

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20478

研究課題名(和文)腸内細菌叢の組成変容をモニタリングする新規イメージング技術の創製

研究課題名(英文)Development of a novel microbiome imaging technique based on semiconducting polymer nanoparticles

研究代表者

中村 乃理子(Nakamura, Noriko)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：80910174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、腸内細菌叢の組成の変容をリアルタイムで簡便にモニタリングできる新規イメージング技術の開発を目的とし、有機半導体ポリマーナノ粒子(PDot)を用いて腸内細菌をラベル化することによる菌組成の変容の観測を目指した。腸内細菌の機能を阻害せずにラベル化するために、PDotのサイズの最適化は重要である。まず、15-200 nmという広範囲で精密にPDotのサイズを制御する合成手法を確立した。さらに、機能性分子の一つであるDNAと、非特異的な相互作用を抑制するPEGのPDotへの修飾手法を最適化した。菌表面のLPSを認識するアプタマーをPDotに修飾することによる、菌のラベル化が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌叢の組成に着目し解析する試みは数多く為されているが、検出手法はDNA/RNA解析が主流であり煩雑かつ高コストな点が課題となっている。そこで、低分子蛍光色素による腸内細菌のラベル化及びイメージングが提案されているが、表面を無数の蛍光色素が覆うことによる細菌の機能への影響が懸念される。ナノ粒子を用いることで細菌の機能への影響を低減したラベル化手法を提案する本研究は新規の試みである。本研究課題において開発された技術によって脳-腸内細菌軸のハイスループットな解明が加速することにより、これまで有効な治療法が確立されていない神経疾患を全身疾患として捉えた新たな治療・診断技術の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to develop a novel imaging technique that can easily monitor the transformation of the microbiota in real time. We aimed to observe the transformation of bacterial composition by labeling intestinal bacteria with organic semiconducting polymer nanoparticles (PDots). Optimization of PDot size is important for labeling intestinal bacteria without interfering with their function. First, we established a synthetic method to precisely control the size of PDot in a wide range of 15-200 nm. Furthermore, we optimized a method for modifying PDots with PEG, which inhibits nonspecific interactions, and DNA, which is one of the functional molecules. The modification of PDots with aptamers that recognize LPS on the bacterial surface is expected to be used for bacterial labeling in the future.

研究分野：材料工学、化学工学

キーワード：有機半導体ポリマーナノ粒子 蛍光ナノ粒子 腸内細菌 細菌イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性の維持において腸管と脳との双方向な情報伝達は重要な役割を果たしており、腸管の情報は神経系を介して脳に伝わる一方で情動変化は副腎皮質ホルモン放出因子や自律神経を介して腸管へ伝達する。この双方向な情報伝達は脳-腸軸(brain-gut axis)と呼ばれ近年注目を集めている。例えば、従来精神疾患は脳機能の欠陥にのみ起因すると考えられており神経系の発達・機能に代謝や免疫が寄与する事実は看過されてきたが、現在は腸管における代謝や免疫が精神疾患を司る神経因子の産生及び修飾へ影響することが明らかにされつつある(Nat. Neurosci., 2015, 18: 965)。

腸内環境を決定する主たる要因は腸内細菌であり、腸内細菌と中枢神経機能との関連を示す脳-腸内細菌軸(brain-gut-microbiota axis)は病理の解明及び治療法の確立が困難な神経疾患の研究における突破口として注目を集めている。これまで疾患モデル動物を用いた検討が多く為され、例えば腸内細菌叢の組成とパーキンソン病様症状の相関が示唆されるなどした (Cell, 2016, 167: 1469)。しかし、動物モデルにおける人間の複雑な神経疾患の反映には限界があり、また、人間の腸内細菌を実験動物に移植する試みもあるが移植後の維持は未検討である。一方で、腸内細菌叢の組成は加齢、環境の変化に伴い変容し、この変容が多くの疾患と関連することが知られており(Cell, 2012, 148: 1258)、飼育環境の異なるモデル動物で腸内細菌叢の組成が変容することが明らかになっている(Nat. Rev. Microbiol., 2021, 19: 241)が、これを神経疾患と関連づけ脳-腸内細菌軸を解明することは複雑さを増しさらに困難である。腸内細菌叢の組成の変容を観測できるような簡便な手法を構築することは脳-腸内細菌軸を明らかにするうえで有用である。

腸内細菌は表面にバイオマーカーとなるような特定のタンパク質を発現しておらず、腸内細菌叢の組成を調べるためには現状網羅的にゲノム/トランスクリプトームを解析するしかないが、これらの手法は煩雑かつ高コストであるという課題を抱える。一方、顕微鏡やフローサイトメトリーによる解析を可能にするために低分子蛍光色素で細菌表面のグリコカリクスをラベル化する技術は細胞膜機能への影響が懸念される。そこで、細菌の機能に影響せずラベル化し人工バイオマーカーとして機能するような技術の創製が脳-腸内細菌軸解析の鍵となる。

### 2. 研究の目的

腸内細菌叢の組成の変容をリアルタイムで簡便にモニタリングできる新規イメージング技術の開発を行う。蛍光プローブをナノ粒子として集積化した有機半導体ポリマーナノ粒子(PDot)は高輝度なため、低分子蛍光色素のように細胞膜上に無数の蛍光分子を修飾せずに腸内細菌を可視化することができる。PDotを用いて腸内細菌をラベル化することにより、腸内細菌の増加に伴う1細胞あたりの蛍光輝度の減少、腸内細菌の減少に伴う系全体における蛍光輝度の減少を指標として菌組成の変容の観測を目指す(図1)。

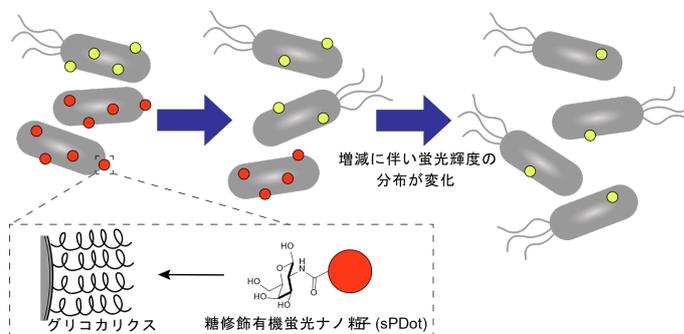


図1. 本研究の概略

### 3. 研究の方法

バイオイメージング、バイオセンシングの領域において蛍光は最も有用かつ普遍的な手段の一つである。従来用いられてきた低分子蛍光色素は蛍光輝度向上の限界や褪色等の課題を有していた。これを解決する手段としてナノ粒子への蛍光の集積化は有効であり、量子ドット(QDot)による細胞のラベル化が実現(Science, 1998, 281: 2016)して以来種々のアプリケーションへの応用が進められてきた。一方で、QDotはカドミウム、セレン等の重金属由来の細胞への毒性が問題点である。そこで、細胞毒性の低い有機半導体高分子を用いたポリマードット(PDot)(Angew Chem. Int. Ed., 2013, 52: 3086)がQDotに代わり注目を集め始め、バイオイメージング、バイオセンシングへの適用の試み(ACS Nano, 2008, 2: 2415)が広がっている。

腸内細菌の機能を阻害せずにラベル化するために、PDotのサイズの最適化は重要である。本研究課題では、まず、PDot合成に用いる分散安定剤の一つであるポリ(スチレン-co-マレイン酸無水物; PSMA)の加水分解速度が粒子サイズを決定するパラメータであることに着目し、分散媒のpH、塩濃度等の条件を変化することで簡便に広範囲で粒子サイズの制御を可能にする手法を確立した。また、PSMAの加水分解速度を利用したPDotの粒子サイズ制御手法は異なる有機半導体ポリマーを用いて粒子サイズの制御を検討し、マルチカラー、マルチサイズのPDotを合成した。

さらに、腸内細菌を特異的にラベル化するためには、PDot の表面の制御が必要である。細菌はその表面にリポ多糖(LPS)を提示しており、菌種特異的な LPS を認識するアプタマーを用いた細菌のラベル化が可能であることが報告されている。そこで、機能性分子の一つである DNA の PDot への修飾手法を検討した。また、PDot の非特異的な相互作用を抑制するために、ポリエチレングリコール(PEG)の PDot への修飾手法を検討した。これらのサイズ、蛍光波長、表面状態の異なる PDot の機能を *in vitro* において評価した。

#### 4. 研究成果

蛍光波長の異なる 3 種類の有機半導体ポリマーを用いた PDot について、ナノ沈澱法による粒子合成において水層の pH、塩濃度、体積を変えることで 15~220 nm の広範囲で粒子径を自在に制御できることを確認した(図 2)。また、このとき粒子のサイズによって吸収スペクトル、蛍光スペクトル、量子収率に変化はなく、この粒子サイズ制御手法は PDot の光学的特性に影響しないことが確認された。

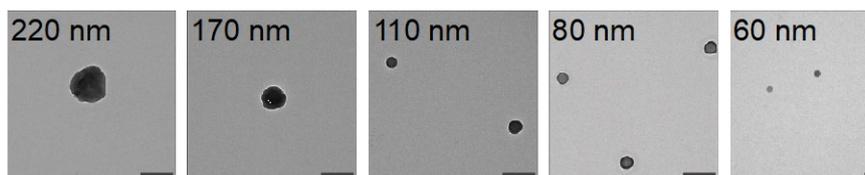


図 2. サイズを制御した PDot の TEM 画像(スケールバー: 200 nm)

PSMA の加水分解によって PDot 表面に存在するカルボキシ基と、DNA や PEG の末端に導入したアミノ基とをカルボジイミド反応により結合することによってこれらの分子を PDot 表面に修飾することに成功した。このとき、添加する機能性分子の粒子表面カルボキシ基に対する等量や反応時の溶媒を最適化することにより、PDot の分散安定性を損なうことなく分子を修飾できることを確認した。末端に PDot とは波長の異なる蛍光色素を修飾した DNA をハイブリダイズすることにより、PDot 表面の DNA が相補的な配列と特異的に二重らせん構造を形成する機能を維持していることが確認された。また、PEG を修飾した PDot が細胞培養液中においても安定に分散することを確認した。このサイズの異なる PEG-PDot を細胞培養液中に添加し、回収した細胞中の蛍光強度をフローサイトメーターにより測定することで、PDot のサイズが培養細胞との相互作用に与える影響を評価することに成功した。また、培養細胞に取り込まれた PEG-PDot を、共焦点顕微鏡を用いて観察し、エンドサイトーシスにより取り込まれていることを確認した(図 3)。

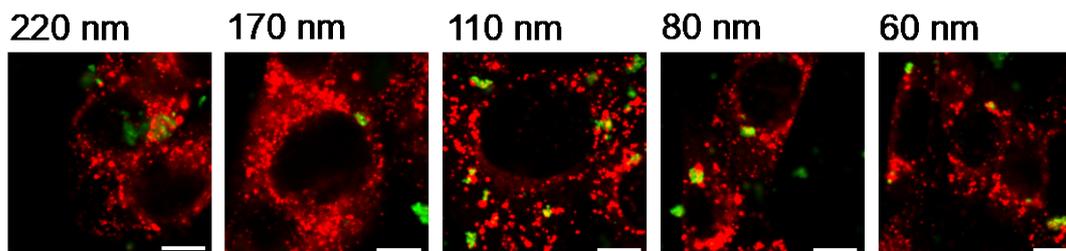


図 3. サイズの異なる PEG-PDot の細胞取り込み(スケールバー: 10 μm)

今後、これらのサイズ、蛍光波長の異なる機能化 PDot を用いて細菌をラベル化し、フローサイトメーターや共焦点顕微鏡を用いて組成変容を評価する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Noriko、Tanaka Nobuaki、Ohta Seiichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Facile and wide-range size tuning of conjugated polymer nanoparticles for biomedical applications as a fluorescent probe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 11606 ~ 11611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1RA09101H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Noriko、Hamada Risa、Kaneko Hiromasa、Ohta Seiichi	4. 巻 135
2. 論文標題 Selecting optimum miRNA panel for miRNA signature-based companion diagnostic model to predict the response of R-CHOP treatment in diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 341 ~ 347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2023.01.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村乃理子、太田誠一
2. 発表標題 有機半導体ポリマーナノ粒子の精密合成を基盤とする新規画像診断ラベルの開発
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 中村乃理子、濱田梨渚、金子弘昌、太田誠一
2. 発表標題 バイオマーカーパネルとしてmiRNAを用いた悪性リンパ腫治療に対するコンパニオン診断モデルの構築
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------