

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14602

研究課題名(和文)がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミ特異的ながん化抑制バリアの形成メカニズム

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of cancer-resistance in 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・准教授

研究者番号：80583062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミ(Naked mole rat, NMR)は、マウスと同等の大きさ(平均体重35g)ながら異例の長寿動物(平均寿命28年)であり、これまで自発的な腫瘍形成が一切認められていないというがん化耐性の特徴をもつ。本研究では、NMR個体のがん化耐性を制御すると考えられる、「NMR特異的ながん化抑制バリア ASIS (ARF抑制時細胞老化)」の形成機構・役割を詳細に明らかにすることを目的とした。mRNA-seqによる解析の結果、発現変動する遺伝子群、また、ASISにおけるNMR種特異的なシグナル伝達制御が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The naked mole rat (NMR) is the longest-living rodent in the world and has extraordinary cancer-resistance. We studied the mechanisms of NMR-specific tumor-suppressive phenomenon, ASIS (ARF suppression-induced senescence). We performed mRNA-seq analyses and found the genes which are upregulated or downregulated upon ASIS induction. We also found NMR-specific regulation of signal transduction in ASIS.

研究分野：幹細胞学、老化生物学、ハダカデバネズミ

キーワード：ハダカデバネズミ

1. 研究開始当初の背景

ハダカデバネズミ (Naked mole rat, NMR・
図 1) は、マウスと同等の大きさ (平均体重
35 g) ながら異例の長寿動物 (平均寿命 28



図 1. ハダカデバネズミ

年) であり、これまで自発的な腫瘍形成が一切認められていないというがん化耐性の特徴をもつ。

これまでに申請者らは、NMR-iPS 細胞は種特異的に腫瘍化耐性であり、免疫不全マウスへ移植した際に造腫瘍性を持たないこと、その原因として、NMR 種特異的に iPS 細胞でがん抑制遺伝子 ARF の発現が活性化していることを突き止めた。通常、細胞はがん化や初期化ストレスにさらされると、ARF などのがん抑制遺伝子が発現し、がん化や初期化が抑制される。しかし遺伝子変異などの何らかの理由により、がん抑制遺伝子が抑制・欠失すると、細胞はがん化・初期化されると考えられる。しかしながら、興味深いことに NMR には、がん化・初期化ストレス存在下で上昇した ARF の発現が低下するような異常な状況の際に、強力に細胞老化を引き起こす、NMR 特異的ながん抑制バリア、ASIS (ARF suppression-induced senescence) が存在することが判明した。解析を進めた結果、この ASIS によって ARF が活性化された腫瘍化耐性 iPS 細胞が選択的に得られることを明らかにした。さらに、これまでの解析により、この NMR 特異的な ASIS は、iPS 細胞のみならず体細胞の腫瘍化をも抑制している可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、NMR 個体のがん化耐性を制御すると考えられる、「NMR 特異的ながん抑制バリア ASIS」の形成機構・役割を詳細に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq による ASIS 特異的な変動遺伝子群の探索

ASIS の誘導メカニズム解明のため、ASIS を誘導した細胞を経時的に回収し、mRNA-seq を実施した。ASIS において特異的に発現上昇する遺伝子を抽出するため、まず ASIS で発現が上昇している遺伝子 Top200 から、p16 を過剰発現させ通常の細胞老化を誘導した場合に発現が上昇する遺伝子を除外した。また同様に、ASIS において特異的に発現低下している遺伝子を抽出した。

(2) ASIS 特異的な変動遺伝子群の発現確認

上記で見出した遺伝子群について、定量 PCR およびウェスタンブロッティングにて発現を確認した。

(3) レンチウイルスによる ASIS 特異的な変動遺伝子のノックダウン

上記で見出した遺伝子群について、発現抑制を行うために、ノックダウンベクターを構築し、レンチウイルスにて細胞に導入した。

4. 研究成果

これまでに、ASIS によって細胞老化した細胞では、INK4a を含む INK4 ファミリーや p21 などの CIP/KIP キナーゼの発現亢進が認められないことが明らかとなっていた。しかしながら、細胞老化のフェノタイプが明確に現れる以前においても、これらの遺伝子の関与がないのかは不明であった。そこで ARF をノックダウンしてから細胞老化が誘導されるまでの

期間で、NMR 線維芽細胞の経時的なサンプリングを実施し、ASIS 初期に変動するタンパク質および mRNA の発現解析を行った。その結果、INK4a や p21 といった既知の細胞老化誘導因子は、ARF ノックダウン後に一過的な発現亢進も認められず、ASIS においては新規の細胞老化誘導因子が関与している可能性が強められた。

この因子の探索のため、INK4a 依存的細胞老化と比較解析をおこなったところ、ASIS において特異的に発現上昇する遺伝子群および ASIS において特異的に発現低下している遺伝子群を抽出した。現在までにこれらの遺伝子の過剰発現またはノックダウン実験を行い、ASIS に与える影響について解析を行っている。また、得られた結果について Gene Set Enrichment Analysis を行った。その結果、DNA 傷害など従来知られている方法によって誘導される細胞老化とは、全く異なるシグナル伝達経路に属する遺伝子群の発現が亢進および抑制されていることが明らかとなった。このことから、細胞老化の制御に極めて重要なシグナル伝達経路に、NMR 種特異的な制御機構が存在している可能性が考えられた。

次に RNA-seq により見出されてきた NMR 種特異的なシグナル伝達制御機構が、ASIS において確かに見られるかをウェスタンブロットティングおよびタンパク質のラベリング実験にて確認した。

今回明らかになった NMR 種特異的なシグナル伝達制御は、細胞老化だけでなく、細胞のがん化や細胞死など、様々な現象に関わる可能性も考えられるものである。そこで、ASIS の解析から明らかになったシグナル伝達制御機構が、例えばがん遺伝子の活性化の際に、どのように変動するのかを評価し、NMR の種特異的なシグナル伝達制御機構が、NMR のフェノタイプとどのような関わりを見せるのか、検討していく予定である。

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4件)

(1) 三浦恭子「長寿齧歯類ハダカデバネズミを用いた老化研究」, *基礎老化研究*, Vol.41(2), 3-8. (2017), 査読あり

(2) 三浦恭子「老化の比較生物学-長寿齧歯類ハダカデバネズミを例に」, *実験医学*, Vol.35(20), 61-66. (2017), 査読なし

(3) 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), doi: 10.21769/BioProtoc.2518, 査読あり

(4) 大岩祐基、岡香織、宮脇慎吾、河村佳見、三浦恭子「新規実験動物としてのハダカデバネズミの可能性」, *LABIO21*, Vol.64(4), 5-8. (2016), 査読なし

[学会発表](計6件)

(1) 坊農秀雅「デバアノテーションのひみつ」, 2017 年度国立遺伝学研究所研究集会 Annotathon2017, 2017 年 11 月 16~17 日, 国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)

(2) 坊農秀雅「ハダカデバネズミのトランスクリプトームデータの再解析」, 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 29 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3) Kyoko Miura, Unique response of cancer- and senescence-resistant rodent “Naked mole-rat” to cellular senescence

induction, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Aging and Mechanisms of Aging-Related Disease (E2)(国際学会), 2017年5月18日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(4) 三浦恭子, Species-specific regulation of cellular senescence in the naked mole-rat, the longest-lived and cancer-resistant rodent., CiRA Open Seminar(招待講演), 2017年1月26日, 京都大学 iPS 細胞研究所(京都府・京都市)

(5) 河村佳見, 三浦恭子「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」, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月2日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(6) 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・老化耐性・社会性の謎に挑む!」, 第56回生命科学夏の学校(招待講演), 2016年8月26日～2016年8月28日, 小原温泉 旅館かつらや(宮城県・白石市)

[その他]

ホームページ等

動物機能医科学研究室

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

坊農 秀雅 (BONO, Hidemasa)

大学共同利用機関法人情報・システム 研究機構(新領域融合研究センター、DBCLS)・准教授

研究者番号：20364789

(3) 連携研究者

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・教授

研究者番号：30327655

(4) 研究協力者

大岩 祐基 (OIWA, Yuki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・大学院生