

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19488

研究課題名（和文）細菌叢乱れに起因する疾病の克服に向けた細菌叢編集技術の開発

研究課題名（英文）Development of bacterial flora editing technology for overcoming diseases caused by bacterial flora disorder

研究代表者

崔 龍洙（Cui, Longzhu）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50306932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体細菌叢の乱れが様々な疾病に関わっている。しかし現状では、プロバイオティクスにより生体細菌叢に特定の細菌種を追加することは可能であるが、特定の細菌（例えば疾病を引き起こす起因菌）のみを選択的に取り除く方法はない。そのため、特定の細菌と疾病との因果関係を同定することは困難であり、関連の研究や医薬品開発に大きな障害が生じている。この問題の解決に向け、本研究では独自に開発したCRISPR-Cas13抗菌カプシド技術（特許第6923862号）を利用して、狙った細菌のみを選択的に取り除く細菌叢編集の技術開発を目指した。現在、基本技術は確立しており、実際の応用に向けた開発を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体細菌叢の乱れに起因する疾病の起因菌の同定、疾病メカニズムの解明と起因菌に対する効率的な抗菌治療などを可能にする基盤技術の創生である。本研究は、これまでに不可能であると思われた「細菌叢内の特定遺伝子を有する細菌の殺菌」を実現することで、生体内細菌叢研究やエビデンスに基づく創薬の発展に新たな道筋を切り拓く挑戦的な研究である。本技術は、医学細菌のみならず、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ため、細菌叢の再構築を目的とした治療や、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できる。

研究成果の概要（英文）：The dysbiosis of the human microbiota has been implicated in various pathological conditions. However, the current lack of a method for targeted eradication of specific bacteria, including pathogenic strains, hampers the identification of causative relationships between particular bacteria and diseases. This limitation poses significant challenges to research endeavors and pharmaceutical development. To overcome this hurdle, our study aims to develop a bacterial community editing technology utilizing our novel CRISPR-Cas13 antibacterial capsid technique (patent application 2018-97751). This innovative approach allows for the selective removal of desired bacteria, thereby paving the way for accurate characterization and investigation of their roles in disease pathogenesis. We have successfully established the foundational techniques and are now actively pursuing further advancements towards practical implementation.

研究分野：感染症学・微生物学

キーワード：生体細菌叢 ファージ CRISPR-Cas13

1. 研究開始当初の背景

ヒトの皮膚や腸管粘膜面に存在する細菌叢（生体細菌叢）は、宿主細胞の数十倍におよぶ遺伝子数を持ち、その代謝産物がヒトの生理・病理に深く関与している。生体細菌叢は通常、宿主免疫や抗菌薬治療などの環境因子の影響を受け、その構成細菌を変遷させながら恒常性を維持している。しかし、その恒常性が破綻した場合（細菌叢の乱れ）、様々な疾病を引き起こすため医療上の重大な問題になる。例えば、腸内細菌叢の乱れが、炎症性腸疾患などの消化器疾患だけでなく、肥満や糖尿病といった代謝性疾患、関節リウマチなどの自己免疫疾患、自閉症などの精神疾患といった様々な疾患を引き起こす（Brody Herb, Nature No.7792 2020）。研究が進むに連れて、細菌叢の乱れが様々な疾病に関与していることが明らかであるが、特定の細菌と疾患との因果関係を同定することは非常に困難である。それは、細菌叢から特定の細菌を選択的に除去する技術がないからである。既存の抗菌薬は、細菌叢の恒常性に影響せず目的細菌のみを選択的に殺菌することができない。即ち、現在の殺菌技術では、特定細菌と疾患間の因果関係を同定することは困難であり、関連疾患の基礎研究や創薬研究は行き詰まっている

2. 研究の目的

上記のような状況下で、申請者らは、2020年に CRISPR-Cas13a とファージを利用して、標的遺伝子を有する細菌を選択的に殺菌する抗菌カプシド技術を開発した(特許第 6923862 号)。更に本技術を用いて、試験管内の混合細菌叢から特定の遺伝子を有する大腸菌のみを選択的に殺菌する実験に成功している。

本研究では、炎症性腸疾患であるクローン病をモデル疾患とし、上記の抗菌カプシド技術を利用して、起因大腸菌の毒素遺伝子を標的とした CRISPR-Cas13a 搭載抗菌カプシドを作製し、疾患マウスモデルの腸内細菌叢から起因菌のみを選択的に除去する技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

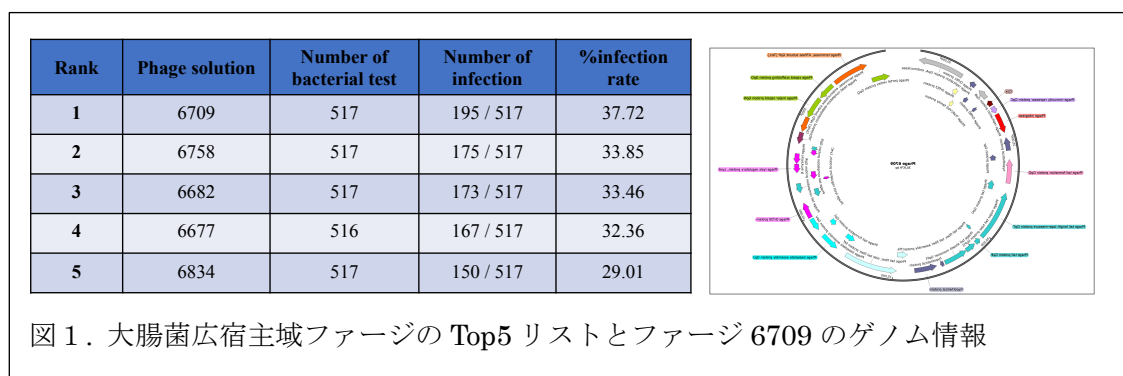
本研究は、当初炎症性腸疾患であるクローン病をモデル疾患として、起因とされる腸管接着性侵入性大腸菌（adherent-invasive Escherichia coli, AIEC）を対象に、本菌の特有遺伝子を標的とした CRISPR-Cas13a を大腸菌ファージに搭載して抗菌カプシドを作製し、その抗菌カプシドを用いて腸内細菌叢から当菌を選択的に除去する技術開発を計画した。しかし、本研究を展開していく中で、当初選定した AIED を変更する必要性が出来てきた。その理由は、1) AIEC 菌は、遺伝型ではなく表現型に基づいて定義された大腸菌であるため、遺伝子標的型の抗菌カプシドの作成において、標的にすることが困難であった。2) また、AIEC 菌の定義は、「腸管接着性侵入性」を特徴とする菌であるように、表現型による定義であり、その定義による細菌の同定は容易ではない。そのため、菌株の収集が困難であった。3) 当初、AIEC 菌の標的遺伝子として選定した2つの遺伝子（*lpfA*, *gipA*）が必ずしも腸炎と関連するエビデンスを得られなかった。そこで標的細菌をクローン病関連大腸がんの発がん要因であるコリバクチン産生大腸菌に変更した。コリバクチンは大腸がんという重要な疾患への関与が明確であり、またコリバクチン産生遺伝子も明確に同定されている。さらに、我々は既にコリバクチン産生大腸菌株多数を確保している。以上のことから、2年目よりコリバクチン産生大腸菌をモデル細菌として研究を進めた。当初の本研究の目的は、生体細菌叢から特定の細菌を選択的に取り除く技術開発であるため、対象

細菌を変更しても当初の研究趣旨に反することではない。また、AIEC とコリバクチン産生大腸菌は同じ大腸菌属であるため、実験方法はほぼ同じである。具体的な研究方法としては、コリバクチン毒素遺伝子を標的とした CRISPR-Cas13 を設計し、それを大腸菌ファージに搭載する。搭載方法として、PICI (Phage-inducible chromosomal island) を介したファージ誘発方法を用いた。まず、PICI (Phage-inducible chromosomal island) を持つ大腸菌に PICI パッケージング配列と相同性のあるファージを溶原化させた。その後 PICI 内に CRISPR-Cas13 を挿入し、その後マイトマイシン C でファージ形成を誘導して、CRISPR-Cas13 をファージカプシド内に搭載した抗菌カプシドの合成を行った。合成した抗菌カプシドの殺菌活性の評価は、当研究室のプロトコル (Kiga K. et al. Nature Communications 11, 2934, Jun. 2020) に従って行った。

4. 研究成果

1) ファージの収集・同定

大腸菌を対象とした抗菌カプシドを開発するための大腸菌ファージを収集した。大腸菌からプロファージ、下水から溶菌ファージを単離した。本項では CRISPR-Cas13a を搭載するためプロファージを必要とする。そのため本項では、プロファージの分離成績を報告する (溶菌ファージ成績は分担課題<12>で報告する)。現在、臨床分離株 517 株に対して感染宿主域が 29~37% のプロファージ 5 株を確保することができ、そのうち 37% を感染するファージ Φ6709 を用いる抗



菌カプシドの合成が進んでいる (図 1)。

大腸菌は、ファージレセプターとなる菌体表面抗原 (H 抗原・O 抗原) に多様性が高いため、広い感染宿主域を持つファージの分離が非常に難しい。例えば、大腸菌モデルファージであるファージ T7 の感染宿主域は約 10% である。プロファージの場合、更に厳しかった。当初、その難しさをある程度予想していたが、本研究の実施で改めて実感した。大腸菌プロファージの分離作業は本研究の実施以前から開始していて、今現在も続いているが、満足したファージ (50% 以上の臨床分離大腸菌に感染するファージ) の分離に至っていない。これまでに、大腸菌 681 株からプロファージサンプルを採取してファージ分離・同定を行なったが、図 1-1 で示したような結果であった。ただ、幸いのことに、上記プロファージの 3 つでカクテル化した場合、80% 以上の大腸菌がカバーできることが分かった。

2) CRISPR-Cas を搭載したファージ (抗菌カプシド) の作成

大腸菌の PICI (Phage-inducible chromosomal island) を利用した抗菌カプシドの合成を行なった。CRISPR-Cas13 は 4kb ほどあり長いため、PICI にそのままコードさせると、ファージのキャパシティをオーバーしてしまう。そこで PICI 上の不必要な遺伝子を相当組換え技術を用いて削除し、その場所設計した CRISPR-Cas13 を挿入した。抗菌カプシドは PICI とプロファージ

により溶原化した大腸菌株上で行い、およそ 10^8 PFU/ml の CRISPR-Cas13 搭載ファージを得ることができた(図2)。CRISPR-Cas13は、大腸菌用に遺伝子コドン最適化を行ってから使用した。また、事前に大腸菌のコリバクチン遺伝子を標的となるように設計した。合成した抗菌カプシドは、フィルター濾過などで精製した後、PEG沈殿法により濃縮を行った。

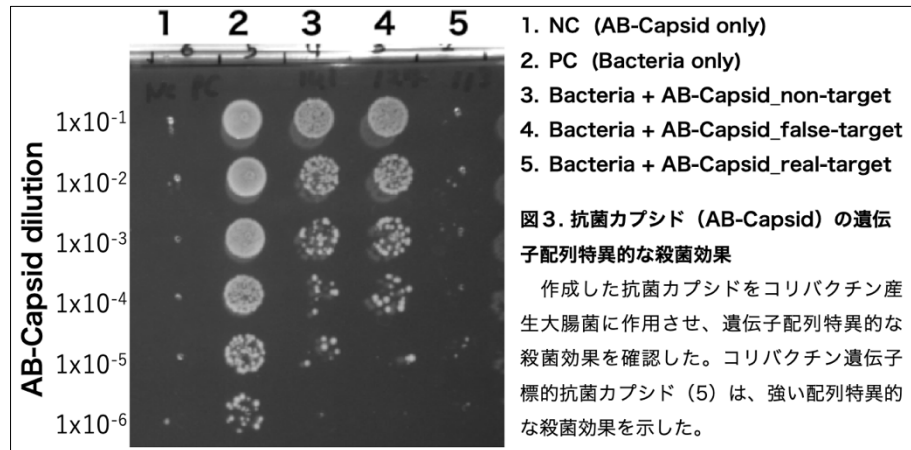
3) CRISPR-Cas 搭載ファージによるコリバクチン産生大腸菌の選択的殺菌効果の検討

合成した抗菌カプシドの遺伝子配列特異的な殺菌効果は、以下3種類を用いて行った。

①毒素遺伝子を標的とする spacer (real-

target) を搭載した抗菌カプシド；②spacer 配列を搭載していない(non-target) コントロール抗菌カプシド；③ランダム配列 spacer を搭載した (false-target) コントロール抗菌カプシド。

上記3種類抗菌カプシドそれぞれをコリバクチン毒素産生大腸菌と混合し、30分作用させた後に10倍系列に希釈して、寒天培地上にスポットして殺菌効果を



評価した。図3で示したように、コリバクチン毒素遺伝子を標的とする spacer を搭載した抗菌カプシド (AB-Capsid real-target) はコリバクチン産生大腸菌に対して顕著な遺伝子配列特異的な殺菌効果を示した (図5の5番)。マウスモデル用いた腸管内での選択的殺菌効果の評価は現在進行中である。

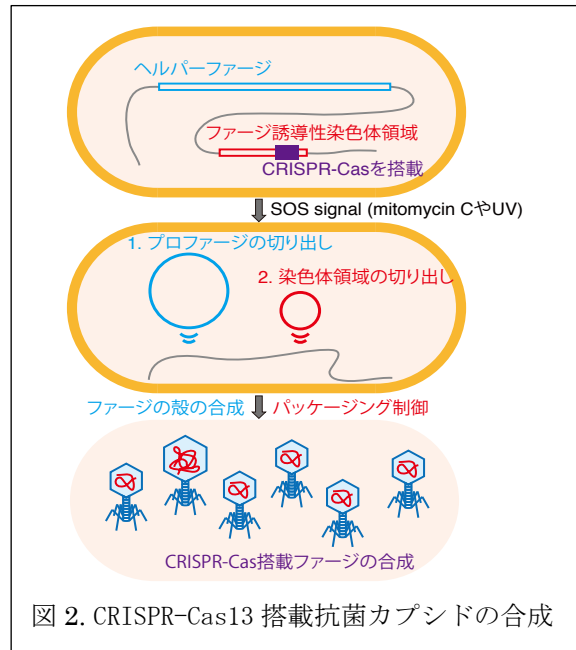


図2. CRISPR-Cas13 搭載抗菌カプシドの合成

図3. 抗菌カプシド (AB-Capsid) の遺伝子配列特異的な殺菌効果
作成した抗菌カプシドをコリバクチン産生大腸菌に作用させ、遺伝子配列特異的な殺菌効果を確認した。コリバクチン遺伝子標的抗菌カプシド (5) は、強い配列特異的な殺菌効果を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Gholizadeh Pourya, Aghazadeh Mohammad, Ghotaslou Reza, Rezaee Mohammad Ahangarzadeh, Pirzadeh Tahereh, Cui Longzhu, Watanabe Shinya, Feizi Hadi, Kadkhoda Hiva, Kafil Hossein Samadi	4. 巻 20
2. 論文標題 Role of CRISPR-Cas system on antibiotic resistance patterns of Enterococcus faecalis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12941-021-00455-6	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 Azam Aa Haeruman, Tan Xin-Ee, Veerananarayanan Srivani, Kiga Kotaro, Cui Longzhu	4. 巻 10
2. 論文標題 Bacteriophage Technology and Modern Medicine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 999 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10080999	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 Veerananarayanan Srivani, Azam Aa Haeruman, Kiga Kotaro, Watanabe Shinya, Cui Longzhu	4. 巻 23
2. 論文標題 Bacteriophages as Solid Tumor Theragnostic Agents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 402 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010402	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, Veerananarayanan 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 1-12
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	渡邊 真弥 (Watanabe Shinya) (60614956)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	氣駕 恒太郎 (Kiga Koutaro) (90738246)	国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・室長 (82603)	
研究分担者	相羽 由詞 (Aiba Yoshifumi) (60783694)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	佐藤 祐介 (Sato'o Yusuke) (20757265)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	削除：2022年6月16日

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