

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03235

研究課題名(和文) リボソームによる細胞リプログラミング機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of cellular reprogramming by ribosome

研究代表者

太田 訓正(Ohta, Kunimasa)

九州大学・基幹教育院・教授

研究者番号：90244128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、リボソームがマウス線維芽細胞の形質転換に関わることを報告したが、ヒト癌細胞がリボソームを取り込むと、細胞塊を形成し、細胞増殖が停止して、形質転換を誘導し、脂肪細胞や骨芽細胞へと分化出来た。次に、リボソームを取り込んだマウス線維芽細胞を解析したところ、エピジェネティックな修飾(H3k9acのアセチル化)が誘導され、細胞融合や核融合が観察された。ATAC-seq解析では、22,921カ所のアクセシブルなクロマチン領域獲得と、30,146カ所のアクセシビリティ喪失を見出した。シングルセルRNA-seq法では、時系列的变化を調べたところ、4つのクラスターに分類出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質合成装置として知られているリボソームを細胞に投与すると、リボソームは細胞質内だけでなく、核内にも取り込まれていた。宿主細胞の核内では、エピジェネティックな修飾が誘導され、様々な遺伝子の発現パターンが変化していた。さらに、リボソームを取り込んだ細胞は、時系列的に、4つの異なった細胞種へと変化することが示された。本研究では、リボソームの新たな役割を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that the incorporation of ribosome into mouse fibroblast cells induced the multipotency in the host cells (Ito et al., 2018). In this study, we tried to examine the molecular function of incorporated ribosome in the host cells. When ribosome was incorporated into human cancer cells, cells made clusters and stopped the cell proliferation. Therefore, ribosome transdifferentiated the cancer cells. Next, we found that the exogenous ribosome was localized in the nuclear and induced the epigenetic modification. Further, ATAC-seq analysis indicated the 22,921 acquired and the 30,146 loss chromatin areas in the ribosome incorporated cells. Further, by the single cell analysis, the ribosome incorporated cells are categorized into 4 groups by time series.

研究分野：幹細胞生物学

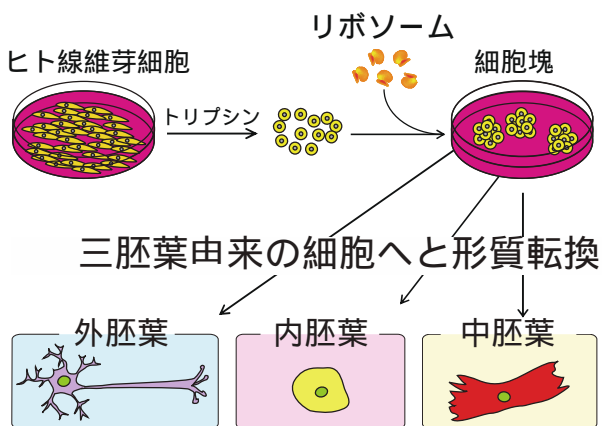
キーワード：リボソーム 形質転換 多能性

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の今までの研究スタイルとして、新たな遺伝子 (Plexin, Tsukushi, Akhirin, Equarin) を単離・命名し、それらの遺伝子の機能解析を行ってきた。人の遺伝子は約 2 万 6 千個あると言われており、その中の 4 個の遺伝子の命名に関与できたことは研究者として幸せなことであるが、研究方法が一辺倒であったことから、幹細胞分野で遺伝子を使わない独創的・革新的な実験がしたいと常々考えていた。2006 年には、山中教授がヒト皮膚細胞に 4 つの遺伝子を取り込ませて iPS 細胞を樹立し、iPS 細胞は基礎研究だけでなく再生医療にとって有益な細胞であるが、私たちの体には存在しない人工細胞である。そこで、古細菌に真正細菌が感染して、真核細胞が誕生したという共生説に着目し、ヒト皮膚細胞にバクテリアを取り込ませれば、新たな細胞を作製できるのではないかというアイデアが、本研究の原点である。

2012 年に、ヒト皮膚細胞に乳酸菌を取り込ませて、細胞に多能性を付与することを世界で初めて報告したが (Ohta et al., PLOS ONE 2012: 日米特許取得済み) 申請者らの結果を信じる研究者はほとんどいなかった。興味深いことに、シュワン細胞がライ菌に感染すると、シュワン細胞が幹細胞に分化転換するという論文 (Masaki et al., Cell 2013) が発表され、申「バクテリアが細胞に感染して宿主細胞をリプログラムする」現象が証明された (Ito et al., DGD 2015)。

2014 年には、リンパ系細胞を酸性の液に漬けると多能性細胞が作製できるという話題があったが、申請者が作製した細胞塊も、乳酸菌が産生する乳酸の影響ではないか? という疑いをかけられた。そこで、乳酸菌由来の何が細胞への多能性付与に関与しているのかを明らかにするために、乳酸菌の破碎液から細胞塊を形成する能力を指標と



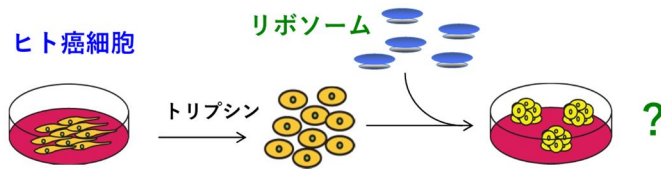
して、様々な生化学的実験を行った結果、リボソームを含む分画に細胞塊形成能が高いことを見出した。次に、乳酸菌からリボソームを精製し、細胞に取り込ませたところ、細胞塊が形成され、様々な多能性マーカーの発現を誘導し、三胚葉由来の細胞へと分化できたことから、リボソームがリプログラミング物質実体であることを報告した (Ito et al., Sci Rep 2018; Ito et al., DGD 2018、右図)。細胞運命の転換現象は明らかになったが、運命転換機構はまだ解明されていないことから、本研究においては、リボソーム誘導細胞塊の樹立課程を詳細に解析することによって、リボソームがどのような分子制御によって細胞に多分化能を付与するかを明らかにし、発生・進化における細胞分化の新たな意義を提唱することが、本研究課題の核心である。

## 2. 研究の目的

リボソーム誘導型多分化能細胞の分子メカニズムを解析することで、初期発生システムを解き明かし、多能性の意義を問うことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

下図にあるように、細胞にリボソームを取り込ませ、その細胞塊形成や、細胞の増殖能、並びに分化能を調べ、宿主細胞に対するリボソームの影響を調べる。

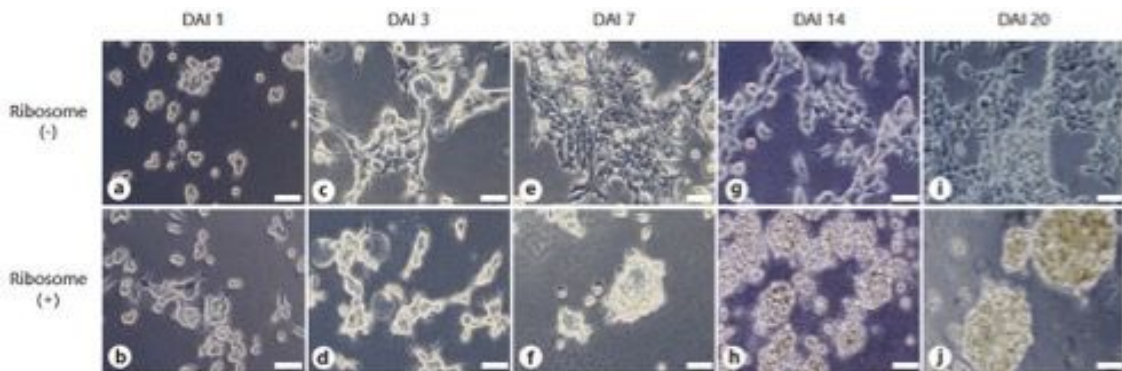


我々の以前のマウス線維芽細胞を用いた実験では (Ito et al., 2018) 外部から取り込ませたリボソームは宿主細胞の核内にまで取り込まれていたため、リボソームが宿主細胞の遺伝子制御を行なっている可能性が示唆されていた。そこで、リボソームを取り込んだ細胞のエピジェネティックな修飾を免疫染色法により調べる。

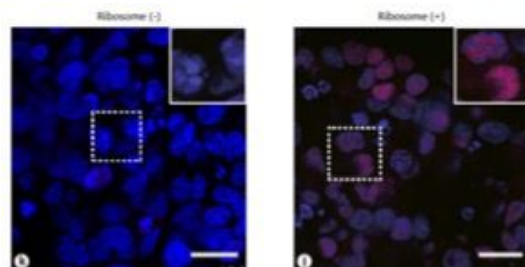
### 4. 研究成果

#### リボソームを取り込んだ癌細胞の形質転換

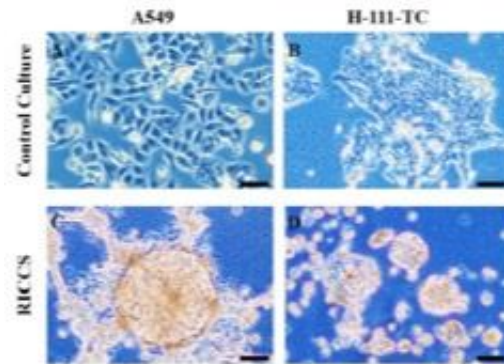
我々は、マウス線維芽細胞やヒト線維芽細胞にリボソームを取り込ませ、それらが細胞塊を形成後、その増殖を停止し、多能性を獲得することを報告してきた (Ito et al., 2018)。しかしながら、ほぼ永久的に増殖するヒト癌細胞へのリボソーム取り込みの影響を調べていなかったため、ヒト乳癌細胞株 (MCF7) にリボソームを取り込ませ、その細胞動態を調べたところ、ヒト乳癌細胞は細胞塊を形成し、増殖を停止した (下図、Kudo et al., 2021)。



次に、外部から投与したリボソーム (大腸菌由来で、リボソームを構成する L7/L12 タンパク質に His タグが付いている、Ederth 博士からの供与) が、ヒト乳癌細胞に取り込まれているかを確認するために、抗 His 抗体を用いて免疫染色法を行った。その結果、細胞外から投与したリボソームが細胞質だけでなく、核内にも取り込まれていることが明らかになった (右図)。



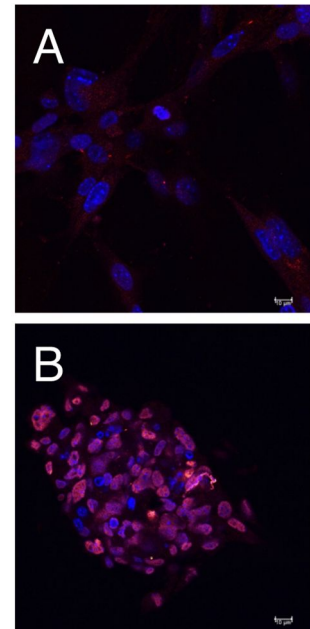
続いて、同様の実験をヒト肺癌細胞 (A549)、ヒト胃癌細胞 (H-111-TC) を用いて行なったところ、2種類の癌細胞は細胞塊を形成し、その増殖が停止した(右図、Anam et al., 2021)。また、これらの細胞は、骨芽細胞や脂肪細胞に分化出来ることが明らかになった。



以上の結果から、外部から投与したリボソームが、宿主細胞である癌細胞の形質転換を誘導したことが明らかになった。

#### リボソームを取り込んだ細胞のエピジェネティックな修飾

我々は、宿主細胞の核内に取り込まれたリボソームの作用機序を調べるために、免疫染色法を行なった。リボソームを取り込んだマウス線維芽細胞 (右図 B) は、エピジェネティックな修飾 (H3k9ac のアセチル化; 赤色) が誘導されるが、コントロールのマウス線維芽細胞 (右図 A) では観察されていない (未発表データ)。この結果により、山中 4 因子による iPS 細胞作成時と同様に、リボソームがクロマチンを様々なエピジェネティック修飾し、多能性獲得のための遺伝子発現を制御していることが示唆されたことから、核内に取り込まれたリボソームタンパク質が相互作用をする標的は、クロマチンであると考えられる。現在、核内に取り込まれたリボソームの動態や作用機序を調べるための解析を行っている。



現在、トランスクリプトーム解析、ATAC-seq、ChIP-seq をリボソーム投与による細胞初期化過程で行っており、初期化のイベントに関わると思われる遺伝子群が、リボソームによる直接的な核内転写調節を介して制御されている可能性が生まれてきた。リボソームが転写調節に関わるという報告は今までになく、今後の研究では、リボソームによる細胞初期化が、翻訳か転写か、あるいはその両方が、または、それ以外のメカニズムを介するのか、について解明を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shirakawa Yuki, Hide Takuichiro, Yamaoka Michiko, Ito Yuki, Ito Naofumi, Ohta Kunimasa, Shinojima Naoki, Mukasa Akitake, Saito Hideyuki, Jono Hirofumi	4. 巻 111
2. 論文標題 Ribosomal protein S6 promotes stem like characters in glioma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2041～2051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kudo Mikiko, Anam Mohammad Badrul, Istiaq Arif, Ahmad Shah Adil Ishtiyag, Ito Naofumi, Ohta Kunimasa	4. 巻 211
2. 論文標題 Ribosome Incorporation Induces EMT-like Phenomenon with Cell Cycle Arrest in Human Breast Cancer Cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 212～221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000513908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Anam Mohammad Badrul, Istiaq Arif, Kariya Ryusho, Kudo Mikiko, Ishtiyag Ahmad Shah Adil, Ito Naofumi, Okada Seiji, Ohta Kunimasa	4. 巻 26
2. 論文標題 Ribosome induces transdifferentiation of A549 and H-111-TC cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100946～100946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.100946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito N., et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Dysfunction of the proteoglycan Tsukushi causes hydrocephalus through altered neurogenesis in the subventricular zone in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 aay7896
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.aay7896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miwa Toru, Ito Naofumi, Ohta Kunimasa	4. 巻 15
2. 論文標題 Tsukushi is essential for the formation of the posterior semicircular canal that detects gait performance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 581 ~ 594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-021-00627-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kudo Mikiko, Ohta Kunimasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of the Brain Neural Niche by Soluble Molecule Akhirin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jdb9030029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Istiaq Arif, Ohta Kunimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Ribosome-Induced Cellular Multipotency, an Emerging Avenue in Cell Fate Reversal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2276 ~ 2276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10092276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirakawa Yuki, Ohta Kunimasa, Miyake Shunsuke, Kanemaru Ayumi, Kuwano Akari, Yonemaru Kou, Uchino Shota, Yamaoka Michiko, Ito Yuki, Ito Naofumi, Hide Takuichiro, Shinojima Naoki, Mukasa Akitake, Saito Hideyuki, Jono Hirofumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Glioma Cells Acquire Stem-like Characters by Extrinsic Ribosome Stimuli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2970 ~ 2970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10112970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Putthisen Siyaporn, Silsirivanit Atit, Panawan Orasa, Niibori-Nambu Akiko, Nishiyama-Ikeda Yuki, Ma-In Prasertsri, Luang Sukanya, Ohta Kunimasa, Muisuk Kanha, Wongkham Sopit, Araki Norie	4. 巻 410
2. 論文標題 Targeting alpha2,3-sialylated glycan in glioma stem-like cells by Maackia amurensis lectin-II: A promising strategy for glioma treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112949 ~ 112949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Istiaq Arif, Ohta Kunimasa	4. 巻 x
2. 論文標題 A review on Tsukushi: mammalian development, disorders, and therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-022-00669-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Quaresima Sabrina, Istiaq Arif, Jono Hirofumi, Cacci Emanuele, Ohta Kunimasa, Lupo Giuseppe	4. 巻 10
2. 論文標題 Assessing the Role of Ependymal and Vascular Cells as Sources of Extracellular Cues Regulating the Mouse Ventricular-Subventricular Zone Neurogenic Niche	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 845567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.845567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Istiaq, A., Urata, K., Nakamura, K., Anam, B., Ahmad, S., Kudo, M., Ito, N., Ohta, K.
2. 発表標題 Incorporation of bacterial ribosome in diverse mammalian cells
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kudo, M., Anam, B., Ahmad, S., Ito, N., Ohta, K
2. 発表標題 Transdifferentiation of human cancer cells by ribosome
3. 学会等名 日本発生生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Istiaq, A., Kuod, M., Nakayama, S., Takashi, K., Ohta, K.
2. 発表標題 Intracellular interaction of bacterial ribosome in mammalian cell towards cellular transdifferentiation
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kudo, M., Anam, B., Ahmad, S., Ito, N., Ohta, K.
2. 発表標題 Ribosome incorporation induce EMT-like phenomenon with cell cycle arrest in human breast cancer cell
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Istiaq, A., Kudo, M., Takashi, K., Haoxuan, G., Fuchao, T., and Ohta. K.
2. 発表標題 Characterization of exogenous ribosome-mediated induced somatic cell multipotency
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 太田訓正、菅裕
2. 発表標題 リボソームによる細胞の形質転換
3. 学会等名 第3回再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arif Istiaq and Kunimasa Ohta
2. 発表標題 Cellar dynamics in Exo-ribosome mediated multipotency induction in somatic cells
3. 学会等名 第3回日独合同若手ミーティング
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	嶋村 健児  (Shimamura Kenji)  (70301140)	熊本大学・発生医学研究所・教授   (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
バングラデシュ	Mawlana Bhashani University		