

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01066

研究課題名(和文) 哺乳類の低代謝機構を応用した革新的組織保存法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel tissue preservation method via mammalian hypometabolism

研究代表者

高橋 政代 (Takahashi, Masayo)

立命館大学・総合科学技術研究機構・教授

研究者番号：80252443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,800,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部のQRFP陽性神経を興奮させて複数日の低代謝を誘導するQ神経誘導性低代謝(QIH)を開発した。これにより、任意のタイミングでマウスを冬眠様状態に誘導できるようになり、冬眠研究に大きく貢献した。次に、休眠表現型の異なるマウス系統由来のES細胞を用いて低温培養における代謝を観察し、STM2由来のES細胞は、他の系統と比較し低温培養時に解糖系の抑制が少ないこと、遺伝子発現解析で電子伝達系複合体の一部の遺伝子発現が抑制されていることを見出した。最後に、「温かい冬眠」を利用して、冬眠様マウスの臓器の遺伝子発現解析を行い、体温とは無関係に低代謝と相関する低代謝耐性遺伝子をリストアップした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では冬眠に代表される哺乳類の低代謝機構を応用した革新的組織保存法の開発を行った。自然界の休眠現象は研究開発に用いづらいため、本研究では人工的に冬眠様状態を誘導できる動物モデルを開発した。また、ゲノム背景が完全に異なる近交系マウスの休眠表現型から、細胞レベルの低温耐性が異なることを突き止めた。本研究で明らかになった冬眠モデルマウスやマウスES細胞の低代謝耐性は今後の組織保存法の開発の土台になるだけでなく、将来の人工冬眠技術の開発に向けて大きな前進であり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：(1) We have developed a method called Q neurons-induced hypometabolism (QIH), which induces a state of low metabolism for several days by exciting QRFP-positive neurons in the mouse hypothalamus. This has allowed us to induce a hibernation-like state in mice at any given moment, making a significant contribution to the hibernation research field. (2) We utilized embryonic stem (ES) cells derived from different mouse strains exhibiting distinct fasting-induced torpor phenotypes to observe metabolism under low-temperature cultures. We discovered that the glycolytic pathway was less suppressed in STM2-derived ES cells during low-temperature culture compared to other strains. (3) We utilized the concept of "warm hibernation" to conduct a gene expression analysis of organs from hibernation-like mice. This enabled us to generate a list of hypometabolism-resilient genes that correlate with low metabolism independent of body temperature.

研究分野：再生医療

キーワード：休眠 冬眠 組織保存 再生医療 低代謝耐性

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療の普及にはドナー組織の安定した供給に加えてドナー組織の安全な長期保存が不可欠である。しかし、2018年時点で最適なドナー組織保存手法が確立されていなかった。本研究はドナー組織を長期間保存するために、冬眠由来の低代謝メカニズムを応用するという奇抜な発想を元に計画された。当研究室では2016年頃に日内休眠を自在に誘導できるマウスの開発に成功していた (Sunagawa GA & Takahashi M, *Sci Rep*, 2016)。この冬眠様モデルマウスによって、哺乳類の低代謝研究は近代的な遺伝学的手法を駆使できる分野に変貌を遂げることが予想された。そこで、本研究では低代謝に必要な遺伝子ネットワークや小分子を検索し、当研究室で製造しているヒト iPS 細胞由来網膜シートを用いて低代謝保存を実証することをめざした。再生医療がより多くの患者に行き渡るように、冬眠を応用したドナー組織の新規保存法の開発を目指したのである。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は哺乳類の低代謝能をヒト組織の保存に応用することである。つまり、ドナー組織を安全かつ自然に長期保管するために、自然が生んだ能動的低代謝の原理を明らかにし、能動的低代謝を人為的に組織で実現することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養網膜組織を用いた低代謝誘導液性因子の検索

研究代表者らはマウスの能動的低代謝である「絶食性休眠」を自在に誘導できる系を構築している (Sunagawa and Takahashi, 2016)。休眠中の個体は全身の代謝が低下していることから、代謝を低下させる液性因子の存在が考えられる。そこで、休眠を自在に誘導できる系を活かし、休眠中のマウスから組織をサンプルし能動的低代謝を誘導できる物質を探索する。

### (2) 臓器横断的な低代謝適応原理の解明

研究代表者らは休眠動物の骨格筋の CAGE 解析を行うことで休眠特異的な遺伝子発現およびプロモーター配列を推定し、個体の代謝状況によってプロモーターの分布が異なることを見出している (Sunagawa et al., bioRxiv, 2018, doi: 10.1101/374975)。同様の手法を多臓器に広めることによって、個体レベルの低代謝適応能に結びつく多臓器に共通した遺伝子を同定する。

## 4. 研究成果

### (1) 冬眠モデルマウスの開発

本課題では、当初、絶食性休眠マウスの臓器サンプリングを行い、遺伝子発現を解析する予定であったが、絶食性休眠によって休眠を誘導すると休眠期間が数時間しかなく、安定したサンプリングを行うことが困難であったため、より安定した休眠を誘導できる系を開発した。具体的にはマウスの視床下部の QRFP 陽性神経を化学遺伝学・光遺伝学的手法で興奮させると、複数日に渡ってマウスの代謝を低下できることを示した (図1、Takahashi TM, et al., *Nature*, 2020)。

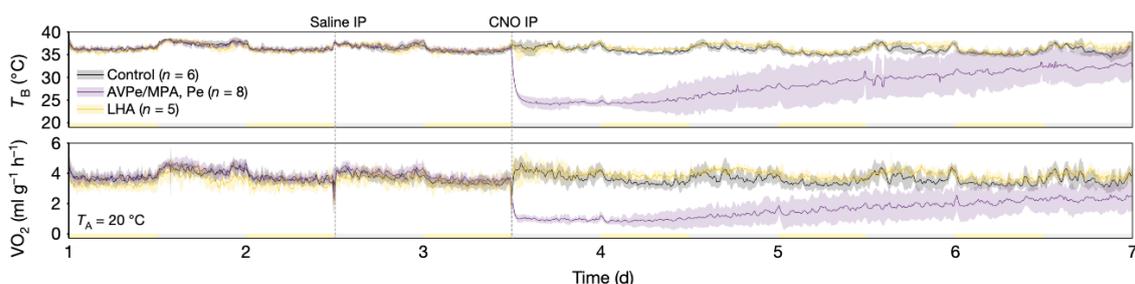


図1 Q神経誘導性低代謝による代謝経時変化 (Takahashi TM, et al., *Nature*, 2020)

この低代謝をQ神経誘導性低代謝(QIH; Q neurons-induced hypometabolism)と名付けた。QIHを誘導すると、マウスの体温セットポイントの低下、数日間にわたる摂食抑制、外部加温なしで低代謝からの回復、など冬眠に酷似した表現型が見られる。冬眠をしないマウスを任意のタイミ

ングで冬眠様状態に誘導できることから、摂動実験が困難であった冬眠研究に大きなインパクトを与えた。また、マウスという実験動物としてもっとも開発が進んでいる動物種において冬眠研究ができるようになった意味も大きい。

### (2) 休眠表現型とマウス ES 細胞の代謝の関連性を精査

本課題では、マウスが有する能動的低代謝の制御機構を明らかにし、試験管内で低代謝を再構成することを目的としていた。そこで、絶食性休眠の表現型が異なる複数のマウス系統の ES 細胞を用いて、培養温度が異なる際の代謝評価（細胞倍加時間、糖消費速度、酸排出速度、酸素消費量、乳酸排出速度など）を行い、マウスの近交系に含まれる休眠能の原理を明らかにしようとした。対象とした3つの近交系のうち、最も休眠表現型が深い（休眠時の代謝が低い）系統である STM2 由来の ES 細胞は他の系統由来の ES 細胞と比べて低温培養を行った際に解糖系の抑制が少ないことがわかった。さらに、対象とした近交系由来の ES 細胞を異なる温度で培養した際の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、STM2 は電子伝達系複合体の一部の遺伝子発現が抑制されていることを見出した。

### (3) 温かい冬眠を活用した低代謝耐性遺伝子のリストアップ

本課題では多臓器にわたる低代謝耐性遺伝子を同定することを目的としていた。多臓器の遺伝子発現解析に先駆けて、絶食性休眠を誘導したマウスの骨格筋の CAGE 解析を行うことで休眠特異的な遺伝子発現およびプロモーター配列を推定し、Atf3 が休眠時の骨格筋で発現が上昇し、Atf3-KO の絶食性休眠の表現型が減弱することをつきとめた(図 2、Deviatiarov R, et al., *Commun Biol.*, 2021)。QIH は冬眠に酷似した状態であるため、QIH によって生じる冬眠様状態の臓器にどのような変化が起きているかを把握することは、試験管内で休眠状態を再構成するために極めて重要である。そこで、QIH を誘導したマウスの臓器の遺伝子発現を解析することで低代謝耐性に関する遺伝子を同定することを試みた。これまでにも冬眠動物で多く遺伝子発現解析が行われてきているが、大きな問題として冬眠・非冬眠時を比較すると必ず低体温の影響を含んだ評価になることである。QIH は環境温度を高く保つことで、休眠状態だが体温は低下していない状態、すなわち「温かい冬眠」を作ることができる。そこで、本課題では温かい冬眠を取り入れることで、体温とは無関係に低代謝と相関する遺伝子リストを得た。現在、同遺伝子群が休眠に及ぼす影響を CRISPR/Cas9 技術を用いてノックアウトマウスを作成し F0 世代の休眠表現型解析で検証している。

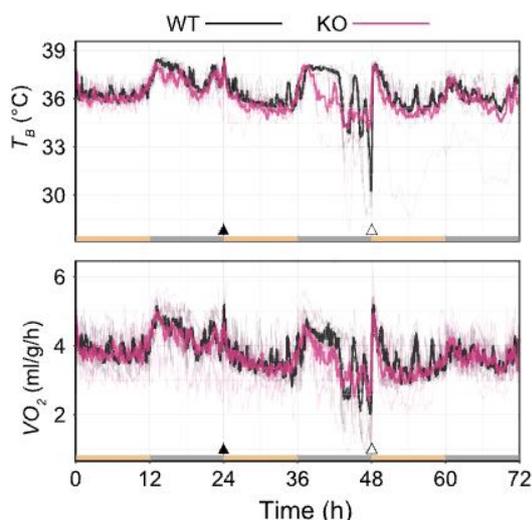


図 2 Atf3-KO マウスは絶食性休眠の表現型が減弱する (Deviatiarov R, et al., *Commun Biol.*, 2021)

### <引用文献>

1. Deviatiarov R, Ishikawa K, Gazizova G, Abe T, Kiyonari H, Takahashi M, et al. Integrative transcription start site analysis and physiological phenotyping reveal torpor-specific expression program in mouse skeletal muscle. *Commun Biol.* 2021;4: 1290.
2. Takahashi TM, Sunagawa GA, Soya S, Abe M, Sakurai K, Ishikawa K, et al. A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature.* 2020;583: 109-114.
3. Sunagawa GA, Takahashi M. Hypometabolism during Daily Torpor in Mice is Dominated by Reduction in the Sensitivity of the Thermoregulatory System. *Sci Rep.* 2016;6: 37011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Deviatiiarov Ruslan, Ishikawa Kiyomi, Gazizova Guzel, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Takahashi Masayo, Gusev Oleg, Sunagawa Genshiro A.	4. 巻 4
2. 論文標題 Integrative transcription start site analysis and physiological phenotyping reveal torpor-specific expression program in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	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） 10.1038/s42003-021-02819-2	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 砂川玄志郎	4. 巻 6
2. 論文標題 休眠とその医学応用可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 978-981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Takahashi Tohru M., Sunagawa Genshiro A., Soya Shingo, Abe Manabu, Sakurai Katsuyasu, Ishikawa Kiyomi, Yanagisawa Masashi, Hama Hiroshi, Hasegawa Emi, Miyawaki Atsushi, Sakimura Kenji, Takahashi Masayo, Sakurai Takeshi	4. 巻 583
2. 論文標題 A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2163-6	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 砂川玄志郎	4. 巻 13
2. 論文標題 睡眠と冬眠と代謝	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 睡眠医療	6. 最初と最後の頁 137-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa, Hidetoshi Masumoto
2. 発表標題 A warm hibernation can protect organs from ischemia
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa, Hidetoshi Masumoto
2. 発表標題 Warm hibernation enabled: revolutionizing hibernation research with QIH
3. 学会等名 BDR Symposium 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa
2. 発表標題 Can we hibernate? R&D toward synthetic hibernation for humans
3. 学会等名 第2回Workshop on Nobel Turing Challenge (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川玄志郎
2. 発表標題 「人口冬眠の実現に向けて～マウスを用いた冬眠研究～」
3. 学会等名 第48回神経内分泌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Genshiro A. Sunagawa
2. 発表標題 QRFP産生ニューロンからはじまるマウスの冬眠様状態
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川玄志郎
2. 発表標題 冬眠は救急医療に有用か？～脳から始まる能動的代謝による急性期疾患の管理～
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川玄志郎
2. 発表標題 Can torpor delay disease progression?
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川玄志郎
2. 発表標題 Can torpor delay disease progression?
3. 学会等名 第44回 分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 人工冬眠へ向けて; 非冬眠動物における冬眠様状態の誘導
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 The physiological aspects of Q neurons-induced hypometabolism (QIH)
3. 学会等名 The 16th International Hibernation Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 A hibernation-like condition in mice: the physiological aspects of Q neurons-induced hypometabolism.
3. 学会等名 第43回 分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 冷たいことには理由がある ~冬眠から考える人類の未来~
3. 学会等名 日本神経科学大会 市民公開パネルディスカッション「2050年の脳科学と社会」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents
3. 学会等名 Hibernation Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 Daily torpor in mice as a model of active hypometabolism in mammals
3. 学会等名 NEURO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 マウスの日内休眠における骨格筋の遺伝子発現の変化
3. 学会等名 第22回日本脳低温療法・体温管理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 冬眠の臨床応用に向けて：能動的低代謝を体温管理療法に応用できるか？
3. 学会等名 第22回日本脳低温療法・体温管理学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 冬眠様状態を誘発する方法およびそのための装置	発明者 櫻井武、高橋徹、砂川玄志郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-178611	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	砂川 玄志郎  (Sunagawa Genshiro)  (70710250)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員   (82401)	
研究分担者	万代 道子  (Mandai Michiko)  (80263086)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・副プロジェクトリーダー   (82401)	
研究分担者	T u H u n g Y a  (HungYa Tu)  (10780835)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員   (82401)	

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
---------	---------