

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04046

研究課題名(和文) 冬眠モデル哺乳類シリアンハムスターの骨格筋可塑的リモデリング機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of skeletal muscle remodeling for hibernation in a mammalian hibernator Syrian hamster

研究代表者

山口 良文 (YAMAGUCHI, YOSHIFUMI)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：10447443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、冬眠哺乳類シリアンハムスターが、冬眠に適した体へと全身を作り替える過程で生じる骨格筋変化を明らかにした。具体的には、1)シリアンハムスターは非冬眠期から冬眠期にかけて骨格筋量を減少させるが、冬眠期の不動状態の間は骨格筋量を維持することを同定した、2)冬眠期のふるえ熱産生に働く広背筋における筋繊維の分布と、その冬眠における変化の詳細を明らかにした、3)遺伝子発現プロファイルから冬眠期骨格筋の性質規定に関わると予想される候補遺伝子群を抽出しその機能解析の準備を行った。これらの知見は冬眠哺乳類の筋萎縮耐性機構に迫る礎となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになった広背筋の質・量と筋繊維組成の変化は、シリアンハムスターの骨格筋で生じる冬眠に適した状態への変化を定量的に記載する礎となる。この礎ができたことにより、今後さまざまな遺伝子機能操作を行なった際の効果判定が容易となり、「冬眠能の可塑的リモデリング」機構に迫れるようになる。これにより、通常冬眠不能状態にあるヒトなどの非冬眠動物に対しても、冬眠能を構成する性質を部分的にでも誘導し活用することで、寝たきり等による筋萎縮を防止する方策の立案につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified the skeletal muscle changes that occur in the process of remodeling the whole body into a body suitable for hibernation in a mammalian hibernator Syrian hamster. Specifically, we identified that Syrian hamsters reduce skeletal muscle mass during the pre-hibernation period, but maintain skeletal muscle mass during hibernation period. We then described the distribution of muscle fiber types in the back muscle that acts on shivering thermogenesis, and its changes during the body remodeling. We also set-up functional analysis of candidate genes that were identified as those assumed to be involved in the remodeling of skeletal muscles. These findings provide the basis for approaching mechanisms of the muscular atrophy tolerance in mammalian hibernators.

研究分野：冬眠

キーワード：冬眠 骨格筋 生理学

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の冬眠は、全身性の能動的な代謝抑制により低温・乾燥・飢餓といった極限環境下での長期生存を可能とする生存戦略である。ヒトやマウスなど多くの哺乳類は長時間の低体温下では臓器機能を保持できず死に至る一方で、一部の哺乳類は10度以下の低体温にも耐え長期間の冬眠を行うことができる冬眠動物である。この冬眠を可能とする「冬眠能」は細胞レベル・組織レベル・全身統合レベルの様々な段階で形成されると想定される。こうした冬眠能を構成する性質は、細胞レベルで先天的に備わるものから、通年発揮されるのではなく季節特異的に発揮される可塑性を示すものまで、どちらも存在することが先行研究から示唆される。季節特異的に発揮される冬眠能とはすなわち、冬眠する哺乳類も非冬眠期(夏)は「冬眠不能」状態にあり、短日寒冷刺激が入る前冬眠期(秋)から冬眠期(冬)にかけて「冬眠可能状態」が誘導され、後冬眠期(春)の訪れとともに冬眠能は解消される、ということである。この「冬眠能の可塑的リモデリング」という事実は、通常冬眠不能状態にあるヒトなどの非冬眠動物に対しても、冬眠能を構成する性質を部分的にでも誘導し活用できる可能性を示唆する。本研究では、冬眠する哺乳類が、冬季の長期間巣穴の中で飢餓・不動状態で過ごすにも関わらず骨格筋が萎縮しない、筋萎縮耐性機構(寝たきり耐性)に着目する。

## 2. 研究の目的

本研究では巣穴の中で飢餓・不動状態で過ごすにも関わらず骨格筋が萎縮しない筋萎縮耐性機構(寝たきり耐性)という興味深い性質に着目し、実験室での冬眠研究に数多くの利点を有するシリアンハムスターを冬眠モデル哺乳類として「冬眠動物が冬眠に伴う長期間の不動状態に適した骨格筋を作り出し維持する機構」を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

シリアンハムスターはジリスやクマなど多くの冬眠動物と異なり、短日・寒冷環境に長期間曝露することで外界の季節に関わらず数ヶ月の冬眠が誘導可能であり、通年での冬眠研究が可能である。また飼育業者(日本 SLC)のクローズドコロニーからの安定的供給が可能のため、研究室での飼育繁殖に適し、冬眠への遺伝的影響と生育環境の影響の弁別が可能となる。私たちはこれまでに、個体生育環境と短日・低温誘導環境を厳密に整え、シリアンハムスターの冬眠を安定かつ効率的(80%以上)に誘導する系を確立し、冬眠誘導には体重の閾値があり、冬眠導入までの期間には体重と正の相関があることを見出していた(R.Soc.Open Sci. 2016)。そこで本研究では、まずこの長期間の短日・寒冷曝露を行う前冬眠期から冬眠期にかけて、骨格筋組織がどのように変化するのか、同一個体での非侵襲的観察および遺伝子発現・組織学的解析を行い、明らかにする。非侵襲的観察は、小型動物用MRIにイソフルラン麻酔下の動物を導入しておこなった。経時変化をとらえるため、長日・温暖条件で飼育下の動物をまず観察し、その後、動物を短日・寒冷曝露条件下に移して飼育を継続し、1ヶ月おきに麻酔して観察を繰り返した。今回の検討で、この処理を行っても動物は冬眠を無事行うことがわかった。観察は、数ヶ月の冬眠ののち動物が冬眠を脱して1ヶ月後まで継続した。動物組織のサンプリングは、麻酔下で sacrifice した動物から行った。広背筋および脚部骨格筋組織は、OCT compound に包埋し凍結切片を作成したのち、各種抗体を用いた免疫組織化学染色に供した。染色した切片は CCD カメラ付属の蛍光顕微鏡により画像として取得し、ImageJ を用いて断面積等の定量をおこなった。RNAseq 解析には骨格筋組織から抽出した totalRNA を用いた。冬眠期に大幅発現変動する遺伝子として同定された遺伝子群の非冬眠動物マウスへの導入は、脚部骨格筋への電気穿孔法および培養細胞株 C2C12 での安定発現細胞株取得によりおこなった。

## 4. 研究成果

### A) 全冬眠期間を通じての骨格筋量の変遷の確認

私たちの先行研究で、シリアンハムスターは非冬眠期から冬眠期にかけて広背筋および脚部の骨格筋量を減少させ、後冬眠期に回復させることが、組織解剖による重量測定により明らかとなっていた。この傾向が全身レベルで同一個体で観察されるのか、小型動物用MRIを用いて同一ハムスター個体で冬眠前から冬眠期に渡る骨格筋量を経時的に観察し検証した。その結果、同様の傾向が観察された。またこの経時観察から、非冬眠期に比べて約4割程度減少する冬眠期の骨格筋

量は、前冬眠期すなわち冬眠開始前に減少しており、不動状態が続く冬眠期の間はその量は維持され、冬眠から脱する後冬眠期になると劇的に回復することも明らかとなった。

## B) 広背筋の筋繊維分布と遺伝子発現プロファイルの同定

A の解析から、冬眠期には全身レベルで骨格筋量が減少することが示唆された。本研究では、骨格筋研究によく用いられる脚部骨格筋だけでなく、広背筋にも着目した。実際に解剖の際の観察から、冬眠期の広背筋は非冬眠期に比べ大幅に萎縮している様子が見てとれる。また冬眠の際の低体温状態から、中途覚醒し 37°C へと体温を戻す際には、全身を震わせるふるえ熱産生が非常に亢進する。この際によくふるえている様子が観察されるのが広背筋である。しかし、シリアンハムスターのみならず齧歯類において広背筋を調べた研究は非常に少なく、その筋繊維構成や遺伝子発現に関する知見も乏しい。そこで本研究では、広背筋の筋繊維組成とその分布について免疫組織化学染色により詳細に検討した。広背筋の切片を作成する際の条件検討から行い、広背筋内において筋繊維数と断面積を測定する手法を確立した。筋繊維特異的ミオシン重鎖に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の結果、速筋繊維 TypeIIb は広背筋内で偏った形で分布しており、これが冬眠期には極端に減少し、後冬眠期には再び増加に転じる様子が確認された。またこれら筋繊維一本一本の断面積は、冬眠期には非冬眠期に比べ減少することが明らかとなった。このように、冬眠開始前の骨格筋量の減少は、骨格筋繊維レベルで生じることが確認された。

## C) 骨格筋可塑的リモデリング因子の探索

シリアンハムスターが冬眠期に向けて骨格筋をリモデリングする機構の同定に向け、これまでに取得した遺伝子発現プロファイルから、冬眠期にかけて変化する遺伝子発現および転写因子の遺伝子発現調節活性の探索を行ない、候補遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子機能の探索のため、マウス C2C12 細胞株での過剰発現、冬眠哺乳類からの筋幹細胞の単離・培養系の樹立に向けた条件検討、および、シリアンハムスターおよび非冬眠動物マウスの脚部骨格筋への電気穿孔法による遺伝子導入条件の検討を行なった。C2C12 については、候補遺伝子 3 つについて、薬剤依存的過剰発現が可能な細胞株を樹立した。その効果の検証を筋分化・筋萎縮耐性について着目し解析を行なうところで研究期間が終了した。冬眠哺乳類からの筋幹細胞の単離・培養については、間葉系細胞は樹立できたが幹細胞の性質判定についてはこれからの状況である。最後に、個体での電気穿孔法による導入については、一部筋繊維への導入は可能であったが、遺伝子導入の効果判定のためにはさらなる条件検討が必要と判断した。以上より、一連の検討をおこなった今回の解析では不動状態下での骨格筋維持に関わる遺伝子の同定には至らなかった。今後引き続き、遺伝子機能評価による骨格筋可塑的リモデリング因子の同定に挑みたい。実験手法と手技の問題点と改善点は明らかになっているので、これらの改良により、目的が達成できると見込んでいる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山口良文	4. 巻 38(6)
2. 論文標題 哺乳類の冬眠の基礎知識～なぜいま、冬眠研究か？	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 970-973
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 -
1. 著者名 山口良文	4. 巻 38(6)
2. 論文標題 冬眠・休眠のバイオロジ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 970
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 -
1. 著者名 山口良文	4. 巻 43(3)
2. 論文標題 哺乳類の冬眠～低代謝と低体温による生存戦略	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 35-39
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 有
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 -
1. 著者名 Anegawa Daisuke, Sugiura Yuki, Matsuoka Yuta, Sone Masamitsu, Shichiri Mototada, Otsuka Reo, Ishida Noriko, Yamada Ken-ichi, Suematsu Makoto, Miura Masayuki, Yamaguchi Yoshifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived $\alpha$ -tocopherol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02297-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類冬眠動物の細胞が有する低温耐性
3. 学会等名 千里ライフサイエンスシンポジウム 細胞死研究の新展開（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamaguchi Y
2. 発表標題 Hibernator's hepatic cold resistance requires a diet-derived nutrient.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 冬眠する哺乳類が示す低温誘導性細胞死への耐性
3. 学会等名 第一回細胞死コロキウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類の冬眠の謎に挑む
3. 学会等名 第60回生命科学夏の学校（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類の冬眠を可能とする「冬眠能」の構成因子:低温耐性の観点から
3. 学会等名 第20回抗加齢医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 冬眠する哺乳類シリアンハムスターに学ぶ、冬眠するための体とは
3. 学会等名 日本低温生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 冬眠を可能とする長期寒冷下での全身可逆的リモデリング
3. 学会等名 日本生化学会北海道支部会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 冬眠する哺乳類シリアンハムスターが示す環境応答と低温細胞死耐性
3. 学会等名 日本Cell Death学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 小型冬眠動物が有する低体温耐性機構と季節性の体の变化
3. 学会等名 日本獣医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類の冬眠における体温変化様式
3. 学会等名 数理生物学学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類の冬眠を可能とする低温耐性
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類の冬眠の分子制御機構解明にむけたアプローチ
3. 学会等名 定量生物学の会 札幌キャラバン（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 哺乳類の冬眠に備えた全身代謝共役変化～シリアンハムスターからのアプローチ
3. 学会等名 群馬大学生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口良文
2. 発表標題 冬眠する哺乳類シリアンハムスターが示す低温耐性
3. 学会等名 日本生理学会（誌上開催に変更）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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