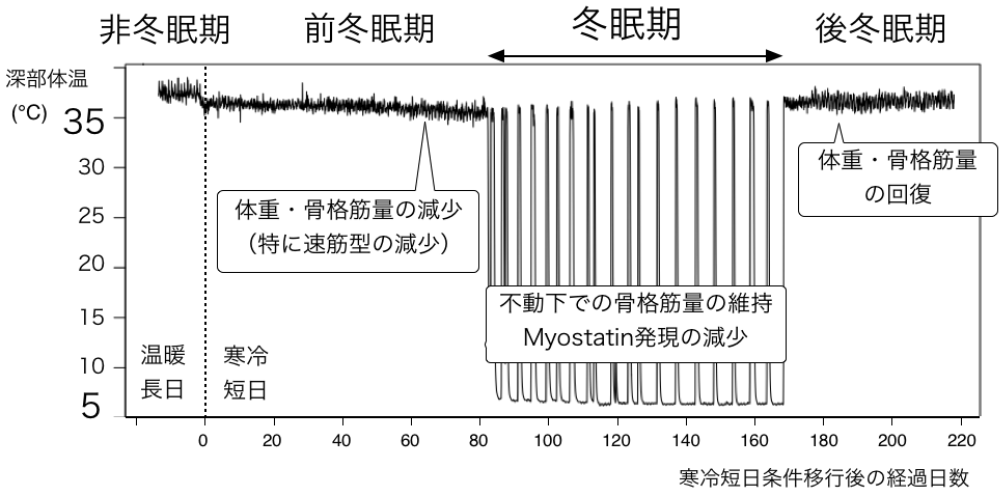
18　冬眠動物が示す筋萎縮耐性能の解析	山口　良文

【目的】哺乳類の冬眠は、全身性の積極的な代謝抑制により低温・乾燥・飢餓といった極限環境下での長期生存を可能とする生存戦略である。ヒトやマウスなど多くの哺乳類は長時間の低体温下では臓器機能を保持できず死に至るため冬眠できないが、一部の哺乳類は 10℃以下まで体温を下げ長期間の冬眠を行う冬眠動物である。この冬眠を可能とする「冬眠耐性」には、低体温とそこからの復温にともなう臓器障害を防ぐ機構（低体温・冷虚血復温障害耐性）に加え、貯蔵白色脂肪組織の効率的な燃焼機構（健康肥満）、長期間の冬期を飢餓・不動状態で過ごすにも関わらず骨格筋が萎縮しない筋萎縮耐性機構（寝たきり耐性）、等が含まれる。本研究では、実験室での冬眠誘導が可能な哺乳類シリアンハムスターを用いて、冬眠動物が示す筋萎縮耐性機構の分子機構に迫ることを目的とした。

【方法】寒冷短日条件での長期飼育によりシリアンハムスターに冬眠を誘導した。このとき、骨格筋がどのような状態にあるのか、全身の骨格筋のうち広背筋と脚部の筋肉において、筋線維タイプマーカーである Myosin 重鎖の発現を定量 PCR と免疫染色により検討した。また、筋萎縮誘導時に発現が上昇することが知られる骨格筋量の負の制御因子である Myostatin の発現も定量 PCR により検討した。

【結果】冬眠期のシリアンハムスターの骨格筋では、非冬眠期に比べ骨格筋量の減少が認められた。しかし、冬眠期の間はその量は一定であった。骨格筋の変化を詳細に検討したところ、筋の部位特異的に、速筋型筋線維 Type Ⅰa および Type Ⅱb のマーカーである Myh2 と Myh4 の発現減少が認められた。また、全身の骨格筋で、Myostatin の発現が冬眠期に顕著に低下していた。さらに、この Myostatin の発現低下は不冬眠個体では見られず、Myostatin は冬眠の発動と連関した発現を示すことが明らかになった。こうした骨格筋の性質変化が、不動状態の筋萎縮耐性機構に寄与する可能性がある。

シリアンハムスターの冬眠生活環における骨格筋の変化



18. 冬眠動物が示す筋萎縮耐性能の解析

山口　良文

北海道大学 低温科学研究所 冬眠代謝生理発達分野

Key words：冬眠，骨格筋，筋萎縮，シリアンハムスター

緒　言

哺乳類の冬眠は、全身性の積極的な代謝抑制により低温・乾燥・飢餓といった極限環境下での長期生存を可能とする生存戦略である［1］。ヒトやマウスなど多くの哺乳類は、長時間の低体温下では臓器機能を保持できず死に至る。一方、哺乳類の一部は 10℃以下まで体温を下げ長期間の冬眠を行うことができる冬眠動物である。この冬眠を可能とする「冬眠耐性」には、低体温とそこからの復温にともなう臓器障害を防ぐ機構（低体温・冷虚血復温障害耐性）に加え、貯蔵白色脂肪組織の効率的な燃焼機構（健康肥満）［2］、長期間の冬期を飢餓・不動状態で過ごすにも関わらず骨格筋がそれほど萎縮しない筋萎縮耐性機構（寝たきり耐性）［3，4］、等の性質から構成されると考えられる。しかし、これら冬眠耐性をもたらす分子機構はほとんど不明である。

我々は、「冬眠耐性」の分子機構に迫るため、実験室環境下での冬眠誘導が可能で、野生由来のリスやクマなどの冬眠動物に比べればはるかに遺伝学的に均一な動物の供給が可能な、シリアンハムスター（*Mesocricetus auratus*）を用いて研究を行なっている［2，5］。シリアンハムスターは、冬眠期の不動下にも関わらずヒラメ筋と横隔膜の骨格筋量を比較的維持することが報告されているが［6］、この筋萎縮耐性の分子機構は、他の小型冬眠動物と同様、未だ不明である［4］。本研究では、この冬眠期の筋萎縮耐性機構の分子メカニズムに迫ることを目指した。

方法および結果

1. 冬眠期の前に骨格筋量が減少し、筋線維タイプが変化する

シリアンハムスターの冬眠生活環（図 1A）における骨格筋の性質変化を、多数個体の剖検により検討した。日本エスエルシー株式会社から 3〜4 週齢で購入し常温長日条件（室温 23〜25℃、明暗周期 明期 : 暗期 ＝ 16 : 8（時間）で体重が約 100 g 以上になるまで 2 ヶ月ほど飼育した雄または雌のシリアンハムスターを、冬眠誘導するために寒冷短日条件（室温 4℃、明暗周期を明期 : 暗期 ＝ 8 : 16（時間）、明期 10 : 00〜18 : 00）へと移行し数ヶ月飼育した。この間、食餌や水は自由摂取可能とした。我々の先行研究から、こうした寒冷短日条件下で動物は、徐々に体重と骨格筋量を減少させるが、冬眠が一旦発動したのち、すなわち冬眠期の間は、体重あたりの骨格筋量は一定に維持されること、さらに寒冷短日条件が継続しているにも関わらず自発的に冬眠を終了させ 1〜2 ヶ月経過した個体では、骨格筋量は再び増加することが明らかになっている（未発表データ）。そこでこの冬眠期の骨格筋において、筋線維タイプの割合が変化するか否か、筋線維特異的発現を示すミオシン重鎖（Myosin Heavy chain）サブタイプの発現量を定量 PCR 法により比較定量することで検討した。その結果、広背筋では TypeⅡb 速筋線維で発現する Myh4 が、前脛骨筋、長趾伸筋、腓腹筋では TypeⅡa 速筋線維で発現する Myh2 が、それぞれの発現が顕著に減少することが明らかとなった。一方、Type Ⅰ遅筋筋線維で発現する Myh7 の発現量は維持されていた（図 1B）。さらに免疫染色により、TypeⅡa 筋線維で Myh2 タンパク質発現量が減少することが確認された（図 1C）。以上の結果から、シリアンハムスターの骨格筋は冬眠期の間、速筋型線維が減少した状態にあることが明らかとなった。

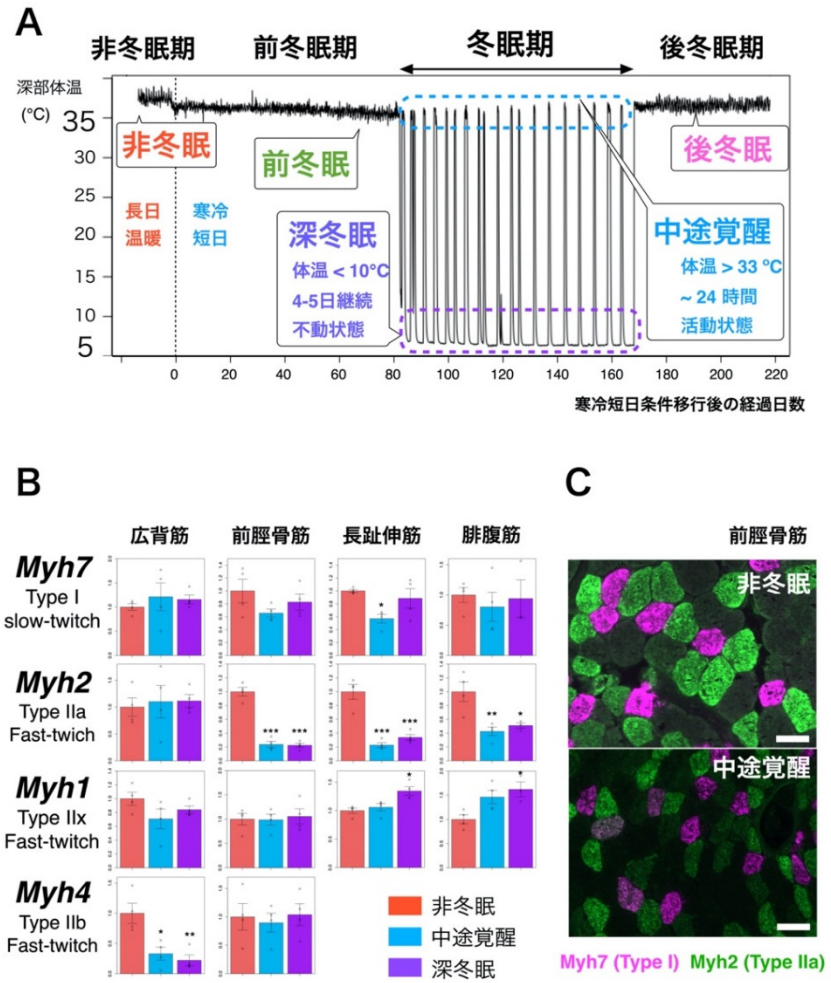


図 1. シリアンハムスターの冬眠生活環における骨格筋量と筋線維タイプの変化

A) シリアンハムスターの冬眠生活環における深部体温変化（縦軸）。温暖長日環境の非冬眠期から、寒冷短日環境に移された動物は、数ヶ月の前冬眠期ののち、極端な体温低下を伴う深冬眠と、そこからの自発的復温による中途覚醒を、幾度も繰り返す冬眠期を開始する。冬眠期は数ヶ月続いたのち、自然と終了し後冬眠期となる。

B) 冬眠期（中途覚醒または深冬眠）の各骨格筋における、筋線維タイプの各マーカー（Myh7、Myh2、Myh1、Myh4）の発現量定量。各群 N＝3～4 個体、mean±sem、One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test。非冬眠との比較：*$p < 0.05$、** $p < 0.01$、*** $p < 0.001$。

C) 免疫染色法による Myh7 と Myh2 の検出。前脛骨筋において、冬眠期（中途覚醒）の個体で Myh2 のシグナルが顕著に減弱した。スケールバー：50 μ m。

2. Myostatin の発現は冬眠期特異的に減少する

Myostatinは骨格筋量を負に制御することが知られるTGB-betaファミリー分子である［7］。ヒトやマウスでは、筋萎縮を誘導する条件下ではMyostatinの発現が誘導されることが知られる。冬眠期の筋萎縮耐性機構に関する知見を得るため、Myostatinの発現量を定量PCR法により検討した。その結果、骨格筋量が減少し不動状態で過ごす冬眠期には、予想に反して、Myostatinの発現量も低下した（図2A）。一方、長期間の冬眠誘導条件（寒冷・短日）下にも関わらず全く冬眠しなかった個体（不冬眠個体）においてMyostatinの発現を調べると、冬眠期の中途覚醒・深冬眠個体で見られるようなMyostatin発現量の低下は見られなかった（図2B）。これらの結果から、Myostatinの発現変動が、単なる長期間の寒冷・短日適応の結果ではなく、冬眠発動と連関することが明らかとなった。

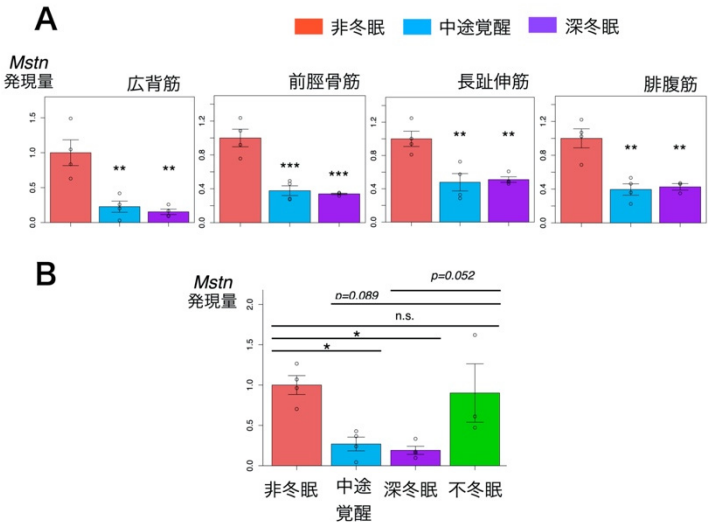


図 2. 冬眠発動と連関した *Myostatin* の発現減少

A) 複数の骨格筋において、冬眠期に *Myostatin* mRNA の発現減少が観察された。

B) 不冬眠個体では *Myostatin* mRNA の発現減少は認められなかった。各群 N = 3～4 個体、mean±sem、One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test。非冬眠との比較：$*p<0.05$、$**\ p<0.01$、$***\ p<0.001$。

考　察

本研究により、シリアンハムスターが冬眠期およびその前後で示す骨格筋の変化様式が明らかになった。冬眠期の骨格筋線維が遅筋型寄りに変化すること自体は、キンイロジリス、マーモット等、他の冬眠動物でも認められている[4]。季節依存性に冬眠を行う季節強依存性冬眠動物であるキンイロジリスでは、この変化が、冬眠開始に先立つ秋の時点から生じるとの報告がある［8］。今回我々が得た結果は、環境変化のみで冬眠を誘導できる条件的冬眠動物であるシリアンハムスターでもキンイロジリスと同様に、骨格筋量の減少とそれに伴う速筋の萎縮という変化が冬眠の発動に先立って生じることを示しており、骨格筋の性質を冬眠期に向けて変化させる未知の機構が冬眠動物に共通に備わっているとも予想される。今後は、冬眠発動の有無との相関が明らかになったMyostatinの発現変動とその機能の追求を、筋幹細胞分化系などの実験操作が容易な*in vitro*系の活用や遺伝子改変個体の作製によりさらに推進することで、冬眠動物が有する不動下での筋萎縮耐性機構の詳細を明らかにしていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の三浦正幸教授である。

文　献

1) Andrews MT. Molecular interactions underpinning the phenotype of hibernation in mammals. J Exp Biol. 2019;222(Pt 2). Epub 2019/01/27. PMID: 30683731 DOI: 10.1242/jeb.160606.

2) Chayama Y, Ando L, Sato Y, Shigenobu S, Anegawa D, Fujimoto T, et al. Molecular Basis of White Adipose Tissue Remodeling That Precedes and Coincides With Hibernation in the Syrian Hamster, a Food-Storing Hibernator. Front Physiol. 2018;9:1973. Epub 2019/02/13. PMID: 30745884 DOI: 10.3389/fphys.2018.01973.

3) Harlow HJ, Lohuis T, Beck TD, Iaizzo PA. Muscle strength in overwintering bears. Nature. 2001;409(6823):997. Epub 2001/03/10. PMID: 11234052 DOI: 10.1038/35059165.
4) Cotton CJ. Skeletal muscle mass and composition during mammalian hibernation. J Exp Biol. 2016;219(Pt 2):226-34. Epub 2016/01/23. PMID: 26792334. DOI: 10.1242/jeb.125401.
5) Chayama Y, Ando L, Tamura Y, Miura M, Yamaguchi Y. Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. R Soc Open Sci. 2016;3(4):160002. Epub 2016/05/07. PMID: 27152216 DOI:10.1098/rsos.160002.
6) Deveci D, Egginton S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters. J Exp Biol. 2002;205(Pt 6):829-40. Epub 2002/03/27. PMID: 11914391.
7) Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. Science. 2002;296(5572):1486-8. Epub 2002/05/25. PMID: 12029139 DOI: 10.1126/science.1069525.
8) Nowell MM, Choi H, Rourke BC. Muscle plasticity in hibernating ground squirrels (Spermophilus lateralis) is induced by seasonal, but not low-temperature, mechanisms. J Comp Physiol B. 2011;181(1):147-64. Epub 2010/08/13. PMID: 20703484 DOI: 10.1007/s00360-010-0505-7.