

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650082

研究課題名(和文)細胞形質転換に関わる乳酸菌由来因子の同定

研究課題名(英文)The identification of lactic acid bacteria derived reprogramming factor(s).

研究代表者

太田 訓正(OHTA, KUNIMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90244128

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)：本申請では、Human Dermal Fibroblasts (HDF細胞)からリプログラミング物質の同定を目的とした。乳酸菌を超音波破碎処理後、クロマトグラフィーを繰り返し、細胞塊形成能を持つ分画を同定した。その分画を用いて、MALDI-TOF-MS解析を行い、リプログラミング物質の同定を試みた。

私たちは、リプログラミング物質の同定に成功し、これをHDF細胞に作用させると乳酸菌を用いた時と同様に細胞塊を形成した。これらの細胞塊は脂肪細胞、骨細胞、神経細胞などへと分化したことから、乳酸菌由来リプログラミング物質は、宿主HDF細胞の遺伝子発現をコントロールしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we demonstrated the generation of multipotential cells from adult human dermal fibroblast (HDF) cells by incorporating lactic acid bacteria (LAB) (Ohta et al., PLOS ONE e51866, 2012). LAB-incorporated cell clusters differentiated into endodermal, mesodermal, and ectodermal cells in vivo and in vitro.

Next, we purified the LAB-derived materials from the homogenized LAB through ion-changed and gel-filtration chromatography by observing their cell clusters forming activity. We applied the peak fraction to MALDI-TOF-MS analysis and determined the LAB-derived reprogramming material. When we applied the LAB-derived material to HDF cells, they formed cell clusters and differentiated into cells derived from three germ layers. LAB-derived material was incorporated into the cells by endocytosis and they localized not only in the cytoplasmic region but also in the nucleus. Thus, LAB-derived material reprograms the host cells and modify their gene expression patterns.

研究分野：生物学

キーワード：乳酸菌 細胞 リプログラム 多能性

1. 研究開始当初の背景

乳酸菌は糖を分解して乳酸を生成する細菌類の総称であり、自然界に広く分布し、ヒトの腸内では善玉菌として健康の維持に働く。私たちはヒト皮膚細胞に乳酸菌を取り込ませると、アルカリホスファターゼ染色陽性の細胞塊が形成され、リプログラミングの誘導がおこり、3胚葉由来の細胞に分化できる多能性細胞が作製できることを報告した (Ohta et al., 2012)。

2. 研究の目的

私たちのグループは乳酸菌のホモジネートからある分子量のフラクションに細胞塊形成を引き起こす活性があることを見出し、本申請では、乳酸菌由来リプログラミング因子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

申請者は乳酸菌によるヒト皮膚細胞 (Human Dermal Fibroblasts: HDF) のリプログラミングの条件をさらに解析した。その結果、HDF細胞に死菌を取り込ませると、HDF細胞は細胞塊を形成し、多能性を獲得した。また、細胞破碎液でも同様の活性があることを確認した。本申請ではHDF細胞培養液に乳酸菌を添加後、数日で結果が判明する細胞塊形成活性を指標にしながら、生化学的手法および網羅的解析法を組み合わせ、リプログラミングを誘導する物質 (Factor X) の同定を試みた。活性を維持した状態で Factor X を精製するために、クロマトグラフィー (FPLC) を用いた粗精製を行った。イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーを数回繰り返し、限外ろ過を組み合わせることで、できる限り候補分子を絞り込んだ。

SDS-PAGE の後、クマシーブルー染色を行ったところ、10数本のバンドが認識されたため、これらを用いて MALDI-TOF-MS 解析を行い、全てのタンパク質を同定した。同定されたタンパク質を用いて、細胞塊形成能を調べた。

4. 研究成果

最終的に、乳酸菌由来のリプログラミング誘導物質の同定に成功した。このリプログラミング誘導物質を HDF 細胞に作用させると、乳酸菌を用いた時と同様に細胞塊を形成し、これらの細胞塊は脂肪細胞、骨細胞、神経細胞などへと分化した。今後は、乳酸菌由来のリプログラミング誘導物質がどのようにして細胞内に取り込まれ、どのようにして宿主である HDF 細胞の遺伝子発現に影響を与えるのかを分子レベルで解析を行いたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Abdulhaleem M FA, Song X, Kawano R, Uezono N, Ito A, Ahmed G, Hossain M, Nakashima K, Tanaka H, Ohta K. Akhirin regulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in intact and injured mouse spinal cord. *Dev Neurobiol*. 査読有 2015, May; 75(5): 494-504. doi: 10.1002/dneu.22238. Epub 2014 Oct 30.
2. Ito N, Ohta K. Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Dev Growth Differ*. 査読有, Apr 10, 2015. doi: 10.1111/dgd.12209. [Epub ahead of print]
3. Daisuke N, Kawano R, Niimori-Kita K, Ihn H, Ohta K. Tsukushi is involved in the wound healing by regulating the expression of cytokines and growth factors. *J. Cell Communication Signaling*. 査読有, sep; 8(3), 2014, 173-177. doi: 10.1007/s12079-014-0241-y. Epub 2014 Aug 27.
4. Riyadh MA, Shinmyo Y, Ohta K, Tanaka H. Inhibitory effects of draxin on axonal outgrowth and migration of precerebellar neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 2014 Jun 20; 449(1): 169-174. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.013. Epub 2014 May 14.
5. Song X, Tanaka H, Ohta K. Multiple roles of Equarin during lens development. *Dev Growth Differ*. 査読有, 2014 Apr; 56(3): 199-205. doi: 10.1111/dgd.12121. Epub 2014 Feb 20.
6. Ohta K. The Role of Tsukushi as an Extracellular Signaling Coordinator. *New Principles in Developmental Processes*. 査読有, 25 Jan, 2014, P227-238. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-54634-4_17

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 太田訓正, 乳酸菌を用いた繊維芽細胞を多能性細胞に転換する技術とそのリプログラミング因子. 平成 26 年度バイオビジネスアワード. 2015 年 2 月 9 日大阪市中央区大阪産業創造館 (大阪市).
2. 太田訓正, 乳酸菌による細胞のリプログラミング. 九州大学 理学部セミナー. 2014 年 12 月 9 日九州大学(福岡市).
3. 太田訓正, バクテリア由来物質による細胞リプログラミング. 第37回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜 (横浜市).
4. 太田訓正, Lactic acid bacteria によるヒト皮膚細胞の reprogramming. 第 7 回 Retina Research Meeting, 2014 年 11 月 22 日、JP タワーホール&カンファレンス (東京都千代田区).
5. 太田訓正, 乳酸菌による細胞のリプログラミング. 東京大学大学院 第998回生物科学セミナー、2014 年 9 月 22 日、東京大学大学院 (東京都文京区).
6. 太田訓正, バクテリアとの相互作用を介した細胞リプログラミング. 金沢大学 がん進展制御研究所セミナー, 2014 年 7 月 25 日、金沢大学 がん進展制御研究所 (金沢市).
7. Ohta K, Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells, 12th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research. (ISSCR). 2014 年 6 月 18 日-21 日、Massachusetts Convention Center Authority (Vancouver, Canada).
8. 太田訓正, バクテリアと相互作用を介した細胞リプログラミング. 北海道大学 遺伝子病制御研究所セミナー, 2014 年 6 月 2 日、北海道大学 遺伝子病制御研究所 (札幌市).
9. Ohta K, Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells. (第12回幹細胞シンポジウム, 2014 年 5 月 30 日-31 日、九州大学医学部 百年講堂 (福岡市)).
10. 太田訓正, 乳酸菌由来物質による細胞のリプログラミング. 産業技術総合研究所セミナー, 2014 年 5 月 14 日、産業技術総合研究所 (つくば市).
11. Ohta K, Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells. Contribution of Probiotics to Preventive & Pre-symptomatic Medicine, 2014 年 3 月 14 日、International conference center Hiroshima (広島市).
12. 太田訓正, 乳酸菌によるヒト皮膚細胞のリプログラミング. 第3回 発生過程におけるエネルギー代謝を考える会. 2014 年 2 月 13 日、熊本大学発生医学研究所(熊本市).
13. 太田訓正, 乳酸菌による多能性細胞の創造. 益生菌及其代謝物之多重応用 学術興産業応用研討会. 2013 年 11 月 22 日、国立台湾大学 (台湾).
14. 太田訓正, 幹細胞基礎研究の最前線. 2013 年度 日本乳酸菌学会 秋季セミナー. 2013 年 11 月 29 日、東京農業大学(東京都世田谷区).
15. Ohta K, Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells. 11th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research. (ISSCR) 2013 年 6 月 12 日-15 日、Massachusetts Convention Center Authority Boston, Massachusetts (U.S.A).
16. Ohta K, Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells, 第46回 日本発生生物学会年会, 2013 年 5 月 28 日-31 日、くにびきメッセ(鳥根県松江市).
17. Ohta K, Lactic Acid Bacteria Convert Human Fibroblasts to Multipotent Cells. 2013 年 5 月 17 日-18 日、第11回幹細胞シンポジウム, 東京大学伊藤国際学術研究センター(東京都文京区).
18. 太田訓正, 乳酸菌によるヒト皮膚細胞のリプログラミング, 日本実験動物技術者協会 九州支部 第36回総会および特別講演会, 2013 年 4 月 20 日、熊本大学生命資源研究・支援センター (熊本市).

〔図書〕(計 1 件)

太田訓正, 日本乳酸菌学会, 乳酸菌を用いた多能製細胞の創造, 2014.03.20.No.1(Vo.25), P13-17.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 細胞の再プログラミング誘導方法、および多能性細胞の製造方法
発明者: 太田訓正
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2014-98213 号
出願年月日: 2014 年 5 月 11 日
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

2015 年 2 月 大阪府彩都賞受賞

ホームページ

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/devneuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 訓正 (OHTA KUNIMASA)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号: 90244128