

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19243

研究課題名（和文）人工冬眠誘発の基盤となる哺乳動物に普遍的な低温耐性機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of low temperature tolerance common to mammals as a basis for induction of artificial hibernation.

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は、冬眠動物において低温ショックタンパク質（CIRP）がスプライシングレベルで発現調節されることを発見した。本研究では、この調節機構が冬眠しない動物でも普遍的に機能し、低体温時に生じる臓器傷害を回避できるか検討した。冬眠時スプライシングパターンの冬眠型と冬眠パターンとならないバリエーション型のゲノム編集マウスを作出した。強制的に低体温を誘導した場合、バリエーション型では体温が20℃を下回ると激しい不整脈が出現し、約半数で心停止が起こった。一方、冬眠型では不整脈の発生が軽微であり、心停止する個体はわずかであったことから、冬眠型のCIRP発現が心臓の低温耐性に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
人工冬眠は極めて困難な課題であるが、成功すれば医療に大きな変革をもたらすと期待できる。しかしながら、冬眠しない動物では25℃以下の低体温になると臓器が傷害されることが障壁となっており、人工冬眠は実現していない。本研究では、低温下で細胞を保護する作用のあるCIRPに着目し、冬眠動物が示す特徴的な発現をゲノム編集技術によりマウスで再現した。このようなマウスでは体温が20℃以下になっても正常な心拍動が維持されることが明らかになったことは、冬眠しない動物に冬眠様低体温に誘導し、医療応用できる可能性を示唆するものであり、学術的意義、社会的意義の高い発見であると言える。

研究成果の概要（英文）：We have previously found that the expression of cold inducible RNA binding protein (CIRP) is regulated at the splicing level in hibernating animals. The present study examined whether this regulatory mechanism commonly functions in non-hibernating animals to avoid organ injury that occurs during hypothermia. Two types of genome-edited mice were generated: hibernating type (exhibiting a hibernating splicing pattern) and variant type (without a hibernating pattern). When hypothermia was forcibly induced, severe arrhythmias appeared in the variant type when the body temperature decreased to less than 20 °C, and cardiac arrest occurred in about half of them. In contrast, arrhythmias in the hibernating type were minor and only a few individuals experienced cardiac arrest. These findings indicate that expression of functional CIRP by hibernation-like splicing mechanism is effective in making the heart tolerant to low temperatures.

研究分野：神経生理学

キーワード：冬眠 低体温 低温ショックタンパク質 転写後調節 ゲノム編集 選択的スプライシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

冬眠中の動物は、放射線照射や感染症に耐性があること、有害化学物質を投与しても組織傷害が起こらないこと、虚血再環流傷害が起こらないこと、さらには寿命が延長することや廃用性筋萎縮が起こらないこと、等々、医学領域で活用可能な多くの特徴が認められる。このようなメリットをヒトや伴侶動物で再現できれば、さまざまな疾病に対して新しい視点の治療法を提供できる可能性があるため、冬眠しない動物に人工冬眠を誘導する方法の開発が望まれている。しかしながら、冬眠動物の体温耐性機序が未解明のため、実現していない状況にある。

これまで研究代表者らは、低温下で発現が増加するタンパク質ファミリーである低温ショックタンパク質に注目して、冬眠動物の体温耐性機序を追究してきた。低温ショックタンパク質は、低温、紫外線、活性酸素などから細胞を保護することが報告されている。これまでの研究から、低温ショックタンパク質のうち Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) が、シリアンハムスターにおいて冬眠時に特徴的な選択的スプライシングの変化を示すことが明らかとなった。平常体温のハムスターでは、CIRP 遺伝子から複数のスプライシングバリエントが発現していること、そのスプライシングバリエントの一つが機能的な CIRP をコードする mRNA であること、冬眠中のシリアンハムスターでは機能的な CIRP mRNA に集約されそれ以外のスプライシングバリエントが消失することがわかった。

本研究の開始当初は、このような CIRP 発現の変化が、冬眠中の動物において低温ショックタンパク質の合成効率を高め、低温耐性能を発揮するため寄与することが想定されたため、その検証が必要な状況にあった。また、冬眠しない動物でも普遍的に起こるかも解明する必要があった。

2. 研究の目的

冬眠動物で発見した低温ショックタンパク質の特徴的な発現調節機構が、冬眠しない動物でも普遍的に機能し、低体温時に生じる臓器傷害を回避できることを証明する。

3. 研究の方法

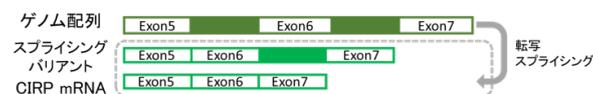
(1) 動物

実験には 8-12 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。室温 22±2°C、明暗周期 12 時間：12 時間（明期 7:00-19:00）の環境で飼育した。飼育期間中は水道水と固形飼料（MF；オリエンタル酵母工業）を自由に摂食させた。本研究における実験動物は、全て岐阜大学動物実験委員会にて審査を受けた後に許可されたものであり、岐阜大学動物実験取扱規程に従い行なった。

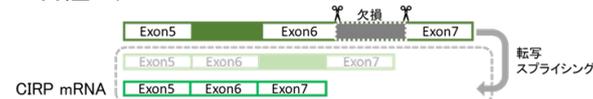
(2) ゲノム編集マウスの作製

CRISPR/Cas9 を用いて CIRP 遺伝子をゲノム編集することで、CIRP mRNA またはスプライシングバリエントのどちらか一方のみを発現するマウスを作製した。CIRP 遺伝子のエキソン 6-7 間のイントロンをゲノムから欠損させ、常に CIRP mRNA のみを発現するマウス（冬眠型）を作製した。また、CIRP 遺伝子のエキソン 7 に隣接するイントロンの配列の後ろに塩基を挿入し、常にスプライシングバリエントのみを発現するマウス（バリエント型）を作製した（図 1）。

A. 野生型マウス



B. 冬眠型マウス



C. バリエント型マウス

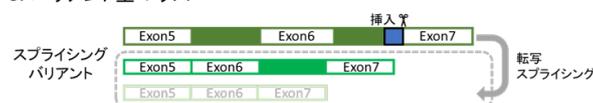


図 1: ゲノム編集の模式図

ゲノム編集の模式図を示す。野生型マウス (A) は転写・スプライシングによりスプライシングバリエントと CIRP mRNA が発現する。冬眠型マウス (B) はエキソン 6-7 間のイントロンが欠損し、CIRP mRNA のみが常に発現する。バリエント型マウス (C) はエキソン 7 側のイントロンに塩基の挿入があり、スプライシングバリエントのみを常に発現する。

(3) 寒冷環境下での飼育

飼育中の体温変動を記録するため、体温ロガー (DST nano: Star-oddi 社) により経時的に体温を記録した。イソフルラン麻酔下でマウスの背部を切開し、体温ロガーを皮下に挿入した。体温ロガーの設置手術は、実験の7日以上前に実施した。体温は10分間隔で記録した。体温ロガーを設置したマウスを5°Cに設定した冷蔵庫内で1週間飼育した。低温環境でマウスは単独飼育し、餌と水は自由に摂食させた。1週間の寒冷飼育後に体温ロガーを取り出し、データを得た。

(4) 絶食による日内休眠の誘導

C57BL/6J 系統、雌の野生型、冬眠型およびバリエント型マウスに体温ロガーを設置し、体温を記録した。17:00 から24時間絶食を行なった後、体温ロガーを取り出し、データを得た。最低到達体温が32°C以下の体温低下が見られた場合を日内休眠と判断した。

(5) イソフルランによる強制低体温誘導

マウスをイソフルランで麻酔後、体温プローブ (RET-2:PHYSITEMP) を肛門から2 cm まで挿入し、直腸温度を測定するとともに心電図を記録した。ステンレスプレートに載せたマウスを冷蔵庫内に移し冷却することで低体温を誘導した。直腸温度 $15 \pm 1^\circ\text{C}$ で1時間維持した後、マウスを頸椎脱臼により安楽殺し、心臓を採材した。

(6) 心電図解析

マウスを15°Cの低体温に誘導し1時間維持する全過程で心電図を記録し、不整脈および致命的な徐脈について評価を行なった。不整脈は有無と程度により0-2の3段階で評価した。15秒区間において、不整脈の発生が無い場合はスコア0、不整脈が1-2回発生した場合はスコア1、不整脈が3回以上発生した場合はスコア2とした。不整脈の判定基準は、連続するR波の間隔が1.5倍以上であった場合とした。致命的な徐脈は、15秒区間で心拍が13回以下の場合とした。ノイズなどの影響で15秒区間中2秒以上R波が確認できない場合は解析不能とした。このスコア化はこの実験に関与しない3人の評価者に依頼し、ブラインド評価とした。

4. 研究成果

(1) ゲノム編集マウスの作製

CIRP 遺伝子発現機構における選択的スプライシングの変化が低温耐性に寄与するかを調べるために、CIRP mRNA またはスプライシングバリエントのどちらか一方のみを発現する CIRP 遺伝子ゲノム編集マウスを作製した。作製した冬眠型およびバリエント型マウスは、出生および体重に明らかな差はなかった。このことから、少なくとも最低限の生命活動には CIRP は関与しないと考えられる。

野生型マウスの心臓では、平常体温では500 bp 付近の機能的な CIRP の mRNA と800 bp 付近のスプライシングバリエントの両方が発現していたが、直腸温度28°C、1時間で維持すると機能的な CIRP mRNA に発現が集約した (図2)。冬眠型マウスは、平常体温および28°Cで1時間維持後の両方において CIRP mRNA のみを発現した (図2)。また、バリエント型マウスは、平常体温および28°Cで1時間維持後のいずれにおいてもスプライシングバリエントのみを発現した (図2)。したがって、作製したゲノム編集マウスでは CIRP 遺伝子のスプライシングパターンが固定されていることが確認できた。

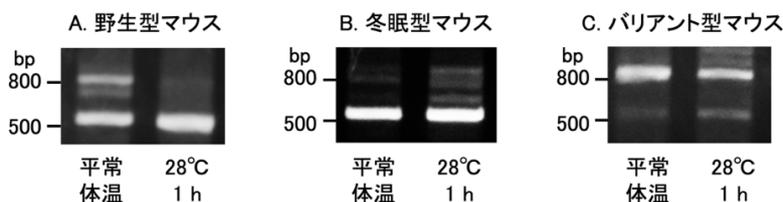


図2: 直腸温度28°Cで維持したマウスにおける CIRP mRNA 発現

野生型およびゲノム編集マウスにて、平常体温時と28°C、1時間維持後の心臓で発現していた CIRP の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。写真横の数値は電気泳動におけるマーカーの位置を示す。

(2) 寒冷飼育における CIRP 遺伝子ゲノム編集マウスの体温変化

CIRP 遺伝子発現機構における選択的スプライシングの変化が、寒冷環境における体温維持に関与するかを検討するために、野生型、冬眠型およびバリエント型マウスを通常環境 (22°C) および寒冷環境 (5°C) で飼育し、それぞれの体温を比較した。22°Cの環境温度で飼育中は、野生型5匹、冬眠型5匹およびバリエント型5匹すべてが35-38°Cで体温を維持していた。その後、5°Cの環境温度で1週間飼育したが、いずれのマウスも床敷の中で体を丸めて震えている様子が観察され、34-37°Cの体温を維持した。これらの結果から、CIRP によってもたらされる低温耐性機構に熱産生能の強化は重要な要素ではないと言える。

(3) CIRP 遺伝子ゲノム編集マウスにおける絶食による日内休眠の誘導

数時間 30°C 付近の軽度な低体温となるマウスの日内休眠に着目し、その際の低体温耐性に CIRP 遺伝子発現機構における選択的スプライシングの変化が関与するかどうかを検討した。日内休眠とは、マウスが飢餓状態に陥ると自発的に代謝を下げるもので、能動的な低代謝とされる。野生型、冬眠型およびバリエーション型マウスを 24 時間絶食させると、個体ごとに最低到達体温や休眠の維持時間にばらつきがあったものの、野生型 5 匹、冬眠型 6 匹およびバリエーション型 5 匹で自発的に体温が 32°C 以下となる休眠行動が誘発された (図 3)。日内休眠を行なったマウスは、その後自発的に体温を平常体温まで復帰させた。機能的な CIRP mRNA を発現しないバリエーション型マウスでも日内休眠が誘導されたことから、日内休眠の誘導に CIRP の選択的スプライシングの変化は必須ではないことが示唆された。

野生型マウスにおいては、日内休眠の直前は平常時と同様の CIRP 遺伝子発現機構における選択的スプライシングパターンを示し、日内休眠の最中には CIRP mRNA に発現が集約していた (図 4)。C57BL/6J マウスの日内休眠において体温は 30°C 程度まで低下し、低体温状態は数時間持続するが、低温障害は起こらないことが知られている。この低体温耐性に CIRP が関与すると思われたが、冬眠型だけでなくバリエーション型マウスも数時間持続する日内休眠を行ない、その後平常体温まで復温したことから、日内休眠で陥る低体温の維持および平常体温への復温にも CIRP は必須ではないと考えるべきである。

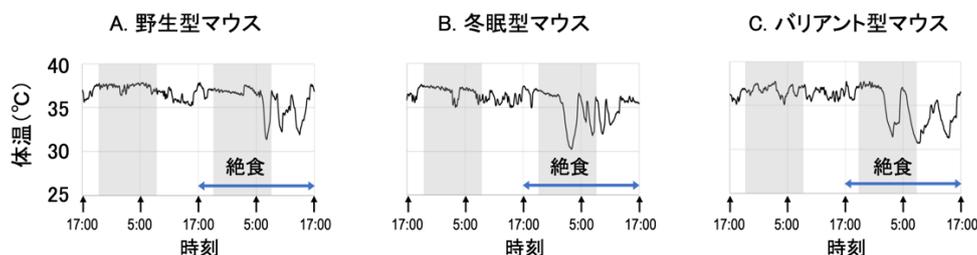


図3: 絶食による日内休眠の誘導

絶食後の体温変化を記録した結果を示す。灰色の部分には暗期、白い部分には明期を示す。両矢印で示した期間に絶食を行なった。A は野生型マウスの体温、B は冬眠型マウスの体温、C はバリエーション型マウスの体温を示す。

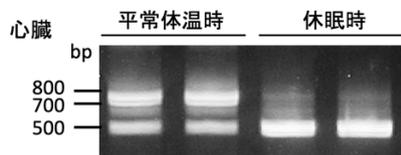


図4: 日内休眠時の心臓における CIRP mRNA 発現

平常体温時と日内休眠時の野生型マウス、それぞれ 2 個体から心臓を摘出し、CIRP の RT-PCR 産物の電気泳動像を示す。写真横の数字は電気泳動におけるマーカーの位置を示す。日内休眠時の個体は、採材時に体温が 32°C を下回った個体を用いた。

(4) CIRP 遺伝子ゲノム編集マウスにおけるイソフルランによる強制低体温誘導

CIRP 遺伝子発現機構における選択的スプライシングの変化が、日内休眠で経験する温度域を下回る低体温への耐性に寄与するかどうかを検討した。野生型およびゲノム編集マウスをイソフルラン麻酔下で冷却し、直腸温度を 15°C まで急激に低下させ 1 時間維持した。いずれのマウスにおいても、体温低下に伴い心拍数、呼吸数が減少した。野生型とバリエーション型は各 2 例が 15°C の直腸温度に到達前または 15°C で維持中に心停止を引き起こした (図 5)。冬眠型は 1 例が直腸温度 15°C で維持中に心停止した。野生型とバリエーション型の各 3 例および冬眠型の 4 例が直腸温度 15°C で 1 時間維持後も生存した (図 5)。心電図解析のスコアをもとに、強制低体温誘導中の不整脈と徐脈の区間を色付けたところ、野生型およびバリエーション型と比較して冬眠型マウスは不整脈や致命的な徐脈の発生が少ないことが判明した (図 5)。

15°C で 1 時間維持した後にマウスの心臓を採材し、HE 染色により心臓の組織学的評価を行なった。野生型、冬眠型およびバリエーション型マウスの強制低体温誘導群において、心筋細胞に細胞腫大を伴う水腫変性、細胞質の好酸性増加、核濃縮を無処置群より顕著に認められた (図 6)。野生型、冬眠型およびバリエーション型いずれにおいても、15°C で 1 時間維持した個体では左心壁の広範囲にわたって心筋細胞の変性が見られたことから、少なくとも 15°C、1 時間の強制低体温誘導ではスプライシング調節の有無が絶対的に生死を決定するものではないといえる。

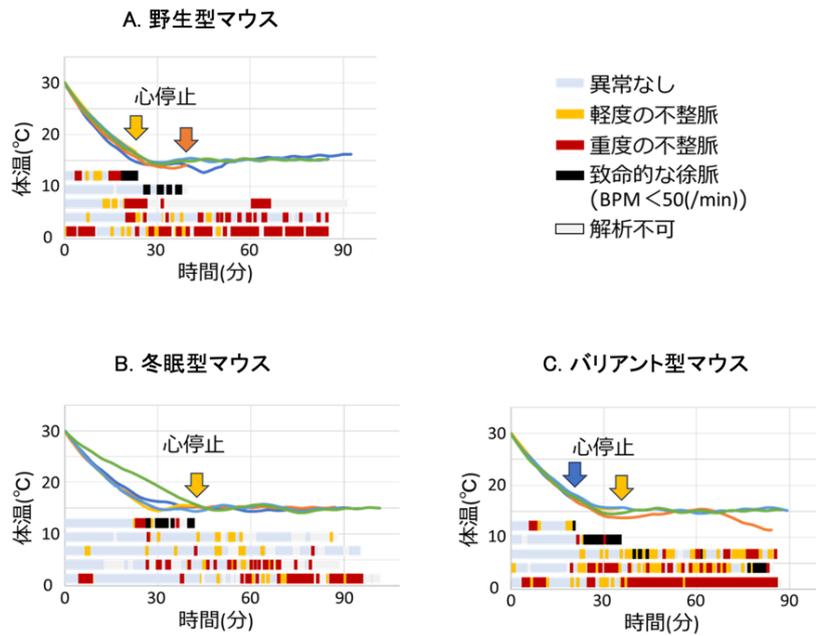


図5: 強制低体温誘導時の体温変化と心電図解析結果

15°C、1時間の強制低体温誘導を行なった野生型およびゲノム編集マウスの体温変化および心電図解析の結果を示す。体温30°C付近を0分とし、各個体の体温変化を示す。心停止を確認した時点体温変化に対応する色の矢印で示す。下のバーは各個体の心電図解析の結果を示す。異常なしの区間を薄い青色、軽度の不整脈を呈した区間を黄色、重度の不整脈を呈した区間を赤色、致命的な徐脈を呈した区間を黒色、解析不能の区間を薄い灰色で示す。Aは野生型マウス、Bは冬眠型マウス、Cはバリエント型マウスの結果を示す。

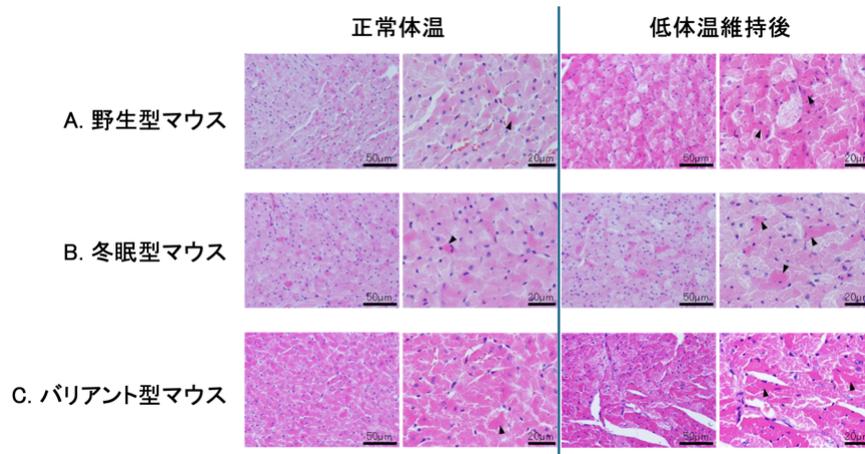


図6: 無処置および強制低体温誘導後の心臓の組織像

正常体温群および強制低体温誘導群の野生型およびゲノム編集マウスにおける心臓の組織像を示す。細胞腫脹と淡明な細胞質を特徴とする水腫変性、細胞質の好酸性増加(矢頭)、核濃縮が見られた。

(5) まとめ

本研究により、CIRP遺伝子発現機構における選択的スプライシングの変化が低体温時の心機能の維持に寄与する可能性が示唆された。また、CIRP遺伝子発現における選択的スプライシング調節機構は、非冬眠動物であるマウスと冬眠動物であるハムスターとで類似していることから、非冬眠動物においても低体温時の低温耐性の獲得にCIRPが寄与する可能性が見いだされた。現在、ランゲンドルフ灌流心の実験装置による心収縮の測定に取り組んでいる。ランゲンドルフ灌流心実験では、心臓の動きを直接観察することができるため、心収縮の発生だけでなく、刺激伝導系の異常や心収縮の強さも可視化し、CIRPの機能と低温耐性のメカニズムを解明できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 堀井 有希、椎名 貴彦、志水 泰武	4. 巻 81
2. 論文標題 実験室における哺乳動物の冬眠・休眠誘導	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 131 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/lowtemsci.81.131	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋愛佳、白石茂菜実、堀井有希、宮脇慎吾、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69回中部日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋愛佳、白石茂菜実、堀井有希、宮脇慎吾、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 マウスCold-inducible RNA-binding protein 遺伝子における日内休眠時の選択的スプライシング (The alternative splicing of Cold-inducible RNA-binding protein gene in mice during daily torpor)
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀井有希、岡寺香南子、宮脇慎吾、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 スンクス (Suncus murinus) における日内休眠のメカニズムの解析 (Elucidation of the daily torpor mechanism in Suncus murinus)
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋愛佳、白石茂菜実、堀井有希、宮脇慎吾、平田暁大、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) 遺伝子ゲノム編集マウスにおける休眠・低体温誘導
3. 学会等名 第32回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀井有希、倉田真奈美、名 貴彦、志水泰武
2. 発表標題 冬眠動物シリアンハムスターにおける冬眠時の心臓Aktリン酸化
3. 学会等名 第32回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋愛佳、白石茂菜実、堀井有希、宮脇慎吾、平田暁大、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) 遺伝子ゲノム編集マウスにおける日内休眠と低体温誘導
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋愛佳、堀井有希、白石茂菜実、宮脇慎吾、平田暁大、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) 遺伝子ゲノム編集マウスにおける低温耐性の解析
3. 学会等名 第70回中部日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yasutake Shimizu, Yuuki Horii, Kanako Okadera, Takahiko Shiina
2. 発表標題 Suncus murinus as a suitable model for studying daily torpor.
3. 学会等名 The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田紗帆、堀井有希、岡寺香南子、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 スンクス (Suncus murinus) の日内休眠モデルとしての特徴と有用性について
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀井 有希、椎名 貴彦、志水 泰武	4. 発行年 2023年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 384
3. 書名 温度刺激による生体応答ダイナミクス (永島計監修) 分担執筆 「冬眠動物における低温ショックタンパク質の冬眠特異的遺伝子発現メカニズム」 pp. 167-175	

〔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	堀井 有希 (Horii Yuuki) (20888531)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (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	宮脇 慎吾 (Miyawaki Shingo) (70756759)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (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