

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 中村 暢宏

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 ファージ療法実用化に向けた基礎的及び臨床応用研究：ファージ耐性化に伴うトレードオフを利用した次世代型細菌感染症治療戦略の構築へ

審査委員

主査 教授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 教授 山下 和人（獣医麻酔学）

副査 教授 萩原 克郎（獣医ウイルス学）

副査 教授 樋口 豪紀（獣医衛生学）

副査 准教授 臼井 優（食品衛生学）

学位論文要旨

ファージ療法実用化に向けた基礎的及び臨床応用研究：ファージ耐性化に伴う
トレードオフを利用した次世代型細菌感染症治療戦略の構築へ

酪農学園大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

獣医生化学 中村 暢宏

抗菌薬の不適切な使用によって、抗菌薬の効かない薬剤耐性菌が世界中で出現し、拡大している。近年、“ポスト抗菌薬時代”の新たな主役としてバクテリオファージ（ファージ）を用いたファージ療法が注目されている。ファージは細菌特異的に感染するウイルスであり、ファージ由来溶菌酵素であるエンドライシンによって細菌を溶菌させる。本研究では獣医療におけるファージ療法の運用に向けて、基礎的性状解析から実際の臨床応用にまで至る包括的な研究を展開した。

第 I 章では、*Staphylococcus aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 の宿主域、安定性、及び安全性について調査した。PhiSA012 は Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) を含む *S. aureus*、さらにその他いくつかのブドウ球菌属に対しても溶菌活性を有することを明らかにした。また、2 ヶ月間の 4°C 保存、1 回までの凍結融解、pH 3 から pH 9 の溶液中ではファージ力価の変化は認められなかった。また、熱刺激により phiSA012 の溶菌活性は徐々に失活することがわかった。また、血清 (FBS) の存在は phiSA012 の溶菌活性を阻害しなかった。健常犬に静脈内、膀胱内、外耳道内、皮膚噴霧の経路で phiSA012 を投与したところ、顕著な副作用は認められず、イヌに対する phiSA012 投与の安全性を確認した。

第 II 章では、phiSA012 由来エンドライシン Lys-phiSA012 を精製し、機能解析を行った。Lys-phiSA012 は多剤耐性株やファージ phiSA012 の溶菌活性が見られないブドウ球菌に対しても急速な溶菌活性を示した。ドメイン欠失変異体を用いた実験により、Lys-phiSA012 の溶菌活性には触媒ドメインの CHAP、及び細胞壁結合ドメインの SH3b の存在が重要であることを証明した。また、1 mM 以上の Ca^{2+} 、また 100 μM Zn^{2+} の存在によって Lys-phiSA012 の溶菌活性が最大になることを明らかとした。さらに、Lys-phiSA012 の添加は、MRSA のオキサシリンに対する MIC 値を減少させた。

ヒトアトピー性皮膚炎は慢性的な炎症性皮膚疾患であり、近年の細菌叢解析の進展によって、病変部では細菌叢の乱れと *S. aureus* 優位な増生が症状の増悪に関与していることが示されている。第III章では、アトピー性皮膚炎自然発症マウスモデルである NC/Tnd マウスを用いて、ブドウ球菌を標的としたファージ療法により皮膚炎症状の改善が認められるかを検証した。PhiSA012 は試験管内にてマウス病変部から分離されたほとんどのブドウ球菌に対して溶菌活性を示した。また、phiSA012 投与したマウスでは病変部組織においてもブドウ球菌は減少し、皮膚炎症状は顕著に改善し、さらには血中 IgE 濃度も Vehicle 群と比較して有意に低値を示した。

第IV章では、既存治療に抵抗性を示した *Pseudomonas aeruginosa* 感染を伴う難治性慢性外耳炎に罹患したイヌに対し、ファージカクテル療法を実施した。被検動物から事前に単離した *P. aeruginosa* PASz に溶菌性を示すファージを選択、及び新規に分離し、複数のファージを混合したファージカクテル設計して点耳投与を行なった。ファージ療法を開始すると一部症状の改善が認められたものの完全には奏功せず、またファージ耐性菌の出現が認められた。ファージ耐性菌に対して溶菌活性を示すファージを新たに分離し、水平耳道内に認められた腫瘍性病変を摘出して治療を継続した。すると、外耳炎症状はさらに改善し、再診時には耳垢スワブから *P. aeruginosa* は検出されなかった。また、ファージ耐性菌 PASz_d7mt の変異解析を実施したところ、IV型線毛の組み立てに関わる *fimV* や、鞭毛を構成する *fliG* などに変異が認められ、これらを介した運動性が低下していることを明らかとした。

第V章では、ファージ耐性化に伴う細菌の表現型変化に着目し、MRSA が phiSA012 に耐性を獲得するメカニズムとファージ耐性株の表現型変化について解析した。臨床分離株 MRSA2007-13 のファージ耐性株では転写制御因子である *geneX*、またペプチドグリカン合成酵素の *femA* に変異が認められた。*geneX* のみに変異を有するファージ耐性株はファージの宿主菌への吸着が阻害されるものの、弱い溶菌活性を示した。一方、*geneX* と *femA* 両方に変異を有するファージ耐性株は phiSA012 の溶菌活性に完全な耐性を獲得していた。*femA* 変異株はペプチドグリカン構造が変化し、Lys-phiSA012 の溶菌作用から逃れることで、phiSA012 の溶菌活性に完全な耐性を示していたことを明らかにした。また、*femA* 変異を有するファージ耐性株では β -ラクタム系抗菌薬の感受性が飛躍的に上昇していた。一方、*geneX* 変異は下流の遺伝子発現を変動させることで、ファージのレセプターへの吸着が阻害された可能性が示めされた。また、*geneX* 変異に伴い複数の病原性遺伝子の発現が抑制され、マウス腹膜炎モデル及び膿瘍モデルにおいてファージ耐性菌の病原性が顕著に低下することを明らかとした。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

薬剤耐性菌の蔓延により世界中でその死者数が毎年増えている中で、これまでの抗菌薬の限界が指摘されている。近年、“ポスト抗菌薬時代”の新たな主役としてバクテリオファージ(ファージ)を用いたファージセラピーが注目されている。ファージは細菌特異的に感染するウイルスであり、ファージ由来溶菌酵素であるエンドライシンによって細菌を溶菌させる。本研究では獣医療におけるファージ療法の運用に向けて、基礎的性状解析から実際の臨床応用にまで至る包括的な研究を展開し、以下のように5章にまとめた。

第I章 黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 の安定性に影響する外的要因及びイヌに対するファージ投与安全性試験

第II章 黄色ブドウ球菌溶菌性ファージ phiSA012 由来溶菌酵素の機能解析

第III章 バクテリオファージを用いた新規アトピー性皮膚炎制御戦略の構築

第IV章 イヌ緑膿菌性外耳炎に対するファージカクテル療法の実施と治療過程に出現したファージ耐性菌の解析について

第V章 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のファージ耐性化に伴う薬剤感受性上昇と病原性低下のトレードオフ

研究の背景と目的

ペニシリンの発見以降、多くの抗菌薬が開発され応用されてきた。それは一方で薬剤耐性化と人の抗菌剤開発の我慢比べであり、終わりのない戦いであった。近年、その均衡は崩れ、薬剤耐性菌は蔓延し、新規抗菌薬の開発は遅れをとった状態である。そのような背景から細菌特異的に感染し溶菌するバクテリオファージを使用したファージセラピーに期待がかけられている。世界ではファージセラピーの人医療への応用が進んでいる国もあるが、未だ世界の抗菌薬の承認基準をクリアするものはない。抗菌薬の使用は、人医療だけでなく獣医療においても同様に依存しており、しかも伴侶動物から産業動物まで多岐にわたっている。本研究では、ファージセラピーに至るための基礎的な検討から伴侶動物の臨床試験、さらにファージ耐性化のメカニズムの解明などの多項目にわたって詳細に検討したものである。

研究の成果

第I章では、*Staphylococcus aureus* 溶菌性ファージ phiSA012 の宿主城、安定性、及び安全性について調査し、製剤としての基本的な安定性は確保でき、健常犬における副作用も認められないことを確認した。

第II章では、phiSA012 由来エンドライシン Lys-phiSA012 を精製し、基礎的な機能解析を行い、さらに *Staphylococcus* 属細菌に対して絶大な溶菌活性を有することを示し、論文化した。

第Ⅲ章では、アトピー性皮膚炎自然発症マウスモデルである NC/Tnd マウスを用いて、ブドウ球菌を標的としたファージ療法により皮膚炎症状の改善が認められるかを検証した。PhiSA012 は試験管内にてマウス病変部から分離されたほとんどのブドウ球菌に対して溶菌活性を示した。また、phiSA012 投与したマウスでは病変部組織においてもブドウ球菌は減少し、皮膚炎症状は顕著に改善し、さらには血中 IgE 濃度も Vehicle 群と比較して有意に低値を示した。

第Ⅳ章では、既存治療に抵抗性を示した *Pseudomonas aeruginosa* 感染を伴う難治性慢性外耳炎に罹患したイヌに対し、日本で初めてのファージカクテル療法を実施した。ファージ療法を開始すると一部症状の改善が認められたものの完全には奏功せず、またファージ耐性菌の出現が認められた。その後ファージのカクテル化を再構築し、水平耳道内に認められた腫瘍性病変を摘出して治療を継続した結果、外耳炎症状はさらに改善し、*P. aeruginosa* は検出も認められず、治療は成功した。また、この臨床試験においてファージ耐性菌が出現したが、その変異解析を実施したところ、線毛鞭毛を構成する遺伝子の変異が認められ、これらを介した運動性が低下している（病原性、感染性の低下の可能性）ことを明らかとした。

第Ⅴ章では、ファージ耐性化に伴う細菌の表現型変化に着目し、MRSA が phiSA012 に耐性を獲得するメカニズムとファージ耐性株の表現型変化について解析した。臨床分離株 MRSA2007-13 は、ファージ phiSA012 により耐性化する場合、2 つの遺伝子 (*mgrA* と *femA*) にその変異が集約されることを突き止めた。これらの変異により、病原性が顕著に低下すること、また、 β -ラクタム系抗菌薬の感受性が高いもので 1000 倍以上と、飛躍的に上昇することを突き止めた。

研究の評価

ファージセラピーは抗菌薬より早く発見され、東欧諸国などでおおよそ 100 年余り、細々とはあるが続いてきた古くからの治療法である。その一方で、今日の薬剤耐性化問題の切り札として脚光を浴びてきているが、世界の抗菌薬の基準にあったファージ製剤は未だない。それは、ファージセラピーの絶大なる効果の反面、その溶菌効果の不安定さ、ファージ耐性菌の問題、個体への投与方法などの多面的な問題も抱えている点が挙げられる。本研究では、それら全ての課題に正面から迫り、解決策も見出し、ファージセラピーの真の可能性を広げるデータを積み上げている。獣医療の多くの治療法は人医療から由来したものであるが、本研究の成果の発信により、獣医療から先んじて成功をおさめ、人医療へ還元していく可能性もあり得る。本研究は、学部卒業当時の本人の高い目標、強い意志により達せられ、広く社会に貢献できる研究成果であり、本学としても誇れる成果でもある。以上により、1 年短縮し 3 年卒業に充分に値すると判断するとともに、今後のさらなる発展を期待したい。

学位論文の一部を公表した論文

1. Fujiki*, J., Nakamura, T.*, Iwano, H. 2018. Characterization of the Lytic Capability of a LysK-Like Endolysin, Lys-phiSA012, Derived from a Polyvalent Staphylococcus aureus Bacteriophage. *Pharmaceuticals*. 11: 25.*equal contribution
2. Nakamura, T., Kitana, J., Iwano, H. 2020. Lytic Activity of Polyvalent Staphylococcal Bacteriophage PhiSA012 and Its Endolysin Lys-PhiSA012 Against Antibiotic-Resistant Staphylococcal Clinical Isolates from Canine Skin Infection Sites. *Frontiers in Medicine*. 7.

その他 5 本

1. *Virus Research*. 306: 198596.2021
2. *Viruses* 13(10):1964 2021
3. *Microbiology and Immunology*. (11):778-782. 2020
4. *Microbiology Resource Announcements*. 9: 1–3.2020
5. *Microbiology Resource Announcements*. 10: 33–35.2020

以上のことから、中村 暢宏 氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 5 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2022 年 2 月 7 日

審査委員

主査	教 授	岩野	英知
副査	教 授	山下	和人
副査	教 授	萩原	克郎
副査	教 授	樋口	豪紀
副査	准教授	臼井	優