

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660070

研究課題名(和文) 乳酸菌による体細胞の多能性能獲得過程におけるエピゲノム解析

研究課題名(英文) Epigenom analysis of multipotent cells by Lactic Acid Bacteria

研究代表者

河野 利恵 (Kawano, Rie)

大分大学・医学部・病院特任助教

研究者番号：20468002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳酸菌誘導多能性幹細胞は、iPS細胞、ES細胞と同様に3系統(内胚葉、中胚葉、外胚葉)に分化する能力を有している。今回、われわれはヒト線維芽細胞を乳酸菌を用いて多能性幹細胞に誘導する際の遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCR法を用いて解析した。乳酸菌誘導多能性幹細胞は、iPS細胞、ES細胞と比較してNANOG遺伝子の発現を強く誘導する。NANOG遺伝子産物は、細胞の未分化能を維持するために必要である。そのNANOG遺伝子の発現の高さが乳酸菌誘導多能性幹細胞の増殖能の低下を招いている可能性が示唆される。

また、われわれは乳酸菌菌体成分のうち何が未分化能に必要なかについて現在探索中である。

研究成果の概要(英文)：The lactic acid bacterium induced pluripotent stem cell has ability to differentiate to 3 germ layers (endoblast, mesoderm, ectoderm), like iPS cells or ES cell. We analyzed gene expression using the real-time RT-PCR method when we derived a human fibroblast to multipotent stem cells using a lactic acid bacterium. The lactic acid bacterium induced multipotent stem cell strongly induces the expression of NANOG gene in comparison with iPS cells, ES cells. The NANOG gene product is necessary to maintain the undifferentiated ability of the cell. The possibility that high expression of NANOG gene causes a drop of the increase ability of the lactic acid bacterium induced multipotent stem cell is suggested. In addition, we are searching among lactic acid bacterium cell body ingredients now what is necessary for undifferentiated ability.

研究分野：農芸化学

キーワード：乳酸菌 リプログラミング

## 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス機構とは、染色体への後天的な修飾による遺伝子発現の制御機構である。多分化能を有する胚性幹細胞、組織幹細胞、癌幹細胞は、それぞれは固有のエピゲノムを有している。

申請者らのグループは、ヒト皮膚細胞に乳酸菌を取り込ませることにより多能性幹細胞を作製した。乳酸菌を取り込んだヒト線維芽細胞は、多能性マーカーの発現を誘導するだけでなく、位置情報を司る Hox ファミリー遺伝子群の発現を減少させた。これらの事実は、細胞質に入り込んだ乳酸菌が宿主細胞の核内における遺伝子発現を制御できることを意味し、このような現象を申請者のグループが世界で初めて報告した (Ohta ら Plos One 2012)。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクス機構は、細胞における遺伝子を選択的に活性化または不活性化し、細胞の個性を創出する仕組みである。多分化能を持つ幹細胞にも、それぞれに固有のエピゲノムを有している。申請者らは、乳酸菌をヒト皮膚細胞に取り込ませることによりリプログラミングが起こり、取り込んだ細胞が分化多能性を獲得するという事実を発見した (Ohta, et. al., Plos One 2012)。リプログラミングされた細胞では、多能性のマスター遺伝子である NANOG の発現が上昇、からだの前後軸の位置情報を担う Hox 遺伝子群の発現は減少していた。この結果は、乳酸菌が細胞に取り込まれると、細胞の個性がエピジェネティックに消去・確立・維持されることを示している。本申請では、乳酸菌誘導多能性幹細胞と iPS 細胞のリプログラミング機構を比較し、その違いを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 乳酸菌誘導多能性細胞と iPS 細胞の多分化能の比較

申請者らが開発した乳酸菌誘導細胞が、iPS 細胞と同等の様々な細胞への分化能をもつか”を確立されている分化誘導法を用いて確認する。また、乳酸菌誘導細胞と iPS 細胞の分化誘導に伴う遺伝子発現の経時的変化をリアルタイム PCR 法で確認する。

(2) 乳酸菌誘導多能性細胞と iPS 細胞のエピゲノム解析

乳酸菌を取り込んだ宿主細胞の特徴は、iPS 細胞と比較して Nanog 遺伝子の発現が極めて高いことである (Ohta, et. al., Plos One 2012)。乳酸菌によりリプログラミングされたヒト線維芽細胞の Nanog 遺伝子領域を中心に ChIP 解析をおこない、修飾ヒストンや転写因子などクロマチン関連タンパク質のゲノム上局在を解析する。

(3) 乳酸菌菌体成分のどの分画がリプログラミングを引き起こすかの確認

乳酸菌菌体成分をゲルろ過法で分離し、どの分画がリプログラミングをひき起こすかを確認する。

(4) 乳酸菌以外の細菌でもリプログラミングが可能であるかを調べる

乳酸菌と同様の方法を用いて、納豆菌によるリプログラミングが可能であるかを調べる。

## 4. 研究成果

乳酸菌誘導多能性幹細胞は、iPS 細胞、ES 細胞と同様に 3 系統 (内胚葉系、中胚葉系、外胚葉系) への分化能を有している。しかし、増殖能はこれらの細胞ほどではない。

なぜこのような違いが出てくるかに関して、NANOG 遺伝子の発現が iPS 細胞、ES 細胞比較して高いことに由来すると考えられる。

(1) 乳酸菌誘導多能性細胞と iPS 細胞の多

## 分化能の比較

我々は、乳酸菌を用いてヒト線維芽細胞を誘導する際の遺伝子発現の変化に関してリアルタイム PCR 法を用いて経時的に解析した。結果として iPS 細胞、ES 細胞と比較して乳酸菌誘導多能性幹細胞は NANOG 遺伝子の発現の上昇が認められた。また、OCT4、SOX2 の上昇は微量しか確認できなかった。現在、NANOG 遺伝子産物は細胞の未分化能を維持するために必要であると考えられている。また、山中因子に含まれる OCT4 と SOX2 は細胞の増殖を引き起こすのに必要なのではないかと考えられる。

### (2) 乳酸菌誘導多能性細胞と iPS 細胞のエピゲノム解析

乳酸菌によりリプログラミングされたヒト線維芽細胞の Nanog 遺伝子領域を中心に ChIP 解析をおこない、修飾ヒストンや転写因子などクロマチン関連タンパク質のゲノム上局在を解析することを試みた。この点に関しては今後の課題である。

### (3) 多能性能を引き起こす乳酸菌成分の同定

乳酸菌成分をゲルろ過で分離しどの分画が多能性能を引き起こすかを確認した。リプログラミングには乳酸菌成分のうちの一部で十分であることを確認した。

### (4) 乳酸菌以外の細菌を用いたリプログラミング

納豆菌が乳酸菌と同様のリプログラミング活性を持つことを確認した。

## 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)

河野 利恵ら 納豆菌によるヒト線維芽細胞のリプログラミング機構

平成 25 年度タカノ農芸化学助成財団 研究報告書(査読なし)第 20 巻 2014 年 p9-14

[学会発表](計 2 件)

1. Naofumi Ito, Rie Kawano and Kunimasa Ohta  
Human fibroblast reprogramming by Lactic Acid Bacteria  
熊本大学 生物化学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」2014 年 9 月 4 日 熊本市医師会館(熊本県熊本市)
2. 伊藤 尚文、河野 利恵、太田 訓正：  
乳酸菌によるヒト線維芽細胞の初期化  
日本発生学会、2014 年 5 月 28 日、WINC 愛知(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  
特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 利恵(KAWANO Rie )  
大分大学・医学部・病院特任助教  
研究者番号：20468002

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者 太田 訓正 ( OHTA Kunimasa )

熊本大学・生命科学研究部神経分化学講座・准

教授

研究者番号 (90244128)

伊藤 尚文 (NAOFUMI Ito)

熊本大学・生命科学研究部神経分化学講座・博士  
研究員

(4)研究協力者

F.Abdulhaleem

飯森 美穂子 (MIHOKO Imori)