

1. 合成生物学 × バクテリオファージ ～細菌の天敵をデザインして創る～

安藤 弘樹

講演時所属：岐阜大学大学院医学系研究科病原体制御学分野
現所属：岐阜大学大学院医学系研究科ファージバイオリジクス研究講座
アステラス製薬株式会社研究本部

本稿は、第67回日本ウイルス学会学術集会におけるシンポジウム4「様々なウイルスの世界」でお話しさせていただいた内容の概要になります。この場を借りて、シンポジウム講演及び本稿執筆の機会をいただきましたことにあらためて感謝申し上げます。

講演では近年盛り上がりを見せている「ファージセラピー」研究に焦点を当て、その背景、従来のファージセラピー、そして遺伝子組換えファージを使った次世代ファージセラピーについて、私の研究も合わせてご紹介しました。

ファージセラピーとは、細菌の天敵ウイルスであるバクテリオファージ（略してファージ）を使って細菌感染症を治療することです。ファージセラピーは東欧諸国を中心に実施されており、100年近い歴史があります。一方、西洋諸国においては、ファージは分子生物学の黎明期から研究対象として、また遺伝学的ツールとして使われてきました。

講演及び本稿のタイトルにある「合成生物学」は比較的新しい学問・研究領域です。初めて合成生物学という言葉が使われたのは約40年前ですが、実際に学問として興ったのは2000年前後だと考えられています。合成生物学は、生命そのものや生命システムをデザインして起動すること、またはそれを応用することを目指すものです。近年、遺伝学や合成生物学を駆使した遺伝子組換えファージや、より大規模な改変を施した人工ファージを使ったファージセラピー研究が報告されています。

さて、抗菌薬の発見によって（特に西洋諸国では）歴史に埋もれてしまったファージセラピーが再興しています。最大の理由は、薬剤耐性細菌感染症の世界的な蔓延だと考えられます。英国政府が公開した通称「オニールレポート」(O'Neill report) は、このまま薬剤耐性細菌感染症に対して何の対策もとられなければ、2050年には年間1,000万人が死亡すると警告しています¹⁾。これは人類の死亡原因第1位になる数です。抗菌薬の開発が滞るなか、古くて新しいファージセラピーに注目が集まっているわけです。米国では緊急条件下ではありますが多剤耐性細菌感染症に対するファージセラピーが実施されており、パターンソン症例は特に有名です²⁾。

ファージセラピーは薬剤耐性細菌感染症治療における「切り札」になりえるものです。しかしながら、天然のファージを用いるアプローチには問題もあります。以下に例として3つの問題を示しながら、どのような合成生物学的アプローチが可能であるのかをご紹介します。

1つ目の問題は、「ファージカクテル」の安定性です。ファージセラピーでは、ファージの宿主域の狭さを補うため、またはファージ耐性菌の出現を抑えるために複数のファージを混合したファージカクテルの利用が考案されています。一定の効果が認められる一方で、異種ファージをカクテルにすることによって各ファージの性能や力価が大きく低下するという報告があります³⁾。これに対して、単一のファージでありながら宿主特異性が異なるデザイナーファージを使うというアプローチが報告されています^{4,5)}。これらの研究ではファージの宿主認識部位（例えば尾繊維の先端部分）だけを変化させ、単一の筐体を持ちながら宿主特異性だけが異なるカクテルを創出しています。私はこれらの研究に携わってきましたが、カクテルにしても各ファージの性能や力価が低下しないことを確認しています。

連絡先

〒501-1194

岐阜県岐阜市柳戸1-1 岐阜大学大学院医学系研究科
ファージバイオリジクス研究講座

TEL: 058-230-6144

E-mail: hiroando@gifu-u.ac.jp

2つ目の問題は、常在細菌叢への悪影響です。ファージの宿主特異性は抗菌薬と比べると遥かに高いものですが、それでも標的細菌だけを殺せるわけではありません。例えば、標的細菌以外の善玉菌を殺してしまうことによる細菌叢の攪乱・変化が私たちの健康に悪影響を及ぼすのではないかと懸念があります。これに対して、CRISPR-Casを搭載したファージによる塩基配列特異的な殺菌が実証されています^{6,7)}。CRISPR-Cas搭載ファージは、標的細菌と同じファージ受容体を持つ善玉菌に吸着（感染）しても標的塩基配列がなければ殺菌しません。これによって、例えば毒素遺伝子や薬剤耐性遺伝子など、特定の塩基配列を持つ標的細菌だけを殺菌することが可能になりました。

3つ目の問題は、ファージの利用そのものに関するものです。ファージは抗菌薬と異なり、標的細菌もしくは適したファージ受容体を持つ細菌がいれば増え続けます。使い方にもよりますが、大量の高力価ファージを何の封じ込め策も講じずに利用しても良いのでしょうか。自然環境への放出が生態系に悪影響を与える可能性は否定できません。遺伝子組換えファージや人工ファージであればなおさらです。では、どのように封じ込めできるでしょうか。すぐに思い浮かぶのは物理的封じ込めです。隔離された場所を用意して、そこで全ての操作・治療を実施することで外部へのファージの放出・拡散を防ぐことができるでしょう。しかし、患者の数が増えれば隔離された場所を確保するのは難しくなるでしょうし、天災や人災による拡散を防ぐことは実質的には不可能です。そこで私の研究室では、ファージそのものに生物学的封じ込め策を施す研究に取り組んでいます。論文公表前なので詳細を記すことは控えますが、ファージの感染能力と殺菌能力を維持させたまま、増殖能力だけを欠いた生物学的封じ込め可能なファージを創出しました。ファージの「増える抗菌薬」としての特徴がなくなってしまうわけですが、高力価なものを使うことによって天然ファージと変わらない治療効果があることを動物モデルを用いて確認しています。

これらのアプローチはファージセラピーが抱える問題を解決しうるものです。しかし、ここでご紹介したものは全て、モデルファージに限定された概念実証実験であり、実用化に至るかどうかは分かりません。目的に応じてどのようにデザインすればいいのか、どうすれば正確に効率的に創出・起動できるのか、手法が確立されているわけではありません。CRISPR-Casを搭載させる手法では2段階の特異性（吸着時の宿主特異性と標的配列に対する特異性）が殺菌効率を低下させることが知られています。これらも含めて、現在の合成生物学的アプローチでは、ベースとなる天然ファージが必要になります。私たちがいま持っている知識と技術ではファージの *de novo* 合成はできず、手探りのアプローチが続いています（だからこそ、やりがいがあります！）。例外はあるものの、標的細菌を殺菌できる

ファージを手に入れるための最も速く、直接的で効率的な方法は、昔も今も自然環境からのスクリーニングです。

従来のファージセラピーと次世代ファージセラピー、どちらが優れているということではなく、それぞれに長短所があります。私の研究室では天然ファージと人工ファージ（デザイナーファージ）を両輪にして、ファージセラピーの実用化に向けた研究を展開しています。世界中で再興しているファージセラピー研究がさらに加速し、薬剤耐性細菌感染症治療の切り札になることを願いながら、これからも邁進していきます。

利益相反事項の開示について

本稿について、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。著者の現所属はアステラス製薬株式会社及び、アステラス製薬と岐阜大学が設置した共同研究講座（ファージバイオロジクス研究講座）ですが、本稿は岐阜大学医学系研究科病原体制御学分野所属時のシンポジウム講演内容をもとにしたものです。

参考文献

- 1) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, UK, 2014.
- 2) Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, Segall AM, Taplitz R, Smith DM, Kerr K, Kumaraswamy M, Nizet V, Lin L, McCauley MD, Strathdee SA, Benson CA, Pope RK, Leroux BM, Picel AC, Mateczun AJ, Cilwa KE, Regeimbal JM, Estrella LA, Wolfe DM, Henry MS, Quinones J, Salka S, Bishop-Lilly KA, Young R, Hamilton T., Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection, *Antimicrob Agents Chemother*, 61:e00954-17, 2017.
- 3) Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que YA, Resch G, Rousseau AF, Ravat F, Carsin H, Le Floch R, Schaal JV, Soler C, Fevre C, Arnaud I, Breteau L, Gabard J., Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial, *Lancet Infect Dis*, 19(1): 35-45, 2019.
- 4) Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK., Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing, *Cell Syst*, 1(3):187-196, 2015.
- 5) Yehl K, Lemire S, Yang AC, Ando H, Mimeo M, Torres MT, de la Fuente-Nunez C, Lu TK., Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis, *Cell*, 179(2):459-469, 2019.
- 6) Citorik RJ, Mimeo M, Lu TK., Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases, *Nat Biotechnol*, 32(11):1141-1145, 2014.

7) Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA., Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-

specific antimicrobials, *Nat Biotechnol*, 32(11):1146-1150, 2014.

