

# 最長寿・老化耐性齧歯類ハダカデバネズミを利用した新たな卵巣老化抑制方法の開発

熊本大学 大学院先導機構／大学院生命科学研究部 老化・健康長寿学講座 准教授 三浦 恭子

## 要 約

ハダカデバネズミ(Naked mole-rat)は、アフリカに生息し、哺乳類では極めて珍しいアリやハチに似た真社会性をもつ小型の齧歯類である。マウスと同等の大きさながら(体重35 g)異例の長寿動物(最大寿命37年)であり、加齢に伴う死亡率の上昇が認められず、生存期間の約8割の間は各種組織・臓器の老化や機能低下が全く起こらないという老化耐性をもつ。さらにはがんにはほとんど罹患しないため、新たな実験動物として近年急速に注目を集め始めている。ハダカデバネズミは超高齢(28才)になっても出産可能であることから、顕著な卵巣の老化耐性も有すると考えられるが、その機構については完全に不明である。これまでに線維芽細胞において、ハダカデバネズミは種特異的に高分子量ヒアルロン酸を分泌しており、がん化耐性に寄与しているという報告<sup>1</sup>から、これが卵巣でも分泌されて炎症惹起抑制や物理的保護に寄与する可能性が考えられた。本研究では、卵巣機能維持機構における高分子量ヒアルロン酸の関与の有無、および卵巣の網羅的遺伝子発現についてマウスとの種間解析を行った。ハダカデバネズミおよびマウスの卵巣でヒアルロン酸を染色した結果、両者に顕著な差は認められず、また、遺伝子発現解析からもハダカデバネズミにおけるヒアルロン酸合成酵素の発現亢進は認められなかった。このことから、発現量としての寄与は低いと考えられた。一方、ヒアルロン酸は分子量により、炎症を促進もしくは抑制に寄与することが知られているため、今後の検証が必要である。また、網羅的遺伝子発現解析から、繁殖に大きく寄与することが知られている代謝経路に関連する遺伝子群の発現亢進が認められ、これがハダカデバネズミの卵巣の機能維持に貢献している可能性が考えられた。

## 緒 言

ハダカデバネズミ(裸出歯鼠, naked mole-rat, NMR, *Heterocephalus Glaber*)は、その和名の通り裸で出っ歯のネズミである(よく見ると感覚毛と呼ばれる毛がまばらに生えており、全く無毛という訳ではない)(図1)。野生下ではアフリカの角(つ)と呼ばれる領域(エチオピア・ケニア・ソマリア)のサバンナの地下にトンネル状の巣を形成して集団で生息している。ハダカデバネズミの際立った特徴と



図1. ハダカデバネズミ

がん化耐性、老化耐性をもつ最長寿齧歯類。

して、マウスと同等の大きさながら(体重35 g)、異例の長寿動物(最大寿命37年)であり、加齢に伴う死亡率の上昇が認められず、生存期間の約8割の間は各種組織・臓器の老化や機能低下が全く起こらないという老化耐性をもつ。さらに2000例以上の観察の結果、自発的腫瘍形成がほとんど見られないことから、がん化・老化に抵抗性を持つ新たな実験動物として近年急速に注目を集め始めている<sup>2,3</sup>。さらに、ハダカデバネズミは哺乳類では極めて珍しい、昆虫のアリやハチに類似した「真社会性」とよばれる分業制の社会を形成する<sup>4</sup>(図2)。真社会性とは、二世代以上が共存し、繁殖する個体とその繁殖を手伝う不妊個体集団からなる社会形態である。真社会性の特徴を有する哺乳類は、ハダカデバネズミと近縁のダマラランドデバネズミのみである。数十から数百匹の個体からなる1つのコロニーにおいて、繁殖を行うのは1匹の女王と1-3匹の王のみである。繁殖に携わらない他の個体は雌雄ともにワーカーや兵隊として巣内の仕事に携わり、生殖器は未発達であ

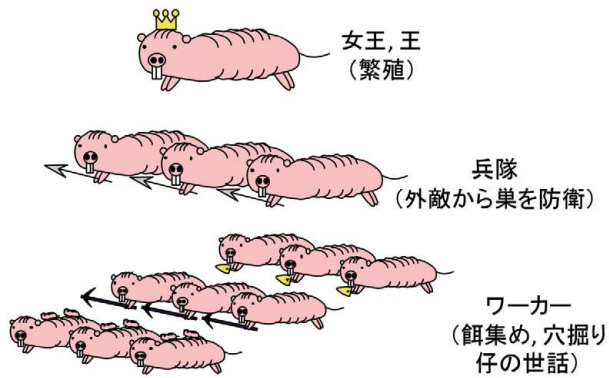


図2. ハダカデバネズミの社会形態  
繁殖に携わる女王、王と非繁殖個体からなる。

る。ハダカデバネズミの女王はアリやハチなどと異なり、生まれながらの女王ではない。女王が死んだりトンネルが崩落して群れが分断されたりすることにより、女王が不在になると体の大きな雌達が互いに争い、その勝者が新女王となる。実験的に下位の雌個体を女王から引き離すと、その雌は性成熟が始まり女王化する<sup>5</sup>ことから、女王は何らかの方法で巣内の他の雌個体の女王化を抑制していることが分かっている。ハダカデバネズミは超高齢(28才)になっても出産可能であることから、顕著な卵巣の老化耐性も有すると考えられるが、その機構については完全に不明である。近年申請者らは、世界で始めてハダカデバネズミの受精卵を採取したところ、マウスと異なり透明帯の粘性が著しく高いことを見出した。過去に、ハダカデバネズミでは線維芽細胞で

動物種特異的な高分子量のヒアルロン酸が分泌されることが報告されており<sup>1</sup>、これが卵巣でも分泌されて炎症惹起抑制や物理的保護に寄与する可能性が考えられた。本研究では、組織・遺伝子発現について、ハダカデバネズミと他動物種の種間比較を行うことで、ハダカデバネズミ特異的な卵巣老化耐性の分子機構・関与因子の解明を目指したものである。

## 方法

- ・ハダカデバネズミおよびマウス卵巣のヒアルロン酸染色を行うために、女王から隔離飼育した雌ハダカデバネズミ卵巣およびC57/BL6雌マウスの卵巣を採取し、新鮮凍結切片およびパラフィン切片を作製した。これらの切片についてヒアルロン酸を含む酸性粘液多糖類を染色するアルシアンブルー染色を行った。ネガティブコントロールとして、ヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼ(HAase)処理した切片も同様に染色した。
- ・ハダカデバネズミおよびマウス卵巣の遺伝子発現を解析するために、RNA-seqのデポジットデータ解析を実施し、変動遺伝子について種間比較を行った。
- ・本課題における実験動物を用いる研究については、熊本大学動物実験委員会の承認を受け(承認番号A30-043およびA2020-042)、同委員会が作成したガイドラインに準じた実験方法、実験場所、

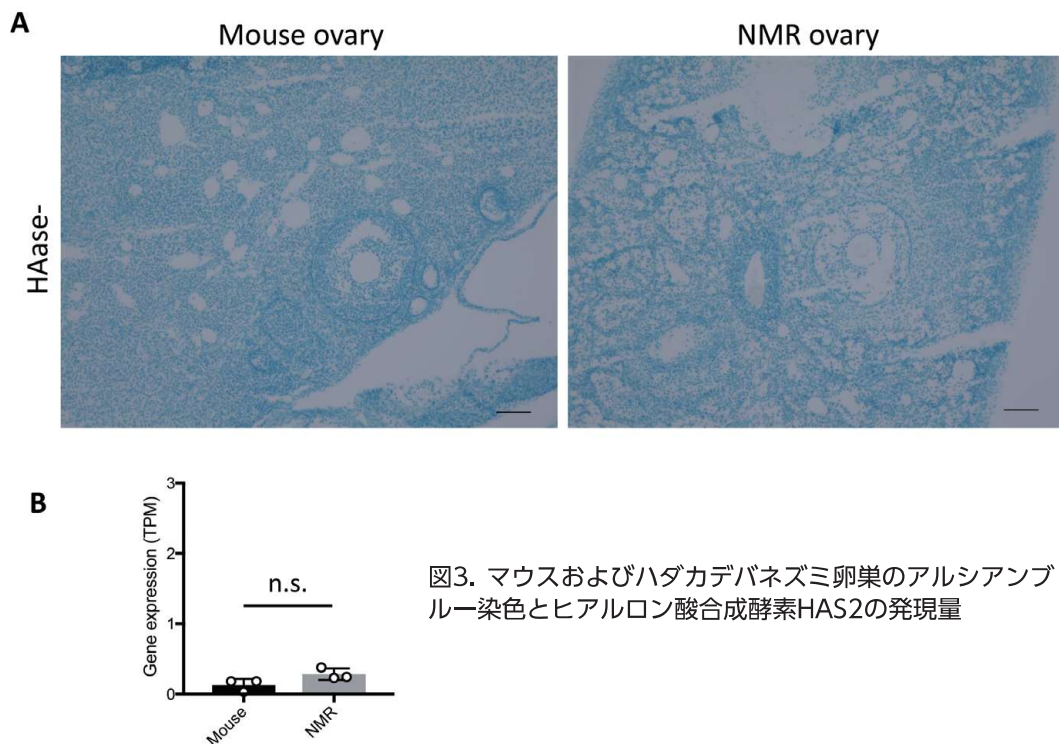


図3. マウスおよびハダカデバネズミ卵巣のアルシアンブルー染色とヒアルロン酸合成酵素HAS2の発現量

処理方法を遵守し、倫理面に十分に配慮して行った。

## 結果

- (1) ハダカデバネズミおよびマウス卵巣において、ヒアルロン酸を含む酸性粘液多糖類を染色するアルシアンブルー染色を行った結果、ハダカデバネズミとマウスでは顕著な差は認められなかった(図3A)。次に行ったRNA-seq解析においても、ハダカデバネズミの皮膚や心臓において高発現し、がん化耐性への寄与が報告されている高分子量ヒアルロン酸を産生する酵素であるHyaluronan synthase 2 (HAS2)について発現量を比較したが、ハダカデバネズミにおける顕著な発現亢進は認められなかった(図3B)。
- (2) ハダカデバネズミおよびマウス卵巣の遺伝子発現を解析するために、mRNA-seq解析を実施した。ハダカデバネズミの卵巣で発現が高かった遺伝子群についてGene ontology解析を行ったところ、“Retinol metabolism”、“Retinol metabolic process”、“Vitamin digestion and absorption”に含まれる遺伝子群が濃縮されていた(図4)。また、“Positive regulation of somatostatin secretion”、“Thyroid hormone metabolic process”といったような、ホルモン産生に関わる遺伝子群の濃縮も見られた。

## 考察

ハダカデバネズミではヒアルロン酸合成酵素であ

るHAS2に種特異的なアミノ酸変異があることで高分子量ヒアルロン酸を産生すること、また、皮膚、心臓、肝臓などの組織でヒアルロン酸分解酵素の活性が低く、各種臓器でヒアルロン酸量が高く保たれていることが報告されている<sup>1</sup>。本研究において、長期にわたり機能を維持し続けるハダカデバネズミの卵巣においてもヒアルロン酸が高発現しているか否かを解析した。ハダカデバネズミおよびマウスの卵巣でヒアルロン酸を染色した結果、両者に顕著な差は認められず、また、遺伝子発現解析からもハダカデバネズミにおけるヒアルロン酸合成酵素の発現亢進は認められなかった。このことから、発現量としての寄与は低いと考えられた。一方、ヒアルロン酸は分子量により、炎症を促進もしくは抑制に寄与することが知られているため、今後の検証が必要である。

ハダカデバネズミおよびマウス卵巣についてmRNA-seqにより遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、レチノールの代謝に関わる遺伝子群がマウスと比較して発現が高いことがわかった。レチノールはビタミンA1としても知られ、卵巣の分化や卵胞発育などに機能し、その欠乏症は卵胞発育が阻害され、排卵数が減少することが報告されている<sup>6</sup>。加えて、レチノールを含むレチノイドシグナル経路の異常は多嚢胞性卵巣などの異常を引き起こしうることから、“Vitamin digestion and absorption”に含まれる遺伝子群により適正にレチノールレベルが維持されている可能性が考えられた。また、ソマ

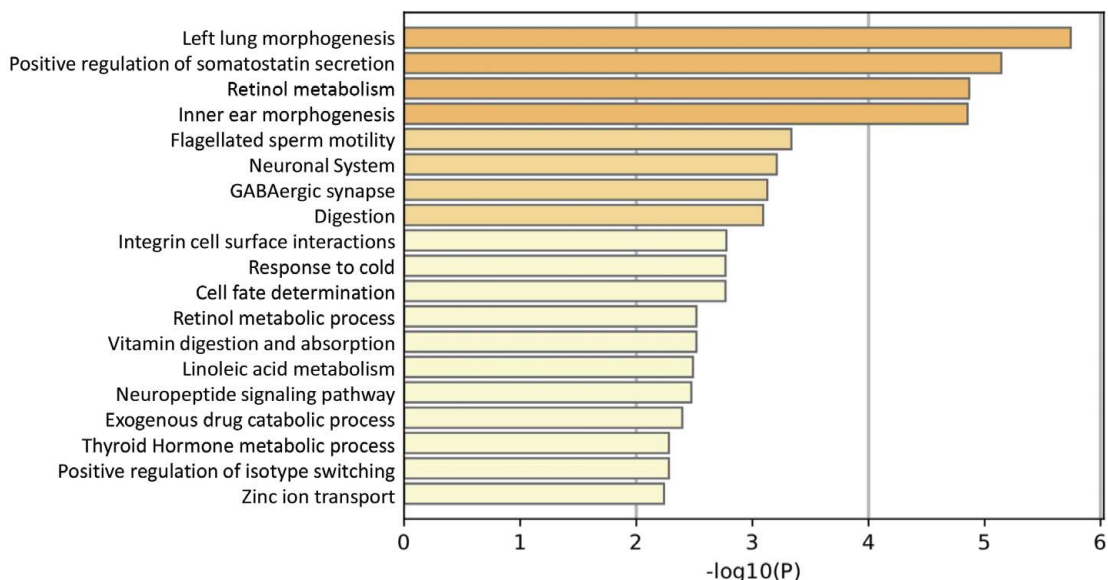


図4. ハダカデバネズミの卵巣でマウスより発現が高い遺伝子のGene enrichment解析

トスタチンは視床下部などから分泌されるペプチドホルモンであり、多くの二次ホルモンの分泌を抑制する。下垂体前葉から分泌されるプロラクチンもその抑制を受けるホルモンであるが、高プロラクチン血症は卵胞の発育、排卵を抑制する。これらのことから、ソマトスタチンの分泌関連遺伝子の高発現は、プロラクチン抑制を介して卵巣機能維持に何らかの役割を果たしているかもしれない。また、甲状腺ホルモンは卵胞の発育や黄体維持に重要であり、その低下もまたプロラクチンの上昇を引き起こしうる。これらのことから、ハダカデバネズミではレチノイドシグナルやホルモンバランスが適正に保たれることによって、繁殖能を長期間維持している可能性がある。今後そのメカニズムについて研究を進めることで、新たな卵巣機能抑制法の開発に寄与できると考えている。

#### 参考文献

1. Tian, X., Azpurua, J., Hine, C. et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. *Nature* 2013, 499, 346-9.
2. Edrey, Y. H., Hanes, M., Pinto, M. et al. Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: a long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR J* 2011, 52, 41-53.
3. Ruby, J. G., Smith, M. & Buffenstein, R. Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age. *Elife* 2018, 7, 1-18.
4. Jarvis, J. U. M. Eusociality in a Mammal: Cooperative Breeding in Naked Mole-Rat Colonies. *Science* 1981, 212(4494), 571-573.

#### Abstract

The naked mole-rat (NMR) is the longest-lived rodent (maximum lifespan, 37 years), although having a similar body size to that of the mouse. Unlike most mammals, NMR shows resistance to cancer and negligible senescence. Since NMRs give birth even in old age (28 years old), NMR ovaries are presumed to be remarkably resistant to aging. However, the mechanism is completely unknown. Unlike most mammals, NMR fibroblasts secrete high-molecular-mass hyaluronan (HMM-HA), contributing to cancer-resistance (Nature, 2013). Since HMM-HA has anti-inflammatory and physical protective properties, we postulated that HMM-HA might also contribute to resistance to ovarian aging in NMRs. In this study, we investigated the involvement of HMM-HA in maintaining the ovarian function, and performed the interspecific comparison of gene expression profiles of ovarian tissues between NMRs and mice. Hyaluronan staining and the expression level of hyaluronan synthases did not show a remarkable difference between both species. Hyaluronan is known to contribute to the promotion/suppression of inflammation, depending on the molecular mass. Thus, future experiments on hyaluronan mass are required. Meanwhile, comprehensive gene expression analysis revealed that the expression of genes related to metabolic pathways, which are known to contribute to reproduction actively, was enhanced, suggesting that this may contribute to the maintenance of NMR ovarian function.

5. Faulkes, C. G., Abbott, D. H. & Jarvis, J. U. Social suppression of ovarian cyclicity in captive and wild colonies of naked mole-rats, *Heterocephalus glaber*. 1990, *J. Reprod. Fertil.* 88, 559-568.
6. Jiang, Y., Li, C., Chen, L. et al. Potential role of retinoids in ovarian physiology and pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Clin. Chim. Acta* 2017, 469, 87-93.

#### 文 献

1. Yamaguchi S, Nohara S, Nishikawa Y, Suzuki Y, Kawamura Y, Miura K, Tomonaga K, Ueda K, Honda T  
Characterization of an active LINE-1 in the naked mole-rat genome. *Scientific reports* 11(1): 5725. (2021) (査読あり)
2. Oiwa Y, Oka K, Yasui H, Higashikawa K, Bono H, Kawamura Y, Miyawaki S, Watarai A, Kikusui T, Shimizu A, Okano H, Kuge Y, Kimura K, Okamatsu-Ogura Y, Miura K  
Characterization of brown adipose tissue thermogenesis in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*), a heterothermic mammal *Scientific reports* 10(1): 19488. (2020) (査読あり)
3. Kawamura Y, Oka K, Takamori M, Sugiura Y, Oiwa Y, Fujioka S, Homma S, Miyawaki S, Narita M, Fukuda T, Suematsu M, Bono H, Okano H, Miura K  
Senescent cell death as an aging resistance mechanism in naked mole-rat *bioRxiv* (2020), doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.02.155903>
4. Wada H, Shibata Y, Abe Y, Otsuka R, Eguchi N, Kawamura Y, Oka K, Baghdadi M, Atsumi T, Miura K, Seino KI  
Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats. *Scientific reports* 9(1):17981. (2019) (査読あり)