

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(腸内マイクロバイオーーム制御による次世代創薬技術の開発)
研究開発中間進捗／成果概要報告書（公開版）

公開

令和6年 10月 4日

1. 公募研究開発課題名：公募課題5：疾患克服に資する腸内細菌を標的とした先端的MB 制御技術の開発
2. 研究開発課題名：腸内マイクロバイオーーム制御による次世代創薬技術の開発/課題5：腸内細菌から狙った細菌を選択的に除去する医薬品の開発に向けた新規殺菌技術の開発
3. 代表機関名：学校法人自治医科大学
4. 研究開発代表者名：崔 龍洙
5. 所属・役職：医学部 感染・免疫学講座 細菌学部門 教授
6. 全研究開発期間：令和3年12月1日 ～ 令和9年3月31日（予定）

【研究開発概要】

腸内細菌叢の乱れが様々な疾患を引き起こすことが解ってきたが、狙った細菌を選択的に殺菌する技術はなく、特定の細菌種と疾患との因果関係を解明するのは困難である。そのため、病原関連の基礎研究や創薬研究、病因治療法の開発が大幅に遅延している。本課題の目的は、腸内細菌叢から狙った細菌を選択的に除去する新規殺菌技術の開発を目指している。本研究開発では、研究の前半期(最初の3年)に大腸がんの発生への関与が明確であるコリバクチン産生大腸菌とエンテロトキシン産生バクテロイデス・フラジリス(ETBF)を通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌の代表的なモデル腸内細菌として研究を遂行する。そして、コリバクチン産生大腸菌とETBFを腸内細菌叢から選択的に除去できるCRISPR-Cas13 搭載ファージカプシドの構築とその関連技術を確立する。本研究では、8つの具体的な研究開発項目を設定し、それぞれに分担者を決めて共同研究を実施している。[1]腸内細菌を標的としたCRISPR-Cas13 搭載抗菌カプシド技術の開発；[2]腸内細菌と腸内細菌ファージの収集、管理；[3]腸内細菌叢関連疾患患者の腸管内細菌検体の収集・解析；[4]ファージと腸内細菌叢のメタゲノム解析；[5]長鎖ゲノムファージの人工合成技術の開発；[6]CRISPR-Cas13 の選別およびその殺菌機能の強化[7]in vitro MB モデルを用いた抗菌カプシドの評価；[8]抗菌カプシドの生体内動態および腸内MB 動物モデルを用いた殺菌効果の評価。

【研究開発中間進捗／研究成果概要】

- 項目1: 抗菌カプシド構築では、独自に取得した大腸菌ファージを用いて、抗菌カプシド10種類を構築し、遺伝子特異的な殺菌効果が認められた。また、ETBFを認識するスパーサー8種類を選定し、ファージミドを作製した。さらに、新しい細菌標的型カプシド粒子(B-CAP)技術も開発した。
- 項目2: 研究対象腸内細菌とそれに感染するファージの収集では、標的毒素遺伝子陽性の大腸菌を含む大腸菌894株、標的毒素遺伝子陽性株を含むバクテロイデス フラジリス314株まで収集を拡充した。また、第3番目の対象細菌の選定を行い、臨床分離 *T. ramosa* 株を合計160株収集した。さらに、それぞれの対象細菌に関するファージライブラリーも拡充している。
- 項目3: 腸内細菌叢関連疾患患者のうち、炎症性腸疾患患者、大腸がん患者、脂肪肝患者から消化管内容物、消化管粘膜、糞便を採取し、検体に含まれる細菌を同定した。
- 項目4: 研究代表者および研究分担者から解析依頼があった菌株、ファージおよび細菌叢のゲノム解析を実施した。また、ファージのゲノム解析により抗菌カプシド構築のためのパッケージング領域を推定した。
- 項目5: 酵母の人工染色体(YAC)を用いて、100 Kbを超えるファージゲノムの構築を進めている。40 Kbのゲノムを持つ大腸菌ファージの構築まで成功した。また、選択マーカーやDNA断片の最適化を進めている。
- 項目6: 殺菌力がこれまでのCas13よりもごく微量なRNAも認識できる特性を持つ強力な新規Cas13(New-Cas13)を発見した。また、本研究で使用するための殺菌活性の高いCas13を選定した。
- 項目7: 通性嫌気性及び嫌気性条件下で、嫌気性菌用液体培地で培養した対象細菌とマウス糞便を混合したin vitro MBモデルを構築した。野生型ファージを用いて、本モデルでの対象細菌のみを除去する実験系の最適化を実施している。
- 項目8: 抗菌カプシドの生体内動態および腸内MB 動物モデルにおける殺菌効果の評価するために、標的細菌(大腸菌感染と *T. ramosa* 菌)腸管定着マウスモデルを構築した。また、野生型ファージを用いる選択的除菌を効果も確認できた。