

最長寿・老化耐性齧歯類を利用した新たな皮膚の老化予防方法の開発

熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学講座

三浦 恭子

The naked mole-rat (NMR) is an African rodent that forms a eusocial colony in subterranean environments. The NMR shows an extraordinary longevity with a maximum lifespan of more than 37 years, although its body mass is similar to that of the laboratory mouse. The NMR also displays delayed aging phenotype and cancer resistance. Cellular senescence plays an important role in the aging and carcinogenesis processes, suggesting that NMRs may have species-specific mechanisms to prevent the accumulation of senescent cells. Here we show that upon induction of cellular senescence, NMR fibroblasts progressively activate cell death including apoptosis through activation of the INK4a-Retinoblastoma protein (RB) pathway in a mechanism we termed “INK4a-RB cell death”. We show that INK4a-RB cell death is independent of p53 activity and not observed in mouse fibroblasts. NMR fibroblasts uniquely accumulate serotonin and are inherently vulnerable to hydrogen peroxide (H_2O_2). Upon activation of the INK4a-RB pathway, NMR fibroblasts increase monoamine oxidases (MAOs) levels, which oxidize monoamine including serotonin and produce H_2O_2 , resulting in increased oxidative damage and activation of cell death. The INK4a-RB cell death may potentially contribute to the suppression of senescent cell accumulation in NMRs. Our findings provide novel insights into the mechanisms of delayed aging and cancer resistance in NMRs.

1. 緒言

本研究は、最長寿かつ老化耐性を持つ齧歯類、ハダカデバネズミ (Naked mole-rat; NMR、図1) における皮膚線維芽細胞の老化抑制機構の解明を目指すものである。この機構を解明することで、将来的に新規の皮膚老化予防薬の開発に繋がると考えられる。

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」と呼ばれる分業制の社会を形成し、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。この地下トンネルは、場所によっては酸素濃度が約7%となるため、ハダカデバネズミは低酸素環境に適応しており、酸素消費量はマウスの3分の2程度と低く、ヘモグロビンの酸素親和性が高い。さらに最近、ハダカデバネズミ個体は無酸素状態に顕著な耐性があり、フルクトースを直接利用する解糖系代謝が関係することが報告されている¹⁾。ハダカデバネズミはマウスと同程度の大きさながら、最大寿命が37年(この37歳のハダカデバネズミは現在も生存)と報告されている異例の長寿動物である。驚くべきことに、ハダカデバネズミでは加齢に伴う死亡率の上昇が認められないことが報告されており、さらに生存期間の約8割の間は、皮膚を含む各種組織・臓器の老化や機能低下が起らない

長寿命(最大寿命37年)
老化耐性・発がん耐性



図1 最長寿齧歯類ハダカデバネズミ

老化耐性の特徴を持つ^{2,3)}。また、今まで自然発生腫瘍が数例しか確認されることがない、顕著ながん化耐性を示す⁴⁾。

皮膚において、コラーゲン等の細胞外基質を産生する線維芽細胞は、加齢に伴いDNA損傷等の様々なストレスにより、細胞老化と呼ばれる不可逆的な分裂停止を引き起こすことが知られている。細胞老化は異常な細胞がそれ以上分裂することを防ぐ機構であり、がん抑制機構として働くことが知られている。さらに発生過程においても細胞老化が形態形成に寄与すること⁵⁾、損傷治癒過程においても老化細胞の出すPDGF-AA (platelet-derived growth factor AA) が筋線維芽細胞への分化を引き起こすことで治癒を早めることが報告されている⁶⁾。しかし一方で、長期にわたり老化細胞が組織中に存在すると、老化細胞は炎症性サイトカインや活性酸素(ROS)等を分泌するSASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる現象を引き起こし、これにより周辺細胞に悪影響を及ぼす。Bakerらは細胞老化マーカーでサイクリン依存性キナーゼインヒビターの1種であるInk4aのプロモーター下流に、薬剤投与でアポトーシスを引き起こす遺伝子を連結したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを用いて、老化細胞をアポトーシスで排除することにより、個体の老化が減弱することを報告し、老化細胞の蓄積と個体老化に直接的な



Development of a new method to prevent skin aging using the longest-lived and aging-resistant rodent

Kyoko Miura

Kumamoto University, Faculty of Life Sciences, Department of Aging and Longevity Research

関係があることを示した^{7,8)}。このように、老化細胞の増加が組織の老化・機能低下やがん化に大きな役割を果たすことが明らかとなってきた。

では、老化耐性を持つハダカデバネズミの細胞老化はどのようなのだろうか。これまでに、ハダカデバネズミの線維芽細胞はがん遺伝子の導入、放射線照射により細胞老化を起こすことが報告されている⁹⁾。一方、ハダカデバネズミの脳において加齢に伴うINK4aの発現上昇が起こりにくいことが示されている¹⁰⁾。これらの結果から我々は、ハダカデバネズミには老化細胞が蓄積されにくいメカニズムがあるのではないかと考えた。

これまでに我々は、老化耐性ハダカデバネズミの皮膚線維芽細胞において、細胞老化誘導によりハダカデバネズミ特異的細胞死が生じることを見出した。この現象はヒトやマウスでは全く認められない。ハダカデバネズミでは種特異的な本現象により老化細胞が除去されることで、皮膚の老化が抑制されていると考えられる。しかしこのハダカデバネズミ特異的な細胞死の誘導機構はいまだ不明であり、解明することで、全く新規の皮膚老化予防薬の開発に繋がりうる。そこで本研究では、ハダカデバネズミ特異的細胞死のメカニズム・誘導遺伝子を解明することを目的とし、研究を行った。また研究成果は現在論文投稿中である。

2. 方法

2.1. 実験動物

1-2歳の成体ハダカデバネズミは熊本大学で維持し、6週齢の成体C57BL/6Nマウスは日本クレアから購入した。この研究は、熊本大学動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。

2.2. 皮膚線維芽細胞の樹立および細胞老化誘導

1-2歳の成体ハダカデバネズミおよび6週齢の成体C57BL/6Nマウスの背部皮膚を採取し、初代皮膚線維芽細胞を分離した。組織は、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(富士フィルム和光)およびアンフォテリシンB(富士フィルム和光)を含む氷冷したPBS(ナカライテスク)で洗浄後、細断した。組織片を15%ウシ胎児血清(FBS)(NMR線維芽細胞用)または10%FBS(マウス線維芽細胞用)を含むDMEM培地に懸濁し、ゼラチンコートした10cm細胞培養皿(IWAKI)に播種、32℃、5%CO₂、5%O₂条件で培養した。遊走してきた線維芽細胞を回収し、初代線維芽細胞として使用した。線維芽細胞は5回継代以内で使用し、培地は2日おきに交換した。

サブコンフルエントになったマウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞に、DNA傷害剤であるドキシソルピシン(DXR;富士フィルム和光)を100nMの濃度で含む培地を添加した。24時間後、培地を新しく調製したDXR含有培

地に交換し、さらに24時間培養した。その後、細胞を洗浄し、新鮮な培地で21日間、2日ごとに培地交換をしながら培養を行い、細胞老化を誘導した。

2.3. 皮膚線維芽細胞への遺伝子導入

マウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。目的遺伝子発現ベクターおよびウイルスパッケージングベクター2種を、HEK293細胞にPEI MAX transfection reagent (Polysciences)を用いてトランスフェクションした。9時間後に培地交換を行い、その後24時間培養した培養上清を0.45μmシリンジフィルター(ザルトリウス)で濾過し、ウイルス含有conditioned mediumとした。このconditioned mediumを培養培地で2倍希釈し、線維芽細胞へのウイルス感染に使用した。

2.4. ウェスタンブロッティング

細胞をPBSで洗浄し、2×サンプルバッファー(125mM Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 10% sucrose)で溶解し、5分間煮沸した。BCA Protein Assay Kit (TaKaRa)を用いてタンパク質濃度を測定したのち、10μgのタンパク質を用いてSDS-PAGEを行い、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)を用いてPVDFメンブレンにトランスファーした。以下に示した一次抗体にて4℃でover night反応させ、TBSTで洗浄したのち、二次抗体を反応させた。ECL Western Blotting Detection System または ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham)で可視化した。シグナル検出にはLAS-4000miniイメージングシステム(FUJIFILM)を、データ解析にはMulti Gauge V3.0ソフトウェア(FUJIFILM)を使用した。一次抗体には、RB (CST; 9309; 1:1000 for NMR, CST; 9313; 1:1000 for mouse)、pRB (CST; 8516; 1:1000)、MAO-A (abcam; ab126751; 1:1000)、MAO-B (Novus Biologicals; NBP1-87493; 1:1000)およびβ-Actin (CST; 4970; 1:2000)を使用した。二次抗体は、HRP標識抗ウサギ(CST; 7074; 1:1000)または抗マウス(CST; 7076; 1:1000)IgG抗体を使用した。

2.5. RNA-sequencingとMetabolome analysis

細胞老化誘導時にハダカデバネズミ特異的に発現変動する候補遺伝子群を抽出するために、ハダカデバネズミおよびマウス皮膚線維芽細胞に細胞老化誘導(INK4aを過剰発現)を行った後TRIzol reagent (Invitrogen)に溶解した。RNA抽出後ライブラリーを調製、Novaseq 6000にてRNA-sequencingを実施(Novogene Bioinformatics Institute)し、変動遺伝子について種間比較を行った。また、一般的に老化細胞では代謝状態が大きく変動するが、老化ハダカデバネズミ細胞における代謝状態を解析するために、ハダカデ

バネズミおよびマウス皮膚線維芽細胞に細胞老化誘導し、液体窒素で凍結後氷冷メタノールで回収し、メタボローム解析を行った。

3. 結果

3.1. 細胞老化誘導時のハダカデバネズミ細胞の挙動

マウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞に低濃度(100nM)のドキシソルピシン(DXR)を添加し、細胞老化を誘導してその後の挙動を経時的に3日おき、21日まで解析した。その結果、ハダカデバネズミ、マウスともに細胞老化マーカーであるSA-β-Gal陽性細胞の増加、細胞増殖の停止を示すBrdU取り込みの低下、細胞老化マーカー遺伝子であるINK4aおよびp21の発現上昇が認められた。興味深いことに、マウスでは細胞死の上昇は見られないのに対し、ハダカデバネズミではDXR処理後12日目以降に細胞死が有意に上昇した(図2A, B)。また、細胞死の上昇とINK4aの発現上昇が同時期に起こっていた。さらにハダカデバネズミ線維芽細胞でINK4aをノックダウンすると、DXR処理して21日後の細胞死が有意に減少した。これらの結果から、ハダカデバネズミ線維芽細胞において、INK4aの発現上昇が細胞死の増加に寄与していると考えられた。

3.2. INK4aの発現上昇はハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こす

INK4aの発現上昇がハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こすのかを調べるために、レンチウイルスベクターを用いてマウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞にINK4aを過剰発現した。DXR老化誘導時と同様にマウスおよびハダカデバネズミ細胞で、SA-β-Gal陽性細胞の増加、BrdU取り込みの低下が認められた。INK4aはサイクリン依存性キナーゼであるCDK4/6を阻害することにより、RBの脱リン酸化(活性化)を起こし、細胞周期停止を引き起こす。ウェスタンブロッティングにより解析を行ったところ、マウスおよびハダカデバネズミ細胞でRBの脱リン酸化が見られた。このように両種の細胞で細胞老化の特徴を示す一方、ハダカデバネズミ細胞のみで細胞死が上昇した(図3)。これらの結果から、INK4aの発現上昇がハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

3.3. ハダカデバネズミ線維芽細胞において、INK4aの発現上昇はp53とは無関係にRBを介して細胞死を引き起こす

一般的に細胞へのダメージが大きい場合は細胞死が、小

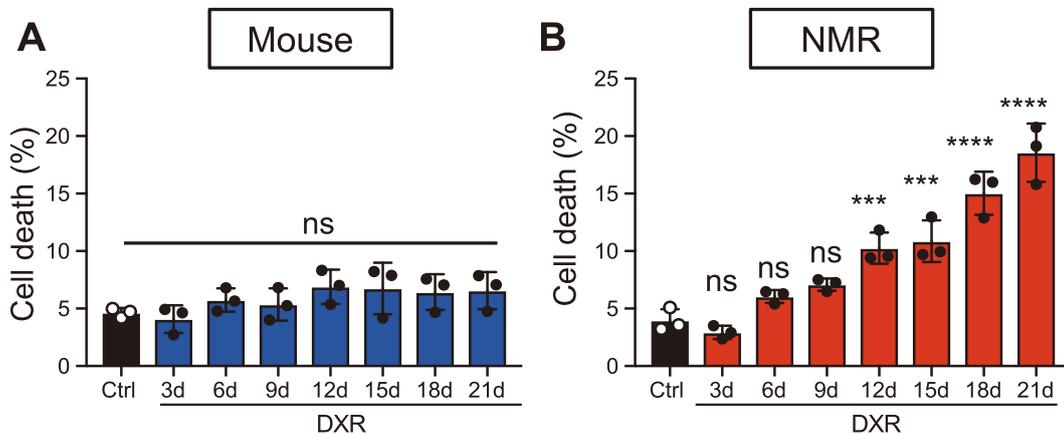


図2 細胞老化誘導時のハダカデバネズミ細胞の挙動

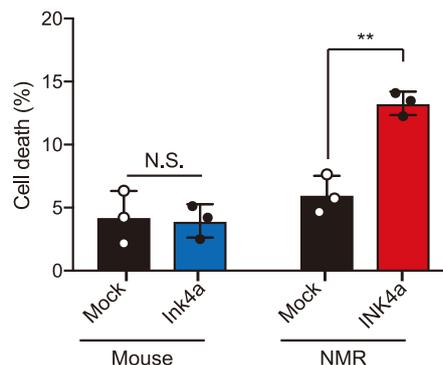


図3 INK4aの発現上昇はハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こす

さい場合は細胞老化が引き起こされ¹¹⁾、図4Aに示すように、がん抑制遺伝子であるp53はアポトーシスの誘導に大きく寄与している。本研究で見られたハダカデバネズミ特異的細胞死がp53に依存するのかを調べるために、ウイルス由来のSV40 Large T antigen (LT) タンパクとその変異体を使用した。野生型LTはp53とRBの両方を阻害し、その変異体LTΔ434-444 (LTΔ)はRBのみを、LTK1変異体(LTK1)はp53のみを阻害する。これらとINK4aをハダカデバネズミ線維芽細胞に過剰発現させ、細胞死を解析した。その結果、LTとLTΔは顕著に細胞死を抑制し、LTK1は細胞死を抑制しなかった(図4B)。また、DXR処理ハダカデバネズミ細胞においても同様の結果が得られた。これらの結果から、ハダカデバネズミの細胞老化誘導時の細胞死はp53非依存的、RB依存的に起こっていることが明らかとなった。そこで我々はこの細胞死をINK4a-RB cell deathと命名した。

3. 4. ハダカデバネズミ線維芽細胞において、固有のH₂O₂への脆弱性がINK4a-RB cell deathに寄与している
INK4a-RB cell deathのメカニズムを解析するために、

ハダカデバネズミおよびマウス皮膚線維芽細胞にINK4a過剰発現による細胞老化誘導を行い、mRNA-seqを実施した。ハダカデバネズミの老化細胞で発現上昇していた遺伝子群についてgene ontology (GO) 解析を行ったところ、老化および細胞死を反映していると考えられるGO term: “SASP” や“aging”、“positive regulation of cell death”とともに、“hydrogen peroxide metabolic process”に関わる遺伝子群が濃縮されていた(図5)。ハダカデバネズミはこれまでにhydrogen peroxide (H₂O₂) に対して顕著な脆弱性¹²⁾を持つことが報告されている。我々はハダカデバネズミ線維芽細胞がマウス線維芽細胞と比べて、これまでの報告通り、顕著にH₂O₂に対して脆弱であることを見出した。このことから、我々はハダカデバネズミのINK4a-RB cell deathには、酸化ストレスの亢進が関与しているのではないかと考えられた。実際、INK4a-RB cell deathを起こしているハダカデバネズミ細胞において、2', 7'-dihydro dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)を用いて活性酸素種(ROS)が増加しているかを解析したところ、ROSレベルの上昇が認められた。

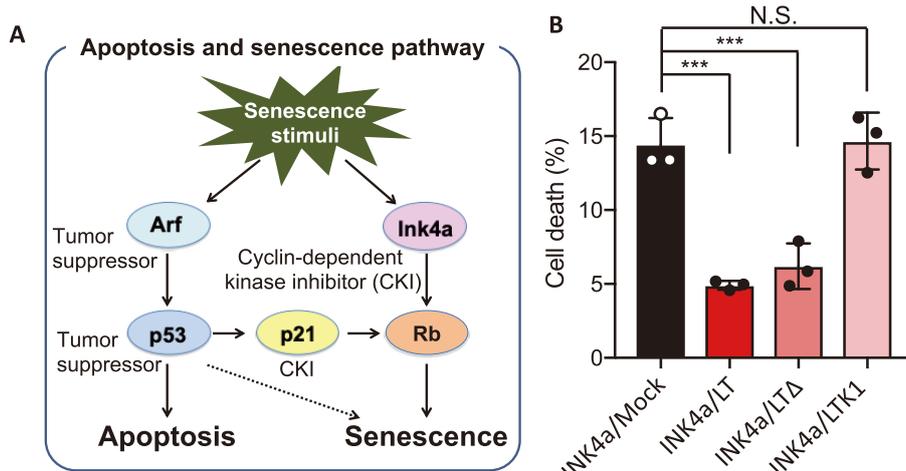


図4 ハダカデバネズミ線維芽細胞において、INK4aの発現上昇はp53とは無関係にRBを介して細胞死を引き起こす

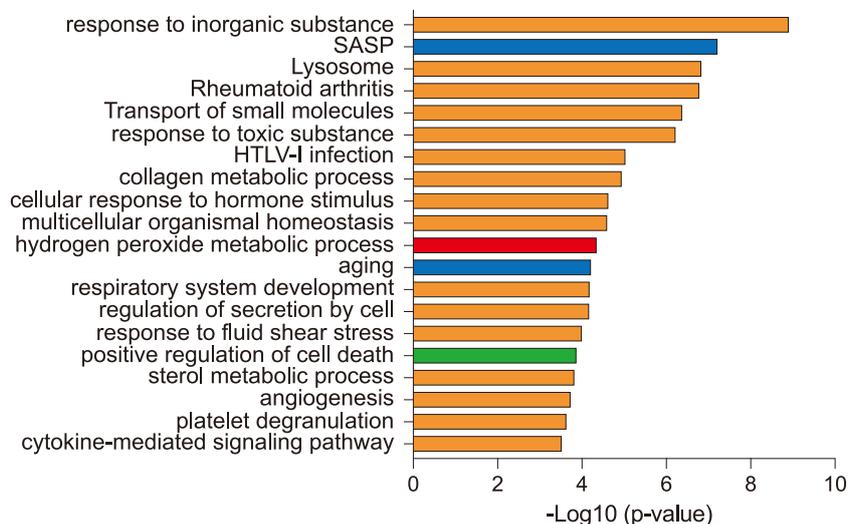


図5 INK4a過剰発現ハダカデバネズミ線維芽細胞のgene ontology (GO) 解析

次にメタボローム解析を行ったところ、興味深いことに、老化していないハダカデバネズミ線維芽細胞では種特異的にserotoninが顕著に蓄積しており、老化したハダカデバネズミ細胞ではその代謝産物である5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)が有意に増加していた。Serotoninから5-HIAAへの代謝経路は大量の H_2O_2 を産生することが知られており、その代謝経路にはmonoamine oxidase(MAO)が寄与している。上述のmRNA-sequencingの結果においても“hydrogen peroxide metabolic process”にはMAO-Bが含まれていた。さらにINK4aを過剰発現させたハダカデバネズミ線維芽細胞ではMAO-AおよびMAO-Bタンパクの発現が上昇していた。これらの結果から、ハダカデバネズミのINK4a-RB cell deathにはMAOによる H_2O_2 の産生が寄与している可能性が考えられた。 H_2O_2 を含むROSの増加がハダカデバネズミ細胞にINK4a-RB cell deathを引き起こしているのかを明らかにするために、INK4a-RB cell deathを誘導したハダカデバネズミ細胞に抗酸化剤であるNAC、Trolox、Tempolを投与した。その結果、INK4a-RB cell deathは有意に減弱した。これらのことから、ハダカデバネズミ細胞が持つ生来の H_2O_2 への脆弱性と、細胞老化時に H_2O_2 を大量に産生するような代謝状態への変化によって、INK4a-RB cell deathが起きていると考えられた。

4. 考察とまとめ

酸化ストレス仮説は個体老化のメカニズムの1つとしてよく知られている。酸化ストレス仮説とは、ROSによる酸化的ダメージが加齢とともに蓄積し、それに起因する細胞障害が個体の機能低下をもたらすという考え方である。ハダカデバネズミは老化耐性動物であることから、酸化ストレス仮説に基づいた検証が積極的に行われてきたが、ROSに対して抵抗性を持っているとする報告やROSに対する防御機構の低さを示す報告といった相反する結果が報告されており、これまで一定の見解は得られていない。本研究は、ハダカデバネズミ線維芽細胞においてINK4a-RB経路が活性化し、 H_2O_2 産生代謝経路が活性化することと、ハダカデバネズミ線維芽細胞が生来持つROSの1種である H_2O_2 に対する脆弱性が協調してINK4a-RB cell deathを引き起こしていることを明らかにした。この機構により、ハダカデバネズミにおいて老化細胞が除去され、皮膚をはじめとする個体の老化耐性に寄与しているのではないかと考えられる。本研究は、ハダカデバネズミにおける H_2O_2 に対する脆弱性と老化耐性を結びつけた初めての報告である。近年、老化防止薬として老化細胞を除去する“senolytic drug”の開発が進んでいるが、老化細胞は個体にとって有益な側面も持っており、老化細胞の除去が本当に安全なのかは議論の余地がある。ハダカデバネズミは進化の過程で獲得した“naturally senolytic

phenotype”を持っており、今後研究を進めることで、真に安全な“senolytic drug”の開発に寄与する可能性がある。

(引用文献)

- 1) Park, T. J. *et al.* Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* **356**, 307-311 (2017).
- 2) Edrey, Y. H., Hanes, M., Pinto, M., Mele, J. & Buffenstein, R. Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: A long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR J.* **52**, 41-53 (2011).
- 3) Ruby, J. G., Smith, M. & Buffenstein, R. Naked mole-rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age. *Elife* **7**, 1-18 (2018).
- 4) Buffenstein, R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J. Comp. Physiol. B.* **178**, 439-45 (2008).
- 5) Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119 (2013).
- 6) Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722-733 (2014).
- 7) Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236 (2011).
- 8) Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189 (2016).
- 9) Zhao, Y. *et al.* Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 1801-1806 (2018).
- 10) Lee, B. P., Smith, M., Buffenstein, R. & Harries, L. W. Negligible senescence in naked mole rats may be a consequence of well-maintained splicing regulation. *GeroScience* **42**, 633-651 (2020).
- 11) Childs, B. G. *et al.* Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1-15 (2014).
- 12) Salmon, A. B., Akha, A. A. S., Buffenstein, R. & Miller, R. A. Fibroblasts from naked mole-rats are resistant to multiple forms of cell injury, but sensitive to peroxide, ultraviolet light, and endoplasmic reticulum stress. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **63**, 232-241 (2008).