

1-04

緑膿菌感染症の克服に向けた遺伝子標的型ファージ製剤の基盤技術の確立

○川口 智史¹、渡邊 真弥¹、劉 怡¹、崔 龍洙¹

自治医科大学 感染・免疫学講座 細菌学部門¹

【目的】日和見感染細菌の一種である緑膿菌は、薬剤排出ポンプの高発現やバイオフィルムの形成、外来性の薬剤耐性遺伝子の獲得によって耐性化し、難治性緑膿菌感染症を引き起こす。薬剤耐性緑膿菌感染症を克服するために新規治療薬の開発が重要であるが、低分子の候補化合物は減少傾向にあり、新しいブレイクスルーが必要である。近年、細菌に感染するバクテリオファージ（ファージ）が治療薬の候補として注目を集めている。また、分子生物学の急速な発展により、ファージを人工的に改変することでファージに付加価値を付与することが可能になった。そこで我々は、緑膿菌ファージに殺菌性物質を搭載した新しいファージ製剤の開発を目指している。本研究では、遺伝子配列特異的な殺菌作用を示す CRISPR-Cas13a を緑膿菌ファージカプシド内に搭載した抗菌カプシドを構築することで、標的遺伝子を持つ緑膿菌のみ殺菌する遺伝子標的型ファージカプシドを開発し、新規ファージ製剤開発のための基盤技術を確立する。

【方法】まず初めに、phiMS037 のカプシド内に DNA が移行するように設計したファージミドに、カルバペネム耐性遺伝子 *bla*_{IMP-1} に対して配列特異的な殺菌活性を示す CRISPR-Cas13a を搭載した Cas13a_IMP1 ファージミドを構築した。次に、Cas13a_IMP1 ファージミドを phiMS037 が溶原化している緑膿菌に形質転換することで、Cas13a_IMP1 ファージミドが phiMS037 カプシドに封入される抗菌カプシドを産生する宿主細菌を作製した。さらに、宿主細菌をマイトマイシン C に暴露することで抗菌カプシドを産生した。Cas13a_IMP1 ファージミドの遺伝子特異的な殺菌作用を *bla*_{IMP-1} 産生緑膿菌で評価した。

【結果】マイトマイシン C 暴露によって、抗菌カプシドを 10⁸ CFU/mL 得た。また、得られた抗菌カプシドを *bla*_{IMP-1} 遺伝子保有または非保有緑膿菌に感染させたところ、*bla*_{IMP-1} 遺伝子保有緑膿菌でのみ抗菌カプシドによる殺菌作用が確認された。つまり、抗菌カプシドによる緑膿菌の遺伝子配列特異的な殺菌作用に成功したことを示している。

【考察】本研究で構築した抗菌カプシドは、標的遺伝子を持つ緑膿菌の配列特異的な殺菌に成功した。抗菌カプシドは、CRISPR-Cas13a のスペーサーを変更するだけで容易に標的遺伝子変更することができる。そのため、新規治療薬としてだけでなく、遺伝子検査等の異なる用途で広範囲に応用できると考える。また、本技術を用いて、更に臨床応用に適したファージ製剤の開発を目指す。