

～ 2023 年度インターナショナル・サマーサイエンス
スクール・ハイデルベルク研究報告書 ～



崇城大学 生物生命学部 生物生命学科 2 年

都築美友

1 序論

1)初めに

私は熊本市の推薦を受け、ドイツのハイデルベルク市で行われたインターナショナルサマーサイエンススクール 2023 に参加した。2023 年 7 月 23 日～2023 年 8 月 19 日の 4 週間にわたり、ハイデルベルク市内の研究機関や名所を訪問し知見を広げた。

研修期間中の 3 週間、私はハイデルベルク大学病院でインターンシップに参加し、ビフィズス菌が産生する代謝産物が大腸がん に及ぼす影響について研究を行った。

2023 年 8 月 17 日には HITS(Heidelberg Institute for Theoretical Studies)で研究報告会が行われ「**Impact of metabolites produced by Bifidobacterium bifidum on colorectal cancer**」というタイトルでプレゼンテーションを行った。

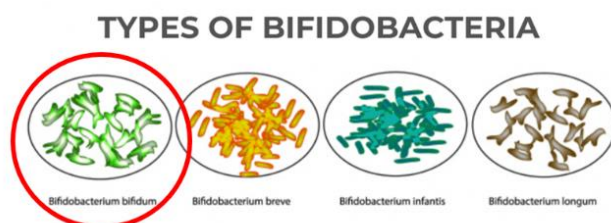
2)大腸と腸内細菌

大腸は食物を消化する最後の通り道であり、長さ約 1.5～2m の臓器だ。

大腸がんの原因は、年齢、遺伝、食事、喫煙など様々である。その要因の 1 つに "腸内細菌"が挙げられる。

腸内細菌とは、ヒトの大腸に生息する様々な細菌のことで、その数は 100 兆個から 1000 兆個にもなる。腸内細菌は腸内フローラと呼ばれる集合体を形成し、未消化物の分解や腸内環境の調節などの役割を果たしている。腸内細菌には善玉菌、悪玉菌、日和見菌の 3 つのタイプがあり、それぞれ異なる働きを持っている。

3)ビフィズス菌とは



TYPES OF LACTOBACILLUS

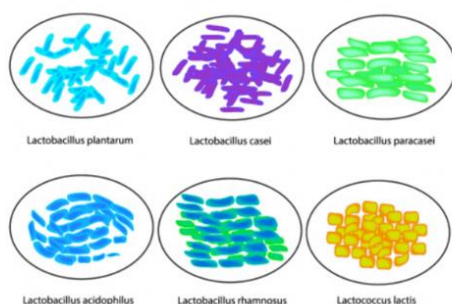


図 1 バクテリアの種類

実験で使用した「*Bifidobacterium bifidum*」(以後 B.b.と呼ぶ)は「ビフィズス菌」という名前でよく知られている偏性嫌気性菌という酸素のあるところでは生育できない菌である。ビフィズス菌は「適正な量を摂取した人の体内で好ましい働きをする生きた菌」という意味のプロバイオティクス的一种としても有名で、善玉菌として人の腸内環境を整える働きをもっている。

プロバイオティクスの例として有名な商品は「ヤクルト」で、ヤクルトには生きた乳酸菌が含まれているため腸内環境を整える作用がある。

4)実験の目的

この実験の目的は、「ビフィズス菌(B.b.)はがん発生にどのような影響を与えるのか（抗がん作用を持つのか、がんを促進する作用をもつのか）」、そして「これは Nrf2 シグナルと関係があるのか」という2つの疑問を解決することである。

5)Nrf2 と ATF3

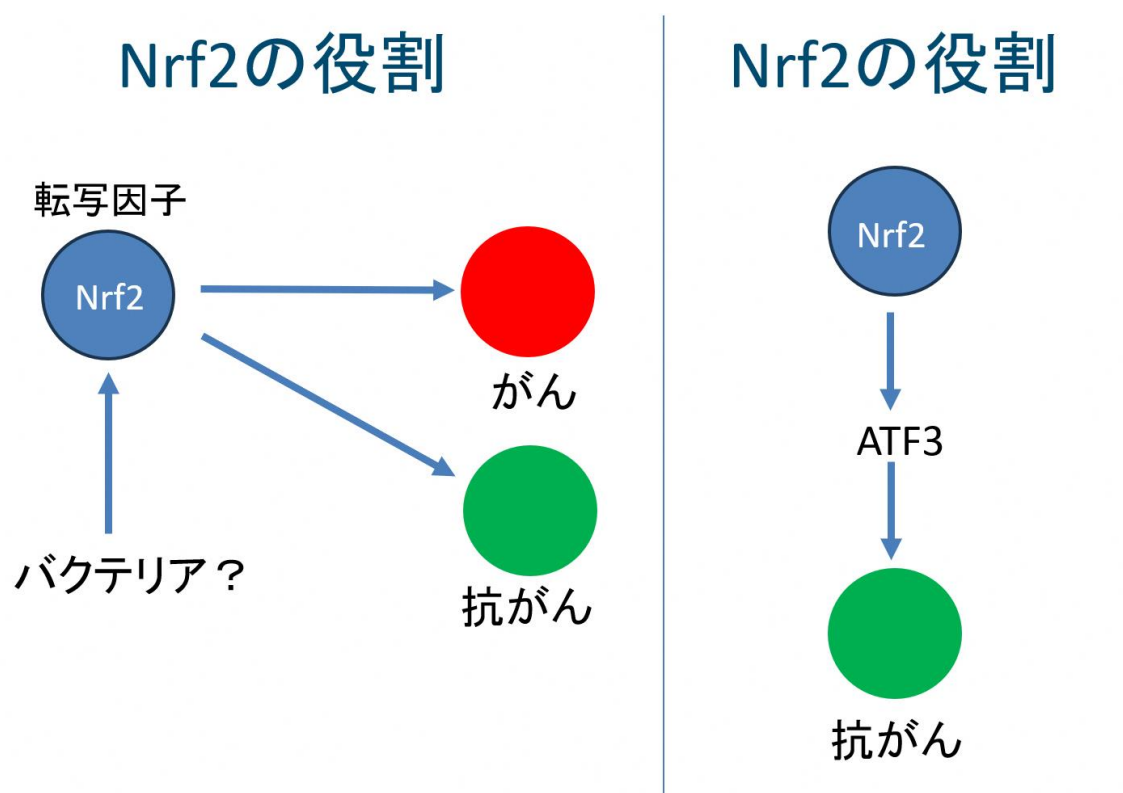


図2 Nrf2・ATF3の役割

Nrf2 は、細胞が毒性ストレスや酸化ストレスにさらされると活性化する転写因子で、ストレスから細胞を守ったり、役割や変異した細胞が生き残るのを抑制したりする。

他方、Nrf2 は細胞増殖刺激の存在下で代謝経路を修正し、がん細胞の増殖を促進し、異常

な活性化はさまざまな種類のがん（NRF2 活性化がん）を引き起こす。つまり、Nrf2 はがん細胞の増殖と抑制の両方に関与している。

このように相反する性質を持つ理由の一端は、Nrf2 によって転写が促進される ATF3 の活性化にある。

ATF3 はストレス応答転写因子であり、免疫に関与する遺伝子で、抗がん作用を示す。

他方、 Δ Zip2 はがん細胞の増殖に関与する因子である。

2 実験方法

1)用いた細菌

私のプロジェクトでは、ビフィズス菌の比較対象としてバクテロイデス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*) (以後 B.f.と呼ぶ)を使用した。



図3 右から Thio(培養液)と B.f.を加え 1 日培養した写真

バクテロイデス(B.f.)は腸に害を与えず、発がん性もないことが知られている。

まず、ビフィズス菌(B.b.)とバクテロイデス(B.f.)を寒天培地で培養し、菌懸濁液をスピンドウンした。そして上澄みだけを採取しその後、上清を滅菌ろ過する。

最後に、この上清を Caco-2 細胞に処理した。この細胞株はヒト直腸癌由来である。

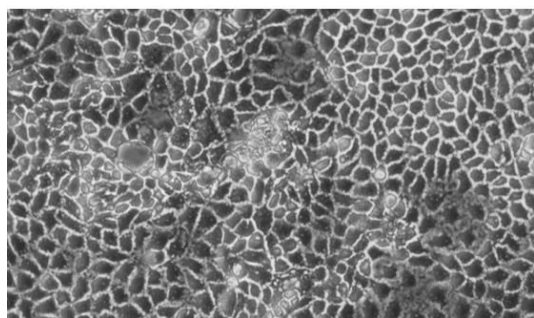


図4 Caco-2 細胞の写真

B.b.は B.f.よりも増殖が遅かったので、大きなコロニーを作るまで 2 日待たなければならなかった。

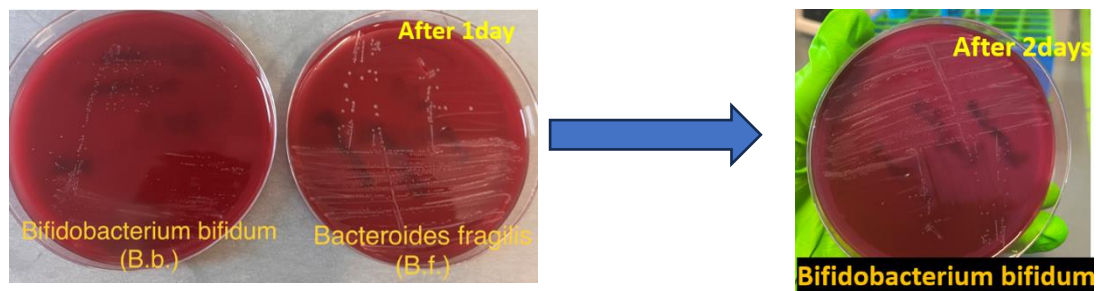


図5 ビフィズス菌とバクテロイデスの培養1日後の写真と2日後のビフィズス菌の写真

また、今回使用した B.b.と B.f.は嫌気性細菌であるため、培養する際には脱酸素剤が入った嫌気ジャーの中に入れた。



図6 嫌気ジャー

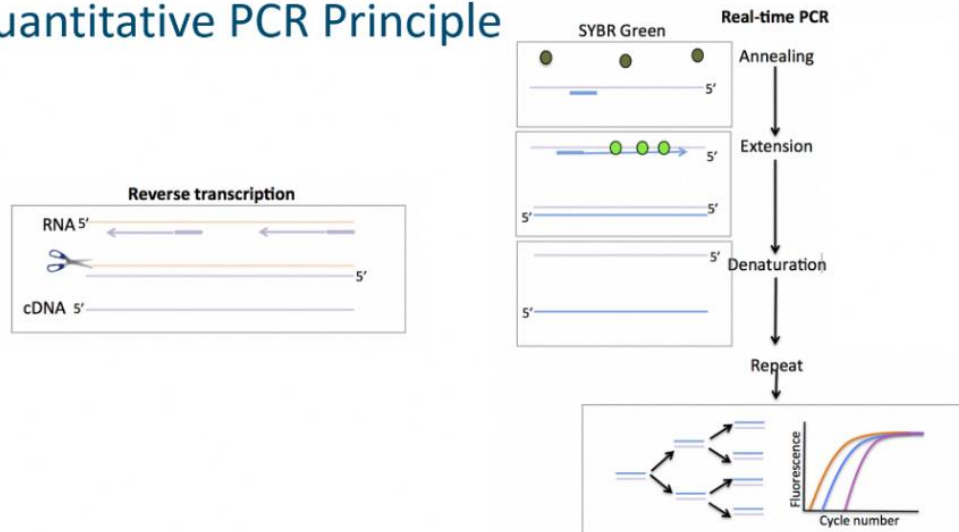
どの細菌が Caco-cell に影響を与えたかを調べるために、RT-qPCR、MTT Assay、ウェスタンブロッティング(Western Blot)の3つの異なる実験方法を用いた。

すべての実験は、細菌が Caco-2 細胞に影響を与えるかどうかを調べるために行った。

それでは、3つの実験の原理を説明する。

2) RT-qPCR の原理 RT-qPCR は PCR 反応を用いてサンプルの中にある特定配列の DNA 量を調べる方法であり、これは決められたサイクル数までの一連の PCR により発生した蛍光物質を測定することで量を測定する

Quantitative PCR Principle



Heidelberg University Hospital | 17/08/ 2023 | Miyu Tsuzuki



図 7 QPCR の原理

私は増幅された 2 本鎖 DNA を検出する蛍光色素として SYBR グリーンを用い、標的遺伝子の mRNA のレベルを測定した。

mRNA は DNA と相補的な塩基配列をもつ RNA で、DNA の遺伝情報をタンパク質合成の場であるリボソームに伝達する役割を担っている。

3) RT-qPCR の実験過程

RT-qPCR の鋳型となる cDNA を手に入れるため、処理した Caco-2 細胞から RNA を取り出した。その後 NanoDrop という機械を使い濃度を測定し、それに水を加えてすべての RNA の濃度を統一した。

NanoDrop という機械は小さな場所に $1\mu\ell$ という微量を載せなければならないため、かなり慎重に作業した。

この後、RT-qPCR 反応を 1 時間行った。



図 8 QPCR 実験過程

RT-qPCR 反応液には、二本鎖 DNA に挿入されて発光する蛍光分子が混ぜられており、この蛍光分子の発光をモニターすることで、遺伝子の増幅量を測定した。

Δ Zip2 は、Nrf2 の下流で発現が促進される転写因子で、がん細胞の増殖を促進することが示されている。今回、私は Caco-2 細胞における Δ Zip2 の発現、および B.b.や tBHQ(ATF 発現の促進のポジティブコントロール)の影響を合わせて検討した。

3)MTT-Assay の原理

MTT-Assay

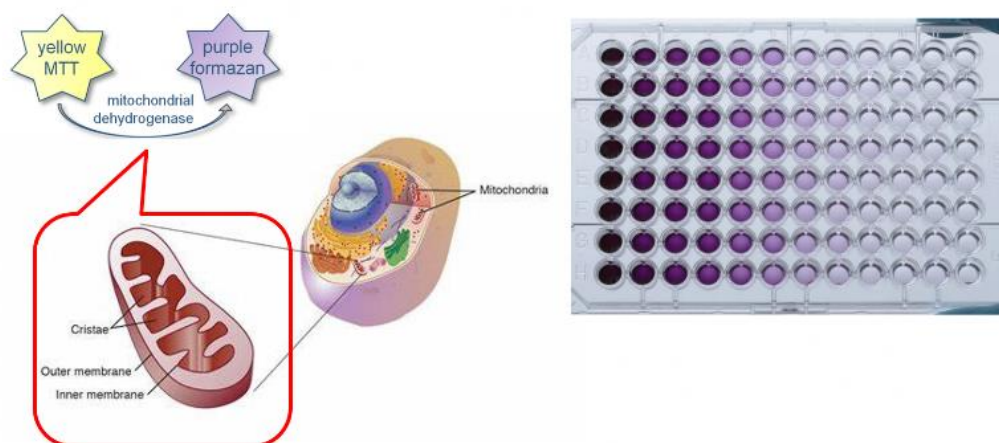


図 9 MTT-Assay の原理

生きている細胞内にあるミトコンドリアがMTTを代謝した時、代謝物が生成され、代謝物の量によってMTT溶液が黄色から紫色へと変化する。

言い換えると、より多くの細胞が存在すれば、より紫色が濃く発色するということだ。つまりこのテストは細胞の生存率と増殖率を明らかにするものである。

4)Westernblot の原理と実験過程

Westernblot は、抗体を用いて特定のタンパク質の存在を検出する方法であり、これによりタンパク質レベルでの増殖を確認することができる。

まず、抽出したタンパク質を電気泳動によって分離し、ジェルからメンブレンへ転写する。その後、検出したいタンパク質に対する一次抗体・二次抗体を用いて反応させることによってタンパク質の存在を検出する。

Westernblot で Nrf2 と ATF3 タンパク質を検出するには、核タンパク質を抽出する必要がある。そのため、まずハイボトニック緩衝液という溶液を使用し、非核タンパク質を含む「細胞内タンパク質」を除去し、次に高塩濃度緩衝液を使用し核を破壊した。

その後、核抽出液内に含まれるタンパク質の濃度を測定するために BCA-Assay という方法を使った。

3. 結果と考察

1) RT-qPCR の結果

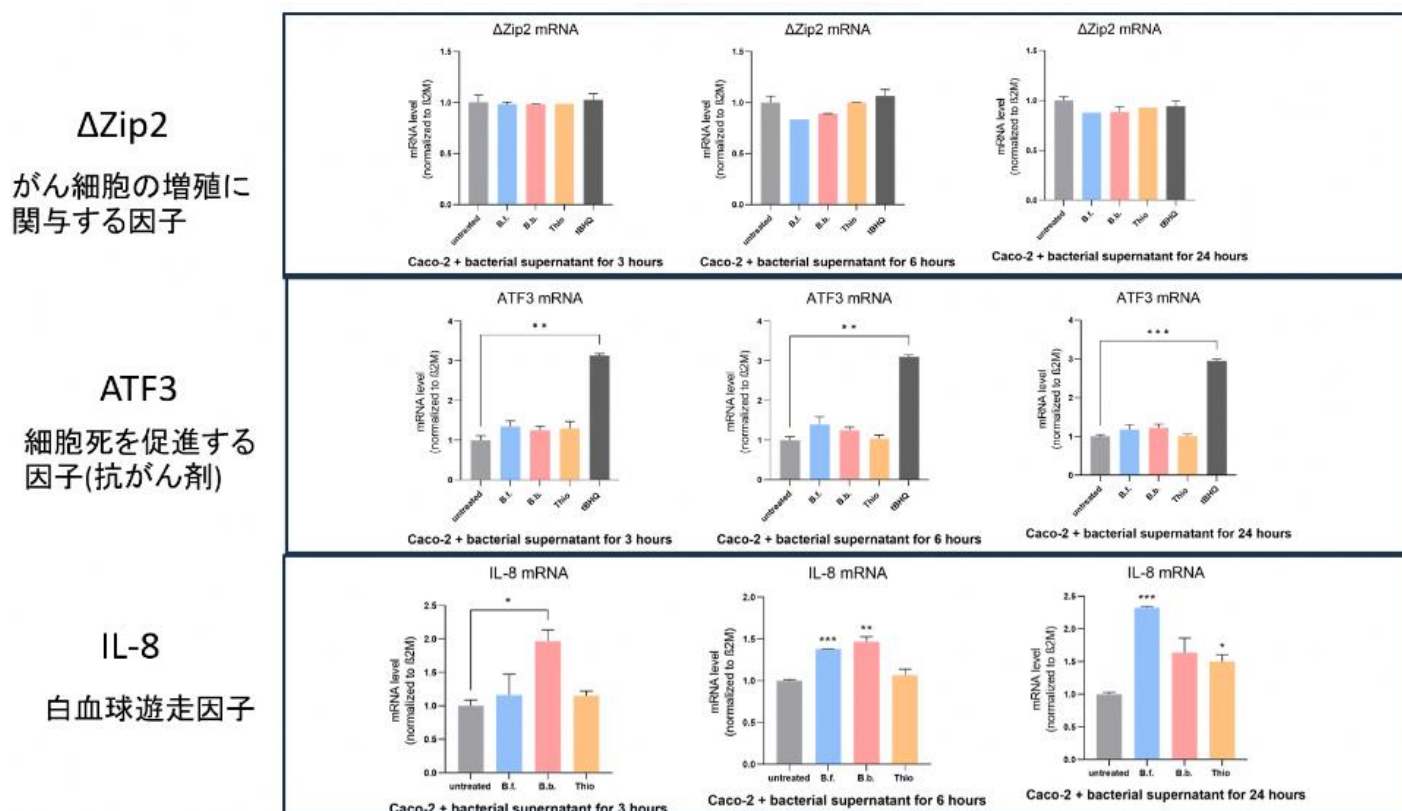


図 10 QPCR の実験結果

このグラフは Caco-2 細胞をバクテリアの上清で処理した時に得られた mRNA の量を示している。私は、ATF3・ΔZip2・IL-8 という 3 つの遺伝子の発現について調べた。縦線はハウスキーパー遺伝子である β 2 M で標準化した mRNA 量で、横線は投与した菌の種類を示している。グラフは左から順にそれぞれ 3 時間・6 時間・24 時間経過後の結果を示している。

ΔZip2 も ATF3 もその発現が変わらなかったことから、ビフィズス菌が Nrf2 シグナルの伝達に影響を与えないこと。すなわちビフィズス菌の上清は分子レベルにおいてもがん細胞の増殖や抑制に関与しないことが示唆された。

ただし、Nrf2 シグナルに影響を与える TBHQ が Atf3 の発現を促進するものの、Δzip2 の発現に影響を与えなかったことから再検討が必要である。

私の予想では、Δzip2 の場合 tBHQ は発現しないと考えられたが予想に反し、3・6・24 時間経過後のいずれにも発現した。

その結果、 Δ Zip2 はがん細胞である Caco-2 においても発現していることが確認されたが、B.b.や tBHQ による発現の促進も抑制も観察できなかった。

2) MTT-Assay の結果

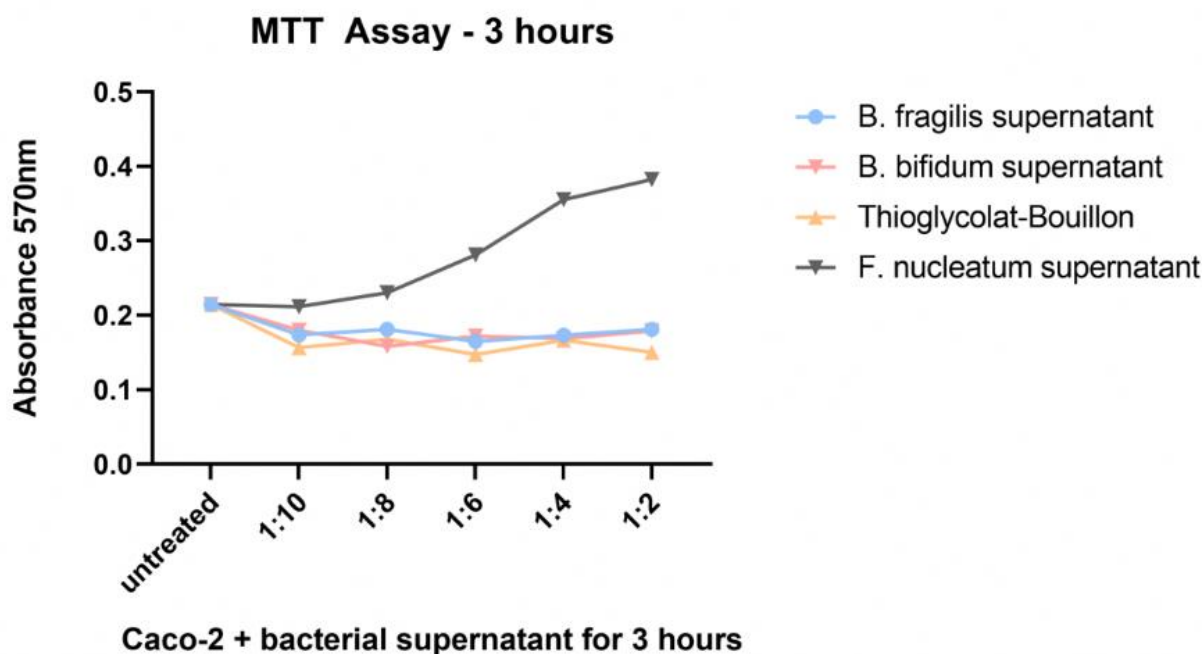


図 11 MTT-Assay 実験結果

グラフは 570nm の光を照射したときの MTT の吸光度を示している。

ポジティブコントロールとして、癌や細胞増殖を引き起こすことで知られているフソバクテリウム(*Fusobacterium*)の上清を使った。結果より、フソバクテリウムを使ったものは予想通り細胞増殖を促した。

ビフィズス菌で処理した Caco-2 細胞は光の吸収が少ない(つまりビフィズス菌の代謝物が Caco-2 細胞の細胞死を誘導する)と予想したが、結果は Thio(培養液)やビフィズス菌(B.b.)で処理した場合とでほとんど変わらなかった。

これらの結果より、予想に反して B.b.の上清は Caco-2 細胞の増殖や抑制に全く関与しないことが示唆された。

3)Westernblot 実験結果

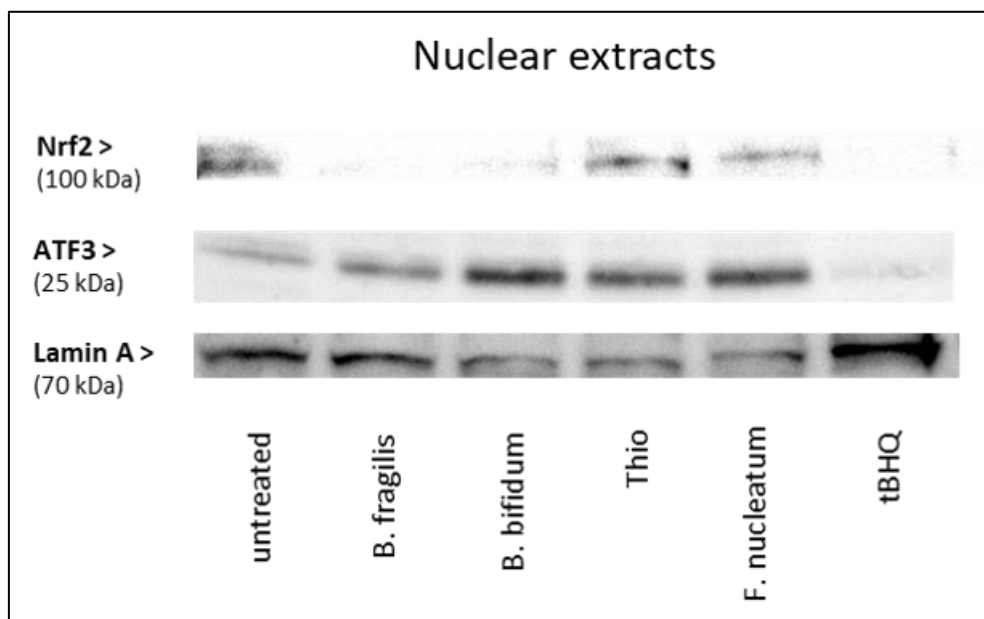


図 12 Westernblot 実験結果

B.b.の培養上清は細胞の生死や Nrf2 の活性化に影響を与えないことが MTT-Assay と RT-qPCR から示唆されている。

タンパク質レベルで遺伝子発現を確認するため、最後に Westernblot を用いた。

グラフは上から順に Nrf2・ATF3・LaminA とそれぞれの細菌上清との反応結果である。LaminA は調べたいサンプルのタンパク質の定量化や標準化に用いる、ローディングコントロールである。

私の実験結果を見ると、未処理(Untreated)に Nrf2 のバンドが現れた。また、予想では tBHQ で処理したポジティブコントロールには Nrf2 と ATF3 というバンドが現れるはずであったが、現れなかった。加えて、今までの実験結果とは異なり B.f.と B.b.には Nrf2 のバンドはなかったが、ATF3 のバンドが見られた。

予想と異なる結果になった原因は、実験の段階のどこかでミスをしてサンプルが入れ替わっていたことが考えられる。

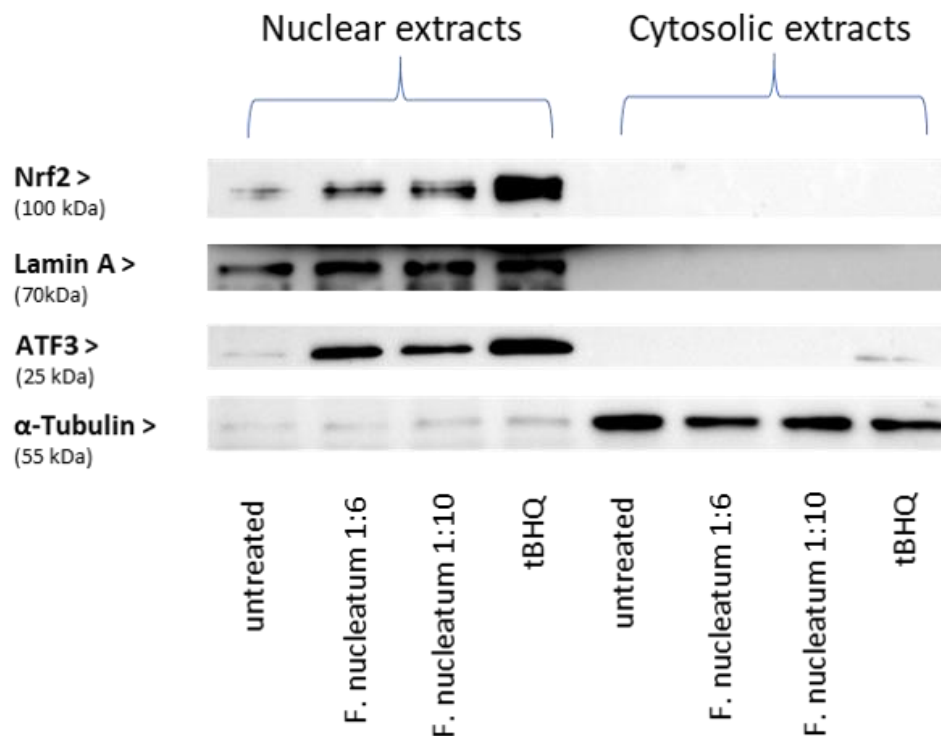


図 13 Western blot 実験結果サンプル

この写真は別の Western blot の結果である。この例を見ると、tBHQ と Fuso Bacterium が Nrf2 と ATF3 の強いバンドを持つことがわかる。

4. 今後の展開

実験で分かったことは、現時点でビフィズス菌は Nrf2 のシグナル伝達に影響を与えない可能性があるということと、ビフィズス菌が癌の増殖に影響を及ぼさないということだ。

また、3つそれぞれの実験データを得るには多くの時間が必要であったことに加え、今回のインターンシップは3週間と短かった。そのため、より正確な結果を得るために Western blot はサンプルを間違えた可能性があることに加え、MTT-Assay や RT-qPCR についても再度実験し、より多くの実験データを集める必要があると考えられた。

5. おわりに

ISH(International Summer Science school Heidelberg)ではハイデルベルク大学でのインターンシップだけでなく、EMBL(European Molecular Biology Laboratory)や MPI-A(Max Planck Institute for Astronomy)・MPI-K(Max Planck Institute for Nuclear Physics)HITS(Heidelberg Institute for Theoretical Studies)など世界的にも有名な研究所を訪問することができた。そのため天文学や原子物理学にも興味が湧いた。

ISH の訪れた研究所で実際に働いている研究者の方に直接質問をし、自分の疑問を解決できた。それに加え、私が将来したいと考えているがん研究を実際に行うことができたことは、私にとって夢のような経験である。

今回熊本市とハイデルベルク市の手厚いサポートがあったおかげで、インターナショナルサマーサイエンススクールハイデルベルクに参加することができ、フランス・ポーランド・イスラエルなど様々な国出身の友人と共に、夢のような経験ができた。

両市にお礼申し上げます。ありがとうございました。

Thank you very much for Kumamoto city and Heidelberg city.

Especially ISH managers Ms. Shimizu Midori (Kumamoto city) and Ms. Risa Güthermann (Heidelberg city), Mr. Felix Grein (Heidelberg city)

I will never forget these experiences. I'd love to visit Germany again!

