

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08898

研究課題名(和文) トーパーの誘導および維持機構の解明

研究課題名(英文) Research on induction and maintenance of torpor

研究代表者

佐藤 貴弘 (SATO, Takahiro)

久留米大学・付置研究所・准教授

研究者番号：50368883

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)：本研究では、研究代表者が樹立したトーパーモデルマウスを用い、トーパーの誘導および維持機構の解明を目的とした研究を実施した。定量PCRアレイ解析から、トーパーモデルマウスでは脳内のグレリン(脳グレリン)含量が高いことが示された。そこで、グレリンを脳室内に投与すると一過性の体温低下が生じた。この時、腹腔内にあらかじめミニポンプを埋め込んで末梢からグレリンを持続投与しておくことで、トーパーが完全に誘導・維持された。すなわち、脳グレリンがトーパーを誘導するとともに、末梢から分泌されるグレリンが脳に反応する際の感受性を高め、持続的な体温低下であるトーパーを維持する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トーパーは、寒冷時や飢餓時などに見られる能動的な低代謝状態で、著しい体温低下を特徴とする生理現象である。類似の現象として低体温症が知られているが、低体温症とは異なって脳機能に障害を残すことはない。このことは、トーパーの誘導や維持機構の解明が、長期間の臓器保存といった次世代型医療に展開できる可能性を示唆している。さらに、能動的な低代謝を特徴とするトーパーの全貌を明らかにできれば、肥満症や糖尿病の新たな治療戦略の創出にも結びつくことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the torpor model mice established by the principal investigator were used to elucidate the mechanisms of induction and maintenance of the torpor. Quantitative PCR array analysis showed that ghrelin (hypothalamic ghrelin) content in the brain was high in the torpor model mice. Therefore, intracerebroventricular administration of ghrelin caused a transient decrease in body temperature. At this time, when ghrelin was administered continuously from the periphery with a mini-pump implanted in the abdominal cavity in advance, the torpor was completely induced and maintained. In other words, brain ghrelin not only induces torpor, but may also maintain sustained hypothermia by increasing the sensitivity of peripherally secreted ghrelin to the brain. Taken together, ghrelin is a peptide required for induction and maintenance of the torpor.

研究分野：内分泌学、神経内分泌学

キーワード：グレリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日内休眠 (daily torpor: トーパー) は哺乳類と鳥類の一部で見られる能動的な低代謝状態である。全身の酸素消費量が低下し、熱産生を含む代謝が抑制されるので、二次的に体温が低下すると考えられてきた。このような能動的な低代謝のうち、数時間続くものをトーパーと呼び、数日間続くものは冬眠と呼ばれる。いずれも、寒冷時や飢餓時などにエネルギー消費を減らして生命を維持する生存戦略であることから、これらには共通の制御機構が存在していると考えられている。しかしながら、トーパーや冬眠という現象を分子レベルで解析できるモデル動物が存在しないことから、これらがどのように誘導・維持されるのか、そのメカニズムの解明は滞っていた。

研究代表者は、飼育マウスを維持する過程で、偶発的に矮小形質を持つ自然発生矮小変異マウス (以下、矮小マウス) を見出した。このマウスは外気温と飢餓に対する感受性が高く、わずかな外気温の低下でも体温が低下し、かつ軽度の飢餓でも体温が大きく低下する特徴を持っていた。一方で、外気温が上昇したり再給餌されると、低下した体温は短時間で正常値まで回復することもわかった。さらに、矮小マウスで見られるこのような体温低下は、同体重の正常マウスでは生じなかった。これらのことから、矮小マウスで見られた一連の反応は、このマウスが矮小なために生じたのではなく、未知の機構による能動的な調節によって生じていると考えられた。

以上の観察はトーパーで見られる現象に類似していたため、矮小マウスの責任遺伝子を同定する研究を実施した。はじめに遺伝子マッピング法にて責任遺伝子の存在する染色体部位を確認したところ、この責任遺伝子は第 16 番染色体上にあることがわかった。そこで、この領域内で次世代シーケンシング解析を行ったところ、cAMP response element binding protein (CREB) binding protein (*Crebbp*) 遺伝子に一塩基欠損が生じていることがわかった。さらに、CRISPR/Cas9 システムによって C57BL/6J 系マウスにこの変異を導入すると、矮小マウスの異常形質が完全に再現されることも証明した。

このことから、研究代表者が見出した矮小マウスはこれまでに知られていない「トーパーモデルマウス」だと考えられたため、トーパーの誘導・維持機構を解明できるのではないかという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が発見・維持してきたトーパーモデルマウスを用い、トーパーの誘導および維持機構を解明する。

トーパーモデルマウスは、母親マウスから、同時に正常マウスと矮小マウス (トーパーモデルマウス) が出生する。すなわち、同腹の個体間で比較解析することが可能なため、より信頼度の高いデータを得ることができる。さらに、このマウスを飼育しているのは研究代表者のみであり、他施設でこの研究を実施することができないことから、独創性を保ちながら本研究を展開することも可能である。また、トーパーモデルマウスの責任遺伝子がコードしている CREBBP は、ほぼ全ての細胞に存在しており、直接 DNA に結合することなく多くの転写活性化因子のコアアクチベーターとして機能するタンパク質である。このことは、CREBBP がトーパーという全身性の強力な反応を達成しうる分子であることを示唆するものであることから、トーパーという生理現象を分子レベルで理解できる可能性がある。

このような特色を持つ本研究の遂行により、肥満症や糖尿病の新たな治療戦略の創出に結びつく可能性がある。また、安全に低代謝を維持できるようになれば、長期間の臓器保存や重症患者の搬送など、次世代型医療への展開も期待できる。

3. 研究の方法

いずれのマウスも一定の飼育環境（明期：7:00 a.m.–7:00 p.m.，暗期：7:00 p.m.–7:00 a.m.；室温：23±1℃）で飼育し、麻酔や外科手術を含む動物実験は久留米大学動物実験規程にしたがって実施した。トーパーモデルマウスおよびグレリン遺伝子 (*ghrl*^{-/-}) 欠損マウスは、自家繁殖したものを使用した。

持続的な体温の測定は、マウスの腹腔内に送信器 (TA10TE-F20; Data Sciences International, St Paul, MN, USA) を埋め込み、受信器 (model RPC-1; Data Sciences International) にてデータを取り込むテレメトリー自動計測システムによって行なった。

(1) トーパーの誘導に関する研究

トーパーの誘導に関わる物質を同定するため、複数のパスウェイの定量 PCR アレイ (Qiagen) を実施し、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (ThermoFisher SCIENTIFIC) にて測定した。組織中グレリン濃度は、Sep-Pak C18 Plus (Waters) にて抽出後、Ghrelin ELISA Kit (SCETIKK) キットにて測定した。脳室内へのグレリン受容体アンタゴニスト投与実験は[D-Lys3]-GHRP-6 (Sigma) を使用した。

(2) トーパーの維持に関する研究

誘導されたトーパーが維持される機構を明らかにするため、浸透圧ミニポンプ (Alzet) を用いて腹腔内に 100 (pmol/μl/hr, 2週間) のグレリンを持続投与した。一方、脳室内には留置カニューレを用いて 100 (pmol) のグレリンを投与した。

4. 研究成果

(1) トーパーモデルマウスは寒冷適応能力が低い。

これまでの予備的な実験から、トーパーモデルマウスを寒冷曝露すると体重が小さいほど体温も低下する可能性が示唆されていたことから、本研究では同腹の正常マウスと矮小マウスを揃えて寒冷曝露実験 (18℃, 4時間) を実施した。正常マウスでは体重と体温の相関が見られず (相関係数: $R^2=0.0793$)、恒温性が保たれていた。一方、トーパーモデルマウスでは寒冷曝露下の体重と体温に弱い相関があり (相関係数: $R^2=0.4231$)、体重が小さいほど体温も低下し、変温性を示すことがわかった。

(2) トーパーモデルマウスでは容易にトーパーが誘導される。

これまでの予備的な実験から、トーパーモデルマウスに絶食を行うと絶食 12 時間程度で著しい体温低下が生じることがわかっていた。そこで、同腹の正常マウスではなく、トーパーモデルマウスと同程度の体重をもつ正常マウスで絶食実験を行うと、著しい体温低下が生じるまで 36 時間程度必要であることがわかった。また、再給餌によって速やかに体温が回復することも示された。したがって、トーパーモデルマウスは容易にトーパーが誘導されるマウスであるということが確認できた。

(3) トーパーの誘導前に脳グレリンが一過性に分泌される。

同腹の正常マウスとトーパーモデルマウスを用い、絶食 (2 時間) 後の脳で定量 PCR アレイを行った。その結果、トーパーモデルマウスでは脳から分泌されるグレリン (脳グレリン) の発現量が多いことがわかった。

そこで、脳グレリンの遺伝子発現量とペプチド含量について、絶食後の経時的な推移を 6 時間おきに 30 時間後まで調べた。脳グレリンの遺伝子発現量は、正常マウスでは 24 時間後 (2.5 ± 0.6 倍 vs 正常マウスにおける開始時 mRNA 発現量) に、トーパーモデルマウスでは 6 時間後 (3.5 ± 0.4 倍 vs 正常マウスにおける開始時 mRNA 発現量) にそれぞれピークが観察された。一

方で、脳グレリンのペプチド含量は、正常マウスでは 24 時間後 (1.5 ± 0.5 pmol/mouse) にピークが観察されたのに対し、トーパーモデルマウスでは絶食開始時(0 時間後; 1.8 ± 0.6 pmol/mouse) に最も高い値を示した。脳グレリンが分泌されるとその濃度は低下することが知られているため、絶食後の体温推移を示す(2)の実験結果と照らし合わせると、正常マウスでは 24~30 時間の間に、トーパーモデルマウスでは 0~6 時間の間に、それぞれ脳グレリンが分泌されたと想定される。

(4) 脳グレリンがトーパーの誘導に必要である。

第三脳室にカニューレを留置したマウスを用い、脳室内にグレリンを投与する実験を行った。脳室内へのグレリン投与は、一過性の体温低下を誘導した(投与 1 時間後に、約 7.5 の体温低下)。この体温低下は、脳室内にグレリン受容体アンタゴニストである[D-Lys3]-GHRP-6 を投与することで観察されなくなったため、脳グレリンがトーパーの誘導に必要であることが示された。

(5) グレリンはトーパーの維持に必要である。

脳グレリンの作用によってトーパーが誘導された後、どのようにしてトーパーは維持されるのかを明らかにする必要がある。本研究では、浸透圧ミニポンプ(Alzet)を用いて腹腔内にグレリンを持続投与しているマウスにおいて、脳室内に留置したカニューレから 100 (pmol) のグレリンを投与する実験を行った。その結果、通常のトーパーで見られる著しい体温低下、すなわちトーパーが観察されることがわかった。

そこで脳室内にグレリンを投与し、3 時間後の様々な遺伝子の発現量を解析すると、弓状核でグレリン受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体(GHS-R1)の遺伝子発現量が、室傍核でニューロペプチド Y(NPY)-Y5 受容体の発現量が増加していることが示された(GHS-R1a mRNA: 2.6 ± 0.57 倍、NPY-Y5: 4.3 ± 1.21 倍)。弓状核のグレリン受容体は、胃から分泌されて血液脳関門を通った末梢グレリンの一次作用部位である。また、このグレリンシグナルは、弓状核からの NPY 分泌を促進し、室傍核の NPY-Y5 受容体に作用して体温を低下させる。したがって、脳グレリンによる弓状核での GHS-R1 mRNA 発現の増加と室傍核での NPY-Y5 mRNA 発現の増加は、末梢のグレリンに対する反応性を高めて低体温を維持するしくみだと考察することができる。

以上、(1)~(5)の結果から、脳グレリンによってトーパーが誘導され、末梢の胃から分泌される高濃度のグレリンによって持続的な体温の低下が維持されていることが示された。また、脳グレリンは、末梢から分泌されるグレリンに対して、視床下部の反応性を高めることによってトーパーの維持に与る可能性も示唆された。

トーパーの人為的な制御は医療に大きな革新を起こす可能性を秘めていることから、今後さらなる分子メカニズムの解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Takahiro Sato, Takanori Ida, Yuki Shiimura, Kazuma Matsui, Kanae Oishi, Masayasu Kojima	4. 巻 13
2. 論文標題 Insights Into the Regulation of Offspring Growth by Maternally Derived Ghrelin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne) .	6. 最初と最後の頁 852636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2022.852636.	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 -

1. 著者名 Takahiro Sato, Kanae Oishi, Daisuke Koga, Takanori Ida, Yusuke Sakai, Kenji Kangawa, Masayasu Kojima	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Thermoregulatory role of ghrelin in the induction of torpor under a restricted feeding condition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 17954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97440-y.	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤貴弘
2. 発表標題 内分泌学の歴史と進歩
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤貴弘, 大石佳苗, 甲賀大輔, 井田隆徳, 児島将康
2. 発表標題 体温調節におけるグレリンの作用機序の解析
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤貴弘
2. 発表標題 食欲と体温の制御機構と睡眠調節の接点
3. 学会等名 第13回ペプチド・ホルモン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤貴弘, 大石佳苗, 児島将康
2. 発表標題 自然発生矮小変異マウスの性状解析
3. 学会等名 第52回心脈管作動物質学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤貴弘, 大石佳苗, 児島将康
2. 発表標題 自然発生矮小変異マウスの生理機能解析
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤貴弘, 椎村祐樹, 児島将康
2. 発表標題 食べるのか, 休むのか
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤貴弘, 大石佳苗, 藤原研, 井田隆徳, 児島将康
2. 発表標題 自然発生矮小変異マウスの内分泌学的特性に関する研究
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023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
---------	---------