

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21366

研究課題名(和文)冬眠動物の特性を医療応用するための人工冬眠誘発に関する研究

研究課題名(英文) Induction of artificial hibernation for medical application of characteristics of hibernators

研究代表者

志水 泰武(Shimizu, Yasutake)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40243802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、冬眠しない動物を人工的に冬眠状態とし安全に覚醒させることを目的とした。ラットおよびマウスをイソフルラン吸入麻酔下で冷却した場合、冬眠様の低体温へと誘導し、さらに低体温から通常体温へと回復することに成功した。心電図や血液生化学検査により、低体温性障害を検討したところ、この方法で誘導した低体温では、重度の低体温障害を引き起こすことはないことが明らかとなった。極度の低体温下で生体機能を保護する仕組みを検討したところ、細胞保護作用のある低温ショックタンパク質CIRPのスプライシングレベルで発現調節が、非冬眠動物の低体温時にも重要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冬眠中の動物には、虚血性傷害がない、骨格筋の萎縮がない、感染に耐性がある、放射線に耐性がある、寿命が延長する、等の驚異的な特徴が知られている。これらの特徴を冬眠しない動物で再現できれば、ヒトや伴侶動物の医療に大きな変革をもたらすことが期待できるが、冬眠しない動物に極度の低体温を誘発できないことが課題であった。冬眠動物ではないラットとマウスにおいて、冬眠様の低体温に誘導し、健全な状態で回復させることに成功した本研究の成果は、冬眠の性質を医療応用するための第一段階として、極めて意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to induce artificial hibernation in animals that do not hibernate. When rats and mice were cooled under isoflurane anesthesia, they become hibernation-like hypothermia. Importantly, they can recover from the hypothermia to normal body temperature. Electrocardiogram and blood biochemical examination revealed that hypothermia induced by cooling under isoflurane anesthesia causes severe injury. Next, we examined a mechanism to protect biological functions under the severe hypothermic condition. Experiments focusing on the gene expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP), which has a cytoprotective effect, revealed that regulation of functional CIRP expression at the level of splicing is important to avoid harmful low temperature not only in hibernators but also in non-hibernators.

研究分野：神経生理学

キーワード：冬眠 人工冬眠 低体温 低温ショックタンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 冬眠中の動物には、虚血性傷害がほとんど発生しない、骨格筋の活動がない状態が続いても筋萎縮が生じない、感染に耐性がある、物理化学的な組織損傷刺激（例えば、放射線）に耐性がある、寿命が延長するなど、多くの特徴があることが知られている。これらの特徴は、脳梗塞や心筋梗塞の治療（救命率増加、後遺症の軽減）、廃用性筋萎縮の回避（寝たきり状態の筋力維持）、感染症制御（致死的な感染症、予防法のない感染症の防御）、ガンの放射線療法へ応用（強い放射線量でガン細胞を攻撃）、移植臓器の適正な保存（移植手術の増加、成功率の上昇）というように医療応用可能であると考えられるため、これらの特徴を冬眠しない動物で再現することが望まれている。

(2) しかし冬眠動物であっても、人為的な冬眠導入は非常に困難である。例えばハムスターでは、段階的な環境温度の低下、明期の短縮、給餌量の減少という条件で、3ヶ月程度の長い期間を要してやっと冬眠に入る。通常 20℃以下の体温で生命維持ができない非冬眠動物に人工冬眠を誘発することは極めて困難な課題である。

(3) 非常に困難であるが、人工冬眠が誘発できたときのメリットが非常に大きいため、その方法の開発が期待されている、ということが研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

- (1) 冬眠しない動物を人工的に冬眠状態とし、安全に覚醒させること
- (2) 人工冬眠を可能とする機序を解明し、有用な特性を人工冬眠させた動物で再現すること

3. 研究の方法

(1) 非冬眠動物における強制低体温の誘発

これまでに研究代表者は、冬眠動物であるハムスターを用いて強制的に低体温にする方法を検討してきた。本研究では、非冬眠動物としてマウスとラット用いて、ハムスターで確立したこれらの方法を適用することを実験の基本とした。確立した方法は、正常な心拍動を維持する場合と不整脈が発生し組織学的な心筋傷害が認められる場合の二つに大別された。不整脈が発生し心筋傷害が起こる方法は、冬眠誘導法としては不適切であるが、正常な状態で低体温を維持する機序を解明するための重要な対照となる。本研究では、ハムスターで成功した方法のみを非冬眠動物に適用するのではなく、不整脈を発生させる方法も適用することで機序の解明を試みた。

(2) 低温不耐性を示す動物を用いた低温体制機構の解明

スunksが低温環境下では生存できないことを利用して、低温体制機構を解明することを試みた。スunksを低温環境下でも生存できるように条件づけできれば、その方法が非冬眠動物に低温耐性を付与する条件となるという発想に基づく実験となる。スunksを段階的な環境温度の低下に暴露し、馴化可能か、可能であれば何が変化するかという視点で実験した。

(3) 低温ショックタンパク質、CIRP (cold inducible RNA binding protein) の発現調節

冬眠中のハムスターの心臓では、細胞保護作用のある低温ショックタンパク質、CIRP (cold inducible RNA binding protein) のmRNAが、機能的なタンパク質をコードするアイソフォームに集約されるようになることを明らかにしている。このようなスプライシングパターンの変化が起こるのが、正常な心拍動を維持する場合（上記の①と④）であることから、低温障害を回避する鍵を握る機序であると考えられる。本研究では、ハムスターで見出してきたCIRPのスプライシングパターンの変化を、強制的に低体温としたラットやマウスでも解析した。

4. 研究成果

(1) ラット、マウスにおける強制低体温の誘発

ハムスターの冬眠に重要であるという報告がある脳のアデノシン A1 受容体を薬理的に活性化する方法で、ラットの低体温誘導を試みた。アデノシン A1 アゴニストである N6-cyclohexyladenosine (CHA) を側脳室内に投与後、4℃の冷蔵室に移動させた。ラットの直腸温度は時間経過とともに低下し、最終的に 15℃という極度の低体温状態でも正常な洞律動を維持していた。また、加温により体温を回復させることで、低体温状態経験後も生存させることが可能であった。この結果から、冬眠時の体温低下に重要な脳内のアデノシン A1 受容体の活性化を適用することで、非冬眠動物を極度の低体温状態に誘導できることが明らかとなった。

次に、麻酔による低体温誘導法について検討した。ペントバルビタールを腹腔内投与後、4℃の冷蔵室に移動させた場合、移動直後から直腸温度は低下し続けたが、直腸温度が低下する過程で急激な心拍数の低下や心室細動、完全房室ブロックなどの異常心電図が発生し、全ての個体が死亡した。この結果を元に、体温を低下させるためには中枢の抑制が不可欠であるが、低体温時

には中枢の活動が維持される必要があるとの仮説を立て、麻酔深度の調節が容易な吸入麻酔薬（イソフルラン）を用いて低体温誘導を試みた。直腸温度が 27.5°C の時点でイソフルランの吸入を停止した場合、全ての個体が震えを起こして体温を回復させた（図 2 A）。一方、直腸温度が 22.5°C の時点でイソフルランの吸入を停止すると、体温を自発的に回復させる個体の他に、体温が回復せずに徐々に低下する個体があった（図 2 B）。22.5°C の時点でイソフルランの吸入量を減少させ、20°C で完全に停止する方法では、全てのラットが 15°C まで直腸温度が低下し続けた（図 2 C）。このように吸入麻酔薬で麻酔の深度を適正に調節することにより、ラットを冬眠様低体温に誘導することが可能となった。また、ラットの体温調節中枢には、体温回復行動の下限の温度があることが明らかとなった。

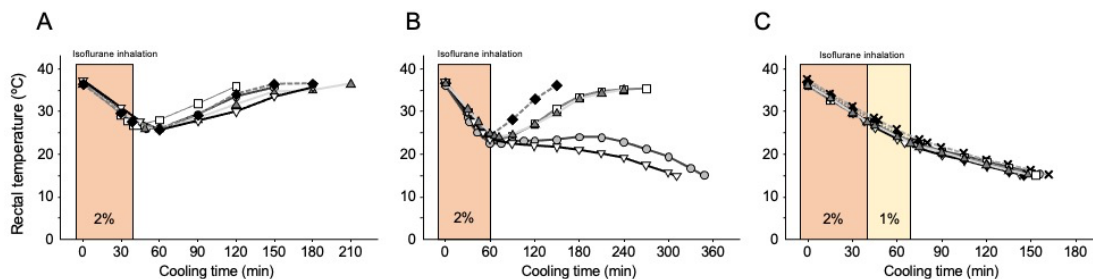


図 1：ラットにおけるイソフルラン麻酔による低体温誘導

直腸温度が 27.5°C に低下するまではイソフルランの濃度を 2% で吸入を行い、27.5°C に到達した時点でイソフルランの濃度を 1% に下げ、直腸温度が 22.5°C に低下した時点でイソフルランの吸入を停止する方法を適切な低体温誘導法として確立した。この方法では、イソフルランの吸入を停止した後も、ラットの直腸温度と心拍数は低下し続け、全てのラットが目標の温度である 15°C に到達した。心拍数は体温低下に相関して減少すること、低体温誘導中に異常な心電図は発生せず、直腸温度が 15°C に到達した時点でも正常な洞調律を示すことがわかった（図 2）。なお、イソフルランの吸入を停止しない場合は、全てのラットが心停止を起こすことから、冬眠様の低体温下では中枢の活動が維持される必要があるものと推察される。

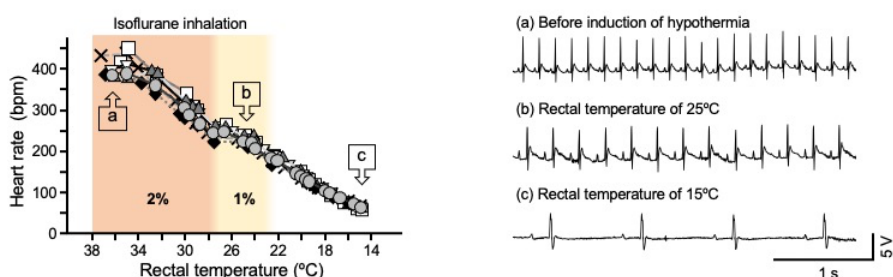


図 2：低体温下のラットにおける心拍動

非冬眠動物であるラットとマウスを極度の低体温に誘導する方法を確立できたので、次にこの低体温が組織傷害を誘発する可能性を検討した。低体温誘導中の血液生化学値 (AST, ALT, LDH, BUN) を測定したところ、体温が 15°C まで低下した時点では有意な変化はなかったが、低体温状態が 3 時間、6 時間と維持されることにより、全ての項目で数値が有意に上昇した（図 3）。また、低体温の維持の有無に関わらず、低体温状態からの体温回復後の値は体温回復前の値より有意に高かった（図 4）。6 時間の低体温状態維持を経験した全てのラットは、1 週間後も生存していた。また、1 週間後の血液生化学値は、低体温誘導前の値と有意差はなかった（図 5）。

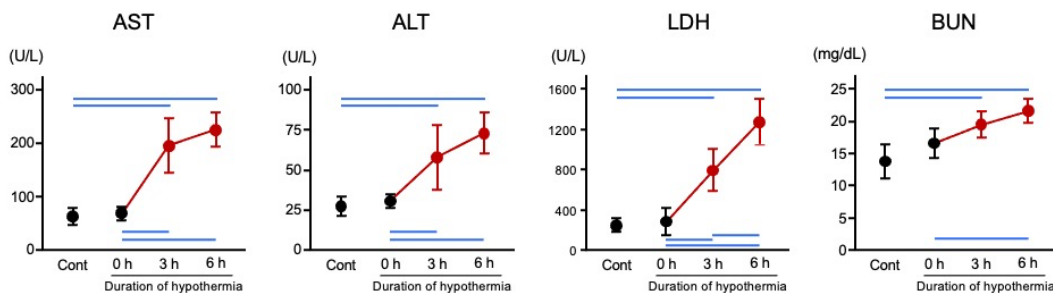


図 3：ラットにおける低体温維持が血液生化学値に与える影響

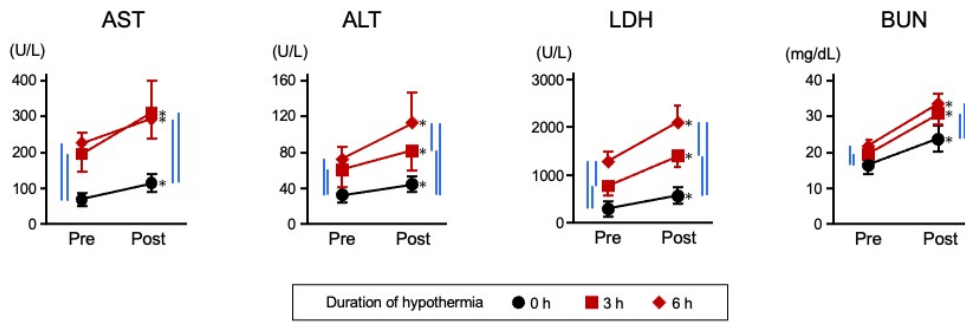


図4：ラットにおける低体温からの回復が血液生化学値に与える影響

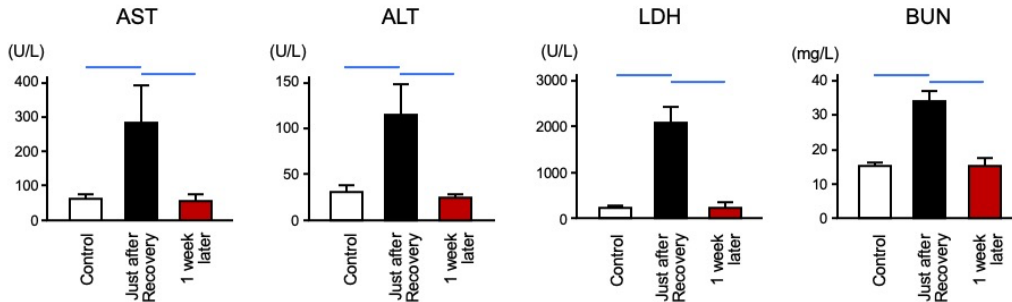


図5：ラットにおける低体温からの回復後の血液生化学値

(2) 低温不耐性を示すスunksを用いた低温体制機構の解析

スunksを環境温度4℃で飼育すると、全ての個体で3日間以内に低体温、不動化が誘発された。比較対照としたマウスでは、4℃の環境下で体温が維持されたので、スunksが低温不耐性であることが確認された。イソフルラン麻酔下のスunksを冷却することで人工的な低体温を誘導したところ、直腸温度が15℃まで低下しても心拍動を維持し生存できることが判明した。このことから、スunksは極度の低体温でも心拍動を維持する生体機能を備えていると考えられる。低体温誘導後に麻酔を止めて室温下に移すと、覚醒したスunksはふるえを呈し体温を回復させたため、低体温から復帰するための熱産生能も備えていると考えられる。しかし、スunksの褐色脂肪量はマウスと比較して少なかったことから、非ふるえの熱産生能は低いことが予想された。スunksを飼育する環境温度を段階的に下げ寒冷順化させると、4℃環境下で体温を維持できる日数が延長した。寒冷馴化後のスunksは未馴化個体と比較して、寒冷刺激時の酸素消費量が増加していることもわかった。これらの結果から、スunksの低温耐性能はマウスに比べて低い場合急激な環境温度の低下には対応できないものの、馴化過程で低温耐性能が強化されれば寒冷環境下で生存できることが示唆された。

環境温度22℃において、一部のスunksは不定期ながら日内休眠(約1~2時間持続する体温低下と不動化)を示した。環境温度の低下に従い、日内休眠の頻度が増加し、体温低下の度合いが大きくなったことから、日内休眠は寒冷ストレスに対する適応反応であると考えられる(図6)。低温環境下では、24時間周期の日内休眠となることもわかった。絶食等、特定の条件を加えなくとも、自発的に日内休眠を示す実験動物として、スunksは冬眠・休眠の研究分野で非常に有用であると考えられる。

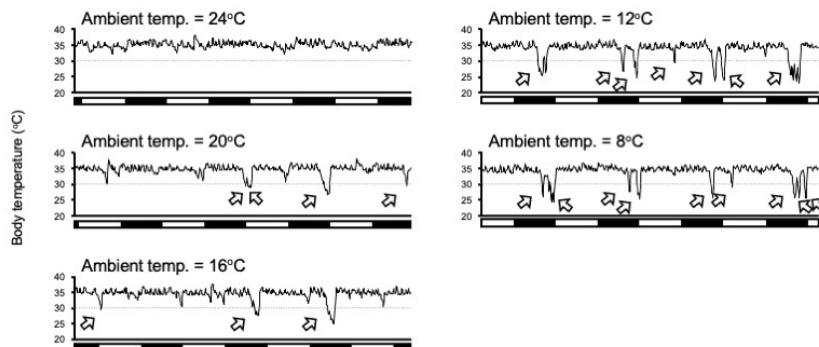


図6：スunksが示す日内休眠

(3) 非冬眠動物における CIRP 発現のスプライシングレベルでの調節

これまでの研究により、冬眠動物であるハムスターの平常時には、CIRP のタンパク質をコードする mRNA とともにスプライシングバリエントと考えられる RNA が検出されること、このスプライシングバリエントは冬眠時には消失し、CIRP をコードする mRNA のみに発現が集約されることを明らかにしてきた (図7左)。このようなスプライシングレベルでの調節は、冬眠時に効率よく CIRP mRNA を存在させるための機構であると考えられる。本研究では、冬眠しない動物における低体温についても、冬眠動物に認められる CIRP のスプライシング調節が寄与していることを想定し実験を行なった。

非冬眠動物であるマウスにイソフルランを用いて低体温を誘導したところ、ハムスターと同様に CIRP のスプライシング調節が引き起こされることが明らかとなった (図7右)。また、ラットにおいても同じようなスプライシング調節の存在が確認された。様々な条件で検討を加えた結果、CIRP のスプライシングパターンへの切り替えは、体温が 30°C 付近に 1 時間以上維持されることで起こることが明らかとなった。したがって、冬眠動物に特異的な調節機構ではなく、温度に依存した非冬眠動物にも共通の機序であることが判明した。

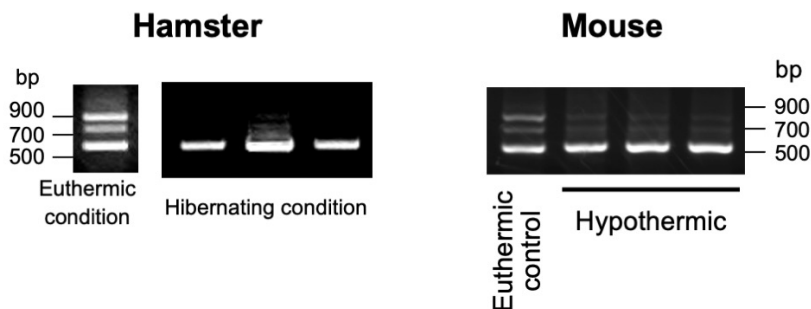


図7：ハムスターとマウスにおける CIRP 発現のスプライシングレベルでの調節

CIRP のスプライシング調節の意義として、「選択的スプライシングの調節によって冬眠時に効率よく CIRP タンパク質の発現を上昇させる」というメリットが考えられる (図8)。一方、最も大きなサイズの PCR 産物の予想される ORF は、CIRP mRNA 配列と 3'末端側の配列が異なっていた。一番大きなサイズの mRNA 配列は、CIRP の予想 ORF の最後のエキソンの 5'末端側に 209 bp の塩基配列が挿入されたものであった。このスプライシングバリエントに挿入された塩基配列には、ストップコドンが含まれているため、C 末端側を欠失した CIRP タンパク質に翻訳されることが予想される。欠失する部分は、CIRP の活性の経路の一つであるメチル化が起こる部位であるので、機能を持たない分子である可能性が高い。このバリエントの RNA 結合ドメインについては CIRP ホモログと完全に一致していたため、RNA 結合ドメインは維持されていると考えられる。よって、最も大きな PCR 産物から翻訳されるタンパク質は、RNA には結合するものの、CIRP としての活性をもたない可能性がある。いわゆるドミナントネガティブとして機能し、平常体温時の CIRP 機能を消去しているのかもしれない (図8)。

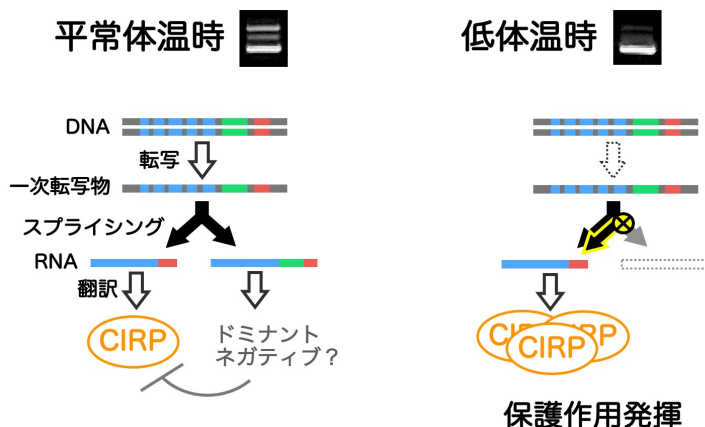


図8：CIRP 発現のスプライシングレベルでの調節の意義

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimaoka Hiroki, Shiina Takahiko, Suzuki Hayato, Horii Yuuki, Horii Kazuhiro, Shimizu Yasutake	4. 巻 71
2. 論文標題 Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-021-00794-1	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 Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 21
2. 論文標題 Temperature-Dependent Alternative Splicing of Precursor mRNAs and Its Biological Significance: A Review Focused on Post-Transcriptional Regulation of a Cold Shock Protein Gene in Hibernating Mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207599	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 Horii Yuuki, Okadera Kanako, Shingo Miyawaki, Shiina Takahiko, Shimizu Yasutake	4. 巻 43
2. 論文標題 Suncus murinus as a novel model animal that is suitable for elucidating the mechanism of daily torpor.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.43.53.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤 茜、野村香南子、島岡弘樹、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 低温不耐性をもつ小型実験動物スunksの寒冷馴化の特徴
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椎名貴彦、堀井有希、志水泰武
2. 発表標題 冬眠ハムスターにおける低温ショックタンパク質の選択的スプライシングによる発現調節
3. 学会等名 2020年度 温熱生理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白石茂菜実、堀井有希、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 マウスの日内休眠時におけるCold-inducible RNA-binding protein遺伝子の選択的スプライシングの変化
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井有希、白石茂菜実、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 冬眠様選択的スプライシングの変化におけるCold-inducible RNA-binding protein転写物の定量的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白石茂菜実、堀井有希、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 日内休眠により引き起こされるCold-inducible RNA-binding protein 遺伝子の選択的スプライシングの冬眠様変化
3. 学会等名 第68回中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井有希、白石茂菜実、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 冬眠様選択的スプライシングによるCold-inducible RNA-binding protein 転写物の発現量の変化
3. 学会等名 第68回中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋愛佳、白石茂菜実、堀井有希、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 マウスの日内休眠時に誘発されるCod-inducible RNA-binding protein遺伝子の選択的スプライシング
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀井有希、白石茂菜実、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 Cold-inducible RNA-binding proteinにおける冬眠様選択的スプライシングの変化における転写物の定量的解析
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022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	椎名 貴彦 (Shiina Takahiko) (90362178)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	

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	海野 年弘 (Unno Toshihiro) (90252121)	岐阜大学・応用生物科学部・教授 (13701)	

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