

審査の結果の要旨

氏 名 姉川 大輔

本論文は、哺乳類冬眠動物が有する低温耐性機構についての研究成果を述べたものである。冬眠とは、積極的に代謝率を抑制して結果として体温を低下させ、体温維持に必要なエネルギーを節約する生存戦略である。ハムスターやリスといった、小型の哺乳類冬眠動物は、冬眠期間中に、体温が 10°C 以下まで低下する「深冬眠」と、体温が通常とほぼ同じ 37°C 程度まで回復する「中途覚醒」とを何度も繰り返す。このような極度の低体温と、そこからの復温は、ヒトやマウスなどの冬眠しない哺乳類では、心停止や組織傷害、細胞死を誘導することが知られる。一方で、冬眠動物は、冬眠期間中明らかな生理学的障害を示さないことから、低温耐性を有すると考えられるが、その耐性機構はほとんどわかっていない。学位申請者は、研究室での冬眠誘導が容易なシリアンハムスターをモデルとし、シリアンハムスターの肝細胞が、生得的に細胞自律的な低温耐性を持つこと、およびこの低温耐性に、食餌由来の α -Tocopherol (α T)が必要であることを見出した。

深部臓器である肝臓は、低温ストレスに脆弱であることが知られるため、申請者は初代培養肝細胞を動物個体から作成し、低温培養を行う系を採用した。冬眠しない哺乳類マウスの初代培養肝細胞では、2 日間低温培養すると大量の細胞死が誘導される一方、シリアンハムスターの肝細胞はほとんど細胞死を示さなかった。この結果は、シリアンハムスターの肝細胞が細胞自律的な低温耐性を持つことを示す。冬眠動物は、夏から冬にかけて、生体を冬眠不能状態から冬眠可能状態へとりモデリングすることが過去の研究から示唆されていた。しかし、冬眠動物の低温耐性が、冬眠しない時期から冬眠期にかけて向上するか否かは不明だった。申請者は、冬眠していないシリアンハムスターと、冬眠・中途覚醒状態の個体のそれぞれから作成した肝細胞を用いることで、肝細胞の低温耐性は冬眠していない時と冬眠時とで顕著な差を示さないことを見出した。この結果は、シリアンハムスター肝細胞の低温耐性が、冬眠時に限定されたものではなく、生得的に備わるものであることを示す。

低温誘導性細胞死は、ferroptosis と呼ばれる、鉄依存性の脂質過酸化を特徴とす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報告されている。実際、申請者は、マウス肝細胞における低温細胞死が、ferroptosis の阻害剤で抑制されることを示している。ferroptosis の誘導機構を足がかりにマウス・シリアンハムスター間の低温耐性の差をもたらす分子機構を解析する過程で、申請者

は、シリアンハムスターの低温耐性が食事に依存して劇的に変化することを見出した。顕著な低温耐性を示す初代培養肝細胞を作成したシリアンハムスターは MR standard (STD) 餌と呼ばれる食餌で飼育していたが、これとは異なる、MR stock (STC) 餌で飼育したシリアンハムスターから初代培養肝細胞を作成すると、これらの肝細胞は 48 時間の低温培養でほとんどが死滅した。この STC 餌を摂取しているシリアン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。STC ハムスターおよびマウスでは、低温ストレスによって、ferroptosis の特徴の 1 つである、酸化脂質の生成が認められた。一方で、STD ハムスターでは酸化脂質生成がほとんど認められなかった。これらの結果は、シリアンハムスターの肝細胞の、ferroptosis に類似した低温誘導性細胞死に対する耐性には、食餌由来の何らかの栄養素が必要であることを示す。STD 餌は、STC 餌と比べて、脂溶性抗酸化物質であるビタミン E が多く含まれていることから、申請者は、食餌由来のビタミン E がシリアンハムスターの低温耐性に必要か否かを検証した。STC ハムスターに対し、ビタミン E 同族体 α -Tocopherol (α T) を経口投与すると、低温耐性が顕著に増強することが判明した。この結果は、シリアンハムスター肝細胞の低温耐性には、食餌由来の α T が必要であることを示す。興味深いことに、マウスとシリアンハムスターとでは、同じ STD 餌を与えていても、低温耐性が大きく異なっていた。この耐性の差異の分子機構の解明を目指し、申請者は、マウス、STC ハムスター、STD ハムスターの肝細胞の脂質組成を、LC-MS により網羅的に解析した。細胞内の主要なリン脂質である Phosphatidylcholine (PC) と Phosphatidylethanolamine (PE) のプロファイルを解析した結果、マウスは、シリアンハムスターと比べて、二重結合数が 3 以上の PC, PE の割合が大きいことが明らかとなった。一般に、二重結合数の多い脂肪酸は、活性酸素種等による傷害を受けやすいと考えられている。したがって、マウス肝細胞の脂質組成は、低温刺激により生じる酸化ストレスに対して、より脆弱である可能性が考えられる。一方で、STC ハムスターと STD ハムスターの脂質プロファイルの差は、マウスとシリアンハムスターの種間の差と比べて小さかった。よって、シリアンハムスターの食餌に依存した低温耐性の差異には、脂質組成の寄与は小さく、肝細胞中の α T 含有量など、他の機構がより強く寄与することが示唆される。

冬眠動物の低温耐性が食餌に依存して変化する例はこれまで知られておらず、本論文は α T がシリアンハムスター肝細胞の低温耐性に必要であることを初めて示した。さらに、マウスとシリアンハムスターとでは、同じ高ビタミン E 餌を与えても低温耐性が異なることを明らかにし、この種間で α T の組織保持能力・代謝が異なる可能性を示唆した。今後、この差異を生む機構をより詳細に解析することで、冬眠動物が冬眠中の低体温でも生存できる機構の解明に迫れ

るばかりか、臓器の低温保存法などの医療面への応用も期待できる。
よって本論文は、博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。