

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20575

研究課題名（和文）ファージ育種を利用した革新的抗菌療法の開発

研究課題名（英文）Development of antibacterial therapy utilizing phage genome editing

研究代表者

小島 新二郎（Shinjiro, Ojima）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・研究員

研究者番号：60967793

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗菌薬治療に代わる治療方法として、バクテリオファージ（ファージ）を用いたファージ療法の開発が試みられている。しかし、現在のファージ療法の技術では患者に感染した細菌を殺滅できないことがファージ療法の最大の障壁となっている。そこで申請者は、独自に環境中から分離したファージ（DruSM1）の全遺伝子欠損株ライブラリを作製し、遺伝子欠損による殺菌力への影響を解析した。その結果、2種類の遺伝子欠損ファージにおいて、細菌の持つ抗ファージ免疫機構から逃避することにより、親株よりも殺菌力が向上した。本研究の成果は、より治療効率を向上させるための治療用ファージの開発に貢献する知見を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗生物質の効かない薬剤耐性菌による死亡者数が増加しており、世界的な問題となっている。2050年には耐性菌を起因とする死亡者数が年間1,000万人に達すると見積もられている。本研究では、抗生物質の代替としてのファージ療法をより治療効率の高いものにするために、ファージゲノムの改変を駆使した殺菌力の向上を試みた。本研究の成果は、薬剤耐性菌の制圧に向けたファージ療法の洗練化に貢献するとともに、ファージの殺菌力を減弱させる細菌が保有する数多くの抗ファージ免疫機構に対処する必要があることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Today, antimicrobial-resistant bacteria (AMR) are a huge problem all over the world. The growing crisis of antibiotic resistance has created urgency for phage therapy as an alternative to antibiotics. However, the present system of phage therapy does not work enough to rescue patients infected with AMR. Here, we constructed phage gene knocked-out mutants library using DruSM1 phage and analyzed the effects for bactericidal activity. The deletion of 2 genes in DruSM1 phage contributed to enhance bactericidal activity due to evasion from the bacterial immune systems. Our findings provide evidence to promote the therapeutic effect of phage therapy.

研究分野：細菌学

キーワード：バクテリオファージ 薬剤耐性菌 ゲノム改変ファージ 抗ファージ免疫機構 ファージ療法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抗生物質の効かない薬剤耐性菌による死亡者数が増加しており、世界的な問題となっている。2050年には耐性菌を起因とする死亡者数が年間1,000万人に達すると見積もられている(図1)。新たな抗菌薬の開発による治療は困難であり、抗菌薬治療以外の治療方法の開発が必要である。これまでに、抗菌薬治療に代わる治療方法として、細菌を特異的に殺菌するウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)を用いたファージ療法の開発が試みられている。しかし、現在のファージ療法の技術では患者に感染した細菌を殺滅することができるファージを確実に選抜して治療に用いる事が困難であり、ファージ投与による治療効果が確かなものではないことがファージ療法の最大の障壁となっている。そこで本研究では、よりファージ療法の治療効率を向上させるために、殺菌力を高めた改変ファージの作製を試みた。ファージのゲノムには、カプシドやテール等のファージの外骨格を形作る遺伝子や自己の複製されたゲノムをカプシドに納めるターミナーゼ等の既知の遺伝子以外に、多数の機能未知の遺伝子が存在する。申請者は、これら機能未知の遺伝子の中には削除することにより菌への感染効率を上げる事ができる遺伝子が存在する可能性を考えた。このコンセプトに従い、ファージの遺伝子を変異あるいは欠失させることにより殺菌力が向上する変異ファージを探索することを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ファージ療法での治療効果に影響するファージの殺菌力を向上させるために、ファージゲノムの改変を行い、変異ないしは欠失により殺菌力が増強されるファージの遺伝子を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) ファージのランダム変異株の作製

ファージに迅速かつ容易にランダムな変異を導入するため、遺伝子修復に関わる3種類の遺伝子(*mutS*, *mutD*, *mutT*)を欠損させた大腸菌を準備した。本菌株への感染を経験して変異が生じた野生ファージのランダム変異株ライブラリを作製する。本ランダム変異ファージを様々な大腸菌株に感染させ、殺菌力が向上する遺伝子変異ファージ株を探索する。

### 2) ファージ遺伝子欠損変異株ライブラリの作製

1)とは異なる手法も用いて殺菌力に寄与するファージ遺伝子の探索を試みる。申請者が環境中から独自に分離したファージ(DruSM1)とファージ合成の技術を利用して、当該ファージの全遺伝子欠損株ライブラリを構築する。本方法は、ファージのゲノムを抽出し、目的とする欠損させたいファージ遺伝子以外の領域をPCRし、複数のPCR断片をアセンブリ後、大腸菌に形質転換する。一連の過程により、形質転換された大腸菌から目的の領域の遺伝子かを欠損したファージが起動し、遺伝子欠損ファージを得ることができる。本方法を用いて、1種類のファージの全遺伝子欠損ファージライブラリを作製した。構築した遺伝子欠損ファージライブラリを様々な大腸菌株に感染させ、殺菌力が向上する遺伝子欠損ファージ株を探索する。

## 4. 研究成果

### 1) ファージランダム変異株の作製と殺菌力の解析

ランダム変異株ライブラリを用いて大腸菌における感染力をスクリーニングした結果、親株と比較して顕著な殺菌力が向上するファージを検出することができた。具体的には、ファージが寒天培地上の菌を溶菌する際に形成する溶菌班(プラーク)の大きさが親株と比較して大きくなり、液体培地中での菌の増殖を抑制し殺滅する速度が速くなることを見出せた。作製した変異ファージの全ゲノム解析を行った結果、細菌を溶菌する際に機能するファージ固有の遺伝子に変異が確認された。

### 2) ファージ遺伝子欠損変異株ライブラリの作製と殺菌力の解析

全遺伝子欠損ファージライブラリの作製を試みた結果、欠損してもファージの存続に必須ではないと考えられる遺伝子が、105種類のコードされている遺伝子のうち、70種類程度あることが明らかとなった。この70種類の遺伝子欠損ファージのうち、2種類の遺伝子を欠損させたファージにおいて、親株のファージと比較して殺菌力が増強される現象を見出せた。さらに詳細な解析を行った結果、欠損させた遺伝子が細菌由来のファージ感染を防御する免疫機構を活性化させる因子であることが明らかになった。従って、細菌由来抗ファージ免疫機構に捕捉される因子を発現させるファージ遺伝子を欠損させることで、細菌の防御機構を逃避することによりファージの殺菌力を高められることが明らかとなった。本研究のコンセプトを用いることで、これまで細菌由来抗ファージ免疫機構に阻まれて殺菌力を発揮することができなかったファージの

殺菌力を向上させる事が可能となり、薬剤耐性菌治療に活かせることが期待される。また、本研究で作製した遺伝子欠損ファージライブラリをさらに詳細に解析を進めることにより、これまで機能未知であった多数のファージ遺伝子の解析が進むことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Yamashita Wakana, Ojima Shinjiro, Tamura Azumi, Azam Aa Haeruman, Kondo Kohei, Yuancheng Zhang, Cui Longzhu, Shintani Masaki, Suzuki Masato, Takahashi Yoshimasa, Watashi Koichi, Tsuneda Satoshi, Kiga Kotaro	4. 巻 6
2. 論文標題 Harnessing a T1 Phage-Derived Spanin for Developing Phage-Based Antimicrobial Development	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioDesign Research	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34133/bdr.0028	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 Tamura Azumi, Azam Aa Haeruman, Nakamura Tomohiro, Lee Kenichi, Iyoda Sunao, Kondo Kohei, Ojima Shinjiro, Chihara Kotaro, Yamashita Wakana, Cui Longzhu, Akeda Yukihiro, Watashi Koichi, Takahashi Yoshimasa, Yotsuyanagi Hiroshi, Kiga Kotaro	4. 巻 7
2. 論文標題 Synthetic phage-based approach for sensitive and specific detection of Escherichia coli 0157	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-06247-w	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 Ojima Shinjiro, Azam Aa Haeruman, Kondo Kohei, Nie Wenhan, Wang Sai, Chihara Kotaro, Tamura Azumi, Yamashita Wakana, Nakamura Tomohiro, Sugawara Yo, Sugai Motoyuki, Zhu Bo, Takahashi Yoshimasa, Watashi Koichi, Kiga Kotaro	4. 巻 0
2. 論文標題 Systematic Discovery of Phage Genes that Inactivate Bacterial Immune Systems	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.04.14.589459	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島新二郎、アザム アア ハエルマン、近藤恒平、千原康太郎、田村あずみ、山下和可奈、佐藤、中村暢宏、高橋宜聖、渡土幸一、氣駕恒太郎
2. 発表標題 細菌由来抗ファージ防御機構を無力化するファージ由来因子の網羅的な探索
3. 学会等名 第97回日本細菌学会
4. 発表年 2024年～2025年

1. 発表者名 千原 康太郎, 近藤 恒平, Aa Haeruman Azam, 小島 新二郎, 菅原 庸, 氣駕 恒太郎
2. 発表標題 大腸菌臨床分離株に保存された新規ファージ防御システムの多様性とファージ防御能の評価
3. 学会等名 第19回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 田村あずみ, Aa Haeruman Azam, 中村暢宏, 李 謙一, 近藤恒平, 小島新二郎, 千原康太郎, 山下和可奈, 崔 龍洙, 伊豫田 淳, 明田幸宏, 渡土幸一, 高橋宜聖, 四柳 宏, 氣駕恒太郎
2. 発表標題 合成ファージによる高感度・高特異的な大腸菌0157:H7検出方法の開発
3. 学会等名 日本ファージセラピー研究会 第3回 研究集会
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 組換えファージ及び遺伝子のスクリーニング方法	発明者 小島新二郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2024-53820	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------