

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14928

研究課題名（和文）プロバイオティクス由来膜小胞の機能解明と制御に基づく炎症性腸疾患の新規治療法開発

研究課題名（英文）Elucidation of the characteristics of probiotic-derived extracellular vesicles and their manipulation for inflammatory bowel disease application

研究代表者

森下 将輝（Morishita, Masaki）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10811747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：プロバイオティクス由来膜小胞の回収条件の最適化並びに基礎的特性の解明について研究を行った。各種プロバイオティクスの培養条件を最適化することで膜小胞産生量の改善が見られ、直径100 nm程度であることが示された。続いて免疫細胞に対する生物活性評価を行った。免疫細胞であるRAW264.7及びDC2.4に膜小胞を添加したところ、免疫調節因子であるサイトカインの産生量が増大する傾向がみられた。さらに、膜小胞の細胞取り込み経路の解明にも成功し、動物実験の結果、投与された膜小胞の体内動態並びに免疫活性化能についても明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫調節作用など生体に有益な効果を与える微生物（プロバイオティクス）が分泌する膜小胞が新たに発見された。しかし、プロバイオティクス由来膜小胞の生物学的意義の解明には至っていないのが現状である。本研究では、新規免疫療法の開発を目的としてプロバイオティクス由来膜小胞の機能解明を試み、有用な知見を見出すことが出来た。本研究で得られた一連の成果は、プロバイオティクス由来膜小胞が持つ機能の解明と制御に基づく疾患の新規治療法開発に結びつくものと期待できることから社会に大きな波及効果を与えうると考える。

研究成果の概要（英文）：We optimized the isolation method of probiotic-derived membrane vesicles (MVs) and evaluated their characteristics. Amount of collected MVs were improved by optimization of culture condition of probiotics and particle size were approximately 100 nm. Next, we evaluated the biological activity of MVs by using RAW264.7 and DC2.4 cells. Cytokine production from cells were increased by treatment with MVs. Moreover, cellular uptake mechanism of MVs were also elucidated. Furthermore, biodistribution as well as immunostimulation activity of MVs were revealed.

研究分野：生体材料

キーワード：プロバイオティクス 膜小胞 免疫調節

1. 研究開始当初の背景

生体試料由来医薬品は有効性と安全性の双方に優れた治療法と成りうることから、次世代医薬品としての実用化が望まれている。有用微生物であるプロバイオティクスはヒト腸管に生息し、免疫調節作用など多彩な機能を有するとともに安全性も実証されていることから、医薬品や機能性食品として実用化されている生体試料である。さらに、免疫システムの異常により発症する潰瘍性大腸炎などの難治性の炎症性腸疾患に対する有効性も報告されている。これまで、プロバイオティクスによる免疫調節作用は菌体が直接生体の細胞に取り込まれることで起きると考えられていた。一方、免疫調節能を有する分子が菌体外部へ分泌され、標的細胞に輸送される機構が存在すると考えられていたがその実態は不明であった。そうした中、プロバイオティクスが分泌する膜小胞が近年新たに発見された。しかしながら、生体試料であるプロバイオティクス由来膜小胞の生物学的意義の解明及び実用化には至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

プロバイオティクス由来膜小胞を取り込んだ細胞が示す生物活性や、免疫応答をはじめとする生命現象との関係性を解明することはその生物学的意義を理解する上で重要であると考えられる。加えて、生体の免疫システムに有益な作用を示すプロバイオティクスは既に医薬品や機能性食品など幅広い分野で実用化されていることから、分泌膜小胞にも同様な機能が備わっていることが期待される。しかしながら、プロバイオティクス由来膜小胞を疾患治療などに利用した先行事例はない。本研究では、生体試料であるプロバイオティクスが分泌する膜小胞に焦点を当て、免疫システムに果たす役割の解明と高機能化による新たな免疫療法の開発を目指す。すなわち、プロバイオティクス由来膜小胞の生物学的意義の解明として、膜小胞を取り込んだ標的細胞が示す生物活性及び生体での免疫応答に与える影響を検討する。得られた知見を元に製剤学的工夫を膜小胞に施し、免疫療法としての有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 膜小胞の特性解析

モデルプロバイオティクスとして乳酸菌株及びビフィズス菌株を選択した。菌体培養液中に存在する膜小胞を超遠心操作により精製し、構成成分であるタンパク質の定量により産生量を評価した。粒子形状は原子間力顕微鏡を用いて観察した。膜小胞の粒子径ならびに表面電位は、動的分散法及び電気泳動法をそれぞれ用いて測定した。

(2) 膜小胞添加後の免疫細胞の生物活性評価及び細胞取り込み機構

免疫細胞であるマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 及びマウス樹状細胞株 DC2.4 に膜小胞を添加後 6 時間培養した。その後、細胞が分泌する免疫調節能を有するサイトカインを ELISA 法により定量した。また、蛍光標識した膜小胞を阻害剤存在下で細胞に添加後、細胞取り込み量をフローサイトメトリー法により評価した。

(3) 生体の免疫応答に与える膜小胞の影響

マウスに対し蛍光標識したプロバイオティクス由来膜小胞を投与した。その後、*in vivo* イメージング法により膜小胞の体内動態を評価した。別途、膜小胞をマウスへ投与後、主要組織を摘出し RNA を抽出した。上述したサイトカインの mRNA 発現量を real time RT-PCR により測定した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

膜小胞の特性解析

膜小胞の回収については、各種プロバイオティクスの培養条件を最適化することで膜小胞産生量の改善が見られた。精製した膜小胞の粒子形状を観察したところ、直径 100 nm 程度であることが示された (図 1)。さらに、膜小胞の構成成分を解析した結果、免疫調節作用を有するペプチドグリカンが存在することが明らかとなった。

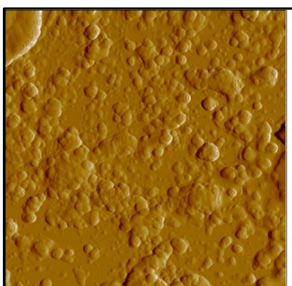
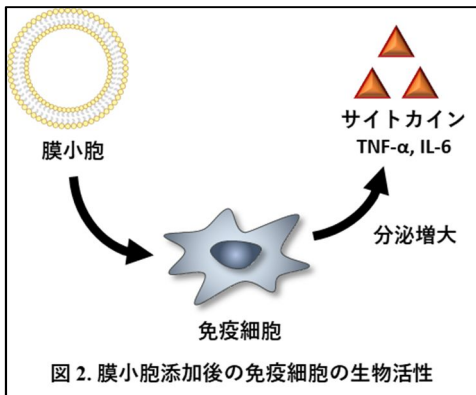


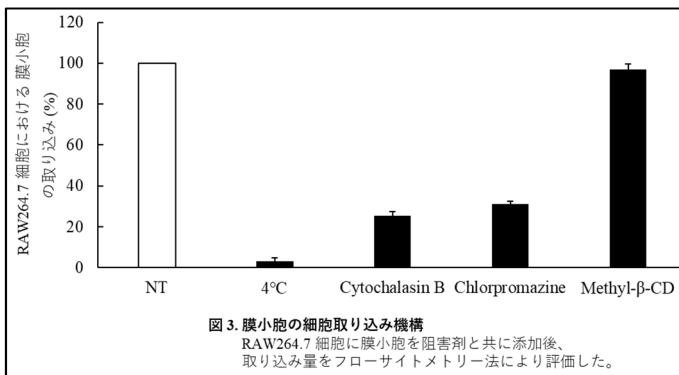
図 1. 原子間力顕微鏡を用いて観察した膜小胞 (Scale = 100 nm)

膜小胞添加後の免疫細胞の生物活性評価及び細胞取り込み機構

膜小胞に関する基本的な情報が得られたため、続いて標的細胞に対する生物活性評価を行った。標的細胞として、免疫細胞であるマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 及びマウス樹状細胞株 DC2.4 を用いた。これらの細胞に膜小胞を添加し、免疫調節因子であるサイトカインの産生量を評価した。その結果、炎症性サイトカインである TNF- α 及び IL-6 の分泌量が膜小胞添加後に増大する傾向がみられた (図 2)。



さらに、これらの細胞が膜小胞を取り込む際の機構を評価した。RAW264.7 及び DC2.4 に蛍光標識した膜小胞を添加後、フローサイトメトリー法により取り込み量を解析した。その結果、Chlorpromazine 及び Cytochalasin B 存在下で取り込み量が減少したことからクラスリン・カペオラエンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスを介して膜小胞が取り込まれることが明らかになった (図 3)。



生体の免疫応答に与える膜小胞の影響

続いて、膜小胞を蛍光色素で標識後にマウスへ投与し、その体内動態を評価した。その結果、皮内投与された膜小胞は鼠径リンパ節に集積することが確認された。さらに、投与部位における炎症性サイトカインの発現量が上昇したことから膜小胞が生体において自然免疫の活性化に寄与することが示された。

研究期間全体を通して、本研究で用いたプロバイオティクスはいずれも直径 100 nm 程度の膜小胞を外部環境へ分泌し、免疫調節作用を有するペプチドグリカンを構成成分として包含することが明らかとなった。さらに、膜小胞が免疫細胞にエンドサイトーシスを介して取り込まれ、その後に免疫調節物質であるサイトカイン産生が増大する傾向が確認された。動物実験からは、投与された膜小胞は主要な免疫器官であるリンパ節へ移行すること、並びに自然免疫を活性化する特性を有することが示された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

膜小胞を対象とした先行研究では、動物細胞由来の膜小胞であるエクソソームの機能解明あるいは実用化に向けた取り組みが国内外問わず活発に行われている。しかしながら、プロバイオティクス由来膜小胞に関する研究は歴史が浅く、膜小胞の存在報告に留まっているものが大半である。本研究によって膜小胞を介したプロバイオティクス 生体間の物質輸送の詳細ならびに生物学的意義が明らかとなったため、膜小胞に関する研究の更なる発展に有用な知見を提供するものと考えられる。

(3) 今後の展望

本研究の実施により、プロバイオティクス由来膜小胞が免疫調節能を有することが明らかとなった。従って、この特性を利用することで膜小胞を基盤とした新たな免疫療法の開発が期待できる。しかしながらその実現には、膜小胞の体内動態を厳密に制御することで目的部位へ効率的

に送達することが求められる。今後は申請者が有するドラッグデリバリーシステム技術を適用して組織指向性を有する機能型プロバイオティクス由来膜小胞を創製し、治療への応用を図っていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Morishita Masaki, Katsumi Hidemasa, Yamamoto Akira	4. 巻 44
2. 論文標題 Elucidation of the Characteristics of Probiotic-derived Extracellular Vesicles for their DDS Application	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 228 ~ 233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.5360/membrane.44.228	査読の有無 有
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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masaki Morishita, Ph.D., Hidemasa Katsumi, Ph.D., Akira Yamamoto, Ph.D.
2. 発表標題 Elucidation of the Characteristics of Probiotic-derived Extracellular Vesicles for their Therapeutic Application
3. 学会等名 APSTJ global education seminar 2018-2nd（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下 将輝、勝見 英正、山本 昌
2. 発表標題 DDSを志向したプロバイオティクス由来細胞外小胞の基礎的特性の解明
3. 学会等名 日本膜学会第41年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下 将輝、堀田 真帆、松山 基輝、勝見 英正、山本 昌
2. 発表標題 免疫療法の開発を目的としたプロバイオティクス由来細胞外小胞の特性解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田真帆、森下将輝、勝見英正、山本 昌
2. 発表標題 各種プロバイオティクス由来細胞外小胞が有する特性の比較検討
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山基輝、森下将輝、勝見英正、山本 昌
2. 発表標題 DDS を志向したビフィズス菌由来細胞外膜小胞の基礎的特性の解明
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森下 将輝、堀田 真帆、松山 基輝、勝見 英正、山本 昌
2. 発表標題 プロバイオティクス由来細胞外小胞が有する特性の比較検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松山 基輝、森下 将輝、勝見 英正、山本 昌
2. 発表標題 免疫療法の開発を目的としたビフィズス菌由来細胞外小胞の機能解明
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----