

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26111006

研究課題名（和文）癌化・老化耐性ハダカデバネズミをモデルとした低酸素適応・代謝制御機構の探究

研究課題名（英文）Investigation of hypoxia adaptation and metabolic regulation in the cancer- and senescence-resistant rodent, the naked mole rat.

研究代表者

三浦 恭子 (Miura, Kyoko)

熊本大学・大学院先導機構・准教授

研究者番号：80583062

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 56,200,000円

研究成果の概要（和文）：ハダカデバネズミとマウスの種間比較により、特有の老化耐性に寄与すると考えられる代謝経路の抑制・亢進部位を明らかにした。次に、ハダカデバネズミからのiPS細胞の樹立を行い、作製したiPS細胞が腫瘍化耐性をもつことを発見した。興味深いことに、通常iPS細胞の樹立効率が亢進する低酸素条件においては、デバIPS細胞は全く樹立されなくなり、体細胞初期化における酸素条件への応答性も特殊化していると考えられた。さらに地下の閉鎖・低酸素環境への適応と関連すると考えられる、特有の社会的コンテキスト依存的な褐色脂肪の調節機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長寿・老化耐性に関連すると考えられるハダカデバネズミ特有の代謝経路の動態を明らかにすることができた。これは、ヒトにおける将来の長寿化・抗老化創薬に向けた新たな介入ポイントの提示につながるものである。ハダカデバネズミにおける種特異的な初期化・発がん耐性機構を明らかにすることができた。これは将来のヒトiPS細胞の安全性の向上につながると考えられる。また、また、低酸素のみならず体温制御の観点からも、ハダカデバネズミの地下の閉鎖環境における低代謝制御戦略の一端を解明することができ、哺乳類における体温制御の多様性について理解を深めることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, by interspecies comparison between naked mole rats (NMRs) and mice, we identified the upregulated or downregulated metabolic pathways, possibly contributing to the senescence-resistance of the NMR. Next, we succeeded to generate NMR-iPS cells and revealed that NMR-iPS cells have tumor-resistance. Interestingly, NMR-fibroblasts failed to reprogram in a hypoxic condition. Thus, the response of the NMR cells to oxygen condition during the reprogramming process seems to be unique. Additionally, we identified the social context-dependent brown adipose tissues thermogenesis in the NMRs.

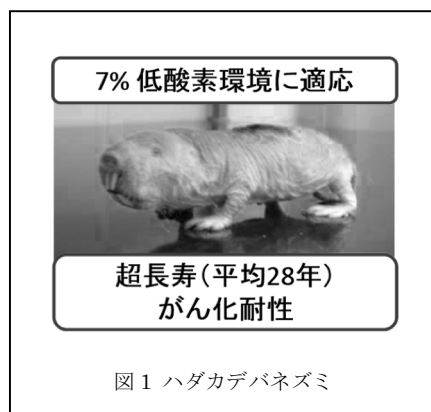
研究分野：分子生物学、幹細胞学、ハダカデバネズミ学

キーワード：ハダカデバネズミ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミ (Naked mole rat、図 1) は地下の低酸素 (約 7% O<sub>2</sub>) と地上の通常酸素 (約 20%) の両方の環境に適応した齧歯類であり、異例の長寿 (体重約 35g、最大寿命 32 年) である。またこれまで自然発生腫瘍がほとんど確認されたことが無いという特徴をもつ。ハダカデバネズミを含む低酸素下で生息可能なくつかの動物種において、長寿化が確認されており、低酸素環境への適応進化と個体の長寿化の間に関連がある可能性がある。また、がん細胞の悪性化には腫瘍微小環境の低酸素状態が密接に関わっており、がん化耐性と低酸素適応にも関連が示唆される。よって、ハダカデバネズミは「低酸素適応リモデリング」を理解するための理想的なモデル生物であると期待される。



## 2. 研究の目的

本研究班では、ハダカデバネズミと通常酸素下に生息するマウスとの線維芽細胞・iPS 細胞・肝臓等の臓器の種間比較解析により、ハダカデバネズミ種特異的な低酸素適応を制御する分子代謝機構の解析を進め、ハダカデバネズミのがん化・老化耐性の表現型を制御する代謝メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 種間比較によるハダカデバネズミ特異的代謝産物・発現遺伝子の同定

ハダカデバネズミとマウスの種間比較により、ハダカデバネズミ特異的な恒常的低酸素適応状態の機構解明を目指した。低酸素環境で培養した線維芽細胞を用いて、Flux analyzer と質量分析を用いた代謝解析を実施した。また、公共データベースを用いてハダカデバネズミ・マウスのトランスクリプトームの種間比較解析を行った。また細胞・臓器のメタボロミクスの結果から着想を得て、ハダカデバネズミ個体への負荷実験を行い、応答性を評価した。

### (2) ハダカデバネズミ iPS 細胞の樹立と機能解析

成体皮膚線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc をレトロウイルスで導入することで iPS 細胞樹立を行った。低酸素培養下でのリプログラミングの評価に関しては、5% O<sub>2</sub> の低酸素インキュベーターを用いて実施した。樹立した iPS 細胞に関しては、増殖速度、免疫染色、RNA-seq 解析等による性状評価を行った。造腫瘍性の評価に関しては、NOD/SCID マウス精巣に移植することにより行った。

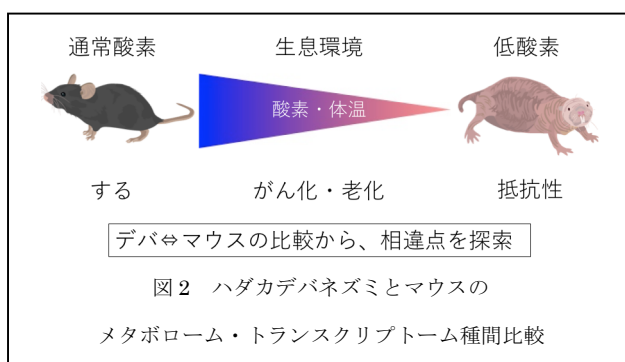
### (3) 未知の代謝制御因子の探索

ノン・ターゲットのメタボロミクスにより、ハダカデバネズミにおける未知の代謝経路・代謝産物の探索を試みた。ハダカデバネズミの変温性も低代謝の基礎と考えられるため、個体の体温維持などに関わり盛んに代謝を行う褐色脂肪組織に着目して解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ハダカデバネズミにおける特徴的な中心代謝プロファイルの解明

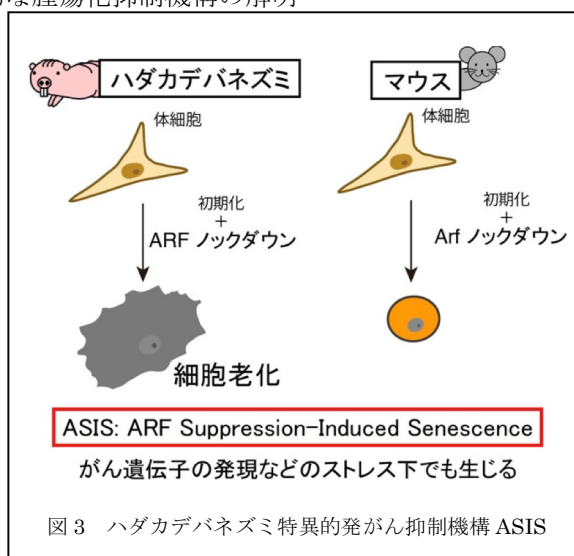
ハダカデバネズミとマウスのメタボローム・トランスクリプトームの種間比較を実施し (図 2)、低酸素適応動物であるハダカデバネズミにおける低代謝プロファイルを、細胞及び臓器レベルで明らかにした。メタボロミクスの結果から着想したある条件において、個体への負荷実験を実施したところ、この条件でマウス



において生じる異常が、ハダカデバネズミではまったく生じないという結果が得られた。この耐性メカニズムは、ハダカデバネズミの加齢性疾患への抵抗性の一因となっていると考えられた。また、ハダカデバネズミで酸化ストレス低減、老化耐性に寄与していると考えられる代謝経路の亢進部位についても明らかにすることができた。本内容については、現在論文投稿準備中である。

## (2) ハダカデバネズミ iPS 細胞における特異的な腫瘍化抑制機構の解明

ハダカデバネズミ iPS 細胞を樹立したところ、興味深いことに他の動物種とは異なり、低酸素下では初期化が抑制されることが明らかになった。また、培養下では多分化能を持つにも関わらず、他の動物種由来 iPS 細胞とは異なり、生体への移植後に腫瘍（奇形腫）を形成しなかった。その特有の腫瘍化耐性の分子機構として、ヒトやマウスの iPS 細胞で発現抑制されるがん抑制遺伝子 *ARF* (Alternative Reading Frame) のハダカデバネズミ特異的な発現亢進およびマウス ES 細胞の造腫瘍性に重要ながん遺伝子 *ERAS* の機能欠失が寄与することが明らかとなった。*ARF* は様々なストレスに応じて発現が亢進し、*p53* 依存のおよび非依存の経路により細胞



の増殖を抑制する。ヒトやマウス細胞のリプログラミング過程では、初期化のストレスにより *ARF* が一旦発現し、その後 *ARF* が抑制された細胞が iPS 細胞になると考えられている。なぜハダカデバネズミ iPS 細胞では *ARF* が活性化したまま初期化されているのかを明らかにするため、我々は、ハダカデバネズミ線維芽細胞において初期化を誘導中に、*ARF* の発現を人為的に抑制した。その結果、*ARF* を抑制したハダカデバネズミ線維芽細胞では、種特異的に細胞老化が誘導された。つまりハダカデバネズミ線維芽細胞は、初期化時に *ARF* が抑制されると細胞増殖が停止するため、対照的に *ARF* の発現が維持された増殖能をもつ細胞が、コロニーを形成して *ARF* 活性化型の腫瘍化耐性 iPS 細胞として選択されたと考えられた。我々はさらに、*ARF* ががん遺伝子の活性化などによる異常な細胞増殖シグナルによっても発現亢進するということと、初期化とがん化には類似性があるという、近年明らかになってきた知見に着目し解析を進めた。その結果、この *ARF* 抑制時の細胞老化は初期化時のみならず、*Myc* 強制発現によるがん化ストレスや培養ストレスの存在下でも生じることが明らかになり、iPS 細胞だけではなくハダカデバネズミ個体のがん化耐性にも寄与すると考えられた。以上の結果から我々はこの現象を「ASIS: *ARF* suppression-induced senescence (*ARF* 抑制時細胞老化)」として報告した (図 3)。ハダカデバネズミでは、*ARF* の抑制というヒトやマウスではがん化につながるような事象が生じた場合、ASIS という種特有の細胞老化を起こし、がん化の危機を回避していると考えられる。

## (3) 変温性・低代謝齧歯類ハダカデバネズミにおける褐色脂肪組織の役割

ハダカデバネズミ特有の低代謝には、個体の変温性も密接に関わると考えられる。恒温性哺乳類の体温・代謝の制御に関わる褐色脂肪組織について解析を進めたところ、変温性哺乳類であるハダカデバネズミにおいては、非寒冷環境において社会的地位・行動依存的に、褐色脂肪組織の活性化が生じることを明らかにした。社会状況変化を感知した代謝制御は、低酸素環境における通常時の酸素消費節約と必要に応じた速やかな活発化を両立する仕組みと考えられ、低酸素適応哺乳類における体温維持メカニズムとして非常に興味深い。本内容については論文投稿中である。また、麻布大学との共同研究により閉鎖環境での低代謝にも関連する集団社会性の制御機構についても新たな知見が得られ、論文化した。

## (4) ユニークな分析法の確立

分担研究者の杉浦らは、上記項目(1-3)にも使用した、高感度な質量分析メタボローム法を開発した。従来は水溶性代謝物のメタボローム解析はキャピラリー電気泳動・質量分析法が用いられて来たが、感度が低い事が問題であった。本研究において、Thermo Fisher Scientific 社と共同研究を行い、新しいクロマトグラフィー法(ion chromatography(IC))と質量分析を組み合わせた高感度メタボローム解析法(IC/MS)を確立した。さらに、組織(臓器)のメタボローム解析では、

臓器を構成する多くの細胞種のうち、どのポピュレーションに代謝変動が見られるかは分からない。イメージング質量分析を高感度化させ、生体内で酸素添加酵素により産生されるステロイドホルモンや、モノアミンをイメージング可能とした。ステロイドホルモンは、コレステロールを原料とし、多様な酸素添加酵素により産生される。中でも高度に酸素添加されたアルドステロンは、原発性アルドステロン症患者血中で上昇するが、この様な高度な酸素添加反応を、患者副腎のどの細胞が産生しているかは不明であった。高感度イメージング質量分析法を用いる事で、従来考えられていた巨大な副腎腫瘍が生じるよりも以前に、**Aldosterone producing cell cluster (APCC)**と呼ばれる細胞群が存在し、これらが機能的にアルドステロンを産生する様子を初めて可視化した。

#### (5) 低酸素応答による新規代謝制御機構の解明

低酸素環境下で生息するハダカデバネズミの特殊な代謝システムを理解する上で、種を越えて共通な「低酸素応答による代謝制御機構」そのものの全貌を把握することは必須である。低酸素環境下においては、細胞のエネルギー代謝は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（酸素を必要とする）から、解糖の活性化（酸素を必要としない）へと劇的にシフトし、その結果大量の乳酸が細胞外へと放出されるのだが、しかし個体が乳酸アシドーシスに陥ることはない。すなわち、低酸素環境において、全身の細胞で低酸素応答が活性化して大量の乳酸が細胞外（血中）に放出される状況においてもなお、我々の身体には乳酸を処理するメカニズムが備わっているということになる。分担研究者の南嶋らは、低酸素応答は①血中乳酸の肝臓（あるいは腎臓）への取り込みと、②肝（・腎）における乳酸からの糖新生を活性化することを、マウスを用いて明らかにした。この結果は、低酸素環境下での個体レベルでのエネルギー代謝制御機構についての新しい知見をもたらしただけでなく、致死率が非常に高い乳酸アシドーシスに対する新規治療法の開発へのヒントをもたらし、臨床現場へのインパクトの大きな研究成果が得られた（特許申請中）。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 44 件）

(1) Watarai A, Arai N, Miyawaki S, Okano H, Miura K, Mogi K and Kikusui T. Responses to pup vocalizations in subordinate naked mole-rats are induced by estradiol ingested through coprophagy of queen's feces. PNAS. 115 (37): 9264-9269. (2018) 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1720530115

(2) Tanaka S, Sugiura Y, Saito H, Sugahara M, Higashijima Y, Yamaguchi J, Inagi R, Suematsu M, Nangaku M, Tanaka T. Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibition Normalizes Glucose Metabolism and Suppresses Oxidative Stress in Diabetic Kidneys. Kidney International. 94 (5): 912-925. (2018) 査読有. DOI: 10.1016/j.kint.2018.04.025

(3) Sugiura Y, Takeo E, Shimma S, Yokota M, Higashi T, Seki T, Mizuno Y, Oya M, Kosaka T, Omura M, Nishikawa T, Suematsu M, and Nishimoto K, Aldosterone and 18-Oxocortisol Coaccumulation in Aldosterone-Producing Lesions. Hypertension 72 (6): 1345-1354. (2018) 査読有. DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11243

(4) Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. Cancer Cell. 33(3): 355-367. e7. (2018) 査読有. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.004

(5) Miyawaki S, Okada Y, Okano H, Miura K. Teratoma Formation Assay for Assessing Pluripotency and Tumorigenicity of Pluripotent Stem Cells. Bioprotocol 7(16): e2518. (2017), 査読有. DOI: 10.21769/BioProtoc.2518

(6) Miyazawa H, Yamaguchi Y, Sugiura Y, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, Miura M. Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. Development. 144(1): 63-73.

(2017) 査読有. DOI: 10.1242/dev.138545

(7) Oyaizu-Toramaru T, Suhara T, Hayakawa N, Nakamura T, Kubo A, Minamishima S, Yamaguchi K, Hishiki T, Morisaki H, Suematsu M, Minamishima YA. Targeting oxygen sensing prolyl hydroxylase (PHD) for metformin-associated lactic acidosis treatment. *Mol Cell Biol* 37(16): e00248-17. (2017) 査読有. DOI: 10.1128/MCB.00248-17

(8) Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, Shimizu A, Hachiya T, Bono H, Koya I, Okada Y, Kimura T, Tsuchiya Y, Suzuki S, Onishi N, Kuzumaki N, Matsuzaki Y, Narita M, Ikeda E, Okanoya K, Seino K, Saya H, Okano H, Miura K. Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. *Nature Communications* 7: 11471. (2016) 査読有. DOI: 10.1038/ncomms11471

(9) Futatsugi K, Tokuyama H, Shibata S, Naitoh M, Kanda T, Minakuchi H, Yamaguchi S, Hayashi K, Minamishima YA, Yanagita M, Wakino S, Itoh H. Obesity-induced kidney injury is attenuated by amelioration of aberrant PHD2 activation in proximal tubules. *Sci Rep* 6: 36533. (2016) 査読有. DOI: 10.1038/srep36533

(10) Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, Kaelin WG Jr, Suematsu M, Minamishima YA. Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(37): 11642-47. (2015) 査読有. DOI: 10.1073/pnas.1515872112

[学会発表] (計 42 件)

(1) 三浦 恭子、長寿・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミ、第 15 回日本病理学会カンファレンス、2018

(2) Yoji Andrew Minamishima, Targeting hypoxic response for the treatment of diseases, Hypoxia Research Meeting 2018, 2018

(3) 杉浦悠毅、メタボローム解析が明らかにする、免疫活性化を起因とする不安・恐怖亢進メカニズム、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

(4) Kyoko Miura, Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. *Mechanisms of Aging | CSHL - CSHL Meetings*, 2016

(5) Yoji Andrew Minamishima, Inactivating HIF-prolyl hydroxylase PHD2 in liver improves survival after lactic acidosis by activating Cori cycle. *Keystone Symposia "Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics (E3)"*, 2015

[図書] (計 2 件)

(1) Sugiura Y, Springer, *Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation*, 2016, 147-160

[その他]

ホームページ

デバ研へようこそ! <https://debalab.org/>

報道

NHK E テレ サイエンス ZERO 「不老不死! ? のほ乳類 ハダカデバネズミ」2019年2月17日

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 南嶋 洋司

ローマ字氏名: MINAMISHIMA, Yoji Andrew

所属研究機関名: 群馬大学

部局名: 大学院医学系研究科

職名: 教授

研究者番号（8桁）：20593966

研究分担者氏名：杉浦 悠毅

ローマ字氏名：SUGIURA, Yuki

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部（信濃町）

職名：講師

研究者番号（8桁）：30590202

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。