

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07079

研究課題名(和文) 老化・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミにおける発生工学技術の開発

研究課題名(英文) Establishment of developmental engineering technologies for senescence- and cancer-resistant rodent, the naked mole-rat

研究代表者

中條 佳見(河村佳見)(Chujo, Yoshimi)

熊本大学・大学院先導機構・助教

研究者番号：20505044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミは最大寿命30年を超える老化・がん化耐性齧歯類である。また、真社会性の社会を形成し、女王と王のみが繁殖する。本研究では、遺伝子改変ハダカデバネズミの作製に必要な発生工学的技術基盤を整備するために、非侵襲性採卵方法の検討、膣スメア法による性周期決定法の確立、性周期同期化法の開発を行った。その結果、同程度の体サイズであるマウスで、非侵襲的に採卵が可能となった。また、約34日の性周期は膣スメア法により判別可能であることが判明した。さらに薬剤投与により性周期を同期化することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハダカデバネズミは顕著な老化・がん化耐性を持つ最長寿齧歯類であり、新規の老化・がん化予防法の開発のための実験動物として、近年需要が急速に高まっている。しかしながら、ハダカデバネズミは女王のみが妊娠する真社会性動物であるため、繁殖効率が低く、いまだ個体を扱った研究の普及には程遠い状況にある。本研究はハダカデバネズミの効率的な繁殖法の開発に大きく寄与し、さらには貴重な女王から非侵襲的に卵を回収する道筋をつけた。本研究により、ハダカデバネズミの実験動物化を進めることで個体を用いた研究が可能となり、老化・がん化耐性機構の解明に大きく役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The naked mole-rat(NMR) is the longest-living rodent with the maximum lifespan exceeding 30 years. In addition to its longevity, NMR has “senescence-resistant” and “cancer-resistant” phenotypes. NMR is a eusocial rodent, and in an NMR colony, reproduction is typically restricted to only one female (the queen) and a few males. In this study, we established some developmental engineering techniques toward generating transgenic NMRs, such as the noninvasive oocyte retrieval technique without sacrificing individuals, the technique of estrous cycle determination by observation of vaginal smear, and the method of estrous synchronization.

研究分野：発生工学

キーワード：ハダカデバネズミ 発生工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

老化・がん化耐性であるハダカデバネズミ(naked mole-rat, NMR)は、マウスと同等の大きさながら(体重約 35 g)、最大寿命約 30 年を超える長寿動物である(図 1)。生存期間の 8 割の期間は、老化の兆候(活動量・繁殖能力・心臓拡張機能・血管機能の低下等)を示さず、加齢に伴う死亡率の上昇も認められないことが報告されている。また、今まで自然発生腫瘍が確認されたことがほとんど無い。これらの特徴から、新規の老化・がん化耐性機構・因子同定のためのモデル動物として世界的な注目を集めている。しかしこれまでの NMR 研究は、言うなれば、有用な phenotype



真社会性  
長寿命(平均28年)  
老化耐性・がん化耐性

図 1. ハダカデバネズミ(NMR)

を示すミュータントを解析してその原因遺伝子を探索する順遺伝学的解析であり、いまだ決定的ながん化耐性・老化耐性を規定する因子は見つかっていない。今後、真にどの遺伝子が NMR 個体の老化・がん化耐性を制御しているかを直接的に証明するには、候補遺伝子の機能阻害や亢進といった逆遺伝学的解析を行うための遺伝子改変 NMR の作製が必須である。しかしながら、世界的に NMR を飼育している研究室は少なく、真社会性であるため繁殖個体が限られており、さらに妊娠期間が長く、性成熟も遅いなどマウスやラットなどと比較して不利な点が多く、その困難さから遺伝子改変 NMR を作製するための基盤となる発生工学技術の開発は、いまだ全くなされていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

今後、遺伝子改変 NMR を作製するためには、まずは前段階として、性周期の測定・同期化、胚の採取・培養、過排卵誘導、胚移植などの基盤となる発生工学技術が不可欠である。そこで本研究では、NMR における発生工学技術の立ち上げを行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 非侵襲性採卵法の検討

NMR と体格が類似している ICR メスマウスに過排卵誘導をかけ、麻酔下で卵管灌流あるいは経膣灌流を行った。

#### (2) 性周期の測定

コロニーを形成している女王およびワーカーメスを女王から隔離してオスとペアにし、女王化誘導を行ったメス個体について膣スメアを採取・観察した。同時に採尿し、尿中プロゲステロン濃度を ELISA 法にて測定した。

#### (3) 性周期の同期化

コロニーを形成している女王およびワーカーメスを女王から隔離してオスとペアにし、女王化誘導を行ったメス個体についてホルモン処理を行い、性周期の同期化を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 非侵襲性採卵法の検討

NMR は真社会性齧歯類であり、繁殖個体が限られる上に複数回出産できる優秀な女王はさらに限定されるため、安楽死させることなく卵を採取することが重要となる。さらに採卵した個体にそのまま胚移植することができれば、使用個体数を削減することができる。そこで、NMR と体格が類似している ICR マウスに過排卵処理を施し、卵管からの生体灌流を試みた。その結果、複数個の卵を採取することに成功した。さらに侵襲度を低下させるため、経膣灌流を試みたところ、卵管からの灌流よりは数が少なかったものの、卵を採

取することができた。

### (2) 性周期の測定

性周期を決定するために膣スミア法および ELISA による尿中プロゲステロン濃度測定法を検討した。膣スミア法について、ペア飼育している 17 匹のメス NMR の膣スミアを採取し、ギムザ染色により評価した。マウスと異なり、NMR は無毛のため、膣上で蒸留水をピペティングする際に液体が流れ落ちてしまい、採取が困難であった。そこでピペティングの液量や角度などを検討した結果、安定して採取できるようになった。採取できたスミアを観察したところ、マウスと同様に有核細胞や無核角化細胞が見られたが、小型の多核のように見受けられる細胞が多く含まれているスミア像も見られた。そこで染色方法

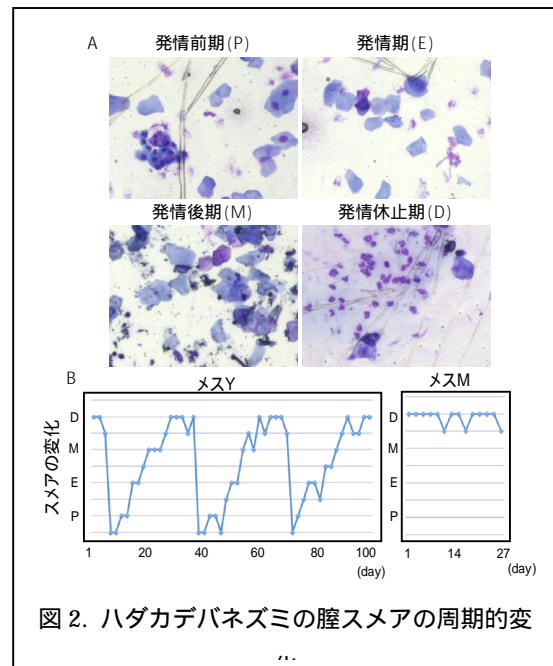


図 2. ハダカデバネズミの膣スミアの周期的変

法を検討することにより、細胞の特定が可能になった。次に、周期的に出産を行っているコロニーの女王の膣スミアを経時的に観察した結果、マウスと同様に有核細胞や無核角化細胞が見られ、性周期の周期的な変動が確認できた(図 2)。同時に、膣スミア法による性周期決定が、尿中プロゲステロン濃度の変動と一致しているかを確かめるために尿を採取し、ELISA による濃度測定を試みた。NMR は水を飲まず、食物である芋や野菜から水分を摂取するため、排尿頻度が低く尿の採取が非常に困難であったが、金網を敷いたケージにしばらく入れておくことにより効率的な採取が可能となった。採取した尿を用い、尿中プロゲステロンの濃度を ELISA 法で測定した。また、通常の ELISA 法では 2-3 日かかり、その間に性周期が進行する恐れがあったが、簡便法により 1 日で測定することも可能となった。本結果は今後、過排卵誘導を行うためのホルモン処理時期の決定に非常に有効である。

### (3) 性周期の同期化

発生工学的技術基盤を整備するにあたり、NMR の性周期は約 34 日と非常に長いため、解析や介入操作が困難である。そこで性周期を人為的に同期化することで、計画的に研究が可能になる。そこで、これまでに手法を立ち上げた膣スミア法をもとに、性周期を決定した女王、および女王から隔離して女王化誘導し、膣スミア法で性周期の変動を確認したメス個体に対して性周期同期化法を検討した。日

数を振って同期化法を検討したところ、日数によらず性周期をほぼ同期化することができた(図 3)。

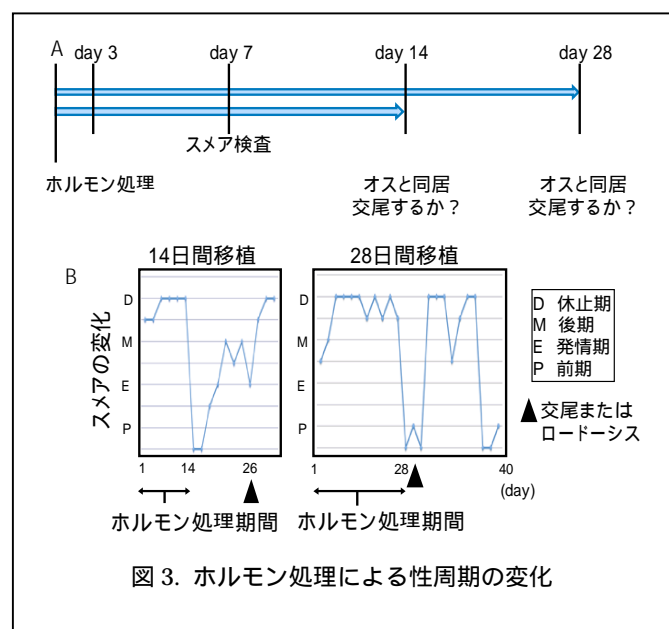


図 3. ホルモン処理による性周期の変化

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

(1) Katori S, Noguchi-Katori Y, Okayama A, Kawamura Y, Luo W, Sakimura K, Hirabayashi T, Iwasato T, Yagi T.

Protocadherin- $\alpha$ C2 is required for diffuse projections of serotonergic axons. *ci Rep.* 7(1):15908. (2017) 査読有. doi: 10.1038/s41598-017-16120-y.

(2) 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

(3) 河村佳見、三浦恭子「ハダカデバネズミを用いた老化研究」, 実験医学増刊, Vol.34, No.7, 181-186. (2016), 査読なし

(4) 大岩祐基, 岡香織, 宮脇慎吾, 河村佳見, 三浦恭子

「古くて新しいバイオリソース 新たな展開 新規実験動物としてのハダカデバネズミの可能性」*Labio* 21 Vol. 64, 5-8. (2016), 査読なし

〔学会発表〕(計1件)

河村佳見、三浦恭子, Unique response of cancer- and senescence-resistant rodent “Naked mole-rat” to cellular senescence induction, 第39回日本分子生物学会年会, 2016

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ

デバ研へようこそ! <https://debalab.org/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

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。