

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893200

研究課題名(和文) 乳酸菌由来の細胞リプログラミング因子の同定

研究課題名(英文) Somatic cell fate conversion by reprogramming factor isolated from Lactic acid bacteria

研究代表者

伊藤 尚文(Ito, Naofumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員

研究者番号：60732716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：以前の研究で、ヒト皮膚繊維芽細胞に乳酸菌細胞を添加することで、特徴的な細胞塊が形成し、その細胞塊が胚葉の制限を超えた多分化能を有することを明らかにしている。そこで、乳酸菌破碎液を分画し、精製画分を質量分析装置で解析すると数十種のタンパク質が同定されたが、他の生化学的から総合的に判断した結果、目的の分子はリボソームであることと判断した。リボソームを取り込んだヒト皮膚線維芽細胞は、三胚葉由来の多様な細胞に分化できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In previous studies, by adding lactic acid bacterium cells to human dermal fibroblasts induced characteristic cell mass formation was revealed. The cell mass had a multiple differential ability beyond germ layers limit. Chromatographic fractionated lactic acid bacteria lysate was added to the human skin cells result the cell mass formation and identified high activity condition for the cell mass formation. The fraction was analyzed by mass spectrometer and identified few proteins. It was also found that the molecule of interest is a molecule of above 100 kDa by other biochemical analysis. It was identified that the molecule of interest is a ribosome.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生 細胞分化 初期化 リボソーム 多能性幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸内では、様々な種類の菌が共生し1つの生態系を形作っていると事から、これらの集団は腸内フローラと呼ばれている。腸内フローラを構成する善玉菌(人体に有用な働きをする菌の総称)の1つである乳酸菌は、糖を分解して乳酸を生成する細菌類の総称であり、ヨーグルト、チーズ、味噌などの発酵食品の生産に利用している。人は経験的に、乳酸菌発酵食品を摂取する事で、自らの健康を支えてきたと言われている。実際に、乳酸菌は、食細胞であるマクロファージを活性化し、過剰な免疫反応を沈静化するIL-10を産生させること(R. Kaji et al. : J. Immunol., 2010)や、ヒトに作用して抗炎症作用のあるインターフェロンの発現を誘導する(K. Tadaomi, et al. : Immunity, 2013)など、科学的にもその有用性が明らかになってきている。

我々のグループでは、乳酸菌とヒトとの細胞レベルにおける関係を調べるため、様々な条件で乳酸菌とヒト皮膚線維芽細胞(HDF)を共培養したところ、特徴的な細胞塊を形成する条件を見いだした(図1)。この細胞塊は多能性幹細胞である胚性幹(ES)細胞が形成する細胞塊とよく似ていたことから、多能性マーカーの発現と分化誘導試験を行ったところ、この細胞塊が三胚葉由来の細胞に分化できる多能性を持つことが明らかになった(Ohta et al., PLOS ONE 2012)。

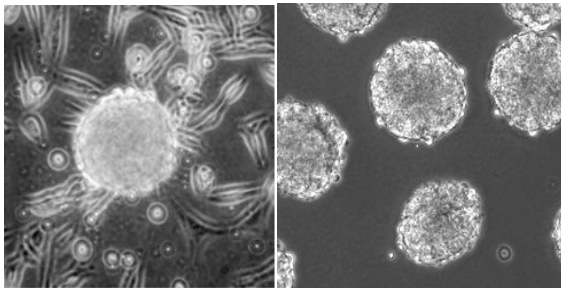


図1 乳酸菌誘導多能性細胞塊(左図)。ヒト皮膚線維芽細胞は通常の培養では細胞塊を形成しない。この細胞塊は胚性幹(ES)細胞が形成する細胞塊(右図)と類似している。

### 2. 研究の目的

本研究では、乳酸菌から特定の細胞リプログラミング因子の同定し、細菌とヒト細胞の相互作用に新しい概念を打ち立てることを目的とする。

### 3. 研究の方法

申請者は乳酸菌の死菌や、硫酸沈殿等の生化学的に簡易な精製画分においても特徴的な細胞塊の形成および、脂肪、骨、軟骨細胞への分化能があることを確認した。(未発表データ)。

本研究では、現在推定している乳酸菌由来のリプログラミング因子(LiPF)の同定を行うが、目的とする分子がタンパク質を中心とした複合体であることは推測できていたが、詳細は不明であったため、生化学的な精製によって分子自体の特徴を理解しながら同定を進めた。細胞リプログラミング因子はリボソームであることが判明した。リボソームはすべての生物に存在するタンパク質翻訳装置で、大腸菌の場合は約2.7MDaのタンパク質と核酸の複合体であるため、超遠心法で、他の細胞内分子と分離することができる。そこで、乳酸菌だけでなく、枯草菌や酵母、ラット培養細胞、ヒト培養細胞などからも分離し、リプログラミング活性を検定した。また、リボソームタンパク質にタグを付加した大腸菌遺伝子組換え体から分離したリボソームおよび購入したリボソームも用いて、リプログラミングが普遍的に生じるかを解析した。

リボソームによる刺激は細胞内に取り込まれることが必須であるかどうかを調べるため、取り込まれる経路をエンドサイトーシス阻害剤アッセイで検定した。さらに細胞内のタグ付きリボソームを免疫学的手法で観察し、また、イメージングサイトメーターで細胞内のリボソーム量を定量した。

細胞リプログラミング因子同定後はリプログラミングされた細胞の性質を解析した。細胞塊のNANOGやOCT4などの多能性幹細胞マーカーの発現、パイサルファイトシーケンスによるエピジェネティクス解析、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析とiPS細胞との比較を行った。

リボソームによる細胞初期化はマウス細胞でもヒトと同様に生じる。そこで、分化誘導能を確認するため、マウス精巣に移植して奇形種(テラトーマ)形成試験を行った。また、生殖系列への転換が生じるかをキメラマウス作成実験で確認した。

細胞塊の分化能は市販あるいは自作の分化誘導培地を用いて、三胚葉由来の細胞に分化できるかを検定した。分化誘導処理後、形態変化を観察し、抗体染色や化学染色で、ヒト皮膚線維芽細胞から他の細胞への転換が誘導されているかを確認した。

### 4. 研究成果

微生物によるヒト細胞の分化可塑性の誘導はハンセン病を引き起こすライ菌によっても引き起こされる(Masaki et al Cell. 2013.)。また、胃がんの主要な原因菌であるピロリ菌も胃細胞を腸細胞に転換させることが知られている。我々が発表した乳酸菌による細胞分化への影響も含めて、微生物には共通してヒト多能性を制御する因子が存在すると考えられる(Ito, N. & Ohta, K. Dev Growth Differ 2015)。乳酸菌培養細胞を超音波で破碎し、硫酸分画や限外ろ過、陰イオン交換クロマトグラフィー等の

生化学的手法で分離した結果、高度に細胞塊形成活性をもつフラクションの分離に成功した。そのフラクションをMALDI-TOF-MSで分析し、フラクションに含まれるタンパク質を34種同定した。他の生化学的解析では目的分子は100kDa以上の乳酸菌にはほとんど存在しないタンパク質であったが、34種のタンパク質の中には二量体であっても、100kDa以上になるタンパク質は存在しなかった。そこで、複合体である可能性を考え、リボソームタンパク質が複数同定されていたことから、目的のリプログラミング分子はリボソームであると推察した。

リボソームは2.7MDaの巨大な細胞内小器官であるため、超遠心法によって単離することが可能である。そこで、乳酸菌からリボソームを精製し、細胞リプログラミング解析を行った結果、特徴的な細胞塊の形成および、脂肪や軟骨細胞への分化能が確認できた。リボソームは全ての生物がもつ翻訳装置で、生存に必須な細胞内小器官である。乳酸菌と近縁な原核生物だけでなく、酵母やヒト細胞からもリボソームを単離し、細胞初期化能を確認したところ、すべてのリボソームで三胚葉由来の細胞に分化可能な細胞塊を形成することが確認できた。手法的な問題として、超遠心法ではある程度のコンタミネーションは避けられない。大腸菌ではリボソームを構成するタンパク質のひとつにHis tagが付加された組換え体が開発されており、この大腸菌からはHis tagを利用した免疫学的な精製が可能である。そこで、この大腸菌を取り寄せて、リボソームを精製し、細胞リプログラミング活性を確認したところ、超遠心法で精製したリボソームと同じ活性を得た。また、市販の*in vitro* translation キットに付属しているリボソームでも同様の活性が確認できた。

次にリボソームの作用機構の解析を行った。リボソームが細胞内に取り込まれているかどうかを顕微鏡および、イメージングサイトメーターで解析した結果、リボソームは細胞内部に取り込まれていることが判明した。また、細胞内取り込み阻害剤を用いた解析によって、リボソームの取り込みが、細胞初期化に必須であることを確認した。

次にリボソームを取り込んだ細胞の性質を確認した。リボソーム取り込みによって細胞は増殖を停止し、細胞移動を行って、集合体を形成していることが判明した。細胞増殖の停止によって、細胞死は起こらず、細胞周期はG2期の細胞が多くなる傾向が観察された。

細胞塊がどのような初期化細胞であるため、幹細胞マーカーのNANOG、OCT4NAなどの発現解析を行った。そのiPS細胞とは発現レベルは低いが、いくつかの初期化

マーカーで発現が見られた。マイクロアレイによる網羅的発現によっても初期化マーカーの発現が確認できた。また、細胞周期関連の遺伝子の発現変化も見られたことから、元のヒト皮膚線維芽細胞とは異なる細胞に変化していることは確認された。

細胞塊を形成しているということは細胞接着に関係している分子の発現も異なると考えられる。そこで、細胞塊の免疫染色および発現解析でVimentinの発現上昇を確認した。また、Cadherinの発現抑制が観察された。細胞周期の停止、Vimentinの発現とCadherinの発現抑制が生じる現象として上皮間葉転換がある。上皮が間葉系幹細胞に転換する現象で、胚発生や神経管の形成などに関わっている。そこで、上皮間葉転換のマーカーであるSNAILやTWISTの免疫染色をしたところ、細胞塊で強い発現がみられ、また、マイクロアレイのデータからも上皮間葉転換が生じていることが確認された。

初期化細胞塊の細胞可塑性を調べるために、脂肪、骨、軟骨、神経、心筋、肝臓細胞に分化誘導した。分化誘導した細胞は携帯の変化が観察され、オイルドロップの産生、免疫染色における陽性細胞の出現が確認された。細胞塊の生体内での可塑性を確認するため、マウス細胞を用いて細胞塊を作成し、マウス精巣に移植して奇形腫形成を観察したが、奇形腫は確認されなかった。また、生殖系への寄与を調べるため、キメラマウス作成実験を行ったが、キメラマウスは獲得できなかった。生体内での分化が確認できなかったが、これはリボソーム誘導した細胞塊が自己増殖性を欠いているためであると思われ、これをコントロールすることは次の重要な課題であると考えている。

リボソームによって細胞周期が停止する現象は核小体ストレスとして知られている。外部から大量のリボソームを細胞内に導入した研究は、この研究が初めてであるが、核小体ストレスは転写因子p53に関係して細胞周期やガン発生に関与していることから、外来リボソームによる核小体ストレス発生機構と細胞分化の可塑性誘導は関係性があると考えられる。今後は細胞初期化誘導機構をより詳細に理解するために、マウス細胞の初期化細胞を遺伝子組換えやGFPマウスなどを用いて解析を行う予定である。

##### 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 1 件)

① N, Ohta K, Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Dev Growth*

Differ, 査読有, 57(4), 2015, 305-312.  
DOI: 10.1111/dgd.12209

〔学会発表〕(計 6 件)

伊藤 尚文

Disruption of Tsukushi leads to hydrocephalus by aberrant neurogenesis ICiRA/ISSCR 2016 International Symposium 2016 3 23  
京都大学百周年時計台記念館 ( 京都府京都市 )

伊藤 尚文

Somatic cell fate conversion by reprogramming factor isolated from Lactic acid bacteria. 第5回 オルソオルガノジェネシス研究会議 2015 8 6 安曇野穂高ビューホテル ( 長野県安曇野市 )

伊藤 尚文

Human cell reprogramming by defined factors isolated from acid bacteria. 第48回日本発生生物学会大会 ( APDBN 共催 ) 2015 6 3 つくば国際会議場 ( 茨城県つくば市 )

伊藤 尚文

細胞外分泌タンパク質 Tsukushi は神経および血管系から発現されることで脳神経幹細胞ニッチの制御に關与する 第37回日本分子生物学会 2015.11.25 パシフィコ横浜 ( 神奈川県横浜市 )

伊藤 尚文

細胞外分泌タンパク質 Tsukushi は神経および血管系から発現されることで脳神経幹細胞ニッチの制御に關与する 熊本医学・生物科学国際シンポジウム 2014.9.4 熊本市医師会館 (熊本県熊本市)

N.Ito, R.Kawano, and K.Ohta.

乳酸菌によるヒト繊維芽細胞の初期化。 Human fibroblast reprogramming by Lactic acid bacteria. 第47回日本発生生物学会年会 2014.5.27~30 ウィンクあいち (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :

種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

熊本大学 大学院生命科学研究部 神経分化学教室 ホームページ :  
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep/t/devneuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 尚文 (ITO, NAOFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・研究員  
研究者番号 : 60732716

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :