEBV）やNK/T細胞リンパ腫は日本を含む東アジア諸国で比較的発生が多い、予後が悪い疾患であり、大きな問題となっている。

本研究では、(1) EBV 潜伏・再活性化平衡状態の解析、(2) リンパ球前駆細胞へのEBV 感染機構の解析、(3) EBV 陽性がんの包括的ゲノム解析、の3つの柱で解析を行う。

(1) EBV 感染直後には潜伏と再活性化の平衡状態となることが知られているが、その実情や機構は明らかでない。そこで、多色蛍光マーカーを適宜組み込んだ細胞とウイルスを作成し、その発光をFACSで経時的に計測することにより、ウイルス感染直後の潜伏と再活性化の平衡状態について解析を行った。また、自然な宿主細胞である初代B細胞にEBVを感染させ、感染直後から数週間において起こっていることを包括的なオミクス解析により観察する。ここでは岩見先生にお願いし、計算化学の手法でモデル化を試み、より信頼性のあるデータとしたい。多色蛍光マーカーウイルスの解析については、論文が受理された。また、初代B細胞にEBVを感染させてオミクス解析を行い、感染直後からPD-L1が強力に発現増強していることを明らかにした。この成果については現在リバイスを行っている。この他にも、初代B細胞感染直後に、ある細胞小器官が巨大化する現象を明らかにしており、これについても投稿準備中である。

(2) そもそもB細胞を宿主細胞とするEBVがどのような機構でNK/T細胞に感染するのか、謎であった。しかしながら我々は予備実験において、iPS細胞をNK/T細胞に分化させる途中のある段階でEBVを感染させると、高率にEBVが感染する様子を得た。そこでEBVが感染しやすいこの前駆細胞が正確にはどのような細胞であるのか、佐藤先生との共同研究によりシングルセル解析を行って明らかにしたい。これまでに現象の再現性をとり、感染が起こりやすい分化段階を同定した。さらに、EBV 陽性細胞と共培養すると感染が起こりやすいことも観察している。

(3) 以前の報告では、主にCAEBVのゲノム解析を行ったが、今回、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、胃癌、上咽頭癌についても解析を行っている。リンパ腫ではウイルスゲノムの欠失が見られたが、上皮系の癌ではほとんど欠失がなかった。がん種によって欠失の場所や長さにも特徴があることが明らかになった。

Epstein-Barr virus (EBV) is a causative agent of several cancers. Some of them, including chronic active EBV infection (CAEBV) and NK/T-cell lymphoma (NKTCL), are associated with dismal prognosis, and incidences are higher in Japan, but safe, efficient therapeutic method is not available yet. We here came up with 3 fundamental questions: (1) equilibrium state between latency and reactivation, (2) infection to progenitor lymphocyte, (3) genomic analysis of EBV-associated cancers. (1) it is known that, upon de novo infection, EBV takes state of equilibrium between latent and lytic infection. Therefore, by using multi-color fluorescent proteins, we perform live cell monitoring of the state after infection to cells, and use the data for computational analysis. Another experiment we plan is, infect wild-type EBV to primary B cells and carry out multi-omics analysis. (2) Interestingly, we found that EBV can infect efficiently to a certain fraction of cells that are induced from iPSC to lymphocytes. We will identify the cell fraction by single-cell analysis. (3) We will also carry out genomic analyses of EBV-positive cancer specimens besides CAEBV and NKTCL. We have found that EBV in lymphomas frequently had intragenic deletion, while EBV in epithelial carcinomas did not.

Keywords EBV, reactivation, progenitor cell, single cell analysis, computational analysis, next generation sequencer,
連絡先 村田貴之 email : tmurata@fujita-hu.ac.jp
研究室情報 URL : <https://www.fujita-hu.ac.jp/faculty/medicine/departments/virology-parasitology.html>

レトロウイルス病原性と持続感染の根源となる不均一な潜伏集団を生み出す宿主エピゲノム特性の解明と治療薬開発

Deep exploration for retrovirus reservoir heterogeneity and host-virus interaction by multi-phase single-cell epigenetic analysis



研究開発代表者

山岸 誠 Makoto Yamagishi

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 特任講師

The University of Tokyo, Graduate School of Frontier Sciences, Project lecturer

研究開発分担者

鈴木 稜 Yutaka Suzuki

東京大学大学院 教授

The University of Tokyo, Professor

内丸 薫 Kaoru Uchimaru

東京大学大学院 教授

The University of Tokyo, Professor

四柳 宏 Hiroshi Yotsuyanagi

東京大学医科学研究所 教授

The University of Tokyo, Professor

HIV-1 及び HTLV-1 感染症対策における最大の障害は、レトロウイルスの特性である宿主ゲノムへの組み込みによって形成される、長期安定的な潜伏化集団（リザーバー）である。潜伏化集団が感染個体中に存在する限り、エイズ患者における抗ウイルス薬の長期投与による弊害や、極めて予後不良な ATL や HAM の発症リスクを負うことになり、したがって臨床的ニーズは高い。潜伏化集団は集団サイズが極めて微細であり、さらにウイルス遺伝子発現レベルも非常に低値であるために、非感染集団との区別、分取が困難である。臨床検体が希少であり、また適切な研究モデルも少ない点も課題である。したがって、これらを克服する革新的な技術、基礎研究、臨床の協働研究体制が必要である。

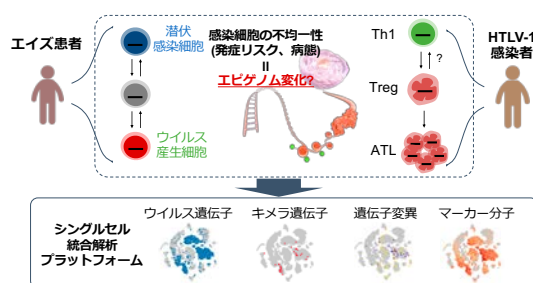
これらの研究課題を達成するために、ウイルス学、シーケンス技術、感染症内科、血液内科の研究者が連携し、以下の3つの分野を融合する。

1. 表面抗原もしくは蛍光タンパク質を用いた不均一な感染細胞集団の精密な分取、解析（研究モデル）
2. 感染者エピゲノムに対するシングルセルレベルの統合解析プラットフォーム（次世代解析技術）
3. 希少な臨床検体の利用、臨床データベースとの統合（臨床的意義の検証、出口戦略）

本研究では、潜伏感染細胞の宿主遺伝子発現とエピゲノムの不均一性に注目する。最新技術を用いて、臨床検体や感染モデルから微細な感染細胞集団を高精度に検出し、持続感染細胞集団や免疫応答に関するエピゲノム特性を明らかにすることができれば、レトロウイルスの潜伏化と病原性メカニズムの解明につながり、将来的なりザーバー制御、発症予防、免疫学的制御の分子基盤となる。

リザーバーの特徴に基づいた標的分子の新規同定も行う。また、宿主ゲノム及びウイルスゲノムの制御を担うヒストン修飾/クロマチン構造制御の重要性を証明し、産学官連携によって開発に成功した valemetostat (EZH1/2 阻害薬) 投薬の理論的根拠の確立と、臨床検体を用いた評価によって非臨床 POC の取得を目指す。さらに、HIV-1、HTLV-1 免疫応答の実態解明と免疫賦活化のための標的分子候補の同定を目的とする。本研究では、病原性や生活環境の異なる HIV-1 と HTLV-1 について、宿主のエピゲノムに注目して統合的に解析することで、病原性や潜伏化の違いについて理解を深める。

現在までに、ウイルス遺伝子、ウイルス-宿主融合遺伝子、変異遺伝子の検出による、高解像度のシングルセル統合解析プラットフォームの構築に成功した。これらは他の感染症研究においても極めて有効な解析技術であり、その有用性、発展性も含め紹介する。また本研究ではこれらの技術を駆使し、HTLV-1 感染者に存在する感染細胞集団の新たな特性を見出した。クローン進化を駆動する遺伝子異常やエピゲノム異常の機能について、最新のデータを紹介する。HIV-1 感染集団のヘテロ性や病原性における宿主エピゲノムの重要性についても議論したい。



Human immunodeficiency virus type I (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) are life-threatening human retroviruses. HIV-1 is a causative agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). HTLV-1 infection is associated with the development of adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy and tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).

The long-lived latently infected cells are a major source of pathogenesis and chronic infection. However, because the latently infected cells are rare in peripheral blood, it is challenging to characterize the specific cell population. To overcome the research issues, we will introduce innovative experimental platform, which are composed of single-cell RNA-seq, single-cell ATAC-seq, and clonality analysis based on virus integration sites. In particular, we focus on the epigenetic heterogeneity because the cellular characteristics (e.g., function and differentiation) of the polyclonal latent cell population are defined at the epigenetic level. We organize interdisciplinary research experts in molecular biology, virology, immunology, bioinformatics, and clinical studies. By collaborating with clinical practice at the University of Tokyo, we will prospectively analyze the transcriptome and epigenome of AIDS patients and HTLV-1 carriers.

Transcriptome and epigenome at single-cell resolution will clarify the characteristics of the low-frequency latent reservoirs. We will also evaluate a potent drug candidate, EZH1/2 inhibitor, for selective elimination of HIV-1/HTLV-1 burden. Epigenetic inhibitors may pave the way for next-generation medicine for human retroviruses.

Keywords HIV-1; HTLV-1; Latent reservoir; Single cell epigenome analysis; Epigenetic drug

連絡先 山岸誠 email: myamagishi@edu.k.u-tokyo.ac.jp

研究室情報 URL: <http://uchimaru.umin.jp/index.html>

グアニン四重鎖構造誘起による (+)ssRNA ウイルス阻害剤の探索研究

Study for anti (+)ssRNA virus agents by inducing G-quadruplexes



研究開発代表者

寺 正行 Masayuki Tera

東京農工大学 大学院工学研究院 准教授

Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Engineering, Associate professor

研究開発分担者

池袋 一典 Kazunori Ikebukuro

東京農工大学 教授

Tokyo University of Agriculture and Technology, Professor

水谷 哲也 Tetsuya Mizutani

東京農工大学 教授

Tokyo University of Agriculture and Technology, Professor

白石 慧 Akira Shiraishi

(公財) サントリー生命科学財団 研究員

Suntory Foundation for Life Sciences Research associate

解決を目指す感染症の課題

SARS-CoV-2がコードするタンパク質の数は少なく、これまでにウイルスタンパク質標的型抗ウイルス薬の実用例はない。本研究では(+)ssRNAウイルスの一つであるSARS-CoV-2のRNA高次構造に着目し、ウイルス転写・翻訳・複製を阻害する、抗ウイルス薬の探索を目的としている。グアニン四重鎖はRNA高次構造の中でも特に安定であり、生体内での大部分の核酸が形成している二重鎖とは構造が大きく異なるため、低分子化合物の標的として優れている。しかし、20kbに及ぶSARS-CoV-2ゲノムにおいてグアニン四重鎖を形成する配列を効率的に探索することは困難である。

研究戦略とそれを具体化するための多分野研究者の役割分担、連携

代表者はこれまでにグアニン四重鎖に結合するリガンド「OTD」と「BBR二量体」を開発し、これらを用いて実験的にグアニン四重鎖形成配列を2000種見出している(図1)。見出したグアニン四重鎖形成配列を機械学習に付することでSARS-CoV-2ゲノムからグアニン四重鎖形成配列を効率的に予測する(インフォマティクス)。ここで見出すグアニン四重鎖形成配列をin vitro翻訳系に適用したレポーターアッセイを構築する(生化学)。代表者がこれまでに開発してきた核酸結合化合物ライブラリを当該アッセイ系にて評価し、ヒット化合物を探索する。さらにヒットtoリードへの化合物構造展開(有機化学)を行うことで、グアニン四重鎖標的薬候補を取得する。最後にSARS-CoV-2感染モデル細胞、動物(ウイルス学)により候補化合物の薬効評価を行い、SARS-CoV-2グアニン四重鎖標的型抗ウイルス薬の創出を目指す。

研究の進捗状況

今年度はグアニン四重鎖に結合すると蛍光を発する特異的グアニン四重鎖プローブを開発しグアニン四重鎖形成配列の実験的な検証法を確立した。G4予測器では、予測精度92%の第一世代型予測器を構築した。これらを組み合わせてSARS-CoV-2において形成されるグアニン四重鎖配列を4種類実験的に見出した。グアニン四重鎖に結合する化合物の構造展開を行い、5種類の新規化合物を合成した。1種類のSARS-CoV-2グアニン四重鎖配列についてレポーターアッセイ系を構築することができた。感染モデル細胞の構築へ向けSARS-CoV-2のレプリコンを作成した。

Despite the COVID-19 pandemic now having lasted for more than a year, no effective anti-SARS-CoV-2 drugs targeting viral proteins have yet been reported, due to the limited number of viral proteins amenable to drugs. In this study, we will develop anti-SARS-CoV-2 agents focusing on higher-order RNA structures which could inhibit viral transcription, translation, and replication. G-quadruplex (G4) is one of the most stable RNA higher-order structures and is a promising target for small-molecules because its structure is different from the duplexes. However, no practical methodology to screen putative G4 in the 20 kb long SARS-CoV-2 genome is yet available. We have experimentally identified 2,000 G4 formation sequences and, by applying machine learning to these sequences, we will predict G4 formation sequences from the SARS-CoV-2 genome (informatics). We will construct a reporter assay that applies the identified G4 to an in vitro translation system (biochemistry). A library of nucleic acid-binding compounds will be evaluated in this assay system to obtain hit compounds (organic chemistry). Finally, we will evaluate the efficacy of the final chosen candidates by using SARS-CoV-2 infected model cells and animals (virology).

This past year, we have developed a G4-specific fluorescent probe and established a method to verify the putative G4 sequence. Four G4 sequences from SARS-CoV-2 were identified and, among them, one reporter assay system was developed. A replicon of SARS-CoV-2 was prepared for the production of infected model cells.

Keywords G-quadruplex, RNA, machine learning, reporter gene assay, SARS-CoV-2

連絡先 寺正行 email: tera@go.tuat.ac.jp

研究室情報 URL: http://web.tuat.ac.jp/~nagasawa/

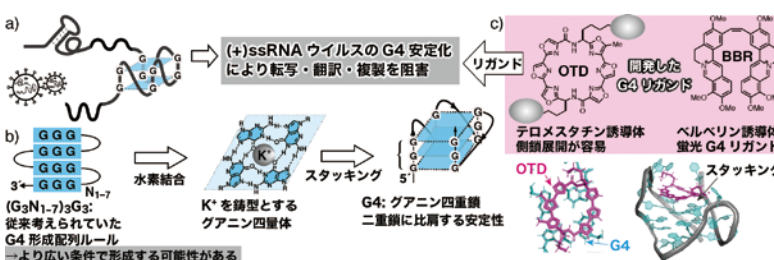


図1. a) mRNA G4による翻訳阻害モデル。G4リガンドにより、ウイルスG4を安定化することで翻訳を阻害する。(+)ssRNAウイルスでは、同様に転写、複製段階も阻害される。b) G4配列モチーフとG4の構造模式図。c) 申請者らが開発したG4リガンド、OTD、BBRの構造と、NMR解析により明らかとなったOTDとG4の結合状態。

乳児ボツリヌス症の包括的理解に向けた基礎的・臨床的研究

Fundamental and clinical study for elucidation of the onset mechanism of infant botulism



研究開発代表者

小林 伸英 *Nobuhide Kobayashi*

金沢大学 医薬保健研究域医学系 助教

Kanazawa University, Graduate School of Medical Sciences, Assistant Professor

研究開発分担者

松村 拓大 *Takuhiko Matsumura*

金沢大学 講師

Kanazawa University
Assistant Professor油谷 雅広 *Masahiro Yutani*

金沢大学 助教

Kanazawa University
Assistant Professor福田 真嗣 *Shinji Fukuda*

慶應義塾大学 特任教授

Keio University
Professor

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、ボツリヌス神経毒素の産生により全身の筋弛緩から重症例では致死的な呼吸失調に至る神経症状 (ボツリヌス症) を引き起こす。乳児ボツリヌス症は、生後およそ3週～1歳未満程度の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口摂取したとき、腸内で芽胞が発芽・増殖し、産生される毒素により発症する。本菌芽胞はハチミツなどの食品や土壌などの環境中にしばしば存在するが、乳児期を過ぎた健常人が芽胞を経口摂取しても本菌が腸内で増殖することはない。本菌が乳児腸内で増殖しやすい理由の一つとして、腸内細菌が未成熟であるためと考えられていたが、感染抑制に関わる詳細なメカニズムは不明であった。

これまでに申請者らは、成人型腸内細菌叢に豊富に存在する腸内細菌代謝物が、*in vitro*で強いボツリヌス菌芽胞の発芽抑制作用を示すことを見出している。抗生物質投与で腸内細菌叢を攪乱したマウスはボツリヌス菌に感染感受性であるが、代謝物産生菌の事前投与によりボツリヌス症が抑制された。すなわち、成人に特有の腸内細菌代謝物がボツリヌス菌感染耐性をもたらすことが示唆された。一方で、実際のヒト腸内細菌叢においてどのような腸内細菌および代謝産物が感染耐性を付与するのかは依然として不明である。そこで本課題では、無菌マウスに健常ヒト乳児または成人糞便を移植したヒト糞便移植マウスを作製し、感染実験、腸内細菌叢解析およびメタボローム解析を行う。さらに、乳児ボツリヌス症または成人腸管ボツリヌス症患者の糞便を解析し、患者に特徴的な菌叢および代謝物組成を明らかにする。これらの研究により、ボツリヌス菌感染耐性を付与するヒト腸内細菌 (叢) およびその分子機構を明らかにする。

一方、3週未満の新生児においても乳児ボツリヌス症はほとんど発症しないが、その耐性機構は全く分かっていない。本研究では、新生児特有の腸内細菌叢、宿主免疫応答、母乳等を介した母子免疫に着目し、新生児期のボツリヌス菌感染耐性についても解析を進める。

本研究により、これまで未知であった乳児ボツリヌス症発症機構の全容解明のみならず、感染耐性を付与する細菌や代謝物を利用した新規の早期治療法等の開発につながると考えられる。



Clostridium botulinum causes severe neuromuscular disease called botulism, by producing botulinum neurotoxins. Naturally occurring human botulism is classified in three forms: foodborne, wound and intestinal (infant and adult) botulism. Intestinal botulism is an infectious disease caused by *C. botulinum* colonized in the intestine. Although healthy adults are resistance to botulinum infection, *C. botulinum* can colonize in the infant intestine. Host susceptibility factor in infants is thought to be immaturity of intestinal microbiota, however, detailed mechanism is not to be elucidated. Recently, we found a bacterial metabolite inhibits the germination of botulinum spores *in vitro*. Adult mice treated with ampicillin to disrupt microbiota were susceptible to infection of *C. botulinum*, and pre-inoculation of the metabolite-producing bacterium ameliorated botulism symptoms. These findings suggest bacterial metabolite peculiar to adult intestine is a key factor for protection against botulinum infection. In this study, we will explore human intestinal bacteria and metabolites which provide colonization resistance against *C. botulinum*, by analyzing human fecal microbiota transferred mice. We will also analyze feces of intestinal botulism patients to reveal composition of microbiota and metabolites. Results of this study will clarify the mechanism of intestinal botulism pathogenesis, and provide novel therapeutic and preventive targets.

Keywords 1. infant botulism 2. *Clostridium botulinum* 3. intestinal microbiota 4. colonization resistance 5. fecal microbiota transfer

連絡先 小林伸英 email: nobukoba@med.kanazawa-u.ac.jp

研究室情報 URL: <https://www.kanazawa-u-med-bacteriol.net/>

インフルエンザウイルス感染に合併する細菌性肺炎の病態形成機構の解明と新規感染制御法の開発

Elucidation of mechanism underlying exacerbation of bacterial pneumonia following influenza infection for development of preventive and therapeutic measures against superinfection



研究開発代表者

住友 倫子 Tomoko Sumitomo

大阪大学 大学院歯学研究科 講師

Osaka University, Graduate School of Dentistry, Associate Professor

研究開発分担者

川口 敦史

Atsushi Kawaguchi

筑波大学 教授

University of Tsukuba
Professor

住吉 孝明

Takaaki Sumiyoshi

関西大学 准教授

Kansai University
Associate Professor

中田 匡宣

Masanobu Nakata

鹿児島大学 教授

Kagoshima University
Professor

川端 重忠

Shigetada Kawabata

大阪大学 教授

Osaka University
Professor

インフルエンザはウイルス性の呼吸器感染症であるが、肺炎球菌による細菌性肺炎の合併を原因として死亡する高齢者の増加が社会的問題になっている。我々はこれまでに、A型インフルエンザウイルス（IAV）が感染した気道上皮の表層に異所性に誘導される小胞体局在シャペロン GP96 が、二次性細菌性肺炎の発症と病態形成の増悪因子であることを見いだした。本研究では、ウイルス感染気道組織で惹起される炎症応答に着目し、inflamm-agingの表現型を呈するマウス、ならびにヒト病原体センサーが機能するトランスジェニック（TG）マウスを重複感染モデルに応用し、老化と炎症に基づく病態形成機構の解明を試みる。また、増悪因子であるGP96を標的とする化合物スクリーニングの評価系を構築するとともに、プロテインノックダウン技術による創薬展開に挑戦する。

以下に示す3項目に取り組んでいる。

1. ウイルス感染肺組織への細菌の定着を亢進させる分子機構の解明

IAV感染上気道および下気道で生じるストレス応答分子群のトランスクリプトーム解析を行い、二次性細菌性肺炎の重症化に導く宿主因子の探索を行っている。また、上気道から下気道への細菌伝播に関連する細菌因子群をTn-Seq法により検索する。

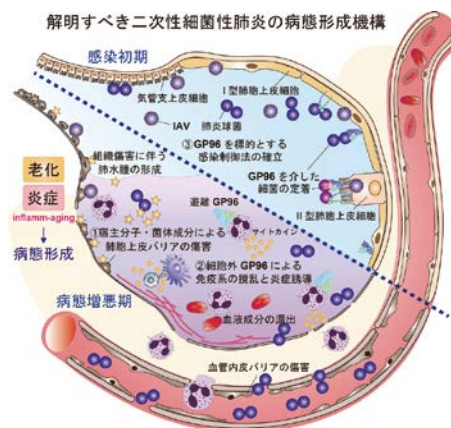
2. 感染気道組織における炎症応答と病態増悪機構の解析

気道上皮特異的な炎症応答を惹起する病原体センサー Mxのヒト遺伝子を導入したTGマウス、ならびにミトコンドリアDNAの大規模欠失によるinflamm-agingの表現型を呈するマウスを用いて感染モデルを構築し、感染宿主における炎症応答と細菌性肺炎の増悪機構の関連を検証する。IAV感染モデルの構築に成功しており、重複感染モデルの構築に着手している。

3. 増悪関連宿主分子を標的とする感染制御法の確立

GP96と細菌表層分子の相互作用を検出する評価系の構築に、水晶振動子マイクロバランス法を応用する。本系を用いて阻害化合物を探索するとともに、標的タンパク質を効率的に分解するPROTAC化合物の創出を進めている。

本研究課題では、細菌学（住友、中田、川端）、ウイルス学（川口）、および医薬品工学（住吉）の連携により、ウイルス感染に合併する細菌性肺炎の感染制御法の確立と実用化を目指し、感染症研究におけるイノベーションの創出に繋げる。



Secondary bacterial pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* following influenza infection has been reported to be associated with considerable rates of morbidity and mortality in elderly individuals. We previously found that GP96 functions as a multifunctional exacerbation factor to promote pneumococcal colonization during secondary bacterial pneumonia following influenza. To gain insight into the mechanism underlying the viral-bacterial synergy for disease progression and to establish effective therapeutic measures for prevention, we propose the following three investigative strategies.

1. Analysis of bacterial dissemination in virus-infected respiratory tract.

To clarify the mechanism responsible for viral infection-induced enhancement of bacterial dissemination, we examine the viral infection-induced transcriptome changes involved in that process. We also attempt to identify responsible bacterial factors using mouse infection models and Tn-seq analyses.

2. Analysis of inflammatory responses in virus-infected respiratory tract and pathogenesis of bacterial pneumonia.

We utilize the human inflammasome sensor protein-transgenic (hMx-Tg) mice and mito-mice to examine the relation between host inflammatory responses and mechanisms that underlie exacerbation of bacterial pneumonia.

3. Development of preventive and therapeutic measures against superinfection.

The quartz crystal microbalance method is applied to the construction of an evaluation system that detects the interaction between identified host molecule, including GP96, and bacterial factors.

Keywords Influenza, Viral-bacterial infection, Pneumonia, Inflammatory response, Development of therapeutic and preventive approaches for infection control

連絡先 住友倫子 email: sumitomo@dent.osaka-u.ac.jp

研究室情報 URL: <https://web.dent.osaka-u.ac.jp/mcrbio/index.html>

COVID-19 関連血栓症のAI血栓識別法の確立と病態解明

Development of an AI-based blood clot characterizer for COVID-19-related thrombosis and elucidation of its physiology with the characterizer



研究開発代表者

西川 真子 Masako Nishikawa

東京大学 医学部附属病院検査部 助教

The University of Tokyo, University of Tokyo Hospital, Laboratory Medicine, Assistant Professor

研究開発分担者

矢富 裕 Yutaka Yatomi

東京大学 教授

The University of Tokyo, Professor

合田 圭介 Keisuke Goda

東京大学 教授

The University of Tokyo, Professor

解決をめざす感染症の課題

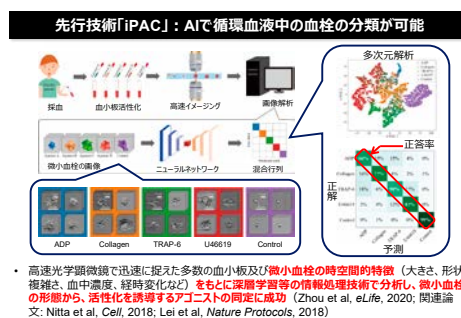
新型コロナウイルス感染症（COVID-19）による肺血栓塞栓症、深部静脈血栓症、脳梗塞、心筋梗塞などの多彩かつ複雑な血栓症は世界的な問題である。日本においても、2020年12月に厚生労働省、日本血栓止血学会、日本動脈硬化学会から共同発表された「COVID-19関連血栓症アンケート調査」によると、重症入院患者の約1-2割に血栓症の発症が認められた。しかし発症メカニズムの解明が進んでおらず、効果的な治療法の確立には至っていない。COVID-19関連血栓症の病態解明が進まない原因として、生体内の微小血栓の構造、組成、及び統計に関する情報を同時に解析することができない、すなわち、血栓の質が診断できない、という臨床検査の限界がある。広く臨床応用され、COVID-19関連血栓症との様々な関連が報告されている血液検査マーカー（Dダイマーなど）は血栓形成の定量評価であり、血栓の質についての診断ツールは世界的にも存在しない。また、Dダイマーの上昇がなくても血栓症の発症が確認されたCOVID-19症例も多数報告されており、DダイマーのみではCOVID-19関連血栓症の診断には不十分である。COVID-19関連血栓症の病態解明と適切な血栓診断ツールの開発は喫緊の課題である。

研究戦略とそれを具体化するための多分野研究者の役割分担、連携

本研究では、2020年に研究分担者である合田、矢富らによって開発された革新的な「インテリジェント血小板凝集塊識別法：intelligent Platelet Aggregate Classifier (iPAC)」(Zhou et al, eLife, 2020 (画像1))の臨床実用機を用いて、COVID-19症例の臨床血液検体の解析を行う。西川が時系列データを取得し、西川と矢富がCOVID-19関連血栓症の病態を解明する。合田が臨床血液検体中の微小血栓プロファイリングと多次元解析、人工知能モデルの最適化を行い、COVID-19関連血栓症の病態解明と適切な血栓診断ツールの開発を目指す。将来的には、本研究で確立する病態理解をもとに、iPACを用いた重症化のバイオマーカーの発見および抗血栓療法の薬効評価法、治療モニタリング法の確立を目指す。

研究の進捗状況

iPACの臨床実用機を東大病院検査部へ導入し、COVID-19症例の臨床血液検査検体を用いて、微小血栓の時系列画像データを取得した。COVID-19感染拡大を受け、2月8日現在で既に重症19例、中等症67例、軽症26例（東京都重症度分類）の時系列画像データ、臨床情報、Dダイマーなどの検査値データの取得が済んでいる。比較対象として、血栓症症例（脳梗塞、心筋梗塞、深部静脈血栓症、肺塞栓症）および敗血症症例の画像データ取得も並行して行っている。また、血栓形成の刺激物質（アゴニスト）を同定するために、血小板刺激アゴニストを添加し作成した微小血栓の画像データを取得し、微小血栓の分類に用いる混合行列データセットを作成している。



The pathogenesis of COVID-19-related thrombosis has not yet been elucidated, and effective treatment methods have not yet been established, although the variety and complexity of thrombosis caused by COVID-19 is a worldwide problem. One of the reasons for the lack of understanding of the pathogenesis of microthrombi is the inability to simultaneously analyze the structure, composition, and statistics of microthrombi in vivo (i.e., the inability to diagnose the quality of the thrombus).

In this study, we aim to analyze clinical specimens from COVID-19 patients using iPAC, and conduct clinical studies to optimize iPAC for COVID-19-associated thrombosis, in order to elucidate the pathogenesis of the disease, to evaluate the efficacy of antithrombotic therapy, and to establish treatment monitoring methods. Specifically, the project will involve: (1) acquisition of clinical sample data from patients; (2) development, optimization and demonstration of iPAC most suitable for the diagnosis of COVID-19-related thrombosis; (3) analysis of microthrombi in clinical samples using iPAC; (4) analysis of COVID-19-related thrombi to elucidate the pathogenesis of the disease; (5) evaluation of drug efficacy and establishment of treatment monitoring methods using compact iPAC.

Keywords 1. COVID-19 2. Thrombosis 3. Deep learning 4. Pathophysiology 5. Evaluation technology
6. Global study 7. Artificial intelligence 8. Imaging
連絡先 西川真子 email: msknishikawa-ky@umin.ac.jp
研究室情報 URL: http://lab-ky.umin.jp/

薬剤耐性菌を殺菌する広宿主域バイオリジクスの開発

Development of broad-host-range biologics capable of killing drug-resistant bacteria.



研究開発代表者

氣駕 恒太郎 *Kotaro Kiga*

自治医科大学 感染・免疫学講座 細菌学部門 講師

Jichi Medical University, Division of Bacteriology, Department of Infection and Immunity, Lecturer

研究開発分担者

鈴木 仁人 *Masato Suzuki*

国立感染症研究所 主任研究官

National Institute of Infectious Diseases
Senior Researcher

新谷 政己 *Masaki Shintani*

静岡大学 准教授

Shizuoka University
Associate Professor

末次 正幸 *Masayuki Suetsugu*

立教大学 教授

Rikkyo University
Professor

薬剤耐性菌は世界規模で蔓延している。WHO（世界保健機関）は、耐性菌対策を講じないと2050年には、現在のがんによる死者よりも多い年間1,000万人が耐性菌によって死亡すると予測している。そして耐性菌による2050年までの経済的損失は100兆ドル（1京円以上）になると見積もられている。この状況下、世界各国で薬剤耐性対策アクションプランが策定され、幸いにも耐性菌の一部は年々減少傾向にある。しかし、これらの努力とは裏腹に、『薬剤耐性プラスミドに起因する耐性菌』は増え続けている。薬剤耐性プラスミドは「菌種を越えて伝播する」ため、その拡散を抑える手立てはない。

このような中、我々は新谷（分担研究者）らが環境試料より取得した“超広宿主域プラスミド”に着目した。当該プラスミドは、臨床上最も深刻な耐性菌群にも接合伝達によって伝播する。本研究では、この超広宿主域プラスミドにCRISPR-Cas13を搭載することで、“広範な薬剤耐性菌を殺菌できる細菌製剤”を開発する（画像1）。この開発には、①CRISPR-Cas13（氣駕）、②超広宿主域プラスミド（新谷）、③長鎖DNA合成（末次）、④シングルセル解析（鈴木）といった多分野のメンバーが携わる。

本研究ではCRISPR-Cas13の遺伝子特異的な標的細菌の増殖抑制能を利用する。これまで我々はレプトトリキア・シャヒイ由来のCas13を利用していたが、氣駕は研究室でシークエンス解析した別のレプトトリキア属のCas13の活性がより強いことを確認し、現在その詳細を解析している。新谷は超広宿主域PromA群プラスミドの環境試料由来の細菌群における宿主域を明らかにしつつある。また、現在当該PromA群プラスミドの各宿主における安定性など、性状分析を行っている。末次は新谷らが単離した超広宿主域プラスミドの合成を、独自の長鎖合成法によりスタートさせた。その後の解析に必要なマーカー遺伝子（GFP）や、*in vitro* プラスミド増幅に必要な配列（oriC）の挿入箇所を検討した。鈴木はプラスミド伝播の問題となっているカルバペネム耐性大腸菌のゲノム解析を行い、カルバペネムのgenotypeを調べた。また、*in vivo* 実験用に予めマウスの腸内細菌叢を調べると同時に、PromA群プラスミドがマウスの体内に存在しないことを確認した。

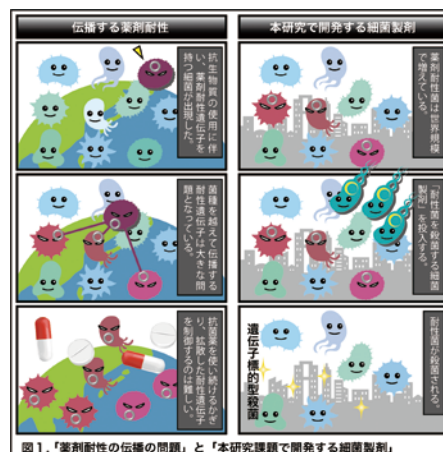


図1.「薬剤耐性の伝播の問題」と「本研究課題で開発する細菌製剤」

Drug-resistant bacteria are spreading globally; with the World Health Organization estimating that 10 million more people will die from drug-resistant bacteria annually by 2050, outpacing the death toll from cancer today, if no action was taken. Additionally, the economic cost of resistant bacterial infections is estimated to be \$100 trillion by 2050. Fortunately, some of the resistant bacteria is decreasing in number year by year, as countries around the world started developing action plans to combat drug resistance. However, the number of drug-resistant bacteria continue to rise despite these efforts due to the acquisition of drug-resistant plasmids. There is currently no way to curb the spread of drug-resistant plasmids, as they can be transmitted across species.

Under these serious circumstances, we focused on an "ultra-broad-host-range PromA group plasmid" obtained from environmental samples by Dr. Shintani who is a co-investigator of this project. The plasmid was found to be transferred by conjugation to most of the clinically important resistant bacteria. In this study, we will be developing a "bacterial biologics" capable of killing a wide range of drug-resistant bacteria by loading CRISPR-Cas13 to the ultra-broad-host-range plasmid. Researchers from a variety of disciplines will be involved in the developmental of such biologics, including Dr. Kiga who will be working on CRISPR-Cas, Dr. Shintani on ultra-broad-host-range plasmid, Dr. Suetsugu on *in vitro* synthesis of genome-scale DNA and Dr. Suzuki on single cell analysis.

Keywords AMR, Antibacterial therapy, bacterial flora, CRISPR-Cas, genotyping of bacteria, broad-host range plasmid, Hi-C analysis

連絡先 氣駕恒太郎 email: k-kiga@jichi.ac.jp

研究室情報 URL: <http://www.jichi.ac.jp/bacteriology/>

革新的天然物創製法に基づく薬剤耐性菌に対する 抗菌薬リード化合物の開発

Development of novel antibiotic lead compounds for intractable bacteria based on innovative natural product discovery approach



研究開発代表者

浅井 禎吾 Teigo Asai

東北大学 大学院薬学研究科 教授

Tohoku University, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor

研究開発分担者

星野 仁彦 Yoshihiko Hoshino

国立感染症研究所 室長

National Institute of Infectious Diseases
Division Chair

鈴木 仁人 Masato Suzuki

国立感染症研究所 主任研究官

National Institute of Infectious Diseases
Senior Researcher

太田 邦史 Kunihiro Ohta

東京大学 教授

The University of Tokyo
Professor

世界を震撼させている新型コロナウイルス感染症など、新興・再興感染症は世界の公衆衛生上重大な問題となっており、それらの治療薬の開発は国際的に喫緊の課題である。中でも、治療が困難な薬剤耐性細菌や非結核性抗酸菌（NTM: nontuberculous mycobacteria）に対する創薬は長く停滞しており、新たな戦略による抗菌薬開発が望まれている。

微生物が生産する天然物から、ペニシリンやエリスロマイシンをはじめ数多くの抗生物質が同定されており、今でも抗菌薬の最も重要な医薬資源として認識されている。一方で、これまでに構築された天然物ライブラリーや抽出物ライブラリーが抗菌活性スクリーニングに供されてきたが、薬剤耐性細菌やNTMの難治性細菌に対する有望な治療薬は見出されていないのが現状である。そこで本研究では、糸状菌ゲノム上に膨大に存在する天然物生合成遺伝子資源を、TAQingシステムを基盤とする大規模ゲノムシャッフリングによる二次代謝活性化とゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法による天然物創製の2つの方法で活用する革新的天然物創製と豊富な臨床分離株や各種薬剤耐性株を利用した臨床に即した活性評価を融合させることで、薬剤耐性の菌を含む難治性細菌に対する新規標的の発見および抗菌薬リード化合物の開発を目的として研究を進めている。本班会議では、TAQingシステムを用いた二次代謝活性化法の開発状況を中心に報告する。加えて、合成生物学的手法を用いた天然物創製の進捗と天然物の活性評価に関して報告する。

TAQingシステムを用いた二次代謝活性化法の開発は、モデル糸状菌である *Aspergillus nidulans* を用いて検討を行っている。核移行シグナルと融合した TaqI 遺伝子を *A. nidulans* で発現させたのち、TaqI のDNA切断活性を誘導するための熱処理条件を種々検討した。その結果、TaqI 遺伝子の形質転換時に40℃で熱処理した株で、顕著な形質の変化が確認された（図1）。また、親株と二次代謝の組成も変化することが確認された。現在、再現性の確認やゲノム再編成が生じているかなど調査している。

また、これまでに獲得した天然物160種について、網羅的に活性評価を行なった結果と、合成生物学的手法による新規天然物創製の進捗状況についても報告する。

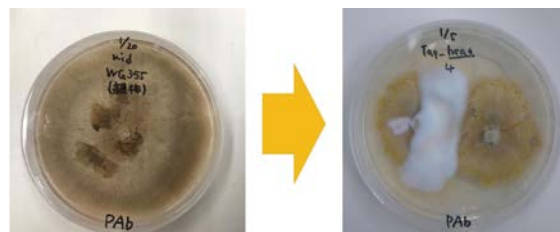


図1. *Aspergillus nidulans* の形質変化

Discovery of new drug seeds for emerging and re-emerging infectious disease is a global urgent issue. Natural product is one of the most attractive source for antibiotics. Thus, we aimed to prepare a novel natural product library by using synthetic biology-based approach and a genome shuffling technique "TAQing system" from a tremendous biosynthetic gene resource. In the previous meeting, we reported about synthetic biology production of macrolide natural products and its synthetic analogs and evaluated their anti-bacterial activities against drug resistant-microbials and nontuberculous mycobacteria. In this meeting, we will report the results of development of a method for inducing fungal cryptic natural product biosynthesis by using "TAQing system".

Introduction of TaqI into *Aspergillus nidulans* and the transformant was stimulated under heating conditions to activate DNA cleavage activity. We tried several heating conditions and found a different phenotype. The phenotype showed different secondary metabolite profile from that of wild type. In addition to the result of TAQing system, we will show the result of screening of natural products for antibacterial activity.

Keywords Natural products, Synthetic biology, Genome shuffling, Antibiotics

連絡先 浅井 禎吾 email: teigo.asai.c8@tohoku.ac.jp

研究室情報 URL: http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/asai_lab/

複雑性創出型化学／生物ハイブリッド合成に基づく 赤痢アメーバ治療薬創製

Development of anti-amoebic dysentery drug stand on complexity generating chem/biological hybrid synthesis



研究開発代表者

恒松 雄太 Yuta Tsunematsu

静岡県立大学 薬学部 講師

University of Shizuoka, Department of Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor

研究開発分担者

野崎 智義 Tomoyoshi Nozaki

東京大学 教授
University of Tokyo
Professor

森 美穂子 Mihoko Mori

東京大学 客員研究員
University of Tokyo
Visiting researcher

住井 裕司 Yuji Sumii

名古屋工業大学 助教
Nagoya Institute of Technology
Assistant Professor

解決をめざす感染症の課題

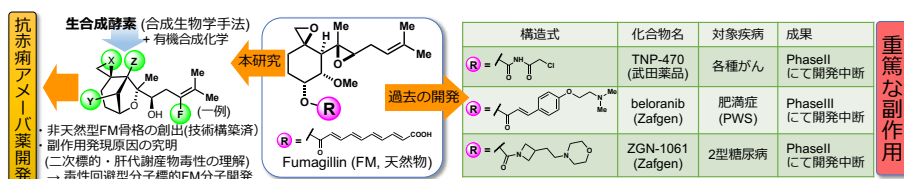
感染症の課題：赤痢アメーバ症は世界人口の約1%に感染する腸管感染原虫症であり、その死者数はマラリアに次ぎ世界第二位を占める（約10万人/年）。現行薬剤はニトロイミダゾール系化合物のみで、熱帯周辺の浸淫地域では遺伝毒性などの副作用や薬剤耐性化が既に認められる。つまり本疾病に対し、より安全かつ安価な薬剤開発が必要である。分担者野崎・森らは天然物フマガリン（FM）に既存薬を上回る抗赤痢アメーバ活性を見出し、肝膿瘍モデル動物での治療効果を示した。**候補薬物の課題：**一方、FM誘導体は30年以上前から各種がん（第二相で中断）や肥満症（第三相で中断）に対して臨床開発が行われてきたが、神経毒性などの副作用のため未だ上市には至っていない「惜しい」薬剤候補である。長年にわたり合成展開等の企業努力が注がれたであろうが、そのアウトカムから判断すると、FM骨格をベッドへと届けるためには既存戦略とは異なる改革の手法が必要と考えた。

研究戦略とそれを具体化するための多分野研究者の役割分担、連携

開発代表者（恒松）はFM分子生合成解明研究を通じ、非天然型FM分子導出技術を構築した。この技術のミソは、かつての創薬研究にて合成展開が困難であったテルペン部（活性ファーマコフォア）について、簡単な遺伝子操作での人工改変を可能とした点にある。そこで、革新的FM分子構築法を樹立した恒松を中心に、種々の熱帯病に関する生物医科学を専門とする分担者（野崎・森）、これまでのFM臨床開発にて壁となった「毒性問題」に対し、薬物代謝学・毒性学・天然物生合成工学の技術融合での解決に取り組む分担者（志津伶太、静岡県大薬・助教）、ヘテロ原子を活用した有機・酵素ハイブリッド合成を基盤として毒性回避型薬剤開発に挑む分担者（住井）、以上の多分野連携にて赤痢アメーバ治療薬開発を行う。なお、本研究にて構築する独自のFM関連分子や毒性機序知見は、FMが過去に治療薬候補となった他の疾病（例：マラリア、がん、糖尿病）における新薬開発にも波及効果をもたらす。

研究の進捗状況

新規FM分子へと至る生合成経路をデザインし、異種発現用プラスミドを作製した。続いて遺伝子組み換え微生物株を構築し、目的化合物を含む複数のFM類縁化合物の生産を確かめた。一部の化合物については単離・構造確認を行い、抗赤痢アメーバ活性を示すことを確認した。現在、本活性を指標に高活性化合物から優先的に精製・構造確認を行っている。化学／生物ハイブリッド合成に向け、非天然型基質の化学合成に着手した。毒性解明については、(1) FM関連分子のin vitroにおける薬物代謝追跡を実施し、(2) 哺乳動物細胞培養系にて試験を開始した。



Amoebiasis is a protozoan infection of the intestinal tract that affects about 1% of the world's population. The approved drugs, metronidazoles, are not satisfactory due to genotoxicity and drug resistance that have been observed in the highly immersed tropical area. We recently found a natural product, fumagillin (FM), exhibits potent anti-amoebic activity and its therapeutic efficacy in animal models of liver abscesses. FM-related molecules have been clinically developed to treat cancer (e.g., TNP-470) and obesity (beloranib, phase III suspended) for the past 30 years, albeit they have not yet been marketed due to adverse effects such as neurotoxicity. We strongly believe that a radical reformation in the methodology of drug development will be required for the FM-based drug to be delivered to the patients. We here challenge a synthetic biology-oriented complexity generation in the FM's terpene scaffold where the synthetic strategy was not applicable in the past. Also, we utilize biosynthesized FM probes to determine the structure-target molecule(s) relationship to unclear how FMs, or their hepatic metabolites, cause the adverse effects. Further, we aim to develop heteroatom-containing drug harboring less toxicity and resistance to metabolism by chem-bio hybrid synthesis.

Keywords Synthetic biology, Amoebiasis, Fumagillin, Natural product-based drug discovery, Chem-Bio hybrid synthesis
連絡先 恒松雄太 email: tsunematsu@u-shizuoka-ken.ac.jp
研究室情報 URL: https://swab.u-shizuoka-ken.ac.jp/~kenji55-lab/

流行地マラリア原虫株を用いた遺伝学とビッグデータ解析を基盤とした多分野融合研究によるアルテミシニン耐性機構の解明

Genetic dissection of artemisinin resistance of malaria parasites by combination of genetics and bioinformatics with field-isolate strains.



研究開発代表者

新澤 直明 *Naoaki Shinzawa*

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 助教

Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Assistant Professor

研究開発分担者

糸川 健太郎 *Kentaro Itokawa*

国立感染症研究所

National Institute for Infectious Diseases

小林 大介 *Daisuke Kobayashi*

国立感染症研究所

National Institute for Infectious Diseases

マラリアは年間約2億人の感染者と40万人の死者を出す再興感染症である。現在、その治療はアルテミシニン併用療法に依存している。しかし近年、アルテミシニン耐性原虫株の出現がカンボジアを始めとした各地で報告され、その対策が喫緊の課題となっており、アルテミシニン耐性機構の解明はマラリア制圧のための最重要課題の一つである。2014年にカンボジア由来株を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、Kelch13遺伝子多型 (K13多型) がアルテミシニン耐性遺伝子の一つであることが報告されている。一方、我々は、タイ由来株を用いた解析においてK13多型を持たない耐性株を見出している。このようにアルテミシニン耐性遺伝子および機構は複数が独立してあるいは協奏的に関与することが示唆されている。

K13多型の発見に利用されたGWASはマラリア原虫薬剤耐性の研究で多用されるが、原因遺伝子や機構が複数ある場合には適していない。そこで、本研究では、アルテミシニン耐性株と感受性株の交雑による遺伝的連鎖解析を計画した。アルテミシニンに対する耐性強度 (IC50値) と遺伝子発現データを量的形質としたQTL解析・ゲノムワイドeQTL解析と続くゲノム編集による逆遺伝学解析によって、アルテミシニン耐性遺伝子および耐性機構遺伝子ネットワークを明らかにし、アルテミシニン耐性機構の解明を目指す。

上記計画には、①熱帯熱マラリア原虫の遺伝的交雑を行う実験技術・設備、②ビッグデータ解析 (QTL解析、ゲノムワイドeQTL解析)、③マラリア原虫におけるゲノム編集、が必要となる。マラリア原虫の遺伝的交雑は異なる系統の原虫を同時に媒介蚊へと感染させることで行うが、国立感染症研究所・昆虫医科学部には、国内では数少ないヒト病原性を示すBSL2病原体を保有するベクター蚊に関する高度安全実験設備があり、分担者・小林大介は蚊への人工吸血法など衛生昆虫学に関する十分な知識・技術を持っている。また、分担者・糸川健太郎は、バイオインフォマティクスを用いたビッグデータ解析の専門家であり、病原体ゲノム解析にも十分な経験を持つ。代表者・新澤直明は、これまでにマラリア原虫の高効率ゲノム編集法を開発し、自身もインフォマティクス解析に精通している。この計画は、流行地株の利用、古典的遺伝学、衛生昆虫学、ビッグデータ解析、最先端遺伝学を組み合わせ、さらに、病原体高度安全施設の利用により初めて成立する感染症研究ならではの多分野融合研究であり、感染症研究を一つ上の研究段階へと引き上げる革新的な成果をあげることが期待される。

本年度は、遺伝的連鎖解析の準備段階として、熱帯熱マラリア原虫の媒介蚊人工吸血法を試み、さらに高精度なQTL解析のために必要な親株の全ゲノム解析を行った。これらの成果により、異なる原虫株を用いた遺伝的連鎖解析の準備は整ったといえる。

Malaria is a re-emerging infectious disease that causes about 200 million infections and 400,000 deaths annually. Currently, the treatment relies on artemisinin-combination therapy. However, in recent years, the emergence of artemisinin-resistant strains has been reported. Elucidation of the artemisinin resistance mechanism is one of the most important issues for controlling malaria. A genome-wide association study (GWAS) using endemic strains in Cambodia reported that the K13 polymorphism is one of the artemisinin resistance genes. On the other hand, we have found a K13-polymorphism-independent resistant strain in Thai-derived strains, suggesting that multiple artemisinin resistance genes and mechanisms are involved independently or synergistically. In this study, we planned a genetic linkage analysis by genetically crossing an artemisinin-resistant strain and a susceptible strain, which clarify the artemisinin resistance gene and the resistance-related gene network by the combination of QTL analysis and genome-wide eQTL analysis with the IC50 to artemisinin and gene expression profile as respective quantitative traits. Subsequent reverse genetics analysis with genome editing reveals the gene and gene-network. This project combines the field research, classical and advanced genetics, entomology, bioinformatics. The goal of this project is to bring drug resistance research in malaria research to a higher scientific level.

Keywords 1. Malaria 2. Artemisinin 3. Drug resistance 4. Genetic Linkage Analysis
5. Bioinformatics 6. Genome editing

連絡先 新澤直明 email : shinzawa.vip@tmd.ac.jp

研究室情報 URL : <http://www.tmd.ac.jp/dept/medicine/vip/index.html>



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

要旨は、原文通り記載させていただいております。
掲載されている文章及び図(解)の無断転用・転載を禁止します。

疾患基礎研究事業部 疾患基礎研究課