

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： *Clostridium ramosum* を標的とした粘膜ワクチンの作用機序解明

Elucidation of action mechanism of mucosal vaccines for *Clostridium ramosum*

研究開発実施期間：令和3年9月15日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：植松 智

Satoshi Uematsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

公立大学法人大阪 大阪公立大学大学院医学研究科医学部メタゲノム解析研究センター/ゲノム免疫学 センター長 / 教授

Department of Immunology and Genomics, Graduate School of Medicine, Osaka Metropolitan University/Professor

II 研究開発の概要

近年では、腸内微生物叢解析が盛んに行われるようになり、特に腸内細菌叢の多様性の変化(dysbiosis)がさまざま疾患と関連していることが報告された。糞便移植治療など dysbiosis の制御法は存在するものの、安全面の問題などから dysbiosis 関連菌に特異的な制御法の確立が強く求められている。近年 dysbiosis だけでなく、疾患の発症や病態に直接的に関わる腸内共生病原菌 (pathobiont) も次々と同定されてきた。私たちの研究グループは、自然免疫受容体のリガンドである CpG DNA およびβグルカン (カードラン) をアジュバントとして抗原と共に筋注すると、全身の粘膜面で高力価の抗原特異的な IgA を誘導できるワクチン接種法を 2019 年に開発し、その粘膜ワクチン技術を国内外で権利化した (特許 6534146)。本技術により、肥満及び糖尿病の発症と関わる腸内共生細菌の *Clostridium ramosum* に対して、菌特異的 Immunoglobulin(Ig)A を腸管に誘導することで、有意に肥満と糖尿病発症を抑制することを明らかにした (*Gastroenterology*. 2019)。さらに、非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) 患者でも、腸管内の *C. ramosum* の構成割合が健常者と比較して増加していることがわかっている。本研究開発では、*C. ramosum* を制御する粘膜ワクチンの臨床応用を実現するために、*C. ramosum* が引き起こす病態メカニズムを解明すると共に、*C. ramosum* の抗原の適正化や治療ワクチンとしての効果の検証についてノトバイオートマウス技術やメタゲノム解析技術などを用いて行った。

研究開発項目として、1) *C. ramosum* 粘膜ワクチンの抗原探索、2) 腸管上皮細胞株や腸管オルガノイドを用いた *C. ramosum* の機能解析、3) *C. ramosum* を定着させた NASH モデルマウスの解析、4) *C. ramosum* 粘

膜ワクチンの治療ワクチン効果（肥満改善効果）の検証、5) *C. ramosum* 粘膜ワクチンの治療ワクチン効果（NAFLD から NASH へ病態を進行させない効果）の検証、の5つを進めた。各項目の成果を記載する。

1) *C. ramosum* 粘膜ワクチンの抗原探索

C. ramosum の標準菌 (JCM1298^T) から作製した凍結乾燥菌体を用いて C57BL/6 マウス (SPF) に 0 週と 6 週に *C. ramosum* 粘膜ワクチンを筋肉注射で免疫をし、全身の粘膜面に抗原特異的な IgG および IgA を誘導させたマウスから脾臓と肺を採取し、細胞を単離した後、レパトア解析を行った。IgG と IgA いずれも増殖しているクローンが検出できておらず、この実験系では特徴的なクローンを同定することが難しいと考えられた。そのため、通常マウスで粘膜ワクチンを接種した場合は、有意な増殖クローンが検出できず、特徴的なレパトアを検出することは難しかった。そのため、*C. ramosum* が多い糞便移植マウスで粘膜ワクチンを接種、腸管膜リンパ節のレパトア解析を行った。腸管膜リンパ節の IgA レパトア解析ではクローンのコピー数には両群で有意な差を認めなかったしかし、Vaccine 群の個体 (全個体) でのみ検出されるクローンが計 15 個同定できた。現在これらの特徴的なクローンの全長配列を同定中で、菌特異的な配列を抗原の候補としたいと考えている。今後は候補配列を元に、機能的に有効な抗原を選択していく予定である。

2) 腸管上皮細胞株や腸管オルガノイドを用いた *C. ramosum* の機能解析

これまで腸管内の *C. ramosum* は、肥満や糖尿病患者で増加していること、また高脂肪食摂取によって菌が増殖することが知られている (MBio. 2013)。さらに小腸腸管上皮細胞のグルコーストランスポーター *Glut2* の発現を亢進させ、腸管内での糖吸収を高めることで、体重増加や耐糖能異常を引き起こすことが知られているが、*C. ramosum* が高脂肪食下で生体内にどのような影響を及ぼすか、明らかではない。本研究課題では、無菌マウスに *C. ramosum* を移植したシングルノトバイオートマウスを作成し、高脂質高コレステロール食を負荷した。腸管上皮細胞および肝臓を回収し RNA を抽出した後、RNA-Seq を行った (図 3 に解析手法を示す)。高脂質高コレステロール食を摂取した無菌マウスと HFHC 食を摂取した *C. ramosum* シングルノトバイオートマウスの比較では、驚くべきことに小腸 (空調および回腸)、大腸上皮細胞の遺伝子発現に有意な変化を示すものではなく、肝臓組織で有意な遺伝子発現の変化を認めた。肝臓での脂肪肝の促進作用があることを示唆するデータが得られた。

3) *C. ramosum* を定着させた NASH モデルマウスの解析

無菌マウスに *C. ramosum* を定着させて、シングルノトバイオートマウスを作製し、高脂質高コレステロール食を長期間与え、NASH モデルマウスを作製した。経時的な体重変化を観察したところ、*C. ramosum* シングルノトバイオートマウスの方が無菌マウスと比較して有意に体重増加率が大きいことが明らかとなった。高脂質高コレステロール食食開始後 24 週目で肝臓組織を解析したところ、無菌マウスでは正常肝が部分的に残っているのに対し、*C. ramosum* シングルノトバイオートマウスでは正常肝がほとんど残っていなかった。*C. ramosum* シングルノトバイオートマウスでは NASH の病態が増悪することが示唆された。

さらに、*C. ramosum* の割合が高い NASH 患者糞便を定着させたノトバイオートマウスを作製し、*C. ramosum* 粘膜ワクチン接種後の経時的な経過および HFHC 食摂取 24 週での病態を評価した。ワクチン接種群と非接種群で明らかな体重の変化は認めなかったが、肝臓組織ではワクチン接種群で正常肝が部分的に残存しており、血液検査でも ALT や ChE が有意に低下していたことから NASH の病態は軽減されていると考えられた。腸管内

で *C. ramosum* の割合が高い場合は、予防的に *C. ramosum* 粘膜ワクチンを接種しておくことで NASH の病態が軽減できる可能性が示唆された。

さらに重要なことは、ワクチン接種後に著しい腸内細菌の構成異常が誘導されないことである。高脂質高コレステロール食摂取 24 週後の腸内細菌叢の構成割合では、*C. ramosum* 粘膜ワクチン接種群と非接種群を比較すると、両方で腸内細菌の構成異常を認めなかった。今後の臨床応用を考えると非常に重要な知見である。

4) *C. ramosum* 粘膜ワクチンの治療ワクチン効果（肥満改善効果）の検証

C. ramosum に対する治療ワクチン効果（肥満改善効果）をより正確に評価するために、無菌マウスに *C. ramosum* を移植したシングルノトバイオートマウスを用いて検討した。無菌アイソレーター内で無菌マウス（C57BL/6 オスマウス）を個別飼育し、嫌気培養下に増殖させた *C. ramosum* の標準菌（JCM1298^T）を経口投与にて定着させた。糞便を採取し、菌の定着を確認後、高脂肪食を開始した。高脂肪食摂取開始 4 週後に *C. ramosum* 粘膜ワクチンを接種し、高脂肪食開始 14 週後まで経時的に体重および糞便中の菌量を測定した。コントロール群と比較して、*C. ramosum* 粘膜ワクチン接種群では体重増加が少ない傾向にあった。糞便サンプルを GAM 寒天培地に塗布し、嫌気培養により *C. ramosum* の菌数を測定したところ、*C. ramosum* 粘膜ワクチン接種群ではコントロール群と比較して約 3 分の 2 程度に減少していた。高脂肪食開始 14 週後に、肝臓を採取した。肝臓重量は *C. ramosum* 粘膜ワクチン接種群とコントロール群で顕著な差を認めなかったが、HE 染色を行うと、*C. ramosum* 粘膜ワクチン接種群ではコントロール群と比較して脂肪沈着が抑制されていた。

5) *C. ramosum* 粘膜ワクチンの治療ワクチン効果（NAFLD から NASH へ病態を進行させない効果）の検証

C. ramosum の割合が多い NASH 患者の糞便を定着させたノトバイオートマウスを作製し、12 週間高脂質高コレステロール食を投与した後、*C. ramosum* 粘膜ワクチンを接種することで NASH の病態の進行を抑制できるかどうか検討する項目である。HFHC 食によって NASH を誘導するためには、24 週以上の時間が必要となる。研究期間が短かったために、4) の実験を優先し、5) は進行中である。

以上をまとめると、*C. ramosum* の定着は標的臓器の異常を誘導し、粘膜ワクチン接種によって内臓肥満の改善効果を誘導できることが分かった。

In recent years, analysis of the intestinal microbiota has become popular, and it has been reported that changes in the diversity of the intestinal microbiota (dysbiosis) are particularly associated with various diseases. Although there exist methods to control dysbiosis, such as fecal microbiota transplantation, it is necessary to establish control methods specific to dysbiosis-associated bacteria due to safety issues. In recent years, pathobionts that are directly involved in the pathogenesis of diseases have been identified in addition to dysbiosis. Our research group developed a vaccination method in 2019 that can induce high-titer antigen-specific IgA on mucosal surfaces throughout the body by intramuscular injection of CpG DNA and β -glucan (cardran) as co-adjuvants together with antigen. We obtained a patent on this mucosal vaccine technology in Japan and abroad (#patent 6534146). Interestingly, this technology significantly suppressed obesity and diabetes development by inducing bacteria-specific IgA in the intestinal tract against *Clostridium ramosum*, an intestinal symbiotic bacteria associated with the development of obesity and diabetes (Gastroenterology. 2019). Furthermore, patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH) have also been found to have an increased proportion of *C. ramosum* in the intestinal tract compared to healthy individuals. In order to realize the clinical application of a mucosal vaccine that controls *C. ramosum*, this research and development project aimed to clarify the pathological mechanism caused by *C. ramosum*, and also examined the optimization of *C. ramosum* antigen and its efficacy as a therapeutic vaccine using notobiotec mouse technology and metagenomic analysis. R&D items included 1) antigen discovery for *C. ramosum* mucosal vaccine, 2) functional analysis of *C. ramosum* using intestinal epithelial cell lines and intestinal organoids, 3) analysis of NASH model mice in which *C. ramosum* was established, 4) verification of the therapeutic vaccine effect against *C. ramosum* (obesity) 5) Verification of the therapeutic vaccine effect against *C. ramosum* (effect of preventing disease progression from NAFLD to NASH). We found that *C. ramosum* colonization induces target organ abnormalities and that mucosal vaccination can induce the ameliorative effect of visceral obesity.

(1) antigen discovery for *C. ramosum* mucosal vaccine

Using a standard strain of *C. ramosum* (JCM1298T) as antigen, mucosal vaccination was performed on mice transplanted with feces with high levels of *C. ramosum*, and repertoire analysis was performed. Specific clones detected only in individuals of the Vaccine group were found, and sequence search is in progress.

(2) functional analysis of *C. ramosum* using intestinal epithelial cell lines and intestinal organoids

Comparison of sterile *C. ramosum* single gnotobiotic mice fed a high-lipid, high-cholesterol diet showed little change in gene expression in small and large intestinal epithelial cells. However, significant gene expression changes were observed in liver tissue.

(3) analysis of NASH model mice in which *C. ramosum* was established

We established single gnotobiotic mice with *C. ramosum* and fed them a high-lipid, high-cholesterol diet for a long period to create a NASH model mouse, showing that the pathogenesis of NASH is exacerbated by the establishment of *C. ramosum*. Improvement of liver function was observed after mucosal vaccination.

(4) verification of the therapeutic vaccine effect against *C. ramosum* (obesity)

We examined the effect of mucosal vaccine on obesity in *C. ramosum* single gnotobiotic mice. There was a trend toward less weight gain in the vaccinated group. Liver weight was not significantly improved in the vaccination group. However, fat deposition was suppressed in the liver.

(5) Verification of the therapeutic vaccine effect against *C. ramosum* (effect of preventing disease progression from NAFLD to NASH)

The preventive effect of mucosal vaccine against NASH was verified in gnotobiotic mice in which feces from NASH patients with a high proportion of *C. ramosum* were settled. This is a long-term experiment and is ongoing.

In summary, we found that *C. ramosum* fixation induces abnormalities in liver and that mucosal vaccination can induce an ameliorative effect on visceral obesity.