

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21603

研究課題名（和文）腸内細菌の外膜小胞を利用した疾患治療法の開発研究

研究課題名（英文）Development of new therapies using outer membrane vesicles derived from gut microbiota

研究代表者

山下 智也（Yamashita, Tomoya）

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90437468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、腸内細菌の外膜小胞(Outer membrane vesicles; OMVs)を介する生体作用を解明して、疾患治療への応用の可能性を検証することである。OMVsは、細菌が分泌する20～250nm程度の大きさの脂質二重膜構造を持つ球状の小胞で、リポ多糖LPSを含む種々の菌体成分や各細菌のタンパクや核酸が含まれる。

腸内細菌から産生されるOMVsの単離に成功した。OMVsにはLPSが含まれており、菌固有のLPS活性の差を反映する結果が得られ、菌に特徴のあるOMVsが産生されることが確認できた。腸管から生体内・血中への移行を調査したが、移行する可能性は低いという結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸内細菌が、どのような機序で宿主の生体機能に影響を及ぼしているのかということが注目されて研究が進められている。その中で、本研究課題では、腸内細菌の産生する外膜小胞OMVsの役割を検証した。我々の研究の成果として、少なくともOMVsが、腸管内から血液中に移行して、生体内で作用している可能性は低いことが示され、この機序での作用は無いことが示され、学術的には意義のある成果である。しかし、OMVsの腸上皮細胞への直接作用や、菌同志の作用を介して、宿主の生体作用に影響していることまでは検証できていない。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the biological effects of outer membrane vesicles (OMVs) derived from gut microbiota and to verify their potential application to therapy. OMVs are spherical vesicles secreted by bacteria with a lipid bilayer structure of the diameter from 20 to 250 nm, and contain various bacterial cell components including lipopolysaccharide (LPS), proteins and nucleic acids of each bacterium. We succeeded in isolating OMVs produced from cultured gut microbiota. LPS is contained in OMVs, and the pro-inflammatory activities were the same as LPS activity of each bacterium. It was confirmed that specific OMVs were produced from each bacterium. We investigated the transfer of OMVs from the intestinal tract to the blood, but we concluded that the possibility of transfer was low. Taken these, we could clarify the pathophysiological role of OMVs in vivo.

研究分野：循環器内科学

キーワード：腸内細菌外膜小胞 菌体毒素

1. 研究開始当初の背景

ヒト生体内の臓器連関を担う分子として細胞外小胞(EV: extracellular vesicle) エキソソームが注目され、がん領域を中心に研究が進展している。これと同様の細菌が産生する外膜小胞(Outer membrane vesicles; OMVs) も細菌間の情報伝達や、腸内細菌では宿主生体内遠隔臓器に影響を与える一つの経路ではないかと考えられている。

研究代表者は、腸内細菌叢と冠動脈疾患の臨床研究にて、マウスに生菌で経口投与すると動脈硬化形成を抑制できる *Bacteroides* 2 菌を見出し、その機序としてリポ多糖 LPS の活性が低下し、結果として炎症が減弱することを報告した。しかし、死菌 *Bacteroides* 2 菌を投与しても動脈硬化の抑制は認められず、これは生菌が産生・分泌する何らかの物質が腸内細菌自体そして生体に影響して、動脈硬化を抑制する事を示唆する。また、腸管内腔には粘液(ムチン)層が存在し、腸内細菌の腸管上皮近辺への侵入を防いでいるにも関わらず、数多くの生体作用が証明されており、このムチン層を通過できる菌の分泌物質の関与が想定される。菌の代謝物もこの条件に相当するが、多くの菌それぞれに特徴のある情報を、安定した形態で効率良く生体内遠隔臓器に伝えられる物質として「言うなれば細菌のエキソソーム」である OMVs に着目した探索的研究を進め、新たな生体作用機序を解明できれば、腸内細菌と生体機能や疾患発症との関連調査研究に新たな変革をもたらすことができると考えた。

2. 研究の目的

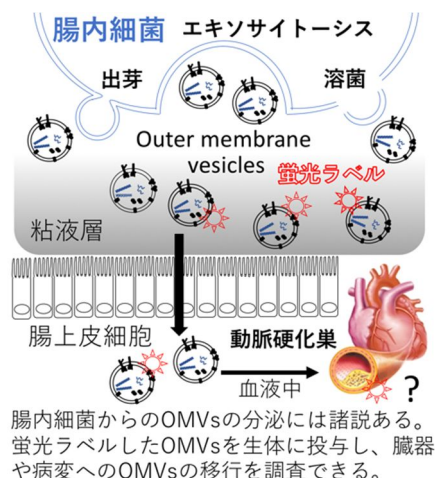
腸内細菌の外膜小胞(OMVs)を介する生体作用を解明して、疾患治療への応用法を探索し、生体利用(臨床応用)の可能性を検証することである。

特に、我々が研究を進めている動脈硬化を予防する腸内細菌 *Bacteroides vulgatus* と *Bacteroides dorei* の OMVs について、その(1)構造・内容物と産生機構 (2)生体内動態と生体作用 (3)動脈硬化・動脈瘤の病態への影響 を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1)構造・内容物と産生機構の解析; 研究代表者が見出した動脈硬化予防菌 *Bacteroides* 2 菌種(*vulgatus* and *dorei*)の培養液から、超遠心法にて OMVs の分離精製を行う。グラム陰性菌の対照として大腸菌 *Escherichia coli* の OMVs も分離し、構造の差異を電子顕微鏡などで確認する。EV からのタンパク質・脂質・DNA・RNA 抽出キットを用いて、*Bacteroides*-OMVs と *E. coli*-OMVs から各成分を分離し、ウェスタンブロット・質量分析・qPCR・RNA シーケンスなどにて内容を解析する。

菌成分リポ多糖 LPS は OMVs の脂質二重膜に高濃度で存在し、その生体内移行に OMVs が重要な役割を担うと報告され、本研究内で明らかにする。培養細菌の電顕での観察と OMVs 内包物質・細菌含有物質の解析にて、OMVs 産生分泌機構(右図上方)を解明する。



(2)生体内動態と生体作用の解析；精製した OMVs を *ex vivo* にて FITC や Cy5 で蛍光ラベルしたものをマウスの腸管内・静脈内に投与し、生体内イメージングや蛍光顕微鏡を用いて血液中・臓器・細胞への移行を評価する。特に、血管壁や動脈硬化巣への移行に関しては詳細に細胞レベルの調査を行う。必要に応じて、OMVs の培養細胞(血管内皮細胞・血管平滑筋細胞・マクロファージ・腸上皮細胞など)への移行や細胞機能への影響を *in vitro* の細胞実験にて明らかにする。

ヒト血液中に、菌由来 OMVs が存在するかを明らかにする。最終的には、心血管病患者の偏倚した腸内細菌叢が産生する OMVs がどのように心血管病に関与するかを解明し、新規治療法の開発に繋げる。

(3)病態への影響の解析と治療薬としての検証；動脈硬化マウスモデル、さらにアンジオテンシン II を持続投与する動脈瘤モデルに、菌の大量培養より精製した OMVs を定期的に経口投与することで、どのような影響を及ぼすのかを調査し、主に免疫分野の解析法にて機序を解明する。病態を改善する OMVs は、薬剤のように経口投与する治療戦略が立案できるので、OMVs を用いた新規の治療法を探索し、医学・社会貢献に繋げたい。

4. 研究成果

様々な実験に使用できるレベルの不純物の少ない OMVs を単離することを目指した。当初は、商業販売されている OMVs 抽出キットを使用して単離を試みたが、電子顕微鏡で確認すると思うようには採取できなかった。最終的には菌の培養液から超遠心法により OMVs を抽出し、電子顕微鏡で確認して単離に成功したことを確認した。この採取方法は、ヒト血液からのエキソソーム抽出法と同じであり、当初の仮説である「菌の OMVs が、ヒトの生体内に移行し、エキソソームのように臓器の遺伝子発現に影響を与える可能性がある」という仮説をサポートするものとなった。

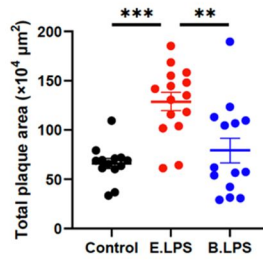
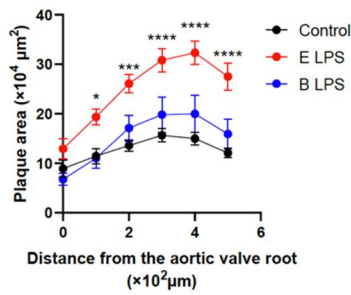
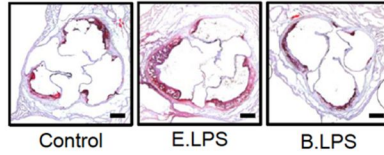
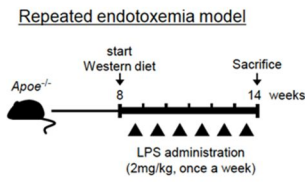
OMVs で培養細胞を刺激すると、膜に当該菌由来のリポ多糖 LPS を保持しており、炎症活性を示した。そして大腸菌由来 LPS に比較して、*Bacteroides* 2 菌種 LPS は、受容体 TLR4 に結合し、活性化する力価が低いことがわかっているが、大腸菌由来 OMVs に比較して、*Bacteroides* 2 菌種 OMVs では、免疫刺激作用が弱いことが示された。OMVs が当該菌由来の LPS を保持することは間違いのないことを確認できた。

OMVs の腸管内から生体内(血液への)移行を調査した。マウスに蛍光色素でラベルされた OMVs を経口・経腸投与したが、臓器への移行は確認できなかった。次に、細菌 OMVs 由来の 20 数塩基の miRNA、small RNA の RNA シーケンスを実施した。ヒトの血中移行を検証するため、すでに公開されたヒト血中の miRNA のシーケンスデータ中に、我々が遺伝子解析した菌由来 miRNA の存在を検証したが、含まれていなかった。この 2 つの実験結果から、腸管内に存在する *Bacteroides* 菌由来の OMVs は、ほぼ血液中へは移行しないと結論づけた。菌の OMVs 中の miRNA とヒトの既報の miRNA との相同性も検証したが、数塩基程度しか重ならず、仮に生体内移行しても、この miRNA が RNA 干渉などの機序で遺伝子発現に影響を及ぼす可能性は低いと考えた。

以上の結果を受け、生体作用(動脈硬化への影響)を評価する実験はキャンセルすることになった。その後、当初の計画を変更し、OMVs に含まれる菌体外毒素リポポリサッカライドに着目した実験を実施し、動脈硬化に与える影響と機序の解明に成功し、一定の成果を得た。

LPS に関しても、腸管からの血中への移行を調査したが、LPS の大量経口投与にても急激に血中濃度の上昇は認められず、単純に腸管内活性と血中活性が平行して変化する可能性は低いと考え、それ以外の要素による制御が重要と考えられた。

そこで、大腸菌 LPS (E.LPS) と *Bacteroides* LPS (B.LPS) の動脈硬化への影響の差異を



検証するための実験として、それぞれの LPS を動脈硬化モデルマウスに 2mg/kg の量で、週に 1 回腹腔内投与する実験を実施した。予想通り、大腸菌 LPS では、動脈硬化が増悪したが、*Bacteroides* LPS では変化が認められず、引き続きその機序の解明を行なっている。

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 Yoshida Naofumi, Yamashita Tomoya, Kishino Shigenobu, Watanabe Hikaru, Sasaki Kengo, Sasaki Daisuke, Tabata Tokiko, Sugiyama Yuta, Kitamura Nahoko, Saito Yoshihiro, Emoto Takuo, Hayashi Tomohiro, Takahashi Tomoya, Shinohara Masakazu, Osawa Ro, Kondo Akihiko, Yamada Takuji, Ogawa Jun, Hirata Ken-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 A possible beneficial effect of Bacteroides on faecal lipopolysaccharide activity and cardiovascular diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69983-z	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 吉田 尚史, 山下 智也, 平田 健一	4. 巻 4
2. 論文標題 腸内細菌由来LPSと循環器疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 151-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 斉藤 克寛, 山下 智也, 吉田 尚史, 田畑 論子, 江本 拓央, 篠原 正和, 平田 健一
2. 発表標題 動脈硬化を予防するBacteroides 2菌種のリボ多糖(LPS)に着目した抗炎症作用機序の解明
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------