

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16636

研究課題名（和文）ファージセラピーの実用化に向けた非増殖性ファージの創出

研究課題名（英文）Creation of non-replicative bacteriophages for the practical application of phage therapy

研究代表者

満仲 翔一（Mitsunaka, Shoichi）

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：10836406

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）：本研究では、改変型ファージの実用化を見据え、様々なファージに適用できるファージの生物学的封じ込め策の確立を行った。ファージの生物学的封じ込めの方法はファージゲノムからピリオン遺伝子を欠失することで、子孫ファージを産生できない、非増殖性ファージに転換するというものである。この方法により作製された非増殖性ファージの多くは、宿主細菌の上ではプラークを形成せず、増殖能の再獲得も示さなかった。また、マウスの敗血症モデルに対して、非増殖性ファージは野生型ファージと同程度の治療効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

改変型ファージは遺伝子組換え生物に該当するため、状況に応じて生物学的に封じ込める必要があるが、これまでに様々なファージに適用できる生物学的封じ込め策は報告されていなかった。本研究で確立したファージの生物学的封じ込め策は原理的にはあらゆるファージに適用できるため、改変型ファージの実用化に寄与する基盤技術になると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established the biological containment method of phages that is applicable to various phages. Our method for biological containment of phages is to convert wild-type phages to non-replicative phages that cannot produce progeny phages by deleting virion gene(s). Almost all non-replicative phages created by our method could not form plaques on host bacteria lawn and were unable to reacquire the ability to proliferate. In addition, non-replicative phages showed similar therapeutic efficacy to wild-type phages in mouse sepsis model.

研究分野：合成生物学

キーワード：バクテリオファージ 合成生物学 ファージセラピー 生物学的封じ込め

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2050年には薬剤耐性細菌によって年間1000万人の方が亡くなると推定されており、薬剤耐性問題は解決しなければならない世界的な課題の一つとなっている。一方で、「開発には莫大な費用がかかる」、「利益を上げづらい」、「新規抗菌薬を開発しても、必ず耐性細菌が出現する」などの問題点により、新規抗菌薬の開発は停滞しているのが現状である。そのため、抗菌薬に代わる新たな治療薬の開発が望まれている。

代替薬の一つとして、細菌に感染する天敵ウイルスであるバクテリオファージ(以下、ファージ)が注目されている。ファージは「細菌への感染」、「細菌内での子孫ファージの産生」、「溶菌による子孫ファージの外環境への放出」という生活環を繰り返すことで、増殖しつつ宿主細菌を殺菌する。この殺菌機序は抗菌薬と大きく異なるため、ファージは薬剤耐性細菌に対しても有効である。さらに、遺伝子改変技術の発展に伴い、任意の機能を付加した様々な改変型ファージが開発されている。例えば、バイオフィーム分解酵素遺伝子や抗菌ペプチド遺伝子を搭載することで殺菌効率が向上したものや、CRISPR/Cas 遺伝子を搭載することで配列依存的に殺菌するもの、宿主域を決める尾繊維を改変することで宿主域を変更したものなどが開発されており、実験室レベルではあるものの、有効性が示されている。このようなファージ改変は細菌感染症治療におけるファージの有効性や安全性を向上させると期待されるが、改変型ファージは「遺伝子組換え生物」に該当するという問題点もある。実験室レベルであれば、物理的封じ込め策でも十分であるが、治療薬として実用化する場合、自然環境中に放出されるリスクが大きくなる。そのため、状況に応じて自然環境中で増殖しないように生物学的封じ込め策が必要になる。しかしながら、様々なファージに適用できる生物学的封じ込め策はこれまでに報告されていない。

本研究では改変型ファージの実用化を見据え、汎用性の高いファージの生物学的封じ込め策の確立を目指した。

2. 研究の目的

モデルファージを用いてファージの生物学的封じ込め策を確立する。生物学的封じ込めを施した非増殖性ファージの *In vitro* 及び *In vivo* での殺菌性の評価と並行して、増殖能の再獲得の有無を検証する。環境サンプルから単離したファージにおいても生物学的封じ込め策を施すことができるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) ファージの生物学的封じ込め策の確立

モデルファージを用いてファージの生物学的封じ込め策を確立する。方法としては、ファージゲノムからピリオン遺伝子を欠失することで、子孫ファージを産生できないようにする。このピリオン遺伝子が欠失した非増殖性ファージは、ピリオン遺伝子発現宿主細菌に当該ピリオン遺伝

子が欠失した人工ファージゲノムを導入することで作製する (図 1A)。ビリオン遺伝子発現株においては、ビリオンタンパク質が供給されるため、非増殖性ファージを増やすことが可能である (図 1B)。

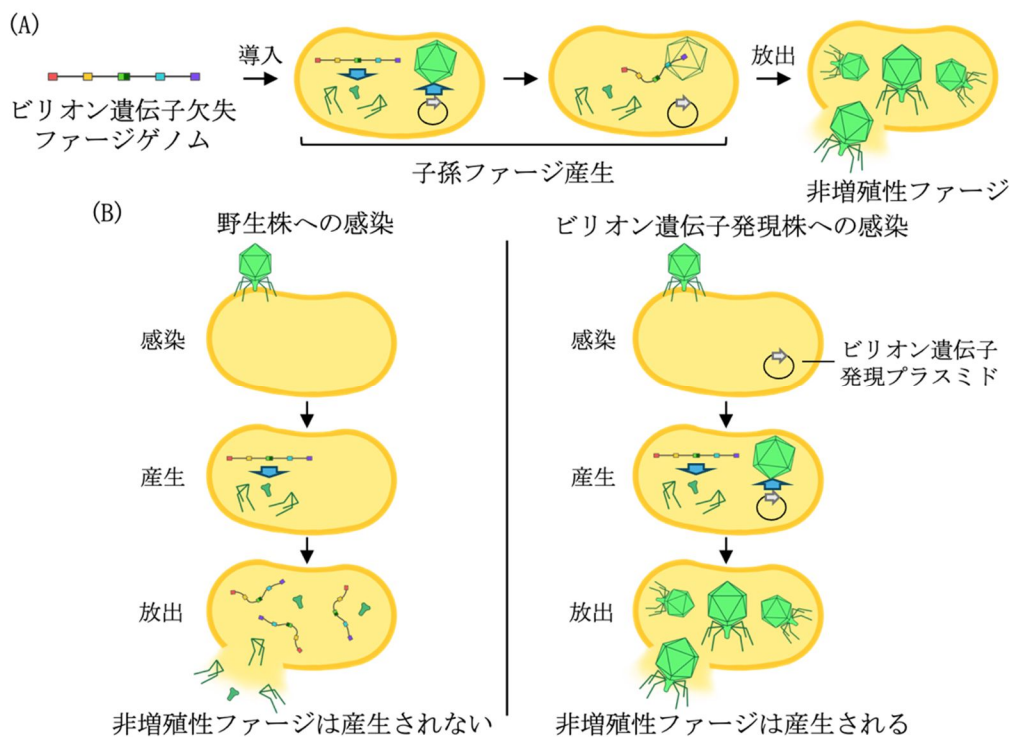


図1 ファージの生物学的封じ込め策

(2) *In vitro*での非増殖性ファージの機能性評価

作製した非増殖性ファージの *In vitro*での殺菌性と増殖能の再獲得の有無を検証する。宿主細菌に対して MOI = 1、10、100 で感染させ、経時的に CFU と PFU を測定する。

(3) 非増殖性ファージを用いたファージセラピー

非増殖性ファージによるマウスの敗血症モデルの治療効果を検証する。マウスに致死量の細菌を腹腔内に接種し、細菌に対して MOI = 100 になるように野生型ファージ、非増殖性ファージまたはコントロールとして LB を静脈注射で投与する。経過観察を行い、マウスの生存率をもって治療効果进行评估する。

(4) 環境サンプルから単離されたファージの生物学的封じ込め

環境サンプルから単離したファージを基に非増殖性ファージを作製できるか検証する。

4. 研究成果

(1) ファージの生物学的封じ込め策の確立

頭部遺伝子を発現する大腸菌またはサルモネラ属菌に、当該遺伝子が欠失した人工 T7 または SP6 ファージゲノムを導入し、それぞれの非増殖性ファージ ($T7_{\Delta head}$ 及び $SP6_{\Delta head}$) を作製した。どちらの非増殖性ファージも、当該遺伝子を発現する株の上ではプラークを形成し、発現しない株の上ではプラークを形成しなかった (図 2A、B)。どちらも高力価を滴下した場合において、Lysis from without (L0) と呼ばれるプラークを形成しない溶菌斑を形成していた。非増殖性ファージは溶菌遺伝子を保持しており、増殖能は欠失しているが殺菌能は有しているため、高力価の滴下では L0 を形成したと考えている。

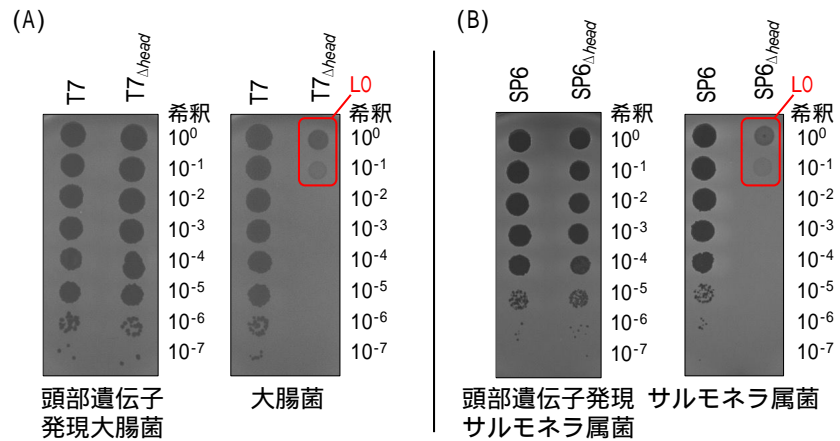


図2 非増殖性ファージのスポットアッセイ

(2) *In vitro*での非増殖性ファージの機能性評価

非増殖性ファージを MOI = 1、10、100 で細菌に感染させた結果、MOI = 1 では効率的な殺菌は見られなかった。これは増殖能を欠失したことで、殺菌性が低下したことを示す。一方で、MOI = 10、100 では、野生型ファージと同程度に殺菌していた。この結果は、増殖能を欠失しても、充分量加えれば殺菌することが可能であることを示している。PFU を経時的に測定した結果、MOI = 1 において、非増殖性ファージの粒子数は経時的に減少していった。この結果は、非増殖性ファージは増殖能の再獲得はなく、100%封じ込められていることを示している。

(3) 非増殖性ファージを用いたファージセラピー

マウスの腹腔内に致死量のサルモネラ属菌を接種した後、コントロールとして LB を静脈注射で投与した結果、3 日後までに全てのマウスが死亡した (図 3)。一方、充分量の SP6 ファージを投与した結果、6 日後の時点で 25% のマウスが生存していた。充分量の非増殖性ファージである $SP6_{\Delta head}$ を投与した結果、6 日後の時点で 62.5% のマウスが生存していた。一見すると、野生型と非増殖性ファージの間に差があるように見えるが、統計学的には有意性はなかった。 $SP6_{\Delta head}$ を投与したマウスから回収したファージの増殖能は欠失

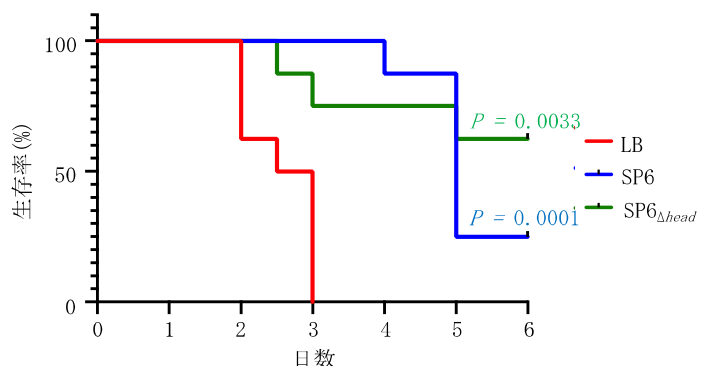


図3 マウスの敗血症モデルに対するファージセラピー

したままだったことから、マウスの敗血症モデルに対する SP6_{Δhead} の治療効果は一度限りの感染・殺菌によるものであることが示された。

(5) 環境サンプルから単離されたファージの生物学的封じ込め

自然環境サンプルから単離したシュードモナス属菌に感染するファージ A 及び抗酸菌に感染するファージ B を基に非増殖性ファージの作製を試みた。ファージ A においては、構成的発現プロモーター依存的にビリオン遺伝子が発現する菌株を構築し、その株に当該ビリオン遺伝子が欠失したファージゲノムを導入することで非増殖性ファージ A を作製した。非増殖性ファージ A は T7 や SP6 と同様に、これまで増殖能の再獲得は見られておらず、100%の封じ込めに成功している。一方、ファージ B においては、構成的発現プロモーターを介して様々なビリオン遺伝子を発現させたが、どのビリオン遺伝子でも菌株の生育を阻害するという問題が生じた。そのため、人工ファージゲノムを導入した際にのみ発現するプロモーターの下流にビリオン遺伝子を繋げたプラスミドを構築し、そのプラスミドを保持する菌株に当該ビリオン遺伝子が欠失したファージゲノムを導入することで、非増殖性ファージ B を作製した。非増殖性ファージ B は増殖能の再獲得が確認されたが、非常に低頻度(10^{-7} ~ 10^{-8} 程度)であった。

本研究ではファージの生物学的封じ込め策を確立した。発現プロモーターやビリオン遺伝子の選定などはファージ毎で変える必要はあるものの、この生物学的封じ込め策は原理的にはあらゆるファージに適用できる汎用性が高いものであり、改変型ファージの社会実装に寄与する基盤技術になると考えている。

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 Mitsunaka Shoichi, Yamazaki Kohei, Pramono Ajeng K., Ikeuchi Megumi, Kitao Tomoe, Ohara Naoya, Kubori Tomoko, Nagai Hiroki, Ando Hiroki	4. 巻 119
2. 論文標題 Synthetic engineering and biological containment of bacteriophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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） 10.1073/pnas.2206739119	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 満仲 翔一、安藤 弘樹
2. 発表標題 バクテリオファージを改変創出する汎用技術及び生物学的封じ込め法の開発
3. 学会等名 第96回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 満仲 翔一、安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピーの社会実装に向けた合成生物学的なアプローチ
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 満仲翔一, 山崎浩平, 永井宏樹, 安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピー実用化に向けた非増殖性ファージの創出
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 満仲翔一, 山崎浩平, 北尾公英, 久堀智子, 永井宏樹, 安藤弘樹
2. 発表標題 ファージセラピー実用化に向けた生物学的封じ込めファージの創出
3. 学会等名 第13回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 満仲翔一, 山崎浩平, 北尾公英, 久堀智子, 永井宏樹, 安藤弘樹
2. 発表標題 生物学的封じ込め可能なバクテリオファージの創出
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 満仲翔一, 山崎浩平, 北尾公英, 久堀智子, 永井宏樹, 安藤弘樹
2. 発表標題 Creation of bio-contained bacteriophage for the practical application of phage therapy
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------