

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：82645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07904

研究課題名(和文)筋萎縮を防ぐー冬眠のメカニズムから学ぶー

研究課題名(英文)Prevent muscle atrophy-learning from the mechanism of hibernation-

研究代表者

石岡 憲昭(Ishioka, Noriaki)

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所・名誉教授

研究者番号：70184471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：冬眠中に筋萎縮や骨量減少を起こさないことに着目して、本来冬眠しないマウスを用いて、人工的に冬眠様睡眠を誘導させることで人工的に体温を低下させ、低温下でのタンパク質やミネラル成分の動態を網羅的に比較解析した。薬剤(アデノシン1リン酸)の連続投与群のマウスは、明らかな継続的体温低下を示した。明らかにマウスの低体温を誘導し、活動量減少に伴う筋肉の変化に対して抑制的に作用する可能性を示唆するとともに、UPLCや二次元電気泳動の分析結果は、筋肉の変化に対応する分子動態の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、老化に伴い自立して歩行できない高齢者や運動不足により筋力の衰えや骨量減少が認められる社会人が多い。本研究の成果は、地上において骨格筋の萎縮や変性、骨量減少に対する対抗措置を検討する基礎資料を提供し、ヒトを用いた臨床的な研究や創薬へと発展する可能性が期待される。また宇宙開発や火星飛行、将来の惑星間飛行における人工冬眠技術への応用だけでなく、抗老化や創薬等における革新的医療技術の開発への道を拓く可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the fact that hibernation does not cause muscle atrophy or bone loss, we investigated the drug-induced artificial hibernation in mice that do not hibernate by nature. A comprehensive and comparative analysis of the dynamics of protein and mineral components in blood, skeletal muscle, and skin under hypothermia were performed. Mice in the continuous drug (adenosine monophosphate) administration group were clearly induced continuous hypothermia. Results of high-performance liquid chromatography, two-dimensional electrophoresis, and mineral analysis suggested the presence of molecular mechanisms corresponding to muscle changes and possible suppressive effects on muscle changes associated with reduced muscle activity.

研究分野：宇宙生命科学、宇宙微生物学、冬眠と老化

キーワード：人工冬眠 低体温飼育 タンパク質発現 超高速液体クロマトグラフィー 二次元電気泳動 誘導結合
プラズマ質量分析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 冬眠動物の骨格筋について分子レベルで研究した先行研究は、これまでに2報告が認められるだけである。コウモリの冬眠前後で分析を行い、冬眠後に骨格筋に萎縮が認められなかった(文献)。筋萎縮の抑制には熱ショックタンパク質 70 (HSP70) が関係しているとの報告がある(文献)。我々の先行研究では宇宙飛行したラットは筋萎縮を生じHSP70だけでなくHSP27、HSP84の発現量も減少していることを明らかにし(文献)、さらにラットの筋活動を抑制して骨格筋を萎縮させたところ、PGC-1 遺伝子の発現量が減少する一方で、予備的低温飼育したアフリカヤマメでは筋萎縮が観察されずPGC-1 のmRNAの増強が認められた(文献)。筋萎縮に関わる遺伝子は1種類だけ(HSP70)とは限らず、複数の遺伝子が相互に関係していると推察されるが、どのような分子で筋萎縮が抑制されるのか実験的詳細に検討されていない。さらに薬物投与による疑似冬眠の報告がなされているが(文献)、冬眠の分子メカニズムが明らかになっていない。本研究では薬物投与による人工冬眠について検討し冬眠のメカニズムを明らかにする知見を得たい。

(2) 宇宙環境に適応する際、宇宙飛行士に現れる異常な骨量の減少や筋の萎縮など様々な生体の機能変化は、老化による骨量の減少や筋力の低下などの諸症状に非常に似ている。宇宙では老化現象を加速させるとされるストレスの要因が多く存在している(文献)。しかしながら、宇宙における急激な筋萎縮などの老化様現象の分子機序は解明されておらず、長期宇宙滞在における宇宙医学の問題の一つである。一方、寿命の延長、抗老化につながる低体温導入や耐性の獲得は、宇宙開発だけでなく、各種疾患治療等々において革新的な医療技術開発への道を拓くことから、これまで様々な角度から研究がなされており、動物では低温環境下あるいは冬眠時に誘導される遺伝子やタンパク質が同定されてはいるものの(文献)、個々の分子が低温耐性において如何なる役割を果たしているのか、筋萎縮などをいかに防いでいるのかを実験的に検証した例はない。

2. 研究の目的

(1) 宇宙では微小重力(μG)によって急激な筋萎縮や骨量減少などの老化様現象が起こる(文献)。また地上の重力1G下でも寝たきりなど筋肉を使用しないことで筋萎縮(廃用性筋萎縮)が生じる。しかし、冬眠中の冬眠動物では、筋萎縮や骨量減少を起こさない。さらに老化を抑え寿命を延ばす。なぜ冬眠期間中の冬眠動物は寝たきりのような廃用性筋萎縮や骨量減少を起こさないのか?その抑制の分子機序は未だ解明されていない。この冬眠中に筋萎縮や骨量減少を起こさないことに着目して、本来冬眠しないマウスを用いて、人工的に体温を低下させ疑似冬眠の誘導を検討する。

(2) 人工低体温状態を誘導する薬剤($5'$ -AMP)を投与するマウス飼育群、活動抑制するコントロール群として低濃度麻酔薬飼育群、生理食塩水によるプラセボ群、未処理)群の4群によるマウスの人工低体温誘導比較実験により、冬眠のような低体温環境下において機能する生体の分子変化を分析し、人工冬眠技術開発のための基盤データを得ることを目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 低体温誘導実験

マウス(C57BL/6J、メス、9週齢)に薬液を投与するためのミニカプセル型浸透圧ポンプとマウス用超小型ロガー体温計を体内に埋め込み、 $5'$ -AMP、活動抑制するコントロール群として低濃度麻酔薬、プラセボとして0.9%リン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)をそれぞれ継続的投与によりマウスを8日間飼育した。温度ロガー体温記録及びのサーモグラフィーによって体表面温度を1日1回、体重とともに記録した。

(2) 血清タンパク質の逆相カラム超高速液体クロマトグラフィー(UPLC:Ultra Performance Liquid Chromatography)の分析

安楽死後に採取した血中のタンパク質を逆相カラムUPLCにより解析した。Waters社のUPLCシステムを使用して、逆相系C4カラム、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)(A)-100%アセトニトリル(B)で90%Aから100%Bの直線グラジエントで溶出、ホットダイオードアレイ検出器で検出した。

(3) 骨格筋タンパク質の2次元電気泳動分析

安楽死後に採取した下肢ヒラメ筋から抽出したタンパク質を、2次元電気泳動により分析した。1次元目をpH3~10のアガロースゲルでの等電点電気泳動、2次元目をポリアクリルアミド5%~20%のグラジエントゲルでSDS電気泳動後、銀染色法で染色しタンパク質マッピングを作成した。

(4) 体毛のミネラル成分の分析

安楽死後に体毛付き皮膚を採取し、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)(文献)により体毛のミネラル成分(文献)を分析した。

4. 研究成果

(1) 各マウスとも飼育中に体重の大きな変化は見られず(図1)、エンドポイントまで異常な行動は見られなかった。ロガー体温計およびサーモグラフィーの結果から、5'-AMP 飼育マウスおよび低濃度麻酔薬飼育マウスは、プラセボマウスと比較して体温が低下する傾向が見られたが、低濃度麻酔薬飼育マウスに比べ5'-AMP 飼育マウスがより体温低下を示した(図2)。ALZET ミニカプセル型浸透圧ポンプにより8日間継続して低体温を誘導、維持させることに成功した。

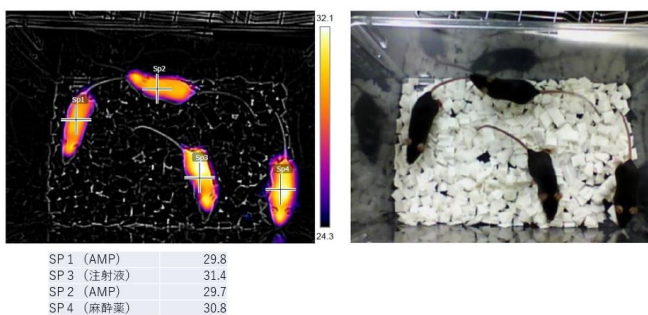


図1. 飼育中のマウスの状態
左: サーモカメラ、右: 通常カメラ

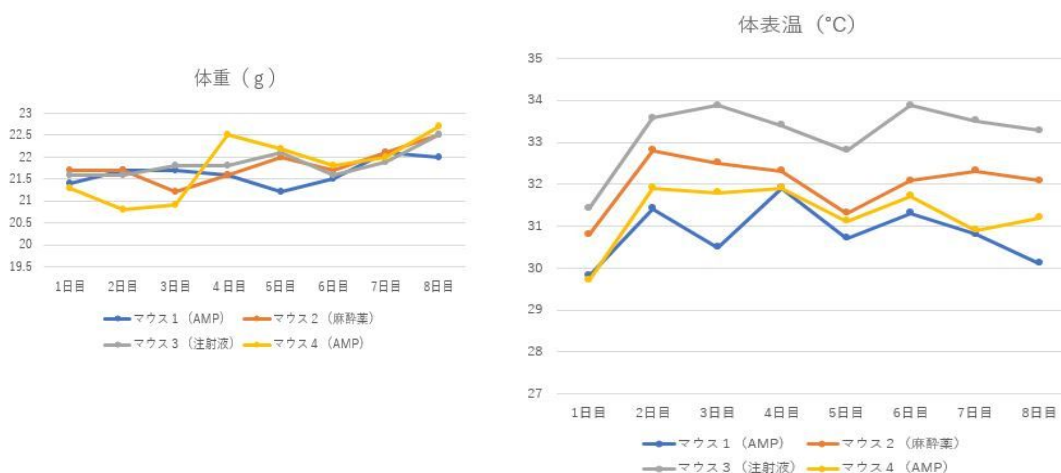


図2. 飼育中マウスの体重と体温
左: 体重、右: サーモグラフィーによる体表温
黄、青: 5'-AMP 投与、橙: 低濃度麻酔薬投与、灰: プラセボ

(2) 安楽死後に採取した血中の血清タンパク質を逆相カラム UPLC により解析したところ、各マウス間で差が見られる特異的なピークが得られた。特に5'-AMP 投与群および低濃度麻酔投与群で、プラセボ群に比べ増加するピークが観察された(図3 A, BおよびC中の2つの赤矢印)。しかしながら、増加の程度は5'-AMP 投与群が明らかに少なく、全体のピークパターンもプラセボ群に近かった。5'-AMP 投与群は麻酔薬群より低体温であったにも関わらず、麻酔薬群よりプラセボ群に類似した溶出パターンを示したことから、低体温ながら生理的な影響が少ないと考えられた。

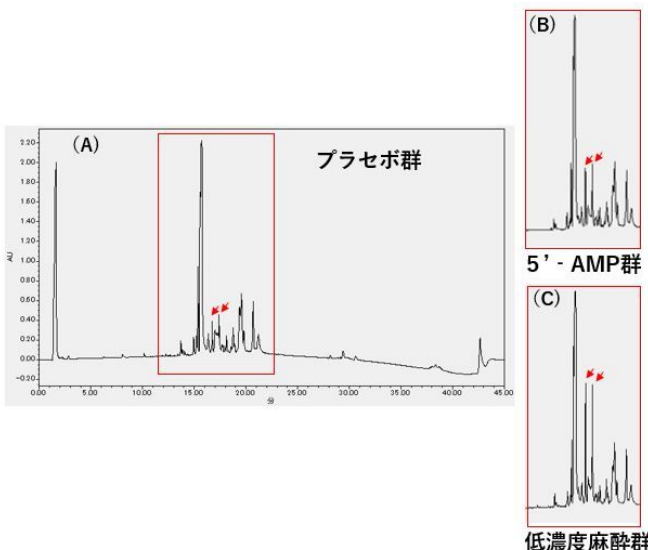


図3. 血清タンパク質のUPLC
(A): プラセボ群、(B): 5'-AMP 群、(C): 低濃度麻酔群

(3) 骨格筋タンパク質の2次元電気泳動分析の結果、プラセボ群(図4 A)と5'-AMP 投与群(図4 B)でマップを比較すると、等電点(pI)7.4~8.3、分子量(MW)29000~45000のエリア(図4 A、B中)、さらにpI4.0~4.6、MW20000~67000のエリア(図4 A、B中)のタンパク質群が5'-AMP 投与群で増加する一方、pI5.6~7.2、MW25000~67000のエリア(図4 A、B中

)のタンパク質群の減少が観察された。図4 Cは各タンパク質スポットの積み上げ面積を比較した。C中の番号はA, B中のエリア番号に対応している。積み上げ面積は、ばらつきはあるもののマップパターンの比較結果同様に、では5'-AMP投与群のタンパク質が多く、ではプラセボ群のタンパク質が多かった。5'-AMP投与で低体温になると、特に酸性、塩基性領域で特徴的なタンパク質が発現することが明らかになり、低体温下における筋肉の変化に対応する分子動態の存在が示唆された。

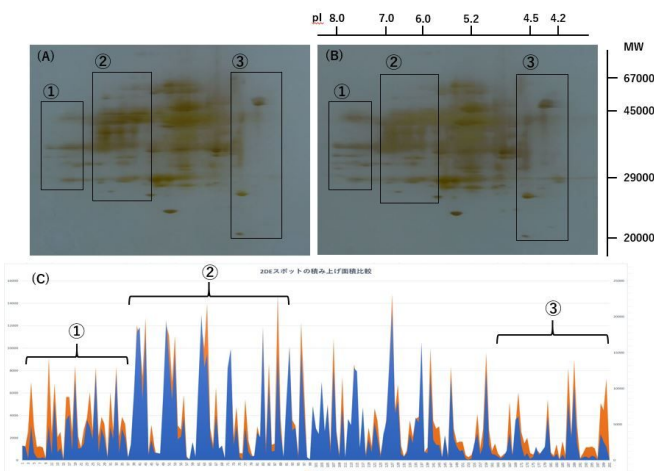


図4 . 骨格筋の2次元電気泳動によるマッピング
(A) : プラセボ群、(B) : 5'-AMP群
(C) : (A)、(B)載せ折れぞれのタンパクスポットの積み上げ面積の比較

(4) ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: 誘導結合プラズマ質量分析法)により体毛のミネラル成分を測定した結果(図5) クロム(Cr)が、プラセボ群と比較して、5'-AMP群ならびに麻酔群で減少している傾向があった。

Crが対照群と比較して、5'-AMP群ならびに麻酔群で減少している傾向があった。Crは生体にとっては必須ミネラルであり、糖代謝との関連が知られている。5'-AMP投与における低体温飼育や麻酔投与によってマウス自体の活動が減少した結果、糖代謝に影響がありCrの濃度自体も変化した可能性が考えられた。筋肉量の減少により、糖代謝異常となり、Crの濃度が変化したと考えられるが、5'-AMP投与群が低濃度麻酔投与群より低体温だったにもかかわらず、血中タンパク質の変化と同様に、低濃度麻酔投与群に比べ変化が明らかに少なかったことから、5'-AMP群では筋肉の減少が抑制されていたと考えられた。

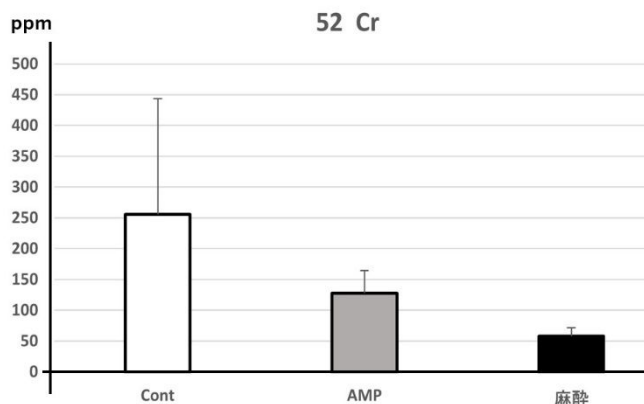


図5 . ICP-MSによる体毛のミネラル分析

以上の研究成果から、5'-AMPの連続投与は、明らかにマウスの低体温を誘導し、UPLCや2次元電気泳動の分析結果は、筋肉の変化に対応する分子動態の存在が示唆されるとともに、ミネラル分析の結果は活動量減少に伴う筋肉の変化に対して抑制的に作用する可能性を示唆しており、擬似冬眠様生理下でも筋萎縮を抑制する分子メカニズムの存在する可能性が強く示唆された。

<引用文献>

Lee K., et al., Overcoming muscle atrophy in a hibernating mammal despite prolonged disuse in dormancy: Proteomic and molecular assessment., *J. Cell. Biochem.*, 104, 642-656, 2008.
 Lee K., et al., Molecular mechanism underlying muscle mass retention in hibernating bats: role of periodic arousal., *J. Cell. Physiol.*, 222(2), 313-319, 2010.
 Ishihara A., et al., Gene Expression Levels of Heat Shock Proteins in the Soleus and Plantaris Muscles of Rats after Hindlimb Suspension or Spaceflight., *J. Physiological Sciences*, 58: 413-417, 2008
 石岡憲昭, 吉原育美, 石原昭彦, 低温環境下での骨格筋特性の変化, 日本宇宙生物科学会第31回大会予稿集, pp 69, 2017 .
 Daniels IS., Lee CC., et al., A role of erythrocytes in adenosine monophosphate initiation of hypometabolism in mammals., *J. Biol. Chem.*, 285(27), 20716-20723, 2010.
 Thirk R., et al., The space-flight environment: the International Space Station and beyond., *CMAJ*, 180, 1216-1220, 2009.
 Geiser F., Hibernation., *Current Biology*, 23(5), R188-93. 2013. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.062.
 Vernikos J., et al., Space, gravity and the physiology of aging: Parallel or convergent disciplines? A mini-review., *Gerontology*, 56, 157-166, 2010.

Stollo F., Vernikos J., Aging-like metabolic and adrenal changes in microgravity: State of the art in preparation for Mars., *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.*, 126, 236-242, 2021. doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.01.028

Grassin-Delye S., et al., A high-resolution ICP-MS method for the determination of 38 inorganic elements in human whole blood, urine, hair and tissues after microwave digestion.. *Talanta.*,199:228-237. 2019. doi: 10.1016/j.talanta.2019.02.068.

Pozebon D., et al.,Elemental hair analysis: A review of procedures and applications., *Anal Chim Acta.*, 992:1-23, 2017. doi: 10.1016/j.aca.2017.09.017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎 丘、石岡憲昭、寺田昌弘、岸本成史
2. 発表標題 人工冬眠は可能か - 有人惑星探査への挑戦 -
3. 学会等名 第4回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 丘、石岡憲昭、石原昭彦、寺田昌弘
2. 発表標題 人工冬眠は可能か - 有人惑星探査への挑戦 -
3. 学会等名 第3回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 丘、石岡憲昭、石原昭彦、寺田昌弘
2. 発表標題 人工冬眠は可能か - 有人惑星探査への挑戦 -
3. 学会等名 第2回 帝京大学 研究交流シンポジウム
4. 発表年 2019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
研究分担者	寺田 昌弘 (Terada Masahiro) (10553422)	京都大学・宇宙総合学研究ユニット・特定准教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山崎 丘 (Yamazaki Takashi) (70301174)	帝京大学・公私立大学の部局等・講師 (32643)	
研究分担者	石原 昭彦 (Ishihara Akihiko) (90184548)	京都大学・人間・環境学研究所・教授 (14301)	令和2年3月20日 ご逝去

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