

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2017～2022

課題番号：15K21770

研究課題名（和文）人工バクテリオファージの創出～薬剤耐性細菌感染症治療とヒト細菌叢編集への応用～

研究課題名（英文）Creation of Synthetic Bacteriophages -Treatment of Drug-Resistant Bacterial Infections and Human Microbiota Editing-

研究代表者

安藤 弘樹 (ANDO, Hiroki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：70462786

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 44,000,000円

研究成果の概要（和文）：バクテリオファージのゲノムをDNA断片から構築して、機能的なファージを起動することができる「Synthetic Engineering Platform」（ファージ合成改変プラットフォーム 2.0）を開発した。本プラットフォームを用いて様々な合成改変ファージを創出した。ファージ療法や細菌叢編集における改変ファージの利用を実現するために、生物学的封じ込め法も開発した。生物学的封じ込め策を施したファージは、ファージ療法実験において野生型ファージと遜色ない治療効果を示した。本研究成果について、特許出願及び論文公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なファージを改変して起動できるプラットフォームは、ファージの基礎研究・応用研究を推進する。また、ファージの生物学的封じ込めは、例えば、改変型ファージの研究室外での利用を考えた際に有力な拡散防止策になりえる。本プラットフォームと生物学的封じ込め法はファージ生物学と関連分野における新しい基盤技術になるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：The "Synthetic Engineering Platform" was developed. The platform can construct bacteriophage genomes from DNA fragments and reboot functional phages. A variety of synthetic phages was created. In addition, biological containment methods were developed to enable the use of synthetic phages in, for example, phage therapy and microbiota editing. Biocontained phages showed therapeutic effects comparable to those of wild-type phages in phage therapy experiments. I have filed a patent application and published a paper on the results of this research.

研究分野：合成生物学

キーワード：バクテリオファージ 合成生物学 ファージ療法 ファージセラピー

1. 研究開始当初の背景

細菌はヒトの健康と疾病に密接に関わっている。例えば、病原細菌は感染症や食中毒を引き起こすし、ヒトが持つ細菌叢は健康、疾病、性格にまで影響を及ぼすことが知られている。したがって、病原細菌や、いわゆる善玉菌・悪玉菌と言われる細菌群を制御することは重要である。しかし、正確に自由に細菌群を制御・編集できる方法は存在しない。抗菌薬は、細菌感染症の治療や予防などに有効であるが、一般的に広域スペクトルを有するため、標的細菌だけを殺す、もしくは標的細菌だけを残すことができない。また、世界規模で薬剤耐性菌が蔓延し、一方で新たに認可される抗菌薬は減り続けており、抗菌薬の代替となる特効薬の開発が望まれている (*Science*, 325(5944):1089-1093, 2009)。

このような状況で、細菌の天敵ウイルスである「バクテリオファージ」を利用してこれらの問題を解決しようという動きが活発化している。ファージは細菌にのみ感染するウイルスである。地球上で最も豊富な生命体様構造物と言われており、自然環境中はもちろん、ヒトの体表や体内にも存在している (*Curr Opin Microbiol*, 6(5):506-511, 2003)。

ファージには細菌群を正確に自由に制御・編集できる可能性がある。しかし、ファージを利用するためには克服しなければいけない課題も多い。例えば、自然環境から得た野生型ファージの安全性の問題である。ファージの中には毒素遺伝子を持つものや標的細菌の遺伝子を積極的に水平伝播するものも存在する。このような遺伝子や機能はあらかじめ除く必要がある。そして、この改変のために必要な分子遺伝学的手法が極めて限られているのも大きな課題である。遺伝子を欠失・欠損させる方法や、有用な遺伝子等を搭載させるための手法が必要である。

研究代表者は、これらの問題を解決してファージの実世界での応用を目指す研究を実施している。これまでに、酵母内でファージゲノムを構築し、機能的なファージを起動させることができる「Phage Engineering Platform」(プラットフォーム 1.0)を開発し、この技術を用いて「人工ファージ」のプロトタイプを創出した (*Cell Systems*, 1(3):187-196, 2015)。これによって、例えば、安全性が保証されたファージをもとに、宿主特異性だけが異なる「人工ファージカクテル」を創ることが可能になった。

2. 研究の目的

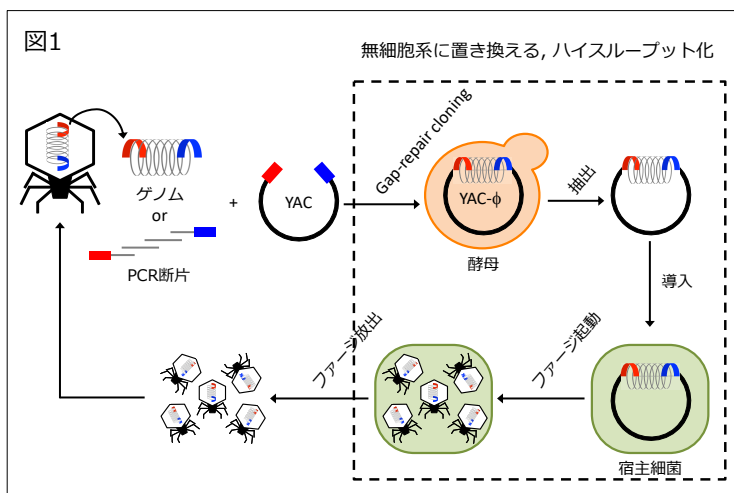
研究代表者が開発したプラットフォーム 1.0 を発展させた革新的基盤技術を確立し、実世界での利用を目指したオーダーメイドによる人工ファージの創出と応用研究を展開する。薬剤耐性細菌感染症やヒト細菌叢編集などを念頭に置き、オーダーメイド人工ファージを用いた次世代の治療法・予防法の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 次世代プラットフォームの開発

研究代表者は人工ファージをデザインして創ることのできるプラットフォーム 1.0 を開発した(図1)。プラットフォーム 1.0 はモデルファージをベースにした人工ファージを創出するには十分であるが、非モデルファージをベースにして、より柔軟にオーダーメイド人工ファージを創出することは難しい。その理由として、プラットフォーム 1.0 が酵母と宿主細菌という二種類の生物を必要とすることが挙げられる。

プラットフォーム 1.0 の最大の律速であり、ハイスルーブット化を妨げる要因にもなっている。また、ファージが起動しなかった場合、その原因がどこにあるのかが分かりにくい系である。そこで、これら生物を必要とする部分を無細胞系で置き換える。すなわち、酵母における gap-repair cloning、宿主細菌におけるデザイナーファージゲノムの複製、転写、翻訳、起動を無細胞系によって行う。これによって、より迅速、簡便、効率的なゲノムの再構築と人工ファージの起動が可能になる。また、無細胞系を使うことによって、例えば 96 穴プレートなどを用いたハイスルーブット化が可能になる。いくつかの先行研究 (*Nature*



によって、より迅速、簡便、効率的なゲノムの再構築と人工ファージの起動が可能になる。また、無細胞系を使うことによって、例えば 96 穴プレートなどを用いたハイスルーブット化が可能になる。いくつかの先行研究 (*Nature*

Methods, 6(5):343-345, 2009., ACS Synth Biol, 1(9):408-413, 2012) を参考にしながら、Gibson Assembly (NEB) などの使用も検討する。

(2) 人工ファージの創出

初めに概念実証実験として、大腸菌を宿主とするモデルファージ T7 と T3 を起動させる。基本的には研究代表者が既に報告した内容 (Cell Systems, 1(3):187-196, 2015) の再現性をとる形で、次世代プラットフォームが機能することを確認する。次に、非モデルファージを対象にして、改変を試みる。また、宿主細菌も大腸菌だけでなく、様々な細菌種を対象にする。

(3) 人工ファージの精査

創出した人工ファージの遺伝子型と表現型を調べる。遺伝子型については、ゲノム配列を読むことでデザイン通りに構築されているか、変異が入りやすい場所があるかなどを調べる。表現型については、例えば、標的細菌に対する感染効率、溶菌効率、生活環、宿主域、デザイン通りの機能性を発現しているか、などについて調べる。

(4) ファージ療法と細菌叢編集

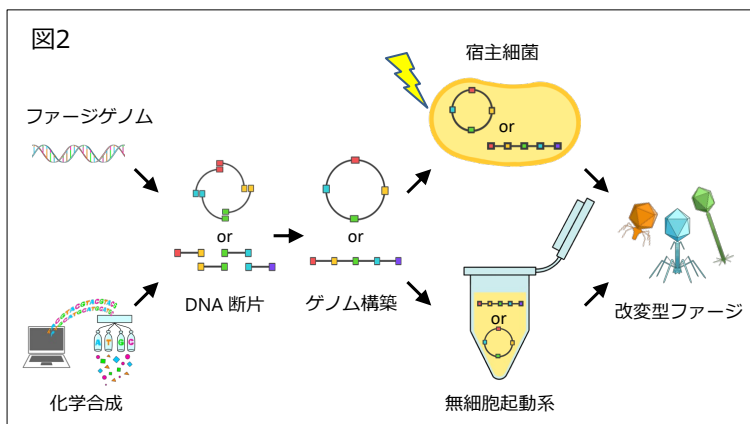
ファージ療法実験では、病原細菌によるマウス敗血症モデルやマウス皮膚炎モデルを想定している。親株 (野生型ファージ) と比べて、人工ファージが優位性を示すことができるかを判定する。細菌叢編集実験では、無菌マウスの腸内に複数種の細菌 (うち、少なくとも一種は標的細菌) を定着させてノトバイオート化し、ここに人工ファージを経口投与することで腸内細菌叢を編集することができるか否かを調べる。また、16S rRNA 解析によってマウスの腸内細菌叢を把握し、これが人工ファージによってどのように編集されるかを調べる。

4. 研究成果

(1) 次世代プラットフォームの開発

In vitro で DNA 断片からファージゲノムを構築し、これを無細胞系もしくは適切な宿主細菌へ

導入することで機能的なファージを起動させることに成功した (図 2)。これを「Synthetic Engineering Platform」(合成改変プラットフォーム 2.0) と名付けた。プラットフォーム 1.0 では、酵母内でファージゲノムを維持するために酵母ベクターと連結する必要があった。しかし、プラットフォーム 2.0 はその必要がなく、真にデザイン通りのゲノムを構築することができる。

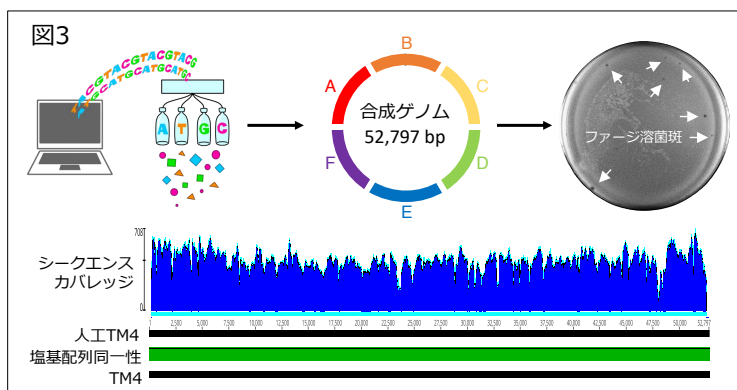


(2) 人工ファージの創出

プラットフォーム 2.0 を用いて、以下 ① ② ③ ④ に代表される様々なファージをデザインして起動した。

① 遺伝子の欠失、挿入、置換などを施したファージ。具体的には、宿主特異性を変えたファージ、溶原遺伝子を欠失させて溶菌性へ転換したファージ、レポーター遺伝子を搭載したファージ、CRISPR-Cas を搭載して塩基配列特異的殺菌ができるファージ、など。プラットフォーム 2.0 の汎用性、迅速性、効率性、を確認した。また、複数の改変を同時に、一回の操作で完了できることの優位性を確認した。

② 保有していないファージをデータベースに登録されているゲノム情報から創出することを試みた。具体的には、抗酸菌に感染するファージ TM4 のゲノム配列 (52,797 bp) をダウンロードし、プラットフォーム 2.0 で再構築できるよう六分割する形でデザインして、化学合成した。合成 DNA をプラットフォーム 2.0 で環状ゲノムとして再構築し、これを適切な宿主へ導入することで機能的な人工



TM4を起動した。ゲノムシーケンスの結果、人工TM4は一塩基の違いもなくデザイン通りのゲノムを持っていた(図3)。この結果は、機能的なゲノム配列があれば、ファージを起動することが可能であり、原理的にはコンピューターでデザインした完全なテラーメイドファージの創出が可能であることを示している。

③ 大腸菌の無細胞転写翻訳系と組み合わせて、ゲノム構築からファージ起動までの全工程を*in vitro*で、生物を介さずに実施できることを示した。

④ 改変型ファージの応用(研究室外での使用)を考えて、生物学的封じ込め法を開発した。具体的には、ファージを形作るために必要な遺伝子(例えば頭部遺伝子、尾部遺伝子)を欠失したゲノムを構築し、これを、欠失した遺伝子を発現する宿主細菌へ導入する。菌体内では機能的なファージが形成されるが、ファージ頭部に格納されるゲノムは当該遺伝子を欠くものである。したがって、この系で産生されるファージは感染能も殺菌能も持つが、子ファージを産生することができない一代限りのものである。詳細は後述するが、「生物学的封じ込めファージ」は適切に用いることで野生型ファージと遜色ない機能性を発揮した。

(3) 人工ファージの精査

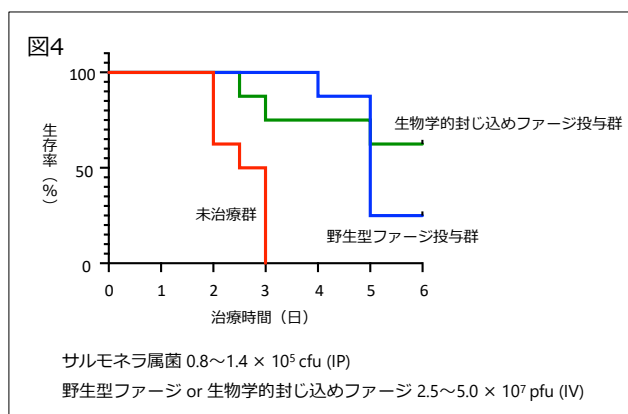
野生型を含む、創出した全てのファージに対してゲノムシーケンスを実施した。また、感染効率、溶菌効率、生活環、宿主域、デザイン通りの機能性を発現しているか、などを確認した。一塩基の違いもなくデザイン通りのゲノムを持つものもあれば、特定の箇所に変異が集中するものなどもあった。また、予想に反して宿主域が狭くなったり、溶菌性が低下したり、付加した機能性を発現できないものもみられた。これらの結果は、デザインルールのアップデートや宿主細菌の選定などが必要であることを示しており、今後の課題だと考えている。

(4) ファージ療法と細菌叢編集

機能性を高めた改変型ファージの応用を想定し、生物学的封じ込めファージを用いたファージ療法実験を行った。具体的にはサルモネラ属菌を使ったマウス敗血症モデルを採用し、ファージ療法の有効性を調べた(図4)。生物学的封じ込めファージは未治療対象群と比べて有意に致死率を低下させた。これは、生物学的封じ込めファージのベースとなっている野生型ファージと遜色ない結果であった。増殖能を欠いた生物学的封じ込めファージであっても適切な投与によって治療できることを示した。また、マウスから血液等を採取して、生物学的封じ込めが維持されているか調べたところ、増殖能を獲得した生物学的封じ込めファージは観察されなかった。これらの結果は、生物学的封じ込めファージがマウス体内でも増殖能を欠いた状態で維持され、標的細菌を野生型ファージと同等の効率で殺菌したことを示すものである。

細菌叢編集実験については、本研究期間内に実施することができなかった。今後、人工ファージ、生物学的封じ込めファージを用いて実施する予定である。

本研究では、ファージを改変するプラットフォーム2.0を開発し、実際に多数の人工ファージ、改変型ファージを創出した。また、これら改変型ファージの応用を考え、強い拡散防止策になりえる生物学的封じ込め法を開発した。本研究で扱っていないファージ種はまだまだ沢山あり、デザインルールのアップデートや機能性発現の仕組みづくりなど課題も多いが、本研究成果はファージ生物学と関連分野における新しい基盤技術になるものだと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimamori Yuzuki, Pramono Ajeng K., Kitao Tomoe, Suzuki Tohru, Aizawa Shin-ichi, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Takeda Shigeki, Ando Hiroki	4. 巻 78
2. 論文標題 Isolation and Characterization of a Novel Phage SaGU1 that Infects Staphylococcus aureus Clinical Isolates from Patients with Atopic Dermatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 1267 ~ 1276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00284-021-02395-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimamori Yuzuki, Mitsunaka Shoichi, Yamashita Hiroataka, Suzuki Tohru, Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Takeda Shigeki, Ando Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Staphylococcal Phage in Combination with Staphylococcus epidermidis as a Potential Treatment for Staphylococcus aureus-Associated Atopic Dermatitis and Suppressor of Phage-Resistant Mutants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13010007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsunaka Shoichi, Yamazaki Kohei, Pramono Ajeng K., Ikeuchi Megumi, Kitao Tomoe, Ohara Naoya, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Ando Hiroki	4. 巻 119
2. 論文標題 Synthetic engineering and biological containment of bacteriophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2206739119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 18件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 バクテリオファージ合成改変プラットフォーム 2.0
3. 学会等名 JMBC第7回アカデミア交流会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 満仲翔一、安藤弘樹
2. 発表標題 バクテリオファージを改変創出する汎用技術及び生物学的封じ込め法の開発
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島守祐月、満仲翔一、山下弘高、鈴木徹、北尾公英、久堀智子、永井宏樹、武田茂樹、安藤弘樹
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎に係る黄色ブドウ球菌に対する表皮ブドウ球菌併用ファージセラピー
3. 学会等名 日本ファージセラピー研究会第1回研究集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 飛び込んだ！飛び出した？ファージと合成生物学の世界
3. 学会等名 ウイルス若手研究集会2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 ファージ療法の100年 歴史的背景から人工ファージの創出まで
3. 学会等名 第37回JBICバイオ関連基盤技術研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 満仲翔一、安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピーの社会実装に向けた合成生物学的なアプローチ
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島守祐月、鈴木徹、満仲翔一、相沢慎一、山下弘高、Ajeng Pramono、久堀智子、永井宏樹、北尾公英、武田茂樹、安藤弘樹
2. 発表標題 アトピー性皮膚炎由来黄色ブドウ球菌に対する表皮ブドウ球菌併用ファージセラピーの検証
3. 学会等名 第65回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島守祐月、鈴木徹、満仲翔一、斎藤真澄、葛井一宏、武田茂樹、久堀智子、永井宏樹、安藤弘樹
2. 発表標題 ファージによるアトピー性皮膚炎における皮膚細菌叢制御の試み
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 次世代バクテリオファージセラピー
3. 学会等名 第94回日本感染症学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 The age of phage 歴史的背景から人工ファージの創出まで
3. 学会等名 第19回ウイルス学夏の学校みちのくウイルス塾（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピーの実用化に向けた取り組み
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsunaka Shoichi, Yamazaki Kohei, Kitao Tomoe, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Ando Hiroki
2. 発表標題 Creation of bio-contained bacteriophage for the practical application of phage therapy
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 満仲翔一、安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピーの安全性を向上させる新手法
3. 学会等名 2019年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 満仲翔一、山崎浩平、北尾公英、久堀智子、永井宏樹、安藤弘樹
2. 発表標題 生物学的封じ込め可能なバクテリオファージの創出
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉（長谷川）桂子、久堀智子、永井宏樹、安藤弘樹
2. 発表標題 T系ファージが必要とする宿主遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 満仲翔一、永井宏樹、安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピー実用化に向けた非増殖性ファージの創出
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉（長谷川）桂子、永井宏樹、安藤弘樹
2. 発表標題 T系ファージが必要とする宿主遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島守祐月、大原直也、露口一成、大屋賢司、吉田志緒美、武田茂樹、永井宏樹、安藤弘樹
2. 発表標題 マイコファージによる非結核性抗酸菌症の予防法と治療法の確立
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 天然ファージと人工ファージによる細菌の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 合成生物学×バクテリオファージ 細菌の天敵をデザインして創る
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 生物学的封じ込め可能な次世代ファージセラピー
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 合成生物学×バクテリオファージ 細菌の天敵をデザインして創る
3. 学会等名 2018年度べん毛研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 次世代バクテリオファージセラピー
3. 学会等名 第53回緑膿菌感染症研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 バクテリオファージをデザインする、細菌叢をデザインする
3. 学会等名 第7回ファージ研究会・2018年日本細菌学会関東支部インターラボセミナー合同大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 次世代バクテリオファージセラピー
3. 学会等名 第55回薬剤学懇談会研究討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 人工ウイルスの創出 薬剤耐性細菌感染症治療と細菌叢編集への応用
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 人工ウイルスの創出
3. 学会等名 日本微生物生態学会環境ウイルス研究部会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安藤弘樹
2. 発表標題 人工ウイルスの創出
3. 学会等名 第11回細菌学若手コロッセウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 安藤弘樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 121
3. 書名 実験医学2022年11月号	

1. 著者名 安藤弘樹	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 131
3. 書名 実験医学2022年6月号	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 宿主細菌特異的ナノ粒子	発明者 満仲翔一、安藤弘樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-563001	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------