

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20205

研究課題名（和文）ビフィズス菌の糖代謝機構を利用した機能性細胞外小胞の創製とがん免疫療法への応用

研究課題名（英文）Development of Functional Extracellular Vesicles Based on the Glucose Metabolism Mechanism of Bifidobacteria and Their Application to Cancer Immunotherapy

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）：本研究ではプロバイオティクス由来細胞外小胞の活性保持と機能付与を両立できる技術の開発を目指した。プロバイオティクスの代謝機構を利用することで、細胞外小胞に反応性官能基であるアジド基を導入することに成功した。このアジド基導入細胞外小胞には、元来有する細胞外小胞としての有益性（免疫細胞活性化能）が維持されており、アジド基への部位特異反応（アジド-アルキン反応）を利用することにより新たな機能性分子を細胞外小胞に搭載することに成功した。特に、本手法により蛍光物質を搭載したプロバイオティクス由来細胞外小胞を用いることで、免疫細胞に添加後の細胞外小胞の挙動（細胞内動態）の可視化を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有用微生物であるプロバイオティクスが分泌する細胞外小胞を利用した新たな疾患治療法が開発が期待されている。その実現には細胞外小胞の高機能化を図る必要があるものの、従来の方法では機能改変後に細胞外小胞の生理活性が損なわれる懸念があった。本研究によりプロバイオティクスが持つ栄養素の代謝機構と、部位特異的な反応様式であるアジド-アルキン反応を巧みに利用することにより、プロバイオティクス由来細胞外小胞の活性保持と機能付与を両立可能な技術の開発に成功した。一連の成果は、細胞外小胞への新規の機能改変技術の開発を通して、細胞外小胞を用いた治療法開発の実現に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop a novel technology that can both retain the activity of probiotic-derived extracellular vesicles (EVs) and functionalize them. By utilizing the metabolic mechanism of probiotics, we succeeded in introducing a reactive functional group (azide) into EVs. The azide-introduced EVs retain their immune activation potency and by utilizing the site-specific reaction (azide-alkyne reaction) to the azide group, new functional molecules can be successfully loaded onto the EVs. In particular, by using probiotic-derived EVs loaded with fluorescent substances based on method, visualization of the intracellular dynamics of the EVs after addition to immune cells was achieved.

研究分野：薬物送達システム

キーワード：プロバイオティクス 細胞外小胞 アジド アルキン反応 代謝機構

## 1. 研究開始当初の背景

有用微生物（プロバイオティクス）は生体の免疫機能の調節や腸管防御能の増強に寄与しており、医薬品や機能性食品として広く実用化されている。従来、プロバイオティクスがもたらす多彩な作用は菌体が直接生体の標的細胞に取り込まれることで起きると考えられていた。しかし近年、プロバイオティクスを始めとする多くの生物において、タンパク質や核酸を内包する細胞外小胞（Extracellular vesicles; EVs）が外部環境へ分泌される現象が報告された。申請書は、プロバイオティクスが分泌する EVs の生理機能の解明および実用化の可能性にいち早く着目し研究に従事してきた。すでに、EVs が免疫細胞に対して活性化作用を示すことを見出している（文献：Morishita *et al.*, *Mol. Pharm.*, 2021）。加えて、細胞に加えた変化は分泌された EVs にも反映されるという特性も発見している。こうした EVs の特徴を利用することで従来の治療法とは異なる新しい抗原特異的な免疫療法が開発可能となる。特に、免疫原性の低い難治性がんに対するがん抗原特異的な免疫療法（がん免疫療法）に EVs を用いることが有望と考えられる。この実現には EVs に対してがん抗原および標的細胞である抗原提示細胞（APC）への指向性を付与するための機能改変技術を適用することが求められる。しかし、従来の機能改変技術では EVs 表面を構成するタンパク質や脂質に対する非特異的な反応を利用しているため、EVs の有益な特性が損なわれる事例が報告されている。すなわち、プロバイオティクス由来 EVs のがん免疫療法への適用に向けては、EVs の活性保持と機能付与を両立できる技術を開発することが求められる。

## 2. 研究の目的

プロバイオティクス由来 EVs の活性保持と機能付与を両立できる技術を開発し、難治性がんに対するがん免疫療法の構築を目指す（図1）。技術開発においては、プロバイオティクスの代謝機構と部位特異反応様式であるアジド-アルキン反応を利用する。すなわち、プロバイオティクスが栄養素（糖やアミノ酸）を代謝する機構を利用し、EVs 表面に反応性官能基のアジド基を導入する。次いで、アルキン修飾した機能性分子を搭載することにより EVs の高機能化を図り、抗腫瘍免疫誘導能を評価する。

### ① プロバイオティクス由来EVs へのアジド基導入



### ② アジド-アルキン反応によるEVsへの機能付与



図1. 研究の概念図

## 3. 研究の方法

### 1). 代謝機構を利用した EVs へのアジド基の導入

プロバイオティクスに対して、糖あるいはアミノ酸の代謝機構を利用可能なアジド化試薬を添加した。この菌体を 24 時間、37℃ で培養して得られた EVs を超遠心操作により回収し、アルキン修飾した蛍光物質（AZDye 488 DBCO）を添加後に蛍光顕微鏡で観察した。EVs の定量はブラッドフォード法により行った。さらに、EVs の粒子形状を原子間力顕微鏡（AFM）で観察し、ゼータサイザーを用いて EVs の粒子径やゼータ電位も測定した。

### 2). アジド基導入 EVs の免疫活性化能の評価

EVs の有益な活性である免疫細胞活性化作用がアジド基導入によっても変化しないことを確認するため、アジド基導入 EVs (Az EVs) を免疫細胞である RAW264.7 細胞（マクロファージ）及び DC2.4 細胞（樹状細胞）に添加した。添加した 24 時間後、細胞が分泌するサイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-6）や共刺激分子（CD40, 80, 86）といった活性化の指標となる分子を ELISA 法及びフローサイトメトリー法で測定した。さらに、EVs の免疫細胞活性化メカニズムの解明も行う

た。具体的には、EVs を免疫細胞に添加する際、免疫細胞上の異物認識受容体である Toll-like receptor 2 (TLR2) に対する阻害抗体を処理した。その後、細胞が分泌するサイトカインを ELISA 法により測定した。

### 3). EVs の細胞内動態の観察

アジド - アルキン反応により蛍光物質を搭載した EVs を RAW264.7 細胞及び DC2.4 細胞に添加する。この時、細胞のエンドソーム / リソソーム画分を染色可能な LysoTracker™ Red DND-99 を用いた。24 時間後、細胞の核を DAPI で染色し、EVs が取り込まれる様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 4). EVs への抗原搭載と機能評価

Az-EVs に対し、アルキン修飾したモデル抗原の搭載を試みた。モデル抗原として OVA を選択し、EVs への抗原搭載にはウェスタンブロッティング法を用いた。調製した抗原搭載型 EVs を樹状細胞に添加した後、細胞の抗原提示能をフローサイトメトリー法により測定した。

## 4 . 研究成果

### 1). 代謝機構を利用した EVs へのアジド基の導入

蛍光顕微鏡観察から、本手法により EVs へアルキン修飾蛍光物質が搭載できることを確認した。特に、アミノ酸の代謝機構を利用した場合に EVs への効率的な蛍光物質の搭載が確認できた。また、AFM 観察やゼータサイザーの結果から、アジド基導入の前後で EVs の粒子形状や粒子径、ゼータ電位といった物理化学的性質に大きな変化は生じないことが確認された。

### 2). アジド基導入 EVs の免疫活性化能の評価

Az-EVs を添加後に RAW264.7 細胞が分泌する TNF- $\alpha$  は大きく上昇し、その値は EVs で処理した場合と同等であった。さらに、IL-6 の産生増大効果も Az-EVs と EVs で同程度に確認された。さらに、DC2.4 細胞でも類似の傾向が見られた (図 2)。次いで、EVs を処理後に両細胞が発現する共刺激分子についても評価した。RAW264.7 細胞においては、Az-EVs, EVs とともに CD40 と CD80 の発現を増強することが示された。また、DC2.4 細胞では CD80、CD86 の発現増強作用が認められ、その程度は AZ-EVs と EVs で同程度であった。さらに、EVs による免疫細胞のサイトカイン産生は TLR2 に対する阻害抗体により抑制された。従って、EVs の免疫活性化作用は EVs と免疫細胞表面の TLR2 との相互作用により発生することが明らかとなった。

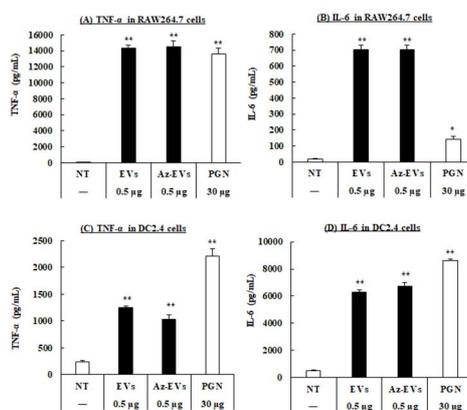


図2. アジド基導入 EVs (Az-EVs) の免疫活性化能の評価

免疫細胞 (RAW264.7細胞及びDC2.4細胞) に対し、EVs または Az-EVs を添加した。24時間後、細胞が分泌するサイトカイン (A and C; TNF- $\alpha$  及び B and D; IL-6) をELISA法により測定した。ポジティブコントロールとしてペプチドグリカン (PGN) を添加した。\* $p < 0.05$ , compared with PBS. \*\* $p < 0.01$ , compared with PBS

### 3). EVs の細胞内動態の観察

Az-EVs をアルキン修飾蛍光物質と反応後、免疫細胞に添加した際の挙動を観察した。その結果、RAW264.7 細胞、DC2.4 細胞の両方において EVs を示す緑色蛍光とエンドソーム / リソソームを示す赤色蛍光が共局在している様子が観察された (図 3)。免疫細胞のエンドソーム画分にも微生物由来の核酸などを認識する

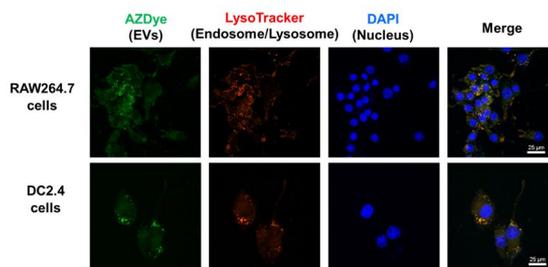


図3. EVs の細胞内動態の観察

アジド-アルキン反応により蛍光物質 (AZDye 488 DBCO) を搭載したEVs を RAW264.7細胞及びDC2.4細胞に添加した。エンドソーム/リソソーム画分をLysoTracker™ Red DND-99で、細胞の核をDAPIで染色し、EVsが取り込まれる様子を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Scale = 25  $\mu$ m.

ことで活性化に寄与する受容体が発現しているため、EVs による免疫細胞活性化には上述した TLR2 との相互作用以外の経路が存在することが示唆された。

#### 4). EVs への抗原搭載と機能評価

ウェスタンブロッティングの検討から、わずかではあるが Az-EVs にモデル抗原が搭載されていることが確認できた。しかしながら、樹状細胞の抗原提示能の増強は認められなかった。この原因として、EVs に搭載された抗原量が少なかったことが考えられる。本研究ではアジド化試薬の添加濃度やプロバイオティクスの培養条件を検討することにより、アジド - アルキン反応を介して EVs の活性を保持しつつ、目的の分子を EVs へ搭載する新規技術の開発に成功した。その一方、抗腫瘍免疫の獲得には EVs への分子搭載効率のさらなる向上が必要であることも判明した。

#### < 引用文献 >

Masaki Morishita, Maho Horita, Ayaka Higuchi, Maho Marui, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto. Characterizing different probiotic-derived extracellular vesicles as a novel adjuvant for immunotherapy. *Mol. Pharm.*, 18, 1080-1092, 2021.

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 Masaki Morishita, Risa Sagayama, Yuta Yamawaki, Marina Yamaguchi, Hidemasa Katsumi, Akira Yamamoto	4. 巻 45
2. 論文標題 Activation of Host Immune Cells by Probiotic-Derived Extracellular Vesicles via TLR2-Mediated Signaling Pathways	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 354-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00924.	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森下将輝, 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自然免疫反応に及ぼす影響の解明と有用性評価.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会, (名古屋) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山脇佑太, 森下将輝, 山口真里奈, 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の自然免疫反応活性化に及ぼす免疫細胞上の TLR2 の機構解明.
3. 学会等名 日本薬学会第142年会, (名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下将輝, 堀田真帆, 樋口綾香, 丸井真帆, 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の免疫賦活剤としての有用性評価と高機能化 自然免疫活性化能の解明とアミノ酸代謝機構を利用した機能付与技術の開発 .
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会, (大阪)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下将輝, 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持つ自然免疫活性化能の解明.
3. 学会等名 第28回次世代医工学研究会, (神戸)
4. 発表年 2021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
---------	---------