

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15254

研究課題名（和文）細胞外膜小胞に由来するアジュバント活性物質の探索

研究課題名（英文）Exploration of adjuvant-active substances derived from extracellular membrane vesicles

研究代表者

河野 健一（Kenichi, Kawano）

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70732874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、菌体から恒常的に分泌される細胞外小胞(EV)から、免疫増強因子をアジュバントへ応用する事を研究目的として、腸内細菌に由来するEVによる免疫活性化の評価を行った。アジ腸内細菌に由来するEVを用いて分化誘導したM1マクロファージとM2マクロファージを刺激したところ、炎症誘発性サイトカインと抗炎症性サイトカインの顕著な分泌が見られた。EV内包分子に免疫調節機能があることが明らかになり、今後、アジュバントへの応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌体から恒常的に分泌される細胞外膜小胞(EV)は、生物学的意義は長らく不明とされてきた。近年の研究で、EVには免疫細胞を活性化させる効果があると分かった。しかしながら、宿主細胞のEMV取込み機構や、EVの内包物放出機構、そして免疫活性中心の物質情報に関して、分子レベルでの解析データは極めて限られている。本研究では、EVの作用機序を詳細に解明し、EV由来の免疫増強因子をアジュバントへ応用する事で、研究成果の社会貢献を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated immune activation by EVs derived from intestinal bacteria, with the aim of applying immune-enhancing factors to adjuvants from extracellular vesicles (EVs) that are constantly secreted from cells. M1 and M2 macrophages differentiated stimulated by isolated EVs remarkably exhibited secretion of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. It has been revealed that EV-encapsulated molecules have immunomodulatory functions, and their application as adjuvants is expected in the future.

研究分野：免疫学

キーワード：曲率認識ペプチド 細胞外小胞 アジュバント 免疫活性 腸内細菌

### 1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞（EV）は、ほぼ全ての細胞から分泌される 50-200 nm の脂質ナノ粒子である。EV は脂質二重膜構造を有しており、タンパク質や核酸、脂質などの細胞由来成分が内包されている（Fig. 1）。また、EV は生体内において、細胞間コミュニケーションに利用されており、ガンや神経変性疾患などの様々な疾患や、免疫応答や炎症反応などに関与していることが報告されている[1]。さらに、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や再生医療への応用の研究が盛んに進められている。

近年の研究で、腸内細菌に由来する EV には免疫細胞を活性化させる効果があることが明らかになりつつあり [2]、ワクチンの免疫増強剤となるアジュバント開発への研究展開が活発に行われている。しかしながら、免疫細胞による EV 取込み機構や、EV の内包物放出機構、そして免疫活性中心の物質情報に関して、分子レベルでの解析データは極めて限られている。

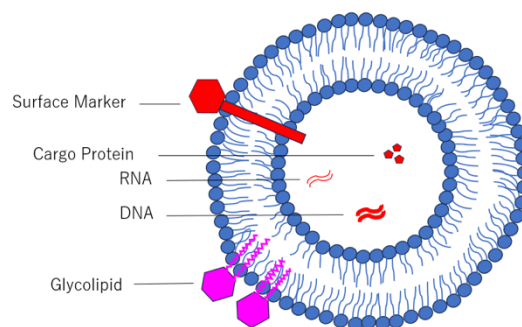


Fig. 1. EV の概略図

### 2. 研究の目的

本研究では、免疫細胞に対する EV の作用機序を詳細に解明し、EV 由来の免疫増強因子をアジュバントへ応用する事を研究目的とする。本来、アジュバントは生体内にほとんど存在しない物質を用いて免疫作用効果を強める技術であることから、通常では出会わない腸内細菌に由来する EV の方が、他の細菌や細胞の EV よりも免疫作用が強いと予想される。そこで EV を大量に分泌する性質があるアジの腸内細菌（グラム陰性細菌）に着目した。アジなどの青魚を摂取することには、血圧や LDL コレステロールの低下、血栓の危険性の低下、抗炎症作用などの働きがあり、アジの腸内細菌が分泌する EV にも免疫作用効果が期待される。アジの腸内細菌株は EV を大量生産することができ、なおかつ粒径や性質が均一であるため安定した供給が可能である[3]。加えて、EV の利用は分泌細胞に由来する免疫活性物質を多く含むが、菌体を除去しているので感染リスクがなく安全性が高いのがメリットである。免疫活性機構の解明が未踏なアジの腸内細菌株由来の EV から免疫応答反応を誘引する活性分子を特定し、作用機序を解明しながら医療応用としてワクチンの免疫増強剤となるアジュバント開発を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究目的を達成するためにアジの腸内細菌株から EV の単離方法を確立した後、単離した EV による免疫細胞の活性化能を調べた。マウス由来のマクロファージ株細胞（RAW264.7）を用いて、炎症性・抗炎症性マクロファージ（それぞれ M1、M2 マクロファージとする）の 2 種類に分化誘導し、EV を添加した際の M1、M2 マクロファージが産生する様々なサイトカインを ELISA で検出し、EV による免疫細胞の活性化能を評価した。

### 4. 研究成果

まず、炎症性・抗炎症性マクロファージの分化誘導を行なった。Western blotting を用いて M1、M2 マクロファージマーカータンパク質の発現を確認したところ、M1、M2 それぞれの特徴的なマーカーである iNOS と Arg-1 に関して顕著な発現量の増大を確認すること

ができた。

次に、単離精製した EV によるマクロファージのサイトカイン分泌量変化を ELISA で定量化した。一般的に、M1 マクロファージは刺激が加わると、炎症性サイトカインの一種である IL-6、IL-12、IL-23 の発現量が増加する。それに対して、M2 マクロファージは抗炎症性サイトカインの一種である IL-10、IL-12 の発現量が增大する。マクロファージに対して EV を添加したところ、炎症性サイトカイン IL-6 と抗炎症性サイトカイン IL-10 の分泌量が非添加時よりも 10 倍以上に増大するデータが得られた。アジの腸内細菌はグラム陰性菌であるため、EV 膜表層には免疫賦活剤であるリポ多糖 LPS が存在する。そこで、LPS 阻害剤ポリミキシン B (PMB) を用いて、EV に含まれる LPS の寄与を確かめた。LPS 単独をポジティブコントロールに用いた際、PMB 存在下によってサイトカイン分泌量の著しい低下が見られたことから、PMB が LPS を特異的に阻害することで LPS のマクロファージ活性化能を効果的に抑制することが示唆された。それに対して、EV は PMB の有無によらず、EV の添加によるサイトカイン分泌量に差は見られなかった。この実験から、EV 表層に含まれる LPS もしくは遊離の LPS によってサイトカインが分泌されたのではないことが明らかになり、EV 内包物に未知の免疫活性化剤が内包されていることが示唆された。

今回の結果では、M1、M2 マクロファージで共に IL-6 と IL-10 の分泌量が顕著に増大していた。EV の内包成分として IL-6 を誘導する物質と、IL-10 を誘導する物質といったように、それぞれ異なる物質によってサイトカインの産生が誘導されている可能性が考えられるため、今後は各種サイトカイン分泌の誘発物質の特定を目指す。

#### 参考文献

- [1] Takahashi Yuki et al. “Extracellular vesicle-based therapeutics: Extracellular vesicles as therapeutic targets and agents.” *Pharmacol Ther*, 242, 108352 (2023)
- [2] Jiang Lingling et al. “EpCAM-dependent extracellular vesicles from intestinal epithelial cells maintain intestinal tract immune balance.” *Nat Commun*, 7, 13045 (2016)
- [3] Chen Chen et al. “Isolation of a novel bacterial strain capable of producing abundant extracellular membrane vesicles carrying a single major cargo protein and analysis of its transport mechanism.” *Front Microbiol*, 10, 3001 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 葛馬佑樹、河野健一、松崎勝巳
2. 発表標題 細胞外小胞の単離に向けた新規 pH 応答性曲率認識ペプチドの設計
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenichi Kawano, Fumiaki Yokoyama, Kouhei Kamasaka, Jun Kawamoto, Takuya Ogawa, Tatsuo Kurihara, and Katsumi Matsuzaki
2. 発表標題 STRUCTURAL FACTORS GOVERNING VESICLE DETECTION OF CURVATURE-SENSING PEPTIDES
3. 学会等名 The 59th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野健一、葛馬佑樹、横山文秋、釜阪紘平、小川拓哉、川本純、栗原達夫、松崎勝巳
2. 発表標題 細胞外小胞の高感度検出を基軸とした曲率認識ペプチドの創製研究
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
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
---------	---------