

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15060

研究課題名(和文) シマリス脳の初代培養系を用いた冬眠特異的タンパク質の機能評価

研究課題名(英文) Establishment of culture system of chipmunk neural stem cell for elucidating function of hibernation-specific protein (HP)

研究代表者

関島 恒夫 (sekiima, tsuneo)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：10300964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：冬眠動物シマリスの神経培養細胞を作成し、冬眠の分子メカニズムの探索を目指す実験基盤を整備した。神経細胞の培養に先立ち、胎児を得るために、シマリスの交配系を確立した。メス個体の観察を通して、発情鳴きをしているときに交尾させることで、計画的に胎児が得られることがわかった。培養に関して特筆すべき成果は、neurosphereの作成に成功し、大量の神経系stem cellの凍結保存できるようになったことである。stem cellから神経細胞への分化誘導も順調で、常時冬眠シマリス由来の神経細胞を用いた実験が可能となった。さらに低温耐性を調べるための培養デバイスを作成し、低温下での培養も可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to generate culture cells of chipmunk neuron and to prepare a platform for elucidating molecular mechanisms of hibernation in vitro. First of all, we established the breeding system of chipmunk based on observation of chipmunk's mating behavior to obtain chipmunk's embryo. A female unique estrus call played a role in acceptance of male and copulation success. Through systematic mating experiments referring to female estrus call, we were able to obtain fresh chipmunk's embryos from some pregnant females and provide them to subsequent culturing experiments. As a notable output for culture cells, we have succeeded to establish the culture system of chipmunk neural stem cells (neurosphere). These cells can be stored in LN. When necessary, cells are thawed and differentiated into mature neurons by appropriate procedures. We also make the culture device that does not require CO2. It makes low temperature culture easily without CO2 incubator.

研究分野：動物生態学

キーワード：冬眠 シマリス 培養 神経系幹細胞 交配実験 発情鳴き

## 1. 研究開始当初の背景

1992年、三菱化学生命科学研究所の近藤らにより、新規の冬眠特異的タンパク質(以下、HP)がチョウセンシマリスから発見された。このタンパク質は、3つの構造的に類似した族タンパク質(HP-20,HP-25,HP-27)の複合体に、 $\alpha 1$ -アンチトリプシンに類似した構造を持つタンパク質(HP-55)が結合した4量体からなるタンパク質複合体で、シマリスを含め冬眠動物に特異的に見られる。HPの産生は肝臓でのみ行われており、産生されたHPは、その後血中に放出される。 $5^{\circ}\text{C}$ ・恒暗条件下で飼育したシマリスの血漿中HP量を測定すると、その量は周期的に繰り返されるシマリスの冬眠と同調して変化する。HPの生体内調節の知見に基づき、冬眠期における脳内HPの機能をHP抗体の脳室内投与により阻害したところ、冬眠状態から覚醒状態への速やかな移行が見られ、冬眠の人工的制御が可能であることを証明した。このように、冬眠調節因子としてのHPの役割は次第に明らかになってきたものの、低体温下における細胞・器官に対するHPの役割は依然不明な状態が続いていた。最近になり、シマリスの繁殖特性が明らかになり、飼育下で交配が計画的にできるようになったことで、シマリス胎児脳の培養神経細胞を用いたHPの機能評価の道筋が見えてきた。本研究では、これまで明らかにされていなかった脳内HPの機能探索に向け、シマリスの計画的な交配システムと神経幹細胞培養系の確立を目的とする。

## 2. 研究の目的

### (1) シマリスの効率的な交配システムの確立

シマリスは既存のモデル動物と異なり安定的な繁殖系が確立していないため、近年の生物学で頻りに用いられるような遺伝学的な手法や、培養系を始めとした分子生物学的な手法を用いた解析アプローチは困難であるとされてきた。そのような中、われわれは、シマリスの繁殖期特有に発せられる鳴き声が、交尾受け入れのシグナルである可能性を見出した。そこで本研究では、シマリス神経培養系の作成のための胎児の安定供給を目指した効率的な繁殖手法の確立を目的として、はじめに、シマリスの冬眠モニタリング環境である $5^{\circ}\text{C}$ ・恒暗条件下における雌の発情周期を外部生殖器モニタリングにより明らかにし、発情鳴きに合わせた交尾および妊娠の成否を評価した。次に、繁殖の効率化を図るため、供試個体を自然日長環境下で飼育し、繁殖サイクルを同期化させた。

### (2) シマリス神経細胞の培養系の確立

シマリスの冬眠は冬眠特異的タンパク質(HP)によって概年的に調節されていることが明らかとなっている。HPは冬眠期に血中から脳に移行することで冬眠誘導を引き起

こすことが明らかとなっているが、脳内における機能については未解明な部分が多い。HPの冬眠における機能解明のためには、脳内のどのような部位、細胞で働き、そこで機能を持つのかを明らかにすることが重要である。そこで本研究では、細胞レベルでの冬眠研究を可能にすることを旨とし、シマリスの神経細胞、グリア細胞の培養系を確立することを目的とした。初代培養細胞を用いるためには妊娠動物の通年安定供給が欠かせない。現在のところ実験室でのシマリスの交配には成功したものの、年一回のペースでしかない。そこで初代培養細胞ではなく、神経幹細胞を調整し、大量に増殖させた後、凍結保存して必要時に実験を行う戦略を立てた。得られた神経幹細胞からの分化誘導法も確立させ、成熟した神経細胞、グリア細胞を作成する。これらの細胞を用い、低温耐性獲得の分子メカニズムを解明する実験系の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) シマリスの効率的な交配系の確立

#### 供試動物

2か月齢のチョウセンシマリス *Tamias sibiricus* を、6か月以上 $23^{\circ}\text{C}$ 、12L12Dで飼育し、実験室環境に順化させた。飼育に際しては、 $25\text{cm} \times 30\text{cm} \times 40\text{cm}$ のラットケージが使用され、餌として標準的なネズミ用飼料が水とともに ad lib. で与えられた。以下に示す冬眠様式のスクリーニングは $5^{\circ}\text{C}$ ・恒暗条件下の実験室で、交配実験は $5^{\circ}\text{C}$ ・恒暗条件および、日長と温度が自然光と外気温によって調整される実験室で実施された。

#### 冬眠様式のスクリーニング

シマリスには、同種内に冬眠を生涯行わない非冬眠型の多型(以下、非冬眠タイプ)が存在することが明らかとなっている。非冬眠タイプ由来の培養細胞は、冬眠機能を有していない可能性もあり、培養細胞を用いた in vitro での評価においてノイズを発生させることも考えられる。そのため、交配を行う親個体は、雌雄ともに冬眠タイプであることが望ましい。これまでの取り組みで、 $5^{\circ}\text{C}$ ・恒暗条件下における260日間のモニタリングを通して、シマリスの冬眠様式の判別が可能であることが明らかとなっている。本研究では、この基準に従い冬眠タイプのシマリスをスクリーニングし、以降の実験に用いた。

#### 発情状態のモニタリング

シマリスの発情特性を明らかにし、計画的な交配を行うために、雌個体の発情プロセスおよび発情周期のモニタリングが行われた。外部生殖器の形態を、非発情、肥大、充血、膣開口の4ステージに区分し、3日毎に外部生殖器を観察することにより、シマリスの発情プロセスおよび発情周期を把握した。さらに、シマリスは繁殖期特異的な発情鳴きを行

うため、発情鳴きの有無が毎日記録された。

#### 交配実験

交配実験は、発情鳴きを示した雌に併せて、睾丸が発達している雄を複数頭選出し、同じケージに雌雄1頭ずつ、20分間同所させることで行われた。交配実験中の行動は、ビデオカメラで記録し、最も頻繁に交尾行動を示した雄が選出され、その後24時間にわたり同所させた。さらに、発情鳴きがシマリスの交配に重要な役割を果たしている可能性があったため、発情鳴き期間と非発情鳴き期間における交尾回数が記録された。

#### (2) シマリス培養細胞の作出

##### 初代培養

妊娠シマリス(妊娠23-28日:シマリスの妊娠期間は約30日)を安楽死後、子宮を取り出し、胎子を顕微鏡下で解剖した。続いて、脳を取り出し、大脳皮質を切り分けた。メスで細断した組織をPBSで洗浄後、パパイイン・DNaseIで15分×2回、37℃で酵素処理した。ピペッティングにより細胞を分散させた後、細胞数を計測した。神経細胞の培養の場合は、あらかじめpoly-d-lysineでコーティングした培養プレートに細胞を播種し、37℃のCO2インキュベータで培養した。培地は、最初の16時間を10%FBSを含むDMEMを用い、その後N2 supplementを含む無血清DMEMに交換して培養した。グリア細胞の場合はコーティングしていない培養用フラスコに10%CSを含むDMEMで培養した。

##### 神経幹細胞

神経幹細胞のneurosphereは、初代培養と同様の手順で大脳皮質の組織から調整した。酵素処理をして分散後、非接着性培養プレート、あるいはフラスコで培養を行った。数日後に顕微鏡でsphereの形成を確認し、sphereが一定の大きさになったところで、遠心で集め、TrypI Selectで分散し、新たなプレート/フラスコに移しsphereの形成を待った。このパッセージ操作を数回繰り返し、大量の細胞を作成し、凍結保存した。実験に用いる細胞はコーティングした培養面に播種して分化誘導を行い、核種マーカーで免疫染色して確認した。

##### 低温培養デバイス

温度コントロールのできるCO2インキュベータは高価であり、しかも15℃程度までしか温度を低下させられないものが多い。そこでCO2透過素材とバッファーを用いた密閉式デバイスを作成して、種々の温度環境で細胞の培養を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) シマリスの効率的な交配系の確立

###### シマリスの繁殖周期

メスの繁殖周期は、一年を通して冬眠明けの

1~3ヶ月ほどしかなく、年に1度の繁殖期を持つことが明らかとなった(図1)。発情プロセスとして、外部生殖器が肥大、充血、開口し、発情鳴きが約10日間隔で認められることが明らかとなった。また、発情プロセスは、冬眠タイプと非冬眠タイプ間で差異は認められなかった。

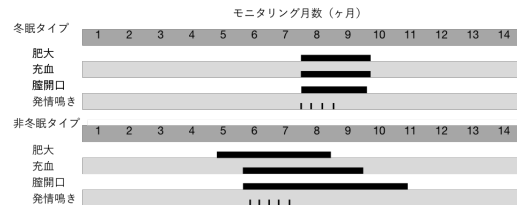


図1 シマリスの発情プロセス.

##### 発情鳴きの生殖上の意義

発情鳴きが交尾行動に及ぼす影響を調べるため、発情鳴きしている期間と、発情鳴きをしていない期間における交尾回数を調べた。発情鳴き期間において頻繁な交尾行動が誘発されており、発情鳴きをしていない期間と比べて、交尾回数に有意差が認められた(図2)。

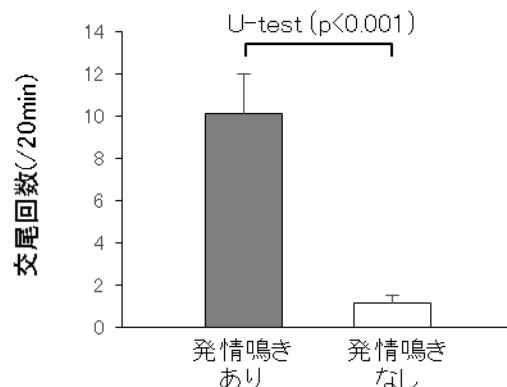


図2 発情鳴きの有無と交尾回数の関係.

##### 自然日長下における発情の同期化

5・恒暗条件下においては、発情率が90%であるものの、その後の交尾率および妊娠率はそれぞれ70%および30%と低下した。低下を引き起こした原因として、恒常条件下での飼育により繁殖サイクルのフリーランが生じ、供試個体の発情周期を同期化できないことが考えられた。そこで、発情の同期化を図るために、自然日長条件に供試個体を曝露し、交配実験を実施した。結果として、当該環境下ではメスの発情率が著しく低く30%であったが、交尾・妊娠成功率は著しく高く、すべての発情雌で交尾行動が認められた。

##### 胎児採材のための妊娠メスの作出

本研究の目的であるシマリスの胎児の作出については、ここまでの結果をもとにした交配系によって行われた。自然日長条件下において、メスの発情鳴きに合わせたオスとの交配を行うことで、シマリスの妊娠メスを作

出すことに成功し、以下の培養実験に胎児を提供できた。

#### まとめ

本研究において、発情モニタリングにより、メスの発情鳴きが交尾受け入れのシグナルとなっており、外部生殖器の形態の変化を発情の前触れとし、発情鳴きを指標に交配を行うことで、シマリスの計画的な交配が可能であることが示された。また、5・恒暗条件下では発情率が高いものの交尾成功率が低かった一方で、自然日長条件下においては、それぞれ逆の傾向を示した。自然日長下において発情率が下がった原因としては、シマリスの警戒心が高まったことが影響していると考えられた。発情鳴きのモニタリングの最中に飼育室に入室すると発情鳴きをしなくなるのが頻りに観測された。自然日長条件は明環境であることから、暗環境よりも他個体の存在やモニタリングを行う人間を察知しやすいと推察される。明環境においても、発情鳴きをしている個体を特定できる観察システムを確立することで、当該環境下における効率的な繁殖が可能になると考えられる。本研究において、シマリスの効率的な繁殖系には、課題が残るものの、シマリスの胎児を実験室下で得ることができる繁殖系を作り出すことに成功した。今後は、繁殖手法をより洗練させ繁殖成績を向上させるとともに、得られた胎児を用いることにより、in vitroでの冬眠研究の展開が期待できる。

#### (2) シマリス培養細胞の作出

##### 初代培養

シマリス脳の細胞の培養系を確立することに成功した。神経細胞及び代表的なグリア細胞であるアストロサイト、及びミクログリアの初代培養に関しては培養系を完全に樹立した。細胞種の同定は免疫組織化学法で行った。市販の抗体はリスに対する交差性に言及していないが、大部分の抗体が使用可能であることが確認でき、研究を進める上でのメリットとなった。神経細胞の同定には MAP2, NeuN などのマーカー蛋白の抗体を、アストロサイトに関しては同様に GFAP の抗体を用い免疫染色で同定した。ミクログリアは形態及び蛍光ビーズの phagocytosis で確認した。

##### 神経幹細胞

neurosphere の作成に成功し、大量の神経系 stem cell の凍結保存に至った。これにより通年で実験を行うことが可能となった。stem cell から神経細胞への分化誘導も MAP2, NeuN の神経細胞マーカーを用いて確認した。分化誘導後 7 日ほどでは神経マーカーの発現と、stem マーカーの Sox2 の発現が混在していた(図 3)。分化成熟は培養日数とともに進行し、神経細胞の培養系として使える状態になった(なお sphere 作成および分化誘導条件は試行錯誤で検討を加え、最適化したが、

論文発表前であるため非公開とする)

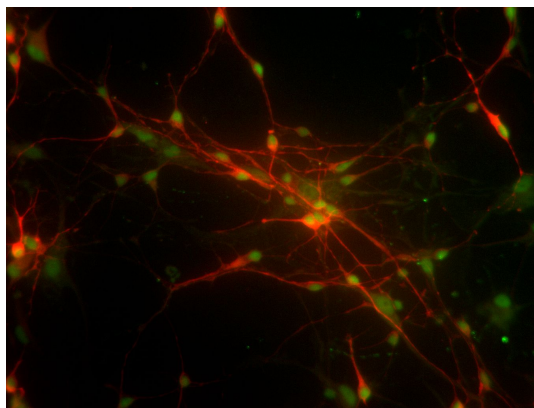


図 3 神経幹細胞から神経細胞への分化誘導。

##### 低温培養デバイス

シマリス由来細胞の低温耐性を調べるための培養デバイスを作成した。このデバイスにより、CO<sub>2</sub> インキュベーター無しでも神経細胞の培養が可能となり、温度を変化させる実験が安価、容易に実施できる態勢となった。予備の実験では、シマリス神経細胞は、少なくとも 20 で 24 時間の培養では生存率に変化が無いことを確認している。これにより、冬眠誘導物質の添加と組み合わせた低温耐性の実験が可能となった。

##### まとめ

本研究によってシマリス脳細胞の培養系を確立することができ、細胞レベルでの冬眠誘導物質の探索やその作用機序の研究が可能となった。特に神経幹細胞の培養系の確立は、妊娠動物の安定供給が難しい冬眠動物の研究では欠かせない手法である。シマリス由来の iPS 細胞の樹立も検討しているが、一概に iPS 細胞のほうが優れているとも言いがたい。ヒト iPS 由来 neural stem cell を扱っている経験からも、特に神経細胞の利用と目的が特化している場合は、neurosphere 由来の stem cell の方が分化誘導がかかりやすく、未分化細胞の混入が少ない。他の臓器の細胞を比較対照とする場合は iPS 細胞も考慮にいれるが、現在は脳をターゲットとしているため、neurosphere から細胞を得る方法が優れていると考えている。また低温培養を手軽に行える手法を開発できたため、HP を始めとした冬眠誘導分子/低温耐性誘導因子の探索や機構の解明の為の実験系も樹立した。これらのツールを用い、今後研究の進展が期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Shintaro Yamada, Taito Kamata, Hiroyuki Nawa, Tsuneo Sekijima and Nobuyuki Takei.

AMPK activation, eEF2 inactivation and reduced protein synthesis in the cerebral cortex of hibernating chipmunk. *Sci. Rep.* (2018 査読中)

[学会発表](計6件)

鎌田泰斗、石庭寛子、関島恒夫  
リス科における冬眠特異的タンパク質の  
種間および種内変異の進化的背景。  
日本進化学会第19回大会, 2017年

武井延之  
シマリス神経幹細胞の維持と分化。  
第一回冬眠休眠研究会, 2017年

鎌田泰斗  
冬眠特異的タンパク - PH - の種間および  
種内比較に基づく冬眠進化プロセスの解  
明。  
第一回冬眠休眠研究会, 2017年

山田新太郎  
冬眠期のシマリス神経細胞における AMPK  
を上流とした翻訳の抑制。  
第一回冬眠休眠研究会, 2017年

山田新太郎、関島恒夫、那波宏之、武井  
延之  
冬眠期のシマリス神経細胞における AMPK  
を上流とした翻訳の抑制。  
第59回日本神経化学学会大会, 2016年

鎌田泰斗、山田新太郎、近藤宣昭、関島  
恒夫  
Intra-specific variation of  
hibernation style in Siberian chipmunk,  
*Tamias sibiricus* .  
The 64th NIBB Conference “ Evolution of  
Seasonal Timers ” , 2016年 (国際学会)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関島 恒夫 (SEKIJIMA Tsuneo)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号: 10300964

### (2) 研究分担者

武井 延之 (TAKEI Nobuyuki)  
新潟大学・脳研究所・准教授  
研究者番号: 70221372