

論文の内容の要旨

哺乳類冬眠動物シリアンハムスターが有する細胞自律的な低温耐性機構の解析

氏名 姉川 大輔

【序論】

冬眠は、食糧不足と気温低下を伴う冬季の過酷な環境を、体温・代謝率を著しく低下させて乗り越える、生存戦略の一つである。多くの哺乳類にとって、体温を約 37°C に維持することは重要である。例えば、ヒトは体温が 18°C を下回ると心停止することが報告されている。また、ラットでは、15°C 以下の低温状態、またはそこからの復温により、臓器機能障害、細胞死が誘導される。一方で、ジリスやシリアンハムスターといった小型の哺乳類冬眠動物は、数ヶ月に及ぶ冬眠期間中、体温が 10°C 以下まで低下する「深冬眠」と、通常とほぼ同じ体温まで復温する「中途覚醒」を何度も繰り返すが、顕著な生理学的障害は示さない (図 1)。実際に近年、冬眠動物が細胞自律的な低温耐性を有することが、ジリスの神経細胞やシリアンハムスターの腎臓上皮細胞の系で示されたが、その分子機構は未だ不明である。本研究では、通年冬眠誘導が可能な冬眠動物シリアンハムスターをモデルとし、冬眠動物の低温耐性機構の解明を目指した。

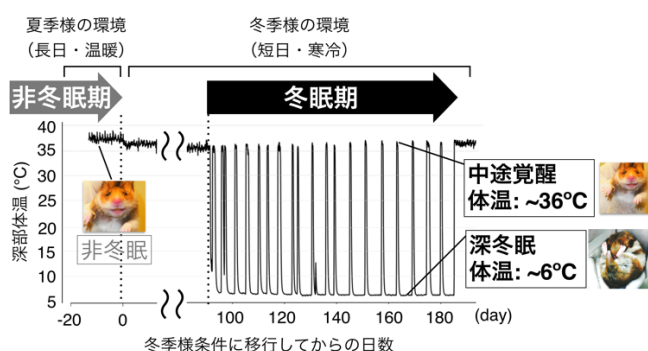


図 1. 冬眠中のシリアンハムスターの体温変化^[1,2]

【方法と結果】

1. 冬眠動物シリアンハムスターの肝細胞は生得的に細胞自律的な低温耐性を有する

深部臓器である肝臓は低温ストレスに脆弱なことが知られている。実際、冬眠しない動物マウスの初代培養肝細胞を低温で培養すると、大量の細胞死が誘導された (図 2A)。一方でシリアンハムスター (以後、ハムスターと表記) の肝細胞では、この低温誘導性の細胞死量が顕著に少なかった (図 2A)。この実験では、夏季様の環境で飼育している非冬眠期のハムスター (図 1) を用いた。ハムスターは夏季様の環境から、冬季様の環境に移行後、2-3 ヶ月の冬眠準備期間を経てから冬眠を開始する。ハムスターは、冬眠期の深冬眠と中途覚醒時に、低体温および、そこからの復

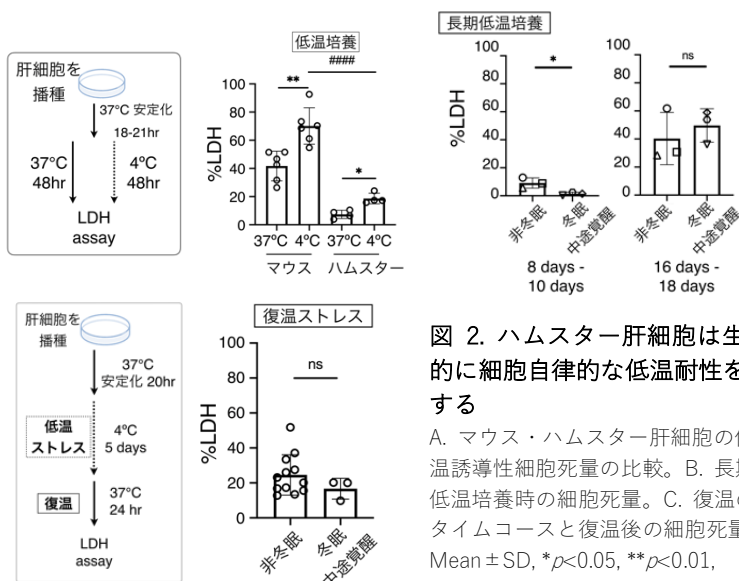


図 2. ハムスター肝細胞は生得的に細胞自律的な低温耐性を有する

A. マウス・ハムスター肝細胞の低温誘導性細胞死量の比較。B. 長期低温培養時の細胞死量。C. 復温のタイムコースと復温後の細胞死量。Mean ± SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$, ns $p > 0.05$

温にさらされる。そこで次に、ハムスターの低温耐性が、非冬眠期から冬眠期にかけて、さらに向上するか否かを検証した。夏季様の環境で飼育している非冬眠期のハムスターと、冬眠期中途覚醒ハムスターから肝細胞を単離し、長期間の低温培養を行ったところ、1週間強の低温培養後もわずかな細胞死しか誘導されないことが判明した(図2B)。一方で、2週間以上低温培養を続けると、大量の細胞死が生じた。しかし、非冬眠期・冬眠期間で、細胞死量に顕著な差は認められなかった(図2B)。さらに、深冬眠から中途覚醒への移行を模した復温ストレスに対する耐性についても同様の比較を行ったが、非冬眠期・冬眠期間で、細胞死量に有意な差は認められなかった(図2C)。これらの結果から、ハムスターの肝細胞は、非冬眠期においても顕著な低温耐性を有しており、この耐性は、非冬眠期・冬眠期間でほとんど変化しないことが示唆された。

2. ハムスター肝細胞の低温耐性は食餌由来の栄養に依存して劇的に変化する

次に、マウス・ハムスター間の低温耐性の差をもたらす分子機構の解明を目指した。低温誘導性細胞死は、ferroptosis と呼ばれる制御された細胞死の一種と共通した特徴を示すことが、ヒト株化細胞の系で過去に示されている。実際、ferroptosis 阻害剤である deferoxamine、trolox をマウス肝細胞の低温培養時に添加すると、細胞死量が顕著に抑制された(図3A)。ferroptosis の分子機構を足がかりにハムスターの低温耐性機構を解析する過程で、私は、ハムスター肝細胞の低温耐性が、食餌に依存して劇的に変化するを見出した。上述の、顕著な低温耐性を示したハムスターを飼育していた STD 餌とは異なる、STC 餌でハムスターを飼育すると、低温耐性が消失した(図3B)。この STC 餌ハムスターの肝細胞で生じる低温誘導性細胞死は、ferroptosis 阻害剤によって顕著に抑制された(図3C)。これらの結果は、ハムスターの初代培養肝細胞が有する生得的な低温耐性には、食餌由来の何らかの栄養が必要であることを示している。

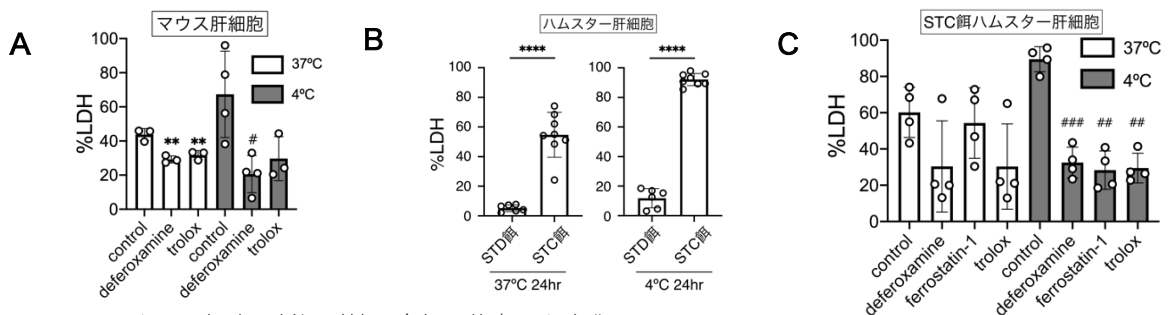


図3. ハムスター肝細胞の低温耐性の食餌に依存した変化

A. マウス肝細胞における ferroptosis 阻害剤処理の効果。B. 食餌によるハムスター肝細胞の低温耐性の変化。

C. STC 餌ハムスター肝細胞における ferroptosis 阻害剤処理の効果。deferoxamine: 100 μ M, trolox: 100 μ M, ferrostatin-1: 1 μ M.

Mean \pm SD, * p <0.05, ** p <0.01, **** p <0.0001, # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001

3. α -tocopherol はハムスター肝細胞の細胞自律的な低温耐性に必要である

そこで次に、冬眠動物の細胞自律的な低温耐性に必要な栄養を明らかにすることを目指した。ferroptosis は、過酸化脂質の蓄積を伴う細胞死であり、その阻害剤である trolox および ferrostatin-1 は、ラジカルスカベンジャーとしての抗酸化作用を介して細胞死を抑制すると考えられている。したがって、餌に含まれる抗酸化物質が、ハムスター肝細胞の低温耐性に必要である可能性を考えた。実際、STD 餌の方が、STC 餌よりもその組成上、脂溶性抗酸化物質ビタミンEの含有量が多い。そこで、食餌由来のビタミンEが、ハムスター肝細胞の低温耐性に必要か否かを確かめるために、哺乳類生体内に選択的に蓄積すると考えられているビタミンEの同族体、 α -tocopherol (α T)をSTC 餌ハムスターに2週間経口投与した(図4A)。その結果、 α T投与群から単離した肝

細胞では、低温培養時の細胞死量が顕著に抑制された (図 4B)。この結果は、ハムスター肝細胞の細胞自律的な低温耐性には、食餌由来の α T が必要であることを示している。

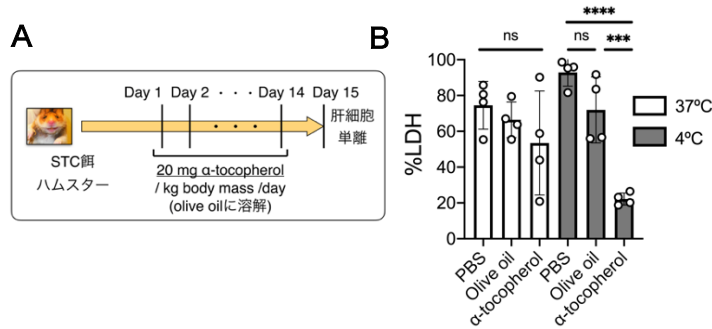


図 4. α -tocopherol (α T) はハムスター肝細胞の低温耐性に必要である
 A. α T 経口投与のタイムコース
 B. α T 投与ハムスターの肝細胞の低温培養時の細胞死量
 Mean \pm SD, *** p <0.001, **** p <0.0001, ns p >0.05

4. マウスとハムスターとのリン脂質組成の差異

興味深いことに、今回実験に用いたマウスには STD 餌を与えていた。つまり、STD 餌はシリアンハムスターには低温耐性を付与するが、マウスには付与しないと言える (図 2A)。では、マウスとハムスターの低温耐性の差異は、どのような機構でもたらされるのだろうか。先行研究において、脂質代謝酵素の機能操作、もしくは脂肪酸の添加によって、脂質組成の変化と相関して、細胞の ferroptosis 耐性が增強することが報告されている。よって、低温耐性の差異も、細胞膜脂質組成の違いに起因する可能性が考えられる。そこで私は、マウス (STD 餌を摂取) と、STD 餌ハムスター、STD 餌ハムスターとで、肝細胞のリン脂質組成を比較することを目指した。そのために、動物から単離した直後の肝細胞から総脂質を抽出し、LC-MS によるリポドーム解析 (慶應義塾大学医学部・杉浦先生との共同研究) を行って、細胞内に豊富に存在するリン脂質である、phosphatidylcholine (PC) および phosphatidylethanolamine (PE) の脂質組成を比較した。同定できた主要な PC, PE に関して、主成分分析を行ったところ、マウスとハムスターとで、異なるクラスターを形成した (図 5A)。この結果は、マウスとハムスターとでは、同一の餌を与えていても、肝細胞の PC, PE の脂質組成が異なることを示唆する。実際、二重結合数の数で PC, PE を分類したところ、二重結合数が 3 つ以上の、多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA) を含む脂質の比率は、ハムスターよりマウスの方が大きいことが判明した (図 5B)。一般に、不飽和度の高い脂肪酸ほど、酸化ストレスによる傷害を受けやすいとされる。したがって、不飽和度の高い脂肪酸を含む PC, PE が多い、マウスの肝細胞の脂質組成は、低温ストレスにより生じる酸化ストレスに対して脆弱である可能性が示唆される。

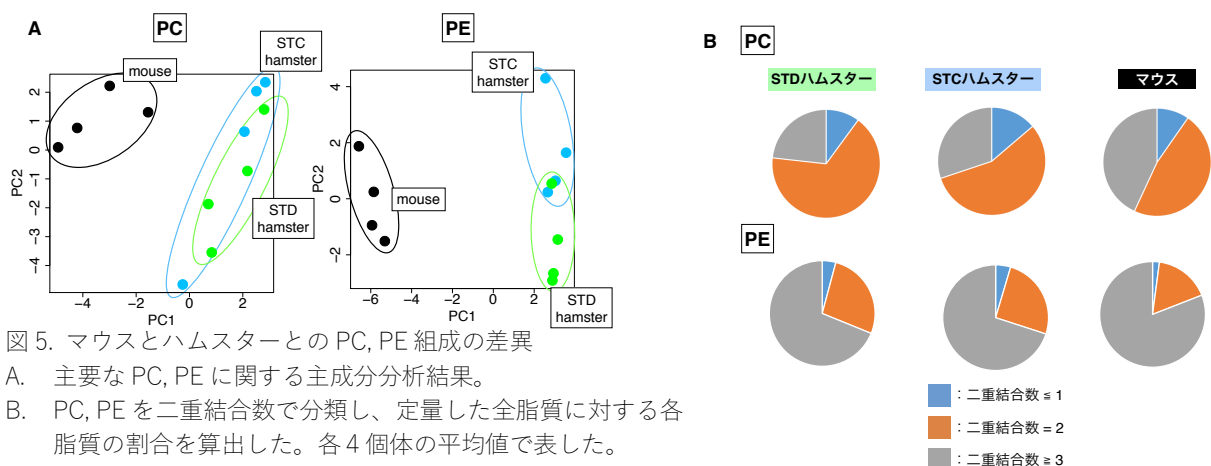


図 5. マウスとハムスターとの PC, PE 組成の差異
 A. 主要な PC, PE に関する主成分分析結果。
 B. PC, PE を二重結合数で分類し、定量した全脂質に対する各脂質の割合を算出した。各 4 個体の平均値で表した。

【まとめと考察】

本研究では、ハムスター肝細胞が細胞自律的な低温耐性を有することを見出した。さらに、その低温耐性は、非冬眠期・冬眠期に関わらず、約1週間の低温ストレスにさらされてもわずかな細胞死しか生じないほど顕著であった。一方で、非冬時期と冬眠期とで、約2週間の低温ストレスへの耐性、および復温ストレスに対する耐性は、ほとんど変わらないことが明らかになった。これら結果は、ハムスター肝細胞の低温耐性が、冬眠期に限定的なものではなく、非冬眠期においても生得的に備わっていることを示している。この生得的な低温耐性が、著しい低体温に陥る冬眠時において、臓器機能の維持、および生命維持に関与すると考えられる。さらに、本研究は、ハムスター肝細胞の低温耐性が、食餌に依存して劇的に変化すること、および食餌由来の α -tocopherol (α T)がその低温耐性に必要であることを明らかにした。一方で、ビタミンE含有量の多いSTD餌は、ハムスターには低温耐性を付与するが、マウスには付与しないことを明らかにした。それでは、 α Tはどのような機構で、ハムスター肝細胞に低温耐性を付与するのだろうか。また、マウスとハムスターとで、同じ餌を与えていても、大きく低温耐性が異なるのは、どのような機構によるのだろうか。第一に、肝細胞内の α T保持量が、低温耐性に直接寄与する可能性が考えられる。細胞内の α T量は、 α Tの細胞内取り込み、代謝、細胞外への排出のバランスにより規定される。これらプロセスを担うタンパク質の活性や α Tとの親和性が、マウスとハムスターの種間で異なる可能性がある。低温耐性に寄与する第二の要素として、膜脂質の組成が挙げられる。本研究において、私は、リン脂質組成の網羅的な解析を行い、マウスとハムスターとでは、同じ餌を摂取していてもPC, PEの組成が異なり、中でも、二重結合数が3つ以上のPC, PEは、マウスの肝細胞により多く含まれることが判明した。マウスの脂質組成は、低温刺激により誘導される酸化ストレスに対して、ハムスターより脆弱な可能性がある。リン脂質組成のリモデリングには、アシル基転移酵素やアシルCoA合成酵素が寄与しうる。これら酵素の発現量や活性が、種間で異なることが、低温耐性の差異に重要かもしれない。低温耐性に寄与しうる第三の要素として、 α Tによるシグナル伝達が挙げられる。 α Tは、酸化ストレス応答に関わるNRF2を含む、複数の転写因子の活性を調整しうることで知られるため、細胞の酸化ストレス消去系の亢進を介して、低温耐性に寄与する可能性も考えられる。

今後、上記で挙げた点に種間の差異があるか否かをマウス・ハムスター間で検証していくことで、低温耐性を有する冬眠動物と、マウス・ヒトなどの低温耐性を有さない動物との違いを生み出す仕組みが明らかになると期待される。そこで得られる知見は、移植臓器の低温保存時や低体温療法時に誘導される低温傷害を抑制する方法の開発など、医療面での応用可能性も秘めると考えられる。

【参考文献】 [1] Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M., Yamaguchi, Y., Decreases in body temperature and body mass constitute pre-hibernation remodeling in the Syrian golden hamster, a facultative hibernator. *R. Soc. open sci.* **3**: 160002, 2016

[2] Chayama, Y., Ando, L., Sato, Y., Shigenobu, S., Anegawa, D., Fujimoto, T., Taii, H., Tamura, Y., Miura, M., Yamaguchi, Y., Molecular basis of white adipose tissue remodeling that precedes and coincides with hibernation in the Syrian hamster, a food-storing hibernator. *Front. Physiol.* **9**: 1973, 2019