

氏 名	かわぐち ともみ
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 731 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 17 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	ファージを用いた CRISPR-Cas13a によるカルバペネム耐性緑膿菌の薬剤感受性の回復
論文審査委員	(委員長) 教授 興水 崇鏡 (委 員) 教授 加藤 大智 准教授 早川 盛禎

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

薬剤耐性菌の増加は、現代における最も深刻な公衆衛生上の課題の一つであり、WHO はその対策を喫緊の課題として位置づけている。緑膿菌は元来抗菌薬に対して高い抵抗性を示すため、有効な抗菌薬が限られている。特に、緑膿菌感染症の第一選択薬であるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す緑膿菌は、治療困難な感染症を引き起こす。当研究室では、CRISPR-Cas13a をファージカプシドに搭載した遺伝子標的型抗菌カプシドを開発した。これは、Cas13a が標的遺伝子の mRNA を認識・切断し、さらに周囲の RNA を分解することで、標的遺伝子を発現する細菌を増殖抑制する。本研究では、カルバペネム耐性遺伝子である *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子を標的とした抗菌カプシドを構築し、カルバペネム耐性緑膿菌の増殖抑制、および薬剤感受性の回復を検討した。

### 2 研究方法

#### 緑膿菌に対する Cas13a の有効性の評価

当研究室では、121 個のスペーサー配列のスクリーニングにより、*bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子発現大腸菌に対して強い増殖抑制効果を示すスペーサー配列を明らかにした。まず、これらのスペーサー配列が緑膿菌に対して有効性を調べるために、大腸菌で高い増殖抑制効果を示した 7 種類のスペーサーと緑膿菌用にコドン最適化した *cas13a* (*cas13aPA*) 遺伝子を導入した *cas13aPA* 搭載プラスミドを構築した。このプラスミドを *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子発現緑膿菌に導入し、寒天平板法と液体培養法を用いた増殖抑制試験、イミペネムおよびコリスチンの最小発育阻止濃度 (MIC) の測定、さらに MIC における生菌数の測定を実施し、Cas13aPA の有効性を評価した。

#### CRISPR-Cas13a を搭載する溶原化ファージの選択と評価

緑膿菌臨床分離株 2 株から 2 種類の溶原化ファージを単離し、NITE バイオテクノロジーセンター (NBRC) から 9 種類の緑膿菌ファージを入手した。計 11 種類の緑膿菌ファージについて、緑膿菌臨床分離株 98 株に対する感染宿主域とファージゲノムを解析した。これらの解析から phMS037 を抗菌カプシド構築に使用することとし、phMS037 の特性を評価した。

#### 抗菌カプシドの構築

抗菌カプシドの構築には、緑膿菌実験室株である PA01 株を用いた。しかし、PA01 染色体上には 3 種類のプロファージが存在しており、これらが抗菌カプシド構築の障害となる可能性があった。そのため、まず相同組換え法によりこれらを除いた PA01  $\Delta \Phi$  株を作製した。次に、PA01  $\Delta \Phi$  染色体に phMS037 を溶原化させた (PA01  $\Delta \Phi :: \text{phMS037}$ )。par 領域は、ファージゲノムをカプシドに搭載するために必要な遺伝子群を含む領域である。par 領域の欠損は抗菌カプシドの産生効率を向上させることが以前の研究で報告されていたため、PA01  $\Delta \Phi :: \text{phMS037}$  の par 領域欠損株 (PA01  $\Delta \Phi :: \text{phMS037} \Delta \text{pac}$ ) を作製した。次に、par 領域を pnPAG プラスミドに搭載することで、マイトマイシン C 誘導により、本プラスミドがファージカプシドに導入されるベクター (ファージミド) を作製した。本ファージミドに *cas13aPA* 遺伝子を搭載することで非標的型 *cas13aPA* 搭載ファージミドを、さらに *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子を標的したスペーサーを挿入することで *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子標的型 *cas13aPA* 搭載ファージミドを構築した。これらのファージミドを PA01  $\Delta \Phi :: \text{phMS037} \Delta \text{pac}$  株に形質転換し、マイトマイシン C で誘導することで抗菌カプシドを産生した。

### 抗菌カプシドの評価

抗菌カプシドの産生効率は、ファージミドが持つゲンタマイシン耐性遺伝子の PA01  $\Delta \Phi$  株への形質転換効率により評価した。また、親ファージの混入は、PA01  $\Delta \Phi$  株に対するプラーク形成能により評価した。次に、*bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子発現緑膿菌に感染させることで、増殖抑制効果を評価した。この時、誘導剤の濃度に応じた標的遺伝子の発現量の変化による増殖抑制効果の影響も評価した。最後に、*bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子標的型抗菌カプシドとイミペネムとの相乗効果を検討した。

## 3 研究成果

### 緑膿菌に対する Cas13a の有効性の評価

7 種類のスペーサーを搭載した Cas13aPA は、いずれも *bla<sub>IMP-1</sub>* 遺伝子発現緑膿菌に対して増殖抑制効果を示した。特に、スペーサー IMP1-702 は最も効果が高く、寒天平板法と液体培養法で増殖抑制効果を示した。また、この Cas13aPA は、イミペネムの MIC を低下させたが、コリスチンの MIC は変化させなかった。この時、イミペネム濃度 16  $\mu\text{g/mL}$  または 8  $\mu\text{g/mL}$  で生菌数の減少が確認された。

### CRISPR-Cas13a を搭載する溶原化ファージの選択

今回の研究で使用した 11 種類の緑膿菌ファージは、いずれも 50%以上の臨床分離株を溶菌した。特に NBRC20043 は 88.8%と最も高い感染宿主域を示した。これらのファージのゲノムを解析したところ、phMS037 のみが溶原化に必要なインテグラーゼ遺伝子を保有していた。当研究室では、溶原化ファージを元に抗菌カプシドを構築していたため、phMS037 を抗菌カプシド構築の基盤ファージとした。phMS037 は線毛を吸着部位とし、直径 1~2mm のプラークを形成する長い尾部のポドウイルスであった。BLAST 解析で高い相同性を示した緑膿菌ファージ phiC725A (NC\_073674.1) ゲノムの par 領域から、phMS037 の par 領域を推測した。

### 抗菌カプシドの構築

ファージの溶原化に適した宿主株 (PA01  $\Delta \Phi$ ) の作製は、PCR 法で確認した。次に、PA01  $\Delta \Phi$  株に phMS037 を溶原化させ、par 領域のコロニー PCR 法によって phMS037 の溶原化株 (PA01  $\Delta \Phi :: \text{phMS037}$ ) を選択した。さらに、par 領域欠損株 (PA01  $\Delta \Phi :: \text{phMS037} \Delta \text{par}$ ) を作製

し、サンガーシーケンス法により *par* 領域の欠損を確認した。これらの株をマイトマイシン C 誘導すると、*par* 領域欠損株ではプラークが消失した。つまり、*par* 領域の欠損は、完全なファージを誘発しないことが確認された。そのため、*par* 領域欠損株にファージミドを形質転換することで、抗菌カプシド産生株を作製した。

### 抗菌カプシドの評価

それぞれの抗菌カプシド産生株は、マイトマイシン C 誘導により、抗菌カプシドを誘発した。この時、*bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子標的型抗菌カプシドは、*cas13aPA* 非搭載抗菌カプシドとほぼ同程度の産生量であった。また、増殖抑制効果を評価したところ、イミペネム耐性誘導濃度で *bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子発現緑膿菌の増殖を抑制した。さらに、MIC の測定により、*bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子発現緑膿菌のイミペネム感受性の回復が確認された。

## 4 考察

本研究で開発された抗菌薬感受性の回復機構は、耐性遺伝子の mRNA が特異的に分解されたことが一因であると推測されるが、今後詳しい解析が必要である。本システムはスペーサー配列を変更することで別の遺伝子を標的化できると考えられる。しかし、今後、実臨床に展開するためには、スペーサーの最適化、Cas13 サブタイプの選択、そして生産効率といった課題がある。

## 5 結論

本研究では、*bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子を標的とする CRISPR-Cas13a を緑膿菌ファージカプシドに搭載することで、カルバペネム耐性緑膿菌のイミペネム感受性を回復させるシステムを開発した。一度使用不可になった抗菌薬を再び有効にすることができる本システムは、薬剤耐性に囚われずに通常の抗菌薬治療が可能になるため、薬剤耐性菌問題の解決に繋がる新たな治療戦略となる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、臨床的に問題となっているカルバペネム耐性緑膿菌に対する新たな治療戦略として、CRISPR-Cas13a を用いた抗菌カプシドを開発した。カルバペネム耐性緑膿菌は深刻な多剤耐性菌の一種であり、特に IMP 型メタロ-β-ラクタマーゼ (*bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子) を介して抗菌薬に耐性を示す。本研究では、CRISPR-Cas13a システムを利用し、*bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子を標的とすることで、その発現を抑制し、カルバペネム系抗菌薬イミペネムに対する感受性を回復させることを目指した。

まず、CRISPR-Cas13a がスペーサーIMP1-702 を用いた場合に緑膿菌でも増殖を抑制しイミペネムの感受性を改善させることを確認した。続いてファージ療法の基盤となるインテグラーゼ型溶原化ファージ phMS037 を緑膿菌臨床分離株から単離し、その特性を解析した。phMS037 はポドウウイルス様の形態を持ち、線毛を宿主吸着に用いることが確認された。次に、CRISPR-Cas13a を搭載するファージミドを構築し、カルバペネム耐性緑膿菌に遺伝子標的型抗菌カプシドを導入するシステムを開発した。Cas13a は *bla*<sub>IMP-1</sub> 遺伝子の mRNA を標的とし、細菌の増殖を抑制してイミペネムの感受性を向上させることが示された。

本研究の成果は、CRISPR-Cas13a を用いた遺伝子標的型ファージ療法が、薬剤耐性緑膿菌に対して有望であることを示した点にある。従来の抗菌薬に依存しない治療戦略として、CRISPR 技術を応用した抗菌カプシドは、今後の臨床応用への可能性を持つ。

審査では、結論に至る理論的な明解さや表現、論文の考察が必要な点について審査員から指摘があり、申請者によって分かり易い表現と考察が加えられて適切に修正された。図表や参考資料の引用も適切であり充実した内容となっていることより、審査委員全員一致で本論文が博士論文として合格に値すると判断した。

## 最終試験の結果の要旨

本研究では、薬剤耐性菌であるカルバペネム耐性緑膿菌に対して CRISPR-Cas13a を搭載した抗菌カプシドを用いて、耐性遺伝子 blaIMP-1 の発現を抑制し、イミペネムに対する感受性を回復させることを実証した。さらに、Cas13a 搭載ファージミドを細菌に導入するシステムを構築し、薬剤耐性菌感染症の新たな治療戦略の可能性を示した。

審査会では、耐性遺伝子の水平伝播、静菌的效果と殺菌的效果、耐性遺伝子の差異、インテグラーゼの追記、速度定数、要旨の明解さ、コントロール実験などについて審査員から質問があり、口頭ならびに論文上で適切に対応された。

以上の発表、質疑応答、修正した論文の総合評価より、申請者は十分に博士号に値し、本研究の今後についても、基礎臨床ともに双方の観点から大きく進展が期待できる内容と判断したため、審査員は全員一致で合格とした。