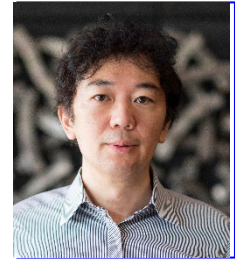


最終報告

冬眠様状態を誘導する神経機構の研究と応用への展開

研究代表者：櫻井 武 筑波大学医学医療系 教授

共同研究者：



1. 研究の背景と達成目標

本提案では、新しい「低代謝医療技術の創成」を目指すための、基礎となる知見の獲得を目指した。中枢神経系の操作により、安全で安定した低代謝状態＝人工冬眠様状態を実現することにより、救急医療、臓器移植時の臓器の保存、食品を新鮮に保つ技術、老化をおくらせる技術などさまざまな可能性を秘めた、またこれまでになかった「新しい価値」を創成することを最終目的とする。

恒温動物である哺乳類や鳥類の体温は環境温度が変化しても通常 37°C前後の狭い範囲に保たれておりこのことにより脳機能をはじめ多くの生理機能がフルに発揮できる。その反面、体温を外気温より高く維持することは多くのエネルギーが必要とする。そこで一部の哺乳動物では、冬季や飢餓など食物が十分に得られない状況下において、体温を下げて必要なエネルギーを節約する戦略をとる。つまり休眠あるいは冬眠と呼ばれる低代謝状態である。

冬眠動物は、長期にわたり、低体温・低代謝の状態でも過ごし、その間、能動的な行動もほとんど見られず、さまざまな生理的機能は大幅に低下するが、いずれの組織にも何らの障害なく自発的に回復し、筋萎縮も見られない。この特性は、さまざまな面で応用される大きな可能性を持っている。医療の面では虚血性心疾患、脳卒中、呼吸障害をはじめ、酸素供給が組織需要を下回るためにおこる致命的な病態は枚挙にいとまがない。冬眠状態では酸素需要そのものが大きく下がっており、冬眠状態の人工的な誘導により酸素供給と需要のミスマッチを解消することが出来る。また、組織そのものの代謝が大きく下がっており、障害そのものもゆっくりと進む可能性がある。このことは救急医療において、治療を行うまでの障害の進行を抑制する、あるいは移植医療における臓器保全、慢性進行性疾患の進行を遅らせることや、将来的には老化の抑制や長期間にわたる宇宙旅行における人工冬眠の実現にいたるまで、さまざまな分野で大きなメリットをもたらす可能性を秘めている。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ① 光操作により長時間にわたり QIH を維持する方法を確立した。
メラノプシンを改変した hOPN4dC をもちいて、6 日連続 QIH 後 1 日復温というリズムで 2 か月以上にわたり QIH を継続することが可能になっている。このことにより QIH が老化の進展や各種病態の進展や体内時計や記憶、睡眠などの生理機能にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることが可能になった。
- ② Q ニューロンが温熱環境や、末梢の温熱刺激によって興奮することを明らかにした。このことにより、末梢神経の操作によって QIH を誘導できる可能性があることが明らかになった。
- ③ Q ニューロンの作用機序解明のため、*Qrfp-FlpO* マウスを作成した。今後このマウスを用いて、Cre を用いた Fos-TRAP 法をもちいて、Q ニューロンが興奮させる神経細胞群や神経回路を同定することが可能になった。
- ④ Q ニューロンの scRNAseq 解析により Q ニューロンに発現する G タンパク質共役受容体を明らかにし、スライス標本によるカルシウムイメージングとパッチクランプ記録によりいくつかのリガン

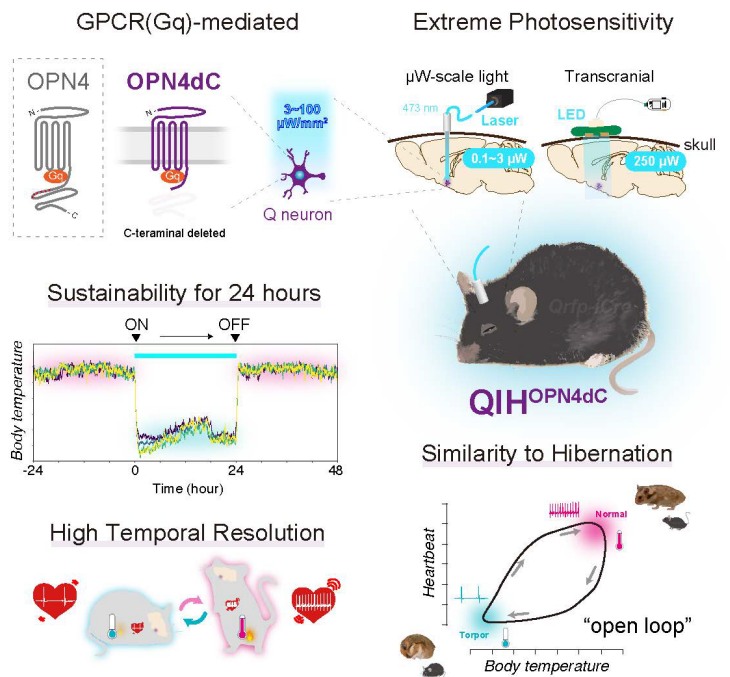
ドによる Q ニューロンの活性化及び脳内投与による体温低下を確認した。このことにより薬物投与による冬眠様状態の誘導を誘導する道が拓かれた。

3. 研究成果

① **QIH が生理・神経機能にもたらす影響の解明**：QIH 中の生理・神経機能の解析を高時間分解能で行うため、光遺伝学により長時間の QIH を誘導する実験系を構築した。従来の DREADD による方法では、化学遺伝学により QIH を誘導していたため、低体温になっている時間をコントロールできず、復温期が長く自然の冬眠で見られるような急激な体温の上昇を模倣できていないという問題点があった。そこで、光遺伝学ツールとして汎用されている ChR2 を Q ニューロンに発現させて光照射することにより低体温を誘導したが神経の興奮に必要な光強度が強くて数時間の刺激を与えると組織損傷が引き起こされることが判明した。そこで OPN4 (メラノプシン) を用いて微弱な光で Gq シグナリングを活性化させることにより神経の興奮を試みた。また感度を上げるために不活性化に

関与する C 末端側のリン酸化クラスター領域を欠損させた (hOPN4dC)。hOPN4dC は青色光で活性化し、神経の興奮を誘導することを電気生理学的に確かめた。さらに、in vivo において Q ニューロンに発現させ光照射の体温への影響を観察した。3-10 μW という極めて弱い光で体温の低下を誘導することが可能であった。24 時間という長期間にわたって光照射を持続させても神経の損傷は観察されず、何度も QIH 誘導が可能であった (図、Takahashi et al., Cell Reports Methods, 2022)。きわめて微弱な光で冬眠誘導が可能のため、経頭蓋的な光の照射でも冬眠様状態の誘導が可能であった。この系を用いて、QIH 導入前後の心拍数の変化を検討し、体温より先行して心拍数の変化が起こることが分かった。従って、QIH における生理機能の変化は体温低下にともなった二次的なものではなく、体温と並行して起こるものであることが示された。また、概日時計に与える影響を概日時計によって制御される生理リズムを指標に解析した。恒暗条件においてマウスの輪回し行動リズムの位相は QIH によって影響を受けないことを見出した。つまり、生体において QIH 中でも概日時計が振動していることが示唆された。また、体温リズムの変化を QIH 前後で比べても、何も同調因子がない条件においても復温後に QIH 前と同じ振幅でリズムを刻み始めることも明らかとなった。

Optogenetics with improved OPN4



② **QIH 誘導メカニズムの解明**：Qrfp 遺伝子に lox-Flp-lox をノックインしたマウス (Qrfp-flox-Flp)

を作成した。このマウスを vGlut2-ires-Cre や vGAT-ires-Cre マウスと掛け合わせることで、Flp を Qh または Qi ニューロンのみに発現させることが可能となった。

- ③ Q ニューロンの制御機構の解明として、Qrfp-iCre マウスの AVPe へ AAV-DIO-GCaMP6 を投与することにより GCaMP6 を発現させ、ファイバーフォトメトリーによって Q ニューロンの活動の変化を観察し、外気温の変化に対する応答を明らかにした。外気温の上昇や、ホットプレートとの接触により Q ニューロンの活動が上昇することが明らかになった。
- ④ **Q ニューロンのトランスクリプトーム解析**：AVPe に発現している Q ニューロンの核を抽出し、10xGenomics 社の Chromium にてシングルセル解析を実施した。その結果、Q ニューロンの制御に関わる因子群を複数同定した。この情報をもとに、Q ニューロンに作用する可能性のある因子を数個ピックアップし、スライス標本にてカルシウムイメージングおよび電気生理実験によって Q ニューロンを興奮させる因子を見出した。この因子をマウスに脳室内投与することにより QIH 様の低体温状態を誘導できることが明らかになった。

4. 今後の展開

- ① QIH 誘導メカニズムの解明：最近開発した Qrfp-Flp マウスを TRAP2 マウスに掛け合わせて、Fos-TRAP 法により Q ニューロン刺激後に DMH のターゲットニューロンのラベルと操作を試みており、Q ニューロンがどのような神経科学的メカニズムで QIH を誘導するのかを明らかにできると考えている。
- ② QIH が生理・神経機能にもたらす影響の解明：OPN4dC の開発により、順調に進んでいる。QIH が睡眠や記憶に及ぼす影響について検討を進めており、冬眠様状態が睡眠負債や記憶にどのような影響を与えているかを明らかにしていく。OPN4dC による QIH 誘導が睡眠、記憶や自律神経系にもたらす影響を明らかにする。QIH 導入後の睡眠状態や、断眠後の QIH が睡眠にもたらす影響を脳派睡眠解析により解明する。記憶に関しては文脈による恐怖条件付けや、水迷路学習後 QIH を導入し、解放後想起テストを行う。
- ③ Q ニューロンのトランスクリプトーム解析：網羅的な遺伝子発現解析をすすめ、Q ニューロンに発現する受容体を同定した。そのリガンドによる QIH 誘導を試みており、有力な候補物質を見出している。このことにより、将来的に薬物をもちいて冬眠様状態を誘導できる可能性が提示された。
- ④ ヒートパッドで四肢に温熱刺激を加えることにより Q ニューロンが強く興奮することが明らかになったため、末梢神経刺激をもちいた冬眠様状態の誘導法の可能性を拓いた。
- ⑤ Q ニューロンのトランスクリプトーム解析：すでにほぼ解析が終わっており、Q ニューロンに発現する受容体を同定した。そのリガンドによる QIH 誘導を試みており、有力な候補物質を見出している。しかし効力的には、DREADD による QIH よりかなり弱いため、さらに有力な因子の検索を行っている。今後は、介在ニューロンやグリアにも着目し、間接的に Q ニューロンに影響を及ぼす因子も含めて検討を行っていく。

以上のような研究により、人工的に冬眠様状態を誘導するための基礎的知見が得られたので、今後応用に向けた進展を期待している。

5. 発表実績

【論文】

1. Hasegawa E, Li Y, Sakurai T. Regulation of REM sleep in mice: The role of dopamine and serotonin function in the basolateral amygdala. *Neurosci Res.* 2023 Sep 9:S0168-0102(23)00168-2. doi: 10.1016/j.neures.2023.09.003.
2. Prokofeva K, Saito YC, Niwa Y, Mizuno S, Takahashi S, Hirano A, Sakurai T. Structure and Function of Neuronal Circuits Linking Ventrolateral Preoptic Nucleus and Lateral Hypothalamic Area. *J Neurosci.* 2023 May 31;43(22):4075-4092. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1913-22.2023. Epub 2023 Apr 28.
3. Ruoshi Li, Kosaku Masuda, Daisuke Ono, Takashi Kanbayashi, Arisa Hirano and Takeshi Sakurai. Aripiprazole disrupts cellular synchrony in the suprachiasmatic nucleus and enhances entrainment to environmental light–dark cycles in mice. *Front. Neurosci.*, 09 August 2023
4. Kosaku Masuda, Naohiro Kon, Kosuke Iizuka, Yoshitaka Fukada, Takeshi Sakurai & Arisa Hirano. Singularity response reveals entrainment properties in mammalian circadian clock. *Nature Communications* volume 14, Article number: 2819 (2023) May 2023.

【学会発表】

【特許】

<発明名称> 冬眠様状態を誘発する方法およびそのための装置

<出願番号> PCT/JP2020/037268

<整理番号> 20-P23

※独立行政法人理化学研究所との共願

【その他】

NHK テレビ 「ヒューマニエンス」(人工冬眠について) 2023年11月7日

インターネット番組 Horie One (人工冬眠について) 2023年3月6日収録

ガリレオ X 「人類は冬眠できるのか」 2022年1月8日 BSフジ

Eテレ「サイエンス ZERO」「もはやSFではない! “人工冬眠”研究最前線」

放送日時 2022年1月15日(日) 23:30~24:00

J-WAVE GROWING REED 5/14 24:00~25:00

「いま、人工冬眠の技術はどこまで来ていますか？」

JK RADIO-TOKYO UNITED (J-WAVE)

人工冬眠について 2020/10/2