



Title	ハダカデバネズミの発がん剤への組織応答性に関する研究
Author(s)	藤岡, 周助
Description	配架番号 : 2623
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14502号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14502
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84578
Type	doctoral thesis
File Information	Shusuke_Fujioka.pdf



学位論文

ハダカデバネズミの

発がん剤への組織応答性に関する研究

(Naked mole-rats show extraordinary resistance to
chemical carcinogenesis with a dampened
inflammatory response)

2 0 2 1 年 3 月

北 海 道 大 学

藤岡 周助

Shusuke Fujioka

学位論文

ハダカデバネズミの

発がん剤への組織応答性に関する研究

(Naked mole-rats show extraordinary resistance to
chemical carcinogenesis with a dampened
inflammatory response)

2 0 2 1 年 3 月

北 海 道 大 学

藤岡 周助

Shusuke Fujioka

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
要旨	2-4
略語表	5-6
1. 緒言.....	7-8
2. 実験方法	9-19
2-1 本研究に用いた実験動物と倫理申請	9
2-2 3MC 処置	9
2-3 DMBA/TPA 処置	10
2-4 UV 照射.....	10
2-5 LPS 処置.....	10
2-6 組織免疫化学染色	10-12
2-7 TUNEL 染色.....	13
2-8 上皮の肥厚および免疫染色陽性細胞の評価.....	13
2-9 RNA 抽出と cDNA 合成.....	13-15
2-10 細胞培養.....	16
2-11 Necroptosis 経路関連遺伝子の発現誘導	16
2-12 Necroptosis 誘導および細胞死の評価	17
2-13 死細胞貪食実験.....	17
2-14 ウェスタンブロッティング.....	17-18
2-15 RNA-sequencing 解析.....	18-19
2-16 統計処理.....	19
3. 実験結果.....	20-73
3-1 ハダカデバネズミは、強い発がん剤耐性能を有する	20-26
3-1-1 ハダカデバネズミは、3MC による発がん誘導に抵抗性を持つ	20-23
3-1-2 ハダカデバネズミは、DMBA/TPA による発がん誘導に抵抗性を持つ	24-26
3-2 ハダカデバネズミでは、発がん促進的な炎症応答が減弱している	27-53
3-2-1 ハダカデバネズミは、3MC 短期間投与により DNA 損傷および細胞死は誘導されるが免疫細胞の浸潤が減弱している	27-35
3-2-2 ハダカデバネズミは、UV 照射後に DNA 損傷および細胞死は誘導され	

るが免疫細胞の浸潤が減弱している	36-40
3-2-3 ハダカデバネズミは、外来性異物である LPS に応答し、マウスと同様に組織で免疫細胞の浸潤を引き起こす	41-44
3-2-4 ハダカデバネズミのマクロファージは、死細胞貪食能を有する	45-46
3-2-5 ハダカデバネズミの組織常在性の免疫細胞数は、他齧歯類と比較して少ない	47-50
3-2-6 ハダカデバネズミでは、発がん促進的な刺激に対する炎症応答が、遺伝子発現レベルで減弱している	51-53
3-3 ハダカデバネズミでは、発がん促進的炎症応答と関連する Necroptosis 経路に必須な制御遺伝子 <i>RIPK3</i> および <i>MLKL</i> が機能喪失している	54-68
3-3-1 ハダカデバネズミでは、発がん促進的な刺激後に <i>RIPK3</i> と <i>MLKL</i> の発現上昇がみられず、それぞれ種特有のフレームシフト変異を持つ	54-62
3-3-2 ハダカデバネズミの初代線維芽細胞は、Necroptosis 誘導剤による細胞死を起こさない	63-66
3-3-3 3MC 投与は、マウス組織内で Necroptosis を引き起こすが、ハダカデバネズミでは引き起こさない	67-68
3-4 Necroptosis 経路の阻害は、マウスにおいて発がん刺激後の免疫細胞浸潤を抑制し、がんの発症を遅延させる	69-73
3-4-1 <i>RIPK3</i> 阻害剤の投与により、発がん剤を投与されたマウスにおける Necroptosis 経路活性化および免疫細胞の浸潤が抑制される	69-71
3-4-2 <i>RIPK3</i> 阻害剤の投与により、発がん剤を投与されたマウスにおける発がんが遅延する	72-73
4. 考察	74-76
5. 総括および結論	77-78
6. 謝辞	79
7. 利益相反	80
8. 引用文献	81-86

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿済みである。

Shusuke Fujioka, Kaori Oka, Yoshimi Kawamura, Yoshihiro Komohara, Takeshi Chujo, Yuki Oiwa, Natsuko Omamiuda-Ishikawa, Yuki Yamamura, Shohei Komaki, Yoichi Sutoh, Satoko Sakurai, Kazuhito Tomizawa, Hidemasa Bono, Atsushi Shimizu, Takuya Yamamoto, Yasuhiro Yamada, Hiroyuki Oshiumi and Kyoko Miura. “Cancer resistance in naked mole-rats via a dampened inflammatory response”, *Nature Communications*.
(投稿済み)

本研究について学会発表は行っていない。

要旨

【背景と目的】

ハダカデバネズミ (Naked mole rat、NMR) は、発がん率が非常に低い、最長寿の齧歯類である。これまでに長期の観察研究から自然発生腫瘍をほとんど形成しないことが報告されている一方、人為的な発がん誘導による腫瘍形成に抵抗性を持つかは明らかになっていない。これまでに NMR の線維芽細胞を用いた発がん耐性機構の研究から、細胞自律的な発がん耐性を示唆する機構が複数提唱されてきた。しかし、最近それとは矛盾した結果も報告されるなど、本当に NMR が強い細胞自律的な発がん耐性を持つのかは議論の的となっている。さらに腫瘍形成は、生体内で生じる炎症などの複雑な細胞間相互作用によって制御されるにも関わらず、これまで NMR の生体内におけるがん耐性機構については全く解析が行われていない。そこで、新規の NMR のがん耐性機構を明らかにするため、個体に発がん促進的な刺激を加えることで、生体内の微小環境の動態を含めた NMR 特異的ながん抑制性の応答を同定し、その機構を解明することとした。

【方法・結果】

NMR が実験的な発がん誘導に抵抗性を持つかを明らかにするため、個体に対して発がん剤 (3-methylcholanthrene (3MC)、dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)/12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)) を用いた発がん誘導実験を行った。発がん剤投与により、マウスは全個体が腫瘍を形成したのに対して、NMR は現在まで 3MC で 132 週以上、DMBA/TPA で 70 週以上全く腫瘍形成が認められていない。

NMR の発がん耐性機構を解明するために、発がん剤あるいは発がん促進的な働きをする UV 照射後の組織変化を調べた。組織免疫染色を行った結果、両種ともに発がん刺激後の細胞死と DNA 損傷は誘導されていた。一方で、発がん促進的な炎症の指標の一つである免疫細胞の浸潤を評価した結果、マウスでは発がん促進的な刺激により強い免疫細胞の浸潤が引き起こされたが、NMR では免疫細胞が有意に増加するものの絶対数の変化は微小であった。NMR で組織への炎症性の免疫細胞の浸潤が一律に起こりにくい可能性を検討するため、NMR の免疫細胞が応答することが報告されているリポ多糖を投与し、皮膚および肝

臓で組織学的な解析を行った。結果、リポ多糖に応答して、NMRにおいても免疫細胞が顕著に増加した。

発がん促進的刺激に対して NMR で炎症応答が抑制される分子機構を明らかにするために、マウス特異的に 3MC 投与および UV 照射時に発現上昇した遺伝子群 (= NMR では発現上昇が起きなかった遺伝子群) の経路解析を行なった。結果、マウスでは、発がん促進的な刺激後に“RIPK1-mediated regulated necrosis (Necroptosis)”経路の活性化が認められた。なぜ Necroptosis 経路が NMR では活性化しないのかを明らかにするため、Necroptosis 経路のマスターレギュレーターである *Receptor-interacting kinase 3 (RIPK3)* および *Mixed lineage kinase domain-like (MLKL)* の配列ならびに遺伝子発現解析を行った。結果、NMR の両遺伝子には Necroptosis 誘導に必須の機能領域より上流に早期終止コドン変異があり、*RIPK3* はナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構により分解されること、*MLKL* はそもそも遺伝子発現していないことが明らかになった。NMR で Necroptosis 経路が喪失していることを確かめるため、初代皮膚線維芽細胞に Necroptosis 誘導剤を処理し、Necroptosis 誘導能の評価を行った。結果、NMR 線維芽細胞では Necroptosis 誘導能が認められなかった。さらに、Necroptosis 活性化時に生じることが報告されている High mobility group box-1 protein (HMGB1) の細胞質への移行を指標として、組織における Necroptosis の活性化を評価した結果、発がん促進的な刺激に伴う HMGB1 の細胞質移行は NMR では認められなかった。

マウスで Necroptosis 経路の抑制を再現した場合に、免疫細胞の浸潤およびがん発症が抑制されるかを明らかにするため、RIPK3 阻害剤である GSK'872 を用いて評価を行なうことにした。その結果、GSK'872 を投与したマウスでは 3MC 投与後の皮膚における HMGB1 の細胞質移行、免疫細胞の浸潤の低下が認められた。さらに、GSK'872 を投与したマウスでは、3MC 投与による発がんが有意に遅延し、Necroptosis 経路の抑制が発がん耐性に寄与することを示した。

【考察】

これまで、様々な齧歯類において、化学発がん物質による発がん誘導への応答性が評価されてきた。NMR と同じく、自然発生腫瘍が非常に起こりにくい Blind mole rat (BMR) でも、本研究と同量の 3MC を用いて発がん誘導実験が行われている。BMR では、130 週間の観察期間中に、18%の個体が腫瘍を形成することが報告されている。本研究の実験系では NMR は 132 週の観察の間に 1 個

体も腫瘍形成を認めておらず、NMR が特に並外れた発がん耐性を持つことを実験的に証明することができた。

本研究は、NMR が Necroptosis 経路に必須な遺伝子である *RIPK3* と *MLKL* の機能喪失型変異により、Necroptosis 誘導能を欠損していることを明らかにした。Necroptosis は、発がん制御に関わるほか、加齢性疾患、虚血、ウイルス感染などの様々な炎症関連性の疾患に関与することが報告されている。特に、NMR はがん耐性だけでなく、加齢性疾患や虚血に対しても強い抵抗性を持つことが報告されている。このことから、Necroptosis 経路の喪失は NMR の疾患・虚血耐性に寄与している可能性も考えられる。

【結論】

本研究では、NMR が化学発がん物質を用いた 2 種類の実験的な発がん誘導に並外れた耐性を持つこと、その耐性メカニズムの一端としてがん促進的な炎症応答の減弱が寄与すること、またその一因として Necroptosis 経路のマスターレギュレーターである *RIPK3* と *MLKL* の機能喪失型変異による Necroptosis 誘導能の喪失を明らかにした。本研究は、NMR をはじめとする他のがん耐性動物のがん耐性機構を理解する上で、個体の組織応答性を解析する重要性を示す第一歩となるものである。今後さらなる研究が進められることで、ヒト・モデル生物を用いた研究とは異なる観点からのがんの治療・予防戦略の開発につながる事が期待される。

略語表

本文および図表中で用いた略語は以下の通りである。

3MC、3-methylcholanthrene

8-OHdG、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

ACTB、Beta-Actin

ActD、Actinomycin D

ANOVA、Analysis of variance

BMR、Blind mole rat

cDNA、Complementary DNA

CHX、Cycloheximide

DMBA、Dimethylbenz[a]anthracene

DMEM、Dulbecco's modified eagle's medium

FBS、Fetal bovine serum

GO、Gene ontology

HE、Hematoxylin and eosin

HIV、Human immunodeficiency virus

HMGB1、High mobility group box-1 protein

HRP、Horseradish peroxidase

IGV、Integrative genomics viewer

IL6、Interleukin-6

i.m.、Intramuscular

i.p.、Intraperitoneal

LPS、Lipopolysaccharide

MLKL、Mixed lineage kinase domain-like

mRNA、Messenger RNA

MPO、Myeloperoxidase

NMD、Nonsense-mediated mRNA decay

NMR、Naked mole-rat

PBS、Phosphate-buffered saline

pH2AX、Phospho-Histone H2A.X

PI, Propidium Iodide

quantitative RT-PCR, Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RIPK, Receptor-interacting kinase

RNA-seq, RNA sequencing

RPMI, Roswell park memorial institute

SDS, Sodium dodecyl sulfate

SV40ER, Simian virus 40 early region

TBS, Tris buffered saline

TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TNF- α , Tumour necrosis factor- α

TPM, Transcripts per million

UV, Ultraviolet

VSV-G, Vesicular stomatitis virus G glycoprotein

緒言

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 (体重35 g)、最大寿命37年以上の最長寿齧歯類である (Lee et al., 2020)。さらに、飼育環境下の2000匹以上のコホート研究から、がんにより死亡した個体がほとんどいないことが報告されている (Delaney et al., 2013; Ruby et al., 2019; Taylor et al., 2017)。この並外れた発がん耐性により、NMRは多くの研究者の注目を集めているが、意外なことに、その個体のがん耐性は自然発生腫瘍が発生しにくいことのみで依拠しており、個体における発がん誘導実験は未報告である。一般に、がんの発生には遺伝的要因だけでなく環境的要因が大きく寄与していることから (Abel et al., 2009)、NMRが真にがん耐性であるかを明らかにするためには、実験的な発がん促進環境下でも発がん抵抗性を示すかどうかを検証する必要がある。

これまでの研究において、NMRのがん耐性機構を明らかにするために、培養線維芽細胞を用いた解析が盛んに行われてきた。その結果から、腫瘍抑制遺伝子であるARFが抑制された場合にNMRは細胞老化様の表現型を示すこと (Miyawaki et al., 2016)、他種に比べてより低密度培養条件での接触阻害機構を有すること (Seluanov et al., 2009)、NMR線維芽細胞を実験的に形質転換するにはHRasV12およびSV40 Large T抗原の導入に加えて、1) 高分子ヒアルロン酸産生の抑制 (Tian et al., 2013) または 2) テロメラーゼ逆転写酵素の強制発現が必要であること (Liang et al., 2010) が報告されている。一方、Hadiらは近年、先述の報告と異なり、NMR線維芽細胞がマウス細胞と同様にHRasV12およびSV40 Large Tのみによって形質転換されると報告しており (Hadi et al., 2020)、NMRが強力な細胞自律的ながん耐性メカニズムを有するかは現在議論となっている。

一般に生体内の発がん過程では、細胞のDNA変異 (イニシエーション) に引き続いて、変異細胞周辺で持続的な炎症が惹起されることにより、免疫細胞や間質細胞などが組織の微小環境を変化させ、変異細胞のさらなる遺伝的およびエピジェネティックな変化を強力に促進し、発がんを進行させる (プロモーション)。この多段階的な発がん過程が、発がん剤や遺伝子改変マウスを用いた研究により明らかにされてきた (Avgustinova et al., 2018; Bald et al., 2014; Mittal et al., 2010)。したがってこれまでのNMR線維芽細胞を形質転換し培養

下で性状解析する、あるいは、形質転換した細胞を免疫不全マウスへ異種移植する実験系では、生体で発生する複雑な細胞間相互作用を含む発がん段階の生理的な状況を十分には反映できていないことが考えられる。

そこで本研究では、NMR が発がん誘導に対する耐性を持つかどうか、またその機構を解明するために、個体レベルでの発がん誘導実験を行い、生体内の微小環境の動態を観察することでNMR 特異的ながん抑制性の応答を同定・解析することとした。

1.実験方法

2-1 本研究に用いた実験動物と倫理申請

NMR は、北海道大学および熊本大学において、12 時間ごとの明暗周期下、室温 $30 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ で維持された飼育室で飼育した。マウスは、日本クレアから購入した 6–8 週齢のオスの C57BL/6N マウスを北海道大学および熊本大学において、12 時間ごとの明暗周期下、室温 $24.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ で維持された飼育室で飼育した。オスのラット (Wistar; 6 ヶ月齢) およびモルモット (Hartley; 6 ヶ月齢) は、日本エスエルシーから購入した。動物実験は、「北海道大学動物実験に関する規定」(承認番号、A30-043) および「熊本大学動物実験等に関する規則」(承認番号、14-0065) に則り行った。

2-2 3MC 処置

腫瘍形成を評価するために、C57BL/6N マウスおよび NMR に 3-methylcholanthrene (3MC、Sigma-Aldrich; 1 mg / 100 μl 、corn oil で溶解) を後肢大腿部または背部皮膚下に注射した (Garcia-Cao et al., 2012)。エンドポイントは腫瘍径 15 mm とし、エンドポイントに到達した動物はイソフルラン麻酔による安楽死を行った。NMR は腫瘍形成が認められなかったため、後肢大腿部に投与した 9 匹中 3 匹を 114 週経過後にイソフルラン麻酔で安楽死させた。個体から筋肉 (3MC 注入部位および対照として反対側の部位) の収集を行い、組織病理学的解析に使用した。3MC 短期間曝露に対する反応を評価するために、3MC (1 mg / 100 μl corn oil) を C57BL/6N マウスおよび NMR の背部皮膚に皮下注射し、1 週間後に注射部位 (約 100 mm^2) を収集し (Zhang et al., 2013)、さらなる解析に使用した。

Necroptosis 経路を抑制するために、皮下または筋肉内 3MC 投与 (1 mg / 100 μl corn oil) を行う 7 日前から、RIPK3 阻害剤 GSK'872 (SelleckBio; 1 mg/kg、生理食塩水で溶解) を週 3 回腹腔内注射した。3MC の短期間曝露に対する組織応答性の評価を行う場合、3MC を皮下注射した 1 週間後に注射部位の皮膚 (約 100 mm^2) を収集し、さらなる解析に使用した。腫瘍形成を評価する場合、3MC を後肢大腿部に注射し、エンドポイントは腫瘍径 15 mm として、エンドポイントに到達した動物はイソフルラン麻酔による安楽死を行った。

2-3 DMBA/TPA 処置

腫瘍形成を評価するために、C57BL/6N マウスおよび NMR の背部皮膚に、dimethylbenz[a]anthracene (DMBA、Sigma-Aldrich; 100 µg / 100 µl、アセトンで溶解) を塗布した。DMBA 塗布の 1 週間後から、DMBA 塗布部位に週 2 回 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA、Cayman Chemical; 12.5 µg / 100 µl、アセトンで溶解) をエンドポイントに到達するまで塗布した (Yamakoshi et al., 2009)。エンドポイントは腫瘍径 7 mm とし、エンドポイントに到達した動物はイソフルラン麻酔によって安楽死した。採取した腫瘍は、さらなる解析に使用した。NMR は腫瘍形成が認められなかったため、55 週後にイソフルラン麻酔下で塗布した背部皮膚の生検を行い、さらなる解析に使用した。組織病理学的解析の際に、外傷が見つかった個体は過去の報告に従い、さらなる組織病理学的解析から除外した (1/6 個体) (Abel et al., 2009)。

2-4 UV 照射

C57BL/6N マウスおよび NMR の背部皮膚に、UV ランプ (UVP UVM-28、Analytic Jena) を使用して、1000 J/m² の線量で 2 日に 1 回の照射を 12 日間行なった (Chung et al., 2015)。C57BL/6N マウスについては、照射前に背部皮膚の剃毛を行なった。最終照射から 24 時間後、イソフルラン麻酔による安楽死を行い、皮膚サンプルをさらなる解析に使用した。

2-5 LPS 処置

C57BL/6N マウスおよび NMR を皮下または腹腔内に Lipopolysaccharide (LPS、Sigma-Aldrich; 10 mg/kg、生理食塩水に溶解) (Kumar et al., 2017) を投与した。24 時間後、イソフルラン麻酔による安楽死を行い、皮膚または肝臓のサンプルをさらなる解析に使用した。

2-6 組織免疫化学染色

組織病理学的解析のために、組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、固定した組織を K.I.stainer に依頼し、パラフィン切片と Hematoxylin and Eosin (HE) 標本を作製した。免疫染色に際し、抗体の交差反応性を K.I.stainer の病理医監修のもと、NMR 脾臓を用いて特異性・至適条件の検定を行った。各抗体の濃度・賦活化に用いたバッファは、リストに記載した (Table 1、Negative: NMR

で染まらなかった抗体、Positive: NMR で染まった抗体)。免疫染色は、切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的にエタノール濃度を下げることで再水和を行った。抗原賦活化は、クエン酸バッファーまたは Tris バッファー中で抗原賦活化処理用プレッシャーチャンバーPascal (Dako) を用いて行った (Nakagawa et al., 2017)。賦活処理した切片は、0.1% NaN₃ を含む 1% ウシ血清アルブミン/ Tris buffered saline (TBS) で 20 分間インキュベートした後、一次抗体; CD45 (Abcam, ab10558)、Myeloperoxidase (MPO, DAKO, A0398)、IBA1 (FUJIFILM WAKO, 019-19741)、CD3 (Nichirei, 413591)、Ki67 (Abcam, ab16667)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG, Santa Cruz Biotechnology, sc-393871)、phospho-Histone H2A.X (pH2AX, Cell Signaling Technology (CST), 9718) または High mobility group box-1 protein (HMGB1, Abcam, ab79823) と 4°C で一晩反応させた。免疫組織化学的染色のために、Peroxidase 結合抗ウサギ、マウス、またはラット二次抗体 (ニチレイ) と室温で 30 分間反応させた。陽性シグナルは、HistoGreen 基質 (Cosmo Bio) または diaminobenzidine (DAB; Nichirei) を使用して発色した。HMGB1 の検出のためには、Alexa Fluor 555 抗ウサギ IgG (CST, A21429) と室温で 1 時間反応させた。核は、Hematoxylin (CD45, MPO, IBA1, CD3, Ki67, 8-OHdG および pH2AX) または Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, HMGB1) で対比染色した。画像は BZ-X 710 蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で撮影し、BZ-X image analyser (KEYENCE) を使用して解析した。

Table 1 本研究で使用した抗体のリストおよび賦活化条件

Antibody	Code No.	Results	Antigen retrieval and concentration
CD3 (SP7)	Nichirei (413591)	Positive	Antigen retrieval buffer pH9 (Nichirei), 1:500
Iba1	WAKO (019-19741)	Positive	EDTA pH8 buffer, 1:4000
Myeloperoxidase	DAKO (A0398)	Positive	EDTA pH8 buffer, 1:4000
CD45	Abcam (ab10558)	Positive	Antigen retrieval buffer pH9 (Nichirei), 1:2000
CD4 (EPR6855)	Abcam (ab133616)	Negative	
CD4 (GHH4)	dianova (DIA-404)	Negative	
CD8 (GHH8)	dianova (DIA-808)	Negative	
CD11b (M1/70)	Biolegend (101201)	Negative	
CD11b (EP1345Y)	Abcam (ab52478)	Negative	
CD34 (EP373Y)	Abcam (ab81289)	Negative	
CD45R(RA3-6B2)	Abcam (ab64100)	Negative	
CD45R(B220)	Pharmingen (01121D)	Negative	
CD68(FA-11)	Abcam (ab64100)	Negative	
CD79a(SP18)	Serotec (MCA1957)	Negative	
EMR1(F4/80)	Original	Negative	
Gr-1	Southern Biotechnology (1900-01)	Negative	
Antibody	Code No.	Results	Antigen retrieval and concentration
pH2AX	CST (#9718)	Positive	Antigen retrieval buffer pH9 (Nichirei), 1:500
8-OHdG	Santa Cruz Biotechnology (sc-393871)	Positive	Antigen retrieval buffer pH9 (Nichirei), 1:5000
Ki67	Abcam (ab16667)	Positive	Antigen retrieval buffer pH9 (Nichirei), 1:2
HMGB1	Abcam (ab79823)	Positive	Antigen retrieval buffer pH9 (Nichirei), 1:500

2-7 TUNEL 染色

TUNEL 染色を行うために、4 μm のパラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、段階的にエタノール濃度を下げることで再水和した。染色には、TUNEL Assay kit BrdU-Red (Abcam) を使用した。核を Hoechst 33258 で対比染色した。画像は BZ-X 710 蛍光顕微鏡 (KEYENCE) で撮影し、BZ-X image analyser (KEYENCE) を使用して解析した。

2-8 上皮の肥厚および免疫染色陽性細胞の評価

上皮の肥厚化を測定するために、1 視野ごとに 5 箇所の上皮の厚さを ImageJ で測定し、平均長を計算した。1 個体あたり 4 視野評価を行なった (Zhou et al., 2019)。組織免疫化学染色および TUNEL 染色陽性細胞数の評価のために、各処置あたり 3 個体以上の動物から 1 視野の総細胞数 (Ki67、TUNEL、pH2AX、8OHdG、CD45、IBA1、MPO および CD3) あるいは組織面積 (CD45、IBA1、MPO および CD3) あたりの陽性細胞数をカウントし、定量した。定量は、2 人の研究者によって 1 個体あたり 4 視野評価を行った。総細胞 (Hoechst または hematoxylin 陽性の核数として算出 (一実験群あたり 350 細胞以上)) および面積 (明視野中の組織占有面積) は、BZ-X image analyser の Hybrid Cell Count application (KEYENCE) を使用して測定した。

細胞質 HMGB1 陽性細胞をカウントするために、HMGB1 の蛍光が Hoechst の蛍光外にある細胞を細胞質 HMGB1 陽性とみなし、HMGB1 陽性細胞の総数 (一実験群あたり 100 細胞以上) に対する比率を求めた。各処置あたり 3 個体以上の動物から、1 個体あたり 4 視野評価を行った。

2-9 RNA 抽出と cDNA 合成

RNeasy Plus Mini キット (Qiagen、細胞の場合) または TRIzol (Thermo Fisher、組織の場合) の標準プロトコールに従い、RNA を抽出した。ゲノム DNA 除去には、それぞれ gDNA Eliminator Spin Column (Qiagen) または TURBO DNA-free™ キット (Invitrogen) を使用した。逆転写反応は、300 ng の RNA をテンプレートとして、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) の標準プロトコールに従い

行なった。逆転写後の cDNA を RT-PCR および qRT-PCR に使用した。RT-PCR の場合、PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara) を使用し、24 cycles (*ACTB*) あるいは 35cycles (*MLKL*) 増幅した。PCR 産物は、2%アガロースゲルで電気泳動した。qRT-PCR は、Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO)あるいは PowerUP SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher)と CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) を使用し、Table2 に記載したプライマーを使用して行なった。

Table 2 本研究で使用したプライマーのリスト

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>Ripk3</i> (Mouse)	Forward	GAAATGGATTGCCCGAGGGA
	Reverse	GTGCTTGCCTCTCAGGACAT
<i>RIPK3</i> (NMR_CDS)	Forward	CTCATCCCGAGCACCCTTC
	Reverse	CCGCTTCTTCCCAGGTGACAA
<i>RIPK3</i> (3'UTR)	Forward	GCGGCCTGTAGGTGTTGAA
	Reverse	GTCAGTTGGGGCATAGCAGG
<i>RIPK3</i> (Guinea pig)	Forward	GGCTTACTTGCCCCAGAAT
	Reverse	GCCACCTCAGTTTCTCTTCC
<i>Mkl1</i> (Mouse)	Forward	AGGAGGCTAACCAGCAGATAGA
	Reverse	GAGCATTGCTTCAGGGTTTTGT
<i>MLKL</i> (NMR)	Forward	ACCTGGGGACTAACTCTGCT
	Reverse	CCACATTCATGCAAAACAGCCC
<i>MLKL</i> (Guinea pig)	Forward	ATCGTCCTCTGGGAAATCGC
	Reverse	GCACCCATCAATGACCTCCT
<i>IL6</i> (Mouse)	Forward	TCTATACCACTTCACAAGTCGGA
	Reverse	GAATTGCCATTGCACAACCTCTTT
<i>IL6</i> (NMR)	Forward	GCTAGTCCTCCACGATGTCC
	Reverse	TTGCCTTTTCCTCCTCTAGGC
<i>p21</i> (Mouse)	Forward	TCCCGTGGACAGTGAGCAGTTG
	Reverse	CGTCTCCGTGACGAAGTCAAAG
<i>p21</i> (NMR)	Forward	ACCTGTCGCTGTCCTGCACCCTTG
	Reverse	CGTCATGCTGGTCTGCCGCCGTT
<i>ACTB/Actb</i>	Forward	AGACCTTCAACACCCCAGCCATGT
	Reverse	GGCCAGCCAGGTCCAGACGCAG
<i>GAPDH/Gapdh</i>	Forward	CTCCTGCGACTTCAACAGCAA
	Reverse	TACCAGGAAATGAGCTTGACA

2-10 細胞培養

NMR 線維芽細胞は、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM、Sigma-Aldrich) に非働化牛胎仔血清 (Fetal bovine serum、FBS、Gibco) 15% (v/v)、ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 0.5% (v/v) (FUJIFILM WAKO)、非必須アミノ酸溶液 1% (v/v) (FUJIFILM WAKO)、L-グルタミン溶液 1% (v/v) (FUJIFILM WAKO) を添加した培地で培養した。またマウス線維芽細胞は、DMEM に FBS 10% (v/v)、ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液 0.5% (v/v)、非必須アミノ酸溶液 1% (v/v)、L-グルタミン溶液 1% (v/v) を添加した培地で培養した。いずれも、32°C、5% O₂、5% CO₂ 環境下で培養を行い、2 日ごとに培地を交換した。なお、実験には継代数 3-5 回の細胞を用いた。

2-11 Necroptosis 経路関連遺伝子の発現誘導

マウス *Ripk3*、*Mkl1* を強制発現するためにレンチウイルスを用いた。レンチウイルス作成のために、pCSII-EF-Mouse-Ripk3-TK-hyg、pCSII-EF-Mouse-Mkl1-TK-hyg、pCSII-EF-Venus-TK-hyg、Human immunodeficiency virus (HIV)、vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) を用いた。目的遺伝子の発現ベクターと HIV、VSV-G を Polyethylenimine MAX transfection reagent (PEI、CosmoBio) を用いて human embryonic kidney 293T にトランスフェクションし、9 時間後に NMR 細胞培養用の培地に交換した。24 時間後に上清を 0.45 μm フィルターを通して回収した。さらに新しい培地を加えて 24 時間培養し、同様に上清を回収した。回収した上清を新しい培地と混合し、1×10⁵ 細胞/6 cm ディッシュの細胞数で播種した NMR 線維芽細胞に添加した。ウイルス感染は 24 時間ごとに 2 回を行い、NMR 線維芽細胞には計 48 時間ウイルスを感染させた。ウイルス感染終了後、48 時間経過した細胞を Necroptosis 誘導実験に用いた。

モルモット *RIPK3*、*MLKL* を強制発現するために、pCSII-EF-Guinea Pig-RIPK3-TK-hyg、pCSII-EF-Guinea Pig-MLKL-TK-hyg、pCSII-EF-Venus-TK-hyg を用いた。PEI を用いて、不死化した NMR 線維芽細胞 5 × 10⁵ 細胞/10 cm ディッシュの細胞を 48 時間ごとに 2 回トランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、Necroptosis 誘導に細胞を用いた。

なお、遺伝子組み換え実験については、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」および「熊本大学遺伝子組換え生物等二種使用等安全管理規則」に基づいて行った。

2-12 Necroptosis 誘導および細胞死の評価方法

マウスまたはNMR皮膚由来線維芽細胞を24ウェルプレートに 1×10^4 細胞/ウェルで播種し、TNF- α (PeproTech; 50 ng/ml)、z-VAD-fmk (Abcam; 20 μ M)、cycloheximide (CHX、FUJIFILM WAKO; 1 μ g/ml) および Necostatin-1 (Nec1、Sigma-Aldrich; 20 μ M) 処置した。24時間後、細胞死を評価するために、細胞をHoechst 33342 (DOJINDO; 1 μ g/ml) で10分間染色し、次にヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide、PI、WAKO; 10 μ g/ml) で5分間染色した。画像はBZ-X 710 蛍光顕微鏡 (KEYENCE)で撮影し、BZ-X image analyser (KEYENCE) を使用して、PIまたはHoechst 33342陽性の細胞数 (一実験群あたり100細胞以上) をカウントした。PIおよびHoechst 33342が共陽性となる細胞を死細胞と見なした。

2-13 死細胞貪食実験

マウスまたはNMRをイソフルラン麻酔で安楽死させ、四肢を採取した。筋肉および軟骨組織を取り除いた後、骨組織をPBS中で破碎した。破碎後の細胞懸濁液を70 μ mのCell Strainer (Falcon) で濾過し、濾液を低浸透圧溶液 (155 mM 塩化アンモニウム、12 mM 炭酸水素ナトリウム、100 μ M Na₂EDTA)に懸濁することで赤血球を除去した。溶血後の残りの細胞を、RPMI-1640 (FUJIFILM WAKO) に15% FBS、ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液0.5% (v/v)、非必須アミノ酸溶液1% (v/v)、L-グルタミン溶液1% (v/v)、ヒトマクロファージコロニー刺激因子 (PeproTech; 20 ng/ml) を添加した培地で8日間培養した。

細胞死を誘導するために、皮膚線維芽細胞へ200 J/m²のUV-C照射をUVクロスリネカー (Analytic Jena) によって行い、照射後24時間、細胞を無血清培地で培養した。24時間後に死細胞を回収し、pHrodo (Thermo Fisher) の標準プロトコールに従い染色した。同量のpHrodo標識死細胞 (5×10^5 細胞) をNMRまたはマウス骨髄マクロファージと共培養し、2時間後、BZ-X 710 蛍光顕微鏡 (KEYENCE)を使用して、pHrodoの蛍光を観察した。

2-14 ウェスタンブロッティング

組織は、Cell lysis buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% sodium dodecyl sulfate, 10% sucrose) に溶解し10分間煮沸を行いタンパク溶液とした。タンパク溶液は、BCA Protein Assay Kit (T9300A、Takara) で濃度を測定し、各サンプルのタンパ

ク質濃度が等しくなるように調製した。その後、Any kD™ミニプロテイン TGX™ プレキャストゲル (Bio-Rad) でタンパク質を分離した。トランスブロット Turbo™ 転写システム (Bio-Rad) を使用して、トランスブロット Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit (1704272、Bio-Rad) 付属の polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。0.5% スキムミルク (雪印メグミルク) / Tris buffered saline with Tween 20 中で1時間室温にてブロッキングし、一次抗体 (MLKL (Abcam、ab184718; 1:1000)、pMLKL (Abcam、ab196436; 1:1000)、GAPDH (Sigma-Aldrich、GA1R; 1:5000)、Vinculin (Sigma-Aldrich、V9131; 1:1000)) を4℃で一晩反応させた。メンブレンを洗浄後、二次抗体を1時間室温にて反応させ、ECL Western Blotting Detection Reagents (RPN2109、GE Healthcare) または ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (RPN2232、GE Healthcare) で発光させ、Image Quant LAS4000 mini (FUJIFILM) を使用して検出した。

2-15 RNA-sequencing 解析

皮膚組織から、Trizol を用いて RNA 抽出を行った。抽出した RNA は、Qiagen RNeasy column を用いて精製後、RNase-Free DNase Set (Invitrogen) を用いて、ゲノム DNA を除去した。RNA の定量およびクオリティーチェックは、Qubit (Invitrogen) および RNA 6000 Nano Kit (Invitrogen) を用いて行った。ライブラリーの調製は、200 ng の RNA を TruSeq stranded mRNA library preparation kit (Illumina) を用いて行なった。作製したライブラリーは、NextSeq 550 (Illumina) を用いて、シングルエンドリードでシークエンスした。

得られたシークエンスデータの解析のため、cutadapt (ver.1.14、Python 2.7.6) (Marcel Martin, 2011) を用いてアダプター配列を除去した。トリミングを行なったデータは、Ensembl 92 (<https://www.ensembl.org/index.html>) からダウンロードしたマウス (mm10) または NMR (HetGla_female_1.0) のリファレンスゲノムデータおよびアノテーションファイル (Bens et al., 2018) を利用し、STAR (ver.2.4.1d) (Dobin et al., 2013) を用いてマッピングを行なった。遺伝子発現量の定量および発現変動遺伝子の検出には、HTSeq (version 0.11.2) (Anders et al., 2015) および edgeR (ver.3.18.1) (Robinson et al., 2009) を使用した。発現変動遺伝子のエンリッチメント解析には Metascape (Zhou et al., 2019)、発現変動遺伝子の細胞型エンリッチメント解析には xCell (Aran et al., 2017) を用いた。*RIPK3*、*MLKL* 遺伝子座における遺伝子発現データは、Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al.,

2011) を用い、リード数を deeptools (ver.2.1.0) (Rustgi, 2007) により TPM 値として補正した後に可視化した。

2-16 統計処理

得られたデータの統計処理には、Graphpad Prism (Graphpad) を用いた。多群間のデータの解析には、分散分析法 (analysis of variance; ANOVA) を用い、Tukey 検定あるいは Dunnett 検定を用いて多重比較検定を行った。また 2 群間の検定には、Student の t 検定を用いた。結果は、平均値 \pm 標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で表した。全ての実験を 3 個体以上あるいは 3 回以上行なった。

3. 実験結果

3-1 ハダカデバネズミは、強い発がん剤耐性能を有する

3-1-1 ハダカデバネズミは、3MC による発がん誘導に抵抗性を持つ

これまでの観察研究から、ハダカデバネズミ (NMR) は自然発生腫瘍をほとんど形成しないことが報告されているが (Ruby et al., 2019)、実験的な発がん誘導に抵抗性を持つかは明らかになっていない。そこで、様々な齧歯類に腫瘍を形成することが報告されている、3MC を NMR およびマウスの後肢大腿部に投与した。マウスでは、6 ヶ月以内に全ての個体 (9/9 個体) が腫瘍を形成した。一方でマウスとは対照的に、NMR は 114 週間の観察期間にわたって腫瘍を発生しなかった (0/9 個体、Fig. 1a–d)。114 週目に 3 個体の NMR の組織病理学的解析を行なった結果、過形成などの異常は検出されなかった (Fig. 2a, b)。さらに、Ki67 陽性の増殖細胞の有意な増加についても観察されなかった (Fig. 2c)。現在、病理解析に用いていない残り 6 個体の NMR の観察を継続しており、腫瘍は 132 週間観察されていない。また、3MC を皮下投与し、70 週間が経過しても、NMR において腫瘍は観察されなかった (0/5 個体、Fig. 3)。一方で、3MC を皮下投与したマウスは、重度の皮膚潰瘍が生じたため、腫瘍形成を待たず 10 週間以内に安楽死させた (Fig. 3)。

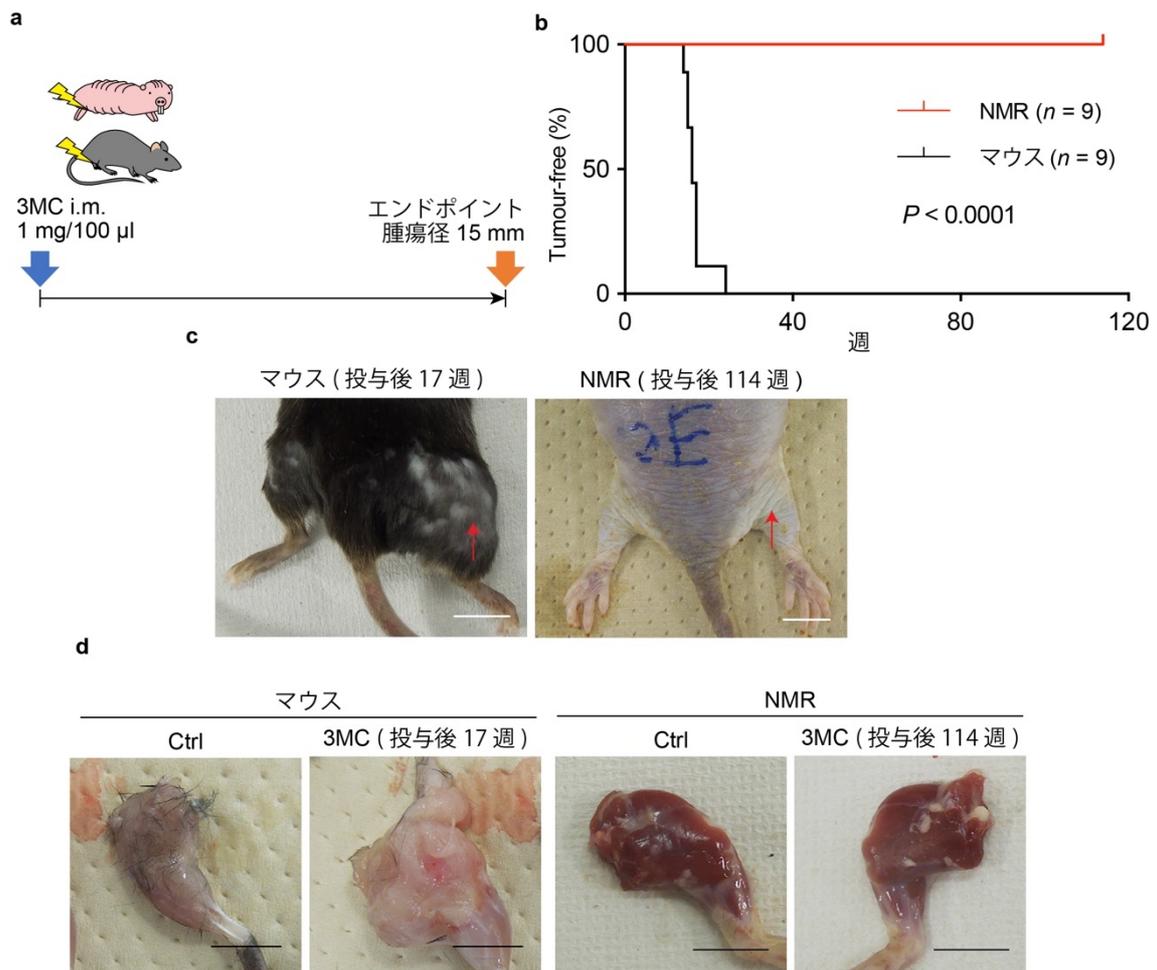


Fig. 1 発がん剤 3MC により NMR は腫瘍を形成しない

- a**、右後肢大腿部への 3MC の筋肉内注射 (i.m.) による発がん誘導実験の模式図。
b、3MC を投与したマウスおよび NMR の Kaplan-Meier 曲線。腫瘍径 > 15 mm をエンドポイントとした。各 $n = 9$ 。 $P < 0.0001$ 、Log-rank test。
c、3MC を投与して 17 週後のマウスおよび 114 週後の NMR。
d、3MC 投与 17 週後のマウスの腫瘍および 114 週後の NMR の投与部位。コントロール (Ctrl) には投与部位と反対 (左後肢) の筋肉を用いた。Scale bar、1 cm。各 $n = 3$ 。

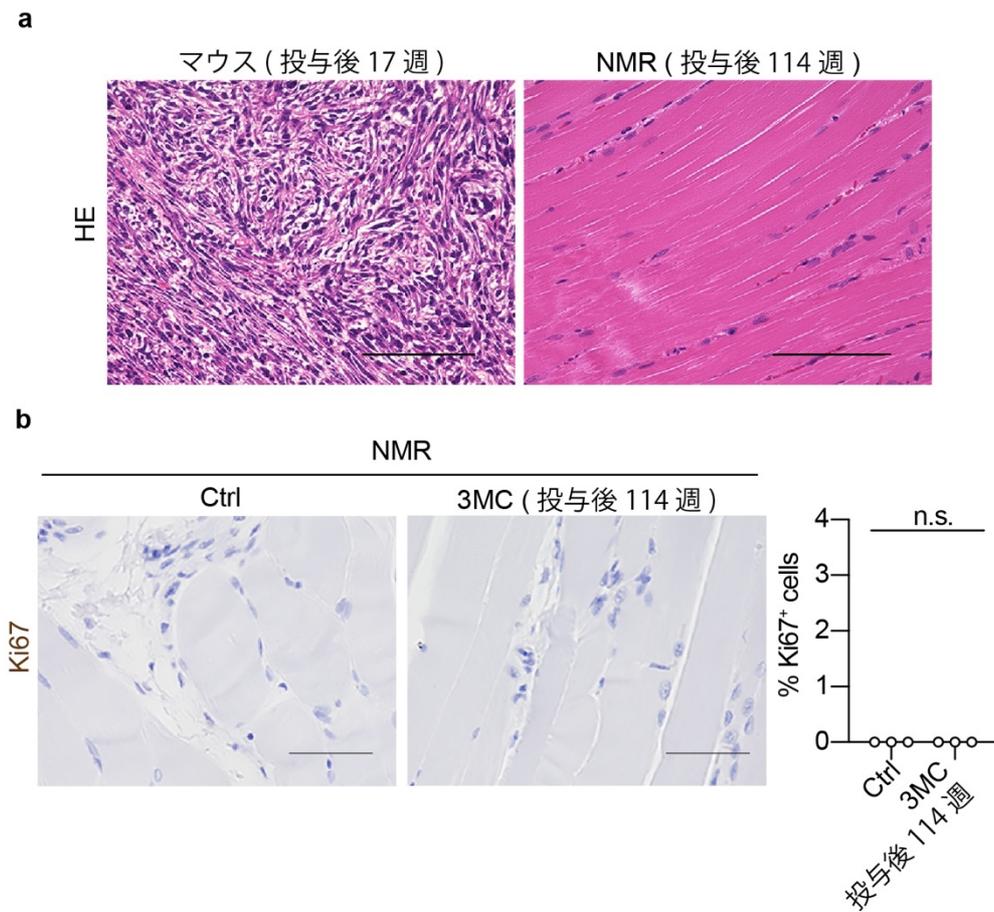


Fig. 2 発がん剤を投与して 114 週経過しても組織の微小変化は起きていない
a、3MC 投与 17 週後のマウスの腫瘍および 114 週後の NMR の 3MC 投与部位の HE 染色像。Scale bar、50 μ m。各 $n = 3$ 。 **b**、3MC 投与 114 週後の NMR の 3MC 投与部位の Ki67 の免疫組織化学染色像および Ki67 陽性細胞の定量結果。Scale bar、50 μ m。各 $n = 3$ 個体。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。n.s.、有意差なしを示す。検定は、Ctrl に対して unpaired t -test で行った。

マウス (3MC 皮下投与後 10 週) NMR (3MC 皮下投与後 55 週)

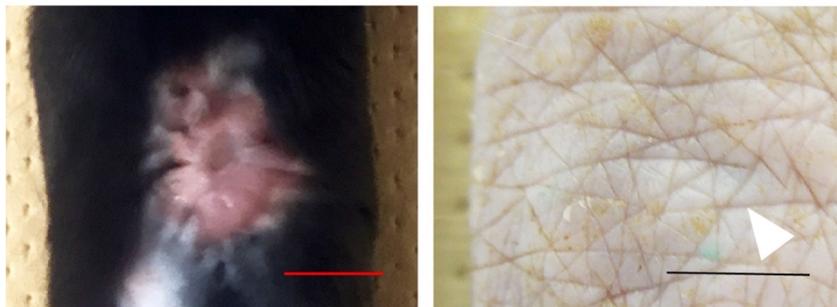


Fig. 3 3MC 皮下投与後のマウスおよび NMR の投与部位
3MC 皮下(s.c.) 投与 10 週後のマウスおよび 55 週後の NMR の背部皮膚。Scale bar、
1 cm。各 $n = 5$ 。矢頭は投与部位を示す。

3-1-2 ハダカデバネズミは、DMBA/TPA による発がん誘導に抵抗性を持つ

上述のように、ハダカデバネズミ (NMR) は 3MC による発がん誘導に強い抵抗性を示した。次に、他の発がん剤による発がん誘導に対しても抵抗性を持つかを明らかにするために、7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) と 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を背中の皮膚に塗布し、腫瘍形成を観察した (Fig. 4a)。マウスは 30 週までに全ての個体が腫瘍を形成した (6/6 個体、Fig. 4a-c)。しかし、NMR は 70 週経過した現在にわたって腫瘍を形成しなかった (0/6 個体、Fig. 4a-c)。55 週経過後に 5 匹の DMBA/TPA を処置した NMR の皮膚生検の組織病理解析を行った結果、上皮の Ki67 陽性の増殖細胞は有意に増加していたものの、過形成などの病変は見られなかった (Fig. 5a, b)。

以上の二種の化学発がん誘導実験の結果から、NMR が化学発がんに対して顕著な発がん耐性を持っていることが明らかになった。

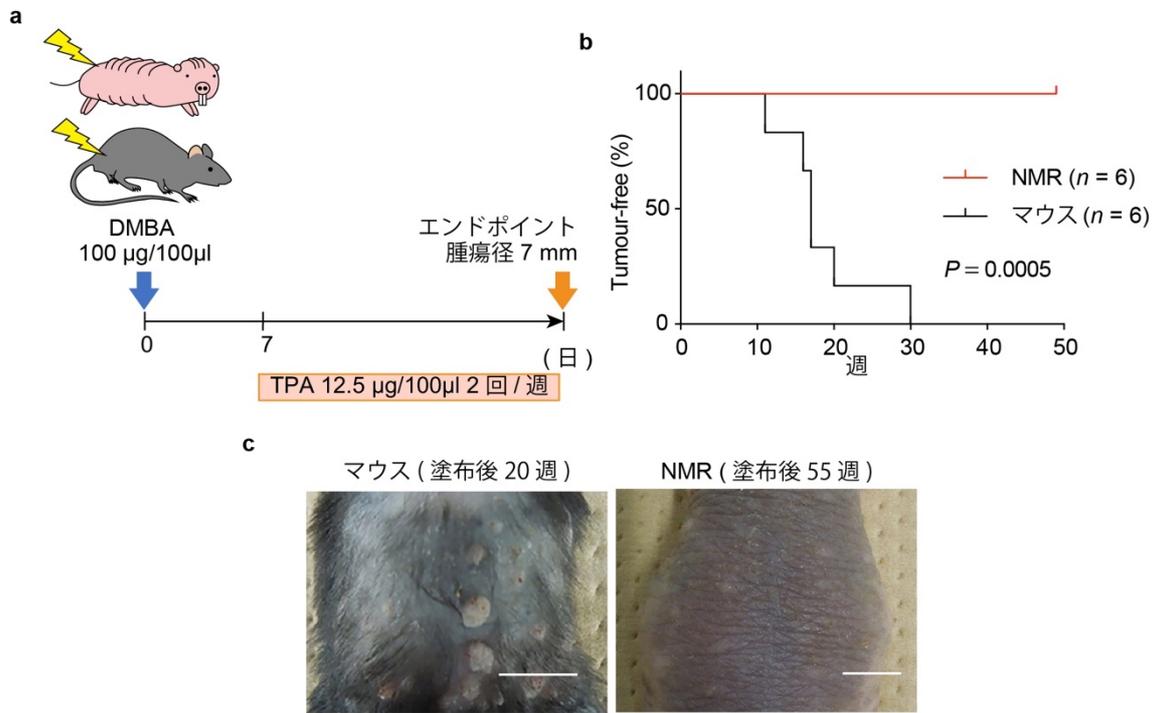


Fig. 4 DMBA/TPA 塗布による発がんモデルで、NMR は腫瘍を形成しない
a、DMBA/TPA 塗布による発がん誘発実験の模式図。DMBA 塗布 1 週間後から腫瘍形成まで、週 2 回 TPA を塗布した。**b**、DMBA/TPA 塗布したマウスおよび NMR の Kaplan-Meier 曲線。腫瘍径 > 7 mm をエンドポイントとした。各 $n = 6$ 。 $P = 0.0005$; Log-rank test。**c**、DMBA/TPA 塗布から 20 週後のマウスおよび 55 週後の NMR の背部皮膚。Scale bar、1 cm。各 $n = 6$ 。

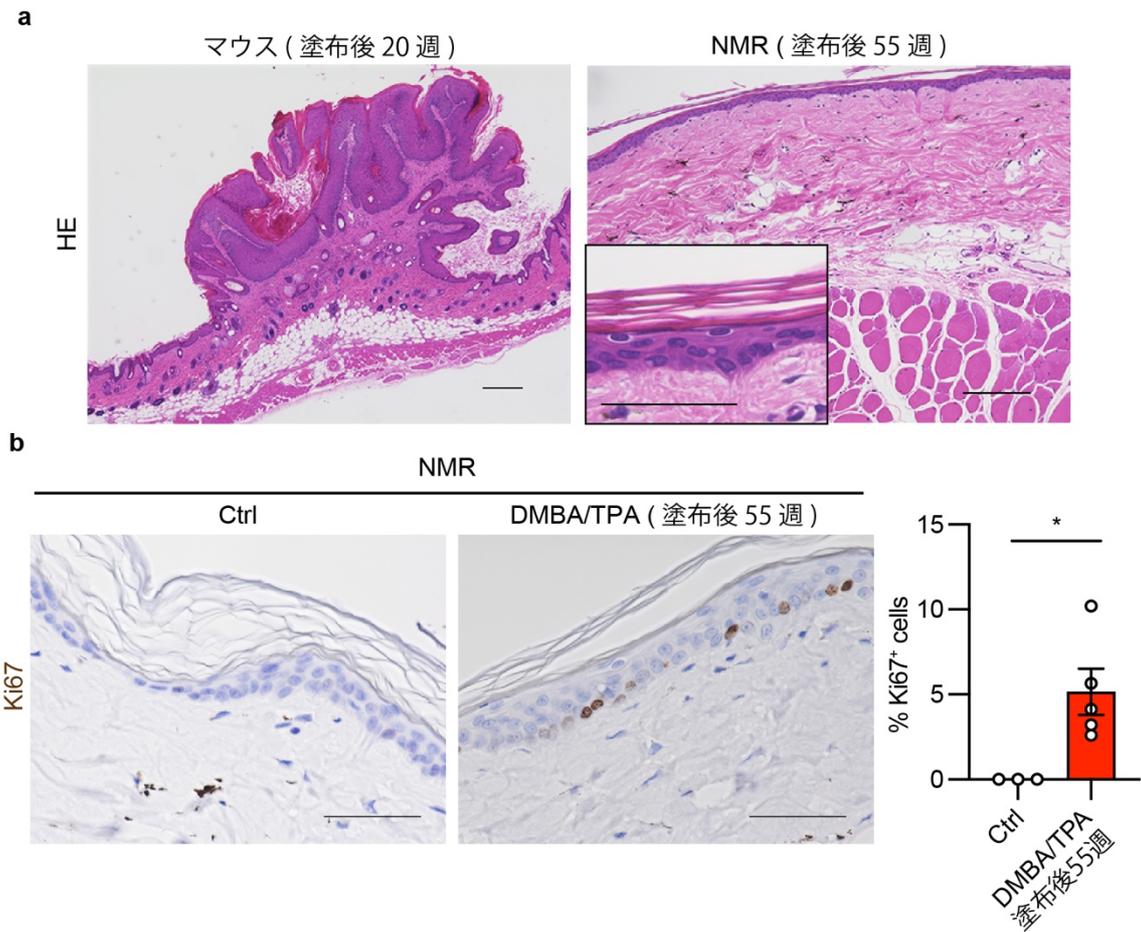


Fig.5 DMBA/TPA 塗布後の NMR で細胞増殖はみられるが腫瘍は形成されない
a、DMBA/TPA 塗布 20 週後のマウス腫瘍および 55 週後の NMR 皮膚の HE 染色像。Scale bar、50 μ m。各 $n = 3$ 。NMR の左下のパネルは、塗布部位の拡大像。
b、DMBA/TPA 塗布 114 週後の NMR 皮膚の Ki67 の免疫組織化学染色像および総細胞数あたりの陽性細胞数の定量結果。1 個体あたり 4 視野を解析。Scale bar、50 μ m。Ctrl; $n = 3$ 、DMBA/TPA; $n = 5$ 。エラーバーは平均 \pm 標準誤差を示す。
 *; $P < 0.05$ 。検定は、Ctrl に対して unpaired t -test で行った。

3-2 ハダカデバネズミでは、発がん促進的な炎症応答が減弱している

3-2-1 ハダカデバネズミは、3MC 短期間投与により DNA 損傷および細胞死は誘導されるが免疫細胞の浸潤が減弱している

ハダカデバネズミ (NMR) の化学発がんに対する耐性のメカニズムを明らかにするため、発がん物質に対する組織の応答を評価した。3MC を皮下注射し、7日後の組織学的評価を行った (Fig. 6a)。初めに DNA 損傷および細胞死の評価を行なった結果、phospho-Histone H2A.X (pH2AX) 陽性または 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 陽性の DNA 損傷細胞および TUNEL 陽性の死細胞は、NMR およびマウス皮膚の両方で有意に増加した (Fig. 6b、c)。これらのデータは、マウスに短期間 3MC を投与した既報と同じく (Zhang et al., 2013)、3MC が NMR 組織中で DNA/細胞の障害を引き起こしていることを示している。

次に、組織損傷後に引き起こされる炎症の指標の一つである、組織内の免疫細胞数の評価を行なった。これまでに NMR 免疫細胞の免疫組織染色に使用できる抗体は報告されていなかったため、NMR およびマウス脾臓を用いて NMR 標的タンパク質と反応する市販の抗体を探索した。結果、16 種類の抗体のうち 4 種類が陽性と判定され [CD45 (白血球)、IBA1 (マクロファージ)、Myeloperoxidase (MPO、骨髄系細胞; 好中球、マクロファージ)、CD3 (T 細胞)]、さらなる実験に使用することにした (Fig. 7)。免疫細胞の染色に際しては、DAB 染色陽性細胞と NMR 皮膚中に散在するメラニン色素を識別することが難しかったため、HistoGreen を使用して緑色に発色させた。

組織免疫化学染色の結果、マウスでは 3MC 短期投与後に、CD45 陽性、IBA1 陽性および CD3 陽性細胞が有意に増加した。この増加は、総細胞数あたりあるいは面積あたりの陽性細胞数のどちらで補正した場合でも同じ傾向であった。一方で、3MC 投与した NMR 皮膚における CD45、IBA1、MPO、CD3 陽性細胞は統計的に有意に増加していたものの、CD45、IBA1、CD3 陽性細胞に関して、増加した細胞の絶対数はマウスと比較して顕著に少なかった (Fig. 8a、b)。同様に、DMBA/TPA 処置した NMR の皮膚では、CD45 陽性の免疫細胞の有意な増加が見られたが、その絶対数はマウスの非がん部位と比べて少なかった (Fig. 9)。

これらの結果から、NMR 組織では発がん物質により組織の損傷が引き起こされるにも関わらず、炎症応答の指標の一つである免疫細胞の浸潤は非常に弱いことが明らかになった。これまでに、病原体などを認識する Toll 様受容体の

一つである *Toll-like receptor 4* のノックアウトマウスでは、TPA 塗布および UV 照射により動員される免疫細胞の浸潤が抑制され、がんの発症が遅延することが報告されている (Bald et al., 2014; Kumar et al., 2017; Mittal et al., 2010)。このことから、組織への発がん促進的に働く免疫細胞の浸潤が起きにくいことが NMR のがん耐性に寄与している可能性を考え、発がん促進的な刺激後の免疫細胞の浸潤に着目し、さらなる実験を行なうこととした。

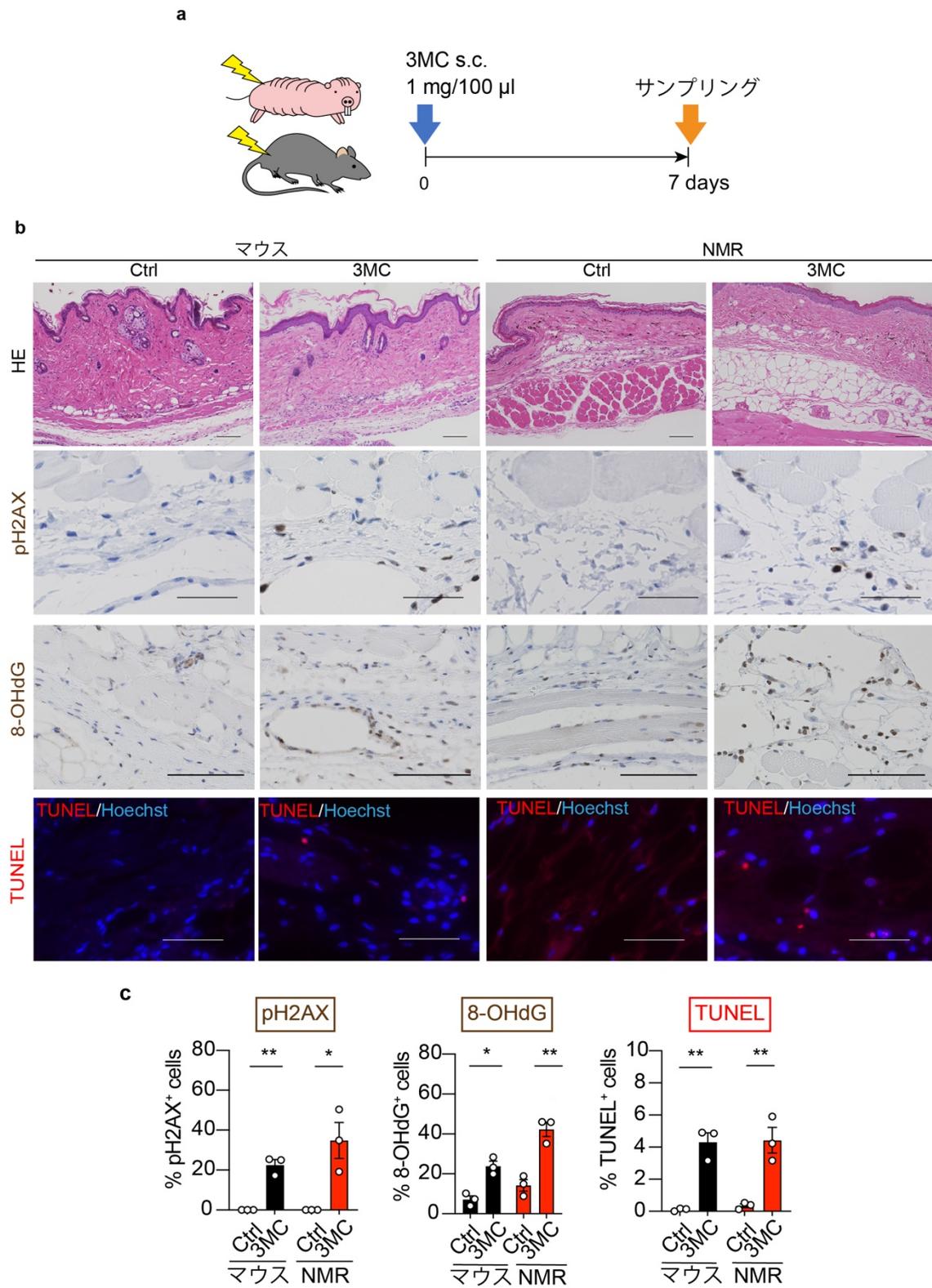


Fig. 6 3MC 投与 7 日後のマウスおよび NMR 皮膚で DNA 損傷および細胞死が増加する

a、3MC 皮下 (s.c.) 注射による短期曝露の実験模式図。**b**、3MC 投与 7 日後の皮膚の HE 染色像、pH2AX および 8-OHdG の免疫染色像。Scale Bar、HE 染色では 100 μm 、その他では 50 μm 。**c**、3MC 投与 7 日後の pH2AX 陽性細胞数、8-OHdG 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞の定量結果。総細胞数あたりの陽性細胞数を求めた。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n = 3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$ 。Ctrl に対して unpaired t -test を行った。

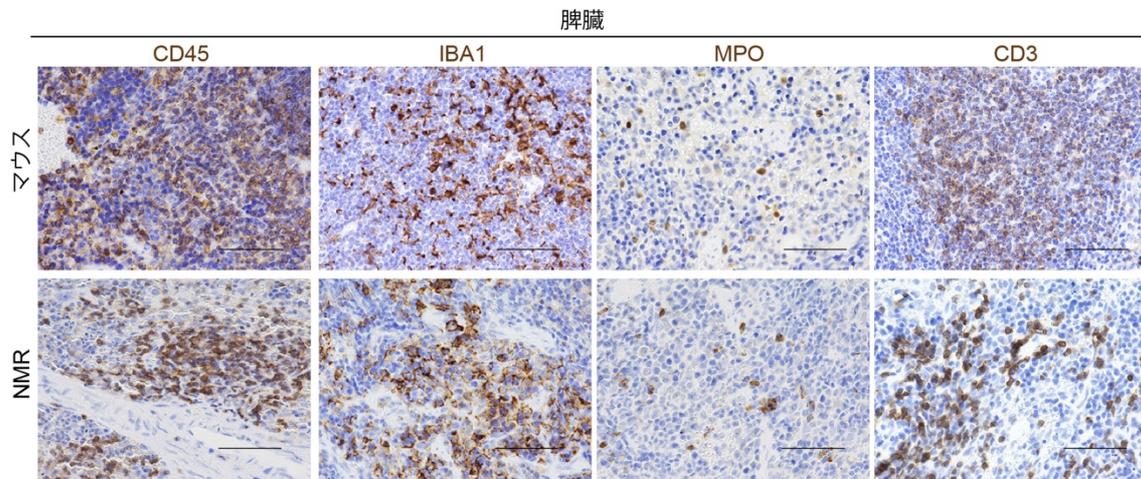


Fig. 7 マウスおよびNMR 脾臓における CD45、IBA1、MPO または CD3 の免疫組織化学染色像。Scale bar、50 μ m。

a

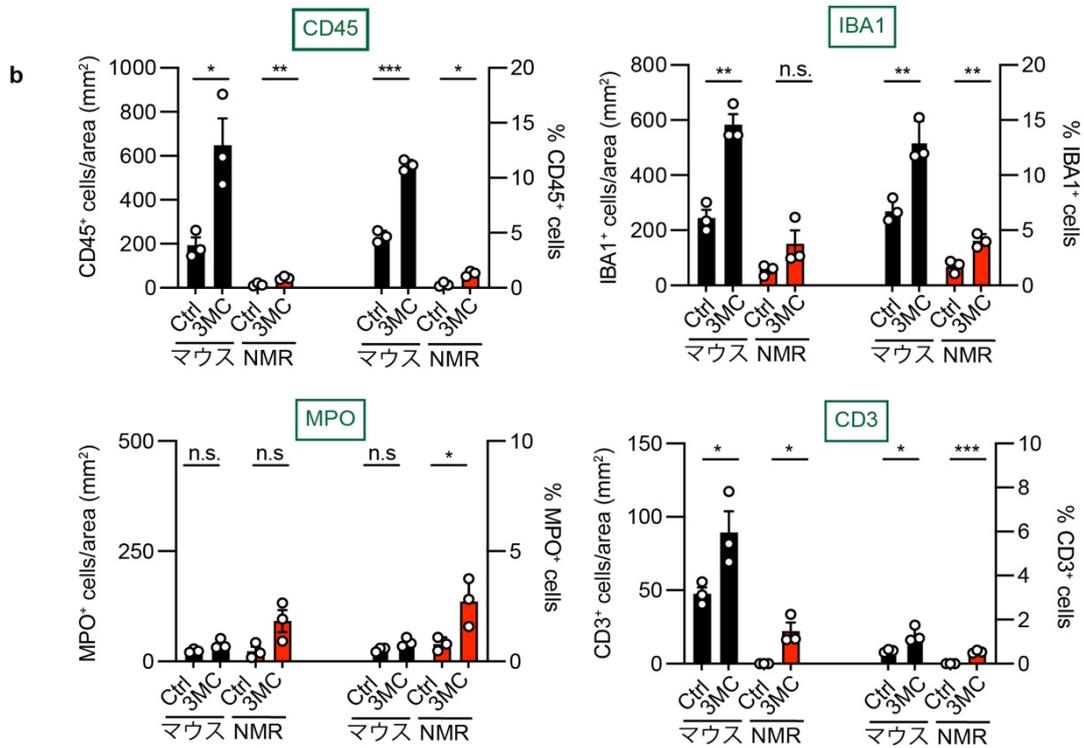
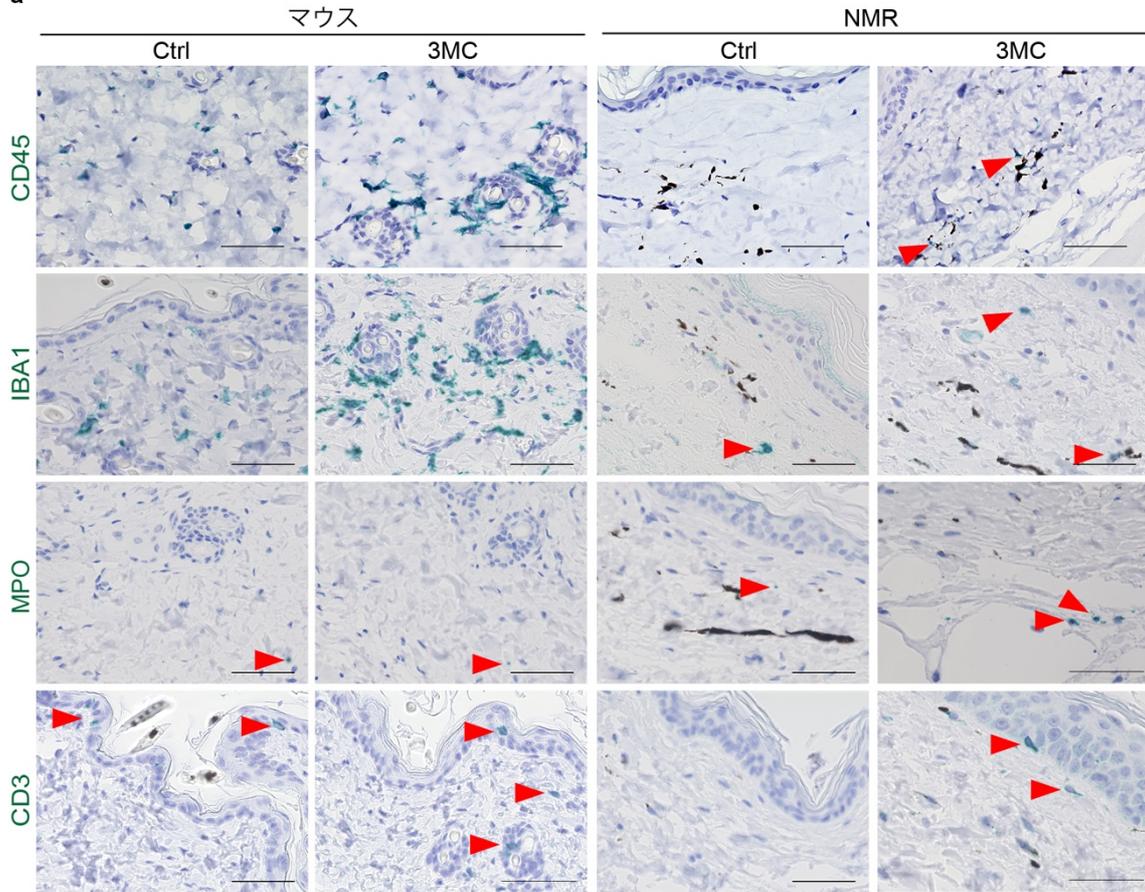


Fig. 8 3MC 投与 7 日後の NMR 皮膚は、
免疫細胞の浸潤がマウスに比べて少ない

a、3MC 投与 7 日後の皮膚における、CD45、IBA1、MPO または CD3 の免疫染色像。Scale bar、50 μm 。一部の陽性細胞には矢頭を付した。**b**、3MC 投与 7 日後の CD45、IBA1、MPO、CD3 陽性細胞の定量結果。面積あたりまたは総細胞あたりの陽性細胞数を求めた。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n = 3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$ 、***; $P < 0.001$ 、n.s.; 有意差なしを示す。Ctrl に対して unpaired t -test を行った。

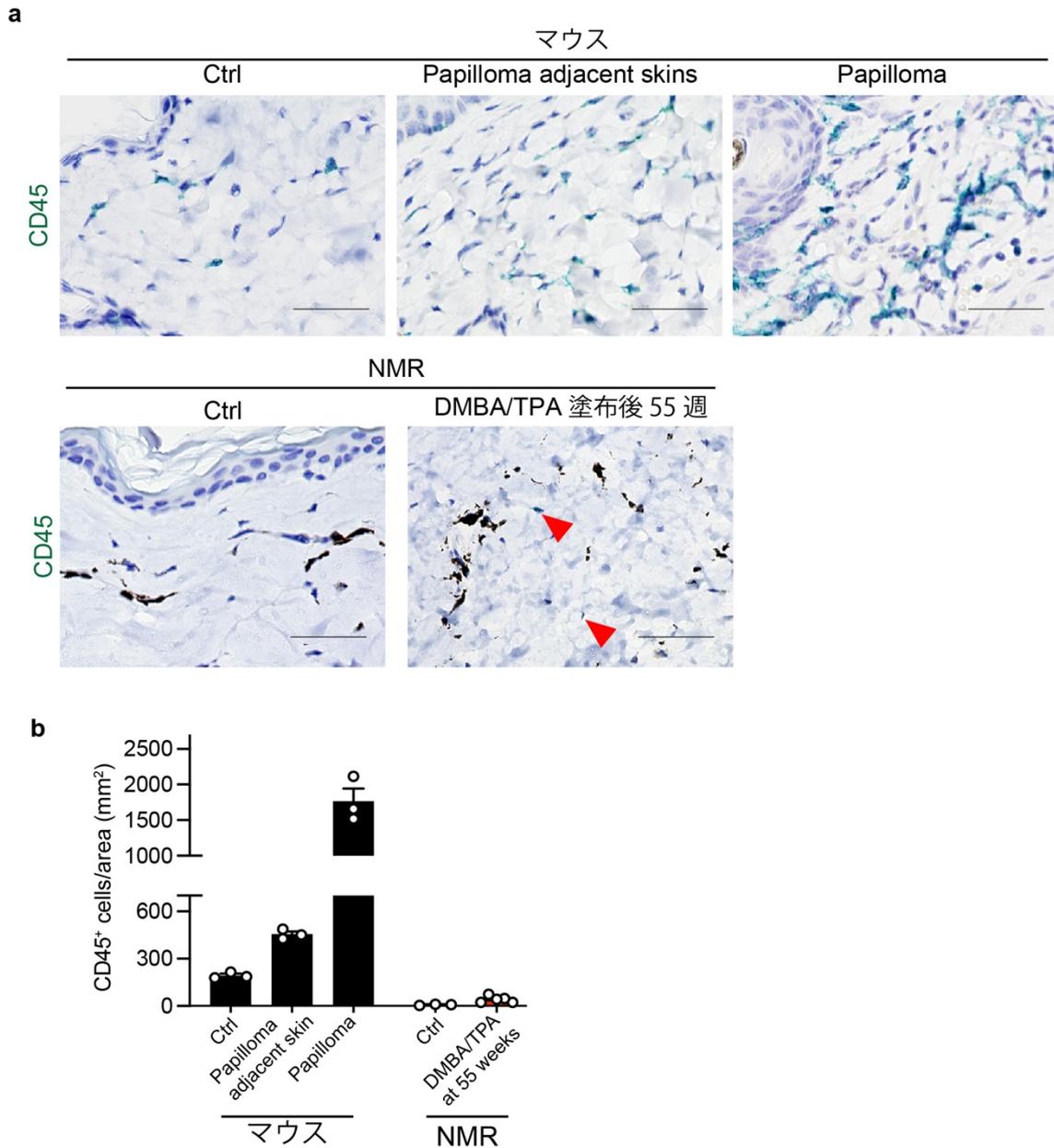


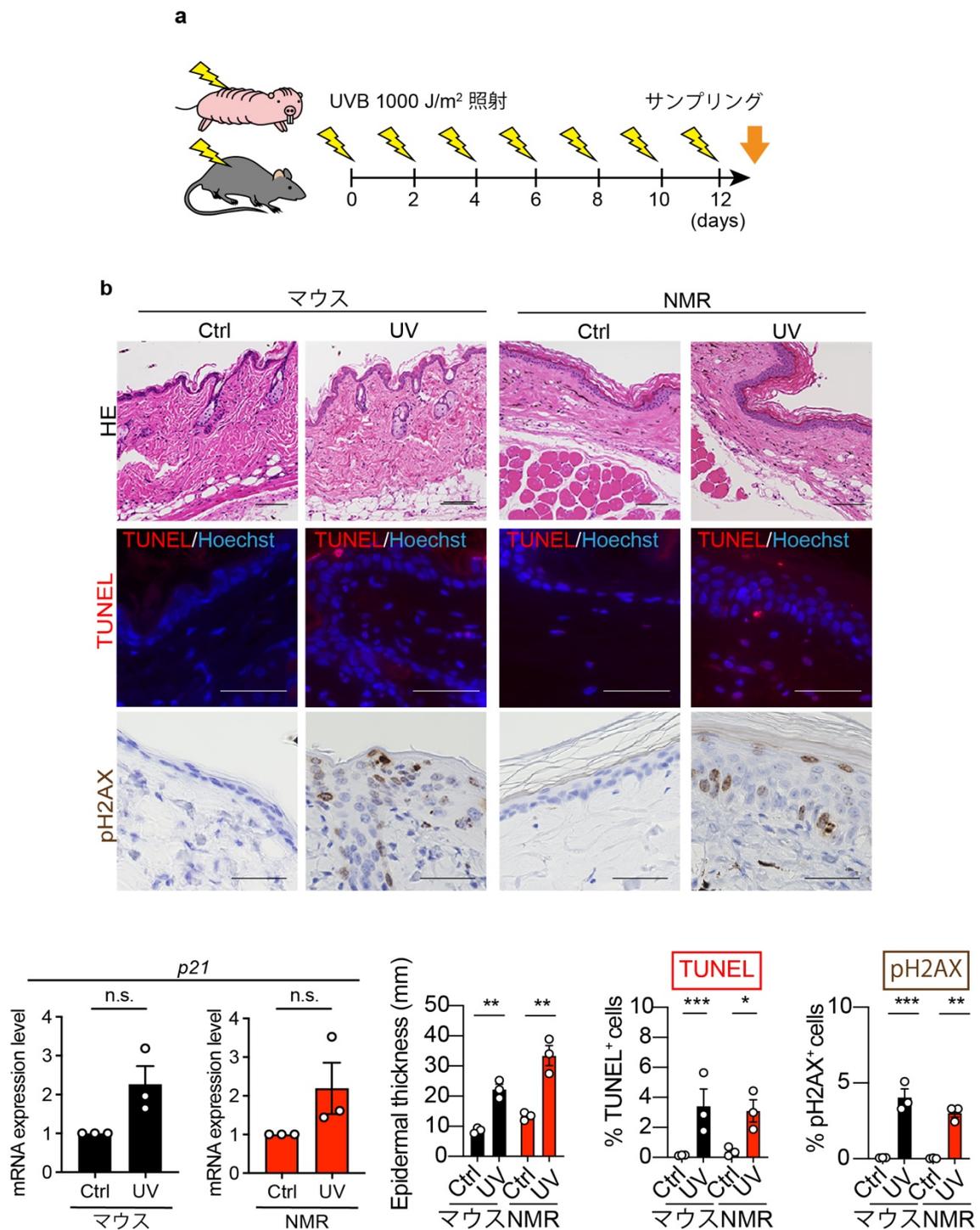
Fig. 9 DMBA/TPA 塗布後の NMR 皮膚は、
免疫細胞の浸潤がマウスに比べて少ない

a、DMBA/TPA 塗布後、エンドポイントに到達したマウスおよび 55 週後の NMR の皮膚の CD45 免疫染色像。Papilloma adjacent skins: 腫瘍の隣接部位。Scale bar、50 μ m。一部の陽性細胞には矢頭を付した。**b**、DMBA/TPA 塗布後の皮膚における面積あたりの CD45 陽性細胞の定量結果。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を

示す。マウス; $n = 3$ 、NMR Ctrl; $n = 3$ 、NMR DMBA/TPA; $n = 5$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。

3-2-2 ハダカデバネズミは、UV 照射後に DNA 損傷および細胞死が誘導されるが免疫細胞の浸潤が減弱している

化学発がん以外の発がん刺激に対しても、ハダカデバネズミ (NMR) において免疫細胞の浸潤の減弱が認められるかを解析するため、DNA 損傷と炎症を誘発することにより発がんを促進することが知られている UV 照射を行い、皮膚の組織反応を評価した (Fig. 10a) (Chung et al., 2015; Zhou et al., 2019)。UV 照射後、皮膚障害の指標である *p21* の発現誘導、皮膚の肥厚化、 γ H2AX 陽性の DNA 損傷細胞および TUNEL 陽性の死細胞の数は、マウスおよび NMR 皮膚の両方で増加した (Fig. 10b, c)。次に、免疫細胞数の変化を評価した。結果、マウスでは UV 照射により、CD45 陽性、MPO 陽性、IBA1 陽性細胞が有意に増加した。一方で、UV 照射した NMR 皮膚においては、CD45 陽性細胞の増加率は統計的に有意であったが、化学発がん刺激時と同様、増加後の陽性細胞の絶対数は少なかった。また、IBA1 陽性細胞の有意な増加は観察されなかった (Fig. 11a, b)。これらの結果は、上述の発がん剤で観察された傾向と一致しており、NMR は種々の発がん促進的な刺激後に、炎症の指標の一つである免疫細胞の浸潤が生じにくいことが示唆された。



a、UV 照射の実験模式図。 **b**、UV 照射後の皮膚の HE 染色像、TUNEL 染色像、pH2AX の免疫染色像。Scale bar、HE 染色では 100 μm、その他では 50 μm。 **c**、

UV 照射後の皮膚における *p21* 遺伝子発現 (インターナルコントロールには *ACTB* を用いた)、皮膚の肥厚化、TUNEL 陽性細胞、 γ H2AX 陽性細胞の定量結果。総細胞あたりの陽性細胞数を求めた。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n = 3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$ 、***; $P < 0.001$ 、n.s.; 有意差なしを示す。Ctrl に対して unpaired *t*-test を行った。

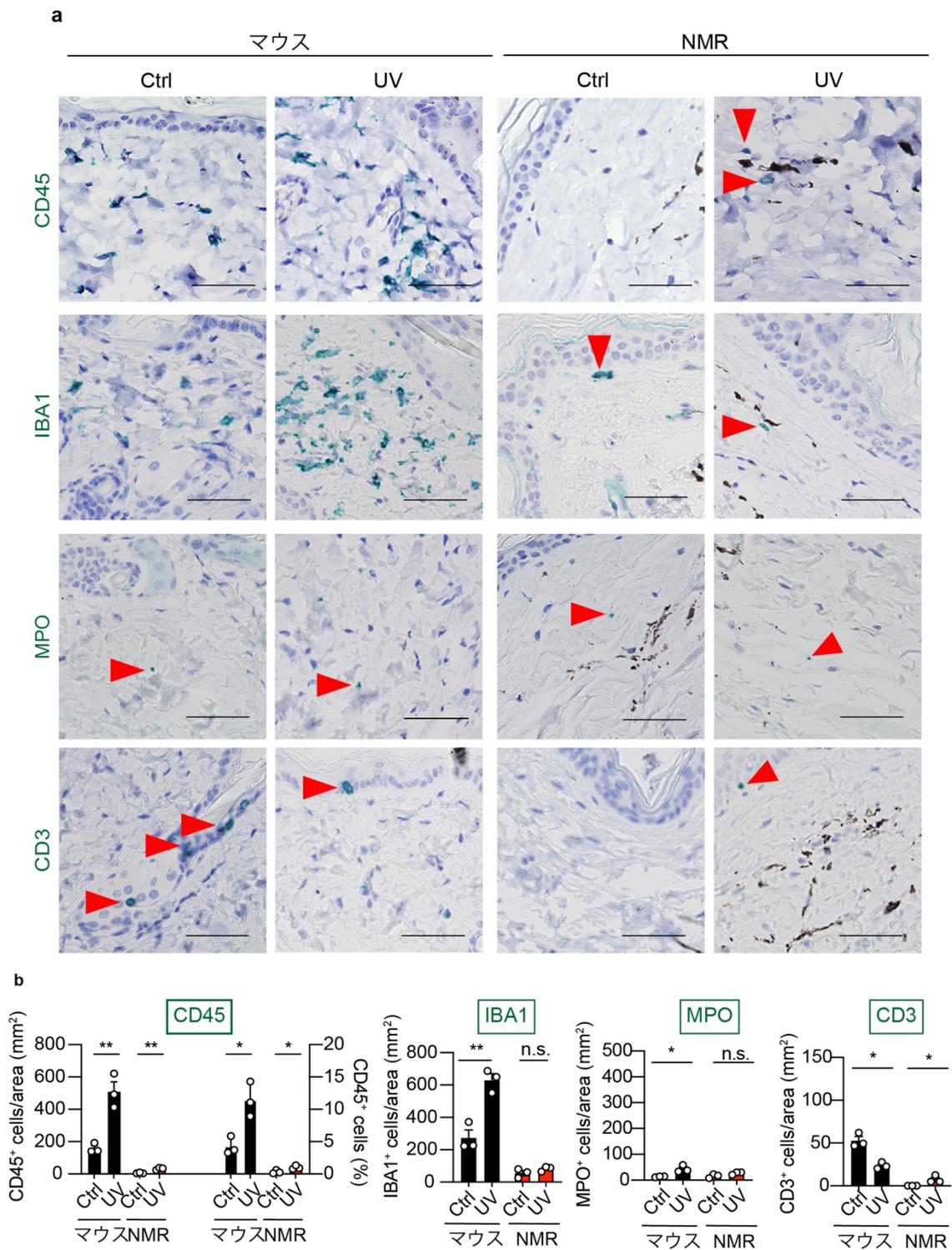


Fig. 11 UV 照射後の NMR 皮膚への免疫細胞の浸潤はマウスと比べて少ない
a、UV 照射後の皮膚の CD45、IBA1、MPO、CD3 の免疫染色像。Scale bar、50 μ m。
 一部の陽性細胞には矢頭を付した。**b**、UV 照射後の皮膚の CD45、IBA1、MPO、

CD3 陽性細胞の定量結果。面積あたりあるいは総細胞あたりの陽性細胞数を求めた。エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。各 $n = 3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$ 、n.s.; 有意差なしを示す。Ctrl に対して unpaired t -test を行った。

3-2-3 ハダカデバネズミは、外来性異物である LPS に応答し、マウスと同様に組織で免疫細胞の浸潤を引き起こす

これまでの結果から、ハダカデバネズミ (NMR) 組織では、発がん刺激に対して免疫細胞の浸潤が起きにくいことが明らかとなった。次に、NMR の組織において、発がん刺激以外に対しても一律に免疫細胞の浸潤が抑制されるのかを調べるため、以前に NMR の免疫細胞を活性化することが報告されている (Cheng et al., 2017) 細菌性リポ多糖 (Lipopolysaccharide、LPS) を皮下注射した (Fig. 12a)。LPS 注射により、マウスおよび NMR 共に、インターロイキン 6 (*Interleukin-6*、*IL6*) の遺伝子発現が有意に上昇し、TUNEL 陽性の死細胞も有意に増加した (Fig. 12b、c)。さらに、発がん剤や UV 照射への応答とは異なり、LPS 投与後の NMR の皮膚では CD45 陽性細胞、MPO 陽性細胞および CD3 陽性細胞がマウスと同等程度の数まで大幅に増加した (Fig. 13a、b)。一方で、LPS の皮下投与では、マウス、NMR ともに IBA1 陽性細胞の有意な増加はみられなかった。発がん刺激、LPS 投与どちらによっても NMR 皮膚への IBA1 陽性細胞の浸潤が見られなかったため、NMR の IBA1 陽性細胞が特殊化し、組織で一律に炎症応答しない可能性が考えられた。しかしながら、LPS を腹腔内投与した場合には NMR 肝臓の IBA1 陽性細胞は有意に増加し、NMR 組織において IBA1 陽性細胞が炎症応答することがわかった (Fig. 14)。以上の結果から、NMR の免疫細胞は一律に組織への浸潤能を失っているのではなく、外来性の LPS には応答して組織で炎症を引き起こすことが明らかになった。

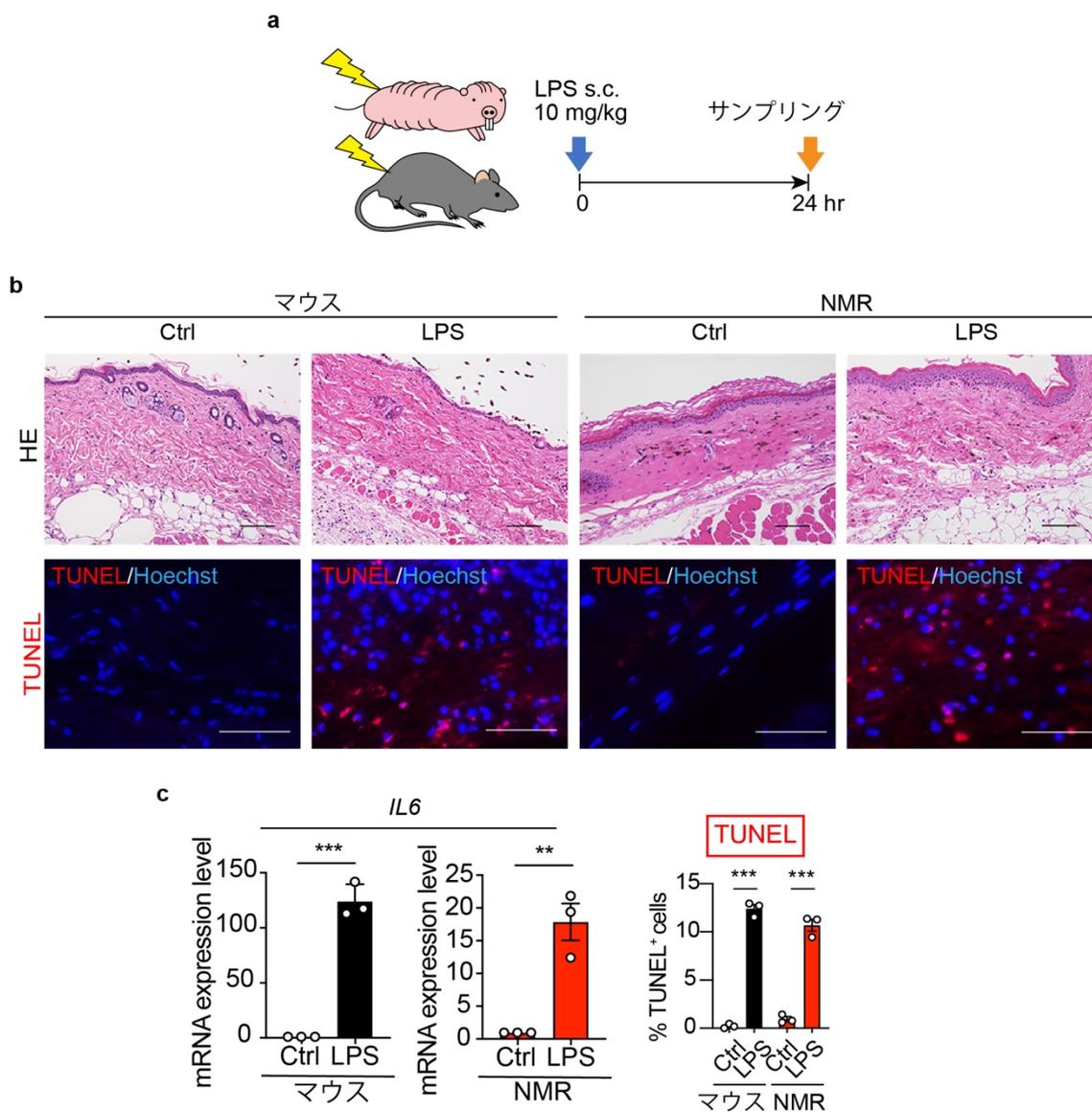


Fig. 12 LPS 皮下投与後、マウスおよびNMRの皮膚でLPSへの応答が生じる
a、LPS投与 (s.c.) 実験の模式図。**b**、LPS投与24時間後の皮膚のHE染色像およびTUNEL染色像 **c**、LPS投与後の皮膚における*IL6*の遺伝子発現 (インターナルコントロールには*ACTB*を用いた)および総細胞あたりのTUNEL陽性細胞の定量結果。エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。各 $n = 3$ 。1個体あたり4視野を解析。**, $P < 0.01$ 、***, $P < 0.001$ 。Ctrlに対してunpaired *t*-testを行った。

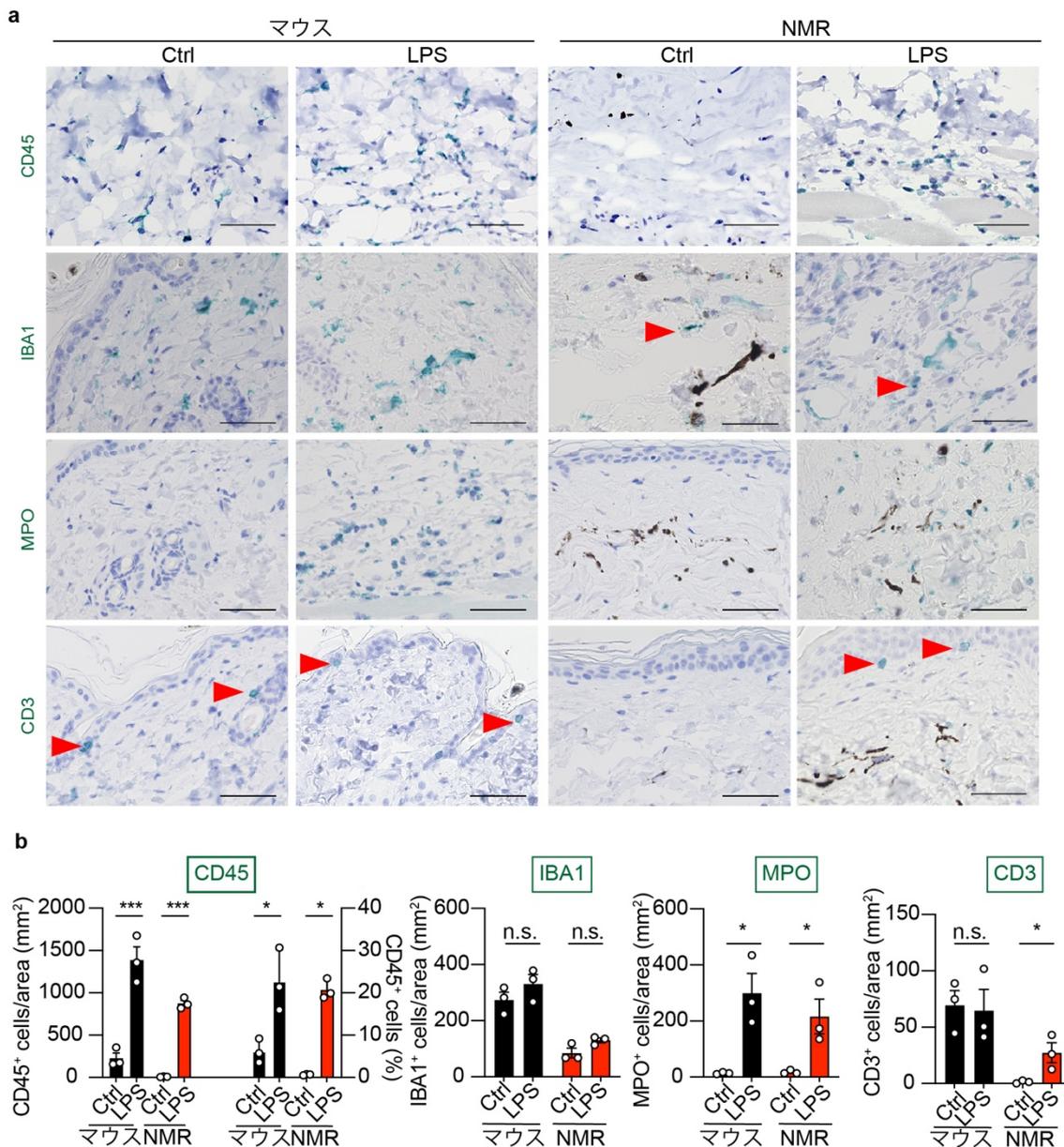


Fig. 13 LPS 皮下投与後マウスおよび NMR の皮膚で免疫細胞の浸潤が起きる
a、LPS 投与 24 時間後の皮膚の CD45、IBA1、MPO、CD3 の免疫染色像。Scale bar、50 μ m。一部の陽性細胞には矢頭を付した。**b**、LPS 投与後の皮膚における CD45、IBA1、MPO、CD3 陽性細胞の定量結果。面積あたりあるいは総細胞あたりの陽性細胞数を求めた。エラーバーは平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n=3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$ 、***; $P < 0.001$ 、n.s.; 有意差なしを示す。Ctrl に対して unpaired t -test を行った。

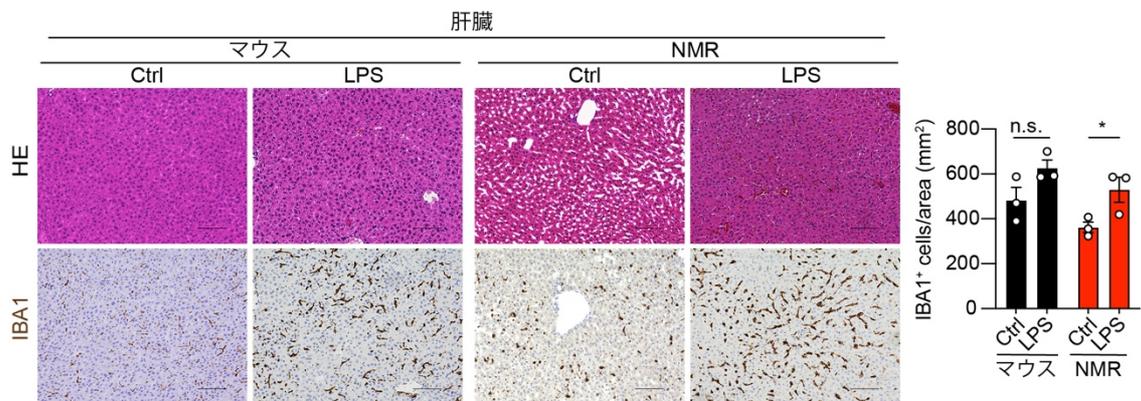


Fig. 14 LPS 腹腔内投与後、マウスおよび NMR の肝臓で

IBA 陽性免疫細胞の浸潤が起きる

左、LPS 腹腔内投与後の肝臓の HE 染色および IBA 免疫染色像。Scale bar, 50 μ m。

右、LPS 投与後の肝臓の面積あたりの IBA1 陽性細胞の定量結果。エラーバーは平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n = 3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$ 、n.s.; 有意差なしを示す。Ctrl に対して unpaired t -test を行った。

3-2-4 ハダカデバネズミのマクロファージは、死細胞貪食能を有する

発がん刺激後にハダカデバネズミ (NMR) 組織中で免疫細胞の浸潤が低減している原因として、NMR 免疫細胞が内因性の損傷を受けた細胞への応答性を失っている可能性を考えた。これまでに、本研究および別の研究グループは、NMR マクロファージがマウスマクロファージと同様に大腸菌ビーズを貪食する能力を持つことを報告している (Cheng et al., 2017; Wada et al., 2019)。損傷を受けた細胞への応答性を評価するため、NMR マクロファージによる死細胞の貪食能の評価を行うこととした。UV 照射により細胞死を誘導した NMR 線維芽細胞を pHrodo により標識し、骨髄由来マクロファージと共培養したところ、NMR マクロファージはマウスマクロファージと同様に死細胞を貪食した (Fig. 15)。このことから、NMR マクロファージは死細胞に応答する能力はあるにもかかわらず、炎症刺激後の組織に浸潤していないことが明らかになった。

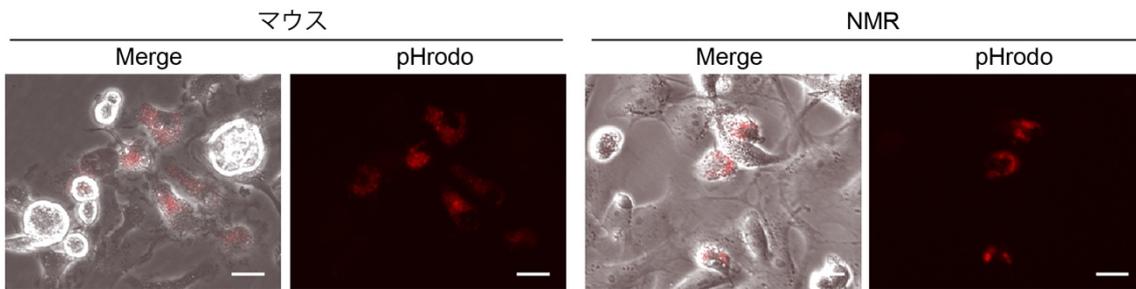
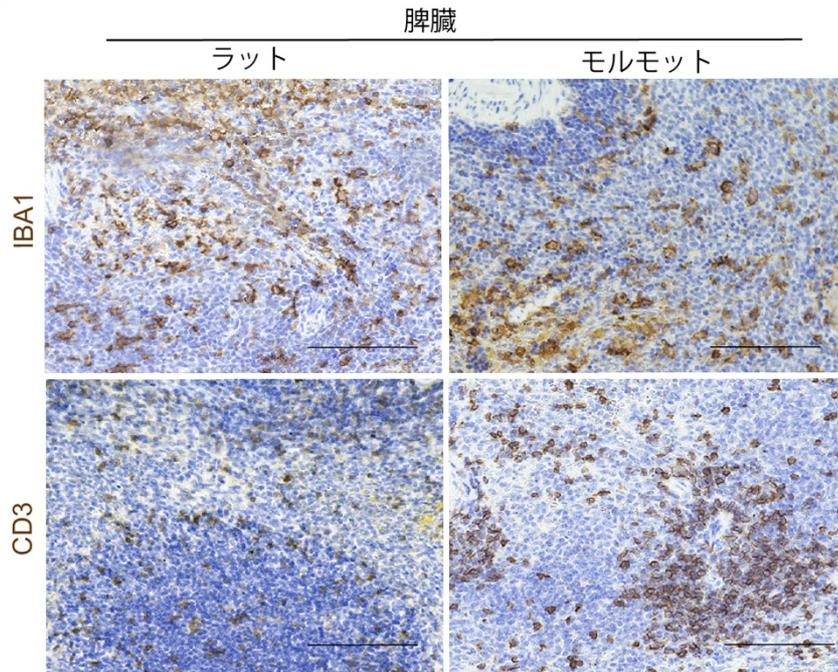


Fig. 15 NMR のマクロファージは、死細胞貪食能を有する
 UV 照射により細胞死を誘導し、pHrodo で染色を行なった線維芽細胞を骨髓由来マクロファージと共培養した。貪食された標識細胞のみ蛍光を発する。Scale bar、20 μm 。

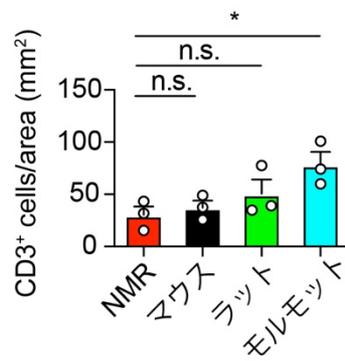
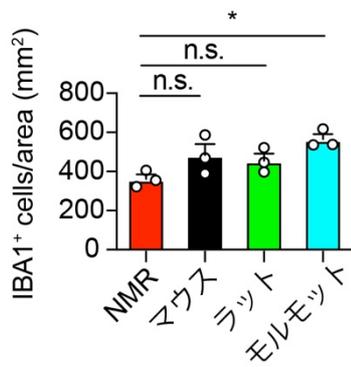
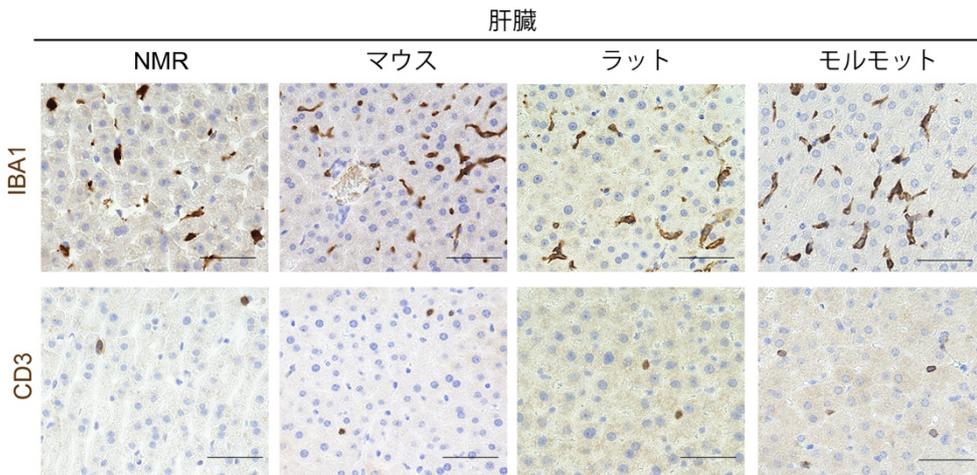
3-2-5 ハダカデバネズミの組織常在性の免疫細胞数は、他齧歯類と比較して少ない

これまでの解析から、健常なハダカデバネズミ (NMR) 皮膚中の免疫細胞数がマウスの皮膚よりも少ないことを見いだした。組織常在性の免疫細胞が NMR 種特異的に減少しているのかを明らかにするため、マウス、ラット、モルモット、NMR の複数の組織で、常在する IBA1 陽性および CD3 陽性免疫細胞の数を比較した。その結果、NMR の組織では、IBA1 陽性あるいは CD3 陽性の常在性免疫細胞の数が他種に比べて少ない傾向が見られた。興味深いことに、ヒトとマウスにおける組織常在性の免疫細胞は、免疫恒常性の維持に働き、発がんや感染症への生体防御に寄与することが報告されている (Rosshart et al., 2017) が、これまでの知見とは異なり、発がん耐性齧歯類である NMR は独自の組織免疫恒常性を維持していることが示唆された (Fig. 16)。

a

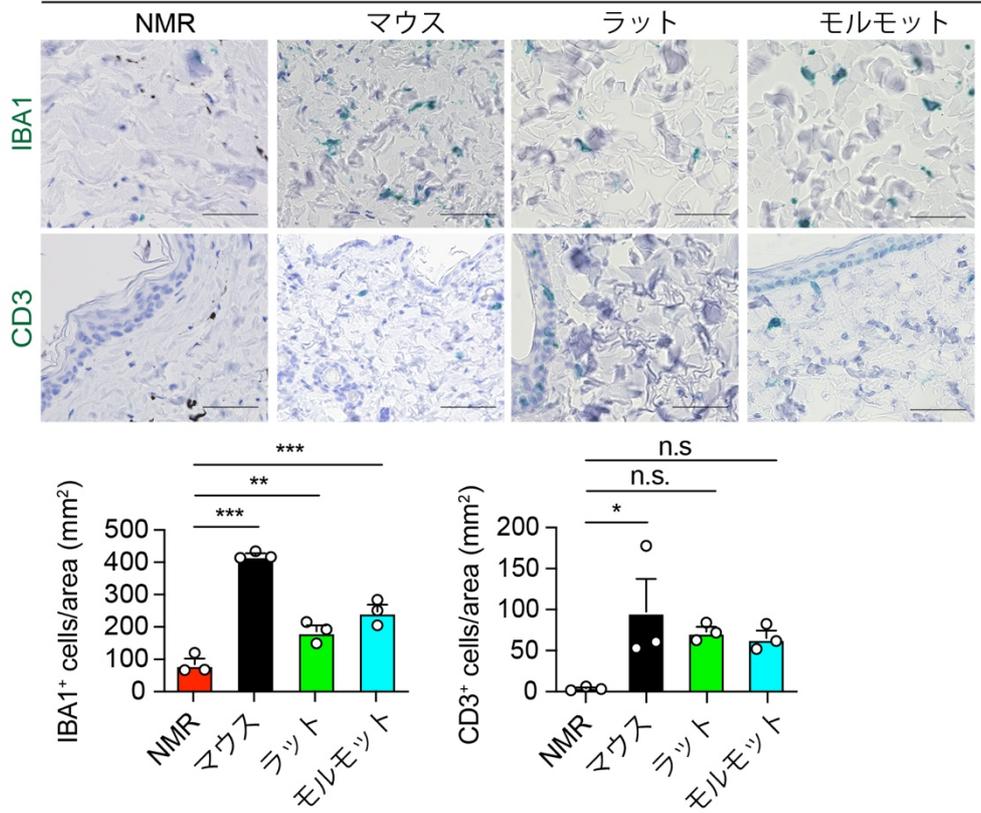


b



c

皮膚



d

小腸

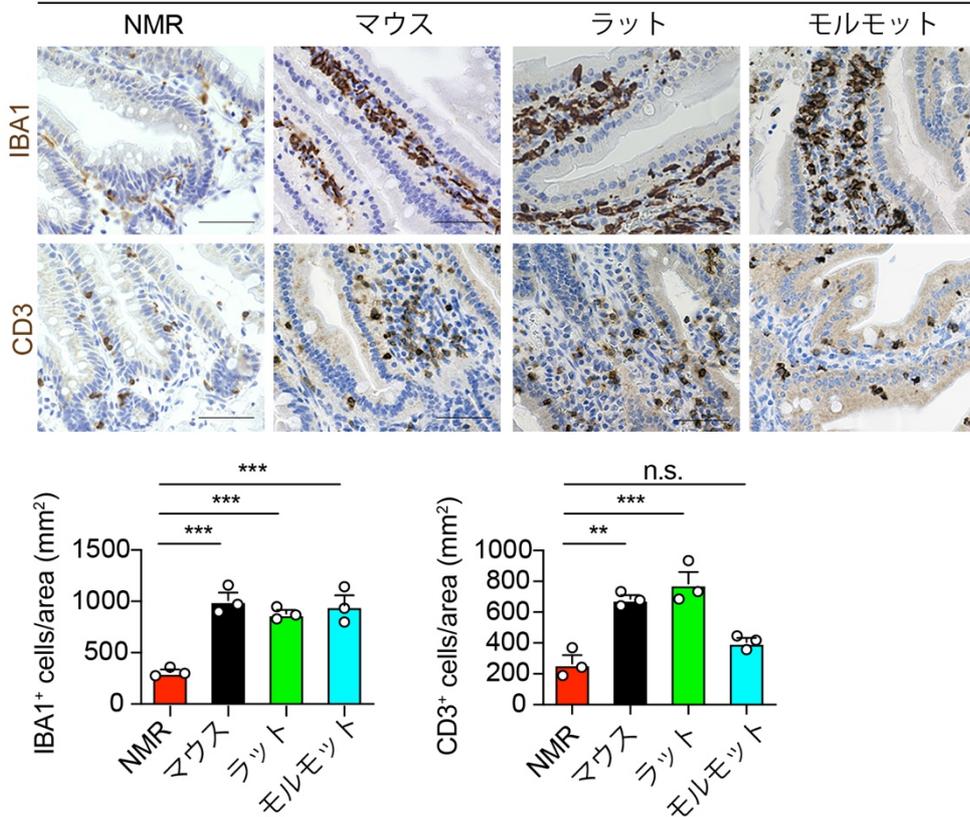


Fig. 16 NMR では、組織常在性の免疫細胞が、他の齧歯類に比べて少ない
a、ラットおよびモルモット脾臓の IBA1 および CD3 の免疫組織染色像。Scale bar、
50 μm 。 **b-d**、NMR、マウス、ラット、モルモットの肝臓 (**b**)、皮膚 (**c**)、または
小腸 (**d**) の IBA1 および CD3 の免疫組織像および陽性細胞の定量結果。面積あ
たりの陽性細胞数を求めた。Scale bar、50 μm 。エラーバーは平均 \pm 標準誤差を
示す。各 $n = 3$ 。1 個体あたり 4 視野を解析。*; $P < 0.05$; **; $P < 0.01$; ***; $P < 0.001$ 、
n.s.; 有意差なしを示す。one-way ANOVA を行った後、NMR に対して Dunnett
検定を行なった。

3-2-6 ハダカデバネズミでは、発がん促進的な刺激に対する炎症応答が、 遺伝子発現レベルで減弱している

これまでの組織学的解析から、各種炎症刺激に対するハダカデバネズミ (NMR) 特異的な免疫応答が見出された。炎症刺激後の皮膚における組織応答に関して更なる知見を得るために、RNA-sequencing (RNA-seq) による網羅的な遺伝子発現解析を行った。LPS、3MC 投与もしくは UV 照射による炎症刺激群と未処置群の遺伝子発現をそれぞれ比較した結果、全遺伝子で比較した場合と、臓器間コミュニケーションに関わるケモカインやサイトカインを含むリガンド遺伝子群 (Ramilowski et al., 2015) で比較した場合の両方において、特に 3MC および UV 処置群で、マウス皮膚における発現変化の方が NMR 皮膚における発現変化に比べて大きい傾向が認められた (Fig. 17a,b)。

次に、細胞集団毎の遺伝子発現に基づいた細胞型エンリッチメント解析を xCell により行なった。上述の皮膚の組織学的解析から得られていた知見と一致し、マウスの皮膚では LPS、3MC および UV 処置のすべての炎症刺激群で免疫細胞エンリッチメントスコアが大幅に増加していた (Fig. 17c)。一方、NMR の皮膚では、LPS 処置は免疫細胞エンリッチメントスコアを有意に増加させたが、3MC または UV 処置後の皮膚では免疫細胞エンリッチメントスコアの有意な上昇は見られなかった (Fig. 17c)。以上の組織学的解析、遺伝子発現解析の結果は、NMR において発がん促進的な刺激後に炎症反応が減弱していることを強く示唆している。

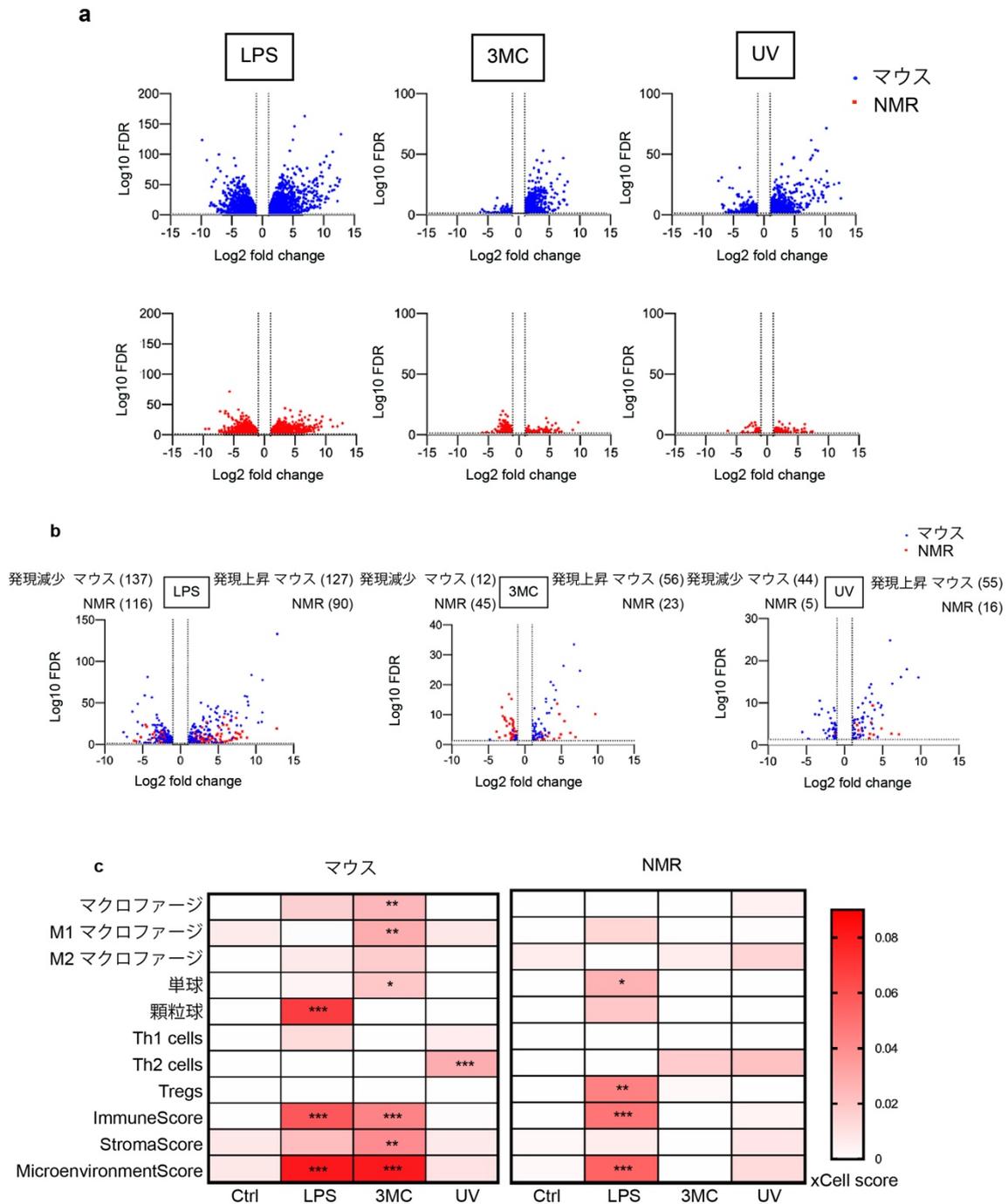


Fig. 17 網羅的遺伝子発現解析による、皮膚の炎症応答の比較。

a、b、LPS、3MC、またはUV処置後のマウス皮膚(青)とNMR皮膚(赤)におけるすべての遺伝子(**a**)および467個のリガンド遺伝子(**b**)の発現変化のボルケーノプロット。FDR < 0.05かつ $|\log_2 \text{Fold change}| > 1$ の遺伝子のみプロットし、(**b**)では遺伝子数を付記した。点線は、 $\log_{10} \text{FDR} = 1.3$ および $|\log_2 \text{Fold change}| = 1$ を示す。各 $n = 3$ 。**c**、xCellを用いた細胞型エンリッチメント解析の平均エンリッチメントスコアのヒートマップ。図中には代表的な免疫細胞群を

選択し示した。*; $P < 0.05$ 、**; $P < 0.01$ 、***; $P < 0.001$ 、を示す。検定は、one-way ANOVA を行い、未処置群 (Ctrl) に対して Dunnett 検定を行なった。

3-3 ハダカデバネズミでは、発がん促進的炎症応答と関連する Necroptosis 経路に必須な制御遺伝子 *RIPK3* および *MLKL* が機能喪失している

3-3-1 ハダカデバネズミでは、発がん促進的な刺激後に *RIPK3* と *MLKL* の発現上昇がみられず、それぞれ種特有のフレームシフト変異を持つ

ハダカデバネズミ (NMR) が発がん促進的な刺激に対して炎症応答を起こしにくい機構を明らかにするために、まず初めに NMR 皮膚において、LPS 処置では変動せず 3MC および UV 処置に共通して発現変動する遺伝子

(Differential expression genes; DEG) に着目した。Metascape を用いて 3MC、UV 処置に共通して発現低下あるいは発現上昇する遺伝子を抽出し、遺伝子パスウェイのエンリッチメント解析を行った結果、免疫応答の抑制に参与する可能性のある経路は抽出されなかった (Fig. 18、茶塗りの領域)。

そこで、LPS 処置に対しては両種とも免疫応答を活性化したのに対し、発がん促進的な刺激には種間で異なる応答を示したことに着想し、発がん促進的な刺激時に種特異的に変動する遺伝子群に着目することにした。LPS 処置後にマウスおよび NMR 皮膚で共通して2倍以上発現上昇する DEG (= 種間で共通して炎症応答に参与する遺伝子群) と、3MC および UV 処置後に共通してマウス・NMR それぞれで2倍以上発現上昇する DEG (= 発がん促進的な刺激に共通してそれぞれの種で応答する遺伝子群) との比較から、マウスあるいは NMR 特異的に発がん促進刺激時にのみ発現増加する遺伝子群を抽出した (Fig. 19、NMR のみで発現増加; 3MC-UV NMR-DEG; 20 遺伝子、紫塗りの領域、マウスのみで発現増加; 3MC-UV マウス-DEG; 192 遺伝子、青塗りの領域)。3MC-UV NMR-DEG のエンリッチメント解析では、KEGG パスウェイ “p53 signaling pathway” が濃縮され、発がん促進刺激後の NMR 皮膚で p53 経路の活性化が生じることが示唆された (Fig. 19a)。一方、3MC-UV マウス-DEG のエンリッチメント解析では、KEGG パスウェイ “Cytokine-cytokine receptor interaction” および GO term “Leukocyte migration” が濃縮され、これまでの解析と同様、発がん促進刺激後のマウス皮膚における炎症反応の活性化が示唆された (Fig 19b)。

興味深いことに、3MC-UV マウス-DEG には KEGG パスウェイ “RIPK1-mediated regulated necrosis (Necroptosis)” および “Regulation of cell killing” に関連する遺伝子がエンリッチされ、発がん促進刺激後にマウスのみ Necroptosis 経路が活性化することが示唆された (Fig. 19b)。Necroptosis は、receptor-interacting kinase 1 (RIPK1) および RIPK3 からなる複合体が Mixed

lineage kinase domain-like (MLKL) をリン酸化し、重合化した MLKL による細胞膜破壊に伴って引き起こされる細胞壊死である (Liu et al., 2017)。Necroptosis はプログラムされた細胞壊死の 1 種であり、細胞溶解によって大量の細胞成分を放出し炎症を惹起する。大腸がんと膵臓がんにおいて、Necroptosis 経路の活性化は、発がん促進に寄与することが報告されている (Jayakumar and Bothwell, 2019; Lee et al., 2019; Seifert et al., 2016)。実際に、3MC、UV 処置後のマウス皮膚では、Necroptosis 経路の活性化の指標である MLKL のリン酸化が、未処置あるいは LPS を投与した皮膚に比べて増加していた (Fig. 20a)。一方で、NMR 皮膚ではどの炎症刺激によっても、*RIPK3* と *MLKL* の発現が上昇していなかった (Fig. 21 b,e)。そこで NMR の *RIPK3* および *MLKL* の塩基配列を他の動物種と比較した結果、Necroptosis の誘導に不可欠である *RIPK3* の RHIM ドメインまたは *MLKL* の Pseudokinase ドメインより上流にフレームシフト変異が存在し、早期終止コドンが導入されていることが明らかになった (Fig. 20b, c)。NMR の *RIPK3* および *MLKL* の早期終止コドンは、最終エクソンより前のエクソン内かつスプライスジャンクションの 50–55 bp 以上上流にあるため、これら 2 つの遺伝子からの転写産物はナンセンス変異依存性 mRNA 分解 (non-sense mediated decay、NMD) (Lejeune and Maquat, 2005) を起こしている可能性が高いと考えられた。そこで初めに、RNA-seq データの解析から *RIPK3* および *MLKL* の mRNA の皮膚における発現を評価した。その結果、*RIPK3* は NMR の皮膚で発現していることが分かったため (Fig. 21a, b)、*RIPK3* が NMD による分解を受けるかを調べた。NMR 皮膚由来線維芽細胞を Actinomycin D (ActD、転写阻害剤) および Cycloheximide (CHX、翻訳阻害剤、NMD を阻害する) で処置し、*RIPK3* の発現変動を評価した (Lejeune and Maquat, 2005)。qRT-PCR により遺伝子発現を定量した結果、*RIPK3* は ActD により発現が減少したのに対し、CHX により発現量が増加した (Fig. 21c)。これは NMD 阻害により *RIPK3* の分解が阻害された結果と考えられ、NMR の *RIPK3* は NMD の標的として分解されていることが推測された。また、*MLKL* に関しては、皮膚で mRNA の発現を検出することができなかった (Fig. 22d–f)。したがって、NMR の *RIPK3*、*MLKL* は NMD による分解あるいは非発現により、機能喪失していると考えられた。前述のように、Necroptosis には炎症およびがん促進的な働きがある。そのため、がん促進的な刺激により Necroptosis 経路が活性化し炎症が惹起されることが発がんにとって重要であり、NMR における

Necroptosis 経路遺伝子の機能喪失は、炎症反応を弱めることでがん耐性に寄与する候補メカニズムであると予想した。

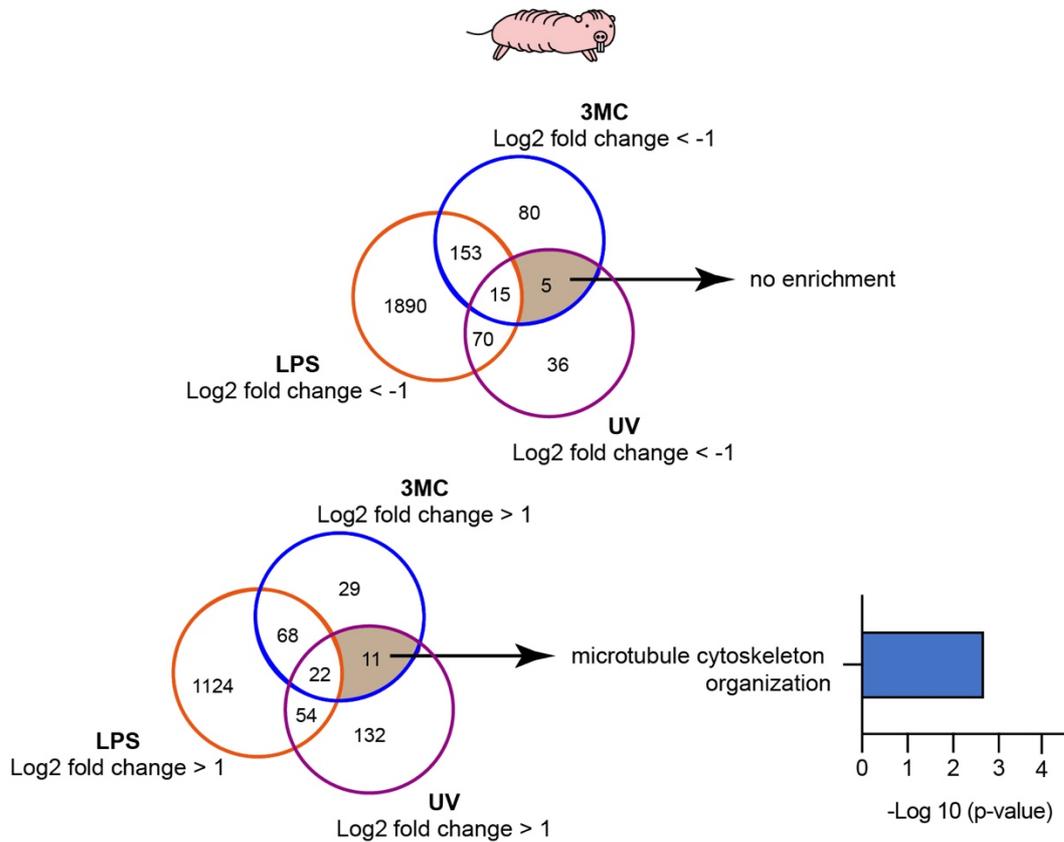


Fig. 18 網羅的遺伝子発現解析による、

炎症刺激後の NMR-DEG のエンリッチメント解析

左、LPS (オレンジ色の円)、3MC (青色の円)、UV (紫色の円) 処置時の NMR 皮膚における 2 倍以上の発現減少 (a) または発現上昇 (b) した遺伝子数を示すベン図。右、NMR 皮膚で 3MC および UV 処置で共通して変動する DEG (茶色塗りの領域) の Metascape によるエンリッチメント解析結果。

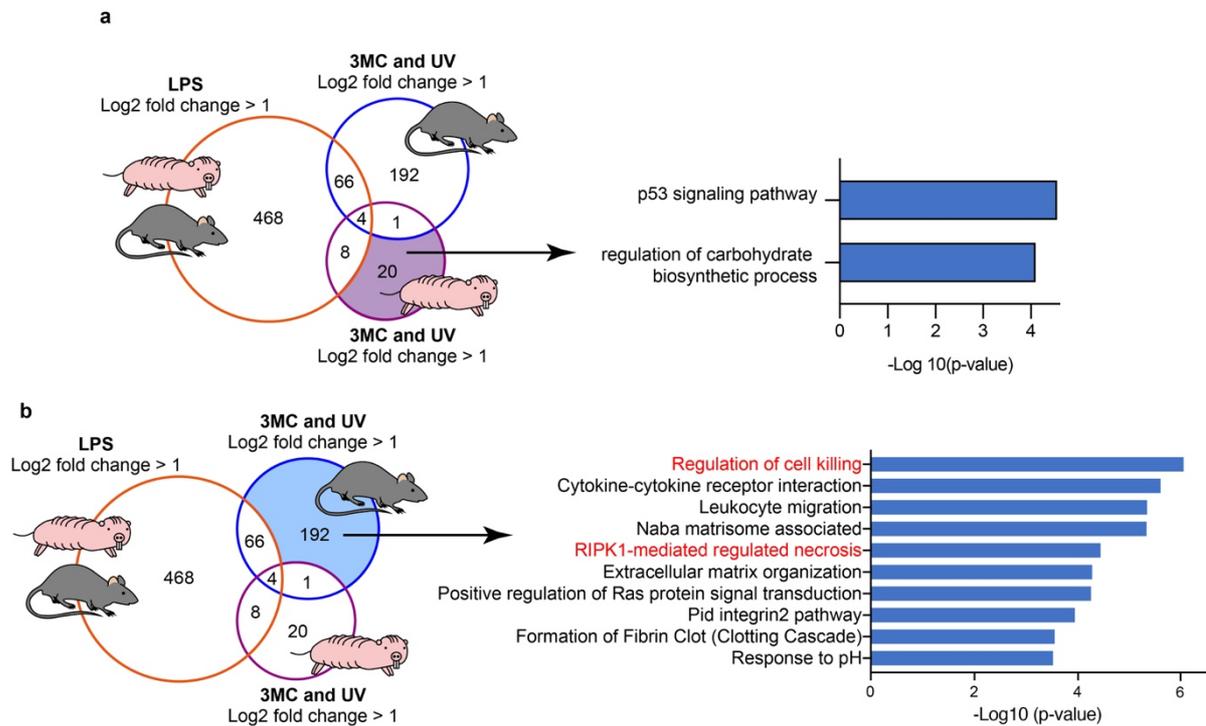


Fig. 19 網羅的遺伝子発現解析による、種特異的かつ発がん刺激特異的な DEG のエンリッチメント解析

a、b、左、LPS 処置時にマウスおよびNMR 皮膚で共通して発現上昇した遺伝子 (オレンジ色の円)、3MC、UV 処置に共通して NMR (紫色の円) またはマウス (青色の円) で発現上昇した遺伝子の数を示すベン図。右、3MC、UV 処置時のみに NMR 特異的 (青塗りの領域、a) またはマウス特異的 (紫塗りの領域、b) に上昇した遺伝子のエンリッチメント解析結果。

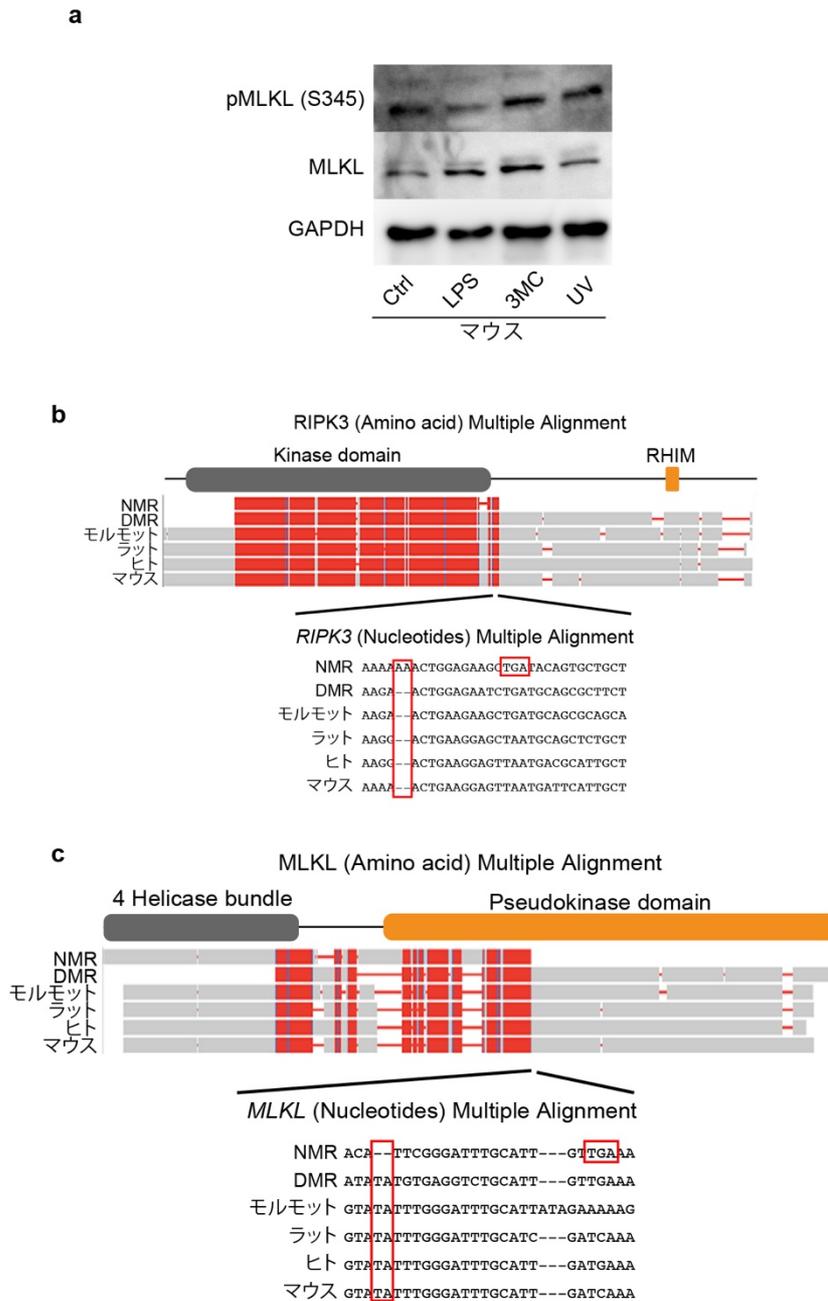


Fig. 20 発がん促進的な刺激後のマウスの皮膚で Necroptosis 経路が活性化するが、NMR では Necroptosis に必須な遺伝子 *RIPK3* と *MLKL* にフレームシフト変異がある

a、LPS、3MC、UV 処置後のマウス皮膚におけるリン酸化 MLKL、total MLKL のウェスタンブロッティング。**b**、**c**、NMR、ダマラランドデバネズミ (Damaraland mole-rat、DMR)、モルモット、ラット、ヒト、マウスの *RIPK3* および *MLKL* の塩基・アミノ酸配列の比較。NMR に生じたフレームシフト変異および早期終止

コドン変異を赤の四角で囲んだ。アライメントの上部に、各タンパク質の機能ドメインを表示した。

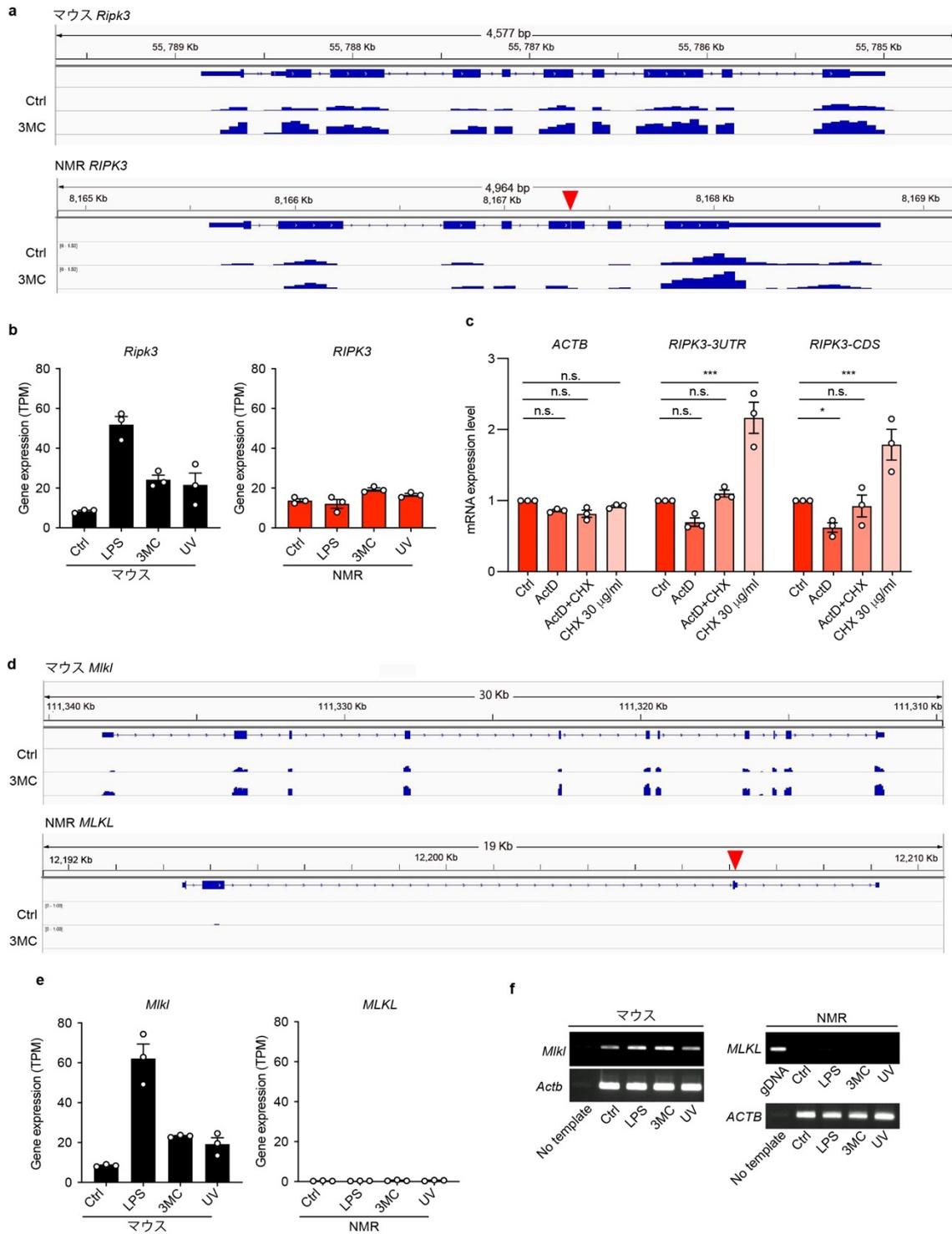


Fig. 21 NMR およびマウスにおける *RIPK3* と *MLKL* の遺伝子発現解析

a、コントロール (Ctrl) または 3MC 投与後の皮膚の RNA-seq データの *RIPK3* 遺伝子座へのマッピング。IGV により可視化した。赤矢印は NMR-*RIPK3* のフレームシフト変異の位置を示す。**b**、Ctrl、LPS、3MC、UV 処置した皮膚の *RIPK3* 発現レベル (TPM) (各 $n=3$)。 **c**、ActD および CHX により処置した NMR 線維芽細胞における *RIPK3* の qRT-PCR。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。GAPDH を内部標準遺伝子として用いた。ACTB は NMD の非標的 mRNA の例として使用した。*; $P < 0.05$ 、***; $P < 0.001$ 、n.s.; 有意差なしを示す。one-way ANOVA を行い、Ctrl に対して Dunnett 検定を行なった。**d**、コントロールまたは 3MC 投与後の皮膚の RNA-seq データの *MLKL* 遺伝子座へのマッピング。IGV により可視化した。赤矢印は、NMR-*MLKL* のフレームシフト変異の位置を示す。**e**、Ctrl、LPS、3MC、UV 処置された皮膚の *MLKL* 発現レベル (TPM) (各 $n=3$)。 **f**、各刺激後の皮膚における *MLKL*、*ACTB* の半定量的 RT-PCR。gDNA：ポジティブコントロールとして NMR の尾由来ゲノム DNA を用いた。

3-3-2 ハダカデバネズミの初代線維芽細胞は、Necroptosis 誘導剤による細胞死を起こさない

ハダカデバネズミ (NMR) では Necroptosis のマスターレギュレーターである *RIPK3* と *MLKL* のフレームシフト変異が生じ、NMD による分解あるいは非発現により機能喪失していることが示唆された。そこで、培養下で実験的な Necroptosis 誘導を行い、NMR 細胞が Necroptosis を起こすかを評価することにした。Necroptosis 誘導能の評価には、初代皮膚線維芽細胞を Necroptosis 誘導剤である TNF- α (TNF- α , T)、CHX (C) および z-VAD-fmk (カスパーゼ阻害剤、Z) で処理し、TNF- α 依存性の細胞死が Necroptosis の阻害剤である Necrostatin-1 (Nec1、RIPK1 阻害剤、N) によって阻害されるかを解析する系を用いた (Degterev et al., 2014)。結果、マウス線維芽細胞では Necroptosis 誘導剤により Nec-1 依存的な細胞死が誘導されたが、NMR 線維芽細胞では TNF- α 依存的な *IL6* の発現増加は見られた一方で、Necroptosis 誘導剤処置により Nec-1 依存的な細胞死は誘導されなかった (Fig. 22a, b)。これらの結果から、NMR 線維芽細胞は Necroptosis 誘導能を失っていることが強く示唆された。さらに、*RIPK3* と *MLKL* の遺伝子変異が NMR の Necroptosis 経路不活性化の責任遺伝子であるかを明らかにするために、他種の *Ripk3* および *Mkl1* を NMR 線維芽細胞に強制発現し Necroptosis が回復するかを解析した。結果、マウスあるいはモルモットの *RIPK3* および *MLKL* を強制発現し Necroptosis 誘導を行った場合でも、NMR 線維芽細胞ではマウス細胞のような細胞死の著増はみられなかった (Fig. 23a, b)。この原因としては、Necroptosis 経路のシグナル伝達には *RIPK3* と *MLKL* と他のタンパク質との 1 アミノ酸レベルでの相互作用が重要であるため (Lalaoui et al., 2020)、別種由来のタンパク質ではシグナル伝達がうまくいかなかった可能性、また、*RIPK3* および *MLKL* の機能喪失以外の未知の因子も寄与している可能性が考えられる。

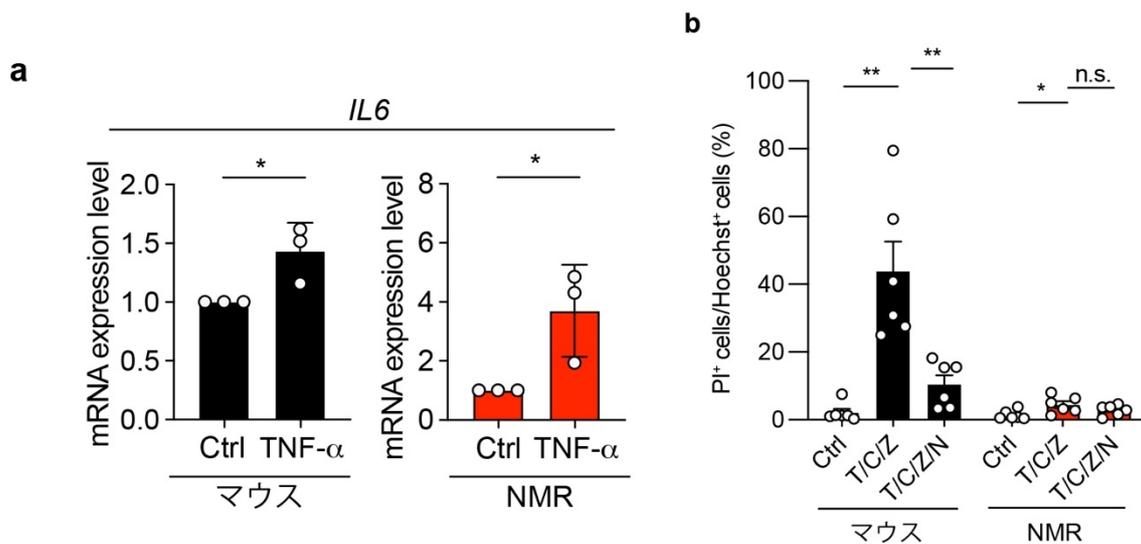


Fig. 22 NMR 線維芽細胞は、TNF- α に応答するが

Nec-1 依存性細胞死は起こさない

a、TNF- α を24時間処理したNMRおよびマウス線維芽細胞における*IL6* mRNAの発現定量結果。ACTBを内部標準遺伝子として用いた。**b**、TNF- α (T)、CHX (C)、z-VAD-fmk (Z)またはNec-1 (N)の組み合わせで24時間処理したマウスおよびNMR線維芽細胞の細胞死の定量結果。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n = 3$ (a) あるいは $n = 6$ (b)。*; $P < 0.05$; **; $P < 0.01$ 、n.s.; 有意差なしを示す。**a**はCtrlに対してunpaired t -testを行った。**b**はone-way ANOVAを行い、Tukey検定を行なった。

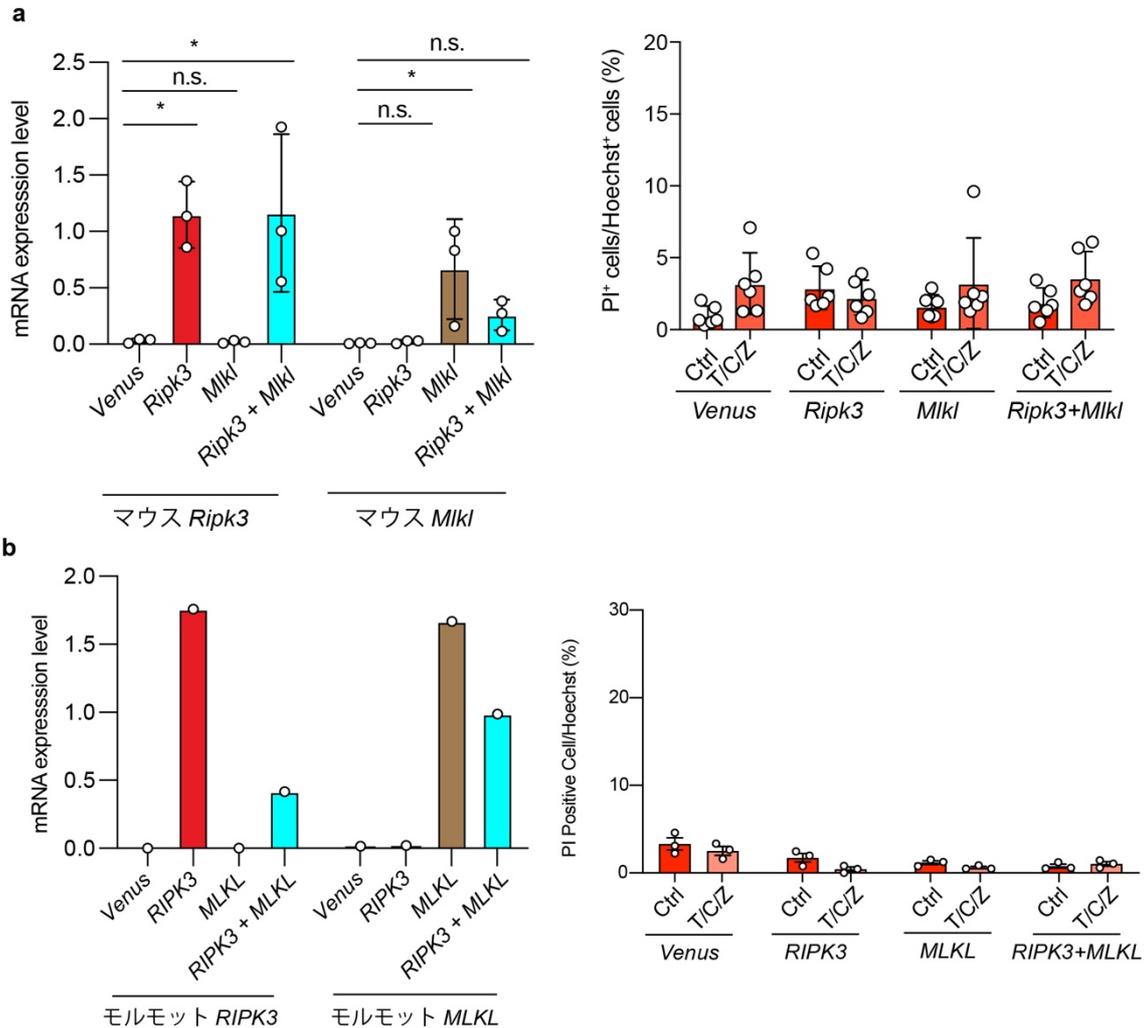


Fig. 23 マウスあるいはモルモットの *RIPK3* と *MLKL* を強制発現しても、
NMR 線維芽細胞は Necroptosis を起こさない

a、左、マウス *Ripk3*、マウス *Mkl1* を強制発現した NMR 線維芽細胞におけるマウス *Ripk3* および *Mkl1* の発現定量結果(インターナルコントロールには ACTB を用いた)。各 $n = 3$ 。*; $P < 0.05$ 、n.s.; 有意差なしを示す。one-way ANOVA を行い、Venus に対して Dunnett 検定を行なった。右、Venus、マウス *Ripk3*、マウス *Mkl1*、あるいはマウス *Ripk3*、*Mkl1* の両方を強制発現した NMR 線維芽細胞における細胞死の定量結果。TNF- α (T)、CHX (C)、z-VAD-fmk (Z) の組み合わせで 24 時間処理し、PI および Hoechst 染色で細胞死を測定した。**b**、左、モルモット *RIPK3*、モルモット *MLKL* を強制発現した NMR 不死化線維芽細胞におけるモルモット *RIPK3* および *MLKL* の発現定量結果 (インターナルコントロールには ACTB を用いた)。 $n = 1$ (biological replicate) 右、Venus、モルモット *RIPK3*、モ

ルモット *MLKL* あるいはモルモット *RIPK3*、*MLKL* の両方を強制発現した NMR
線維芽細胞における Necroptosis 誘導剤を用いた細胞死の定量結果。 $n = 3$
(technical replicate)

3-3-3 3MC 投与は、マウス組織内で Necroptosis を引き起こすが、ハダカデバネズミでは引き起こさない。

一般に Necroptosis は、High mobility group box-1 protein (HMGB1) などのさまざまな細胞内成分を細胞外に放出することで炎症を活性化させる。HMGB1 の核から細胞質への移行はがん促進的な炎症を促進することが報告されており、Necroptosis 経路の活性化の指標として一般的に使用されている (Han et al., 2015; Seifert et al., 2016; Zhou et al., 2019)。そこで Necroptosis 誘導能の喪失が発がん刺激後の組織応答に与える影響を明らかにするために、それぞれの処置後の皮膚における HMGB1 の細胞質移行を評価した。HMGB1 の組織免疫化学染色を行った結果、3MC 処置したマウスの皮膚では HMGB1 の細胞質移行が大幅に増加したが、ハダカデバネズミ (NMR) の皮膚ではいずれの処置によっても有意な変化は認められなかった (Fig 24a, b)。このことから、NMR における Necroptosis 誘導能の喪失は、組織中での発がん刺激後の細胞内成分の漏出抑制を通じ、発がん促進的な炎症の抑制に寄与していることが示唆された。

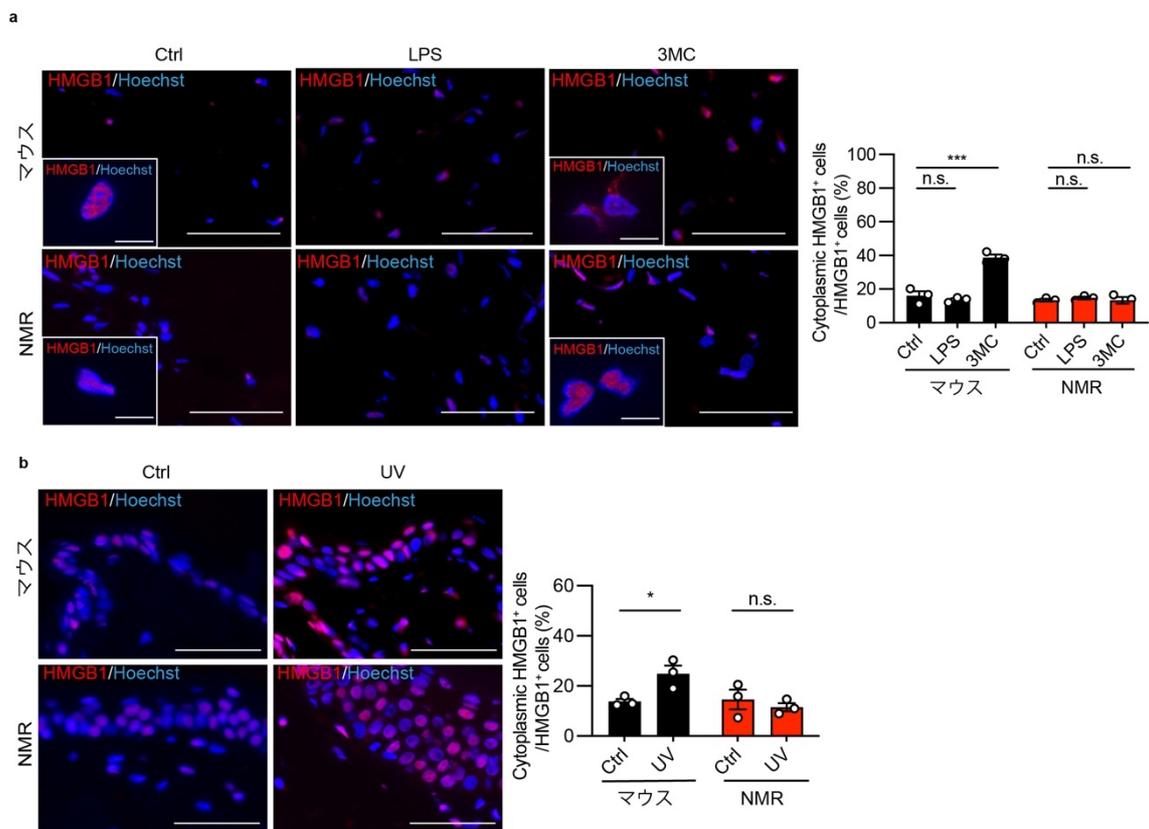


Fig. 24 3MC 処置により、マウスのみで HMGB1 の細胞質移行が誘導される
a、b、 左側、マウスおよび NMR の皮膚における HMGB1 の免疫蛍光染色像。Scale bar、50 μ m、20 μ m (拡大図)。右側、HMGB1 の細胞質移行の定量結果。HMGB1 陽性細胞のうち、細胞質移行が見られた細胞の割合を求めた。エラーバーは、平均 \pm 標準誤差を示す。各 $n=3$ 。***; $P < 0.01$ 、*; $P < 0.01$ 、n.s.; 有意差なしを示す。one-way ANOVA を行い、未処置群 (Ctrl) に対して Dunnett 検定を行なった。UV 群は Ctrl に対して unpaired t -test を行なった。

3-4 Necroptosis 経路の阻害は、マウスにおいて発がん刺激後の免疫細胞の浸潤を抑制し、がんの発症を遅延させる

3-4-1 RIPK3 阻害剤の投与により、発がん剤を投与されたマウスにおける Necroptosis 活性化および免疫細胞の浸潤が抑制される

これまでの解析から、ハダカデバネズミ (NMR) において Necroptosis 経路の機能喪失が、がん耐性に寄与している可能性が示唆された。そこで、実際に Necroptosis 経路の抑制が免疫細胞の浸潤および発がん耐性に寄与するかを明らかにするため、マウスで Necroptosis を抑制することで、免疫細胞の浸潤および発がんを抑制できるかを評価することとした。発がん刺激時に Necroptosis を抑制するため、3MC 皮下注射の 7 日前から RIPK3 阻害剤である GSK'872 をマウスに腹腔内投与した (Fig. 25 a)。3MC 投与 7 日後の皮膚のウェスタンブロッティング解析を行った結果、Necroptosis の指標である MLKL のリン酸化が GSK'872 投与によって顕著に抑制されていた (Fig. 25 b)。また、3MC 処置マウスにおける HMGB1 の細胞質移行も GSK'872 投与により有意に減少し、GSK'872 が発がん刺激後の Necroptosis を抑制することがわかった (Fig. 25c)。さらに、免疫細胞の浸潤を評価した結果、3MC 処置によって誘導される CD45 および Iba1 陽性細胞の増加は GSK'872 投与マウスにおいて有意に抑制された (Fig. 26)。

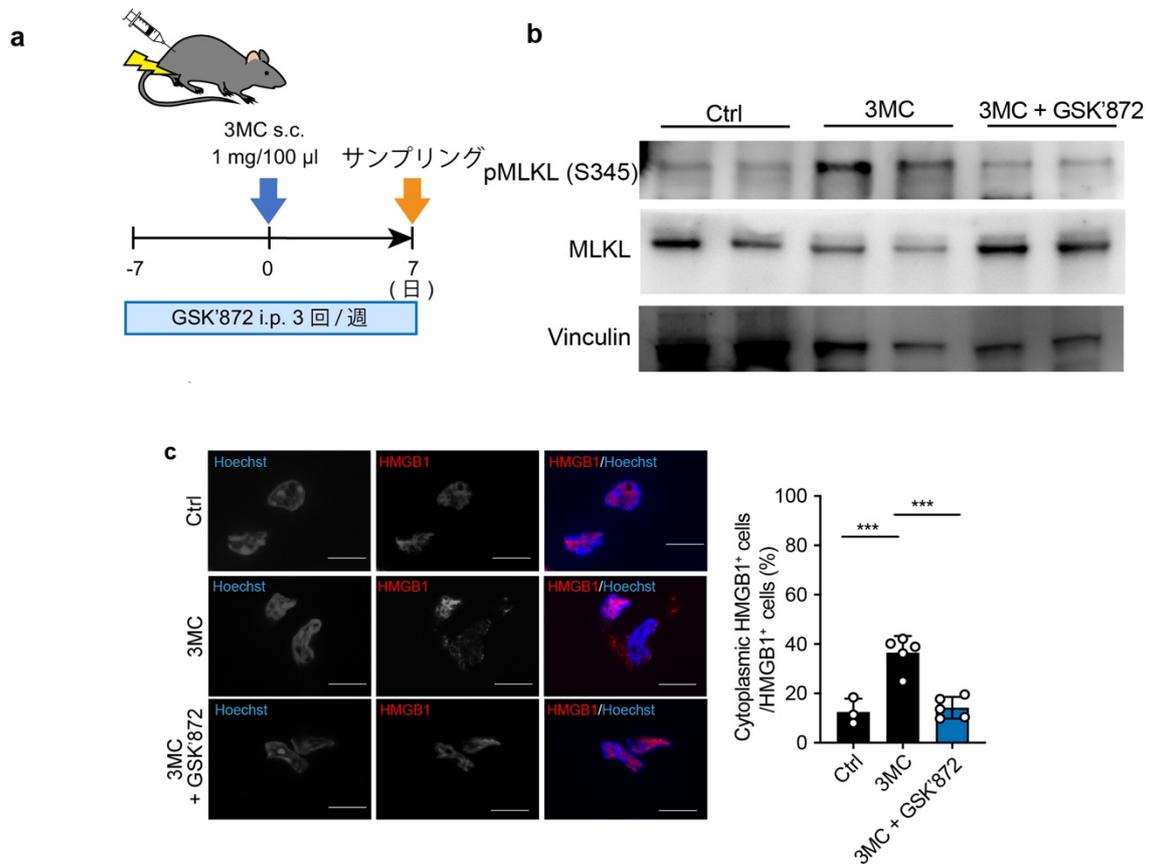


Fig. 25 RIPK3 阻害剤 GSK'872 投与は、

3MC に短期間曝露されたマウスにおける Necroptosis 経路の活性化を阻害する

a、GSK'872 を用いたマウス皮膚における発がん刺激時の Necroptosis 経路抑制の実験模式図。GSK'872 は 3MC 注射の 7 日前から週 3 回腹腔内 (i.p.) 投与した。

b、GSK'872 投与あるいは未投与のマウス皮膚における MLKL のウェスタンブロッティング。

c、左側、3MC 投与 7 日後の GSK'872 投与あるいは未投与のマウス皮膚の HMGB1 の免疫蛍光染色像。Scale bar、20 µm (拡大図)。右側、HMGB1 の細胞質移行の定量結果。HMGB1 陽性細胞のうち、細胞質移行が見られた細胞の割合を求めた。エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。各 $n = 3$ (Ctrl)、 $n = 5$ (3MC、3MC + GSK872 投与群)。**、 $P < 0.01$ を示す。one-way ANOVA を行い、未処置群 (Ctrl) に対して Dunnett 検定を行なった。

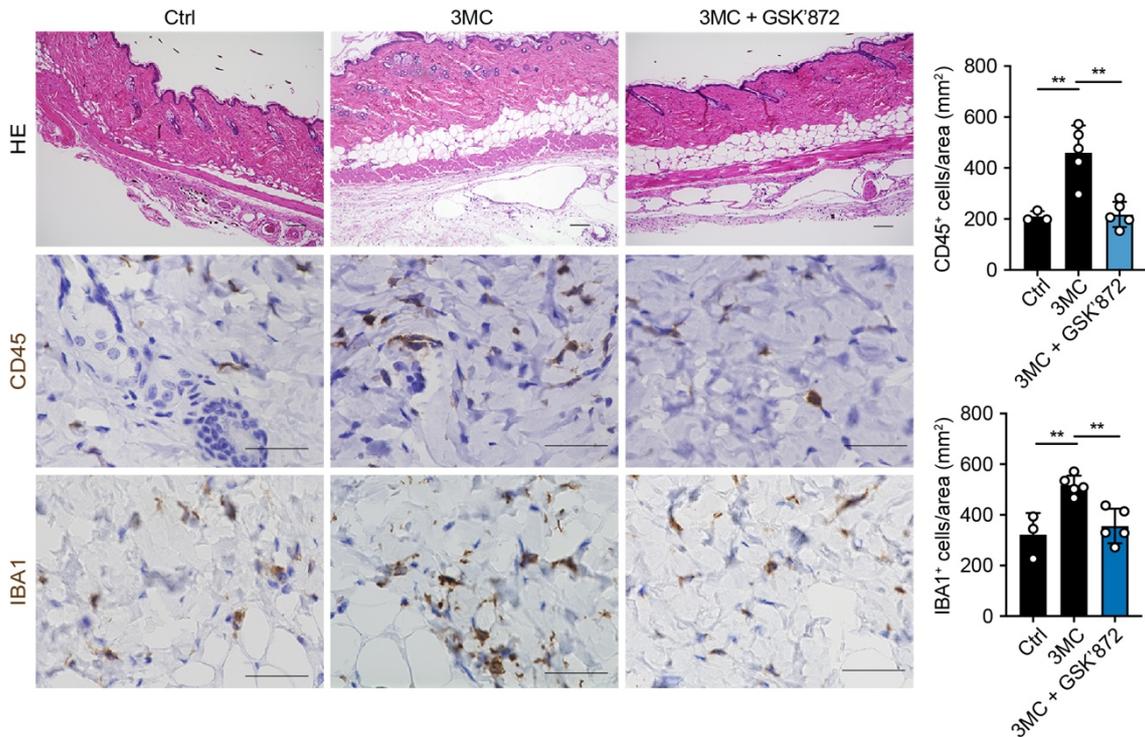


Fig. 26 RIPK3 阻害剤 GSK'872 投与は、

3MC に短期間曝露されたマウスにおける免疫細胞の浸潤を抑制する
a、b、 3MC 投与 7 日後の GSK'872 投与あるいは未投与のマウス皮膚の HE 染色像、CD45 および IBA1 免疫染色像。面積当たりの CD45、Iba1 陽性細胞数を定量した。エラーバーは、平均 ± 標準誤差を示す。各 $n = 3$ (Ctrl)、 $n = 5$ (3MC、3MC + GSK872 投与群)、**; $P < 0.01$ 、を示す。one-way ANOVA を行い、Tukey 検定を行なった。

3-4-2 RIPK3 阻害剤の投与により、発がん剤を投与されたマウスにおける発がんが遅延する

これらの結果から、GSK'872 による Necroptosis 経路の阻害が発がん刺激後の炎症応答を低減することが明らかになったため、最後に、GSK'872 による発がん抑制効果を検証した。結果、GSK'872 投与マウスは未投与マウスと比べ 3MC 投与による腫瘍の発症が有意に遅延した (Fig. 27、 $P = 0.0423$ 、Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定)。このことから、Necroptosis 経路の抑制をマウスで模倣することで、NMR で見出した炎症抑制による化学発がん耐性の一部を、マウスで再現することができたことを意味している。

これらの結果から、Necroptosis 経路に重要な遺伝子の変異により Necroptosis 経路が失われることで、がん促進的な炎症反応を減弱していることが、NMR 特有のがん耐性機構を制御する一つの新規メカニズムであると考えられる。

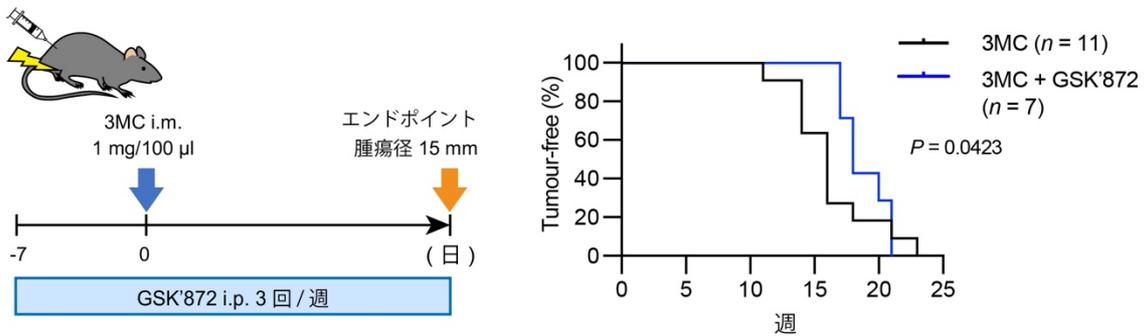


Fig. 27 RIPK3 阻害剤 GSK'872 の投与は、3MC 投与マウスにおける腫瘍形成を遅延させる

左、GSK'872 を併用投与した 3MC によるマウス発がん誘導実験の模式図。右、3MC 処置した GSK'872 投与あるいは未投与マウスの Kaplan-Meier 曲線。腫瘍径 > 15 mm をエンドポイントとした。各 $n = 7$ (GSK'872 併用投与群)、 $n = 11$ (コントロール群)。 $P = 0.0423$ 。

4. 考察

本研究では、NMR が化学発がん物質を用いた 2 種類の実験的な発がん誘導に対して並外れた耐性を持つこと、その発がん耐性メカニズムの一端として Necroptosis 経路のマスターレギュレーターである *RIPK3* と *MLKL* の機能喪失型変異による Necroptosis 誘導能の喪失および炎症応答の減弱が寄与することを明らかにした。

これまでに様々な齧歯類を用いて、化学発がん物質の腫瘍原性が評価されてきた (Ames and Gold, 1990)。NMR と同様に、自然発生腫瘍に対する発がん耐性を持つことが報告されている BMR でも、過去に本研究と同様の 3MC を用いた発がん誘導実験が行われている。この実験では、130 週間の観察で 18% の BMR 個体が腫瘍を形成することが報告されている (Altwasser et al., 2019; Manov et al., 2013)。一方本研究では、3MC を処置した NMR において 132 週以上、DMBA/TPA を処置した NMR において 70 週以上の観察期間において、一例も腫瘍形成が認められなかった。このことから、NMR ががん耐性動物の中でも特に並外れた発がん耐性を持つことを実験的に証明することができたと考えている。BMR は、高い DNA 修復能をもつことが報告されているが、3MC により強い炎症反応を引き起こすことも報告されている (Domankevich et al., 2018; Manov et al., 2013)。一方で、NMR は高い DNA 修復能といった細胞自律的な保護機構に加えて (Tian et al., 2019)、炎症応答の抑制を含む非細胞自律的な発がん耐性機構を持つことで、並外れた発がん耐性を獲得していると考えている。

本研究結果から、がんを促進する刺激に対する炎症応答の抑制が、NMR の発がん耐性に寄与していることが初めて明らかになった。しかしながら、炎症応答の惹起には Necroptosis 以外にも様々な因子が関与することから (Tang and Wang, 2016)、本研究では着目しなかった他の因子も、NMR における炎症応答の抑制に寄与していると考えられる。特に、他生物種と NMR の免疫細胞の特性の違いが、炎症応答を制御している可能性が考えられる。これまでに NMR 血液を用いた Single cell RNA-seq 研究により、NK 細胞の欠如、リンパ球と比した骨髄細胞の高比率、ユニークな顆粒球サブセットの存在など、NMR の免疫に関する興味深い知見が明らかになってきている (Hilton et al., 2019)。さらに今回私は、一部の組織において NMR の組織常在性の免疫細胞数が他の齧歯類に比べて顕著に少ないことを明らかにした。一方これまでのヒトやマウスの研究で、組

織常在性の免疫細胞は免疫恒常性の維持に寄与し抗炎症性の働きを持つことが報告されており (Rosshart et al., 2017)、NMR における常在免疫細胞の少なさがどのように炎症抑制に寄与しているかは未解明なままである。今後、本研究の知見を含めた NMR のユニークな免疫システムに関する研究が進展することで、がん耐性の理解がさらに深まることが期待される。興味深いことに、NMR と同様に長寿かつがん耐性を持つことが報告されているコウモリにおいても、*in silico/in vitro* の解析によって免疫の特殊性が報告されている (Ahn et al., 2019; Jebb et al., 2020; Xie et al., 2018)。進化的に獲得されたがん耐性の共通性および相違性を理解するために、他のがん耐性動物の免疫・炎症応答とがん耐性のクロストークに関する研究が進められることが期待される。

本研究では NMR が、Necroptosis のマスターレギュレーターである *RIPK3* および *MLKL* の機能喪失型変異をもち、Necroptosis 誘導能を欠損していることを明らかにした。Necroptosis は、加齢性疾患、虚血、ウイルス感染などの様々な炎症関連性の疾患に関与することが報告されている (Chen et al., 2018; Jiao et al., 2020; Li et al., 2017)。特に、NMR はがん耐性だけでなく、加齢性疾患や虚血に対しても強い抵抗性を持つことが報告されていることから (Park et al., 2017; Ruby et al., 2019)、Necroptosis 経路の喪失は NMR のこれらの特徴にも広く寄与している可能性が考えられる。

本研究において、Necroptosis 経路の抑制を模倣するだけでは、NMR の並外れた発がん耐性をマウスで完全に再現することはできなかった。発がんに至るまでには、様々なゲートキーパーが複雑な役割を果たす (Hanahan and Weinberg, 2011) ことが知られているため、NMR には、さらに未解明の多様な発がん耐性機構が存在することが予想される。がんの発症には、変異細胞周囲の微小環境の変化に加えて、特定の遺伝子への変異の蓄積も重要である。本研究では、発がん物質投与後に DNA 損傷マーカー陽性細胞数が NMR とマウスで同等に増加することを示し、発がん剤が NMR 細胞において DNA 傷害を誘導することを明らかにした。しかしながら、網羅的遺伝子解析で発がん促進的な刺激後に NMR はマウスに比べてより p53 経路が活性化していた。また、がんの発症においては、遺伝子変異がどの部位に生じるかががんの発症に影響を与えることが報告されている (Avgustinova et al., 2018)。このため、本研究で明らかになった NMR における発がん促進に関連する炎症応答の減弱に加えて、1) 以前に報告された効率的な DNA 二本鎖切断の修復 (Tian et al., 2019) や未知のメカニ

ズムによる、特定の遺伝子の変異からの保護作用、および2) 未知のメカニズムによる、遺伝子変異が蓄積した細胞の排除機構などが、複合的に NMR のがん耐性を制御している可能性があると考えられる。

NMR の化学発がんに対する並外れた耐性とそのメカニズムの一端を実証した本研究は、NMR 個体に着目した発がん研究の新たな出発点となることが期待される。今後、NMR 個体においてさらなる研究が進められることで、培養細胞レベルでは発見が難しかったさまざまな細胞間/細胞内のがん耐性メカニズムが明らかになり、発がんを制御する機構の理解と将来的にがんを予防するための新しい戦略の開発につながることを予想される。

5. 総括および結論

- NMR は、2種類の化学発がんモデルに対して強い発がん耐性を示す。
- 発がん物質投与後に、細胞死およびDNA損傷はNMRとマウスで同様に誘導されるが、炎症の指標の一つである免疫細胞の浸潤はNMRで顕著に少ない。
- UV照射に対しては、発がん剤投与時と同様に、NMR皮膚における免疫細胞の浸潤は少ない。一方LPSに対しては、NMRでもマウスと同等の免疫細胞の浸潤が引き起こされる。
- マウスの皮膚では3MC投与、UV照射後にNecroptosis経路が活性化する。
- NMRでは、Necroptosis経路の活性化に必須な遺伝子である*RIPK3*、*MLKL*に機能喪失型のフレームシフト変異が存在する。
- NMR線維芽細胞はNecroptosis誘導能を持たず、3MC投与後のNMR皮膚において、3MC投与後にNecroptosis経路活性化の指標の一つであるHMGB1の細胞質移行がNMRでは増加しない。
- マウスにNecroptosis阻害剤であるGSK'872を併用投与すると、3MC投与によるNecroptosis経路の活性化、免疫細胞浸潤が抑制され、がんの発症が遅延する。

本研究では、これまで未解明であったNMRの化学発がん物質による発がん誘導への強い発がん抵抗性を明らかにした。またその発がん耐性メカニズムの一つとして、Necroptosis経路の機能喪失を伴った炎症応答の減弱という、非細胞自律的な機構が関わっていることを明らかにした。

これまでNMRの発がん耐性は飼育下での観察研究のみに依拠していたが、本研究により、人為的な発がん誘導に対しても強い発がん耐性を持つことが明らかになり、その並外れたがん耐性が個体レベルではじめて実証された。

今までのNMRの発がん耐性研究は、線維芽細胞を用いた細胞自律的な発がん耐性機構の解析に限られていた。一方で、がんの発症は細胞自律的/非自律的なさまざまな要因によって制御されることから、細胞自律的な発がん耐性機構を明らかにするだけでは、NMRの本質的な発がん耐性に迫ることは難しい。本研究では、この問題を解決すべく、個体内での発がん刺激への個体の応答に着目し、様々な刺激に対する組織の動態を解析することで、NMR特有の非細胞自律的な発がん耐性機構の一端を解き明かすことができた。

本研究は、発がん耐性動物特有の発がん耐性を明らかにするうえで個体の応答を理解することの重要性を改めて実証したものであり、発がん耐性を持つ動物を用いたがん研究の新たな出発点となることが期待される。今後、NMRの生体を用いて、細胞間相互作用並びに細胞内因的制御の双方に着目した研究が発展することで、NMRの並外れたがん耐性の分子機構の全容が明らかになることが期待される。従来のモデル生物を用いた研究に加え、NMRのようながん耐性動物の生体を用いた研究により、がんの理解が深まり、将来的にがん治療および予防方法の新たな戦略の開発につながるが見込まれる。

6. 謝辞

本研究の実施にあたり、北海道大学で博士課程の大学院生として、研究に取り組む機会を与えてくださいました、遺伝子病制御研究所免疫生物分野・清野研一郎教授に心より御礼を申し上げます。

組織の解析方法やご助言を快くしてくださいました、熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学講座の菰原義弘准教授、東京大学医科学研究所先進病態モデル研究分野の山田泰広教授に心より感謝を致します。

組織の遺伝子発現解析のため、実験の相談や実施、ならびに解析機器を快くお貸しくださいました、京都大学 iPS 細胞研究所未来生命科学開拓部門の山本拓也准教授、櫻井智子氏に心より御礼を申し上げます。また、遺伝子発現データの解析に際して、丁寧なご指導を賜りました、広島大学大学院統合生命科学研究科ゲノム情報科学研究室の坊農秀雅特任教授、いわて東北メディカル・メガバンク機構の清水厚志教授、須藤洋一特命助教、小巻翔平特命助教に心より感謝を申し上げます。

Necroptosis 経路遺伝子の喪失の発見と実験に関しまして、ご助言をいただきました熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座の押海裕之教授に、心より御礼を申し上げます。

研究結果のディスカッションや、研究の進め方などに助言を頂きました熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学講座の中條岳志助教に心より御礼を申し上げます。

最後に、本研究全般にわたり助言をしてくださいました、熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学講座の三浦恭子准教授、河村佳見助教、岡香織研究員また、熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学講座のメンバー全員に心より感謝致します。

7. 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

8. 引用文献

- Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., and DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat. Protoc.* *4*, 1350–1362.
- Ahn, M., Anderson, D.E., Zhang, Q., Tan, C.W., Lim, B.L., Luko, K., Wen, M., Chia, W.N., Mani, S., Wang, L.C., et al. (2019). Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. *Nat. Microbiol.* *4*, 789–799.
- Altwasser, R., Paz, A., Korol, A., Manov, I., Avivi, A., and Shams, I. (2019). The transcriptome landscape of the carcinogenic treatment response in the blind mole rat: Insights into cancer resistance mechanisms. *BMC Genomics* *20*, 1–15.
- Ames, B.N., and Gold, L.S. (1990). Chemical carcinogenesis: too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 7772–7776.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* *31*, 166–169.
- Aran, D., Hu, Z., and Butte, A.J. (2017). xCell: Digitally portraying the tissue cellular heterogeneity landscape. *Genome Biol.* *18*, 220.
- Avgustinova, A., Symeonidi, A., Castellanos, A., Urdiroz-Urricelqui, U., Solé-Boldo, L., Martín, M., Pérez-Rodríguez, I., Prats, N., Lehner, B., Supek, F., et al. (2018). Loss of G9a preserves mutation patterns but increases chromatin accessibility, genomic instability and aggressiveness in skin tumours. *Nat. Cell Biol.* *20*, 1400–1409.
- Bald, T., Quast, T., Landsberg, J., Rogava, M., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Kohlmeyer, J., Riesenberger, S., van den Boorn-Konijnenberg, D., Hömig-Hölzel, C., et al. (2014). Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature* *507*, 109–113.
- Bens, M., Szafranski, K., Holtze, S., Sahm, A., Groth, M., Kestler, H.A., Hildebrandt, T.B., and Platzer, M. (2018). Naked mole-rat transcriptome signatures of socially suppressed sexual maturation and links of reproduction to aging. *BMC Biol.* *16*, 77.
- Chen, H., Fang, Y., Wu, J., Chen, H., Zou, Z., Zhang, X., Shao, J., and Xu, Y. (2018). RIPK3-MLKL-mediated necroinflammation contributes to AKI progression to CKD. *Cell Death Dis.* *9*, 878.

- Cheng, J., Yuan, Z., Yang, W., Xu, C., Cong, W., Lin, L., Zhao, S., Sun, W., Bai, X., and Cui, S. (2017). Comparative study of macrophages in naked mole rats and ICR mice. *Oncotarget* 8, 96924–96934.
- Chung, K.W., Choi, Y.J., Park, M.H., Jang, E.J., Kim, D.H., Park, B.H., Yu, B.P., and Chung, H.Y. (2015). Molecular Insights into SIRT1 Protection Against UVB-Induced Skin Fibroblast Senescence by Suppression of Oxidative Stress and p53 Acetylation. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 70, 959–968.
- Degterev, A., Zhou, W., Maki, J.L., and Yuan, J. (2014). Assays for necroptosis and activity of RIP kinases. *Methods Enzymol.* 545, 1–33.
- Delaney, M.A., Nagy, L., Kinsel, M.J., and Treuting, P.M. (2013). Spontaneous histologic lesions of the adult naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). *Vet. Pathol.* 50, 607–621.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Domankevich, V., Eddini, H., Odeh, A., and Shams, I. (2018). Resistance to DNA damage and enhanced DNA repair capacity in the hypoxia-tolerant blind mole rat *Spalax carmeli*. *J. Exp. Biol.* 221, jeb174540.
- Garcia-Cao, I., Song, M.S., Hobbs, R.M., Laurent, G., Giorgi, C., de Boer, V.C.J., Anastasiou, D., Ito, K., Sasaki, A.T., Rameh, L., et al. (2012). Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State. *Cell* 149, 49–62.
- Hadi, F., Kulaberoglu, Y., Lazarus, K.A., Bach, K., Ugur, R., Beattie, P., Smith, E.S.J., and Khaled, W.T. (2020). Transformation of naked mole-rat cells. *Nature* 583, E1–E7.
- Han, S.J., Min, H.J., Yoon, S.C., Ko, E.A., Park, S.J., Yoon, J.-H., Shin, J.-S., and Seo, K.Y. (2015). HMGB1 in the pathogenesis of ultraviolet-induced ocular surface inflammation. *Cell Death Dis.* 6, e1863–e1863.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hilton, H.G., Rubinstein, N.D., Janki, P., Ireland, A.T., Bernstein, N., Fong, N.L., Wright, K.M., Smith, M., Finkle, D., Martin-McNulty, B., et al. (2019). Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity. *PLOS Biol.* 17, e3000528.

Jayakumar, A., and Bothwell, A.L.M. (2019). RIPK3-Induced Inflammation by I-MDSCs Promotes Intestinal Tumors. *Cancer Res.* 79, 1587–1599.

Jebb, D., Huang, Z., Pippel, M., Hughes, G.M., Lavrichenko, K., Devanna, P., Winkler, S., Jermiin, L.S., Skirmuntt, E.C., Katzourakis, A., et al. (2020). Six reference-quality genomes reveal evolution of bat adaptations. *Nature* 583, 578–584.

Jiao, H., Wachsmuth, L., Kumari, S., Schwarzer, R., Lin, J., Eren, R.O., Fisher, A., Lane, R., Young, G.R., Kassiotis, G., et al. (2020). Z-nucleic-acid sensing triggers ZBP1-dependent necroptosis and inflammation. *Nature* 580, 391–395.

Kumar, S., Wang, J., Shanmukhappa, S.K., and Gandhi, C.R. (2017). Toll-Like Receptor 4-Independent Carbon Tetrachloride-Induced Fibrosis and Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in Mice: Role of Hepatic Stellate Cells. *Am. J. Pathol.* 187, 1356–1367.

Lalaoui, N., Boyden, S.E., Oda, H., Wood, G.M., Stone, D.L., Chau, D., Liu, L., Stoffels, M., Kratina, T., Lawlor, K.E., et al. (2020). Mutations that prevent caspase cleavage of RIPK1 cause autoinflammatory disease. *Nature* 577, 103–108.

Lee, B.P., Smith, M., Buffenstein, R., and Harries, L.W. (2020). Negligible senescence in naked mole rats may be a consequence of well-maintained splicing regulation. *GeroScience* 42, 633–651.

Lee, S.B., Kim, J.J., Han, S.-A., Fan, Y., Guo, L.-S., Aziz, K., Newsheem, S., Kim, S.S., Park, S.-Y., Luo, Q., et al. (2019). The AMPK–Parkin axis negatively regulates necroptosis and tumorigenesis by inhibiting the necrosome. *Nat. Cell Biol.* 21, 940–951.

Lejeune, F., and Maquat, L.E. (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 309–315.

Li, D., Meng, L., Xu, T., Su, Y., Liu, X., Zhang, Z., and Wang, X. (2017). RIPK1-RIPK3-MLKL-dependent necrosis promotes the aging of mouse male reproductive system. *Elife* 6, 1–21.

Liang, S., Mele, J., Wu, Y., Buffenstein, R., and Hornsby, P.J. (2010). Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). *Aging Cell* 9, 626–635.

Liu, S., Liu, H., Johnston, A., Hanna-Addams, S., Reynoso, E., Xiang, Y., and Wang, Z. (2017). MLKL forms disulfide bond-dependent amyloid-like polymers to induce necroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7450–E7459.

Manov, I., Hirsh, M., Iancu, T.C., Malik, A., Sotnichenko, N., Band, M., Avivi, A., and Shams, I. (2013). Pronounced cancer resistance in a subterranean rodent, the blind mole-rat, *Spalax*: in vivo and in vitro evidence. *BMC Biol.* *11*, 91.

Marcel Martin (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet.Journal* *17*, 10–12.

Mittal, D., Saccheri, F., Vénéreau, E., Pusterla, T., Bianchi, M.E., and Rescigno, M. (2010). TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *EMBO J.* *29*, 2242–2252.

Miyawaki, S., Kawamura, Y., Oiwa, Y., Shimizu, A., Hachiya, T., Bono, H., Koya, I., Okada, Y., Kimura, T., Tsuchiya, Y., et al. (2016). Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. *Nat. Commun.* *7*, 11471.

Nakagawa, T., Ohnishi, K., Kosaki, Y., Saito, Y., Horlad, H., Fujiwara, Y., Takeya, M., and Komohara, Y. (2017). Optimum immunohistochemical procedures for analysis of macrophages in human and mouse formalin fixed paraffin-embedded tissue samples. *J. Clin. Exp. Hematop.* *57*, 31–36.

Park, T.J., Reznick, J., Peterson, B.L., Blass, G., Omerbašić, D., Bennett, N.C., Kuich, P.H.J.L., Zasada, C., Browe, B.M., Hamann, W., et al. (2017). Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* *356*, 307–311.

Ramilowski, J.A., Goldberg, T., Harshbarger, J., Kloppmann, E., Kloppman, E., Lizio, M., Satagopam, V.P., Itoh, M., Kawaji, H., Carninci, P., et al. (2015). A draft network of ligand-receptor-mediated multicellular signalling in human. *Nat. Commun.* *6*, 7866.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* *29*, 24–26.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* *26*, 139–140.

Rosshart, S.P., Vassallo, B.G., Angeletti, D., Hutchinson, D.S., Morgan, A.P., Takeda, K., Hickman, H.D., McCulloch, J.A., Badger, J.H., Ajami, N.J., et al. (2017). Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell* *171*, 1015–1028.

Ruby, J.G., Smith, M., and Buffenstein, R. (2019). Naked mole-rat mortality rates defy Gompertzian laws by not increasing with age. *Elife* *8*, 1–18.

- Rustgi, A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* *21*, 2525–2538.
- Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Giao Ly, N.N., Allothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S.H., et al. (2016). The necrosome promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature* *532*, 245–249.
- Seluanov, A., Hine, C., Azpurua, J., Feigenson, M., Bozzella, M., Mao, Z., Catania, K.C., and Gorbunova, V. (2009). Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 19352–19357.
- Tang, L., and Wang, K. (2016). Chronic Inflammation in Skin Malignancies. *J. Mol. Signal.* *11*, 1–13.
- Taylor, K.R., Milone, N.A., and Rodriguez, C.E. (2017). Four Cases of Spontaneous Neoplasia in the Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*), A Putative Cancer-Resistant Species. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* *72*, 38–43.
- Tian, X., Azpurua, J., Hine, C., Vaidya, A., Myakishev-Rempel, M., Ablaeva, 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.
- Tian, X., Firsanov, D., Zhang, Z., Cheng, Y., Luo, L., Tomblin, G., Tan, R., Simon, M., Henderson, S., Steffan, J., et al. (2019). SIRT6 Is Responsible for More Efficient DNA Double-Strand Break Repair in Long-Lived Species. *Cell* *177*, 622–638.
- Wada, H., Shibata, Y., Abe, Y., Otsuka, R., Eguchi, N., Kawamura, Y., Oka, K., Baghdadi, M., Atsumi, T., Miura, K., et al. (2019). Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats. *Sci. Rep.* *9*, 17981.
- Xie, J., Li, Y., Shen, X., Goh, G., Zhu, Y., Cui, J., Wang, L.-F., Shi, Z.-L., and Zhou, P. (2018). Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats. *Cell Host Microbe* *23*, 297–301.
- Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., et al. (2009). Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.* *186*, 393–407.
- Zhang, J., Chen, L., Liu, X., Kammertoens, T., Blankenstein, T., and Qin, Z. (2013). Fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells prevent carcinoma through collagen production and encapsulation of carcinogens. *Cancer Res.* *73*, 2770–2781.

Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A.H., Tanaseichuk, O., Benner, C., and Chanda, S.K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* *10*, 1523.