

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08826

研究課題名(和文) 多剤耐性菌の脅威に対するバクテリオファージ療法の新規効果機序の解明

研究課題名(英文) Novel Mechanisms of Bacteriophage Therapy Against the Threat of Multidrug-Resistant Bacteria

研究代表者

松田 剛明 (Takeaki, Matsuda)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80365204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、問題となっている多剤耐性菌感染症に対する新たな治療戦略の一つとして細菌に感染して溶菌するバクテリオファージ(ファージ)が注目されている。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、代表的な多剤耐性菌であり、皮膚軟部組織感染症など、国内でも感染者数は多い。本研究では、MRSAに対して広い宿主域と高い溶菌性を示すphiMR003を用いて、感染病巣にファージを添加した際の免疫応答をマウスの創部感染モデルを用いて解析した。その結果、ファージに対して感受性を示す菌株の治癒を早めたことに加えて、ファージに溶菌されない菌の感染病態も改善したが、これは過剰な炎症の抑制によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRSA感染症のファージ療法は、欧米でさらに臨床研究などが促進され、その成功例も多く報告されるようになった。ファージを投与することで完全な細菌数の消失がないまま病態が改善されている症例もみられ、治癒する機序についてはまだ不明な点が多い。本研究による成果は、それらの機構の解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：Bacteriophage (phage), which infects and lyses bacteria, has recently been focused on fighting against multidrug-resistant bacterial infections.

Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) is a representative multidrug-resistant bacterium. In Japan, a certain number of infections, including skin and soft tissue infections, are caused by MRSA. In this study, we analyzed the immune response by administration of phiMR003, which is an MRSA phage showing a broad host range and high bacteriolysis activity, to wound infection using a mouse model. The results showed that phage accelerated healing of wound infection with phage-susceptible MRSA strain. The pathology of the infected wounds with phage-insensitive MRSA strain was also improved, suggesting that this was due to the suppression of excessive inflammation.

研究分野：重症感染症の治療

キーワード：ファージ療法 バクテリオファージ 多剤耐性菌 MRSA 創傷感染 免疫修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌の感染症に対して抗菌薬以外の治療の選択肢は喫緊の課題となっている。バクテリオファージ(ファージ)は細菌に感染するウイルスであり、ファージレセプターを保有する菌に感染して増殖(複製)するが、その際に菌を溶菌し、死滅させる。この作用を利用した細菌感染症に対するファージ療法は、一方、ヒトに感染することはなく、これまでロシアや東欧諸国以外の国では対象外であったファージ療法が、多剤耐性菌の感染症の新たな治療戦略の一つとして注目されてきていたが、2016年の米国における多剤耐性アシネトバクター感染症に対するファージ療法の成功例を契機に、欧米を中心にファージ療法の実現に向けた研究が活発化し治療成功例の報告が続いている。一方で国内における研究は少ない。また、その効果には未解明の点多く残されている。

細菌に感染するウイルスであるファージには感染後に宿主を溶菌する「溶菌ファージ」と一旦ゲノムを宿主ゲノムに組み込む「溶原ファージ」がある。感染症治療にはこのうち挙動の単純な溶菌ファージが用いられる。ファージは高い宿主特異性により病原菌のみをターゲットにして感染後し、溶菌酵素により迅速に細胞壁を溶解して細菌を死滅させるが、その効果は薬剤耐性の有無に寄らない。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は代表的な多剤耐性菌であり、過去には主に院内感染で検出され、問題になった。しかしその後、市中にもMRSAが検出され、それが院内のMRSAと起源が異なることが明らかとなり、前者をHA(Healthcare-Acquired)-MRSA、後者をCA(Community Acquired)-MRSAとよぶようになった。その後、CA-MRSAの検出件数は増加し、現在はCA-MRSAは市中のみならず院内感染例も多い。また、MRSAは、抗菌薬感受性の黄色ブドウ球菌と同様に、健常人の常在菌から分離される一方で、皮膚軟部組織感染症、骨髄炎などを引き起こし、免疫能の低下した易感染宿主では、肺炎、敗血症もみられる。多剤耐性菌感染症による死亡者数として日本で最も多い原因菌は、MRSAとなっており、高病原性のMRSAの分離頻度が上昇していることから今後、MRSAの感染症の重症例が増加する可能性が危惧されている(Hanawa T, Shimoda-Komatsu Y, Araki K, Ohyama M, Ohnishi H, Kamiya S, Matsuda T, *Jpn J Infect Dis.* 2019, 73:72-75)。

申請者らはMRSA感染症に対するファージ療法の基礎的検討として、MRSAの遺伝型の解析と研究協力者の丹治、宮永らと共に下水流入水より単離されたphiMR003ファージの解析を行った(Peng C, Hanawa T, Azam H, LeBlanc C, Ung P, Matsuda T, Onishi H, Miyanaga K, Tanji T, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103:7751-7765)。その結果、溶菌作用以外、ファージには宿主免疫系を介して殺菌や炎症を抑制する効果のあることを示唆した結果を得ており、本課題ではその機構を解明することとした。

2. 研究の目的

ファージ療法において、感染部位では宿主(ヒト)-菌-ファージ間に相互作用が生じる。その中で、本研究ではファージと宿主の相互作用に着目し、宿主免疫系を介したファージによる殺菌作用および抗炎症効果の機構を明らかにする。ファージはヒトやマウスにとって異物であり、免疫系に認識されて免疫応答を引き起こす。ファージ療法においてヒトの免疫系がファージに対して反応することが考えられるが、その影響について解析した報告は少ない。そこで本課題では、マウスの創部感染モデルを用いてファージ投与による影響を解析した。

新たな視点からファージの治療効果を解析する本研究の成果は、ファージ療法の研究において重要な情報となり、ファージ治療の普及を推進する。

3. 研究の方法

本研究では、ファージの溶菌以外の作用機構を明らかにするため、実験を行う際にファージを添加しても溶菌しない条件下で解析する必要がある。本研究の特徴は、溶菌する系としてファージに感受性を示す臨床分離株KYE116を用いて、溶菌しない系としてファージ非感受性臨床分離株KYMR58を用いた。また、これらの菌に溶菌性を示さないT4ファージを用いた。それにより溶菌作用以外の菌と宿主の相互作用を解析することができる。

マウスの背面に皮膚切除部位を作成し、そこにファージ感受性または非感受性のMRSA臨床分離株を接種し、ファージを投与して創部の細菌数、炎症性サイトカインの産生、および組織の病理学的変化を解析した。

ファージには申請者らが共同研究者である丹治らと共に2018年に都市部下水流入水から単離した黄色ブドウ球菌ファージであるphiMR003を用いた。

4. 研究成果

phiMR003はMRSA臨床分離株に対して広い宿主域を示す。ファージ感受性株であるKYMR116を接種したマウス創部にファージを添加した場合、菌数は急激に減少し、創部病態は顕著に改善した。一方、非感受性菌であるKYMR58をマウス創部感染に用いた場合にも約1/100の菌数減少がみられた。さらにKYMR58感染モデルにおいて、好中球の減少、炎症性サイトカ

インの産生低下、傷の修復と関連している VEGF 量が増加し、病態の早期改善がみとめられた。腹腔マクロファージを用いて検討を行なったところ、LPS で刺激せずにファージを添加した場合には炎症性サイトカインの発現量に変化はみられなかったが LPS 刺激後にファージを添加した場合には炎症性サイトカインの発現が有意に低下した。これらの結果からファージには過剰な炎症を抑制することで感染病態を改善する効果のあることが示唆された(Suda T, Hanawa T, Tanaka M, Tanji Y, Miyanaga K, Hasegawa-Ishii S, Shirato K, Kizaki T, Matsuda T. *Sci Rep.* 2022 12:15656)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suda T, Hanawa T, Tanaka M, Tanji Y, Miyanaga K, Hasegawa-Ishii S, Shirato K, Kizaki T, Matsuda T	4. 巻 12
2. 論文標題 Modification of the immune response by bacteriophages alters methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19922-x	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中真由子、須田智也、丹治保典、松田剛明、花輪智子
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌ファージphiMR003投与によるMRSA創部感染病態への影響
3. 学会等名 第96回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花輪智子、須田智也、田中真由子、丹治保典、宮永一彦、松田剛明
2. 発表標題 MRSA創傷感染に対するバクテリオファージの影響
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 Le Nhat Minh, Tomoya Suda, Mayuko Tanaka, Yasunori Tanji, Kazuhiko Miyanaga, Tomoko Hanawa and Takeaki Matsuda
2. 発表標題 Bacteriophages isolated from domestic sewage influent and sensitivities to extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli strains
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 花輪智子、松田剛明
2. 発表標題 宿主免疫を介した黄色ブドウ球菌ファージphiMR003の効果の解析
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Le Nhat Minh, Tomoya Suda, Mayuko Tanaka, Shota Yonetani, Takeaki Matsuda and Tomoko Hanawa
2. 発表標題 Characteristics of E. coli isolated from urinary tract infections at the Kyorin University Hospital
3. 学会等名 第95回 細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 花輪智子、Le Nhat Minh、須田智也、田中真由子、丹治保典、宮永一彦、松田剛明
2. 発表標題 臨床分離株を用いたESBL産生大腸菌ファージの単離と感受性解析
3. 学会等名 第95回 細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須田智也、花輪智子、松田剛明
2. 発表標題 マウスMRSA感染症モデルを用いたファージ療法の効果について
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田剛明、花輪智子、須田智也、田中真由子、丹治保典、宮永一彦
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌ファージの宿主免疫系に与える影響
3. 学会等名 第65回ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花輪智子、松田剛明
2. 発表標題 宿主免疫を介した黄色ブドウ球菌ファージphiMR003の効果の解析
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 HANAWA TOMOKO, SUDA TOMOYA, TANAKA MAYUKO, TANJI YASUNORI, MIYANAGA KAZUHIKO, HASEGAWA-ISHII SANAE, SHIRATO KEN, KIZAKI TAKAKO, MATSUDA TAKEAKI
2. 発表標題 Effect of methicillin-resistant staphylococcus aureus phage, phiMR003 on mouse wound infection of MRSA clinical isolates
3. 学会等名 6th Targeting Phage Therapy (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	花輪 智子 (Hanawa Tomoko) (80255405)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 真由子 (Tanaka Mayuko) (00322446)	杏林大学・医学部 (32610)	
研究協力者	木崎 節子 (Kizaki Takako) (00322446)	杏林大学・医学部 (32610)	
研究協力者	須田 智也 (Suda Tomoya) (20793673)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	
研究協力者	丹治 保典 (Tanji Yasunori) (00282848)	東京工業大学・工学部・名誉教授 (12608)	
研究協力者	石井 さなえ (Ishii Sanae) (40435863)	杏林大学・保健学部・准教授 (32610)	
研究協力者	白土 健 (Shirato Ken) (60559384)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
研究協力者	宮永 一彦 (Miyanaga Kazuhiko) (40323810)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

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
---------	---------