

## ハダカデバネズミの超老化耐性・がん化耐性機構の解明

北海道大学 遺伝子病制御研究所 動物機能医科学研究室

三浦 恭子

### 1. はじめに

ハダカデバネズミ(NMR・右図)は、アフリカのケニア・エチオピア・ソマリアの地下に集団で生息する齧歯類である(Jarvis, 1981)。NMRは、マウスと同等の大きさながら(平均体重35 g)異例の長寿動物(平均寿命28年)であり、これまでに自発的な腫瘍形成が一切認められていないという特徴を有する(N=800)(Buffenstein, 2008)(河村 佳見, 2014)。さらに、



哺乳類では極めて珍しい真社会性(アリやハチに類似した女王・王・兵隊・ワーカーからなる分業性の集団生活を営む)・酸・カプサイシンによる痛み刺激への非感受性・低酸素環境への耐性など、数々の興味深い特徴を有しており、近年急速に注目を集め始めている齧歯類である。2011年にはゲノム配列が明らかになり(Kim et al., 2011)、昨年には、NMR特異的な高分子量のヒアルロン酸が線維芽細胞の*in vitro*での形質転換への抵抗性に寄与することが報告された(Tian et al., 2013)。その他にも、これまでにNMRの老化耐性・癌化耐性に関する報告はいくつか存在するが、未だその耐性のメカニズムのほとんどが不明であるのが現状である。

申請者はこれまでに、日本で初めてのNMRの分子生物学的研究の立ち上げを行い、各種臓器における遺伝子発現情報、NMR-iPS細胞の樹立、3D MRI脳アトラス(Seki et al., 2013)の構築を含む様々な基盤整備を進めてきた。樹立したNMR-iPS細胞の解析を行ったところ、癌化耐性齧歯類NMRから樹立したiPS細胞は、極めて珍しい腫瘍化耐性を有する多能性幹細胞であることが判明した。本報告書では、申請者が明らかにしてきたNMR-iPS細胞の腫瘍化耐性の分子機構について報告する。

### 2. 方法と結果

申請者は、NMR成体皮膚線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いてOct3/4, Sox2, Klf4, cMycの4つの遺伝子を導入することにより、NMR-iPS細胞を樹立した。極めて興味深いことに、樹立したNMR-iPS細胞は*in vitro*での多能性幹細胞としての性質(三胚葉への分化能力を持ち長期継代維持が可能)を有するにも関わらず、ヒト・マウスiPS細胞の特徴である造腫瘍性を示さず、*in vivo*での腫瘍化耐性能をもつことを見出した。申請者は、腫瘍化耐性への関与が考えられる種々の候補遺伝子の配列・発現について検討を行い、結果として、下記のNMR特異的な機構を明らかにした。

一般的にマウスやヒトにおいて、iPS細胞の樹立過程及び樹立後においては、癌抑制遺伝子Ink4a/Arfの発現が強力に抑制されることが知られている。しかしながら、Real-time PCRで遺伝子発現を解析したところ、NMRでは、樹立過程後期から一貫してInk4aの発現は抑制されるものの、Arfの発現抑制は生じていないことが判明した。そこで樹立後のNMR-iPS細胞においてArfのノックダウンを行ったところ、細胞増殖速度が上昇し、*in vitro*での造腫瘍性の指標となる足場非依存性増殖能を獲得すること、および*in*

*vivo*での免疫不全マウスへ移植時の弱い造腫瘍性を獲得することが明らかとなった。一方で、*Arf*の抑制によりNMR-iPS細胞の樹立効率は上昇しなかった。

次に申請者は、NMRにおいて、原癌遺伝子ERasのCoding regionに4塩基の挿入が入り、フレームシフトを起こしていることを見出した。10種類の哺乳類間でERasの遺伝子配列の種間比較を行ったところ、この変異はNMRに特異的であった。機能確認のため、NIH 3T3細胞での強制発現実験を行ったところ、mouse ERasがもつ形質転換能をNMR-ERasは全く有していないことが判明した。そこでmouse ERas遺伝子をNMR-iPS細胞に導入したところ、結果としてNMR-iPS細胞はARFノックダウン時と同様の弱い造腫瘍性を獲得した。さらに、ARFのノックダウン・ERasの強制発現を同時に行うことにより、NMR-iPS細胞はより強い造腫瘍性を獲得することが明らかとなった。HE染色の結果、これらの遺伝子発現変化により形成されたNMR-iPS細胞由来の腫瘍はテラトーマであった。以上の結果から、NMR-iPS細胞においては、動物種特異的な*Arf*の発現持続機構およびゲノムレベルでのERas遺伝子への4塩基挿入による機能欠失により、造腫瘍性が負に制御されていることが明らかとなった。

### 3. 考察

申請者らは、今回NMRからのiPS細胞の樹立に成功し、種特異的な腫瘍化耐性機構が存在すること、またその分子メカニズムを明らかにした。iPS細胞やES細胞の造腫瘍(奇形腫)性は、細胞移植治療を考えた際の一つの大きな障害である。移植後の腫瘍化リスクを減らすため、様々な分化応答性の高いクローン選別法や効率的な分化誘導法の開発が進められているが(Miura et al., 2009)(Tsuji et al., 2010)(Okano et al., 2013)、同時に造腫瘍性の低い多能性幹細胞の開発も期待されている。過去の報告において、*Ink4a/Arf*遺伝子を複数コピー有するBACトランスジェニックマウスから樹立されたiPS細胞は、多能性を有するにも関わらず腫瘍形成能が低下することが知られている(Menendez et al., 2012)。また、ERasのノックアウトES細胞は、奇形腫形成能が減弱することが知られている(Takahashi et al., 2003)。本研究の結果、これらのトランスジェニックマウス・ノックアウトマウスに類似した性質がNMRに生来備わっていることが判明した。今後、ヒトiPS細胞の遺伝子発現状態をNMR-iPS細胞型に近づけることができれば、再生医療でのリスクとなりうる腫瘍化リスクをより減らすことが可能になると期待される。

申請者は、今後、NMRにおける*Arf*の特殊な発現制御のメカニズムおよび関与因子の詳細な解明を行い、NMR種特異的ながん化耐性を規定する機構の解明を進める予定である。*Ink4a/Arf*遺伝子は個体老化にも密接に関わる遺伝子であるため、NMR種特異的な個体の老化耐性機構との関連も視野にいれ、研究を進めていきたい。また最近、NMR-ARFの発現制御のみならず配列自体にも種特異性が存在することが明らかになったため、個体の癌化・老化耐性に与える影響を評価するために、現在NMR-ARFノックインマウスの作出を進めている。

これらの成果は2015年12月現在論文改訂中であり、このような実り多き貴重な研究助成を与えて下さいました組織委員の先生方ならびに公益財団法人アステラス病態代謝研究会の皆様にご心から深く御礼申し上げます。

### 参考文献

Buffenstein, R. (2008). Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J Comp Physiol B* 178, 439-445.

Jarvis, J.U. (1981). Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science* (80- ). *212*, 571–573.

Kim, E.B., Fang, X., Fushan, A.A., Huang, Z., Lobanov, A. V, Han, L., Marino, S.M., Sun, X., Turanov, A.A., Yang, P., et al. (2011). Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* *479*, 223–227.

Menendez, S., Camus, S., Herreria, A., Paramonov, I., Morera, L.B., Collado, M., Pekarik, V., Maceda, I., Edel, M., Consiglio, A., et al. (2012). Increased dosage of tumor suppressors limits the tumorigenicity of iPS cells without affecting their pluripotency. *Aging Cell* *11*, 41–50.

**Miura, K.**, Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* *27*, 743–745.

Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., Ikeda, E., Yamanaka, S., and **Miura, K.** (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.* *112*, 523–533.

Seki, F., Hikishima, K., Nambu, S., Okanoya, K., Okano, H.J., Sasaki, E., **Miura, K (corresponding author)**., and Okano, H. (2013). Multidimensional MRI-CT atlas of the naked mole-rat brain (*Heterocephalus glaber*). *Front. Neuroanat.* *7*, 45.

Takahashi, K., Mitsui, K., and Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* *423*, 541–545.

Tian, X., Azpurua, J., Hine, C., Vaidya, A., Myakishev-Rempel, M., Ablueva, J., Mao, Z., Nevo, E., Gorbunova, V., and Seluanov, A. (2013). High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* *499*, 346–349.

Tsuji, O., **Miura, K.**, Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S., et al. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 12704–12709.

河村 佳見, 宮脇 慎吾, 岡野 栄之, **三浦恭子** (2014). ハダカデバネズミ. *化学と生物* *52*, 189–192.