

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670148

研究課題名(和文)ハダカデバネズミの長寿・癌化耐性と集団内利他的社会性をもたらすゲノム安定性の解明

研究課題名(英文)Mechanism of genomic stability of the naked mole rat

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミは、最大寿命30年の長寿、がん化耐性をしめす真社会性齧歯類である。本研究では、ハダカデバネズミのゲノム安定性を検討するため、DNA傷害への応答性について解析を行った。マイトマイシンCや放射線照射後の応答をマウスと比較解析した結果、急性のDNA傷害に対しては、ハダカデバネズミ特異的な耐性が存在する可能性が考えられた。また、DNA傷害に関連して発現が上昇するgene Xについて、geneXの配列をハダカデバネズミ型に改変したノックインマウスの作出にむけて、組換えES細胞の樹立を行った。

研究成果の概要(英文)：Naked mole-rat (NMR) is one of only two eusocial mammals like ant or bee. NMR's maximum lifespan exceeds 30 years although their body size is same as mouse. Moreover, these animals have never been observed any spontaneous tumor formation. The purpose of this study is to test whether NMR cells have the resistance to DNA damage or not. We treated the cells with mitomycin C or radiation, and found that NMR cells may have the resistance to acute DNA damage. Furthermore, we generated knock-in ES cells carrying NMR-gene X, which contribute to the DNA damage response, toward the generation of NMR-gene X knock-in mouse.

研究分野：分子生物学

キーワード：ハダカデバネズミ naked mole rat

1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミ(naked mole rat)は、エチオピア・ケニア・ソマリアの地下に集団で生息する齧歯類である(図1)。マウスとほぼおなじ大きさであるにも関わらず、異例の長寿命(平均生存期間28年)であり、今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、がん化耐性の特徴を持つ。



図1. ハダカデバネズミ

自然環境では、ハダカデバネズミは、サバンの地下の比較的安定な環境(温湿度の変化が少なく、外敵が少ない)に生息し、アリやハチに類似した分業制の真社会性コロニーを形成する。一つのコロニーは、繁殖を行う1匹のQueen、1-3匹のKing、そして多数の非繁殖個体から構成され、分業制の集団生活を営む。

我々は、ハダカデバネズミのがん化耐性・老化耐性の獲得と真社会性の発達に、ゲノムDNAの安定性が関与しているのではないかと考えた。そこで、DNAの安定性や損傷に対する応答性について、比較解析を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究では、*in vitro*におけるハダカデバネズミのDNA損傷への応答性およびDNA損傷に関連して発現が上昇するgene Xの機能解析を行うことを目的とした。なお、当初、ハダカデバネズミのゲノム多様性が低いという報告があり、真社会性の成立との関係性が想定されたため、ハダカデバネズミのケニアでの野生個体の採取およびマイクロサテラ

イトの解析も検討していたが、当該地域での政情の不安定化に加え、他グループから、野生のハダカデバネズミ集団内のゲノム多様性は地域により異なる(Athi Riverを境に、多様性が高い地域と多様性が低い地域がある)という報告もあったことから(Ingram et al., 2015)、野生個体のゲノム採取を行う意義が低下したため、ケニアへの渡航は行わず、*in vitro*での解析に特化することとした。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞の樹立

ハダカデバネズミ(1才)およびC57BL/6マウス(6週齢)を使用した。ハダカデバネズミは皮膚を清拭し、マウスについては剃毛後、背中中の皮膚を回収してペニシリン/ストレプトマイシン入りPBSで洗浄した。皮膚を3mm四方程度の大きさに細断後、15%FBS/DMEMで懸濁してゼラチンコート培養皿に播種した。32℃、5% O₂、5% CO₂にて培養し、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) マイトマイシンCによるDNA傷害

マイトマイシンC濃度がそれぞれ0 nM、40 nM、200 nM、1000 nM、5000 nMとなるように添加した培地で線維芽細胞を24時間培養した。その後、上記濃度のマイトマイシンCを添加した新しい培地で培地交換を行い、さらに24時間培養した。PBSで2回洗浄後、マイトマイシンCを含まない新しい培地に交換して培養し、5日目と10日目に回収して各種アッセイを行った。回収の24時間前にBrdUを培地中に加えて培養し、サンプルを回収後、抗BrdU抗体で陽性細胞を検出することで、細胞増殖を定量した。

(3) 放射線によるDNA傷害

線維芽細胞に15 GyのX線を照射し、24時間、4日間、10日間、14日間培養した。

(4) 細胞死解析

細胞を回収し、Annexin V-PI 染色を行った。アポトーシス細胞の割合を FACS Calibur で解析した。

(5) 組換え ES 細胞の作出

ハダカデバネズミ gene X CDS-Ires2-AcGFP1-pA-loxP-pGK-neo-pA-loxP のカセットを構築し、PCR により arm をつけて増幅後、gene X の周辺領域のマウス BAC(Bacterial artificial chromosome)を購入し組換えをおこなった。組換えには Red/Et recombination kit を使用した。ES 細胞のターゲティング効率を上昇させるため、BAC を ES 細胞に導入する際に、マウスの geneX を標的としたガイド RNA を設計し、CRISPR/Cas9 による DSB の誘導も行った。ES 細胞の組換えに関しては、まず B6 由来の ES 細胞に、20 ug の組換え BAC と 10 ug の CRISPR/Cas9 ベクターをエレクトロポレーション法により導入した。導入後の ES 細胞は MEF フィーダー上で培養し、ネオマイシンによるセレクション後、サザンプロットと PCR により、目的の領域が組換わったマウス ES 細胞を確認し、目的のクローンを得た。

4 . 研究成果

DNA 傷害剤であるマイトマイシン C に対する応答性を解析するために、マイトマイシン C を 0 nM、40 nM、200 nM、1000 nM、5000 nM の濃度で添加して培養した。BrdU を用いて細胞増殖を解析したところ、マウスは 200 nM で処理した後 10 日間培養すると BrdU 陽性の細胞が出現しなくなったのに対し、ハダカデバネズミでは BrdU 陽性細胞が 20%程度存在していた。1000 nM を添加した群ではマウスおよびハダカデバネズミで BrdU 陽性細胞が消失した。このことから、ハダカデバネズミはマイトマイシン C に対する感受性がマウスよ

り低いことが考えられた。また、DNA 損傷に対する応答性を解析するために、マウス及びハダカデバネズミ線維芽細胞に X 線照射を行った。その結果、照射後に残存した細胞の核の変形や DNA 損傷マーカーの発現上昇が、マウスに比べて軽微である傾向が認められた。これらのことからハダカデバネズミでは、急性の DNA 傷害に対する抵抗性が存在する可能性が考えられた。別解析において、マイトマイシン処理後時間をおいて細胞老化を誘導した場合には、ハダカデバネズミではマウスより顕著に細胞死が亢進することも判明したため、今後、多角的に解析を進めていく。

また、我々は次に、DNA 損傷に関連する遺伝子 X について機能解析を行ったところ、配列・発現制御について種特異性を見出した。

そこで、gene X の配列をハダカデバネズミ型に改変したマウスの作出に向けて、マウス ES 細胞のターゲティングを行うこととした。ターゲティングには、マウス gene X をハダカデバネズミ gene X に組換えした BAC vector と、CRISPR/Cas9 を組み合わせて用いた。サザンプロットによって組換えを評価したところ、3/32 クローンにおいて、相同組換えが生じており、およそ 10%の高確率で、ヘテロ変異体の組換え ES 細胞を樹立することができた。現在、gene X の強制発現等の *in vitro* での機能評価をさらに詳しく進めている。また、テニュアトラック研究者として独立し、自らの研究室に高効率にキメラマウスを作出する胚操作系を立ち上げた。今後、NMR-gene X 組換え ES 細胞からのキメラマウスの作出を経て、gene X のハダカデバネズミ化マウスの作出を行い、がん化耐性能力の獲得の有無について、機能解析を進めていく。

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4件)

1. 岡 香織、三浦 恭子
「老化・がん化耐性研究の新たなモデル：ハダカデバネズミと長寿動物を用いた 老化学」、生化学、88(1): 71-77 (2016) 査読有
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2016.880071
2. 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) 査読有
doi:10.2492/inflammregen.35.042
3. 宮脇慎吾, 河村佳見, 三浦恭子, 「ハダカデバネズミの不思議 - がんにならず長生きするには - 」, *現代化学*, No.530, 32-34. (2015) 査読無
4. 三浦恭子, 「総説 おもしろいバイオロジー 第 5 回 『めっちゃ!おもしろい!ハダカデバネズミ!: 超長寿・がん化耐性・社会性のひみつを探る』」, *細胞工学*, Vol.32, No.4, 461-465. (2013) 査読無

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 三浦恭子
「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～」
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) ワークショップ、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市) 2015 年 12 月 1 日 (火)
2. 清水厚志 「ハダカデバネズミをモデルとした低酸素適応機構の解明」 第 13 回 がんとハイポキシア研究会 / 国立遺伝学研究所研究会、口頭発表、国立遺伝学研究所 (静岡・三島) 平成 27 年 6 月 5 日 (金) ~6 日 (土)
3. 三浦恭子
「なぜ? どうして? がんにならない超長寿ハダカデバネズミ」, 日本発生物学会第 47 回大会市民公開講座、口頭発表、名古屋大学 (愛知県・名古屋市) 2014 年 5 月 31 日 (土)
4. 三浦恭子, 宮脇慎吾, 清水厚志, 八谷剛

史, 土屋喜洋, 新井奈月, 成田年, 榊原康文, 岡野栄之

「老化耐性・がん化耐性ハダカデバネズミの分子生物学的研究の展開」日本動物学会 第 84 回 岡山大会、シンポジウム口頭発表、岡山大学 (岡山県・岡山市) 2013 年 9 月 28 日 (土)

〔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

三浦 恭子 (KYOKO MIURA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師

研究者番号：80583062

(2) 研究分担者

清水 厚志 (SHIMIZU ATSUSHI)

岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・特命教授

研究者番号：30327655