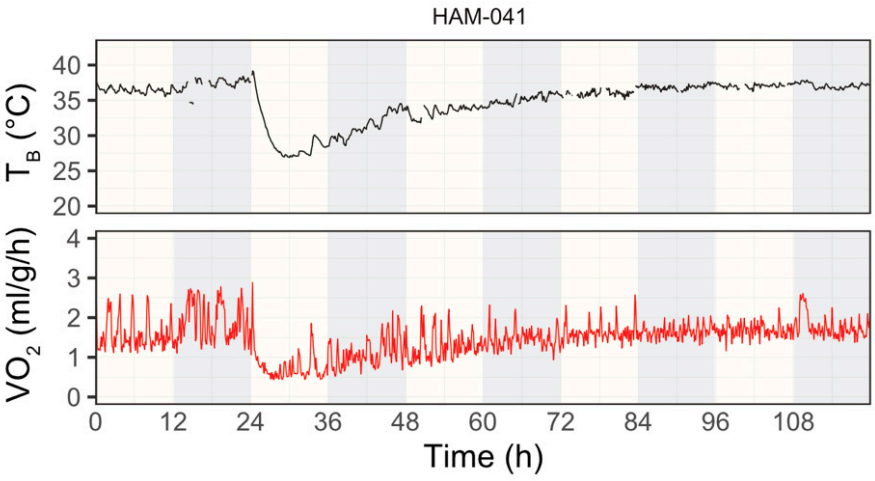
39　冬眠動物の人為的冬眠誘導法の開発	砂川　玄志郎

【目的】冬眠は一部の哺乳類が呈する省エネ機構であり、冬季・飢餓などのエネルギー供給が危機的な状況において、代謝を能動的に低下させることで必要なエネルギーを低下させて、少なくなったエネルギー供給でも生存をはかる戦略である。基礎代謝が正常状態の 1〜30%程度まで低下するのにも関わらず、動物の臓器・組織は障害を受けることなく長時間に渡る低代謝・低体温に耐性を発揮する。このような低代謝適応能を人間に実装し、人工冬眠を実現できれば臨床において高い代謝が原因で障害をもたらす様々な病態に有効であると考えられる。たとえば、急性疾患が発症し病院に搬送されるまでの期間を冬眠することで、現在では救命できない患者を救える可能性がある。冬眠のもつ低代謝適応能を理解するためには冬眠を研究することが王道と言えるが、既存の手法では冬眠動物は任意のタイミングで冬眠を誘導することができない。我々は 2020 年に非冬眠動物であるマウスを冬眠様状態に誘導することに成功した。この冬眠マウスモデルは、視床下部の Qrfp 陽性神経を化学遺伝学・光遺伝学的手法を用いて特異的に興奮させると、冬眠と似た低代謝・低体温状態を数日間に渡って誘導することができる（QIH：Q 神経誘導性低代謝）。QIH の最大の特徴は、誘導開始から約 30 分で冬眠様状態になることである。同冬眠マウスモデルにより冬眠研究の飛躍的な前進が期待される一方、低代謝・低体温の程度が冬眠動物には及ばないという課題も残っている。そこで、本研究課題では我々が開発したマウスの冬眠様状態の誘導法を基盤に、冬眠動物の人為的な冬眠誘導法の開発に挑戦する。

【方法】ハムスターAVPe の神経を興奮させるために、AAV9-CamKⅡ-hM3Dq-mCherry を作製し、シリアンハムスター（オス、10 週齢、n=3）に対して、脳固定装置（David Koph、Model940）にてブレグマより X+0.40 mm；Y 2.56 mm；Z −7.80 mm、にウイルス量 0.3 μL を注射した。AAV の注射から 3 週間後に、体温測定装置を全身麻酔下にて腹腔内に留置した。AAV 投与から 4 週間後に代謝測定装置に移動させ、環境温度が 20℃、明暗周期が 1 日の始まりから明暗=12 時間：12 時間に保たれた環境にて、酸素消費量と体温を 5 日間測定した。測定開始から 24 時間目に CNO（Abcam、ab141704）を生理食塩水に溶解し 100 μg/mL としたものを、腹腔内に投与した（1 mg/kg）。

【結果】ハムスターAVPe の興奮性神経を非特定的に興奮させると、ラットと同様に QIH 様状態が誘導されることが確認された。しかし、冬眠を誘導できなかったため、今後は更に特異度の高い方法でハムスターの Q 神経を興奮させることを検討する。さらに、ハムスターの自然な冬眠を誘導できる神経回路の探索をおこなう。

冬眠動物における QIH 様状態の誘導



39. 冬眠動物の人為的冬眠誘導法の開発

砂川　玄志郎

理化学研究所 生命機能科学研究センター 老化分子生物学研究チーム

Key words：冬眠，ハムスター，AAV，視床下部，低代謝適応

緒　言

冬眠は一部の哺乳類が呈する省エネ機構であり、冬季・飢餓などのエネルギー供給が危機的な状況において、代謝を能動的に低下させることで必要なエネルギーを低下させて、少なくなったエネルギー供給でも生存をはかる戦略である（図 1）。基礎代謝が正常状態の 1～30%程度まで低下するのにも関わらず、動物の臓器・組織は障害を受けることなく長時間に渡る低代謝・低体温に耐性を発揮する。このような低代謝適応能を人間に実装し、人工冬眠を実現できれば臨床において高い代謝が原因で障害をもたらす様々な病態に有効であると考えられる。たとえば、急性疾患が発症し病院に搬送されるまでの期間を冬眠することで、現在では救命できない患者を救える可能性がある。

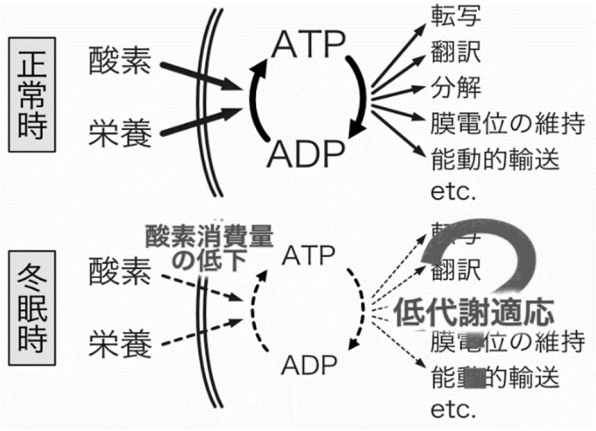


図 1. 冬眠と低代謝適応
冬眠中に通常であれば組織が障害を受けるような少ない酸素消費量でも、組織が障害を受けないのは、末梢組織における酸素需要が低下しているからだと考えられている。

冬眠のもつ低代謝適応能を理解するためには冬眠を研究することが王道と言えるが、既存の手法では冬眠動物は任意のタイミングで冬眠を誘導することができない。多くの冬眠動物は環境温度の低下、全身の代謝リモデリング、一定期間の飢餓などの環境が整ってはじめて冬眠する。また環境が整っても、冬眠をあらかじめ予測することが不可能であり冬眠動物を用いた研究の大きな課題となっている。我々は 2020 年に非冬眠動物であるマウスを冬眠様状態に誘導することに成功した［1］。この冬眠マウスモデルは、視床下部の Qrfp 陽性神経を化学遺伝学・光遺伝学的手法を用いて特異的に興奮させると、冬眠と似た低代謝・低体温状態を数日間に渡って誘導することができる（QIH：Q 神経誘導性低代謝）。QIH をおこすと二日間なにも食べないが、特に後遺症もなく正常状態に戻ることができる。QIH の最大の特徴は、誘導開始から約 30 分で冬眠様状態になることである。同冬眠マウスモデルにより冬眠研究の飛躍的な前進が期待される一方、低代謝・低体温の程度が冬眠動物には及ばないという課題も残っている。自然界の冬眠動物だと体温が 10℃以下に低下することは一般的であるが、冬眠マウスモデルだと 20℃を下回ることはない。

冬眠の原理解明ならびに人工冬眠の開発をすすめるにあたって、冬眠動物の任意のタイミングにおける冬眠誘導は必要不可欠な手法であると考えられる。そこで、本研究課題では我々が開発したマウスの冬眠様状態の誘導法を基盤に、冬眠動物の人為的な冬眠誘導法の開発に挑戦する。具体的には、冬眠動物であるハムスターの Q 神経特異的興奮を行うことで冬眠誘導を試みる。非冬眠動物であるマウスの Q 神経を刺激することで冬眠様状態である QIH を誘導できたこと、非冬眠動物であるラットにおいてマウスの Q 神経が存在する領域で非特異的に神経を興奮させることで QIH 様の状態を誘導できたことから［1]、ハムスターの同領域の神経を興奮させることで冬眠誘導を試みる。さらに、冬眠誘導を検証するためには冬眠動物の生理的な冬眠と比較することが重要である。そこで、ハムスターの生理的な冬眠誘導を行うための低温動物室ならびにハムスターの長期代謝測定系の確立を行った。

本研究期間において、ハムスターの視床下部における非特異的神経刺激によって体温低下が見られることを確認した。しかし、実際の休眠期間は冬眠ほど長くはなく、今後、生理的な冬眠と比較を行っていくことが重要である。ハムスターの QIH と比較するために、ハムスターの冬眠誘導を行うための低温動物室の準備並びにバイタルの長期モニター装置の開発に着手した。具体的には体内に留置可能な超小型体温・加速度センサーならびにミリ波レーダーを利用した非侵襲呼吸測定装置の開発に着手した。本年度はプロトタイプの開発にとどまったが、今後ハムスターを月から年単位で観察するためには必須の技術であり、引続き開発を進めたい。

方　法

1. 中枢神経系の刺激によるハムスターの冬眠誘導

マウスの視床下部視索前野の前腹側脳室周囲核（AVPe）に局在する QRFP ペプチド含有神経（Q 神経）は、化学遺伝学的手法で興奮させると複数日にわたる低代謝・低体温状態が誘導される（QIH）。具体的には $Qrfp^{iCre}$ マウスの AVPe に対して hSyn-DIO-hM3Dq という Cre リコンビナーゼ特異的に DREADD 化学受容体である hM3Dq を発現できる AAV を微量投与し、そのマウスに対して CNO を腹腔内投与することで Q 神経を特異的に興奮させている。冬眠をしないラットにおいても、同部位の神経を興奮させることで一定の体温低下が見られることは知られている。そこで、本研究ではハムスターの脳 AVPe に CamKⅡ-hM3Dq という遺伝子を AAV によって発現させ、ラットと同様に体温低下などの症状が検出できるか検証した。

ハムスターの視床下部に AAV で遺伝子導入するために、もっとも感染効率がよく、感染が限局する AAV のエンベロープを特定する必要がある。そこで、AAV1、2、5、8、9 の AAV-hSyn-EGFP（Addgene, 50465-AAV、2、5、8、9）をハムスターの脳に感染させ、EGFP の発現を脳切片にて確認した。ウイルスの力価はそれぞれ 1.3×10^{31}、8.6×10^{12}、1.2×10^{13}、2.5×10^{13}、1.9×10^{13} vg/mL であった。シリアンハムスター（オス、約 30 週齢、各セロタイプ n＝2 ずつ）を吸入麻酔にて全身麻酔を導入し、脳固定装置（David Koph、Model940）にてブレグマより X＋0.40 mm；Y 2.56 mm；Z－7.80 mm、に、ウイルス量 0.3 μL を 3 分かけて注射し、5 分間待機した後に、注射針を抜去した。AAV 感染後 4 週後に、灌流固定を行い、脳切片を作製して観察を行った。

ハムスターAVPe の神経を興奮させるために、AAV9-CamKⅡ-hM3Dq-mCherry を作製し（ウイルス力価 4.68×10^{13} vg/mL）、シリアンハムスター（オス、10 週齢、n＝3）を吸入麻酔にて全身麻酔を導入し、脳固定装置（David Koph、Model940）にてブレグマより X＋0.40 mm；Y 2.56 mm；Z－7.80 mm、にウイルス量 0.3 μL を 3 分かけて注射し、5 分間待機した後に、注射針を抜去した。AAV の注射から 3 週間後に、体温測定装置を全身麻酔下にて腹腔内に留置した。AAV 投与から 4 週間後に代謝測定装置に移動させ、環境温度が 20℃、明暗周期が 1 日の始まりから明暗＝12 時間:12 時間に保たれた環境にて、酸素消費量と体温を 5 日間測定した。測定開始から 24 時間目に CNO（Abcam, ab141704）を生理食塩水に溶解し 100 μg/mL としたものを、腹腔内に投与した（1 mg/kg）。実験終了後に灌流固定を行い、脳切片を作製して AAV の感染部位の確認を行った。

2. ハムスターの長期バイタルモニタリング手法の開発

マウスの休眠状態を評価するには、マウスの酸素消費量ならびに体温の経時的変化を用いることが多い。マウスの代表的な休眠は絶食性休眠であるが、1 回の休眠エピソードは数時間にとどまるため、1 匹のマウスの代謝を評価する期

間としては高々1 週間程度となる [2]。ところが、冬眠動物は基本的に冬眠に入ると数ヶ月単位で冬眠状態を継続する。この間、代謝が下がったままではなく、数日に 1 回ほど正常体温に回復する中途覚醒が見られる。今回の提案では、ハムスターの脳を操作することにより、冬眠状態を誘導することが目的であったが、実際に冬眠であることを確認するためには、生理的な冬眠と比較することが重要である。すなわち、ハムスターの冬眠をモニターするためには、2 年間、バイタルサインをモニターできる系が必要となる。

小動物のバイタルモニター実験装置として次の装置が存在する。

- 呼気ガス分析装置（時間あたりの酸素消費量ならびに二酸化炭素排出量を定量できる装置）
- 無線体温測定装置

呼気ガス分析装置は分析装置のコストが高く、100 匹以上を同時に測定することは現実的ではない。一方で無線体温測定装置はコストの問題もあるが、それ以上に、継続的に測定できる最長期間が 6 ヶ月であることが大きな問題であった。これ以上に長期間測定できるようなデバイスを目指すと、現在の仕様では、センサーが重くなり、動物に負担をかけることになる。そこでコスト問題・電池寿命・質量問題を解決するために、ディスポーザブルタイプの超小型センサーの開発に着手した。電池が不要な無線給電方式なので、装置が破損しない限り半永久的に測定できる。また、そもそも動物にセンサーを埋め込まなくても良いデバイスとして、電波による動物の微小な運動観察も活用を検討している。すなわち、非侵襲に動物の胸郭の動きなどを読み取り、呼吸数を算出しようというものである。

結果および考察

1. 中枢神経系の刺激によるハムスターの冬眠誘導

ハムスターの視床下部に投与した AAV は AAV2 を除いて高い感染効率が見られた（図 2）。AAV5 と AAV1 は感染部位が広範に渡ったため、今回の用途には不適切と判断した。AAV9 と AAV8 は大きな差はなかったため、今回は AAV9 をハムスター視床下部への最適なセロタイプとして選定し、続く実験に用いる AAV は AAV9 としてパッケージングを行った。

次に、ハムスターの AVPe に CamKⅡプロモーターで DREADD 受容体を発現させ CNO にて、特異的に興奮性ニューロンを興奮させる実験を行った。3 匹中 1 匹は測定器の不調でデータを回収できなかったが、残り 2 匹は 1 日以上の代謝・体温低下が見られた（図 3）。マウスの QIH だと、神経の特異性の違いは有るが、外気温が 20℃で最低体温が 22℃程度まで低下するので、ハムスターの最低体温はマウスと比べると高いといえる。一方で、ハムスターと全く同じ手法で QIH 様状態を誘導したラットでは体温が 30℃を下回ることはなかった。このことから、AVPe の非特異的興奮性神経の興奮による QIH 様低代謝は体の大きさによって最低体温・最低代謝が決定されている可能性が示唆された。本課題の最終的な目的は冬眠動物であるハムスターで任意のタイミングで冬眠を誘導できるようになることである。今回の結果により、ハムスターでも QIH が誘導できる可能性が示唆されたため、今後はハムスターの Q 神経をより特異的に摂動できる方法を開発したい。一方で、実際の冬眠が現在のアプローチで可能になるかは定かではない。そこで、冬眠動物の冬眠誘導機構を精査し実際に冬眠を誘導できる神経回路の特定をすすめたい。

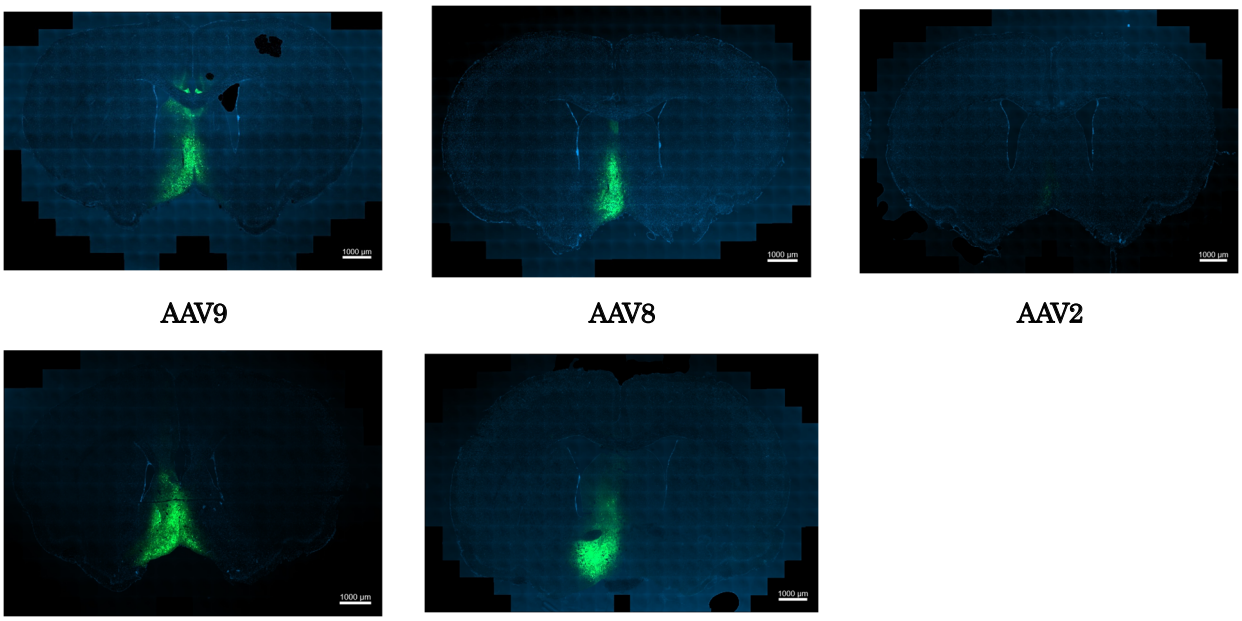


図 2. ハムスター視床下部における AAV セロタイプの違いによる感染効率の変化

ハムスターの脳に最適な AAV セロタイプを調べるために、hSyn-EGFP を組み込んだ AAV を異なる 5 つのセロタイプの AAV を視床下部に感染させ、EGFP の強度と広がりによってセロタイプ 8 を選択した。青色は各染色、緑色は AAV によって発現した EGFP の蛍光。

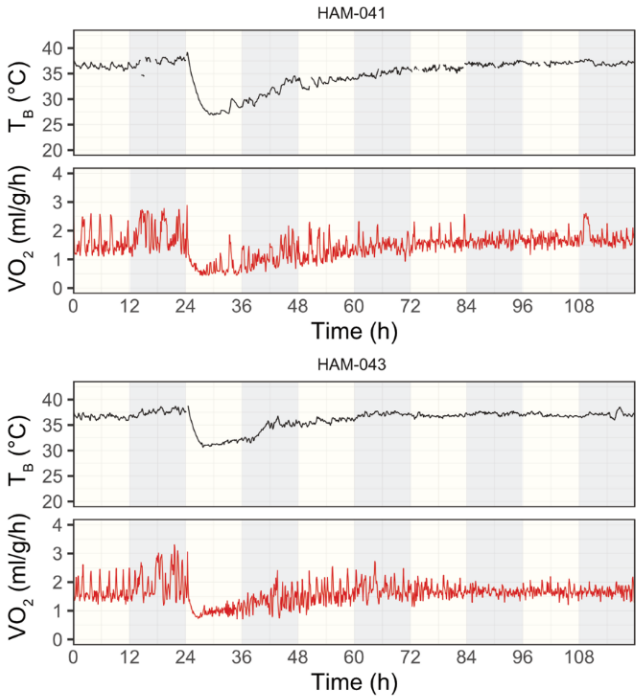


図 3. ハムスターの QIH 様状態の誘導

ハムスターの AVPe に AAV9-CamKII-hM3Dq-mCherry を感染させ、興奮性神経を CNO によって非特異的に興奮させた（time＝24）。いずれのケースでも、3～4 時間かけて最低代謝となり、正常時の 50～60%まで酸素消費量が低下した。背景の淡黄色と灰色はそれぞれ明期と暗期を表している。

2. ハムスターの長期バイタルモニタリング手法の開発

ハムスターを冬眠に誘導することを確認するためには、ハムスターが本来有している冬眠を正しく評価する必要がある。今回、ハムスターの冬眠誘導のための低温動物室を整備した。さらに、ハムスターの代謝を長期間モニターするために、呼気ガス代謝測定装置を導入したが、多くの個体で 2 年前後の代謝モニタリングを行うためには、より勘弁で安価なデバイスが必要だと考え、超小型体温センシングデバイスや、非侵襲呼吸検出デバイスの機能検証器を開発した。現在は、動物実験まで至ってはいないが、今後小型化、機能強化をすすめハムスターの体温・呼吸を長期モニタリングできるデバイスを実現したい。

文 献

1) Takahashi TM, Sunagawa GA, Soya S, Abe M, Sakurai K, Ishikawa K, Yanagisawa M, Hama H, Hasegawa E, Miyawaki A, Sakimura K, Takahashi M, Sakurai T. A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. Nature [Internet]. Springer US; 2020 Jul;583(7814):109–114. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2163-6 PMID: 32528181

2) Sunagawa GA, Takahashi M. Hypometabolism during Daily Torpor in Mice is Dominated by Reduction in the Sensitivity of the Thermoregulatory System. Sci Rep [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 Nov 15;6(1):37011. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/srep37011 PMCID: PMC5109469