

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660249

研究課題名(和文)人工冬眠誘導法の確立と新しい低体温療法の開発に向けた非冬眠動物への応用

研究課題名(英文) Establishment of a method for induction of artificial hibernation, and its application to hypothermic therapy in non-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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、冬眠することのない動物において冬眠と同等の低体温を誘発し、種々の疾病に対する低体温療法に応用することにチャレンジした。冬眠動物であるハムスターにおいて、イソフルランの吸入麻酔下で冷却して体温を低下させ、体温が25℃付近になったときに吸入を停止することにより、正常な心拍動を維持した状態で極度の低体温に誘導できることを見出した。この知見を非冬眠動物であるラットに適用し、極度の低体温に誘導することに成功した。また、ハムスターの心臓が低温耐性を示す機序を解析し、体温ショックタンパク質の発現調節が寄与することを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to develop a method for inducing hypothermia, which is equivalent to hibernating animals, in non-hibernators, to apply the hypothermic condition as a novel hypothermic therapy. In hamsters, extreme hypothermia with normal heartbeats can be forcibly induced by cooling the animals under isoflurane inhalation and stopping the inhalation when their body temperature was dropped about 25°C. Application of the method to rats successfully induced hypothermia without accompanying cardiac arrest. In addition, we examined mechanism underlying cold-tolerant nature of the hamster heart, and found that regulation of cold-shock protein expression may have a beneficial role.

研究分野：神経生理学

キーワード：冬眠 低体温 心臓 低温ショックタンパク質 麻酔 生理学 獣医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 冬眠には短日・寒冷環境への馴化が必須であると考えられており、従来の冬眠研究は馴化過程での変化に着目した冬眠時と非冬眠時(活動時)の比較が実験の基本であった。しかしながら、冬眠時と活動時に何らかの違いが検出されたとしても、それが冬眠するために必須の変化なのか、冬眠に入る前の寒冷短日環境への適応性変化なのかは区別できない。従来の研究では、冬眠前の適応性変化が低体温で生存するために不可欠であるという固定概念があったので、2つの可能性を区別して考える発想が欠落していたものと考えられる。

(2) これに対して、申請者らは冬眠前の馴化過程がなくともハムスターを冬眠状態にできることを証明した(Am. J. Physiol. 295, R991-R996, 2008)。この先行研究により、冬眠前の適応性変化がなくとも、特定の生理機構が活性化されることで冬眠が成立するという発想に至り、新たな視点で研究を開始することとなった。

2. 研究の目的

(1) 冬眠動物であるハムスターを人為的に低体温へ誘発し、維持、覚醒させる手法を確立する。

(2) 確立した方法がラットに適用できるか、またラットにも冬眠の特性が見られるか検討する。

(3) 極度の低体温下で心拍動できる機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) ハムスターを人為的に冬眠様の低体温とし、数時間後に傷害なく回復させる方法を確立する実験

吸入麻酔を施して体温室に放置し、体温を低下させる。体温が28~20℃まで様々な体温で吸入麻酔を停止する。80%以上のハムスターが不整脈を発生させないで低体温となった場合に、熱産生を放棄するセットポイントを超えたと判断する。

カプサイシンは、TRPV1(43以上の温度を感知するセンサー)のアゴニストであるので、これを投与すると暑熱環境に置かれたときのように熱の放散が高まる。熱放散が亢進した状態で強制的に冷却することで、熱産生を放棄するセットポイントを超えて、冬眠様低体温に移行させるか検討する。

導入した低体温の維持時間と臓器傷害の有無を検討する(最大24時間までとする)。持続的に心電図を記録して不整脈をチェッ

クするとともに、経時的にサンプリングして、血液検査と主要臓器の組織学的検査を行う。麻酔下で強制的に冷却した場合は様々な傷害が発生するので、これを比較対照とする。

体温が復帰する過程は、急激な循環系の変化により傷害が発生する可能性が高い。その影響を調べるために、低体温に誘導した直後に加温して、体温を復帰させる。その後、長期間飼育する群とサンプリングして検査する群に分け、総括的に調べる。

(2) ハムスターで確立した人為的冬眠誘導法を適用し、ラットを極度の低体温で生存させる実験

ハムスターで確立した方法が、ラットでも低体温を誘導できるか実験的に確かめる。

ラットにおいて低体温が誘発できたら、低体温の維持時間と臓器傷害の有無を検討する。回復させることの影響も多角的に調べる。

ラットにおける冬眠様の低体温が、虚血再灌流傷害を緩和、改善できるかを検討する。動脈を結紮し、脳あるいは心臓に虚血を引き起こし、冬眠様低体温が傷害を緩和できるか検証する。虚血時間を変化させ、経時的に傷害を観察し、体温が37℃付近に維持されたラットと比較する。また、虚血そのもので傷害が発生しない最大の時間で血流を止めた後、再灌流させ傷害を評価する。

(3) 極度の低体温下で心拍動できる機序を解明する実験

近年、低温ショックタンパク質の機能が注目されている。RNA結合タンパク質が低温にさらされた細胞で発現し、低温耐性に必要なタンパク質を翻訳レベルで高めることが明らかとなっている。そこで冬眠中のハムスターの低温ショックタンパク質のひとつであるCIRPの発現を調べる。

ハムスターに人為的な低体温を誘導し、同様の変化が認められるか調べる。

非冬眠動物であるラットに低体温を誘導したときに、冬眠動物と同じようなテインショックタンパク質の誘導が観察されるか検討する。

4. 研究成果

(1) ハムスターにおける人為的低温の誘発

冬眠動物であるハムスターをペントバルビタール麻酔下で冷却した場合は、体温は経時的に低下し、10℃を下回る冬眠様の低体温に誘導することができた(図1)。しかしながら、不整脈(房室ブロック)を示す心電

図が記録され、正常な心拍動が維持されないことが判明した(図1)。この状態で冷却を停止し加温したが、心拍動が正常に戻ることなく死亡した。この結果から、冬眠動物であっても麻酔下で強制的に体温を下げることは有害であることがわかる。

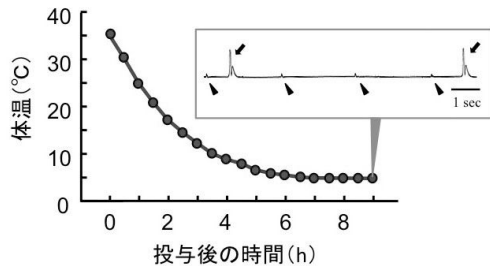


図1：ペントバルビタールと冷却により誘導したハムスターの低体温

麻酔剤の影響を速やかに除去できるメリットを活かし、イソフルランの吸入麻酔を用いて低体温を誘発することを試みた。吸入麻酔を施して低温室に放置し、体温が28~20まで低下したところで吸入麻酔を停止させたところ、22付近で吸入麻酔を停止すると、不整脈を発生させないでハムスターを15以下の低体温に誘導できることがわかった(図2)。このように低体温に導入したハムスターは、最大24時間まで維持させることが可能であり、自発的に低体温から回復する個体も存在していた。自発的な覚醒を起こさないハムスターにおいては、血糖値の低下が顕著であったことから、血糖値を維持する自律的な調節が働くことが、低体温からの回復に必要であることが示唆された。低体温で6時間維持し、加温により正常体温に復帰させた場合は、各種血中逸脱酵素の上昇はなく健全な状態であることが確認できた。

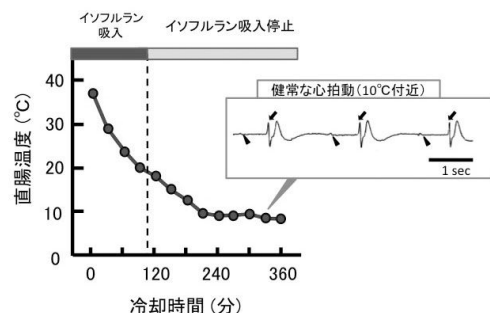


図2：イソフルラン麻酔を低体温に移行する過程で停止する方法で誘導したハムスターの低体温

カプサイシンを投与し、熱放散が亢進した状態で強制的に冷却する実験を行ったが、

30 付近にまで体温が低下するものの、冬眠様低体温に移行させることはできなかった。

これらのハムスターを用いた実験から、22 付近に熱産生を放棄するセットポイントが存在することが示唆された。この温度より低い状態では、麻酔がなくとも低体温が維持され、傷害も発生しないので、イソフルラン麻酔を低体温に移行する過程で停止する方法は、人為的な低体温の誘導法として有用であると考えられる。

(2) ラットにおける人為的低体温の誘発

自発的に冬眠することのないラットにおいて、ペントバルビタールと冷却を組み合わせた低体温誘発を試みた。不整脈が出現するものの低体温に移行したハムスターとは対照的に、ラットの場合は体温が20に低下する前に、心房細動や房室ブロックが発生し、心停止することが判明した(図3)。この結果から、冬眠動物の心臓は非冬眠動物の心臓と比較して低温耐性があることが示唆される。

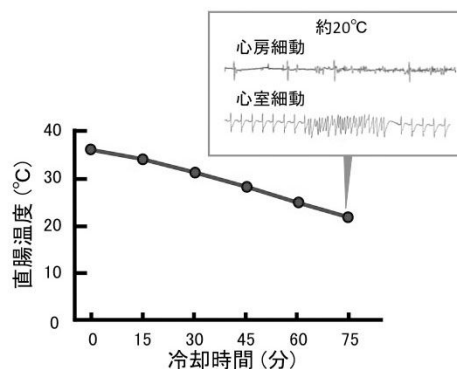


図3：ペントバルビタールと冷却により誘導したラットの低体温

ハムスターにおいては、イソフルラン麻酔を低体温に移行する過程で停止する方法により低体温に誘発できたので、この方法をラットに適用した。体温が25 付近に低下したときにイソフルランの吸入を停止すると、その後も体温の低下が持続し、15 の低体温にすることができた(図4)。心電図に異常は認められなかった。このような方法によって、冬眠することのないラットに対して冬眠様の低体温を誘発することに成功した。

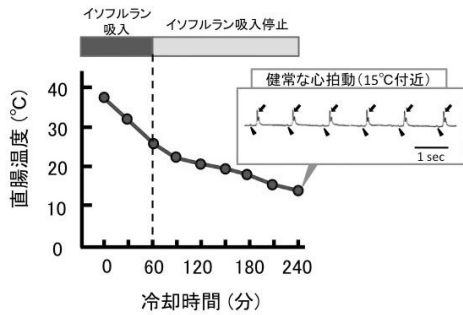


図4：イソフルラン麻酔を低体温に移行する過程で停止する方法で誘導したラットの低体温

研究代表者は、ハムスターの脳室内にアデノシン A1 受容体アゴニストを投与すると冬眠様の低体温が誘発できることを報告した (Am. J. Physiol. 295, R991-R996, 2008)。この知見を基に、ラットにおいても脳内アデノシン系の活性化で低体温が誘導できるのではないかと考え、実験を行った。A1 受容体のアゴニストである CHA をラットの脳室内に投与した後に冷却すると、ハムスターと同じように極度の低体温を誘発することができた (図5)。

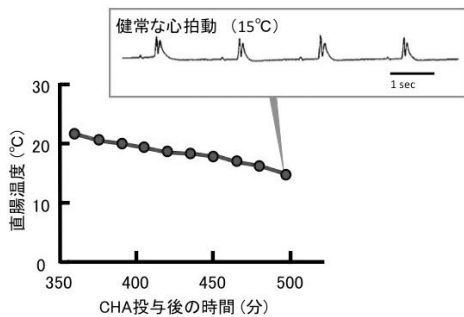


図5：アデノシン A1 受容体アゴニストの脳室内投与で誘導したラットの低体温

イソフルラン麻酔を低体温に移行する過程で停止する方法により誘発した低体温が、臓器傷害を引き起こすか否か検討した。ラットの体温を 15°C に低下させた後、加温して体温を回復させたところ、体温に誘導した時点では血中のパラメーターに異常はなかったが、回復させた直後に有意な上昇が求められた (図6)。ただし、体温回復後 1 日経過した時点では、上昇した数値は正常値に復帰していたので、一過性の傷害で問題がないものと判断された。

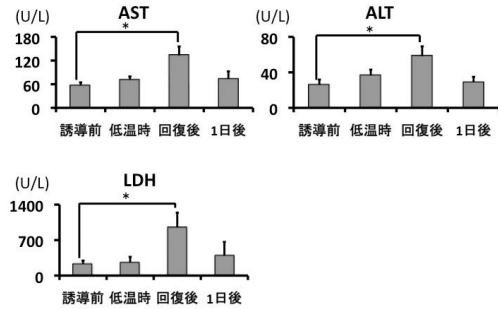


図6：イソフルラン麻酔を低体温に移行する過程で停止する方法で低体温誘導したラットの血中逸脱酵素値

低体温を 6 時間まで維持した場合は、体温を回復させる処置を施さなくとも、血中逸脱酵素値が顕著に上昇し、体温回復後も影響が残った。組織像を観察すると、心筋に壊死が認められ、肝臓や肺、脳にも異常所見が認められた。この結果から、低体温に移行すること自体は問題がないものの、長期間維持すると不可逆的な傷害が発生することが判明した。

(3) 極度の低体温下で心拍動できる機序としての低温ショックタンパク質の発現

近年、低温ショックタンパク質の機能が注目されている。RNA 結合タンパク質が低温にさらされた細胞で発現し、低温耐性に必要なタンパク質を翻訳レベルで高めることが明らかとなっている。そこで冬眠中のハムスターの低温ショックタンパク質のひとつである CIRP の発現を RT-PCR 法で調べた。発現量が増加することを期待した実験であったが、冬眠していないときは複数の mRNA が存在しており、冬眠すると 1 種類の mRNA に集約されることが明らかとなった (図7)。集約される mRNA の塩基配列を分析した結果、これが機能のある CIRP に翻訳されることが示唆された。つまり、冬眠に入るとスプライシングのレベルで調節して、機能タンパクの量を急速に増加させる機序があるものと推察される。

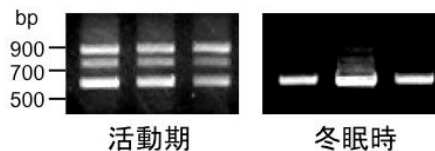


図7：冬眠前後のハムスターにおける CIRP の発現

冬眠前に発現している CIRP バリエントの 1 つは、途中にストップコドンが含まれており、RNA に結合できるが活性を持たないタンパク質に翻訳されている可能性が見出された(図 8)。冬眠していないときに CIRP の作用を減弱させるためのドミナントネガティブ型である可能性が考えられる。

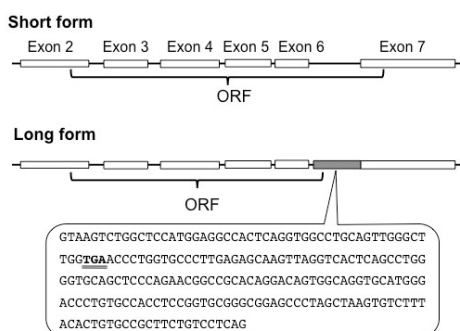


図 8 : ハムスター CIRP のエクソン構造

ハムスターを人為的に低体温に誘導した場合には、冬眠時に認められるようなスプライシングバリエントの集約化は観察されなかった(図 9)。冬眠と関連した特殊な要素がこの調節に関わることが示唆された。

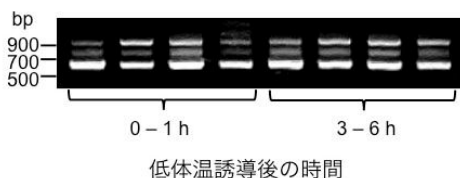


図 9 : 人為的低体温を誘発したハムスターにおける CIRP の発現

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Sano Y, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Shimizu Y.

Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読あり, 印刷中

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.135.

[学会発表](計 3 件)

佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武 冬眠時のシリアンハムスターにおける低温ショックタンパク質遺伝子の発現、第 157 回日本獣医学会学術集会 北海道大学(札幌・北海道) 2014.9.10

佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武 シリアンハムスターにおける冬眠特異的な遺伝子発現、第 24 回日本病態生理学会大会 北九州国際会議場(北九州・福岡) 2014.8.9

島岡弘樹、鈴木隼人、川口敬之、内藤清惟、椎名貴彦、志水泰武 人為的な冬眠様低体温がマウスに与える影響、第 156 回日本獣医学会学術集会 岐阜大学(岐阜市・岐阜) 2013.9.21

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

椎名 貴彦 (TAKAHIKO SHIINA)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号: 90362178