

乳酸菌オリゴ DNA による幹細胞の運命制御

創薬シーズとしての細菌ゲノム由来 DNA

Regulation of Stem Cell Fate by Oligodeoxynucleotides from Lactic Acid

Bacteria

Bacterial Genome-Derived DNA as Drug Seeds

オリゴ DNA による細胞の運命制御

高谷智英

Tomohide TAKAYA

信州大学農学部

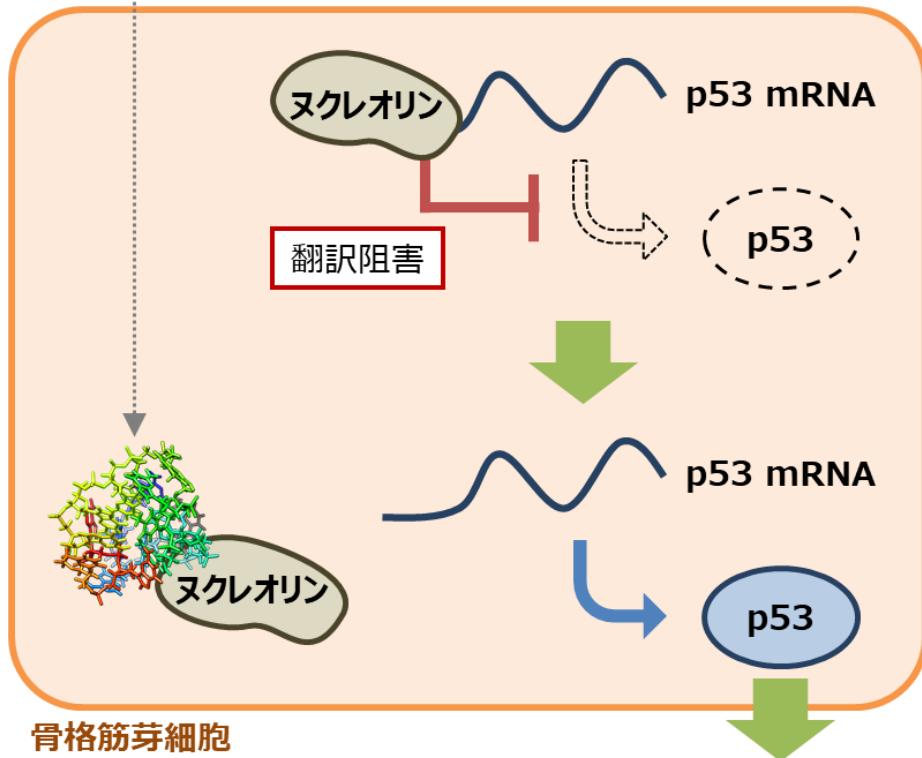
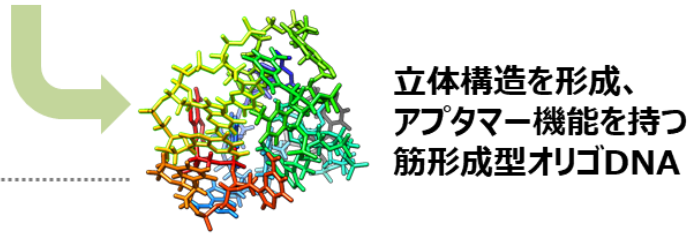
【要旨】

細菌ゲノム由来のオリゴ DNA は TLR リガンドとして免疫応答を調節するが、一部のオリゴ DNA は幹細胞の分化にも影響することがわかってきた。核酸医薬のシーズとして期待される新しいタイプのオリゴ DNA について紹介する。

Bacterial genome-derived oligodeoxynucleotides regulate not only immune responses but also stem cell differentiation. These type of oligonucleotides can be seeds for novel nucleic acid drugs.

【キーワード】

1. オリゴ DNA
2. 筋形成型オリゴ DNA (myoDN)
3. アプタマー
4. 細胞分化
5. ロコモティブ症候群



骨格筋分化の促進

1 【序文】

2 微生物ゲノム由来のオリゴ DNA は、病原体関連分子として宿主細胞の自然免
3 疫系を調節することが知られてきた。他方、一部のオリゴ DNA は非免疫細胞
4 の分化にも影響することが散発的に報告されてきたが、その生理学的意義は不
5 明であった。筆者は最近、乳酸菌ゲノム配列に由来するオリゴ DNA が、骨格
6 筋の前駆細胞である筋芽細胞の分化を著明に亢進することを報告した。この筋
7 形成型オリゴ DNA は、加齢や疾患が誘発する筋萎縮の治療に有用な、新たな
8 核酸医薬品のシーズとして期待される。本解説では、筋形成型オリゴ DNA の
9 の研究を例に、微生物由来オリゴ DNA による細胞の運命制御について紹介す
10 る。

11

12 【はじめに】

13 宿主に感染した病原菌やウイルス、宿主と共生する腸内細菌、あるいは摂取
14 した食物が含有する微生物などが体内で死滅し、分解されると、彼らのゲノム
15 から数塩基から数十塩基の一本鎖オリゴ核酸が生成される。中でも、非メチル
16 化 CpG モチーフを有するオリゴ DNA は、細菌やウイルスのゲノムに遍在する
17 ことから、重要な病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular
18 patterns; PAMPs) として免疫系細胞の Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR)
19 9 に認識される。CpG オリゴ DNA を受容した TLR9 は、自然免疫系を活性化
20 し、炎症応答を誘導する。この性質を利用し、人工的に合成した CpG オリゴ

21 DNA をワクチンアジュバント（免疫賦活剤）に応用する研究も進んでいる⁽¹⁾.
22 一方、テロメア配列（TTAGGG）を持つオリゴ DNA は、TLR3, TLR7, TLR9
23 依存的に免疫反応を抑制する. このような免疫抑制型オリゴ DNA は、アレル
24 ギーや自己免疫疾患に対する治療薬の候補として期待されている⁽²⁾.

25 興味深いことに、一部のオリゴ DNA は非免疫細胞の分化に影響することが
26 散発的に報告されている. 例えば、CpG-1826 は TLR9 依存的に破骨細胞の分
27 化を抑制し⁽³⁾, CpG-2006 は TLR9 非依存的に間葉系幹細胞から骨芽細胞への
28 分化を阻害する⁽⁴⁾. CpG オリゴ DNA 以外では、ヒトミトコンドリアゲノム由
29 来のシトシンに富む配列 MT01 が、骨芽細胞の分化を促進するという研究があ
30 る⁽⁵⁾. しかし、これら非免疫型オリゴ DNA の直接の標的や詳細な作用機序、
31 そして生理学的意義については不明な点が多い. オリゴ DNA によって幹細胞
32 や前駆細胞の運命を制御できれば、新たな核酸医薬シーズの提案につながると
33 考えられるが、実現には乗り越えるべき課題が多い. そこで筆者は、新たな非
34 免疫型オリゴ DNA の同定と、その作用機序の解明、および基盤技術の確立を
35 目標に研究を開始した.

36

37 【ロコモティブ症候群と核酸医薬】

38 超高齢社会では、筋萎縮や骨粗鬆症などの複合的な要因による運動機能の低
39 下、すなわちロコモティブ症候群が急増している. 日本では、要支援・要介護
40 となる理由の第一位が運動器障害であり、健康寿命を阻害する大きな要因とな

41 っている。人体最大の組織である骨格筋は、多核の巨大細胞である筋線維が多
42 数集合した組織である。筋線維と基底膜の間には、衛星細胞（サテライト細胞）
43 と呼ばれる体性幹細胞が存在する。筋形成や筋再生の初期過程で、休止中の衛
44 星細胞は、筋芽細胞と呼ばれる前駆細胞に活性化する。筋芽細胞は分裂して増
45 殖した後、収縮性の筋細胞へと分化して筋組織を構築する⁽⁶⁾。このため、加齢
46 や疾患による筋芽細胞の分化能の減弱は、筋萎縮の遠因の一つと考えられてい
47 る。筋分化を促進する分子として、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やトリテ
48 ルペン酸が知られるが、非特異的な作用や短い半減期など、臨床応用には不利
49 な性質が指摘される。

50 オリゴ DNA は、安価で大量に合成可能な安定した分子である。また、ヌク
51 レオチドの塩基、リン酸、糖の各部を化学修飾したり置換することで、ヌクレ
52 アーゼ耐性、標的結合能、体内毒性などの性質を改善することができる。オリ
53 ゴ DNA を含む核酸分子は、抗体医薬品に続く次世代新薬のシーズとして大き
54 な期待が寄せられている⁽⁷⁾。筋芽細胞に直接作用し、筋分化を促進するオリゴ
55 DNA を開発できれば、筋萎縮の予防・治療に効果のある核酸医薬品の開発に
56 結び付くと考えられる。

57

58 【筋形成型オリゴ DNA の発見】

59 筆者は、共同研究者である下里剛士博士（信州大学農学部）から提供された
60 オリゴ DNA ライブラリを用い、筋分化を誘導する配列をスクリーニングした。

61 このライブラリは、乳製品にも用いられる乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG
62 のゲノム配列から設計された 18 塩基のオリゴ DNA 群からなる。元々、免疫型
63 オリゴ DNA の探索を目的に設計されたライブラリであるため、CpG モチーフ
64 やテロメア配列を含むオリゴ DNA が多いことが特徴である。これら乳酸菌オ
65 リゴ DNA を、初代培養したマウス筋芽細胞に投与し、骨格筋の最終分化マー
66 カーであるミオシン重鎖の発現を指標に筋分化促進活性を評価した。その結果、
67 テロメア配列を有する一連のオリゴ DNA 群 (iSN01~iSN07) が著しく筋分
68 化を誘導すること明らかになった (図 1)。筋分化を促進するオリゴ DNA は
69 過去に報告がなく、筆者はこの新奇配列群を筋形成型オリゴ DNA (myogenetic
70 oligodeoxynucleotide; myoDN) と命名した⁽⁸⁾。そのメカニズムを解明すべく、
71 同定された筋形成型オリゴ DNA のうち、活性が最も高い iSN04 について詳細
72 に解析した。

73 オリゴ核酸の作用機序は大別して 3 種類ある。1 つは、PAMPs として TLR
74 に受容され、免疫応答シグナルを調節するもので、CpG オリゴ DNA やテロメ
75 ア型オリゴ DNA が含まれる。iSN04 はテロメア反復配列 (TTAGGG TGAGGG)
76 を有するため、その筋分化促進活性と TLR シグナルの関係性を検討した。ヒ
77 ト筋芽細胞は全ての TLR 遺伝子 (*TLR1*~*TLR10*) を発現するが、RNA シー
78 ケンスの結果、iSN04 投与によって TLR シグナル経路に含まれる遺伝子群の
79 発現は変動しないことがわかった。また、既知の CpG オリゴ DNA やテロメア
80 型オリゴ DNA は、単体では筋分化に影響せず、iSN04 による筋分化促進作用

81 も阻害しなかった。以上の結果は、iSN04 の筋分化促進活性は TLR 非依存的
82 である，すなわち iSN04 が PAMPs ではないことを示す。

83 オリゴ核酸の機能の 2 つ目は，アンチセンス核酸としての作用である。この
84 タイプの配列は，ゲノム DNA，mRNA，マイクロ RNA などと相補的に結合し
85 て，遺伝子の発現や転写，スプライシング，タンパク質への翻訳を調節する。
86 iSN04 は，ヒト，マウス，ニワトリのいずれの種においても筋分化を促進した
87 ことから，アンチセンス核酸として機能するのであれば，これらの種間の相同
88 遺伝子座に iSN04 類似配列が保存されていると考えられた。しかし，BLAST
89 検索では各種間のゲノムに共通する配列や遺伝子座を見出せなかった。さらに，
90 アンチセンス核酸は熱変性による直鎖化によって活性の向上が期待されるが，
91 筋形成型オリゴ DNA の一部は熱変性によって筋分化促進作用を失った。この
92 事実は，iSN04 の活性は塩基配列ではなく立体構造に依存していることを強く
93 示唆する。

94 オリゴ核酸の 3 つ目のタイプは，構造依存的に標的分子（主にタンパク質）
95 と直接結合するアプタマーである。核酸医薬品としてのアプタマーは，ランダ
96 ムな配列群の中から，あらかじめ設定した標的分子に結合する配列を選別・濃
97 縮していく SELEX (systematic evolution of ligands by exponential
98 enrichment) 法によって開発されることが多い。一方，自然界では，一部の
99 mRNA がアプタマーとして低分子と結合し，リボスイッチとして働くことが知
100 られている。iSN04 の活性は立体構造依存的であったため，アプタマーとして

101 機能しているのではないかと考えられた。

102

103 【筋形成型オリゴ DNA の作用機序】

104 共同研究者の梅澤公二博士（信州大学農学部）による分子シミュレーション
105 の結果、iSN04 は平均半径約 1 nm のコンパクトな球状構造を形成することが
106 わかった（図 2）。特に、テロメア反復配列後半の 3 連グアニン塩基が互いに
107 近接し、スタックして分子全体の構造を安定化していることが示唆された。こ
108 のグアニン塩基群を 1 つずつ削除していくと、それに伴って筋分化促進作用が
109 低減したことから、このグアニンスタックが iSN04 の活性中心であることは明
110 らかである。テロメア配列のようにグアニンに富む配列は、グアニンカルテッ
111 ト（G-quartet）と呼ばれる平面構造を形成し、さらにそれらが重合したグア
112 ニン四重鎖（G-quadruplex）という高次構造を取ることがある。ゲノム上で形
113 成されたグアニン高次構造に転写複合体が結合することで、遺伝子の発現が制
114 御されることも知られている⁽⁹⁾。iSN04 も、自身のグアニンスタックを介して
115 タンパク質と複合体を形成し、筋分化を促進していることが推測された。

116 iSN04 を固定したビーズで細胞内の可溶性タンパク質を沈降した結果、
117 iSN04 結合タンパク質としてヌクレオリンが単離された。ヌクレオリンは RNA
118 結合ドメインを有する多機能なリン酸化タンパク質で、核小体、核質、細胞質、
119 細胞膜などに局在し、それぞれの場所において、転写、翻訳、細胞周期、アポ
120 トーシスなどの多様な細胞内プロセスに関与している⁽¹⁰⁾。がん細胞での研究が

121 特に進んでおり、ヌクレオリンの阻害は細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘
122 導することが報告されている。一方、筋芽細胞を含む幹細胞や前駆細胞におけ
123 るヌクレオリンに関する研究はほとんどなく、細胞分化におけるヌクレオリン
124 の役割は不明な点が多い。筆者は、ヌクレオリンが p53 mRNA の 5'側非翻訳
125 領域と結合し、p53 タンパク質への翻訳を阻害するという報告に着目した⁽¹¹⁾。
126 筋芽細胞において p53 は、骨格筋のマスター転写因子 MyoD と協同して遺伝子
127 発現を調節し、筋分化を誘導する。iSN04 を筋芽細胞に投与すると、p53 mRNA
128 の転写量が減少するにも関わらず、p53 のタンパク質量は増加することがわか
129 った。また、RNA シーケンスのデータから、iSN04 が実際に p53 シグナル経
130 路を活性化することも確認された。これらの結果から、iSN04 は p53 mRNA
131 と競合的にヌクレオリンと結合することで、ヌクレオリンによる p53 の翻訳阻
132 害を解除し、p53 タンパク質の増加に伴う下流シグナルの活性化によって筋分
133 化を促進することが明らかになった（図 3）。

134

135 【筋形成型オリゴ DNA の応用展開】

136 筋芽細胞の分化を促進する iSN04 は、筋萎縮の予防や治療に効果のある核酸
137 医薬のシーズとして期待される。骨格筋の萎縮は、加齢のみならず様々な疾患
138 で併発し、死亡率に関わる危険因子として知られる。肥満と筋萎縮の合併はサ
139 ルコペニア肥満といわれ、特に糖尿病患者における筋量の減少は死亡率と相関
140 する。また、日本人の死因の 1 位を占めるがんでは、進行性がん患者の数十%

141 がカヘキシー（がん悪液質）と呼ばれる脂肪・筋肉組織の消耗を呈する。筋量
142 の低下はがんによる死亡率と相関し、カヘキシーはがん死因の約 20%を占める
143 ともいわれている。

144 筆者は現在、これら疾患性の筋萎縮に対する iSN04 の作用についても研究を
145 進めている。糖尿病患者の筋芽細胞は分化能の低下を呈することが複数報告さ
146 れているが、iSN04 は I 型および II 型糖尿病患者の筋芽細胞の分化を改善する
147 ことがわかってきた（投稿中）。また、がん細胞培養上清への曝露は筋芽細胞
148 の分化を悪化させることから、がん細胞の分泌物中に筋分化抑制因子が存在す
149 ると考えられている⁽¹²⁾。iSN04 は、がん細胞分泌物による筋分化の悪化を回復
150 したことから、いまだ有効な対策がないカヘキシーに新たな治療戦略を提案で
151 きると考えている。糖尿病やがんに加え、心不全や慢性腎疾患でも骨格筋の萎
152 縮は予後の危険因子である。今後、これらの疾患が合併する筋萎縮に対しても
153 iSN04 が効果を発揮するか、検証を進めていきたい。

154 また、筋形成型オリゴ DNA の塩基配列も改良が進んでいる。一般的に、数
155 十塩基程度のオリゴ DNA は、配列に関わらずエンドサイトーシスによって細
156 胞膜を通過し、エンドソームを介して細胞質に移行する。iSN04 も、投与 2 時
157 間以内に細胞内に到達することを確認している。しかし、エンドソーム膜を通
158 過するオリゴ DNA は全体の一部であり、薬効の増強には分子量の低減が効果
159 的であると考えられている。筆者は、iSN04 の構造解析で明らかになった活性
160 コアを中心に、同様の構造を形成すると推測される、より短い筋形成型オリゴ

161 DNA の設計に取り組んでいる．現在までに，18 塩基の iSN04 と同様の筋分化
162 促進作用を示す，14 塩基および 12 塩基の配列の開発に成功している．塩基配
163 列の短縮は，合成コストの低減，吸収率の増加，および分子の安定化につな
164 ると期待される．

165

166 【乳酸菌オリゴ DNA の可能性】

167 筋形成型オリゴ DNA の研究から，微生物ゲノム由来のオリゴ DNA が，ア
168 プタマーとして幹細胞の分化を制御し得ることが明らかになった．冒頭で紹介
169 したように，直接の標的は不明なものの，破骨細胞や骨芽細胞の分化に影響す
170 るオリゴ DNA の報告例もある^(3,4)．筆者は最近，筋形成型オリゴ DNA のスク
171 リーニングに用いたライブラリから，骨芽細胞の分化を促進し，破骨細胞の分
172 化を抑制する骨形成型オリゴ DNA (osteogenetic oligodeoxynucleotide;
173 osteoDN) を見出した (特許出願中)．骨組織は，骨芽細胞が分化した骨細胞
174 による骨形成と，破骨細胞による骨吸収のバランスによって恒常性が維持され
175 る．ロコモティブ症候群の三大疾患の一つである骨粗鬆症では，骨形成と骨吸
176 収の均衡が崩れ，骨密度や骨量が減少する．骨形成型オリゴ DNA によって骨
177 リモデリングを制御できれば，骨粗鬆症に対する治療薬の開発につながると期
178 待される．骨形成型オリゴ DNA の作用機序は研究中だが，筋形成型オリゴ
179 DNA と同様に，アプタマーとして機能していることが予測される．

180 高々 50 種類の乳酸菌オリゴ DNA ライブラリから，筋形成型オリゴ DNA や

181 骨形成型オリゴ DNA が次々と見つかったのは，単なる偶然や幸運によるもの
182 であろうか．ゲノム DNA や転写された RNA は，それら単体で機能すること
183 はない．ゲノム DNA には，転写複合体，クロマチンタンパク質，塩基の修飾
184 酵素，さらには開裂・複製・修復・切断に関する様々なタンパク質が結合する．
185 RNA のスプライシング，ポリアデニル化，輸送，そして翻訳には多彩な RNA
186 結合タンパク質が働き，その数はヒト全遺伝子の約 7.5%にも及ぶ⁽¹³⁾．つまり，
187 ランダムな塩基配列と比べ，ゲノム配列は何らかのタンパク質と相互作用する
188 可能性が格段に高く，特に核酸結合タンパク質に対するアプタマーの探索には
189 非常に有望なソースになるといえよう．

190 乳酸菌をはじめとする共生細菌は，ヒトの腸管内に 100～1000 兆個が生息し
191 ており，彼らの遺伝子総数は数百万個に及ぶともいわれる．また，ヒトは多種
192 多様な動物，植物，菌類を摂食するが，食事を介して 1 日あたり 1～2 g のヌク
193 レオチドを摂取しているという．ヒトの体内には由来も配列も異なる膨大な核
194 酸が存在しており，その大半はヌクレアーゼによって分解されると考えられる
195 が，中には，母乳を介して母体から乳児に移行するマイクロ RNA といった例
196 も報告されている⁽¹⁴⁾．他種ゲノム由来のオリゴ核酸には，いまだ機能や役割が
197 明らかにされていない配列が，恐らくは我々が想像する以上に多数存在してお
198 り，本稿で紹介した筋形成型オリゴ DNA は，そのほんの一例ではないかと思
199 われる．

201 【謝辞】

202 本解説の研究は，研究室の学生諸氏，梅澤公二博士，下里剛士博士の協力，
203 ならびに日本農芸化学会第 15 回農芸化学研究企画賞の支援を得て行われまし
204 た．この場をお借りして深く感謝申し上げます．

205

1 【文献】

- 2 1) J. Vollmer & A. M. Krieg: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 195 (2009).
- 3 2) C. Sackesen, W. van de Veen, M. Akdis, O. Soyer, J. Zumkehr, B. Ruckert, B. Stanic,
4 O. Kalayci, S. S. Alkan, I. Gursel, *et al.*: *Allergy*, **68**, 593 (2013).
- 5 3) J. H. Chang, E. J. Chang, H. H. Kim & S. K. Kim: *Biochem. Biophys. Res.*
6 *Commun.*, **389**, 28 (2009).
- 7 4) N. Norgaard, T. Holien, S. Jonsson, H. Hella, T. Espevik, A. Sundan & T. Standal:
8 *J. Immunol.*, **185**, 3131 (2010).
- 9 5) Z. Feng, Y. Shen, L. Wang, L. Cheng, J. Wang, Q. Li, W. Shi & X. Sun: *Int. J. Mol.*
10 *Sci.*, **12**, 2543 (2011).
- 11 6) N. A. Dumont, C. F. Bentzinger, M. C. Sincennes & M. A. Rudnicki: *Compr.*
12 *Physiol.*, **5**, 1027 (2015).
- 13 7) 井上貴雄 : *Drug Delivery System*, **31**, 10 (2016).
- 14 8) S. Shinji, K. Umezawa, Y. Nihashi, S. Nakamura, T. Shimosato & T. Takaya: *Front.*
15 *Cell Dev. Biol.*, **8**, 616706 (2021).
- 16 9) T. M. Ou, Y. J. Lu, J. H. Tan, Z. Z. Huang, K. Y. Wong & L. Q. Gu: *ChemMedChem*,
17 **3**, 690 (2008).
- 18 10) W. Jia, Z. Yao, J. Zhao, Q. Guan & L. Gao: *Life Sci.*, **186**, 1 (2017).
- 19 11) M. Takagi, M. J. Absalon, K. G. McLure & M. B. Kastan: *Cell*, **123**, 49 (2005).
- 20 12) F. Marchildon, E. Lamarche, N. Lala-Tabbert, C. St-Louis & N. Wiper-Bergeron:

1 *PLoS One*, **10**, e0145583 (2015).

2 13) S. Gerstberger, M. Hafner & T. Tuschl: *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 829 (2014).

3 14) B. J. Stephen, N. Pareek, M. Saeed, M. A. Kausar, S. Rahman & M. Datta: *Front.*

4 *Immunol.*, **11**, 404 (2020).

5

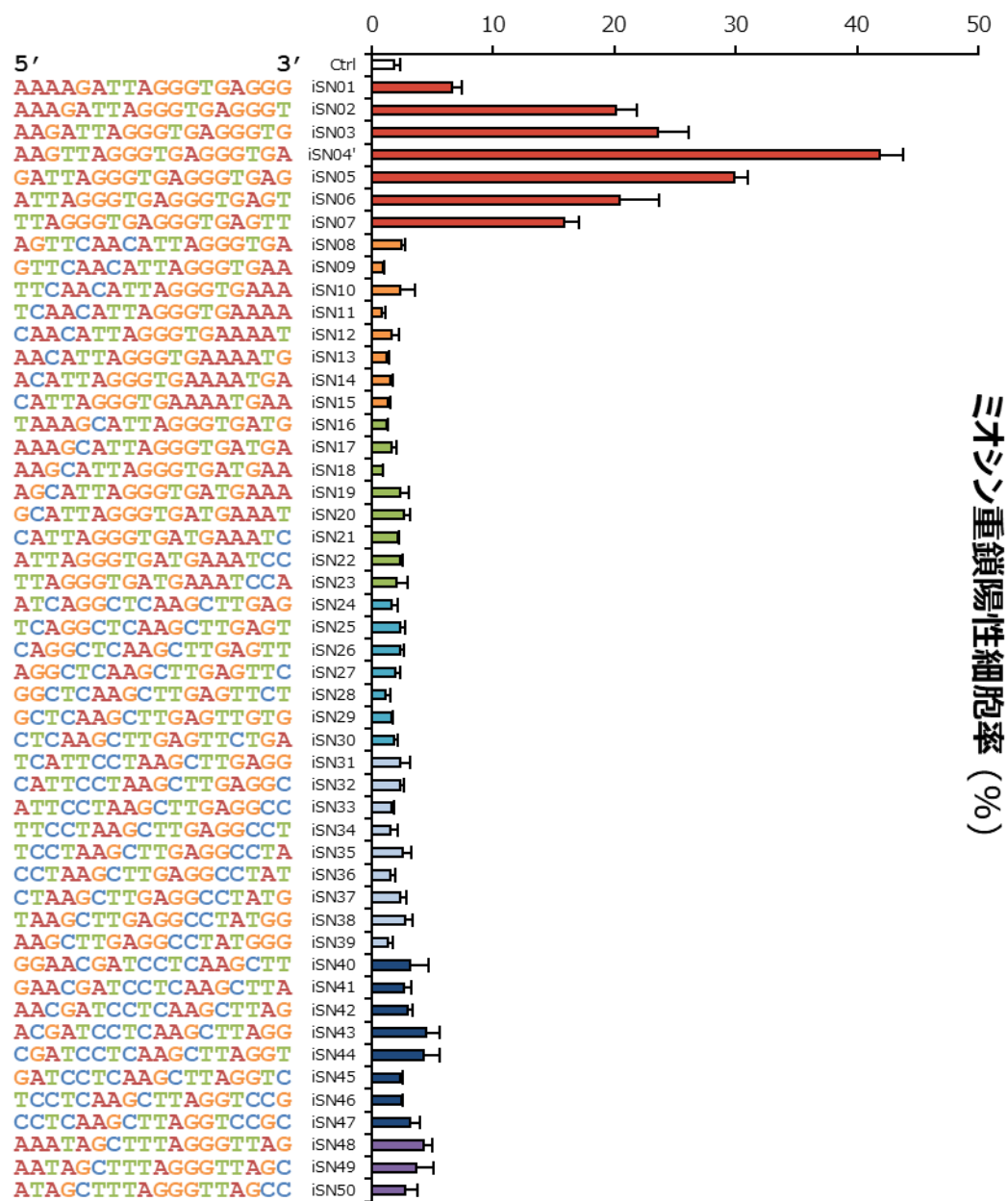
1 【コラム】

2 「オリゴ」(oligo) は「少数の」という意味の接頭辞で、ライフサイエンスの分
3 野では、数個から数十個の連なりからなる分子を指します。この解説で登場す
4 るオリゴ DNA は 18 塩基ですが、ヒトゲノムの全長 30 億塩基や、遺伝子の平
5 均長 3 万塩基と比べれば、随分と短いことがわかります。生物を構成する高分
6 子の多くは、単純な構造が多数連結したポリマー(重合体)です。「ポリ」(poly)
7 は「多くの」を意味します。ヌクレオチドがリン酸ジエステル結合で連結され
8 た核酸はポリヌクレオチド(～数億)、アミノ酸がペプチド結合でつながったタ
9 ンパク質はポリペプチド(～数千)、単糖がグリコシド結合で重合した多糖はポ
10 リサッカライド(～数万)といえます。これらの巨大分子が体内で分解・切断
11 されたり、あるいは類似の分子を人工的に合成してできた短い断片が、オリゴ
12 核酸やオリゴペプチド、オリゴ糖です。オリゴ分子は、さらに巨大な分子を作
13 る材料になったり、元になったポリマーの機能の一部を模倣したり、場合によ
14 っては、ポリマーとは全く異なる性質を発揮します。この解説で紹介したオリ
15 ゴ DNA は、元々は乳酸菌の遺伝子の一部でしたが、遺伝情報は完全に失われ
16 ており、その代わりに特徴的な立体構造を形成することで新たな機能を獲得し
17 ました。

18 短いオリゴ分子ですが、その可能性は広大です。DNA の塩基には、アデニ
19 ン、チミン、グアニン、シトシンの 4 種類があります。これらが 10 個つな
20 ったオリゴ DNA の存在し得るパターンは 4 の 10 乗、すなわち 1,048,576 種類

1 になります。ペプチドを構成するアミノ酸は 20 種類ですから、10 残基のオリ
2 ゴペプチドの種類は 20 の 10 乗で、10,000,000,000,000 (10 兆) 以上に及びま
3 す。オリゴ分子は、単純な構造の繰り返しによって比較的簡単に合成でき、し
4 かも無数のパターンを生み出せるため、医薬品やサプリメントの素材として注
5 目されているのです。

6



ミオシン重鎖陽性細胞率 (%)

図 1・筋形成型オリゴ DNA の筋分化促進作用

50 種類の乳酸菌オリゴ DNA をマウス筋芽細胞に投与し、ミオシン重鎖陽性細胞への分化を評価した。結果、テロメア反復配列 (TTAGGG TGAGGG) を持つ iSN01~iSN07 に強い筋分化促進作用を見出した。

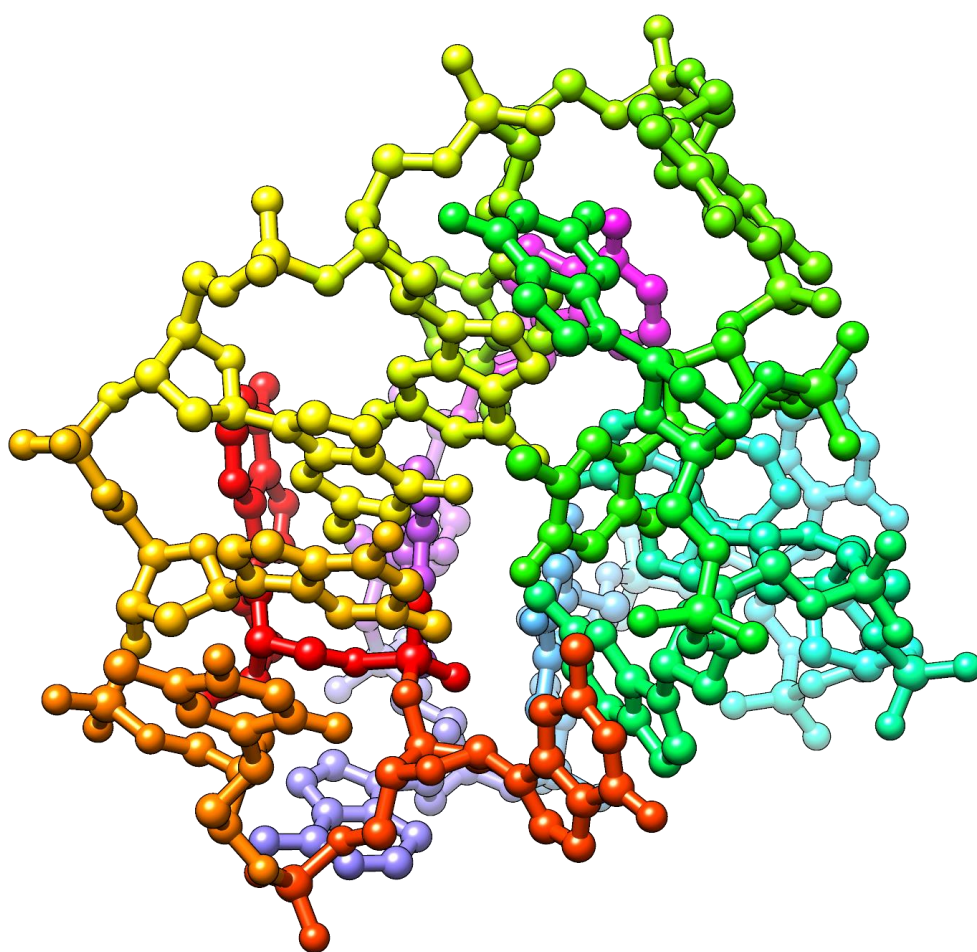


図 2・筋形成型オリゴ DNA の立体構造

310 K の水分子中で熱力学的に最も安定な iSN04 の構造の分子シミュレーション結果.

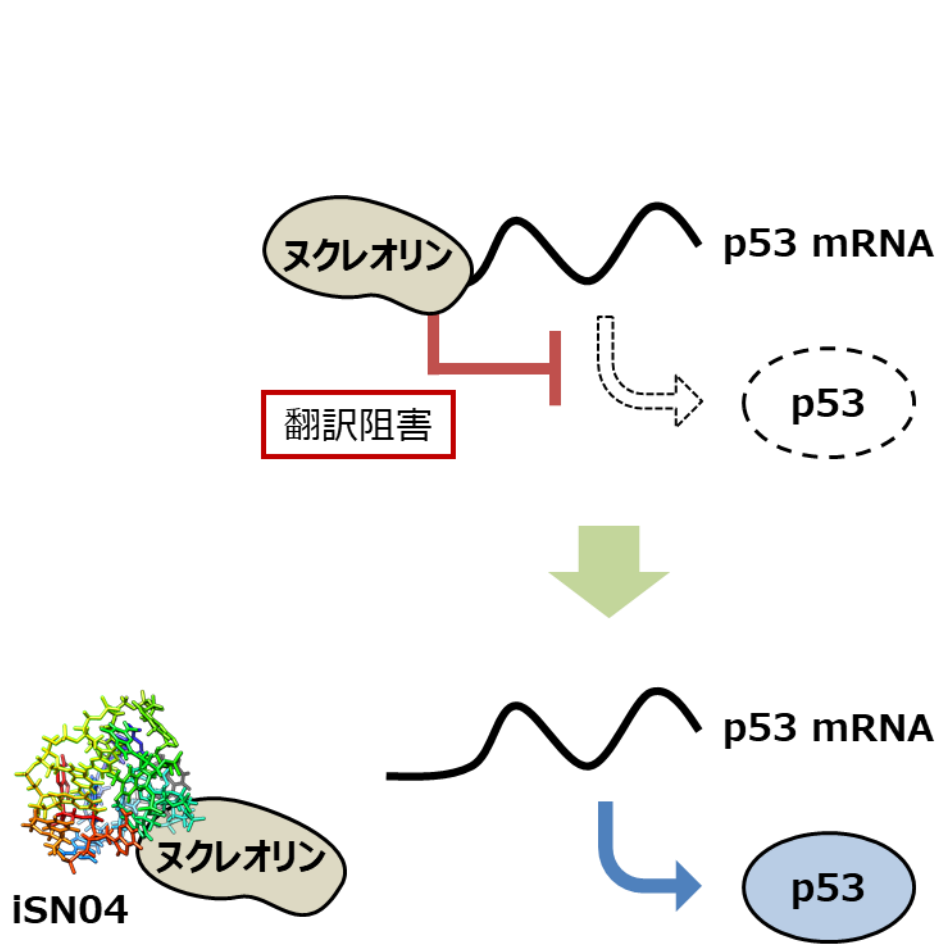


図 3・筋形成型オリゴ DNA の作用機序

iSN04 はヌクレオリンと結合することで、ヌクレオリンによる p53 タンパク質の翻訳阻害を解除する。