

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09793

研究課題名（和文）薬剤感受性・耐性菌による誤嚥性肺炎に対するバクテリオファージ療法の創出

研究課題名（英文）Bacteriophage therapy for aspiration pneumonia caused by antimicrobial resistance

研究代表者

北村 直也（Kitamura, Naoya）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：70351921

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）：【背景】近年、多くの病原細菌が薬剤耐性を獲得しており、抗菌薬非依存的な治療法の開発が重要である。我々は、薬剤耐性黄色ブドウ球菌（SA）を標的とした新規バクテリオファージを分離し、解析した。【方法】下水より新規の広宿主域SAファージを2種（KSAP7、KSAP11）を分離し、ゲノム解析した。【結果】KSAP7とKSAP11のゲノムサイズはそれぞれ137,950bp、138,307bpで、いずれもORF10とORF88の2か所で再編が認められた。これら2か所の可変領域を有するSAファージは過去に6種報告されていた。【考察】ゲノム再編によるORFの変化が宿主域に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、口腔内細菌が癌や糖尿病をはじめとする様々な全身疾患と関係することが明らかにされ、その制御が重要視されるようになってきた。しかし、今日、多くの病原細菌が薬剤耐性を獲得しているため、抗菌薬非依存的な殺菌・除菌法の開発が重要である。そこで我々は、本学医学部微生物学講座と共同で口腔内病原細菌のうち薬剤耐性黄色ブドウ球菌をターゲットとしたバクテリオファージ（ファージ）療法の研究に着手し、新規ファージの分離およびそれらのゲノム解析を行った。今後は本ファージ研究の経験を活かし、口腔・食道・大腸癌の病原細菌へのアプローチを検討している。

研究成果の概要（英文）：Two *Staphylococcus aureus* bacteriophages, KSAP7 and KSAP11, were isolated from sewage and characterized. Based on morphology and DNA sequences, they were assigned to the genus *Silviavirus*, subfamily *Twortvirinae*, family *Herelleviridae*, whose members are hypothesized to be suitable for bacteriophage therapy. The KSAP7 and KSAP11 genomes were 137,950 and 138,307 bp in size, respectively. Although their DNA sequences were almost identical, evidence of site-specific DNA rearrangements was found in two regions. Changes in the number of PIEPEK amino acid sequence repeats encoded by *orf10* and the insertion/deletion of a 541-bp sequence that includes a possible tail-related gene were identified.

研究分野：口腔外科学、口腔癌、口腔感染症

キーワード：バクテリオファージ 薬剤耐性 黄色ブドウ球菌 ファージ療法 ゲノム解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔内細菌が癌や糖尿病をはじめとする様々な全身疾患と関係することが明らかにされ、その制御が重要視されるようになってきた。しかし、今日多くの病原細菌が薬剤耐性を獲得しているため、抗菌薬非依存的な殺菌・除菌法の開発が重要であると考えた。

### 2. 研究の目的

われわれは、本学医学部微生物学講座と共同で口腔内病原細菌のうち薬剤耐性黄色ブドウ球菌をターゲットとしたバクテリオファージ(ファージ)療法の研究に着手し、新規ファージの分離およびそれらのゲノム解析を行った。

### 3. 研究の方法

高知市の下水処理場3施設で採取した汚水の遠心濾液に黄色ブドウ球菌を加え、TSB培地(20mM塩化Mg含有)でファージを増幅し、その上清より単一プラーク法を用いて新規の黄色ブドウ球菌ファージを分離した。それらのファージの宿主域および形態を検討するとともに、臨床応用への適格性を判断するためにゲノム解析を行った。

宿主域(ファージの細菌に対する感受性): 新規に分離されたすべてのファージについて、高知大学医学部微生物学教室で保有している黄色ブドウ球菌: 30株(うちMRSA: 23株)に対する感受性をプラーク形成能およびストリークテストにより検討し、プラーク形成能を有し、ストリークテストで明瞭な溶菌作用が認められた場合を「感受性あり」と評価した。

形態: 広宿主域(宿主域: 90%以上)を示すファージを選択し、ファージを塩化セシウム密度勾配超遠心法により精製・透析後、透過型電子顕微鏡(日本電子 JEM-1400 plus)にて検討した。

ゲノム解析: 精製したファージからDNAを抽出し、次世代シーケンス法を用いて全塩基配列を決定した。さらに、それらの配列を既に報告されている近縁のファージらと比較した。尚、ゲノム解析には GENETYX ver. 12、BLASTn および BLASTp を使用した。

### 4. 研究成果

宿主域: 下水処理場の汚水から新規に分離された黄色ブドウ球菌ファージは11種であった。それらを黄色ブドウ球菌株(30株)に適用した結果、広宿主域を示したファージは2種(KSAP7, KSAP11)で、これらファージの宿主域はそれぞれ93.3%, 100%であった(表1)。

形態: KSAP7 および KSAP11 の形態はいずれも正二十面体の頭部と収縮鞘を有する尾部で構成されていたことより、両者はミオウイルス科に分類された(図1)。

ゲノム解析: KSAP7 および KSAP11 のゲノムサイズはそれぞれ137,950bp, 138,307bpであった。ゲノム塩基配列の比較により、これらは近縁のファージであることが明らかとなった。両者の違いは2か所で、*ORF10*における塩基配列の再編、*ORF88.1*の有無が同定された(図2a, b)。*ORF10*における塩基配列の再編により、*ORF10*にコードされるアミノ酸配列のC末端側の一部で6個のアミノ酸からなる配列(PIEPEK)の繰り返し個数が異なっていた(図2b)。*ORF88.1*に関しては、Campbell model に従い、2つの50-bp direct repeats(紫矢印)を含む組換えにより、541-bp DNA配列の Insertion/Deletion が *ORF88* と *ORF89* の間で起こっている可能性が考えられた(図2a)。なお、これら2か所の可変領域を有する黄色ブドウ球菌ファージは過去に6種報告されていた(表2)。

以上の研究成果より、*ORF10* 遺伝子におけるアミノ酸配列の再編と *ORF88.1* 遺伝子の有無が宿主域を変化させる一因となっている可能性が示唆された。

#### 【引用文献】

- 1) Matsuzaki S, Uchiyama J, Uchiyama I, Daibata M.: Perspective: The age of the phage. *Nature* 509(7498): S9. 2014.
- 2) Vandersteegen K, Kropinski AM, Nash JE, Noben JP, Hermans K, Lavigne R.: Romulus and Remus, Two Phage Isolates Representing a Distinct Clade within the *Twortlikevirus* Genus, Display Suitable Properties for Phage Therapy Applications. *Journal of Virology* 87(6) 3237-47. 2013.
- 3) Kitamura N, Sasabe E, Matsuzaki S, Daibata M, Yamamoto T. Characterization of two newly isolated *Staphylococcus aureus* bacteriophages from Japan belonging to the genus *Silviavirus*. *Archives of Virology* 165(10) 2355-9. 2020.

#### 【特許】

特開 2020-143019「黄色ブドウ球菌および/または緑膿菌を原因とする感染症の治療」, 北村直也、松崎茂展、山本哲也、大畑雅典(2019年3月7日: 申請、2020年9月: 公開)

表1. KSAP7 およびKSAP11の宿主域

No.	<i>S. aureus</i> strain	Methicillin sensitivity*	Phage	
			KSAP7	KSAP11
1	IID671	S	+	+
2	IID975	S	+	+
3	IID980	S	+	+
4	RN4220	S	+	+
5	SA14	S	+	+
6	SA37	S	+	+
7	SA46	S	+	+
8	COL	R	+	+
9	TY12	R	+	+
10	TY21	R	+	+
11	IID1667	R	+	+
12	MR1	R	+	+
13	MR3	R	+	+
14	MR4	R	+	+
15	MR5	R	+	+
16	MR6	R	+	+
17	MR7	R	-	+
18	MR8	R	+	+
19	MR9	R	+	+
20	MR10	R	+	+
21	MR11	R	+	+
22	MR12	R	-	+
23	MR13	R	+	+
24	MR14	R	+	+
25	MR15	R	+	+
26	MR16	R	+	+
27	MR17	R	+	+
28	MR18	R	+	+
29	MR19	R	+	+
30	MR20	R	+	+
宿主域率			93.3%	100%

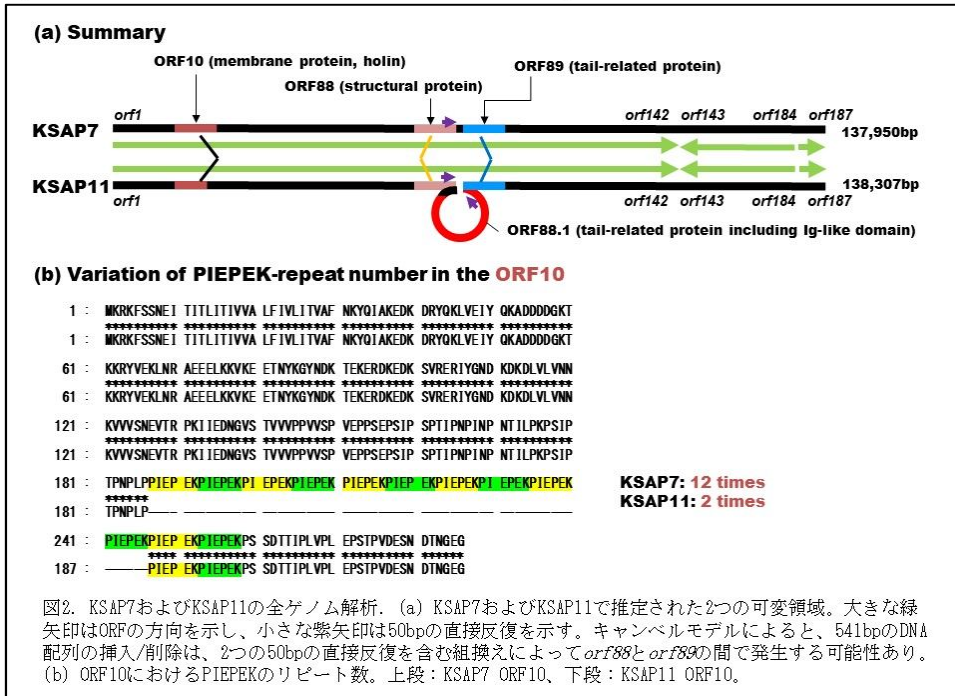
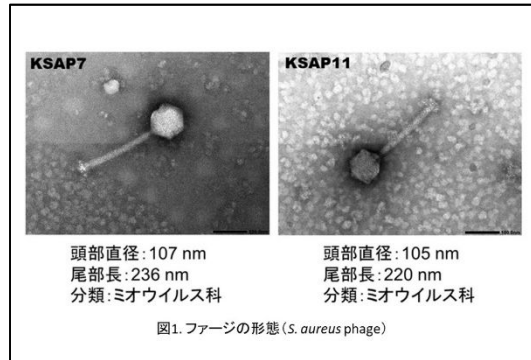


表2. シルビアウイルスゲノムの2つの可変領域の特徴

Phage	ORF10-like protein			ORF88.1-like protein			
	Related gene product	Number of amino-acid residues	Number of PIEPEK	Identity to KSAP7 ORF10 (%)	Related gene product*	Number of amino-acid residues	Identity to KSAP11 ORF88.1 (%)**
KSAP7	ORF10	286	12	100	Absent		
KSAP11	ORF10	226	2	79.02	Present (ORF88.1)	170	100
Remus	Remus_009	277	8	90.2	Present (Remus_086)	170	97.64
Romulus	Romulus_009	277	8	90.2	Present (Romulus_086)	170	97.64
SA11	F422_gp153	273	9	90.72	Present (F422_gp078)	170	95.88
StAP1	SAP1_035	285	11	94.84	Present (SAP1_115)	170	95.88
Stau2	Stau2_17	255	6	84.19	Present (BH792_gp095)	170	95.88
φMR003	MRS_079	237	3	79.03	Present (MRS_154)	170	95.88
K	CPT_phageK_gp179	397	0	38.69	Present (CPT_phageK_gp115)	170	61.76
Twort	TwortORF029	323	0	39.57	Present (TwortDSMZ_157)	172	55.42

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 Naoya Kitamura, Eri Sasabe, Shigenobu Matsuzaki, Masanori Daibata, Tetsuya Yamamoto	4. 巻 165
2. 論文標題 Characterization of two newly isolated Staphylococcus aureus bacteriophages from Japan belonging to the genus Silviavirus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 2355 ~ 2359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-020-04749-6.	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 -

〔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 北村直也
2. 発表標題 多剤耐性黄色ブドウ球菌特異的バクテリオファージの全ゲノム解析とそれらを用いた感染制御
3. 学会等名 第74回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北村直也
2. 発表標題 薬剤耐性黄色ブドウ球菌バクテリオファージのゲノム解析
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村直也、松崎茂展、山本哲也
2. 発表標題 薬剤耐性黄色ブドウ球菌および緑膿菌感染症に対するバクテリオファージ療法の創出
3. 学会等名 第63回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 黄色ブドウ球菌および/または緑膿菌を原因とする感染症の治療	発明者 北村直也、松崎茂展、山本哲也、大畑雅典	権利者 高知大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2020-143019	出願年 2019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
研究分担者	松崎 茂展  (Matsuzaki Shigenobu)  (00190439)	高知大学・医学部・客員教授   (16401)	
研究分担者	山本 哲也  (Yamamoto Tetsuya)  (00200824)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授   (16401)	

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