

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592676

研究課題名(和文)高温耐性ラットである FOK ラットの高温環境下での遺伝子発現・制御システムの解明

研究課題名(英文) The mechanism of the gene expression of heat resistant FOK rats in the hot environment

研究代表者

増田 和彦 (Masuda, Kazuhiko)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00381799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円

研究成果の概要(和文)：高温耐性ラットである FOK ラットについて、細胞レベルにおいても高温耐性かどうか FOK およびコントロールラットである WKAH ラットの皮膚から単離した線維芽細胞を用いて高温環境下での細胞生存率に関して比較検討を行った。結果は、45℃で15分、30分の高温環境下で FOK の線維芽細胞の方がコントロールの細胞に比べて生存率が高い傾向を認めた。また、高温環境下に置く10時間前に45℃8分間の熱処理(Pre-heating)を行うと、45℃45分、60分、75分においてもコントロール細胞に比べて生存率が高まる傾向を認めた。以上により、細胞レベルにおいても高温耐性の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Whether fibroblasts of the FOK rats have the character of the heat resistant, exponentially growing cells of the FOK rats and the control WKAH rats were immersed in a water bath maintained at 45℃ for 15, 30, 45, 60, and 75 min. Cell viability of FOK rat fibroblasts showed higher resistant to heat treatment at 45℃ for 15 and 30 min than did control WKAH rat fibroblasts. Furthermore, the both cells were conditioned by preheating (45℃, 8 min), incubating at 37℃ for 10 hours, then exposing to a heat treatment at 45℃ for 15, 30, 45, 60, and 75 min. That preheating increased cell viability of FOK rat fibroblasts at 45℃ for all periods when compared with that of control WKAH rat fibroblasts. It suggests that FOK rat fibroblasts have the character of the heat resistant.

研究分野：救急医学、実験動物学

キーワード：FOKラット 高温耐性ラット 線維芽細胞 DNA障害 Pre-heating

1. 研究開始当初の背景

マウスを使用した動物実験や、実際に救急外来において搬送される重症の熱中症患者において深部体温が 40 を越えるような場合は全身に様々な障害を引き起こし、状態によっては不可逆的な変化を引き起こすことが数々の臨床研究によって明らかにされている。そこで、その不可逆的な変化を引き起こすメカニズムを解明することが熱中症患者の病態を理解する上で重要であると考えられる。

当研究機関である名古屋市立大学大学院医学研究科には、脳神経生理学教室の古山富士弥博士らが開発した近交系高温耐性ラットである FOK ラットが系統維持されている。古山博士らの論文によれば、この FOK ラットは 37.5~42.5 の高温環境下において深部体温が 40 以上に上昇することなく 39.5±0.7 の体温で数時間維持することができるたいへんユニークなラットである。そこで我々は FOK ラットの耐性メカニズムを研究し解明することが、熱中症患者における上記の不可逆的な変化を予防、診断及び治療につながる何らかの手段が得られるのではないかという発想をもとに本研究課題の着想に至った次第である。

FOK ラットに関する論文は現在までいくつか報告されている。それらの報告によれば、高温耐性メカニズムについて、FOK ラットは高温環境下では唾液腺分泌が増加しその気化熱を利用する戦略をとっていると報告をされている。しかしながらその詳細については未だ不明な点があると思われる。そこで、当該研究期間を FOK ラットの高温耐性メカニズムの基礎的研究期間と設定し、「他の系統ラットと比較して、高温環境下において FOK ラットの細胞内では高温耐性をもたらすどのような遺伝子発現・制御システムが存在するのか」についてあきらかにしたい。

近年の研究手法の進歩により、マウスやラットをはじめ様々な遺伝子操作動物が作られ、研究に応用されている。古山博士らの論文によれば、その中でも FOK ラットは、Wister ラットを出発点として高温環境下でのセレクションを行っているものの遺伝子操作を行わずに高温耐性を獲得した希少なラットであり、当研究機関である名古屋市立大学大学院医学研究科が誇る、ひいては日本が世界に誇る大変ユニークなラットである。

近年、環境問題に取り組む元アメリカ合衆国副大統領アル・ゴア氏と気候変動に関する政府間パネル (IPCC) が 2007 年度のノーベル平和賞を受賞した事実等により、気候温暖化問題への関心は、世界規模でもかつてない高まりをみせている。国内においても、毎年「猛暑」による熱中症患者の増加が社会問題化するとともに、その対策に注目が集まっている。このような状況から、高温耐性を獲得している FOK ラットを用い、その基礎的研究を行うことは、学術的にもたいへん有意義で

あり、社会的に貢献度も高く、また、急務でもある。そして、本研究の研究成果をさらに発展させることで、将来的には臨床応用も可能であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 古山博士らの論文によれば、FOK ラットは 37.5~42.5 の高温環境下において深部体温が 40 以上に上昇することなく 39.5±0.7 の体温で数時間維持することができる。さらに、強度の低温環境下においても大きな体温の低下は認めなかったとする報告があり、以上から、FOK ラットには高温環境下において高温耐性をもたらす独自の遺伝子発現・制御システムが存在すると推測される。

(2) 高温環境下において高温耐性をもたらす FOK ラット独自の遺伝子発現・制御システムを見つけ出すことができれば、

例えば、

高温耐性をもたらす原因遺伝子にたどりつく実験、

上記の遺伝子発現・制御システムにおいて発現が上昇している遺伝子について、ヒトでの発現の上昇の有無を調べて熱中症とのかわりを研究する実験

など、その後において様々な発展的な研究を展開することが可能と考える。

3. 研究の方法

(1) FOK ラット及びコントロールラットである WKAH ラットの胸腹壁の皮膚から線維芽細胞を単離・培養した。

(2) 両者において高温環境下での細胞生存率を調べる実験系を確立した。その実験系とは、40、42.5、45 に設定した恒温槽に、線維芽細胞を培養している 6cm シャーレを沈まない程度に 15分、30分、45分、60分、75分間浸した。その後、細胞を集めて 96 ウェルプレートに 5000 個ずつ移し、24 時間、48 時間、72 時間後にマイクロプレートリーダーによる 480nm の吸光度測定することで線維芽細胞の細胞生存率を測定、比較した。

(3) 上記 6cm シャーレを 45 の高温環境下に置く約 10 時間前に 45 の恒温槽に 8 分間浸し (Pre-heating)、37 で通常培養を約 10 時間施行後、(2) と同様の方法で、45 に設定した恒温槽に、線維芽細胞を培養している 6cm シャーレを沈まない程度に 15分、30分、45分、60分、75分間浸した。その後、細胞を集めて 96 ウェルプレートに 5000 個ずつ移し、24 時間、48 時間、72 時間後にマイクロプレートリーダーによる 480nm の吸光度測定することで線維芽細胞の細胞生存率を測定、比較した。

4. 研究成果

(1) 40 の高温環境下では、むしろFOKラットよりWKAHラットの線維芽細胞の生存率の方が高い傾向を認めた。
(Fig.1~Fig.6)

Fig.1 : FOK及びWKAH線維芽細胞を40 の高温環境下(15分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

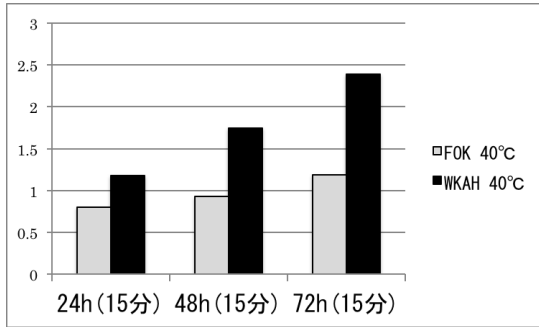


Fig.2 : FOK及びWKAH線維芽細胞を40 の高温環境下(30分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

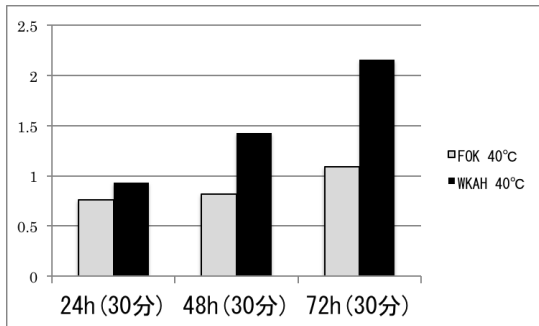


Fig.3 : FOK及びWKAH線維芽細胞を40 の高温環境下(45分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

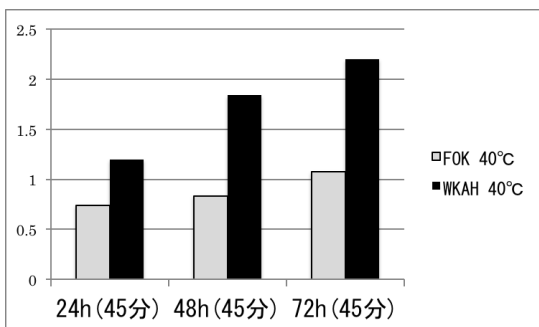


Fig.4 : FOK及びWKAH線維芽細胞を40 の高温環境下(60分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

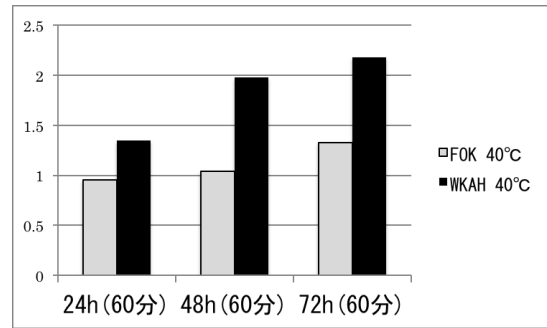


Fig.5 : FOK及びWKAH線維芽細胞を40 の高温環境下(75分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

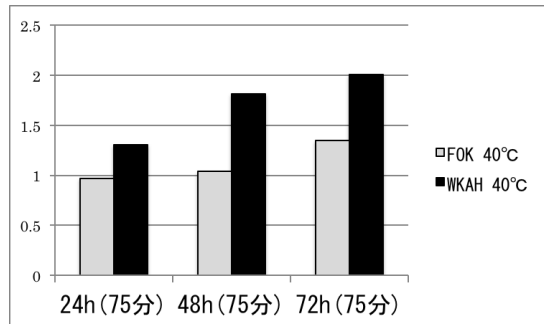


Fig.6 : Fig.1~5のまとめ

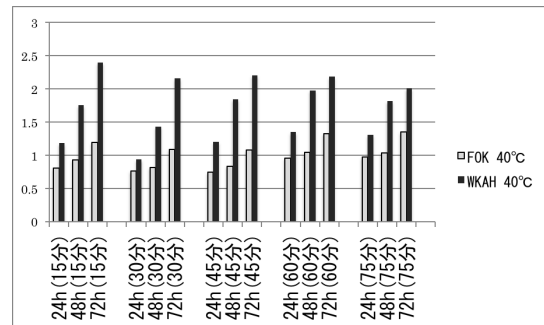


Fig.2 : FOK及びWKAH線維芽細胞を42.5 の高温環境下(15分、30分、45分、60分、75分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

(2) 42.5 の高温環境下においても、FOKラットよりWKAHラットの線維芽細胞の生存率の方が高い傾向を認めた。
(Fig.7~Fig.12)

Fig.7 : FOK及びWKAH線維芽細胞を42.5 の高温環境下(15分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

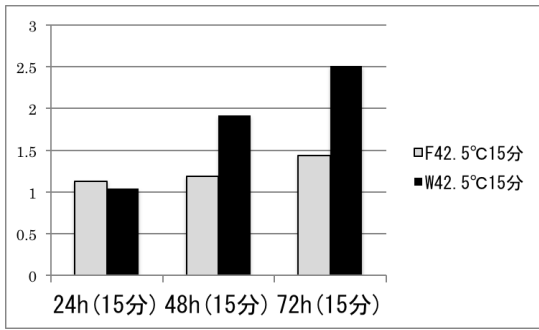


Fig.8 : FOK及びWKAH線維芽細胞を42.5 の高温環境下(30分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

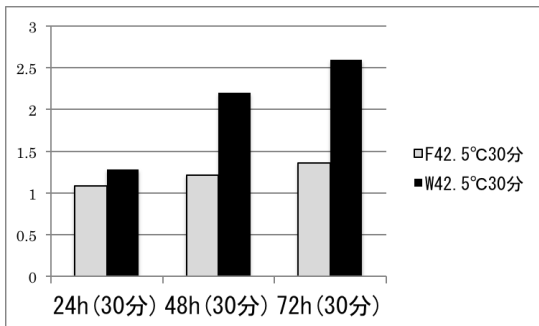


Fig.9 : FOK及びWKAH線維芽細胞を42.5 の高温環境下(45分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

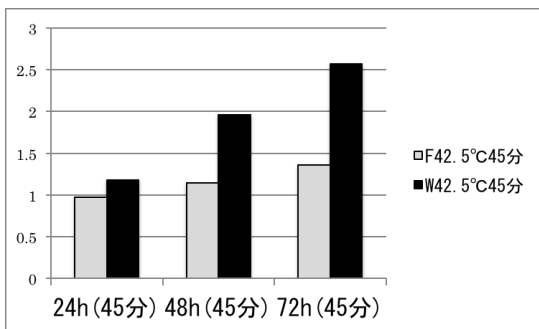


Fig.10 : FOK及びWKAH線維芽細胞を42.5 の高温環境下(60分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

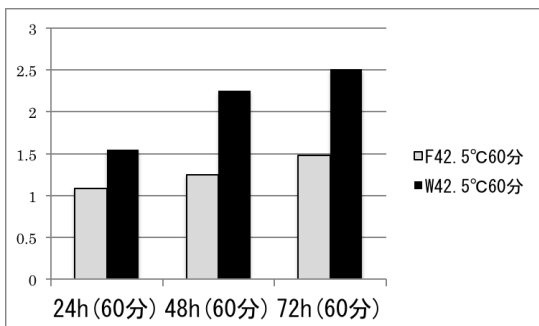


Fig.11 : FOK及びWKAH線維芽細胞を42.5 の高温環境下(60分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

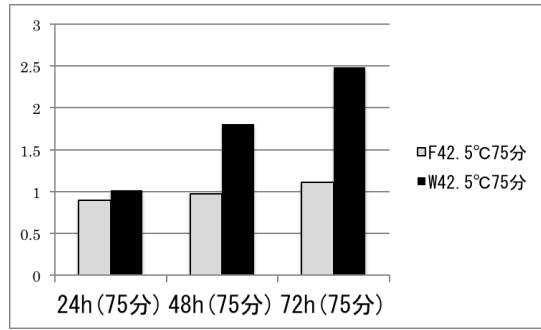
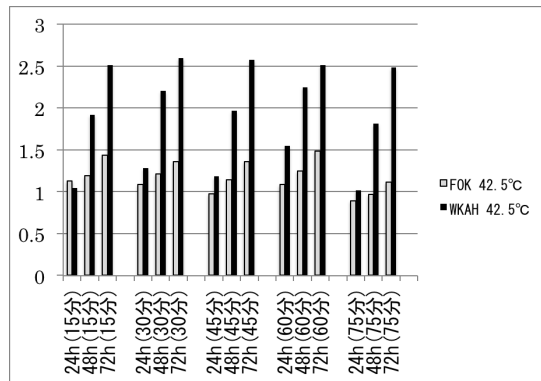


Fig.12 : Fig.7~11のまとめ



(2) 45 の高温環境下では15分、30分処理後の24時間、48時間後の細胞生存率においてFOKラットの線維芽細胞の方がWKAHラットより高い傾向を認めた。(Fig.13~Fig.18)

Fig.13 : FOK及びWKAH線維芽細胞を45 の高温環境下(15分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

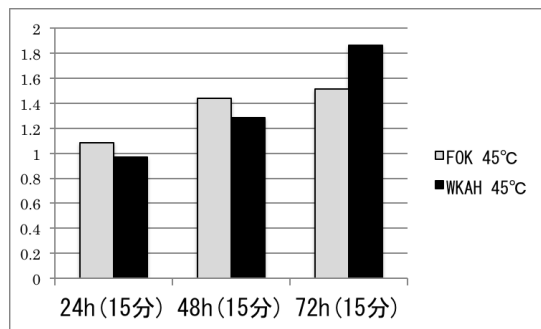


Fig.14 : FOK及びWKAH線維芽細胞を45 の高温環境下(30分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

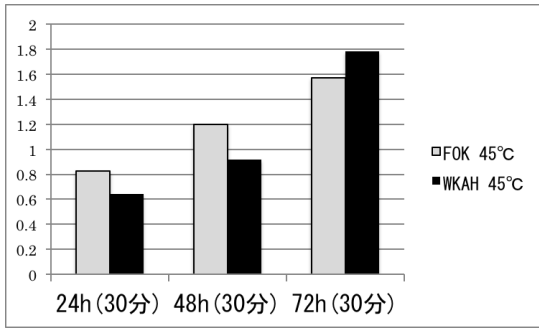


Fig.15: FOK及びWKAH線維芽細胞を45 °Cの高温環境下(45分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

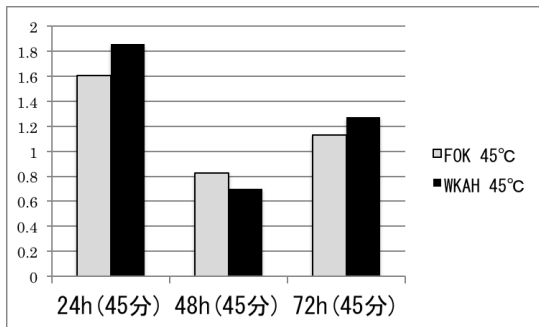


Fig.16: FOK及びWKAH線維芽細胞を45 °Cの高温環境下(45分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

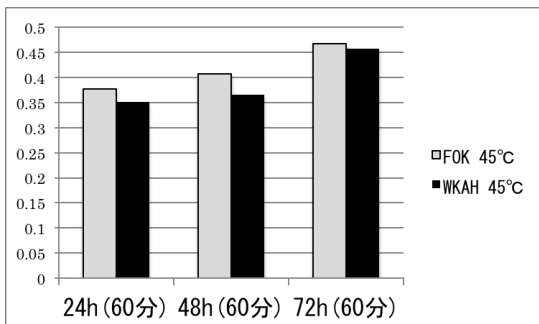


Fig.17: FOK及びWKAH線維芽細胞を45 °Cの高温環境下(45分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

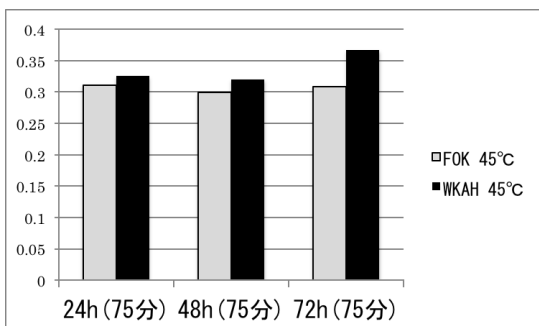
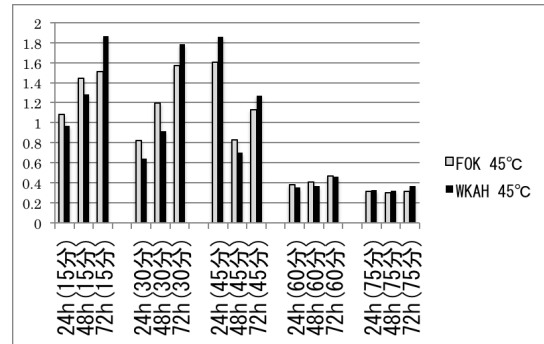


Fig.18 : Fig.13~17 のまとめ



(3) Pre-heatingを行った場合、細胞生存率は両者とも改善し、さらにWKAHラットに比べてFOKラットの線維芽細胞の方が45 °C 15分、30分、45分、60分、75分のすべてにおいて生存率が高い傾向を認めた。(Fig.19~Fig.24)

Fig.19: FOK及びWKAH線維芽細胞を45 °C 8分間のPre-heating施行し、約10時間後に高温環境下(15分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

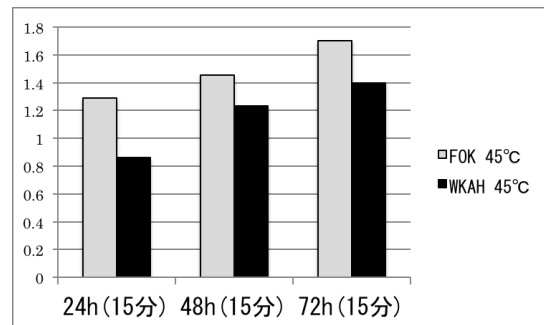


Fig.20: FOK及びWKAH線維芽細胞を45 °C 8分間のPre-heating施行し、約10時間後に高温環境下(30分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

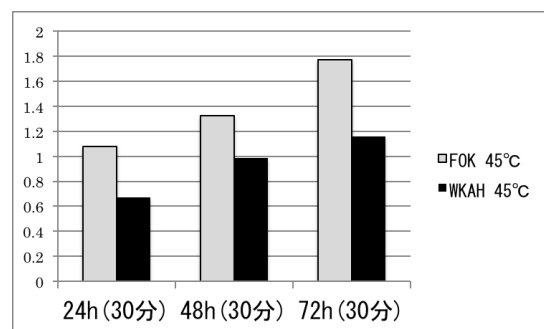


Fig.21: FOK及びWKAH線維芽細胞を45 °C 8分間のPre-heating施行し、約10時間後に高温環境下(45分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

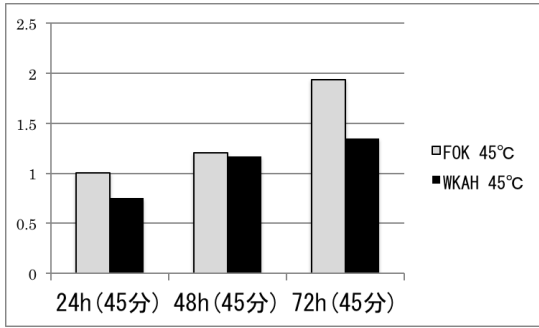


Fig.22 : FOK及びWKAH線維芽細胞を45 8分間のPre-heating施行し、約10時間後に高温環境下(60分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

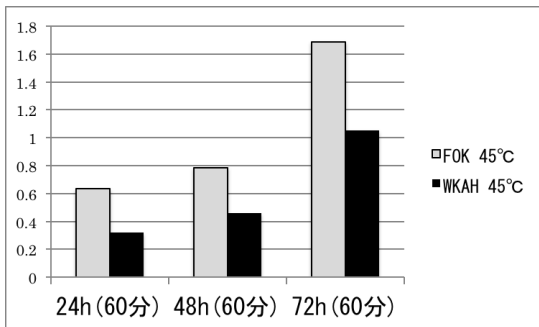


Fig.23 : FOK及びWKAH線維芽細胞を45 8分間のPre-heating施行し、約10時間後に高温環境下(75分)で培養後、24時間、48時間、72時間後の吸光度測定値の比較

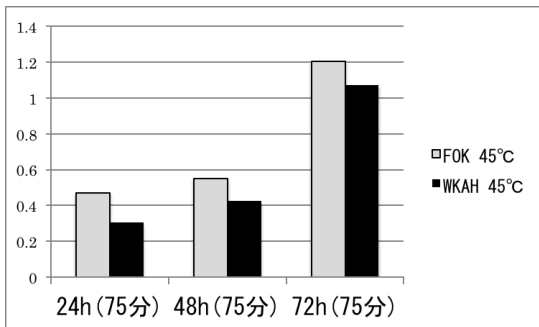
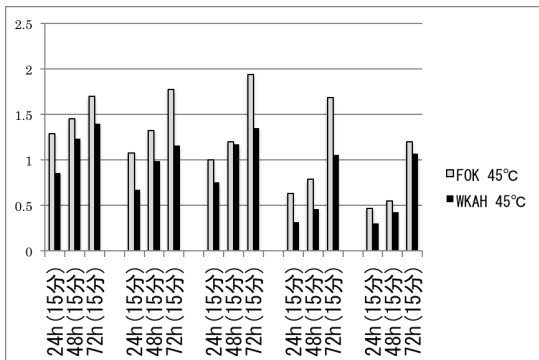


Fig.24 : Fig.19~23 のまとめ



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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

増田 和彦 (Masuda Kazuhiko)
名古屋市立大学・医学研究科・助教
研究者番号：00381799