

研究報告書

「超長寿げっ歯類ハダカデバネズミを用いた「積極的老化予防」機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 11 月

研究者: 三浦 恭子

1. 研究のねらい

近年の医学の発展によりヒトの平均寿命は延びつつあるが、がん・脳機能の低下・心疾患・血管疾患などの様々な老化関連疾患により、健康を維持したまま天寿を全うすることは困難であるのが現状である。積極的な老化／老化関連疾患の予防法を開発するためには、既存のモデル動物のみを解析対象とするのではなく、「進化的に長寿化している」と考えられる動物の生体恒常性維持機構を解明することが、極めて重要である。

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、最大寿命>30年という異例の長寿齧歯類である。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、その期間は加齢に伴う死亡率の上昇も認められない。超高齢(28才以上)になると加齢性変化(筋肉量の減少、リポフスチンの沈着等)が認められてくるが、自発的な腫瘍形成はほとんど認められていない。つまりNMRは、老化そのものの、そしてがんを含む老化関連疾患に対して、極めて抵抗性を示す特異な哺乳類であると考えられる。

我々は現在、日本の研究機関で唯一のNMR飼育施設を有しており、これまでに、NMRの分子生物学的解析のために必要となる基礎的な研究基盤の構築を進めてきた。

本申請研究では、これまでに確立してきた研究基盤を元に、NMRの老化／老化関連疾患耐性に関わると考えられる、NMR特異的な現象の探索、分子機構の同定を目指して、研究を行った。本さがけ研究期間中は、NMRの個体数が少なく貴重であったため、NMR-iPS細胞や線維芽細胞などの培養細胞、臓器での遺伝子発現情報を用いて、NMR特異的な老化耐性・がん化耐性現象と、関与する遺伝子に着目し、研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

近年、細胞のがん化とリプログラミング過程には共通する多くの防御機構が存在することが明らかとなってきた。今回、老化・がん化耐性齧歯類NMR(図1)からiPS細胞を作製して性状を解析したところ、NMR-iPS細胞は*in vitro*での三胚葉系の細胞への分化能をもつにも関わらず、ヒトやマウス由来のiPS細胞の特徴である、未分化状態での造腫瘍性(奇形腫形成能)を示さないことが明らかとなった。解析の結果、NMR-iPS細胞では、種特異的ながん抑制遺伝子ARFの活性化とがん遺伝子ERASのフレームシフト変異によって腫瘍化耐性が制御されていることが判明した。また、iPS細胞樹立過程の解析から、NMR特異的ながん抑制機構ASIS(ARF suppression-induced senescence)を同定した。



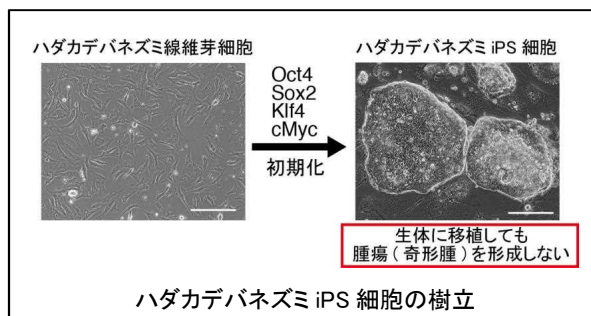
ハダカデバネズミ

ASIS は NMR 特異的な iPS 細胞の腫瘍化耐性に加えて、生体内のがん化耐性にも寄与すると考えられる。本内容は 2016 年に論文化した(論文 1, 学会発表 1, プレスリリース 1)。また、マウスと NMR 間の ARF の配列差について、2015 年に論文化した(論文 2)。次に、NMR の線維芽細胞において細胞老化を誘導したところ、NMR では、ヒト・マウスでは生じない、動物種特異的な「老化細胞死」が生じることを見出した。解析の結果、ある細胞老化関連遺伝子が発現上昇すると、NMR 特異的にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。また、*in vivo* で細胞老化を誘導した場合も、マウスと異なり、NMR では細胞老化がほとんど起こらず、細胞死の亢進が認められた。近年、老化細胞の蓄積が個体の老化と密接に関連することが報告されている (Baker et al., *Nature*, 2011, 2016)。NMR 特異的な「老化細胞死」による老化細胞の蓄積の抑制は、NMR 個体の老化耐性の一因であると考えられる。本内容は現在論文投稿準備中である。

(2) 詳細

・研究テーマ A 「NMR-iPS 細胞を用いた NMR 特異的ながん化抑制機構 ASIS の同定」

NMR 皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて Oct4, Sox2, Klf4, cMyc を導入したところ、NMR-iPS 細胞の作製に成功した(右図)。解析の結果、NMR-iPS 細胞は培養下で三胚葉由来の細胞への分化能をもつにも関わらず、未分化な状態で移植しても、他の動物の iPS 細胞のように腫瘍(奇形腫)を

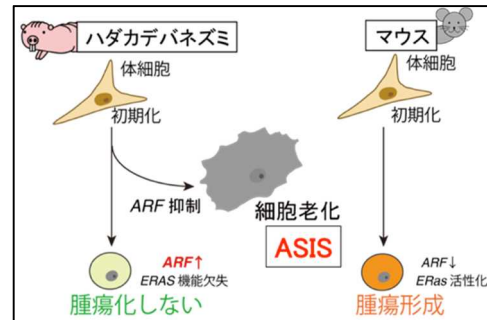


形成しなかった。腫瘍形成能を持つマウスやヒトの iPS 細胞では、2 つのがん抑制遺伝子、Ink4a と ARF の発現が強く抑制されていることが知られている。解析の結果、NMR-iPS 細胞では、INK4a の発現は抑制されているが、ARF の発現は活性化状態にあった。また、マウス ES 細胞の腫瘍形成能を正に制御するがん遺伝子 ERAS の配列を解析したところ、NMR-ERAS で種特異的なフレームシフト変異が生じていた。そこで NMR-iPS 細胞で、ARF のノックダウンとマウス ERAs の導入を行ったところ、腫瘍形成能が獲得された。さらにマウス iPS 細胞で NMR と同様に Arf を発現させると、腫瘍形成能が著しく抑制された。以上から、NMR-iPS 細胞では ARF の活性化と ERAS の機能欠失により腫瘍化耐性がもたらされていると考えられる。

ARF は初期化やがん化のストレスにตอบสนองして活性化し、細胞増殖を止める働きをもつ。ARF による防御機構を突破した細胞が iPS 細胞やがん細胞になると考えられている。実際、iPS 細胞や多くのがんでは ARF が抑制または欠失していることが報告されている。また、マウス iPS 細胞の作製過程で Arf を抑制すると、iPS 細胞の樹立効率が上昇することが知られている。そこで我々は、NMR で同様の実験をおこない、初期化ストレスに対する応答性を検証した。NMR 線維芽細胞に初期化因子を導入して初期化ストレスを与えたところ、マウスやヒトと同様に ARF の活性化が認められた。次に、初期化ストレス下で活性化した ARF をノックダウンしたところ、マウスとは対照的に、NMR 線維芽細胞は増殖を停止して初期化された細胞が出現しなくなった。解析の結果、ARF が抑制された NMR 線維芽細胞では、がん抑制機構の一つであ

る「細胞老化」が生じていた。我々はこの現象を、NMR 特異的な腫瘍化耐性機構のひとつとして、ASIS (ARF suppression-induced senescence)と命名した。NMR では、ASIS により ARF が抑制された細胞が増殖停止するため、対照的に、増殖する細胞である、ARF 活性化型の腫瘍化耐性 iPS 細胞が選択されたと考えられた。解析の結果、cMYC の過剰発現や培養による増殖ストレスなどのがん化ストレス下でも、同様に ASIS が生じることが判明した。

マウスやヒトなどの哺乳類の細胞では、初期化やがん化のストレスを受けると、防御機構としてがん抑制遺伝子 ARF が活性化され、その抑制もしくは破綻の結果として、腫瘍形成能をもつ細胞が出現する。一方で NMR では、ARF の活性化のみならず、活性化された ARF が抑制されてしまう状況下でも ASIS が機能し、二重の防御機構で初期化やがん化を抑制すると考えられた(右図)。



iPS 細胞は、様々な細胞へと分化する多能性を持つことから、細胞移植治療への応用が期待されているが、未分化状態での腫瘍形成能が細胞移植治療の障害の一つになっている。今回明らかになった NMR-iPS 細胞に特有の腫瘍化耐性機構を応用することで、将来、より安全なヒト iPS 細胞の作製につながる可能性があるかもしれない。また、ASIS では、細胞老化誘導において重要な役割をもつ INK4a, p21 の発現上昇が起こらないことが判明しており、その誘導機構は未だ不明である。引き続き分子機構の解明を進めることで、NMR の「体のがん化耐性」の仕組みが明らかになり、将来的にヒトに応用できる新たながん化抑制方法の開発につながることを期待される。

3. 今後の展開

これまでの解析により、NMR 特異的な老化耐性機構・がん化耐性機構として、「ASIS」と「老化細胞死」の現象・分子機構の一端が明らかになった。これらの現象は新規かつ NMR 特異的であり、制御機構と誘導因子に関しては、いまだほとんどが不明である。今後、ASIS と老化細胞死の制御機構・誘導因子の解明を目指して研究を推進する。申請者らの最終的な目標は、NMR にて同定した耐性因子を導入することで、マウス個体・ヒト細胞で、NMR の老化耐性・がん化耐性を再現することである。そのため、今後、ASIS 誘導因子・老化細胞死誘導因子を導入した遺伝子改変「デバ化マウス」を作出し、がん化耐性・老化耐性能を獲得させることを目指す。

今回のさきがけ研究では、個体数の制限から、*in vivo* での臓器や生体を用いた解析がほとんど進められなかったのが残念な点であった。しかし、本研究期間での繁殖法の改善が功を奏し、この4年で NMR の頭数は 50 頭から 300 頭に増大し、*in vivo* の解析を行うことが可能になりつつある。現在、さきがけでのネットワークを含めて、日本全国の各分野の専門家と、デバ研究ネットワークを広げていっている。今後、このネットワークを駆使し、様々な解析手段を組み合わせ、ハダカデバネズミの老化耐性・がん化耐性のメカニズムの全容の解明に迫りたい。上述の ASIS、老化細胞死の解析に加えて、組織幹細胞、脂肪、炎症、免疫、ミトコンドリア、腸内細菌、薬剤・遺伝子導入による発がん誘導への応答性などに着目し、共同研究も含めて、研究を展開する。また、現在要望が増大している、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変ハダカデバネズミの作出について、系の確立を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究を実施することで、NMR 特異的ながん抑制機構 ASIS と、NMR 特異的な老化抑制機構「老化細胞死」について、現象・分子機構の一端を明らかにすることが出来た。老化細胞死について論文化まであと一歩であることと、上記現象の誘導因子の同定にはまだ至っていないのが残念な点ではあるが、これまでに立ち上げた基礎的な研究基盤を元に、ほぼゼロの状態から、細胞レベルでの NMR 特異的な老化耐性・がん化耐性現象と機構の一端を明らかにすることが出来たのは、本研究課題での成果であると考えている。本結果に関しては、15年後の社会実装を目指していきたい。また、本研究期間でNMRの繁殖方法の改善に成功し、個体数を50頭から300頭に増加させることができたのも、成果のひとつである。現在も極めて順調に個体数が増加しつつあり、次のステップにおいて、さらに日本における NMR 研究を本格化させて、各研究分野に展開させるための目処を立てることができた。また、研究実施体制・研究費執行についても、適切に運営することで、上記の成果につなげることが出来た。今後、予想外の老化抑制・がん抑制機構の同定を目指すと同時に、将来的にヒトに応用可能な耐性因子の同定を目指して、国内外の各分野の研究者と協力しながら、ハダカデバネズミ研究をさらに深めていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、老化およびがんを含む老化関連疾患に対して高度の抵抗性と異例の長寿を示すハダカデバネズミ(Naked mole rat, NMR)を対象として、NMR-iPS細胞や線維芽細胞などの培養細胞と臓器での遺伝子発現情報を用いて、NMR 特異的ながん化ならびに老化耐性とそれに関与する遺伝子に着目して検討した。その結果、種特異的ながん抑制遺伝子 ARF の活性化とがん遺伝子 ERAS のフレームシフト変異によってがん化耐性が制御されていることを明らかにした。また、iPS細胞樹立過程の解析から、NMR 特異的ながん抑制機構 ASIS (ARF suppression-induced senescence)を同定し、論文発表を行った。また、NMR 特異的な「老化細胞死」による老化細胞の蓄積の抑制は、NMR 個体の老化耐性の一因であると考えられる結果も得ている。

今後、ASIS と老化細胞死の制御機構・誘導因子の解明を目指して研究を推進し、NMR にて同定した耐性因子を導入することで、マウス個体・ヒト細胞で、NMR の老化耐性・がん化耐性を再現することを目標として研究を発展させることが期待される。

研究期間内にテニュアトラックで独立。さらに、さがけ研究期間にテニュアトラックを終了し准教授に就任し、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

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, 2016, 10;7:11471
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, 2014, 35(1):42-50

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. **Miura K.**, Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats.
Cold Spring Harbor Meeting, Mechanisms of Aging, アメリカ、ニューヨーク、2016年9月27日
2. **三浦恭子**, 長寿・がん化耐性ハダカデバネズミの分子生物学
第39回日本分子生物学会年会 公募シンポジウム、日本、神戸、2015年12月1日

受賞

平成28年度 北海道大学 研究総長賞 奨励賞

プレスリリース・報道・取材

1. がんになりにくい長寿ハダカデバネズミから初めてiPS細胞作製に成功
2016年5月10日 URL:<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160510/>
同プレスリリースについて、朝日新聞デジタルを始め、ウォール・ストリート・ジャーナル日本版、日本経済新聞、北海道新聞、京都新聞、神戸新聞、日刊工業新聞などの紙面、オンライン版に掲載された。北海道医療新聞では特集として掲載された。
2. 朝日新聞出版「AERA」2014年12月29日-1月5日合併号で、「日本を突破する100人」として紹介された。