

冷やしても死なない細胞の秘密

～冬眠する哺乳類の細胞に学ぶ低温耐性の仕組み～

ポイント

- ・シリアンハムスターの細胞は、冬眠をしない哺乳類の細胞に比べ、低温で長く生きる。
- ・シリアンハムスターの細胞が低温で生存するために重要な働きをする遺伝子を見出した。
- ・この遺伝子の量を増やすと、冬眠しないヒトやマウスの細胞が低温に強くなった。

概要

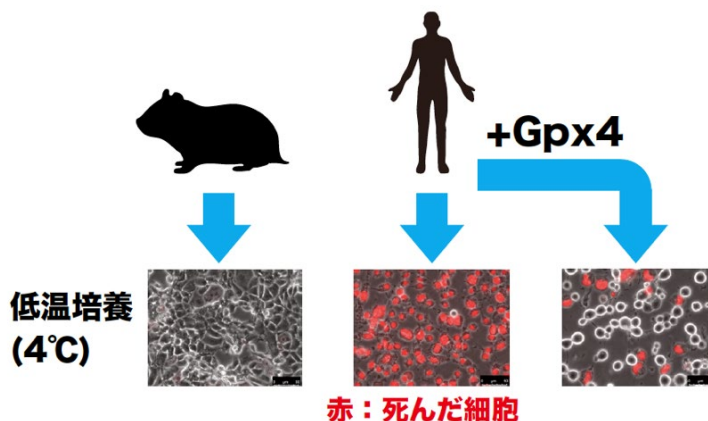
北海道大学低温科学研究所の曾根正光助教、山口良文教授らは、冬眠する哺乳類であるシリアンハムスターの細胞が長時間の低温に耐えられる仕組みの一端を明らかにしました。

哺乳類の中には、食糧が不足する冬を乗り切れるよう、エネルギーを節約するために冬眠を行う種がいます。シリアンハムスターは冬眠の際、10℃以下にもなる低温状態を何日も持続させます。ヒトはこのような長期間の低温状態では、脳、心臓、肺など様々な臓器の機能が不全となり死んでしまいます。

では、冬眠する哺乳類はどのような仕組みで長期間の低温状態に耐えられるのでしょうか。これまでの研究から、冬眠する哺乳類から取り出して培養皿で培養した細胞を冷やすと、ヒトのような冬眠をしない哺乳類の細胞を冷やした場合に比べ、長く生存することが分かっていました。つまり、冬眠する哺乳類の体を形成する一つ一つの細胞に、もともと低温への耐性が備わっているのだと考えられます。しかし、こうした細胞レベルでの低温への耐性が、どのような仕組みで発揮されているのかは不明でした。

そこで研究グループは、まず遺伝子工学の手法を用いて、シリアンハムスターの細胞で働く様々な遺伝子をヒトの細胞で働かせました。次に、それらのヒト細胞の集団の中で、長時間冷やした際に生存できる細胞を選別することで、低温への耐性を与えるシリアンハムスターの遺伝子を探しました。その結果、グルタチオンペルオキシダーゼ4 (Gpx4) と呼ばれる遺伝子を働かせると、ヒトの細胞を冷やした際の生存率が上がりました。反対に、シリアンハムスターの細胞でGpx4の働きを止めると、低温で生存できなくなりました。また研究グループは他にも、シリアンハムスターの低温での生存を支えている遺伝子を複数見出しました。Gpx4を含めこれらの遺伝子は、どれもヒトにおいてもゲノム上に備わっています。もしこれらの遺伝子の働きを、低温におかれた際のヒト細胞で引き出すことができれば、臓器移植の際、臓器の低温保存期間延長などへの応用が期待できます。

なお本研究成果は、日本時間2024年9月19日（木）公開のCell Death and Disease誌に掲載されました。



Gpx4 を働かせるとヒトの細胞が低温で生存できるようになる。

【背景】

哺乳類や鳥類は恒温動物と呼ばれ、気温によらず体温を 35~42°C 付近に保つことができます。進化の過程で動物はこのような「恒温性」を獲得することで、地球上の寒い地域への進出や夜間など気温低下を伴う時間帯での活発な活動が可能となり、飛躍的に行動や活動の範囲を広げてきました。一方で、恒温動物は体温の低下には弱く、通常体温から大きく離れると様々な症状が現れます。例えば、ヒトの体温が 33°C 付近まで低下すると全身の震えが止まらず心拍数が上昇し、さらに体温が低下すると脈拍・心拍数の減少や意識消失などが生じ、命の危険にさらされます。

このような中で例外的なのがハムスターやジリス、コウモリなどの冬眠を行う小型の哺乳類です。これらの哺乳類（以後、冬眠する哺乳類）は冬眠の時期になると、10°C 以下の体温を数日から 2 週間程度のあいだ保つ深冬眠と呼ばれる状態と、そこから急激に体温を戻して 37°C 付近の体温となり短期間過ごす中途覚醒とを交互に繰り返します（図 1）。こうした極端な低体温や劇的な体温変化はヒトなど冬眠しない哺乳類では体に障害を引き起こすはずですが、冬眠する哺乳類ではそうした障害は生じません。

では、冬眠する哺乳類はどのようにして低体温によるダメージから身を守っているのでしょうか？過去の研究により、冬眠する哺乳類から得られた培養細胞は、ヒトなどの冬眠しない哺乳類の培養細胞より、低温で長く生きられることが知られています。こうした、冬眠する哺乳類の細胞自身が持つ低温への耐性が、冬眠の際の極端な低体温によってダメージを受けない理由の一つだと考えられます。

一方、がん研究分野では、ある種の抗がん剤で誘導できる「フェロトーシス」というタイプの細胞死に関する研究が精力的に進められています。フェロトーシスでは、細胞を構成する脂質の酸化により最終的に細胞膜が破壊されます。近年、ヒトの細胞を低温で培養するとなぜか脂質酸化が進み、フェロトーシスが起こることが報告されました。しかし、冬眠する哺乳類の細胞がどのように低温でフェロトーシスを防いでいるのか、また低温耐性に必要な遺伝子はあるのかなど、多くの点が不明でした。

【研究手法】

今回の研究では主に、培養皿のうえで増殖し様々な実験に用いることが容易な、がん細胞を用いて研究を行いました。シリアンハムスターのがん細胞も低温耐性を持っており、今回使用したシリアンハムスターの膀胱がん細胞は 4°C で 5 日以上生存することができます。そこで、次のような方法で、ヒトの細胞に低温耐性を与えることのできるシリアンハムスターの遺伝子をスクリーニング*1しました。

まず、シリアンハムスターのがん細胞で働いている遺伝子のライブラリー*2を作製し、4°C では 1 日でほとんど死んでしまうヒトのがん細胞に遺伝子工学的な手法を用いて導入しました（図 2）。これにより、細胞ごとに異なるシリアンハムスターの遺伝子が導入された多様なヒト細胞の集団を得ました。次にその細胞集団を、通常の培養温度である 37°C から 4°C に培養温度を変更し、6 日間培養しました。するとほとんどの細胞は死んでしまいましたが、再び温度を 37°C に復温させてしばらく培養を続けると、生き残った一部の細胞が増殖を再開し、細胞数が回復しました。このような処理を繰り返し行うことで、低温にもそこからの復温にも耐えられる細胞集団が得られます。この細胞集団に導入されたシリアンハムスターの遺伝子の中には、低温耐性を与える遺伝子が含まれると期待できます。なぜなら、今回用いたヒトのがん細胞は元来このような低温と復温には耐えられずに死んでしまうので、低温と復温への耐性は、導入したシリアンハムスターの遺伝子の働きによってもたらされたと考えられるからです。

さらにこうして見出された、ヒトがん細胞に低温・復温への耐性を与える遺伝子が、シリアンハムスターの細胞が低温で生存するためにも必要なのかを調べました。CRISPR/Cas9（クリスパー/キャスナイン）と呼ばれる分子複合体を用いたゲノム編集技術によって、シリアンハムスターの細胞で特定の遺伝子を破壊し、低温耐性への影響を、細胞死の割合や脂質の酸化量といった指標から検証しました。

【研究成果】

実験の結果、低温と復温への耐性を獲得したヒトの細胞に導入されたシリアンハムスターの遺伝子は Gpx4 と呼ばれる遺伝子でした。この遺伝子から作られるたんぱく質は脂質の酸化を抑える酵素として働き、フェロトーシスを防ぐのに重要な役割を果たします。実際に、シリアンハムスターやヒトの Gpx4 の働きを、冬眠しないヒトのがん細胞で遺伝子導入により強めると、これらの細胞が低温でフェロトーシスを引き起こすのを抑えることができました。次に、Gpx4 がシリアンハムスター細胞の低温耐性にも重要なのかを調べました。ゲノム編集技術により Gpx4 遺伝子を破壊したシリアンハムスター細胞を作り、4°Cで培養を行ったところ、4°Cで2日間は生存できましたが、その後徐々に細胞死を起こし、5日目にはほとんど死滅しました。これはシリアンハムスターの細胞が低温で長期間生存するために Gpx4 遺伝子が必要なことを意味します。一方で、これら Gpx4 遺伝子を破壊したシリアンハムスター細胞も2日間は4°Cで生存したため、ヒトの細胞より明らかに低温への耐性が高いことが分かりました。

そこで研究グループは、シリアンハムスターの細胞には Gpx4 以外にも低温による細胞死を防ぐメカニズムが備わっていると考えました。がん研究分野で、フェロトーシスを抑える働きをする遺伝子が Gpx4 以外にも複数報告されていますが、なかでも三つの遺伝子、FSP1、Dhodh、Gch1 に着目しました。シリアンハムスターの細胞で、それぞれの遺伝子を個別に破壊し4°Cで培養しても、細胞死に影響はありませんでした。しかし、これらの遺伝子破壊された細胞に、同時に Gpx4 たんぱく質の働きを止める薬剤を加えて4°Cで培養すると、2日間で細胞死が増加しました。これらの結果から、FSP1、Dhodh、Gch1 遺伝子はいずれも Gpx4 遺伝子と協力して、シリアンハムスターの細胞の低温耐性を支えていると考えられます。

さらに Gch1 遺伝子の働きをヒトの細胞で増強させると、Gpx4 遺伝子の場合と同様、低温による細胞死を抑え、生存率が飛躍的に高まることも分かりました。Gch1 遺伝子から作られるたんぱく質はビオプテリンという抗酸化作用を持つ物質を作り出す働きをします。そこで最後に、がん細胞以外の正常な細胞への効果を検証しました。マウスから取り出した肝臓の細胞を低温培養する際に、シリアンハムスターの Gpx4 遺伝子を導入し働かせるとともにビオプテリンを培養液に加えると、両者は相乗的に細胞の低温での生存率を高めることが分かりました。

【今後への期待】

今回、シリアンハムスター細胞の低温耐性を支える遺伝子として、Gpx4 を中心とした四つの遺伝子を見出しました。これらの遺伝子はどれもヒトのゲノムにも存在する遺伝子ですが、これらの遺伝子が働く経路を遺伝子操作や化合物添加により低温下で強めることで、ヒトやマウスのような冬眠しない哺乳類の細胞でも低温耐性が強められることも明らかとなりました。こうした方法を応用すれば、臓器移植の際に摘出された臓器の低温保存期間を延長することなどが期待できます。一方で、これらの遺伝子のがん細胞の増殖や生存にも必要な遺伝子であるため、慎重な検討が必要です。

また、これらの遺伝子は冬眠する哺乳類と冬眠しない哺乳類の両者にあるにもかかわらず、なぜ両者の低温耐性に違いがでるのかは、まだ謎のまま残されています。今回の成果がその解明の手掛かりになると期待されます。

論文情報

論文名 Identification of genes supporting cold resistance of mammalian cells: lessons from a hibernator (哺乳類細胞の低温耐性を支える遺伝子の同定：冬眠動物から学ぶ)

著者名 曾根正光¹、三橋ののか^{1,2}、杉浦悠毅³、松岡悠太³、前田 黎³、山内彩加林¹、岡橋良仁^{1,2}、山下純平¹、曾根加菜子¹、延寿祥代¹、姉川大輔¹、山口良文¹ (¹北海道大学低温科学研究所、²北海道大学大学院環境科学院、³京都大学大学院医学研究科附属がん免疫総合研究センター)

雑誌名 Cell Death and Disease (細胞死の専門誌)

D O I 10.1038/s41419-024-07059-w

公表日 2024年9月19日(木) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学低温科学研究所 教授 山口良文 (やまぐちよしふみ)

T E L 011-706-6892 F A X 011-706-7142 メール bunbun@lowtem.hokudai.ac.jp

U R L <http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/hibernation/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

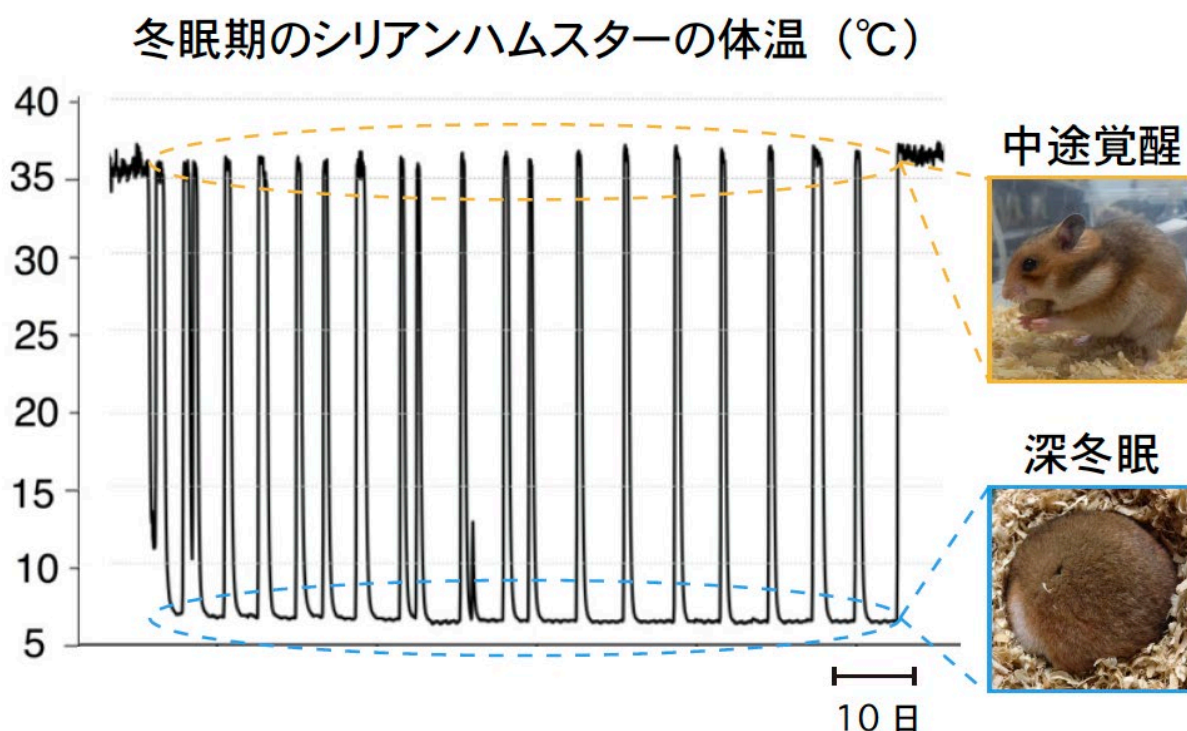


図 1. シリアンハムスターの冬眠期間の体温変化図。低体温の深冬眠と、通常体温の中途覚醒を何度も自然に繰り返す。

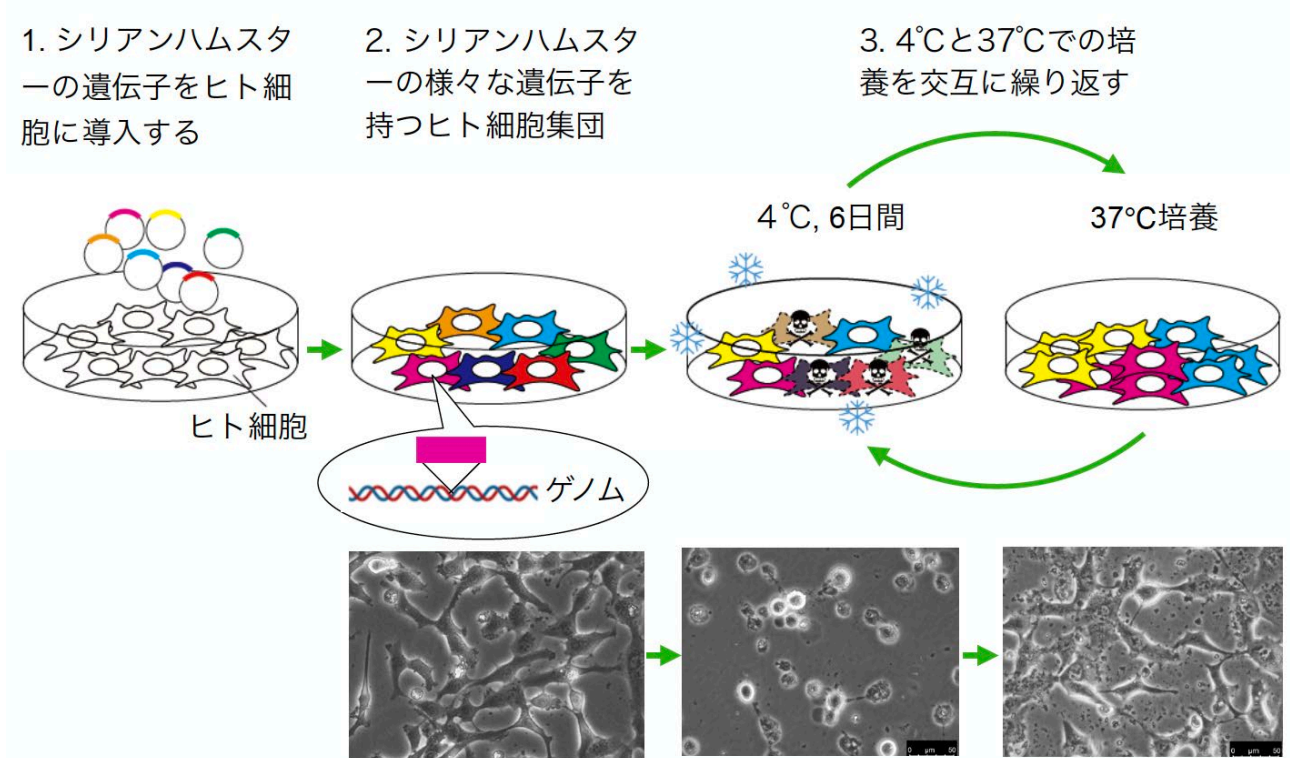


図 2. スクリーニングの概要。ヒトの細胞に導入することで、ヒトの細胞が低温と復温に耐性を獲得し、生存することができるようになるような、シリアンハムスターの遺伝子をスクリーニングした。

【用語解説】

*1 スクリーニング … 多くの異なる性質をもつ因子から構成される集団のなかから、条件に合うものを見つけ出すこと。ここでは、低温・復温に弱いヒトのがん細胞をそれらに対して強くする遺伝子を、多数の遺伝子の中から探し出した、ということ。

*2 遺伝子のライブラリー … ここでは、シリアンハムスターのがん細胞で働いている遺伝子の多数を含むように作られた、プラスミドと呼ばれる環状の DNA の集まりを指す (図 2 の 1)。一つ一つのプラスミドにはシリアンハムスターの異なる遺伝子が挿入されており、ヒト細胞に導入されると、それぞれの遺伝子がその細胞の内部で働くようになる。個々の細胞がどの遺伝子が挿入されたプラスミドを受け取るかはランダムに決まるため、それぞれの細胞ごとに働くシリアンハムスターの遺伝子は異なる。