

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430116

研究課題名(和文)ハダカデバネズミの超老化耐性・がん化耐性を制御する細胞内メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of senescence-resistance of the naked mole-rat

研究代表者

河村 佳見 (Kawamura, Yoshimi)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：20505044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミ(NMR)は最大寿命30年を超える齧歯類で、老化耐性・がん化耐性を示す。本研究では、NMRの細胞レベルにおける老化耐性機構を解明するために、NMRの成体線維芽細胞に細胞老化誘導処理を施し、その応答性をマウスと比較解析した。その結果、NMR細胞では細胞老化よりむしろ細胞死が引き起こされた。さらに、NMRにおける細胞老化誘導時の細胞死の責任遺伝子としてGene Xを見出した。また、NMR個体についても細胞老化を誘導した結果、マウスと比較して老化細胞がほとんど出現しないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The naked mole-rat (NMR) is a long-living rodent with the maximum lifespan exceeding 30 years. Moreover, NMR has “senescence-resistant” and “cancer-resistant” phenotypes. In this study, to elucidate NMR’s “senescence-resistant” mechanisms at the cellular level, we subjected NMR skin fibroblasts to cellular senescence stimuli and compared their phenotypes with those of mouse. We found that NMR cells underwent cell death rather than cellular senescence. Moreover, we found the responsible gene for cell death in NMR cells after induction of cellular senescence. We also induced cellular senescence in skins of living NMRs. Compared to mice, we found that senescent cells were rarely detected in NMR’s skin.

研究分野：発生工学

キーワード：ハダカデバネズミ 細胞老化 細胞死

### 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 35 g)、年齢 39 歳を超える生存個体が確認されている異例の長寿動物 (平均生存期間 28 年) である (図 1)。



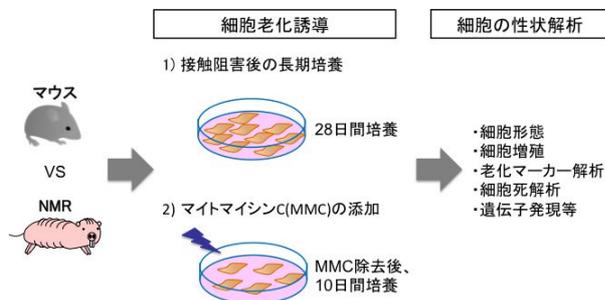
図 1. ハダカデバネズミ (NMR)

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という特徴を持つ。このような老化・がん化耐性 NMR においては、通常より長期間にわたり生体を老化やがん化につながる異常から防衛する機構、すなわち老化細胞および異常細胞が生じにくい機構が特異的に発達しているのではないかと考えられる。しかしながら、直接 NMR 個体の老化耐性を解析することは、その平均寿命が 28 年と長いことから非常に困難である。そこで、我々は近年個体老化との関係が明らかになってきた細胞老化に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、NMR 細胞に細胞老化を誘導し、その応答性をマウスと比較解析することにより、NMR 特異的な老化耐性・がん化耐性を制御する細胞内メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法



細胞老化誘導時にマウスとハダカデバネズミで異なる表現系があるか？

図 2. 研究方法の概要

#### (1) 線維芽細胞の樹立

NMR (1 才) および C57BL/6 マウス (6 週齢) を使用した。NMR は皮膚を清拭し、マウスは剃毛後、それぞれ背中の皮膚を回収して培養

し、組織片から遊走してきた線維芽細胞を初代皮膚線維芽細胞として樹立した。

#### (2) 接触阻害後の長期培養による細胞老化誘導

NMR およびマウス線維芽細胞を播種し、2 日おきに培地交換をしながら培養した。細胞老化の度合いを老化マーカーである SA-β-gal 染色で解析した。また、BrdU を培地中に加えて培養し、抗 BrdU 抗体で陽性細胞を検出することで、細胞の増殖活性を定量した。

#### (3) マイトマイシン C (MMC) による細胞老化誘導

MMC を含む培地で線維芽細胞を培養した後、MMC を含まない新しい培地に交換して培養を行った。細胞老化の度合いを老化マーカーである SA-β-gal の染色で解析した。また、BrdU を培地中に加えて培養し、抗 BrdU 抗体で陽性細胞を検出することで、細胞の増殖活性を定量した。

#### (4) Annexin V/PI 染色による細胞死解析

細胞をトリプシン処理にて分散した後、Annexin V/PI 染色を行い、死細胞の割合を FACS Calibur で解析した。

#### (5) UVB 照射による個体への細胞老化誘導

NMR および被毛のない HR1 マウスの背中に麻酔下で UVB を照射し、皮膚を回収した。これらの皮膚について、クライオスタットで新鮮凍結切片を作製し、SA-β-gal 染色および免疫染色を行った。

### 4. 研究成果

NMR およびマウス線維芽細胞に、接触阻害後の長期培養により細胞老化を誘導した際、NMR ではマウスと比較して SA-β-gal 陽性細胞が少ないことが判明した。このことから、NMR は細胞レベルでも老化耐性があるのではないかと考えられたが、細胞を観察した結果、死細胞様の細胞が多数見受けられた。そこで、Annexin V/PI 染色で細胞死を解析した。その結果、マウスでは死細胞の割合が老化誘導後も変わらないのに対し、NMR では老化誘導していない細胞と比較して死細胞の割合が 4 倍以上上昇していた。このことから、接触阻害後の長期培養により細胞老化を誘導した場合、NMR では細胞老化より細胞死を起こしやすいことが考えられた。さらに、この現象が他の細胞老化誘導法でも見られるのかを解析するために、MMC による老化誘導を行った。その結果、NMR 線維芽細胞はマウスと比較して、老化マーカーである SA-β-gal 陽性細胞の割合が低く、さらにその際、他種ではほとんど見られない細胞死が顕著に亢進するという現象が共通して見られた。

次に、NMR とマウス間で細胞老化誘導時の遺伝子発現を比較した。ヒトやマウスで DNA 損傷などの老化刺激が加わった時、細胞老化

あるいは細胞死を引き起こすことが分かっている遺伝子に着目して定量的 PCR を行った。その結果、マウスではこれらの老化関連遺伝子は、いずれも発現が増加していた。一方、NMR において 2 種類の老化誘導処理で共通して発現上昇していたのは Gene X のみであった。

そこで、この Gene X が NMR 特異的な細胞死を引き起こす候補遺伝子ではないかと考え、老化していない NMR 及びマウスの線維芽細胞に NMR あるいはマウスの Gene X を強制発現した。その結果、NMR およびマウスのどちらの細胞でも、どちらの種の Gene X を発現させた場合でも、増殖の停止や細胞の扁平化といった老化細胞様の形態を示した。一方、Annexin V/PI 染色で細胞死を解析したところ、NMR 細胞のみで、Gene X を過剰発現した際に細胞死が引き起こされていることが明らかとなった。どちらの種の Gene X でも細胞死は増加していたことから、NMR の Gene X が直接的な細胞傷害性を持つのではなく、Gene X 下流の遺伝子群が細胞死を引き起こしていると考えられる。

そこで、Gene X を過剰発現した細胞に対し RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現がどのように変化しているかを解析した。GO 解析を行い、発現上昇した遺伝子群を GO term ごとに調べた結果、NMR のみで細胞死関連遺伝子群の発現上昇が認められた。また、細胞老化誘導時に Gene X をノックダウンした場合の細胞応答を解析した。NMR 線維芽細胞において Gene X を shRNA でノックダウンし、MMC による細胞老化誘導を行ったところ、ノックダウンしていない時と比較して細胞死が減弱することが判明した。このことから、候補遺伝子 Gene X が、細胞老化誘導時に生じる細胞死の責任遺伝子であると示唆された。Gene X のノックダウンによって細胞死が全く起こらなくなるわけではないことから、下流遺伝子などについても解析を進めているが、NMR 特異的に働くシグナル経路について一定の見解が得られた。

さらに、これまで線維芽細胞において見られたような細胞老化誘導時の NMR 特異的な細胞死が、個体においても生じるのかどうかを解析するために、紫外線照射による皮膚への細胞老化誘導系を立ち上げた。NMR 及び被毛のない HR1 マウスに UVB を照射して細胞老化を誘導後、皮膚を回収し、切片を作製した。細胞老化のマーカーである SA-β-gal 染色を行った結果、HR1 では UVB を照射した皮膚において多数の陽性細胞が見られたのに対し、NMR では陽性細胞が非常に稀にしか認められなかった。HR1 マウスはアルビノであるが、NMR は色素を持つので UV の照射に耐性を持つ可能性が考えられた。そこで、2 倍の線量の UVB を照射して、皮膚を回収した。角質が剥がれ、表皮が肥大していたことから、UV の影響は受けていると考えられた。切片を作製して SA-β-gal 染色を行ったところ、同様に陽

性細胞が非常に少なかった。このことから、個体においても培養細胞と同様に、NMR はマウスに比べて細胞老化誘導時に出現する老化細胞が少ないことが判明した。現在、皮膚切片における細胞死マーカー解析および Gene X 等の発現解析を行っている。

以上のことから、細胞老化誘導によって Gene X 等が発現上昇することで、通常マウスでは細胞老化が引き起こされるが、NMR では NMR 細胞特異的なシグナル経路により細胞死が引き起こされることが示唆された。さらに個体において細胞老化を誘導した際にも、マウスは老化細胞が多数出現するのに対し、NMR ではほとんど見られなかった。このような機構は、老化細胞の出現及び増加を積極的に抑えることで、老化の抑制ひいては長寿命化に寄与している可能性がある。現在、細胞老化誘導時に細胞死を引き起こす NMR 細胞特異的なシグナル経路の詳細を明らかにするとともに、個体における解析も進めている。

NMR の細胞老化について解析した研究は世界でも報告されておらず、本研究は NMR の顕著な老化耐性メカニズムの解明に大きく貢献するものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

(1) 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), 査読あり, DOI: 10.1038/ncomms11471

(2) 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

(3) Miyawaki S, Kawamura Y, Hachiya T Shimizu A, Miura K. Molecular cloning and characterization of the Ink4a and ARF genes in naked mole-rat. Inflammation and Regeneration, 35(1):42-50 (2015), 査読あり, DOI: 10.2492/inflammregen.35.042

(4) 河村佳見, 宮脇慎吾, 大岩祐基, 岡野栄之, 三浦恭子「ハダカデバネズミ: 老化と主要研究の新しいモデル」, 生体の科学, Vol.66, No.6, 589-594. (2015), 査読なし

(5) 河村佳見, 宮脇慎吾, 岡野栄之, 三浦恭子「ハダカデバネズミ-なぜそんなに長生きでがんにならない?」, 化学と生物 Vol. 52,

No. 3, 189-192. (2014), 査読あり

他 2 件

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 河村佳見

「老化・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」、北大・部局横断シンポジウム、2016 年 3 月 7 日、北海道大学医学部学友会館フラテホール(北海道・札幌市)

(2) 河村佳見

「老化・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」、酸素生物学・ダイニングコード合同若手会議、2016 年 1 月 27 日、一宮シーサイドオーツカ(千葉県・一宮町)

(3) 河村佳見

「老化・がん化耐性げっ歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」、第 37 回(2015 年)日本基礎老化学会シンポジウム「モデル動物の多様性から探る老化現象の普遍性」、2015 年 10 月 31 日、東京都健康長寿医療センター(東京都)

(4) 河村佳見

Unique response of cancer- and senescence-resistant rodent “Naked mole-rat” to cellular senescence induction、The 10th International Symposium of the Institute Network、2015 年 7 月 23-24 日、北海道大学医学部学友会館フラテホール(北海道・札幌市)

(5) 河村佳見

「アフリカの奇妙な齧歯類“ハダカデバネズミ”～がん化耐性・長寿の不思議」、第 15 回日本抗加齢医学会総会、2015 年 5 月 29 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

(6) 河村佳見

「老化・癌化耐性齧歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(7) 河村佳見

「老化・がん化耐性げっ歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」、第 79 回日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会、2014 年 6 月 19 日、北海道大学医学部学友会館フラテホール(北海道・札幌市)

(8) 河村佳見

「老化・がん化齧歯類ハダカデバネズミの細胞老化誘導に対する応答性」、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 03 日、神戸

ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/debanezumi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 佳見 (KAWAMURA YOSHIMI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：20505044

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

三浦 恭子 (MIURA KYOKO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師  
研究者番号：80583062