

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19386

研究課題名（和文）細胞内寄生細菌を殺菌する抗菌カプシドの開発

研究課題名（英文）Development of antibacterial capsids for killing intracellular bacteria

研究代表者

渡邊 真弥（Watanabe, Shinya）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60614956

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）：細菌に感染するウイルス（ファージ）を治療薬として用いるファージ療法の開発が世界中で進行中である。しかしながら、ファージはヒト細胞内に効率的に取り込まれないため、細胞内に寄生する細菌への治療効果が限られている。そこで、本研究では、細胞内寄生細菌に対するファージ製剤を開発するための基盤技術の構築を行った。本研究で得られた成果を活用することで、細胞内寄生細菌への治療効果を向上させたファージ製剤の開発が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内寄生細菌が起こす感染症には、結核や非結核性抗酸菌症などが存在する。これらの感染症に対する有効な治療法が限られていることが現状である。そこで本研究では、ファージを基盤とした細胞内寄生細菌を効率的に殺菌する製剤開発のための基盤法を構築した。本法を用いることで、抗酸菌が潜伏するマクロファージの内部へ到達する細胞内侵入性が向上した抗酸菌ファージを合成することに成功した。今後、本研究を継続的に進めることにより、本研究を臨床応用へ発展させ、抗酸菌症の新規治療法の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：The development of phage therapy, which uses viruses (bacteriophages) that infect bacteria as therapeutic agents, is progressing worldwide. However, phages are not efficiently taken up by human cells, limiting their therapeutic effect on intracellular parasitic bacteria. Therefore, in this study, we established a foundational technology for developing the phage-based antibacterial capsid against intracellular parasitic bacteria. The findings from this study provide a foundation for the rational design and engineering of phage-based therapeutics with enhanced intracellular penetration and targeting capabilities.

研究分野：細菌学

キーワード：細胞内寄生細菌 ファージ ファージ療法 ファージライブラリー

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌は世界中に蔓延しており、医療現場や社会全般に深刻な脅威となっている。薬剤耐性菌感染症は、効果的な治療法が限られているため、通常の感染症に比べて重症化しやすく、死亡率が高くなる傾向にある。そのことにより、治療期間が長くなり医療の増加や医療システムへの負担増につながると考えられる。また、薬剤耐性菌は国境を越えて拡散するため、世界的な公衆衛生危機となり世界中の人々の健康を脅かす重大な問題となっている。しかし、細菌が薬剤耐性を獲得するスピードと比較して、薬剤耐性菌に著効する新しい抗菌薬の開発が遅れていることが、薬剤耐性菌問題を深刻化させている。このような状況の中、ファージ療法が再注目されている。細菌に感染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は、歴史的には東欧で開発が進められ、現在では世界各国で臨床使用に向けた臨床試験が行われている。ファージは、殺菌メカニズムが従来の抗菌薬とは異なるため、多くの薬剤耐性菌に対しても作用することが *in vitro* の試験で明らかとなっている。従って、ファージ療法は、薬剤耐性菌感染症に対して有効な治療法になると考えられる。しかし、低分子薬と比較して、ファージの粒子サイズは大きく、病巣組織への浸透性は不透明である。特に、細胞内に潜伏感染する細菌に対しては、その効果が限定的であると考えられる。

細菌がヒトに感染すると、多くの細菌はマクロファージなどの食細胞に捕食され殺菌されるが、一部の細菌は食細胞に貪食された後、マクロファージの殺菌機構から逃れ生存し増殖することが出来る。このような性質を持つ一群の細菌を細胞内寄生細菌と呼ぶ。さらに、多くの抗菌薬は細胞内への浸透性が悪いため、抗菌治療効果が乏しく、細胞内寄生細菌に対する抗菌治療は医療上の難題である。本研究では、細胞内寄生細菌のモデルとして抗酸菌を対象としている。抗酸菌は、結核や *Mycobacterium avium complex* (MAC) を含む細菌である。これらの細菌は、一般的な抗菌薬に耐性を示すことが多いことに加えて、近年では薬剤耐性化が問題となっており、抗結核薬や抗非結核性抗酸菌薬の開発は世界中で推進すべき課題である。さらに、結核や非結核性抗酸菌症を治療するためには、半年から数年におよぶ抗菌治療が必要であることが、これらの感染症の治療を複雑にしている。このような中、非結核性抗酸菌に対するファージ療法が近年行われ、一定の治療効果がみられている。しかしながら、治療失敗例も報告されており、治療失敗の原因が細胞内に潜伏する抗酸菌にファージが届き難いことだと考察された。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ファージの宿主細胞内への移行性を向上させることにより、細胞内に潜伏する細菌を効率的に殺菌できる新しいファージ製剤を開発するための基盤研究を行う。本研究を遂行することにより、ファージ療法の適用疾患を拡大させ、治療薬が届き難い細胞内寄生細菌に対する新規治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

まず抗酸菌に広く感染するファージを複数入手した。次に、抗酸菌ファージに対する遺伝子組換え法を確立した。遺伝子組換え効率が向上している抗酸菌を宿主にして、そこに抗酸菌ファージと遺伝子組換え用の DNA を同時に投与することで、抗酸菌ファージのゲノムを組み替えた。抗酸菌の遺伝子組換え法を用いて、抗酸菌ファージの遺伝子に細胞内移行性を付与する機能を持たせた。さらに、THP-1 細胞を用いた細胞培養系で、その細胞内移行性を評価した。

4. 研究成果

4-1. 抗酸菌ファージ

抗酸菌ファージ TM4 および D29 を分与頂いた。TM4 と D29 ファージの抗酸菌に対する感染域を調べたところ、結核菌 *M. tuberculosis* H37Rv 株に効率的に感染することを確認した。また、これらのファージは、非結核性抗酸菌の実験株である *M. bovis* BCG、*M. smegmatis* mc²155 や、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. abscessus* を含む複数の非結核性抗酸菌の臨床分離株に感染した。つまり、この 2 つのファージは幅広い抗酸菌に感染することがわかった。

4-2. 抗酸菌ファージの遺伝子組換え法

抗酸菌ファージの遺伝子組換え法を確立した。CRISPY-BRED 法 (DOI: 10.1038/s41598-021-

86112-6)を元にした改良法を考案した。実際に、TM4 と D29 の遺伝子組換えに成功した。TM4 フェージの約 5 kb の遺伝領域を除去後、2 kb 以上の遺伝子カセットの挿入に成功した。

4-3. 細胞内寄生細菌を殺菌する抗菌カプシドの構築

構築した抗酸菌フェージの遺伝子組換え技術を用いて、抗酸菌フェージの遺伝子に細胞内移行性を付与する機能を持たせることにより、抗酸菌が潜伏するマクロファージ内へ効率良く到達する細胞内侵入性が向上した抗酸菌フェージ（抗菌カプシド）を合成した。

4-4. 抗菌カプシドの細胞内移行性

構築した抗菌カプシドを用いて、THP-1 を用いた培養細胞系で細胞内移行性を評価した。野生型フェージと比較して、細胞内移行性が向上していることを確認した。従って、抗酸菌が潜伏するマクロファージの内部へ到達する細胞内侵入性が向上した抗酸菌フェージを合成することに成功したと考える。今後、本研究を継続的に進めることにより、本研究を臨床応用へ発展させ、抗酸菌症の新規治療法の開発に貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwasawa Okuto, Kamiya Koji, Suzuki Takayuki, Watanabe Shinya, Cui Longzhu, Karube Daiki, Kado Soichiro, Maekawa Takeo, Komine Mayumi, Ohtsuki Manitaro	4. 巻 6
2. 論文標題 A case of cutaneous <i>Mycobacterium chelonae</i> infection requiring a differential diagnosis of <i>Mycobacterium stephanolepidis</i> infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cutaneous Immunology and Allergy	6. 最初と最後の頁 61～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cia2.12276	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 Fujiki Jumpei, Nakamura Tomohiro, Nakamura Keisuke, Nishida Keita, Amano Yurika, Watanabe Yusaku, Gondaira Satoshi, Usui Masaru, Shimizu Masaru, Miyanaga Kazuhiko, Watanabe Shinya, Iwasaki Tomohito, Kiga Kotaro, Hanawa Tomoko, Higuchi Hidetoshi, Sawa Teiji, Tanji Yasunori, Tamura Yutaka, Cui Longzhu, Iwano Hidetomo	4. 巻 12
2. 論文標題 Biological properties of Staphylococcus virus SA012 for phage therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-25352-6	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 Fujiki Yasumaro, Mato Naoko, Watanabe Shinya, Shibano Tomoki, Tonai Ken, Takahashi Kento, Saito Tatsuya, Okuyama Akiko, Takigami Ayako, Bando Masashi, Suzuki Takuji, Cui Longzhu, Hagiwara Koichi	4. 巻 38
2. 論文標題 Virulent <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pneumonia in an immunocompetent adult associated with a home whirlpool bath: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 101673～101673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmcr.2022.101673	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 新井直人, 中山雅之, 黒木知則, 新井郷史, 川崎樹里, 黒崎史朗, 渡邊真弥, 崔龍洙, 間藤尚子, 坂東政司, 萩原弘一	4. 巻 -
2. 論文標題 気管支鏡検査で診断した <i>Actinomyces graevenitzii</i> による肺放線菌症の1例	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本呼吸器内視鏡学会雑誌「気管支学」	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 -

1. 著者名 渡邊真弥, 崔龍洙	4. 巻 40
2. 論文標題 CRISPR/Cas搭載の遺伝子標的型抗菌ファージの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2992-2994
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 -

1. 著者名 Norihiko Takemoto, Kohei Ogura, Shinya Watanabe, Fumito Maruyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Streptococcus pyogenes Genomics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In: Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations [Internet]. 2nd edition. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center	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 -

1. 著者名 Watanabe Shinya, Nsofor Chijioko A., Kanate Thitianapakorn, Xin-Ee Tan, et. al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Metabolic remodeling by RNA polymerase gene mutations is associated with reduced β -lactam susceptibility in oxacillin-susceptible MRSA	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00339-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.00339-24	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

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊真弥
2. 発表標題 オキサシリン感性MRSAを用いた黄色ブドウ球菌の β -ラクタム薬耐性化機構の解明
3. 学会等名 第16回日本薬学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口智史, 渡邊真弥, 劉怡, 崔龍洙
2. 発表標題 広感染宿主域緑膿菌ファージを用いた遺伝子標的型ファージ製剤の開発
3. 学会等名 第2回ファージセラピー研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tan, X-E., K. Kiga, S. Watanabe, Y. Sato 'o, Y. Aiba, T. Sasahara, K. Thitianapakorn, A.H. Azam, L. Feng-Yu, L. Cui
2. 発表標題 Isolation and characterization of a broad-host-range staphylococcal phage for the loading of CRISPR-Cas system
3. 学会等名 第66回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊真弥, T. Boonsiri, C. Nsofor, X-E. Tan, K. Thitianapakorn, 相羽由詞, 崔龍洙
2. 発表標題 Oxacillin感性MRSAにおけるラクタム薬高度耐性化機構の解析
3. 学会等名 第66回日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口智史, 渡邊真弥, 崔龍洙
2. 発表標題 薬剤耐性遺伝子を持つ緑膿菌を標的とした抗菌カプシドの開発
3. 学会等名 第36回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川口智史, 渡邊真弥, 崔龍洙
2. 発表標題 緑膿菌の薬剤耐性遺伝子を標的とした抗菌カプシドの開発
3. 学会等名 第16回若手コロッセウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Srivani Veerananarayanan, Sugano Takashi, Shinya Watanabe, Aa Haeruman Azam, Kotaro Kiga and Longhzu Cui.
2. 発表標題 Multi-Therapeutic Applications of Engineered Phage Capsids.
3. 学会等名 ISAJ Symposium-2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Thuy Nguyen, Arbaah Mahmoud, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Xin-Ee Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙
2. 発表標題 Development of Cas13a-phagecapsid to eliminate enterotoxigenic Bacteroides fragilis.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口 智史, 渡邊 真弥, 劉 怡, Xin-Ee Tan, 崔 龍洙
2. 発表標題 緑膿菌ファージを用いた抗菌カプシド構築法の確立
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Adeline Yeo Syin Lian, Aa Haeruman Azam, 氣駕 恒太朗, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, 相羽 由詞, Xin-Ee Tan, 崔 龍洙
2. 発表標題 Development of highly efficient CRISPR-Cas13-antimicrobial against MRSA
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ola Alessa, Kanate Thitianapakorn, Thi My Duyen Ho, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Srivani Veerananarayanan, Xin-Ee Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙
2. 発表標題 Isolation of bacteriophages targeting AIEC strains with a broad host range from wastewater
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mahmoud Arbaah, Thuy Nguyen, 相羽 由詞, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, Xin-Ee Tan, 笹原 鉄平, 崔 龍洙
2. 発表標題 Isolation and characterization of Bacteroides fragilis bacteriophage with a broad host range
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Thi My Duyen Ho, ティティアナンパコーン カネート, アルイーサ オラー, 宮永 一彦, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, タン シンイー, スリワニ プィーラナラヤナン, 崔 龍洙
2. 発表標題 Isolation and characterization of broad-host-range bacteriophage targeting Escherichia coli strains.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 タン シンイー, 氣駕 恒太郎, 渡邊 真弥, 宮永 一彦, 相羽 由詞, KanateThitiananpakorn, 崔 龍洙
2. 発表標題 A trick method enabling packaging of Staphylococcal pathogenicity islands into desired phage capsids
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ヴィーラナラヤナン スリワニ, Kanate Thitiananpakorn, 菅野 貴史, 渡邊 真弥, Aa Haeruman Azam, 氣駕 恒太郎, Longzhu Cui
2. 発表標題 Engineered Phage Capsids for Cancer Cell Targeted Drug Delivery Application.
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	崔 龍洙 (Cui Longzhu) (50306932)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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