

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20700

研究課題名（和文）冬眠の低体温における神経機能維持機構の解明 -Ca²⁺ イメージングを用いたアプローチ～研究課題名（英文）Elucidating the Mechanisms of Neural Function Maintenance During Hibernation-Induced Hypothermia: An Approach Using Ca²⁺ Imaging

研究代表者

山田 新太郎 (YAMADA, Shintaro)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70960607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：冬眠動物は、極度の低体温でも神経活動を維持できる驚異的な能力を持つ。しかし、冬眠を任意に誘導させることの難しさや、冬眠中の神経活動を測定する手法がこれまで少なかったことから、冬眠中の神経活動には不明な点が多い。本研究では、チアゾリン類恐怖臭を用いて冬眠動物ハムスターに冬眠様な低体温を誘導できることを示し、さらに *in vivo* Ca²⁺ imaging を冬眠様低体温下のハムスターで行った。結果として冬眠様低体温のハムスターでは神経活動は維持され、カルシウムスパイク数の減少、スパイク幅の増加が起きること、また非冬眠動物のマウスでは低体温下でカルシウムの異常な流入が起きることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により匂い物質を利用した非侵襲的な冬眠様低体温誘導法を確立した。また、遺伝子組み換え動物がほとんど存在しない冬眠動物にアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子導入を行い、超小型蛍光顕微鏡を用いた *in vivo* Ca²⁺ imaging を可能にした。これらの技術を利用することで、これまで難しかった冬眠における比較研究や、冬眠行動における神経機能の解明につながることを期待される。さらに、本研究でわかってきた冬眠動物の神経がもつ低体温におけるカルシウム恒常性のメカニズムが解明されることで、虚血などを始めとした神経障害や疾患の治療などにもつながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Hibernating animals possess an extraordinary ability to maintain neural activity even under low-temperature conditions that are intolerable for typical mammals. However, the difficulty in artificially inducing hibernation and the lack of non-invasive methods to measure neural activity during hibernation have left much about the neural cold tolerance of hibernating animals unknown. In this study, we demonstrated that the thiazoline class fear odor, which induces hypothermia in mice, can also induce hibernation-like hypothermia in hibernating hamsters. Furthermore, we applied the recently developed *in vivo* Ca²⁺ imaging technique to hamsters under hibernation-like hypothermia. The results showed that neural activity was maintained in the hibernation-like hypothermic hamsters, with a decrease in the number of calcium spikes and an increase in spike width. In contrast, non-hibernating mice exhibited abnormal calcium influx under low-temperature conditions.

研究分野：神経科学

キーワード：冬眠 チアゾリン類恐怖臭 ハムスター 低体温 *in vivo* Ca²⁺ imaging 人工冬眠

1. 研究開始当初の背景

低温はあらゆる生物学的な過程を緩やかにする。神経の活動性も例外ではなく、低体温により低下し、神経機能に障害をきたすとされる。その一方で、冬眠中のリスやハムスターは5 ほどまで体温が低下するにも関わらず、神経は機能を停止せず、神経活動が維持されている。これにより、冬眠中の脳でも生命維持機能や記憶の保持機能は維持されると考えられているが、冬眠中にどのような神経活動が存在しているのかは不明である。

これまで、冬眠中の動物において神経活動を詳細に観測することは困難であった。その理由として、冬眠を任意のタイミングで動物に誘導することが難しいことと、生体内における神経のリアルタイムな観察手法が限られていたこと、また冬眠動物は外部刺激により冬眠から醒めてしまうため、非侵襲的に神経活動を観測する技術がほとんど無かったことが考えられる。そのため、既往の研究では、動物が冬眠したタイミングで、脳波や細胞外記録による神経活動の測定を行うに留まっており、低温下での神経の詳細な観測は行われていない。したがって、冬眠中の生体内における神経活動を評価するためには、冬眠様な低体温へ人工的に誘導する手法と、自由行動下におかれた冬眠動物の冬眠中に神経をモニタリングする手法が必要である。

2. 研究の目的

近年、細胞内の Ca^{2+} に応答して蛍光を発する GCaMP などのセンサータンパク質と mini scope や photometry を用いて自由行動下における脳活動を計測する技術が開発され、マウスの自由行動下での神経活動に関する様々な知見が得られている。一方、ハムスターやリスなどの冬眠における神経機能の維持に関する研究は古くから着目されているにも関わらず、自由行動下の脳活動の計測技術をハムスター等の冬眠動物に適用した例はほとんどなく、冬眠時の動物の神経活動の *in vivo* ライブイメージングの報告例はほとんど存在していない。そのため、冬眠中でも記憶や生命維持に必須の神経活動は選択的に残されると推定されるが、このような少数の神経活動はこれまでの脳波計測法などでは解明できていない。

また、我々は齧歯類に低体温を誘発する thiazoline-related fear odors (tFOs) を用いた実験を通して、冬眠動物であるハムスターに感覚誘導性人工冬眠状態を速やかに誘発することができることを発見した。これまでも冬眠動物へ冬眠様な低体温を誘導する手法は報告されているが、脳への薬物投与や外科的な手術を行わず非侵襲的に冬眠様な低体温へ誘導できる手法はこれまでにほとんど報告されていない。

以上より、本研究では、冬眠動物への tFOs を用いた冬眠様な低体温手法の開発と、*in vivo* ライブイメージングを用いた冬眠動物における低体温時の神経活動の観測を行い、これまで困難とされてきた冬眠時の動物の個々の神経活動維持機構の解明を進めることを目的とする。

3. 研究の方法

冬眠動物への非侵襲的冬眠様な低体温の誘導

本研究では、実験対象冬眠動物としてシリアンハムスターを用いた。また、対照となる非冬眠動物として、マウスを用いた。実験には、2-Methyl Thiazoline(2MT)、Thiomorpholine(TMO)、Cinnamyl Aldehyde(CNA)の3種類の tFOs を用いた。体温の測定方法として、ラジオテレメトリー送信機を使用した。実験開始前に、動物は個別のケージに移され、 $5\sim 8^{\circ}C$ の低温に30~60分間慣らした。この低温環境は、温度を $5\sim 8^{\circ}C$ に保つことができる実験用低温チャンバーを使用した。動物を低温に慣らした後、化合物を浸したフィルターペーパーをケージに入れることで冬眠様な低体温誘導実験を行った。冬眠様な低体温は、既往の文献を参考に深部体温が $10^{\circ}C$ 以下に低下したときと定義した (Kamata et al., 2023)。

in vivo ライブイメージングを用いた低体温時の神経活動の観測

神経活動を測定するためのイメージング手法として、*in vivo* Ca^{2+} imaging 手法を用いた。測定に用いるカルシウムセンサーとして GCaMP6f を用い、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV10-hSyn-GCaMP6f) を用いて海馬に発現させた。カルシウムセンサーの蛍光は超小型顕微鏡 UCLA mini scope v4 を持ちいた。低体温時の神経活動の測定は、この手法を用いて動物を低体温に誘導し行った。得られた神経活動の動画データは matlab を用いて解析し、様々な体温における動物の個々の神経活動を調べた。

4. 研究成果

冬眠動物への非侵襲的冬眠様な低体温の誘導

実験の結果、2MT を用いた場合、ハムスターに冬眠様な低体温 ($10^{\circ}C$ 以下) を誘導することができた。具体的には、2MT に暴露すると、ハムスターの体温は3~5 低下し、その後数時間維持された後、環境温度である $5\sim 10^{\circ}C$ と同程度まで低下した(図1)。この低体温状態は24時間以上続いてもハムスターが死亡することなく、その後常温に戻すと死亡せずに体温が回復した。しかし、24時間以上低体温を維持した状態を続けても、自発的に体温は回復せず、最終的に死亡してしまうことがわかった。

一方、TMO を用いた場合、2MT とは異なり、ハムスターに冬眠様の低体温を誘導することはできなかった。CNA についても同様に、ハムスターに低体温を誘導することはできなかった。

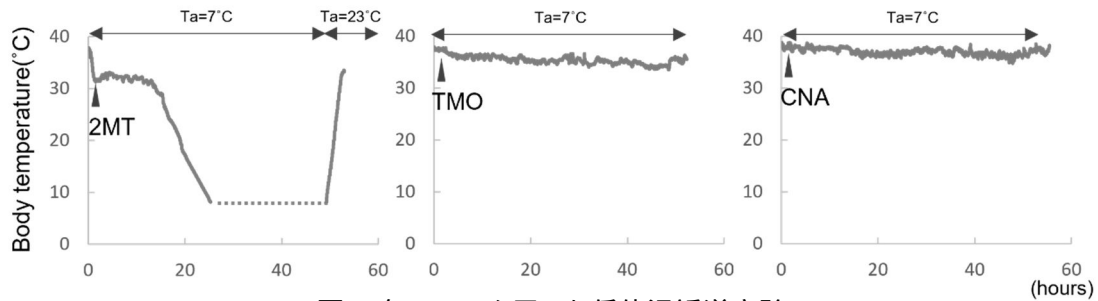
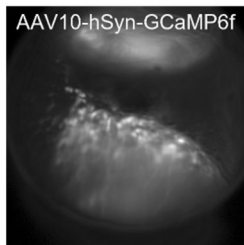


図 1: 各 tFOs を用いた低体温誘導実験

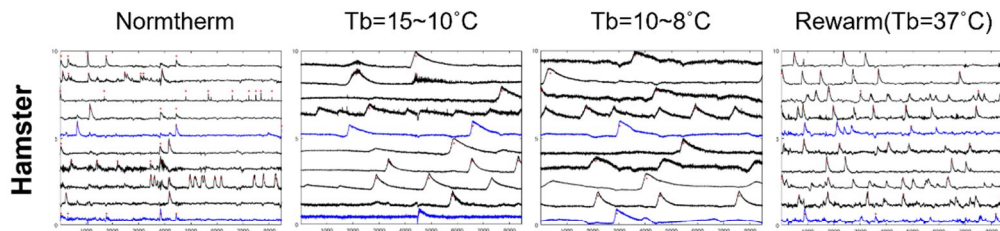
in vivo ライブイメージングを用いた低体温時の神経活動の観測

ハムスターの海馬に GCaMP6f を発現させ、Ca²⁺イメージングを用いて低体温時の神経活動を観察することに成功した(図 2(a))。続いて、2MT を用いて冬眠様低体温を誘導した状態でイメージングを行うと、体温の低下に伴い GCaMP6f の蛍光強度が減少していった。しかし、冬眠様低体温の下においても、神経活動の頻度の低下やカルシウムスパイク幅の上昇は見られたものの、神経活動は持続した。さらに、復温させた後に神経活動は元の状態に戻ることが確認された(図 2(b))。一方、非冬眠動物であるマウスでも同様の実験を行ったところ、ハムスター同様低体温下で蛍光強度が減少、活動の低下、カルシウムスパイク幅の増加が見られたが、最終的に異常なカルシウム流入が発生し、数時間で死亡した(図 2(c))。

(a)



(b)



(c)

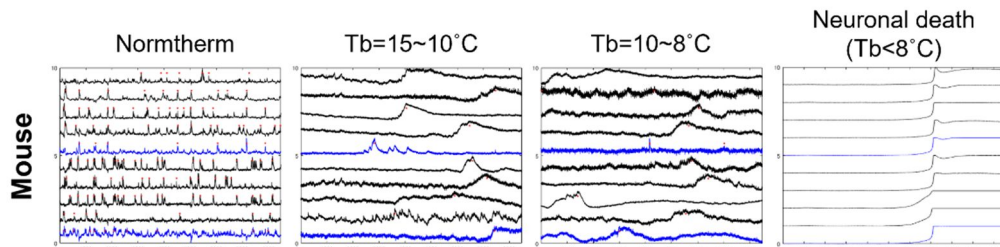


図 2: (a)GCaMP6f を発現する海馬ニューロンの蛍光画像. (b,c) in vivo Ca²⁺ imaging により示されたハムスターおよびマウスにおける冬眠様低体温下でのニューロン個々のカルシウム濃度変化

まとめと展望

本研究を通して

- ・ 2MT を用いてハムスターに冬眠様な低体温を誘導できること
- ・ 冬眠様低体温状態のハムスターに in vivo Ca²⁺ imaging が適用できること
- ・ 低体温のハムスターではカルシウムスパイク数の減少、幅の増加が起きること

・低体温のマウスではカルシウムの異常な流入が起きることが明らかとなった。このことは、冬眠動物の神経では、低体温においてもカルシウム恒常性を保つ機構が存在することを示唆していると考えられる。今後はカルシウム恒常性に着目して、冬眠動物の低体温における神経活動維持機構の研究を行っていく。また、冬眠中の記憶の維持や体温の調節に神経がどのように関わっているかを明らかにするため、tFOs 誘導性冬眠様低体温と自然な冬眠における神経活動を比較していく必要性があると考えられる。

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 2件）

1. 著者名 Kamata Taito, Sato Hitomi, Mukai Haruka, Sato Takahiro, Yamada Shintaro, Sekijima Tsuneo	4. 巻 4
2. 論文標題 Sensitivity analysis of collision risk at wind turbines based on flight altitude of migratory waterbirds	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ecological Solutions and Evidence	6. 最初と最後の頁 e12222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2688-8319.12222	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 Kamata Taito, Yamada Shintaro, Sekijima Tsuneo	4. 巻 14
2. 論文標題 Differential AMPK-mediated metabolic regulation observed in hibernation-style polymorphisms in Siberian chipmunks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2023.1220058	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 Hayashi Shinichi, Seki-Omura Ryohei, Yamada Shintaro, Kamata Taito, Sato Yuki, Oe Souichi, Koike Taro, Nakano Yousuke, Iwashita Hikaru, Hirahara Yukie, Tanaka Susumu, Sekijima Tsuneo, Ito Takeshi, Yasukochi Yoshiki, Higasa Koichiro, Kitada Masaaki	4. 巻 891
2. 論文標題 OLIG2 translocates to chromosomes during mitosis via a temperature downshift: A novel neural cold response of mitotic bookmarking	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 147829 ~ 147829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2023.147829	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------