

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K06347
研究課題名(和文) 脳機能イメージングによる能動的低代謝の原理解明

研究課題名(英文) Functional MRI Brain imaging in Torpid Mice

研究代表者

砂川 玄志郎 (Genshiro, Sunagawa)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：70710250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトはマウスの能動的低代謝である休眠をMRI内で誘導しマウス休眠における脳の局所的活動ダイナミクスを観察することが目的である。冬眠動物を含め脳の機能的MRIが休眠状態で撮影されたことはなく、様々な臨床応用が期待されている休眠現象の原理解明に大きく貢献することが期待されたプロジェクトであった。しかし、MRI内で休眠を誘導することに難渋したが、2020年度に発表したQIHによってMRIと同様な狭い空間で安定的に休眠を誘導できることに目処がついた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あ休眠現象は組織の酸素需要を低下させることで動物の個体としての代謝が低下した状態である。臨床における重症状態は原則的に末梢組織の酸素需要が満たされないことに起因するため、休眠を患者に誘導することで今では助からない患者が多く救命できる可能性がある。休眠動物の機能的MRIを観察することで休眠の原理解明に近づくだけでなく、中枢神経系における休眠中の代謝ダイナミクスを観察できる。本計画年限ではMRI撮像にまでは至らなかったが、動物をMRI内で休眠させられる目処はついた。

研究成果の概要(英文)：This project aims to observe the local dynamics of the brain during torpor. Torpor is induced by 24-hour fasting of mice. The brain of any torpid animals, including hibernators, have not been reported to be evaluated under functional MRI. Active hypometabolism of torpor is promising for harmful high-metabolism conditions in medicine. We experienced difficulty inducing torpor in the MRI; however, we have nearly overcome the issue by developing QIH, an inducible hibernation-like condition in mice.

研究分野：生理学、救急医学

キーワード：休眠 冬眠 能動的低代謝 機能的MRI 非侵襲代謝評価 マウス

1. 研究開始当初の背景

能動的低代謝とは全身の代謝を積極的に低下させ省エネ状態に入る現象で、一部の哺乳類が冬期や飢餓などの危機的状況を切り抜けるための生存戦略だと考えられている。継続時間によって冬眠 (hibernation; 数週間) や日内休眠 (daily torpor; 数時間) と呼ばれるが、能動的低代謝を起こしている動物の体温は恒温動物であるのにも関わらず外気温よりも数 高い程度 (0~30) にまで低下する。応募者は 2016 年にマウスの休眠を再現よく誘導する技術を打ち立てた (Sunagawa and Takahashi, *Sci. Rep.*, 2016.)。興味深いことに、このような能動的低代謝をきたしている動物は脳波が平坦になりながらも (Daan S et al., *Neurosci Lett*, 1991) 全身の代謝は能動的に制御されている (Ortmann S and Heldmaier G., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000) 。はたして冬眠・休眠動物は中枢神経の代謝が著しく低下した状態でどのように全身の代謝を制御しているのだろうか？

この問いに答えるためには、能動的低代謝に至る過程で脳の神経活動が時空間的にどのようなダイナミクスで変化しているのか捉える必要がある。すなわち、脳のどのような部位が、どのような順序で、どのような相互関係を持ちながら代謝が低下していくのか明らかにする必要がある。そこで、本課題ではマウスの脳活動を機能的MRIで可視化しながら個体を低代謝状態に誘導し、全身代謝と脳がどのようなダイナミクスで関係しているか明らかにする。機能的MRIは非侵襲に脳内の活動を空間的かつ経時的に把握することができるため、脳内の神経活動ネットワークを可視化するための強力なツールである。他の手法として、脳が作り出す微弱な電流である脳波を検出することで、脳活動をモニターする方法があるが、侵襲性が高く脳深部の活動を見ることは技術的に難しい。一方で本課題ではMRIの撮像だけではなく、動物の個体としての代謝状態を同時に評価する必要がある。MRIの仕組み上、装置内に金属を含むセンサーを設置することは難しい。そこで、応募者が開発したマウスの呼吸パターンを非接触に測定する装置を発展させ (Sunagawa GA et al., *Cell Rep.*, 2016; Tatsuki F, Sunagawa GA et al., *Neuron*, 2016.)、MRI内でも使用できる金属部品を含まない代謝測定装置を開発する。すでに、予備実験において同装置を用いて休眠状態を検出することに成功しており実現性は高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は正常の代謝状態から低代謝状態に個体代謝が遷移する間に脳における神経活動の変化を時空間的に明らかにすることである。前述した技術的な障壁によって、冬眠動物も含め、能動的低代謝を呈する動物の脳の機能的イメージングはいまだかつて報告がない。このため、本研究によって恒温動物である哺乳類が一過性に恒温性を失うメカニズムを包括的な脳機能評価からアプローチするという新しい知見を得ることが期待される。

特定の脳部位あるいは脳部位のネットワークが能動的低代謝と関連が強いことが明らかになれば、マウスの脳の任意の部位を薬剤などで障害させた上で、休眠の表現型を観察することで、因果を証明することも可能である。また、その部位のトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を行うことで、いまだ明らかになっていない能動的低代謝の制御機構の担い手である分子を同定できる可能性がある。さらに、本課題と同じ実験セットアップで全身の機能的MRIの解析が可能であり、能動的低代謝による臓器別の経時的代謝変化を評価しうる。脳における脳部位間ネットワークは1個体の代謝制御という観点では重要であるが、臓器毎に様々な代謝が存在することが知られており、本課題の次のステップとして末梢組織の代謝状況を1個体の中で包括的

に評価し、どの臓器がどのような順番で代謝を制御されているのか把握することの意義は大きい。

3. 研究の方法

目標1 休眠を誘導しながら機能的MRIを測定する

MRIを撮像しながらマウスに休眠を誘導するためには2つの問題点が存在する。1点目はマウスの休眠誘導には静かな環境が必要だがMRIは大きな騒音を生む点である。2点目はMRIの撮影は対象部位の不動が要求されるが代謝に影響を及ぼすという理由で麻酔による不動化が使えない点である。まず、騒音に対しては次の2つの方法で対策を講じる。1つ目は睡眠研究で用いられるように、騒音下でマウスを飼育し騒音環境に馴致させる方法を用いる。2つ目は内耳有毛細胞のシグナル伝達に関係する*Tmc1*遺伝子などを欠失させたマウスのような先天性難聴マウスを用いる方法である。次に無麻酔の不動化に関しては、専用の頭部固定具の開発とトレーニングにより解決を試みる。呼吸測定のための密閉装置内に頭部固定具を設置し、この装置内で休眠誘導の訓練を行い実験に用いる個体を選抜する。

目標2 MRI装置内で全身の代謝を測定する

動物の肺換気量は酸素消費量と比例することが知られており、換気量を反映する呼吸パターンから酸素消費量を推定することは現実的である。ただし、呼吸パターンの個体差が予想されるため、個体ごとに呼吸パターンから酸素消費量を機械学習で推定する。具体的にはMRIで測定を行う前に、被験個体ごとに一定期間の呼吸パターンと酸素消費量を同時測定し呼吸パターンから酸素消費量を推定するため数理モデルを構築しておく。各動物で個別のモデルを用いることで、実際にMRIで撮像中の酸素消費量を呼吸パターンから推定する。

目標3 低代謝に至る脳活動ダイナミクスを明らかにする

目標1と2を達成することで、MRIでマウスの休眠を誘導しながら、個体の酸素消費量を定量することが可能となる。研究分担者の佐々木は動物を用いた脳機能イメージングの専門家であり（Kobayashi K, Sasaki T et al., *J Immunol Res*, 2015）、機能的MRIの記録及び解析を担当する。インビボイメージング技術の利点を生かし、休眠導入時、休眠時、覚醒時における数時間単位の脳血流（酸素消費）の動的な変化を非休眠時をリファレンスとして可視化する。具体的には、脳部位ごとの血流および個体の脳血流の経時変化を比較することで、脳のどのような部位が、どのような順序で、どのような相互関係を持ちながら代謝が低下していくのか評価し、異なる個体でも共通する重要な脳部位あるいは脳部位群の特定を試みる。

4. 研究成果

本研究の最大の目標であった休眠状態のマウスの機能的MRIを撮影するには至らなかった。原因としてはMRIを取るための狭い空間においてマウスが絶食誘導性休眠に至らなかった点にある。しかし、目標1の最大の障壁ともいえる狭いMRI撮影用の空間の中でマウスを保定した状態で休眠に誘導することは、冬眠様モデルマウスの開発によって解決できたと言える（Takahashi TM, *Nature*, 2020）。この手法は任意のタイミングで休眠を誘導できるため、今後は絶食性休眠ではなく同マウスモデルを用いて、マウスの脳が休眠状態に入り回復していく過程を機能的MRIで観察していく予定である。また、目標2では機械学習を用いて呼吸圧波形から代謝（酸素消費量）を推定することを試みたが、十分な精度が現時点で得られていない。今後は教師データを増やしながら高い精度で代謝を推定できることを目指す。目標3に関しては対照実験となる全身麻酔下のマウスの脳の機能的MRIを撮影するにとどまった。今後、休眠マウスの脳機能的MRIを

撮影し、全身麻酔を導入したマウスとの相違点を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 砂川 玄志郎	4. 巻 13
2. 論文標題 睡眠と冬眠と代謝	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 睡眠医療	6. 最初と最後の頁 137-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa
2. 発表標題 冬眠のひみつ
3. 学会等名 文部科学省 新学術領域研究「温度生物学」市民公開講座
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa
2. 発表標題 マウスを用いた人工冬眠の研究
3. 学会等名 第63回 宇宙科学技術連合講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa
2. 発表標題 Daily torpor in mice as a model of active hypometabolism in mammals
3. 学会等名 NEURO2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa
2. 発表標題 冬眠の臨床応用に向けて：能動的低代謝を体温管理療法に応用できるか？
3. 学会等名 第22回日本脳低温療法・体温管理学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Genshiro A Sunagawa
2. 発表標題 Physiological Phenotyping by Non-invasive Respiratory Recordings
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 冬眠様状態を誘発する方法およびそのための装置	発明者 櫻井武、高橋徹、砂川玄志郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-178611	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐々木 崇了 (Sasaki Takanori) (10461253)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------