

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15149

研究課題名（和文）バクテリオファージを用いた追撃型抗菌治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a chasing type antimicrobial using bacteriophage

研究代表者

氣駕 恒太郎（Kiga, Kotaro）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90738246

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）：薬剤耐性菌は世界規模で蔓延し、人類の健康を脅かしている。しかし、抗菌薬の開発は行き詰まっているため、これまでとは異なるアプローチで抗菌剤を開発する必要があるが出てきた。そこで我々はバクテリオファージ（ファージ）という細菌に感染するウイルスに着目した。ファージが宿主細菌へDNAを注入できることを利用し、CRISPR-Cas13という抗菌作用を持つ物質を菌体内に入れることに成功した。CRISPR-Cas13を搭載したファージは、大腸菌を感染させたハチノスツツリガの幼虫の致死率を有意に改善した。今後、Cas13搭載ファージを新規抗菌薬の候補として開発を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬が効かない薬剤耐性菌は世界規模で広がり、既存の抗菌薬で対処することが難しくなってきた。すでに欧米では、バクテリオファージ（ファージ）という細菌に感染するウイルスを利用した抗菌治療が進められている。本研究では、ファージを遺伝子改変することで、より効果的な抗菌治療を目指した。実際に我々は、抗菌性の遺伝子をファージに搭載することで、狙った細菌を殺菌することに成功した。この抗菌ファージは既存の抗菌薬とは殺菌機構が異なるため、薬剤耐性菌にも効果があることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Drug-resistant bacteria are spreading on a global scale and threatening human health. Nevertheless, the development of antimicrobials has been stalled, so there is a need to take a different approach to developing antimicrobials. In this study, we focused on a virus that infects bacteria called bacteriophages (phages), because they have an ability to inject DNA into host bacteria. Taking advantage of this function, we succeeded to inject an antimicrobial substance called CRISPR-Cas13 into the bacteria. Phages carrying CRISPR-Cas13 significantly improved the lethality of E. coli-infected Galleria mellonella larvae. We will develop Cas13-carrying phage as a candidate for a new antibacterial drug in the future.

研究分野：細菌学

キーワード：バクテリオファージ 抗菌治療 ファージ療法 CRISPR-Cas

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

抗菌薬が細菌感染症の治療において最も重要な役割を果たしてきたことに疑いの余地はない。しかしながら、近年の抗菌薬の効かない細菌(耐性菌)の出現とその蔓延が既存の抗菌薬を無力化し、細菌感染症は再び人類を脅かしている。2014年に発表されたイギリス政府のレポートによると、このまま抗菌薬に依存し続けると2050年までに3億人が耐性菌感染症により死亡し、それに伴う経済損失も約1京円になると見積もられている(Arias CA. et al., 2015, N Engl J Med.)。このように深刻な耐性菌の問題に直面していながらも新たな抗菌薬の開発は「限界に達している」状態であり、これまでとは異なる細菌感染症治療戦略の組み立ての必要が迫ってきた。

このような状況に立ち向かうための手段として、従来のファージセラピー技術の再生がある(Reardon S. 2015, Nature)。ファージは、細菌に感染すると宿主細菌内に自身の核酸を注入し、宿主の複製機構を利用して増殖しながら細菌を殺す。ファージセラピーは1915年のファージの発見と共に始まり、当初は良好な成績を収めていた。しかしながら、ペニシリンの発見とその後の抗菌薬の開発が進むことにより、一度はほぼ完全に忘れ去られている。近年、ファージセラピーが再び注目され始めているのは、新たな抗菌薬の開発が行き詰まったこと以外に、ゲノム編集や遺伝子工学技術の飛躍的な発展に伴い、ファージの遺伝子改変が可能になってきたことがある。しかし、ファージセラピーは未だにロシアやグルジア、ポーランド等の一部の国でしか用いられていない。その理由の最たるものに、本治療法の不確実性(効果が出ない場合がある)がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、薬剤耐性菌に効果的な抗菌治療薬を開発することである。ファージ療法はこれまでも旧ソ連の国々や欧米でも試みられてきたが、効果が出ない場合もあった。その要因は、ファージ耐性、ファージの体内安定性、ファージの殺菌力などが挙げられる。ファージ耐性は異なるファージもしくはファージカクテルを用いることで解決することが主流である。体内安定性は、ゲルやカプセルにファージを入れたり、ファージの殻を改良することで対応している。その一方でファージによる殺菌力の強化方法の研究はあまり進んでいない。ファージは地球上に $10^{31}$ 個も存在していると言われるものの、自然界からファージを採取するにも限界があるため、本研究では遺伝子組換えによりファージの殺菌力を強化することを目指した。さらに、搭載する遺伝子により、ファージに新たな効果を生み出せるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

### A) ファージの殺菌機能の強化

ファージに搭載するものとして当初はサイトカインなどを考えていた。なぜならば、サイトカインが菌体内で発現すると、それにより炎症細胞が惹起され、細菌を殺菌すると考えられたからである。しかし、細菌の殺菌と同時に炎症も起こしてしまうことがわかったため、私は細胞増殖抑制効果があることがわかっていたCRISPR-Cas13aを搭載することにした。CRISPR-Cas13aは2016年に初めてその機能が解明されたRNA標的型のCRISPR-Casシステムである(Abudayyeh O. et al., 2016, Science; East-Seletsky A. et al., 2016, Nature)。Cas13aは一度標的遺伝子の転写産物を認識すると、非特異的RNA分解酵素に変化し、速やかに宿主細菌の種々RNAを分解して増殖抑制する特殊な機能を持つ。しかし、どの程度の増殖活性を持つかはわかっていなかったため、Cas13aの活性についても予め検討することにした。

### B) 抗菌カプシドの開発

抗菌カプシドは、ファージのパッケージング手法を用いて合成した。ファージは自身のゲノムをカプシドに挿入する際に、ファージDNA上のパッケージング配列を認識する。溶原性ファージ(細菌のゲノムに組み込まれているファージ)のパッケージング配列を相同組換え法により削除し、その配列を機能性遺伝子(CRISPR-Cas13aなど)をコードするプラスミドに挿入した。溶原化ファージをMitomycin Cなどにより誘発することで、ファージのカプシドに目的のプラスミドが挿入されていく。申請者らは、この手法を用いてCRISPR-Cas13aを大腸菌ファージカプシドや黄色ブドウ球菌のファージカプシドに搭載することに成功した。また溶菌性ファージをベースとした抗菌カプシドも合成した。作製した抗菌カプシドの殺菌効果を確認するため、本カプシドを標的の耐性菌に感染させ、振盪温度勾配培養装置にて細胞数を測定した。また、抗菌カプシドが目的のDNAをデリバリーしていることを確認するために、トランスダクションアッセイを行った。同様の方法で、細菌遺伝子検査用と細菌ジェノタイプング用の抗菌カプシドを作製した。作製した抗菌カプシドの対象菌に対するin vitroでの殺菌効果を評価した。

### C) 動物感染モデルにおける治療効果の評価

感染動物を用いて、上記で構築した合成抗菌カプシドの治療効果を検証した。G.mellonella 幼虫に菌を接種し、一時間後に合成したファージを投与した。生存菌数や病態、生存率の度合いを

査定し、その治療効果を評価した。

#### 4. 研究成果

本研究では、バクテリオファージ(ファージ)に CRISPR-Cas13a を搭載することで新規殺菌剤を創出することに成功した。ファージは細菌に感染するウイルスで、自身の核酸 (DNA や RNA) を宿主細菌に注入することができる。本研究では、ファージのカプシド内に CRISPR-Cas13a を封入することに成功し、標的細菌を選択的に殺菌できる新規抗菌製剤 (抗菌カプシドと名付けた) を作製した。

##### 1) ファージの殺菌機能の強化

本研究では、薬剤耐性遺伝子を認識するように設計した CRISPR-Cas13a (後述) をバクテリオファージ (通称ファージ) に搭載することで、薬剤耐性菌を効率的に殺菌できる抗菌薬の開発を目指した。初めに、Cas13a がどの程度増殖阻害を引き起こすのかを調べた。まず、Abudayyeh らの報告を元に実験を行ったところ、既報通り Cas13a を発現した細菌では緩やかな増殖遅延が確認された。その一方で、標的遺伝子に対する crRNA 配列を最適化すると、Cas13a は強力な増殖抑制作用を発揮すること、更には宿主細菌の細胞死を引き起こすことが分かった。これらの結果から、CRISPR-Cas13a は設計次第で強力な殺菌剤として使用できることが示唆された。

次に Cas13a を搭載するファージの合成に取りかかった。ファージへの搭載には、大腸菌に感染する M13 ファージ、80 ファージ、T7 ファージ、黄色ブドウ球菌に感染する 80 ファージを用いた。M13 ファージはパッケージング法により、80 ファージには phagemid を用いた手法、T7 ファージには in vitro 合成法、80 ファージには SaPI (Staphylococcus aureus pathogenicity island) を用いた手法を用いた。その結果、M13 ファージと 80 ファージ、80 ファージの殻に Cas13a を搭載することに成功した。その一方で、T7 ファージのゲノムにも Cas13a を搭載することはできたが、継代している途中で Cas13a の配列が抜けていくことがわかった。合成したファージは標的の細菌を殺菌することが、大腸菌、黄色ブドウ球菌でそれぞれ確認された。一連の実験により、ファージの選択的殺菌力を挙げることに成功した。

##### 2) 抗菌カプシドを利用した抗菌治療

CRISPR-Cas13a の抗菌活性は標的配列を選べば非常に強いことが明らかになった。抗菌カプシドは標的遺伝子を保有する菌を選択的に殺菌できるため、標的細菌 (病原菌や薬剤耐性菌) を選択的に殺菌できる抗菌治療薬として使用できる可能性が考えられた。実際に、カルバペネム耐性遺伝子である blaIMP-1 を標的とした抗菌カプシドは、blaIMP-1 発現株を感染させたハチノスツヅリガの幼虫の致死率を有意に下げることを確認した (図 1)。この治療薬は標的細菌を狙い撃ちするため、細菌叢のバランスを乱さない抗菌治療が可能になる。また、DNA 標的型の抗菌カプシド (例えば Cas9 抗菌カプシド) は、プラスミド (菌の生存に必須ではない DNA) 上の遺伝子を標的とした場合に殺菌効果が無く、更には標的遺伝子を切断することにより菌に予期せぬ変異を引き起こす恐れがあった。そのため、Cas13 は Cas9 よりも安全に使用できる可能性が示唆された。

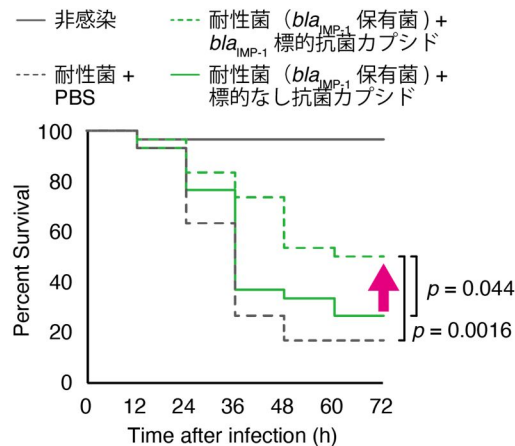


図 1. 合成ファージによる治療効果

##### 3) 抗菌カプシドを利用した細菌叢の編集

生体細菌叢の乱れが様々な疾病に関わっていることが明らかになり、その関連研究は国内外問わず活発に行われている。しかし現在、特定の疾患の起因菌を選択的に取り除く方法がないため、その疾病に関連する菌の同定や、起因菌に対する抗菌治療は困難である。本抗菌カプシドは、細菌叢から狙った細菌のみを取り除くことができるため、上記問題の解決に応用できることが考えられた。blaIMP-1 を標的にする抗菌カプシドと、コリスチン耐性遺伝子 mcr-2 を標的とする抗菌カプシドを合成したところ、3 種類の菌 (野生型、blaIMP-1 発現菌、mcr-2 発

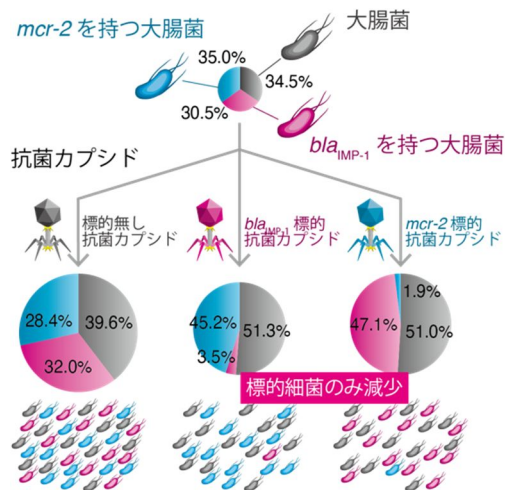


図 2. 合成ファージによる細菌叢の改変

現菌)を混合した細菌叢から標的細菌のみを減少させることに成功した(図2)。

本研究では、バクテリオファージの合成技術を利用し、既存の殺菌剤とは異なる抗菌剤の創出に成功した。この製剤は、我々人類が直面している薬剤耐性菌問題に対する新しい武器になることが考えられる。本抗菌剤(抗菌カプシド)は、遺伝子を標的として狙った細菌を選択的に取り除くことができるため、生体に有利な「善玉菌」に影響を与えず、病原菌である「悪玉菌」のみを選択的に殺菌できる。更に、対象細菌の標的遺伝子認識配列とキャリアとなるファージの種類を変えることで、家畜、植物、土壌、生活空間に生息するいかなる細菌にも応用できる。そのため、細菌叢の再構築を目的とした抗菌治療や、畜産、農業、環境保全、食品製造など様々な細菌制御領域に革新的な発展をもたらすことが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotaro Kiga, Xin-Ee Tan, Rodrigo Ibarra-Chavez, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Yusuke Sato, Feng-Yu Li, Tepei Sasahara, Bintao Cui, Moriyuki Kawachi, Tanit Boonsiri, Kanate Thititanapakorn, Yusuke Taki, Aa Haeruman Azam, Masato Suzuki, Jose R Penades, Longzhu Cui	4. 巻 -
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 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する
1. 著者名 Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Sanada Takahito, Ogura Yoshitoshi, Bo Zhu, Iida Tamako, Yokomori Rui, Kuroda Eisuke, Tanaka Mototsugu, Sood Arpana, Suzuki Toshihiko, Nakai Kenta, Hayashi Tetsuya, Mimuro Hitomi	4. 巻 525
2. 論文標題 Mutational diversity in mutY deficient Helicobacter pylori and its effect on adaptation to the gastric environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 806-811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.087">https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.087</a>	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 -
1. 著者名 Kinoshita-Daitoku Ryo, Ogura Yoshitoshi, Kiga Kotaro, Maruyama Fumito, Kondo Tomoyo, Nakagawa Ichiro, Hayashi Tetsuya, Mimuro Hitomi	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Helicobacter pylori Strain ATCC 43504, a Type Strain That Can Infect Gerbils	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00105-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1128/MRA.00105-20">https://doi.org/10.1128/MRA.00105-20</a>	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 -
1. 著者名 Tanaka Mototsugu, Kinoshita-Daitoku Ryo, Kiga Kotaro, Sanada Takahito, Zhu Bo, Okano Tokuju, Aikawa Chihiro, Iida Tamako, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Okubo Koshu, Kurosawa Miho, Hirahashi Junichi, Suzuki Toshihiko, Nakagawa Ichiro, Nangaku Masaomi, Mimuro Hitomi	4. 巻 10
2. 論文標題 Group A Streptococcus establishes pharynx infection by degrading the deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-020-60306-w">https://doi.org/10.1038/s41598-020-60306-w</a>	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 -

1. 著者名 Kinoshita-Daitoku R, Kiga K, Otsubo R, Ogura Y, Sanada T, Bo Z, Phuoc TV, Okano T, Iida T, Yokomori R, Kuroda E, Hirukawa S, Tanaka M, Sood A, Subsomwong P, Ashida H, Binh TT, Nguyen LT, Van KV, Dung Ho DQ ... [Show all 25] ... Mimuro H	4. 巻 -
2. 論文標題 Helicobacter small RNA regulates host adaptation and carcinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	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) なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Watanabe Shinya, Cui Bintao, Kiga Kotaro, Aiba Yoshifumi, Tan Xin-Ee, Sato 'o Yusuke, Kawauchi Moriyuki, Boonsiri Tanit, Thitiananpakorn Kanate, Taki Yusuke, Li Fen-Yu, Azam Aa Haeruman, Nakada Yumi, Sasahara Teppei, Cui Longzhu	4. 巻 10
2. 論文標題 Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus Leptotrichia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02838">https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02838</a>	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 -

1. 著者名 Cui Bintao, Watanabe Shinya, Sato 'o Yusuke, Nihashi Fumiya, Aiba Yoshifumi, Kiga Kotaro, Sasahara Teppei, Tan Xin-Ee, Kawauchi Moriyuki, Boonsiri Tanit, Thitiananpakorn Kanate, Taki Yusuke, Li Feng-Yu, Imokawa Shiro, Cui Longzhu	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of the Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain JMUB3031, Isolated from a Patient with Fatal Community-Acquired Pneumonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01652-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1128/MRA.01652-18">https://doi.org/10.1128/MRA.01652-18</a>	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 -

1. 著者名 Watanabe Shinya, Aiba Yoshifumi, Tan Xin-Ee, Li Feng-Yu, Boonsiri Tanit, Thitiananpakorn Kanate, Cui Bintao, Sato 'o Yusuke, Kiga Kotaro, Sasahara Teppei, Cui Longzhu	4. 巻 19
2. 論文標題 Complete genome sequencing of three human clinical isolates of Staphylococcus caprae reveals virulence factors similar to those of S. epidermidis and S. capitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 810-810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1186/s12864-018-5185-9">https://doi.org/10.1186/s12864-018-5185-9</a>	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 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 氣 駕 恒 太 朗
2. 発表標題 薬剂耐性菌を選擇的に殺菌するファージ製剤の開発
3. 学会等名 第102回 日本細菌学会関東支部総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氣 駕 恒 太 朗, 崔 龍 洙
2. 発表標題 遺伝子標的型ファージ製剤の開発
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 氣 駕 恒 太 朗
2. 発表標題 ファージを利用した遺伝子標的型殺菌剤の開発
3. 学会等名 日本細菌学会関東支部インターラボセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotaro Kiga, XinEe Tan, Rodrigo Ibarra-Chavez, Jose R Penades, Longzhu Cui
2. 発表標題 Developing bacteriophage-based antimicrobials for killing antimicrobial-resistant bacteria.
3. 学会等名 Oxford phage 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氣駕 恒太郎, 李 峰宇, XinEe Tan, 佐藤 祐介, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, Rodrigo Ibarra-Chavez, Jose R Penades, 鈴木 仁人, 崔 龍洙
2. 発表標題 狙った細菌を選択的に殺菌する殺菌技術の開発
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 氣駕恒太郎、崔龍洙	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 Precision Medicine	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗菌キメラファージ、治療用組成物、殺菌剤、食品、細菌判別キット、治療用組、成物製造方法、細菌除去方法、細菌判別方法、及び動物治療方法	発明者 崔 龍洙、氣駕 恒太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-97751号、PCT/JP2019/1680	出願年 2018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
---------------------------	-----------------------	----