

乳酸菌由来物質による癌細胞リプログラミング機構

熊本大学大学院 生命科学研究部 神経分化学分野

太田 訓正

1.

はじめに

わたしたちの生物社会は大きく真核生物、真正細菌、古細菌に分類され、「**原核生物である古細菌に、同じく原核生物である真正細菌が入り、やがて核を持った真核生物へと進化した**」という説が提唱されている。真正細菌は、「**バクテリア**」のなかまだと考えられており、ヨーグルトなどの生成に欠かせない乳酸菌などが含まれる。乳酸菌とは、糖を分解して乳酸を生成する細菌類の総称であり、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）の一つであり、「**現代医療のトップランナー**」と言われるほど未知なる可能性を持っている。また、一般的な腸内細菌を無菌マウスの腸に過剰投与すると、腸の重要な機能（栄養吸収、粘膜防御など）に関わる様々な遺伝子の発現が変化することから、腸内フローラ内における腸内細菌が、宿主細胞の遺伝子発現に影響を与える可能性が示されている（Hooper et al., Science 2001）。本研究は、「**乳酸菌のような善玉菌を細胞に取り込ませると、宿主細胞に何らかの変化をもたらすはずである**」というアイデアからスタートした。

背景

申請者のグループは、世界で初めて細胞にバクテリアを取り込ませ、リプログラミングを誘導させたが（Ohta et al., PLOS ONE 2012）、このアイデアは全く新規で独創的なものである（特許：特願 2011-152479、PCT/JP2012/067544、特願 2013-82797、特願 2014-98213）。最近、「ヒト成人由来のシュワン細胞は、ライ菌（グラム陽性）に感染すると多能性を獲得する」という論文（Masaki et al., Cell 2013）が発表されたことから、バクテリアが宿主細胞に感染し、宿主細胞にエピジェネティックな影響を与える可能性が認識されている。本研究では、1970年にマーギュリスが提唱した細胞内共生説（嫌気性真核生物が好気性細菌を飲み込むことにより共生し、現在の真核細胞へと進化した）を実験的に検証することで、「**細菌を飲み込むことにより細胞内にミトコンドリアや葉緑体といった独自にエネルギーを生み出す小器官をもつ真核細胞の起源の解明**」が期待できる。

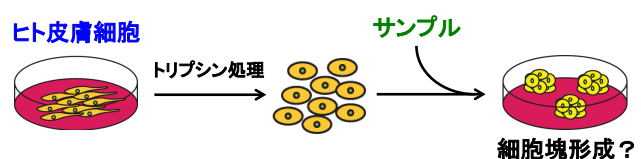
また、乳酸菌は、私たちが積極的に摂取している安全な善玉菌であり、乳酸菌を用いた多能性細胞の製造方法は人工的な遺伝子の導入操作を全く必要とせず、倫理的問題や腫瘍化の恐れを考慮する必要はない。この製造方法は、**医療分野**（創薬研究、並びに医薬品の安全性、有効性及び副作用の試験）、**疾患研究**（難病の原因解明、治療法や予防法の開発）、**再生医療**（神経、血管、臓器の機能修復）において有用である。乳酸菌由来のリプログラミング物質Xを同定できれば、再生医療並びにがん治療の可能性を更に高めることが期待できる。

目的

本研究では、1) 乳酸菌由来のリプログラミング誘導物質Xの同定。2) 癌細胞に乳酸菌を取り込ませ、リプログラミング過程におけるエピジェネティック機構を理解し、新たな癌細胞治療方法の基盤確立を目指す。

2. 方法

①乳酸菌を超音波処理した後、硫酸沈殿後のある分画をイオン交換カラムにとおし、細胞塊形成を指標にして活性があるフラクションを調べる。私たちが独自に確立した実験方法は、右図に示すようにとても簡便な方法であり、細胞塊形成活性の判定を容易に判定できる。



最終的に、活性があるフラクションを質量分析法で解析し、候補物質の中から細胞塊形成能を指標にして、リプログラミング物質 X を同定する。

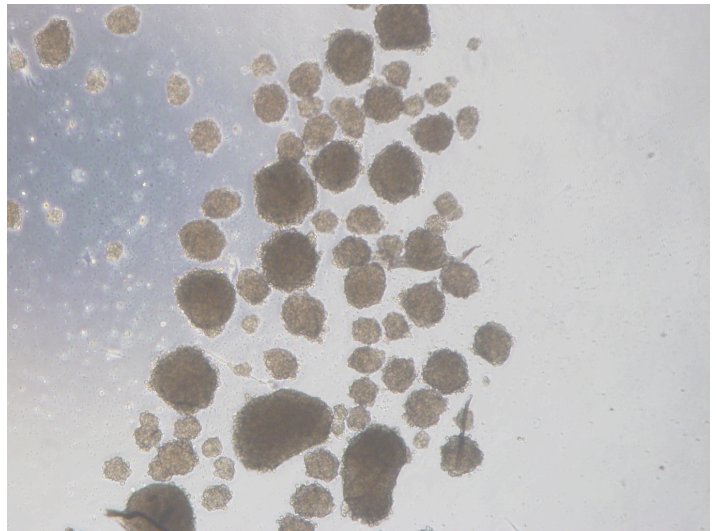
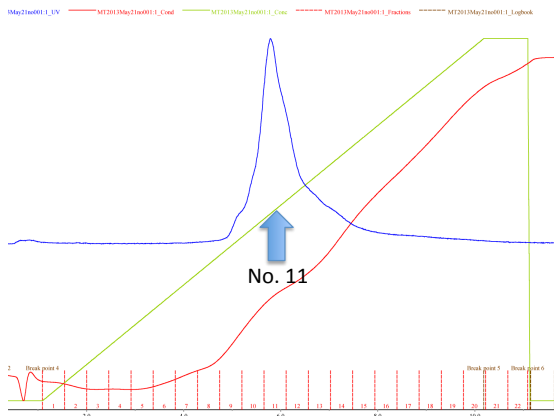
②また、乳酸菌由来粗精製物質をヒト癌細胞に取り込ませ、その影響を調べた。実験方法は①と同様で、5種類のヒト癌細胞を用いて細胞塊形成能を調べた。

3. 結果 研究成果

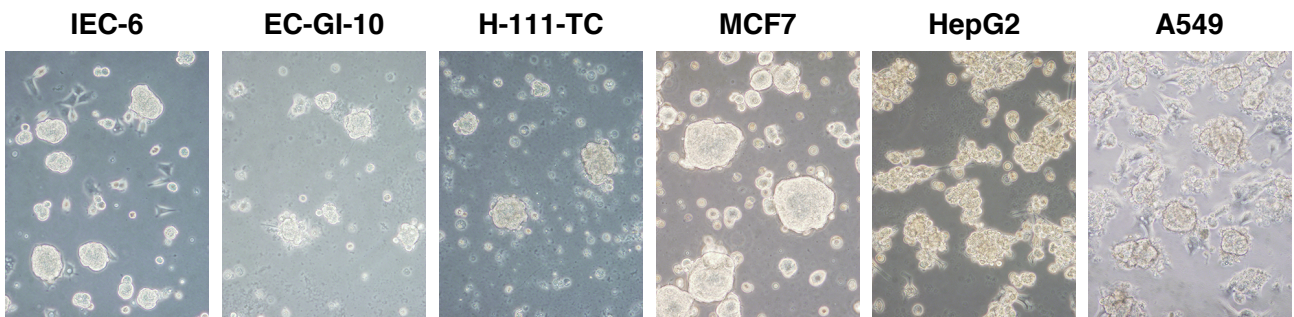
①硫酸沈殿後のある分画を、最初のイオン交換カラムにとおして細胞塊形成能を調べた。細胞塊形成活性が観察されたフラクションをピックアップし、次のゲルろ過交換カラムにとおして、細胞塊形成活性があるピークを見出した。さらに、このピークを別のイオン交換カラムにとおすと、シングルピーク(No. 11)に細胞塊形成能が存在することを見出した(下左図、未発表データ)。

シングルピーク(No. 11)を SDS-PAGE にかき、クマシー染色し、染まったバンドを切り出した。切り出したサンプルは、熊本大学薬学部にあるタンパク質解析共通施設で解析していただいた。得られた結果から、リプログラミング候補物質と考えられる X を産生し、細胞塊形成能の有無を調べたところ、下右図に示すように細胞塊形成が観察された(未発表データ)。

陰イオン交換クロマトグラフィー



②乳酸菌由来粗精製物質を細胞に取り込ませ、その影響を調べた。正常細胞としてラット小腸細胞(IEC-6)、5種類のがん細胞株[食道がん(EC-GI-10)、胃がん(H-111-TC)、乳がん(MCF7)、肝がん(HepG2)、肺がん(A549)]を用いて細胞塊形成実験を行ったところ、小腸細胞と5つのがん細胞すべてが細胞塊を形成し、ある程度の大きさ(直径、100-200 μm)になると増殖が停止した(下図、未発表データ)。



4. 考察 まとめ

私たちは乳酸菌由来のリプログラミング物質 X の同定に一步近づけたと考える。このリプログラミング物質 X の特性を分子レベルで明らかにすることにより、発生・細胞生物学における新しい原理の発展に結びつく可能性がある。例えば、約20億年前に古細菌と真正細菌の共生関係を経て誕生した真核細胞が、ミトコンドリアやクロロプラストを獲得した細胞内共生説と同様に、リプログラミング物質 X による細胞リプログラミングが低頻度ながらも進化の潮流になっている可能性がある。つまり、真核細胞は絶えず様々な細菌の感染に晒され、そのリプログラミング物質 X を細胞質や核内に取り込むことにより、細胞をリプログラミングしてより良い性質を有する細胞を進化させてきたのかもしれない。本申請により、リプログラミング物質 X の新たな機能的な一面を解き明かせれば、発生・進化学に大きなインパクトを与えられると確信している。

また、興味深いことに一度形成された細胞塊は細胞塊のまま1ヶ月ほど培養でき、決して増殖をすることはない。もともとリプログラミング物質Xは、私たちが食する乳酸菌由来物質であり、人工的な遺伝子の導入操作は全く必要としないことから、癌化の可能性は正常状態とほとんど差がないと言える。化学療法は、外科的療法、放射線療法とともに、現在がんの治療の三本柱とされているもののひとつであるが、抗がん剤の投与によって引き起こされる吐き気や脱毛などの副作用がどうしても避けられない。近年、抗がん剤を内包した高分子ミセルを用いて生体内での抗がん活性の著しい増進が確認され、癌組織への選択性の高い集積が観察されていることから、リプログラミング物質Xを内包した高分子ミセルを投与することにより、副作用の無い固形癌へのドラッグデリバリーシステムが開発できる。リプログラミング物質Xを抗がん剤として用いている技術は他にはない。癌細胞を殺すことはできなくとも、細胞増殖を抑制し、癌細胞をリプログラミングすることにより安全・安心な抗がん剤の開発基盤を形成できると考える。

ES細胞やiPS細胞は将来の再生医療に向けた有望なツールであるが、ES細胞は倫理上の問題、iPS細胞は癌化への不安を完全には拭いきれていない。体細胞にリプログラミング物質Xを取り込ますことにより作製された多能性細胞には、これらの問題を考慮する必要はなく、再生治療にも応用することができる。最終的に、リプログラム物質Xの分子特性を明らかにし、その作用機序を解明できれば、安全に増殖する細胞株にリプログラム物質Xを作用させ、安全・安心な多能性細胞を製造し、将来の細胞移植に用いることができるかもしれない。

5. 発表論文

太田訓正「乳酸菌による多能性細胞の創造」日本乳酸菌学会誌 25, 13-17 (2014)

Ito, N. and Ohta, K. Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Develop. Growth Differ.*, 57, 305-312 (2015)

参考文献

Hopper L.V. et al., Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291, 881-884 (2001)

Kondrashov, N. et al., Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383-397 (2011)

Masaki, T. et al., Reprogramming adult schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell* 152, 51-67 (2013)

特許

1. 出願番号：特願2014-98213

発明者：太田訓正、

発明の名称：細胞の再プログラミング誘導法、および多能性細胞の製造方法

出願日：平成26年5月11日

2. 出願番号：特願2015-223656

発明者：太田訓正、伊藤尚文

発明の名称：細胞の再プログラミング誘導する物質、及び該組成物を用いた多能性細胞の製造方法

出願日：平成27年11月16日