

## 幹細胞を用いた低代謝誘導物質の検索

理化学研究所 生命機能研究センター 網膜再生医療研究開発プロジェクト

砂川 玄志郎

### ■研究背景

冬眠中の哺乳類は正常時と比べて基礎代謝（酸素消費量）が1%程度まで低下し、体温が外気温近くまで低下するが、組織や臓器は障害を受けない。もし人間に冬眠動物のような安全な基礎代謝の低下（能動的低代謝）を誘導できれば、重症患者の搬送、臓器の保管・輸送、全身麻酔の安全性など、臨床現場で代謝が高いことから生じる様々な問題を解決することができる。そこで、冬眠の臨床応用を実現させるために冬眠動物が有する低代謝耐性・低温耐性の原理を明らかにしたい。これまでの冬眠研究は個体としての低代謝の制御機構を明らかにするために「個体」を用いて研究されてきた。しかし、能動的低代謝の本質は細胞や組織に宿る低代謝耐性・低温耐性であると考え、本課題ではマウスの「組織」を用いて能動的低代謝を誘導する物質の検索を行った（図1）。マウスは冬眠（hibernation）をしないが、数時間程度の低代謝である日内休眠（daily torpor）を呈する哺乳類である。申請者らはマウスの休眠を自在に誘導できる系を開発しており（Sunagawa and Takahashi, 2016）、同系を用いて休眠したマウスから血清をサンプリングし、並行して用意したマウスES細胞にサンプルを投与し、in vitroで基礎代謝・低温耐性・低酸素耐性の変化を観察した。



図1 研究概要

### ■手法

マウスの能動的低代謝を誘導する物質をin vitro代謝解析系を用いて明らかにするために、次の3つの計画を立て、順次遂行した。

#### 計画1 休眠動物から低代謝誘導物質のサンプリング

申請者らはC57BL/6Jマウスの休眠を自在に誘導する系の開発に成功しており（Sunagawa and Takahashi, 2016）、この系を駆使して休眠時と非休眠時の個体を用意し、各々の血清を採取し、低代謝誘導物質のライブラリを作製した。具体的には、C57BL6/Jマウスは24時間の絶食により安定的に休眠を誘導できるため、絶食群と非絶食群を用意し、もっとも休眠確率が高い絶食後22時間の時点で動物を代謝測定チャンバーから取り出し、吸入麻酔をかけたのちに、心臓の直接穿刺により採血を行った。採取した血液は冷却され、

遠心処理後に血清のみ分離し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結した。なお、効率よくサンプリングを行うために、もともと有していた個体の代謝測定装置を増設し、同時に8匹の個体の酸素消費量・体温を計測できる系を整備した。

### 計画2 細胞を用いた代謝評価系の確立

休眠中の動物の代謝低下は体温の低下だけでは説明がつかないことがわかっており、末梢組織の維持に必要な酸素消費量が低下しているからであるが、必要酸素消費量がどのようなメカニズムで低下するかはわかっていない。そこで、末梢組織の基礎代謝の変化をin vitroで測定できる系を構築し、試験管内で能動的な代謝を再構成するプラットフォームを確立した。具体的にはフラックスアナライザー (Agilent社) を用いて、マウスのES細胞の代謝を酸素消費量および酸排出速度をもって定量した。本装置を用いることでサンプルに対する代謝測定の影響を最小限にとどめることができる。なお、本実験の前に適切な細胞数、培養時間を検索するための予備実験を行った。

### 計画3 In vitro系における低代謝誘導物質の検索

計画1で採取したサンプルを様々な濃度に調整し、計画2で開発したin vitro代謝測定系で細胞の代謝に与える影響を評価した。

## ■結果

8匹のC57BL/6Jマウス (10週齢、オス) を代謝測定装置にセットし、明暗条件12:12時間で24時間以上の飼育を行った後 (図2)、休眠誘導群 (n=6) と休眠非誘導群 (n=2) の2群に分け、休眠を誘導し、休眠誘導後22時間 (ZT-22) の時点で採血を行い、血清を遠心分離したのちに、代謝測定実験までは $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保管した。

次にマウスES細胞の代謝測定系を確立するために、最適な細胞播種数および培養期間を検討した (図3)。24穴プレートに $1 \times 10^5$ および $2 \times 10^5$ 個のES細胞を播種し、それぞれ3時間および12時間の培養を行い、フラックスアナライザーでOCRおよびECARを評価したところ、 $1 \times 10^5$ で3時間培養した群がもっとも再現よくばらつき少なく代謝を測定できたため、以下の実験はすべて当該条件で行った。

最後に、休眠群と非休眠群から採取した血清がES細胞の代謝にどのような変化を及ぼすか検証した。図4Aに示すように、フラックスアナライザーで測定をしながら培地の1%にあたる血清を投与し、マウスES細胞の代謝がどのように変化するか観察した。休眠中の動物は基礎代謝が平常時の約30%程度にまで低下する。図4Bに示したように、休眠および非休眠個体から採取した血清は、細胞レベルのOCRには変化をきたさなかったが、ECARを減少さ

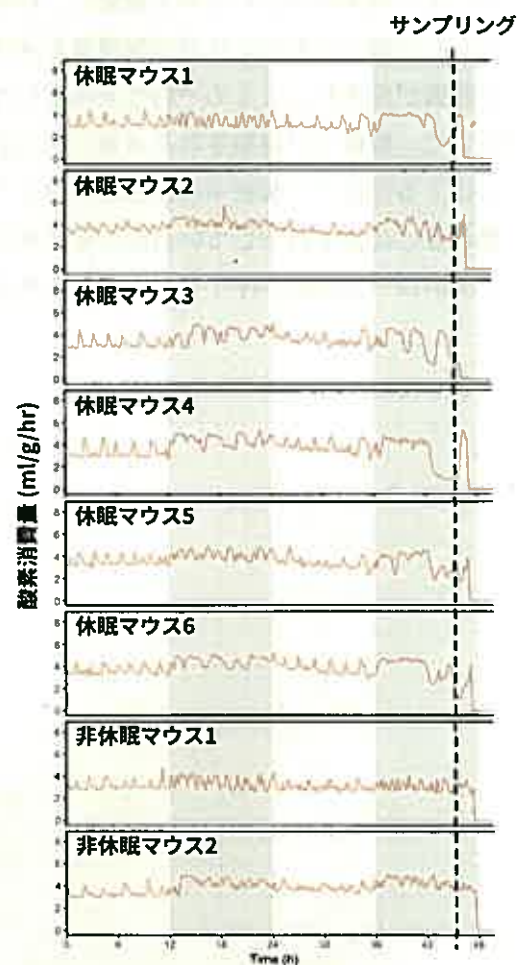


図2 休眠マウスからのサンプリング  
C57BL/6Jマウスを代謝測定装置にセットし酸素消費量を24時間モニターし、6匹は絶食にて休眠誘導を行い (休眠誘導群)、2匹は自由摂食環境に置いた (休眠非誘導群)。絶食開始から22時間後に血清のサンプリングを行った。

せる傾向が見られた。個体の液性因子によって細胞レベルで代謝低下を観察することに成功したと言える。

### ■考察

今回の実験により休眠中の血清はマウスES細胞の解糖系を抑制している可能性が示唆された。現時点で限られた数のサンプルによる結果であるため、より多くの個体から採取した血清において再現性を探る必要がある。また、フラックスアナライザーは細胞状態によって敏感に値が変化する系であり、実験間の正規化を検証する必要がある。これらの問題点を解決した上で、他のES細胞株や異なる近交系のES細胞においても同様の現象がみられるかを観察し、休眠マウスから採取した血清に代謝抑制現象を誘導できる物質が含まれることの一般性を検証したい。さらに、解糖系が抑制されるメカニズムを明らかにするために、解糖系のどのパスウェイが影響を受け代謝が低下しているかしらべるために、メタボローム解析を行っていく予定である。

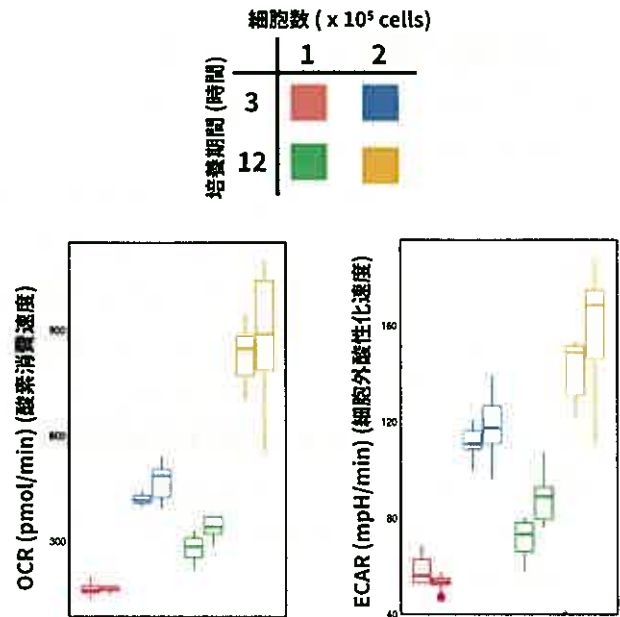


図3 細胞代謝測定の実験条件

播種細胞数と測定開始までの細胞培養時間をそれぞれ2条件ずつ振り、同一の条件で2回実験を行い、ばらつきが少ない条件を検討した。

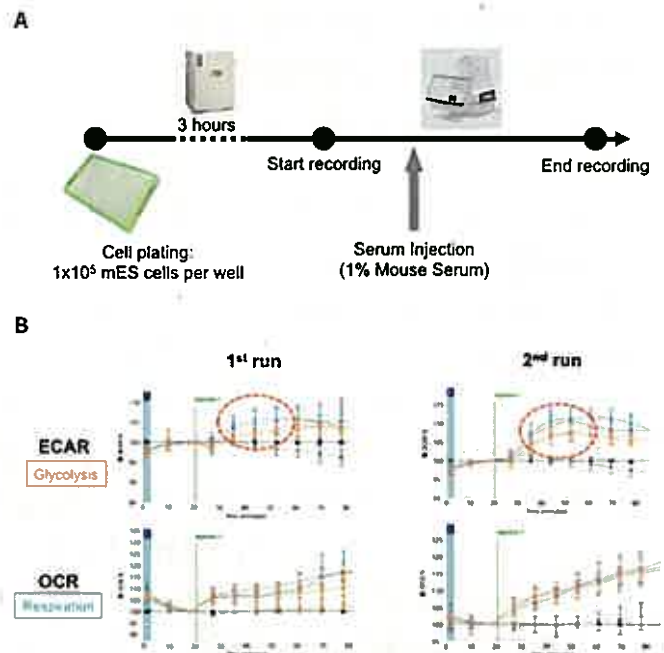


図4 マウスES細胞を用いた低代謝誘導物質の評価

A 実験スキーム、B 非休眠群(水色)と比べて、休眠群(オレンジ)のECARが低い傾向を示した。OCRには差が見られなかった。