

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(腸内マイクロバイオーーム制御による次世代創薬技術の開発)
研究開発中間進捗／成果概要報告書（公開版）

公開

令和6年 10月 6日

1. 公募研究開発課題名：疾患克服に資する腸内細菌を標的とした先端的 MB 制御技術の開発
2. 研究開発課題名：1 粒子遺伝子解析に基づいた *in vivo* 膜小胞産生細菌のハイスループット特定技術の開発と生菌製剤応用基盤の構築
3. 代表機関名：国立研究開発法人物質・材料研究機構
4. 研究開発代表者名：岡本 章玄
5. 所属・役職：高分子・バイオ材料研究センター電気化学ナノバイオグループ グループリーダー
6. 全研究開発期間：令和3年12月1日 ～ 令和9年3月31日（予定）

【研究開発概要】

近年、腸内細菌叢や免疫系を制御する因子の一つとして、細菌由来膜小胞(MV)が注目されており、ヒト腸内において強い影響力を持つ MV 産生菌群の特定は、革新的な生菌製剤創薬の基盤になりうる。一方で、膨大な腸内細菌種から MV 産生菌を特定するための有効な手法は確立されておらず、ヒト腸内 MV を網羅的かつ高精度にプロファイリングするための技術基盤が必要である。

本研究では、申請者らの独自技術である、MV 内部の DNA 配列を 1 粒子レベルで網羅的に解析する技術 Single-Microbial-Vesicle-Genomics, SMVG を駆使し、内部に保存される DNA を明らかにすることで、腸内での重要 MV 産生菌を特定する基盤技術を創出する。さらに、培養可能な株を用いて、内包物質の網羅的同定、腸管免疫系や腸内細菌叢に対する影響を調べることで、「生菌剤候補としての MV 産生菌のカタログ化」へ向けた評価手法の標準化を実施する。

【研究開発中間進捗／研究成果概要】

ヒト糞便サンプル中からの各種 MV 精製手法の比較検討を実施し、ヒト由来細胞外小胞の混入率が低く、DNA 解析に十分な MV の収量を確保できる精製手法を確立した。同精製手法を基に、健康人由来糞便からの MV 精製を実施したところ、一般的な 1 検体あたりの採取量である糞便 5 g から、ショットガンメタゲノミクスや SMVG に十分な量の MV 由来 DNA を再現性高く確保可能であることを明らかにした。これらの、健康人から得られた糞便由来 MV サンプルに対し、MV 1 粒子 DNA 解析 (SMVG)、MV ショットガンメタゲノミクス解析を実施したところ、多くの DNA 配列がファージに由来するものの、細菌由来 DNA を検出することに成功した。これらの細菌由来 DNA 配列の帰属を独自の解析パイプラインにより解析し、腸内で顕著に MV を産生する細菌を 1 種類同定した。細菌叢プロファイルとの比較からこの MV 産生菌はマイナー種である可能性が強く示唆された。

続いて、特定した有望な MV 産生菌株を対象に、培養菌株からの MV 精製、内包物質の解析、宿主細胞に与える影響の解析の 3 点を実施した。対象 MV 産生菌では、従来法では十分な MV 回収量が得られなかったが、独自手法を適用したところ、従来法に比べ 50 倍程度の、機能解析に十分な量の MV 粒子を得ることに成功した。回収した MV に対して独自のバイオインフォマティクス解析パイプラインを取り入れたプロテオーム解析を実施し、細胞外タンパク質を含む雑多な総体的プロテオームから MV 特異的なプロテオーム選別し、結果的に病原因子を含む 50 種類以上の内包物質を特定することに成功した。さらに、これらの MV をマウス由来の免疫細胞に投与したところ、特定の CD 抗原の発現の上昇が明らかとなった。これらの結果は、本研究で特定した MV が *in vivo* においても重要な機能を発揮しうることを示す重要な結果である。

さらに MV 産生と関連性の高い対象疾患として炎症性腸疾患に着目し、患者糞便由来の MV-DNA の解析を実施することで、疾患患者で総体的な産生量を増加・減少させる MV 産生菌を同定することを試みた。糞便あたりの検出 MV 数を比較したところ、健康者由来の糞便に比べて平均的な MV 量が有意に増加することが明らかとなった。腸内環境の変動と死菌数の関連については報告例があり、こうした細胞死の増加に関連する検出 MV 量の増大を示唆しており、対象疾患と MV の関連性を強く裏付ける結果と考えられる。