

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17060

研究課題名（和文）細菌叢の正常化と疾患治療を目的としたバクテリオファージ療法の開発

研究課題名（英文）Development of bacteriophage therapy for normalisation of bacterial flora and treatment of diseases.

研究代表者

佐藤 祐介 (Yusuke, Sato'o)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：20757265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：クローン病（CD）は指定難病の一つであり、消化管の慢性的な炎症を特徴とする炎症性腸疾患である。発症には細菌叢の破綻が関与しており、特にAIECが関連しているとされている。しかし、治療ガイドラインには細菌叢を対象とした治療指針は含まれていない。申請者は、細菌叢中からバクテリオファージを用いて、AIECを除去することで疾病治療が可能と考えた。実際にマウスを用いた実験でAIECの除去と病態改善を証明するとともに、AIEC特異的遺伝子に対するCRISPRの標的指向性を解析した。以上のことから細菌叢を標的とした合成ファージ療法に関する成果を得ることができ、クローン病の新しい治療法の道筋を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト腸管には細菌が棲みつきおり、健康維持に重要である。しかし、この細菌叢が乱れると病気の原因となる。治療のために細菌叢を正常化する方法が注目されているが、既存的手法には確実性などの問題があり、臨床への展開が遅れている。この研究では細菌叢中に微量ながら存在するが他の細菌を支配し、細菌叢を破綻状態に追い込む種に着目した。この原因菌を細菌のウイルスであるバクテリオファージを用いて特異的に除去することで細菌叢を正常化し、難病モデルにおいて治療効果があることを確認した。

研究成果の概要（英文）： Crohn's disease (CD) is one of the designated intractable diseases and is characterized by chronic inflammation of the digestive tract. Dysbiosis of the gut microbiota is involved in its onset, with AIEC being particularly implicated. However, the treatment guidelines do not include therapeutic approaches targeting the microbiota. The applicant hypothesized that using bacteriophages to eliminate AIEC from the microbiota could lead to disease treatment. Experiments with mice confirmed the removal of AIEC and improvement of disease symptoms, and the CRISPR target specificity for AIEC-specific genes was analyzed. These findings demonstrated the potential of synthetic phage therapy targeting the microbiota, indicating a new treatment pathway for Crohn's disease.

研究分野：細菌学

キーワード：クローン病 バクテリオファージ ファージセラピー 細菌叢 難病

1. 研究開始当初の背景

クローン病 (CD) は消化管粘膜の慢性的な炎症を特徴とする難病で、炎症性腸疾患の一疾病である。国内の CD 患者数は研究開始時点で約 4 万人と指定難病の中でも屈指の患者数 (331 疾患中 4 番目、平成 30 年度末時点) を数える疾病であり、その数は増加の一途を辿っていた。CD は青年期に発症することが多い。この時期は就学や就職などのライフステージの変化が大きい時期でもあり、疾患を原因とした QOL の低下により生活上の困難が生じる場合も少なくない。また本疾病は再燃と寛解を繰り返しながら、進行性に消化管機能の低下を示す症例が少なくない。つまり、若年で発症後、自身の体の機能低下を伴いながら闘病する必要があるため、患者の精神的、肉体的負担が大きい。このように CD は人生に大きな損失をもたらす疾病と言える。この CD の発症には多要因 (遺伝学的要因、食生活などの生活習慣、細菌叢など) が複雑に関連すると考えられているが、研究開始時点での CD 治療のガイドラインには細菌叢に根ざした治療法の掲載はなかった。

2. 研究の目的

バクテリオファージ (ファージ) は細菌に寄生するウイルスである。ファージの細菌への感染はウイルスレセプター依存し、そのため対応するリガンドを有する菌に限られ、同一細菌種内であっても殺す菌・殺さない菌を選択できる。そのため、細菌叢のように複数の細菌が混在する環境で、一つの細菌を標的とした殺菌にはファージが理想的なリソースになりえる。CD 患者の細菌叢は Dysbiosis 状態に陥っていることが知られており、これには Adherent invasive *Escherichia coli* (AIEC) と呼ばれる大腸菌の 1 グループの寄与が報告されている。研究開始時点で、細菌叢正常化を目的として糞便移植などが検討されているが、その有効性は報告毎にばらつき、全患者に奏功するわけではなかった。そこで申請者は CD におけるファージを使った AIEC の選択的排除が腸内環境の効率的な正常化に繋がり、さらに CRISPR の機能を加えることでより特異的殺菌力を高めたファージ利用が可能になると発想した。これにより国民に広がる難病の一つとなっている本疾病に対する新たな治療法の確立につながると考え、この研究を開始した。

3. 研究の方法

1. 下水からのファージの分離および MMC 処理により大腸菌感染性ファージを分離し、培地中での感染域を調べた。分離ファージのうち、AIEC に殺菌活性を示すファージについて糞便中での殺菌活性を *in vitro* で調べた。

2. IL-10 ノックアウトマウスに AIEC を定着させて CD モデルを作出した。このモデルに対して、ファージおよび Mock の投与を行ない、病態の経過及び細菌叢を解析した。

3. 非 AIEC 大腸菌の事前定着あり・なしマウスを使用し、上記と同様にファージ投与実験を行なった。またこの非 AIEC 大腸菌のファージ感受性を培地中で確認した。

4. AIEC 特異的遺伝子内における効率的な殺菌部位の同定

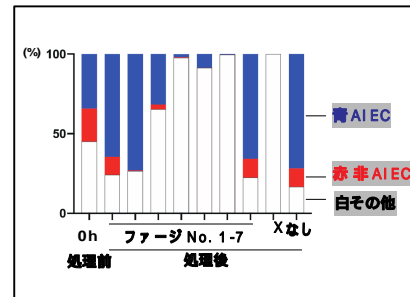
AIEC において、特異的かつ発現が高いことが知られている遺伝子 X について、CRISPR/Cas による効率的な殺菌ができる領域の特定を行った。具体的には crRNA ライブラリーを構築し、その殺菌力を人工細菌叢中での存在比率で確認した。

5. 次世代シーケンサーでの X の塩基配列を解析した。またその情報を元に、そのリバースジェネティクス の確立を行なった。具体的には無細胞系および有細胞系での検討を行なった。

4. 研究成果

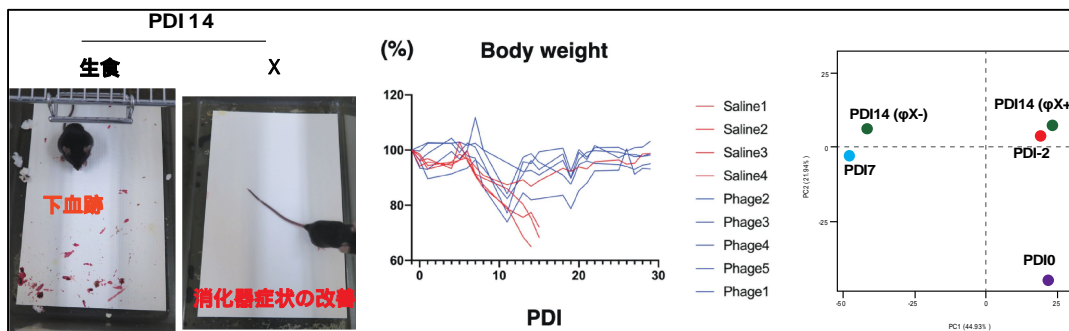
1. AIEC に対するファージの分離

この研究の始まりとして、体内で AIEC に感染・殺菌できるファージの分離を行なった。その結果 AIEC を含めた大腸菌に殺菌活性を示すファージを複数分離した。これらの AIEC 感染ファージの糞便中での感染力を調べたところ、X において糞便中での高い殺菌活性を確認した (右図)。一方で、培地中で高い殺菌活性を示しても、糞便中では活性が認められないファージも存在していた。以上のことから X に焦点を当てて以下の動物実験を実施した。



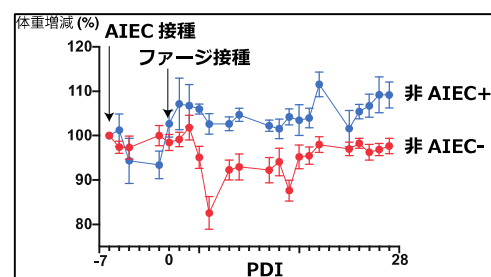
2. CD モデルを用いたファージによる治療効果の検討

次に X の生体を用いた治療効果を検討した (下図)。このモデルでは AIEC 定着後、約 1 週間で腸炎症状を示し、体重減少や消瘦、下血などの消化器症状が認められ、細菌叢も正常とは異なる状態となる。ファージ投与群では AIEC が排除され、消化器症状が軽快し、体重減少が少なかった。一方で、Mock 投与群では症状が重症化し、消瘦が酷い個体では死亡した。病理組織学的解析では障害をうけていた腸管上皮の構造がファージ投与群で復活していることを確認した。モデル構築から治療までの一連の細菌叢の変化をみると AIEC 投与後、細菌叢が変化しているのが見て取れた。一方で、ファージ投与により細菌叢が再度変化していた。しかし、ある程度は回復するが完全に戻るわけではなかった。これは AIEC がごく少数検出されていたことからこの残存した AIEC の作用であることが考えられる。以上の結果から X が in vivo でも AIEC を排除し、細菌叢を変化させることで CD の症状を抑え込むことが示唆された。



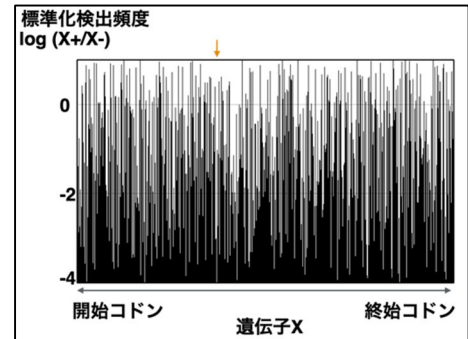
3. 非 AIEC 大腸菌の存在によるファージ効果の向上

2 の動物実験では実験前の検査で糞便から大腸菌が検出されないマウスのみを使用した。しかし実験中に一部のマウスでは非 AIEC 大腸菌が検出された。そこで、このようなすでに定着している大腸菌の影響を確認した。両マウスとも消化器症状に違いはなく、死亡例などはなかった。しかし、体重に関しては違いが見られ、非 AIEC 大腸菌が事前に定着していた群ではファージ投与後の体重の回復が早く、4 週間後の体重も非定着群と比較して重かった。また非定着群の一部のマウスでは微量 (2-6 コロニー/糞便 g) な



がらも 4 週間後まで AIEC が検出されていたが、非 AIEC 定着群では検出限界以下であった。このことから非 AIEC 大腸菌の存在で、競合作用などにより AIEC の細菌叢からの排除が促進されることが考えられた。しかし、X はこの非 AIEC に感染できたことから、AIEC とともにファージによる殺菌の影響が考えられ、競合作用が減弱している可能性が示唆された。

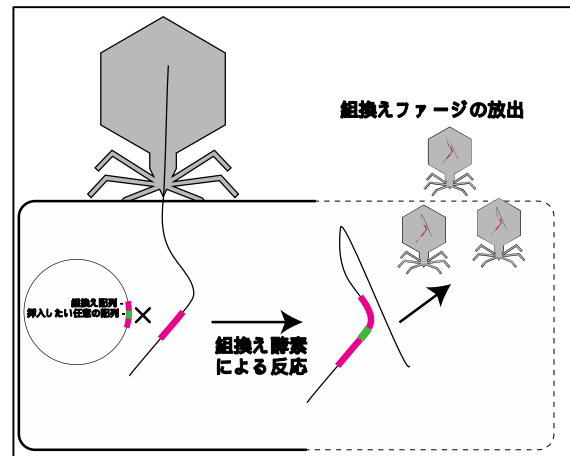
4. AIEC 特異的遺伝子内における効率的な殺菌部位の同定
 遺伝子 X 全長について、1 塩基ずつずれた crRNA を設計し、遺伝子 X 陽性大腸菌と陰性大腸菌にそれぞれ導入し、細菌叢中での存在比率を比較した (右図)。その結果、設計領域により千倍以上の殺菌活性の違いがあり、矢印で示す領域で設計した crRNA が最大の活性を有していた。



5. 長鎖 DNA ゲノムファージにおけるリバースジェネティクスと効率的な遺伝子組換え手法の確立

次世代シーケンサーの解析によりファージ X は 100 kbp 以上の長鎖 DNA を保有することがわかった。研究開始時点ではこの長さのファージゲノムを安定して再起動できる実験系はなかった。そこで安定的なリバースジェネティクス系の確立を行った。まず、これまでの無細胞系の改良目的に糖などを添加することで長鎖 DNA からの再起動の効率が僅かながら上昇した。しかし、成功率は低かった。そのため、有細胞系での実験系を別途構築した。既存の酵母の実験系の条件を見直し、安定的に長鎖ファージゲノムを作ることが可能な条件を確定させた。さらに、その人工ゲノムを元にファージ粒子が形成されることを確認した。

次に細胞を使った再起動系は従来の無細胞系よりも時間を要するために再構成した人工染色体に組換え配列を導入し、大腸菌内での組換えを試みた。具体的には再構成したファージゲノム中に組換えの起点となる組換え配列を導入し、ポケットを作った。ここから再起動したファージを組換え配列で挟まれた目的配列を含むプラスミドを有する大腸菌に感染させることで、組換えを行えるようになった。これにより、ファージ内への任意の DNA 配列の挿入も高効率で行えるようになった。



総括: この研究では当初の目的であるファージを用いた細菌叢の改変とそれによる CD 治療が可能であることがモデルマウスで証明された。当初の予定では組換えファージを用いて異なる大腸菌が存在する状況下での AIEC 特異的な殺菌による治療効果を見る予定であったが、実験の進捗状況から至らなかった。しかし、他の大腸菌と競合とファージの併用といった方向性も見つけられ、特異的殺菌の重要性も示唆された。以上のことから本研究では本難病における新しい治療戦略について一定の道筋をつけたと考えられる。

引用文献

1. Gajendran M., Loganathan P., Catinella A et al. A comprehensive review and update on Crohn's disease *Disease-a-Month*. **64**, 20-57 (2018).

2. 久松理一ら。潰瘍性大腸炎・クローン病 診断基準・治療指針 令和2年度改訂版。厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業。(2021)
3. Kakasis A. and Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **53**, 16-21 (2019).
4. Joossens M., Huys G., Cnockaert M., et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, **60**, 631-637 (2011).
5. Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, **491**, 119-124 (2012).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Taki Yusuke, Watanabe Shinya, Sato 'o Yusuke, Tan Xin-Ee, Ono Hisaya K., Kiga Kotaro, Aiba Yoshifumi, Sasahara Teppei, Azam Aa Haeruman, Thitianapakorn Kanate, Veeranarayanan Srivani, Li Feng-Yu, Zhang Yuancheng, Kawaguchi Tomofumi, Hossain Sarah, Maniruzzaman, Hu Dong-Liang, Cui Longzhu | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 The Association Between Onset of Staphylococcal Non-menstrual Toxic Shock Syndrome With Inducibility of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Production | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology | 6. 最初と最後の頁 765317 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.765317 | 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 SATO 'O Yusuke, OMOE Katsuhiko, AIKAWA Yasuko, KANO Mayuko, ONO Hisaya K., HU Dong-Liang, NAKANE Akio, SUGAI Motoyuki | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 Investigation of <i>Staphylococcus aureus</i> positive for Staphylococcal enterotoxin S and T genes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science | 6. 最初と最後の頁 1120 ~ 1127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0662 | 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 Koibuchi Harumi, Fujii Yasutomo, Sato 'o Yusuke, Mochizuki Takashi, Yamada Toshiyuki, Cui Longzhu, Taniguchi Nobuyuki | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Inhibitory effects of ultrasound irradiation on Staphylococcus epidermidis biofilm | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics | 6. 最初と最後の頁 439 ~ 448 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10396-021-01120-3 | 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 Taki Yusuke, Watanabe Shinya, Sato 'o Yusuke, Tan Xin-Ee, Ono Hisaya K., Kiga Kotaro, Aiba Yoshifumi, Sasahara Teppei, Azam Aa Haeruman, Thitianapakorn Kanate, Veeranarayanan Srivani, Li Feng-Yu, Zhang Yuancheng, Kawaguchi Tomofumi, Hossain Sarah, Maniruzzaman, Hu Dong-Liang, Cui Longzhu | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 The Association Between Onset of Staphylococcal Non-menstrual Toxic Shock Syndrome With Inducibility of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Production | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology | 6. 最初と最後の頁 765317 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.765317 | 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 Boonsiri Tanit, Watanabe Shinya, Tan Xin-Ee, Thitianapakorn Kanate, Narimatsu Ryu, Sasaki Kosuke, Takenouchi Remi, Sato 'o Yusuke, Aiba Yoshifumi, Kiga Kotaro, Sasahara Teppei, Taki Yusuke, Li Feng-Yu, Zhang Yuancheng, Azam Aa Haeruman, Kawaguchi Tomofumi, Cui Longzhu | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible mecA-positive <i>Staphylococcus aureus</i> | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 16907 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73796-5 | 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 Thitianapakorn Kanate, Aiba Yoshifumi, Tan Xin-Ee, Watanabe Shinya, Kiga Kotaro, Sato 'o Yusuke, Boonsiri Tanit, Li Feng-Yu, Sasahara Teppei, Taki Yusuke, Azam Aa Haeruman, Zhang Yuancheng, Cui Longzhu | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Association of mprF mutations with cross-resistance to daptomycin and vancomycin in methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 16107 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73108-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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kiga Kotaro, Tan Xin-Ee, Ibarra-Chavez Rodrigo, Watanabe Shinya, Aiba Yoshifumi, Sato 'o Yusuke, Li Feng-Yu, Sasahara Teppei, Cui Bintao, Kawachi Moriyuki, Boonsiri Tanit, Thitianapakorn Kanate, Taki Yusuke, Azam Aa Haeruman, Suzuki Masato, Penad's Jos? R., Cui Longzhu | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 2934 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16731-6 | 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 Aiba Yoshifumi, Watanabe Shinya, Tsukahara Rieko, Umemoto Naoka, Thitianapakorn Kanate, Boonsiri Tanit, Li Feng-Yu, Kiga Kotaro, Sato 'o Yusuke, Tan Xin-Ee, Taki Yusuke, Azam Aa Haeruman, Zhang Yuancheng, Sasahara Teppei, Demitsu Toshio, Cui Longzhu | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Pantone-Valentine Leukocidin-Negative <i>Staphylococcus aureus</i> Strain Isolated from a Patient with Pervasive Necrotizing Soft Tissue Infection | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements | 6. 最初と最後の頁 e00295-20 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00295-20 | 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 Sato'o Yusuke, Hisatsune Junzo, Aziz Fatkhanuddin, Tatsukawa Nobuyuki, Shibata-Nakagawa Mari, Ono Hisaya K., Naito Ikunori, Omoe Katsuhiko, Sugai Motoyuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Coordination of prophage and global regulator leads to high enterotoxin production in staphylococcal food poisoning-associated lineage | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Microbiology Spectrum | 6. 最初と最後の頁 e0292723 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.02927-23 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤 祐介, 重茂 克彦, 相川 靖子, 狩野 真由子, 小野 久弥, 胡 東良, 中根 明夫, 菅井 基行 |
| 2. 発表標題 ブドウ球菌エンテロトキシン Sおよび T陽性黄色 ブドウ球菌に関する分子遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 志水 孝之, 鶴川 真実, 佐藤 祐介, 佐久間 信至, 川本 恵子, 岡本 まり子 |
| 2. 発表標題 膜透過性ペプチド固定化高分子を用いたマウス樹 状細胞のゲノム編集誘導の試み |
| 3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 磯貝 亮弥, 保坂 真希, 佐藤 祐介, 川本 恵子, 岡本 まり子 |
| 2. 発表標題 マウス肥満細胞腫細胞株へのRNP複合体導入検討ならびに機能遺伝子欠損細胞の作製 |
| 3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 TCRシグナル刺激によるイヌ TCRレパトリーへの影響 |
| 2. 発表標題 塩川 麗良, 岡本 憲明, 渡邊 健司, 水上 洋一, 永根 大幹, 山内 章寛, 金井 詠一, 高木 哲, 山下 匡, 佐藤 祐介, 川本 恵子, 岡本 まり子 |
| 3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤祐介, 氣鷲恒太郎, 渡邊真弥, anit Boonsiri, 李峰宇, 相羽由詞, 李俊傑, Azam Haeruman, 笹原鉄平, 崔龍洙 |
| 2. 発表標題 クロストーク法によるKlebsiella pneumoniaeに対する広感染宿主域ファージの分離 |
| 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 |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|