

令和元年6月5日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15497

研究課題名(和文) マイコプラズマの癌感染性因子としての重要性の解明

研究課題名(英文) Mycoplasma hyorhinis as an infectious tumor-promoting factor

研究代表者

疋田 智也 (HIKITA, Tomoya)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍制御学分野・主任研究員

研究者番号：20600935

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)：本研究では、がん進展におけるマイコプラズマの関与を個体レベルで明らかにするため、組織染色に使用可能な抗マイコプラズマ抗体の作製、及びマイコプラズマのin vivo発光イメージングシステムの構築を中心に行った。PFA固定マイコプラズマを抗原とし、腸管リンパ節法によるモノクローナル抗体作製を実施し、有用な抗体の取得に成功した。また、近赤外蛍光試薬 XenoLight Bacterial Detection Probe 750 を用いて、マイコプラズマの蛍光標識を行い、in vivoイメージングが可能であることを見出した。本研究で作製したこれらの解析ツールにより、マイコプラズマの生体解析が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト全癌死亡の約20%は、感染を背景とする感染がんが占めると考えられており、がん感染性因子の同定及び詳細な発がん・がん進展機構の解明が重要である。我々はこれまでに、M.hyorhinisががん感染性因子であることをin vitroの実験系において明らかにしてきたが、その生体での重要性は不明である。がん感染性因子の証明には、生体での感染の有無やその感染動態をモニターできる検出ツールや技術が必須である。本研究では、それらの解析を実行可能な高品質の抗体、及び発光標識菌体の作製に成功した。これらツールを用いた解析によりその重要性を明らかにできれば、新たながん治療や予防が可能となるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we mainly tried to create analytical tools to demonstrate the importance of mycoplasma hyorhinis (M.hyorhinis) in cancer progression. To clear the incident of M. hyorhinis infection in tumor mass, we prepared anti-M.hyorhinis monoclonal antibody which is available for immunohistochemistry. By immunizing paraformaldehyde-fixed M.hyorhinis as an antigen to mesenteric lymph node, we finally obtained high-quality monoclonal antibodies against M. hyorhinis. In addition to detecting the infection in tumor sample, infection dynamics should be elucidated to demonstrate the importance of M.hyorhinis in cancer. Therefore, we next labeled M. hyorhinis with far-red fluorescent reagent for monitoring infection dynamics in mice. These analytical tools would make it possible to elucidate the importance of mycoplasma in cancer.

研究分野：腫瘍生物学、細胞生物学

キーワード：マイコプラズマ がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HPV や HTLV-I、ヘリコバクター・ピロリ菌に代表される感染がん(ウイルス、細菌、寄生虫などの感染を背景に発症するがん)は、ヒト全がん死亡の少なくとも 20%を占めると考えられている。そのため、がん感染性因子の同定、及び感染に伴う発がん・がん進展機構の解明は、治療・予防の観点から極めて重要である。我々はこれまでに、マイコプラズマ(*M. hyorhinis*: マイコプラズマ・ハイオリニス)感染が増殖因子 HB-EGF の発現亢進を介してがん悪性化に関与すること、独自に作製したポリクローナル抗体を用いた組織染色でヒト卵巣がん及び胃がんで陽性例が確認されること、さらにマイコプラズマ感染領域において HB-EGF が高発現していることを見出している。しかしながら、組織染色解析に用いたマイコプラズマ抗体は高いバックグラウンドを示すことから、感染評価が困難であった。マイコプラズマのがん感染性因子としての重要性を証明するには、優れたマイコプラズマ抗体を用いた詳細かつ大規模な組織染色解析が必要であると考えられる。また、マイコプラズマの感染経路および感染動態は、がんとマイコプラズマを結びつける重要ファクターであるが、生体内でどのような動態を示すか全く不明である。

2. 研究の目的

我々は、マイコプラズマのがん感染性因子の一つであることを、in vitro の実験系を用いて明らかにしてきた。しかし、その感染動態及び、がん病態との関連性などは不明である。そこで本研究では、組織染色能に優れたマイコプラズマモノクローナル抗体を作製し、大規模な組織染色解析を行うとともに、感染動態を観察可能な実験系を構築することで、マイコプラズマのがん感染性因子としての重要性を解明する。

3. 研究の方法

(1) 生体試料におけるマイコプラズマ感染の検出

以前、マイコプラズマの Mp37 組み換えタンパク質を抗原としたポリクローナル抗体を自作した。この抗体はマイコプラズマに対して高い特異性を示すが、バックグラウンドが出てしまうという欠点があった。そこでまず、免疫染色に使用可能な高品質のモノクローナル抗体作製を最優先に実施した。PPL0 培地で純培養したマイコプラズマをパラホルムアルデヒドで固定したものを抗原とし、腸管リンパ節法によりマウスへ免疫を行い、ハイブリドーマを作製した。マイコプラズマ感染細胞を固定化したプレートおよび Mp37 組み換えタンパク質を固相化したプレートを用いて特異抗体のスクリーニングを行った。作製した抗マイコプラズマ抗体を用いて、卵巣がん及び胃がんの組織アレイの染色を行い、感染有無の判別を行なった。

(2) 感染動態の解明

マウスにおける感染動態を In Vivo Imaging System (IVIS)を用いて解析するため、発光酵素標識マイコプラズマ株の樹立を試みた。ルシフェリンなどの基質の添加なく自家発光可能な luxABCDE オペロンをマイコプラズマゲノム上に挿入するため、pAUL-A Tn4001 luxABCDE ベクターをエレクトロポレーションによりトランスフェクションした。また、バクテリア膜上に存在する陰イオンリン脂質をラベル可能な近赤外蛍光試薬 XenoLight Bacterial Detection Probe 750 を用いて、マイコプラズマと共培養することにより標識を試みた。樹立した自家発光型マイコプラズマ株を呼気、口腔、血中および経腔に感染させ、臓器への集積性や体内動態を IVIS により解析する。また、ヒト卵巣癌及び胃癌細胞株の同所移植マウスを用いて、向腫瘍感染性についても同様に解析を行う。

4. 研究成果

マイコプラズマ菌体を免疫することにより、8クローンの特異的抗体産生細胞を取得することができた。これらの抗体は、マイコプラズマ感染細胞に高い反応性を示し、非感染細胞ではほとんど反応性を示さなかった。また興味深いことに、これらの抗体はいずれも Mp37 タンパク質に強い反応を示した。菌体を免疫原として作製した抗体がいずれも Mp37 タンパク質を認識することから、Mp37 は強い免疫原性を有していることが推察される。また、感染動態を解析する目的で発光マイコプラズマ株の樹立を試みた。pAUL-A Tn4001 luxABCDE ベクターを用いる方法では標識したマイコプラズマ菌体を得ることができなかったが、XenoLight Bacterial Detection Probe 750 を用いることでマイコプラズマの標識に成功した。

本研究により、S/N 比および特異性の高いマイコプラズマ抗体を得ることに成功した。現在、多数のヒト腫瘍組織を染色する準備をしているところであるが、今回得られた抗体により詳細な感染割合や、感染部位の特定を行うことができると期待している。また、現在標識したマイコプラズマ菌体を用いて、経口および経腔経路による感染動態の解析を行っている。解析ツールの準備が完了したため、これらを用いて腫瘍における感染の有無や感染部位の特定および感染動態の解明を行い、がんにおけるマイコプラズマ感染の関与について明らかとしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/06shuyo_uirusu/index.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。