

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03140

研究課題名（和文）宇宙環境における生物個体ホメオスタシス攪乱の可視化

研究課題名（英文）Visualization of homeostatic disturbances in the space environment

研究代表者

阪上 朝子（Sakaue, Asako）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：90462689

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,900,000円

研究成果の概要（和文）：「動物（マウス）が宇宙へ行った際、どのようなストレスを感じ、あるいは個体内腫瘍はどのような影響を受けるのか？」という疑問に対して、近い将来国際宇宙ステーションISS・きぼう実験棟において可視化観察する為の発光-蛍光マーカーの開発を行った。発光-蛍光マーカーの過剰発現がホストマウスの獲得免疫を作動させてしまうケースが報告されており、その現象を回避する為の技術開発を試行錯誤しながら進め、最終的に理想的なマーカーを作製する事が出来た。本マーカーを利用した共同研究により、腫瘍を担癌したマウスは疑似微小重力環境においてよりストレス感受性になる事を再現性をもって可視化する事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2020年末にCell誌に報告されたレビューでは、生体が宇宙飛行によって受ける6つの生物影響とその5つの要因について議論されています。

Artemis計画に代表される宇宙探査時代において、人類が遭遇するであろう宇宙環境における生命現象の理解を対象にした「宇宙生命科学」に我々のバイオイメージング技術を応用し、まずは2つの視点（微小重力、宇宙放射線曝露）で科学するための技術革新を推進しています。地球環境や宇宙環境（ISS、月）と生体との相互作用を細胞レベルから個体レベル、様々な視点でバイオイメージングすることで、より複雑な生命恒常性の理解に貢献していきます。

研究成果の概要（英文）：When animals (mice) go to space, what kind of stress do they experience and how are their intra-tumors affected?

We have developed Bioluminescence-Fluorescence markers to visualize and observe these phenomena in the near future on the International Space Station (ISS)-Kibo module.

It has been reported that overexpression of Bioluminescence-Fluorescence markers unintentionally activate acquired immunity in host mice, and we have finally succeeded in creating an ideal marker through trial and error of techniques to overcome this problem. Through collaborative research using this marker, we achieved in visualizing the stress sensitivity of tumor-bearing mice under simulated microgravity conditions by in vivo bioluminescence imaging.

研究分野：分子生物学

キーワード：微小重力環境 発光イメージング 蛍光3次元可視化

1. 研究開始当初の背景

国際宇宙ステーション (ISS) プロジェクトにおいて本邦は「きぼう」日本実験棟の開発や運用を担当している。2018年現在、ISSおよび「きぼう」はヒトが微小重力環境下(10^{-6} G ~)において長期滞在し種々の船内外の宇宙実験を実施する唯一の建造物である。アメリカ航空宇宙局が進める“NASA's Journey to Mars” ミッション (<https://www.nasa.gov/content/nasas-journey-to-mars>)に代表されるように、火星への到達を目指す有人宇宙探査計画が進行しており、JAXA 宇宙航空研究開発機構も“将来の国際有人宇宙探査と今後の地球低軌道宇宙活動に関する検討”などを重点的に推進している (<http://iss.jaxa.jp/about/>)。近未来に人類が遭遇するであろう宇宙環境 (微小重力、宇宙放射線曝露など) における生命現象を対象にした「**宇宙生命科学**」は、上記の有人宇宙探査計画に並行して積極的に進められるべき課題である。実際に ISS/「きぼう」日本実験棟の船内環境を利用するフィジビリティスタディ (FS) テーマが随時実行され着実に成果を発信し続けている。我々は、独自のバイオイメージング技術を応用して、ISS/「きぼう」における生命現象可視化 (On-site direct visualization) の実現を目標に掲げ、宇宙環境における生命恒常性を理解するための技術革新を推進している。

2. 研究の目的

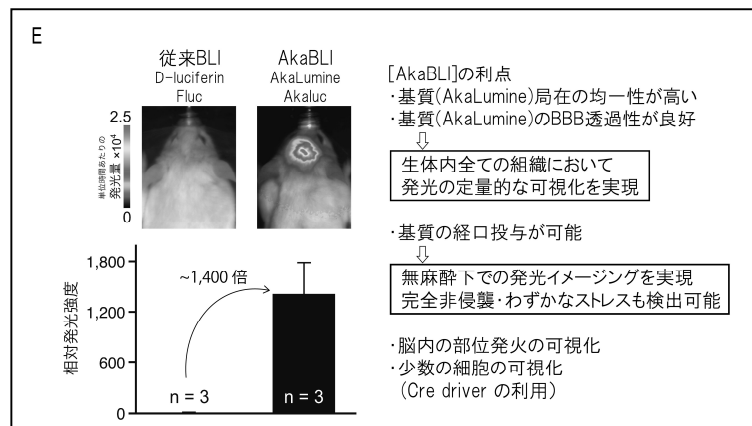
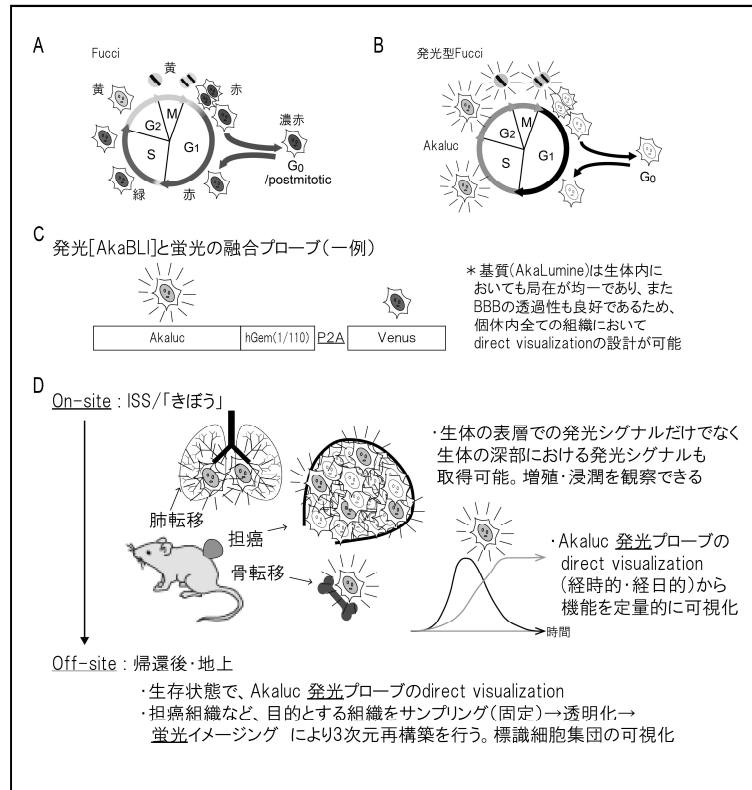
JAXA [2018年度「きぼう」利用FSテーマ] 代表：群馬大学・高橋昭久教授、研究テーマ：「宇宙での微小重力環境におけるガンの進行」に研究分担者として参画するうえで、「**発光イメージング**システムのデザインおよび**発光型 Fucci** プロープの開発」を実践するための研究基盤を整備する。2018年に研究分担者の岩野らが開発した「人工生物発光システムAkaBLI」を採用する。このシステムは、生きた動物個体深部からのシグナル検出能を飛躍的に向上させることに成功している。新たにこの発光イメージングを基軸としたプロープおよび技術を整備することで、ISS/「きぼう」において、生命現象可視化(On-site direct visualization) を実現し、さまざまな仮説の検証に貢献する。近未来的には「ISS Hotel」「宇宙エレベーター」「深宇宙探査ゲートウェイ」「月」「火星」など近宇宙空間で暮らすべきヒトの生命恒常性を理解するための技術革新へとつなげていく。

3. 研究の方法

ISS/「きぼう」ではさまざまな動植物について動態をモニタする実験が行われている。現在は「小動物飼育ミッション」のもとに、合計 12 匹のマウスを個別にモニタする環境が整備され、さらに小動物の *in vivo* **発光イメージング**装置が開発されている。発光の蛍光に対するメリットとして励起光を必要としないこと、よって生体深部のシグナルも取得できることが挙げられる。各種**発光プロープ**および、**発光イメージング**環境を整備することで、On-site : ISS/「きぼう」において、生体の連続的な機能遺伝子動態の可視化が初めて可能となる(図 A-D)。

まず、我々の保有する**蛍光性の機能プローブを発光型に** 改変する(図 B)。研究分担者が開発した「人工生物発光システム AkaBLI」は、生きた動物個体深部からのシグナル検出能を飛躍的に向上させた技術である(Iwano et al., *Science* 2018)(図 D,E)。

「動物(マウス)が宇宙へ行った際、どのようなストレスを感じ、あるいは個体内腫瘍がどのような影響を受けるのか?」という課題に対して、これらを可視化する為の**発光プローブ**の開発を進める。さらに**発光プローブ**を効果的かつ安定に発現する細胞株やマウスラインの作製を通して、真の宇宙空間における生命現象の可視化(On-site direct visualization)の実現を目指す。具体的には、発光-蛍光マーカーを発現する細胞株を用いて担癌実験を行う。ホストマウスを疑似微小重力モデル実験(マウス尾部懸垂(群馬大学・高橋昭久教授との共同研究による))に処し、将来の宇宙実験の為の予備実験を行う。さらに帰還後・地上での Off-site 実験として、担癌組織や転移巣組織をサンプリング、透明化处理をして、蛍光イメージングにより3次元再構成を行うことで標識細胞集団を可視化する。In vivo BLI との相関を解釈する。



4. 研究成果

* 本研究成果について論文にまとめている段階です。技術の詳細を報告する内容の為、論文公開までは、詳細の公表を控えたいと思います。

a. 生命基本現象を可視化する蛍光プローブの選択・導入と発光型への変換

Fucci について、増殖期をモニタするタイプ: hGeminin(1/110) を**発光-蛍光型**に改変した。Venus-Akaluc-hGeminin(1/110) について機能検証を in vitro, in vivo で行い有用であることを確認した。具体的には、C3H/HeN/Jcl マウス系統での syngeneic model 実験を視野に、LM8 (murine osteosarcoma cell line) 細胞で安定かつ強力に発現する細胞株の樹立を目指し、PiggyBac system を採用した。LM8/Venus-Akaluc-hGeminin(1/110)細胞をマウスに担癌後、形成される腫瘍塊や転移する細胞集団の中で、増殖フェーズ(S, G2, M期)にあるものを in

vivo BLI (Bioluminescence Imaging) で可視化する事ができた。これはもちろん宇宙実験のみならず生体内での増殖フェーズにある極少数の細胞を in vivo BLI で描出する研究に有用である。2022 年度中に論文で報告する計画である。

次に、腫瘍塊および転移する細胞全てをモニタする為に、シンプルな**発光-蛍光マーカー**を作成した。

詳細は、後日再提出

宇宙における個体レベルでのストレス検知を目指し、自作の蛍光型酸化ストレスプローブを発光型へ改変した。まず、in vitro の系で、蛍光型と同様のストレス応答を可視化できるかどうかの検討が重要であり、詳細の実験を進めている段階である。最適な発光型プローブが作成できたら、発現細胞の担癌、もしくは安定発現動物（マウス）の作製を進める予定である。

発光-蛍光マーカーを発現する細胞株について、ホストマウスを疑似微小重力モデル実験（マウス尾部懸垂（群馬大学・高橋昭久教授との共同研究による））に処し、“宇宙での微小重力環境におけるガンの進行”についての予備実験を行った。

詳細は、後日再提出

b. 発光イメージングシステムのデザイン

研究分担者の岩野らにより開発された高感度発光システム「AkaBLI」(Iwano et al., *Science* 2018) について、ISS/「きぼう」実験棟に搭載予定の**マウス発光イメージングシステム**で最大の成果を発揮するような実験系のデザインを行った。麻酔-基質投与-in vivo BLI-タイムラプスイメージングの一連を誰でもスムーズに行えるように設計する事で、データの再現性の向上に貢献してゆく。基質投与後連続した30分間程度のBLIを行うと、発光輝度のピークを捉える事ができる。発光輝度ピーク値と腫瘍の状態との相関を検証した。マウス個体において連続的な可視化を目標に、無麻酔かつ自由行動下のシグナル追跡の為の基質(AkaLumine)投与方法などのノウハウを蓄積した（*まずは地上実験室レベルでのイメージングを想定）。基質(AkaLumine)の体内動態の理解のため、組織特異的 AkaLuc 発現マウスを用いた詳細な発光プロファイルの取得を行い、観察部位に依らない普遍的なプロトコルの作製を行った。

c. Off-site, 発光-蛍光検証実験

ISS/「きぼう」から帰還後の生体について、Off-siteでの検証実験を計画した。生存状態での**発光イメージング**を行った後に、目的とする組織のサンプリング（固定）、透明化を行い、**蛍光3次元イメージング**により標識細胞についての検証を行う事が理想的であるが、現状では軌道上で安楽死処置された状態での帰還となるため、それに合わせた実験を再検討した。帰還後に目的とする組織を透明化して、蛍光3次元イメージングを行う為には、個体の固定方法が重要となってくる。可能な実験条件について検討を進め、PFA固定後に凍結されたマウスから腫瘍塊および肺転移巣をサンプリング、透明化して蛍光3次元再構築を行い、転移巣のダイナミクス可視化を行う事が出来た。将来的にはOn-site(軌道・宇宙)生体深部発光イメージングデータに、このOff-site3次元情報のアサインメントを実行することで、詳細の理解を進める。

上記 a. b. c.を同時に推進しながら、「**宇宙生命科学**」における時間情報、空間情報、重力情報を基軸とした生命制御機構について理解を深めるための可視化 (direct visualization) 技術の基盤整備を進める事ができた。作製された**発光-蛍光マーカー**技術とその安定発現細胞株や、計画進行中の**発光型プローブ**安定発現マウスは、宇宙実験のみならず、例えば産業界における薬剤動態スクリーニングへの応用も視野に検討を進めていく。High throughput, bioluminescent-based drug screening system などをパッケージとして提案できるようシステムをデザインしてゆく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahashi K, Takahashi H, Furuichi T, Toyota M, Furutani-Seiki M, Kobayashi T, Watanabe-Takano H, Shinohara M, Numaga-Tomita T, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Naruse K.	4. 巻 7(1):2
2. 論文標題 Gravity sensing in plant and animal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Microgravity.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41526-020-00130-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa S, Nagamatsu A, Neno M, Fujimori A, Kakinuma S, Katsube T, Wang B, Tsuruoka C, Shirai T, Nakamura AJ, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Harada H, Kobayashi M, Kobayashi J, Kunieda T, Funayama T, Suzuki M, Miyamoto T, Hidema J, Yoshida Y, Takahashi A.	4. 巻 4703286
2. 論文標題 Space Radiation Biology for "Living in Space".	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/4703286.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyao T, Miyauchi M, Kelly ST, Terooatea TW, Ishikawa T, Oh E, Hirai S, Horie K, Takakura Y, Ohki H, Hayama M, Maruyama Y, Seki T, Ishii H, Yabukami H, Yoshida M, Inoue A, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Muratani M, Minoda A, Akiyama N, Akiyama T.	4. 巻 11:e73998
2. 論文標題 Integrative analysis of scRNA-seq and scATAC-seq revealed transit-amplifying thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.73998.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Asako Sakaue-Sawano
2. 発表標題 細胞の個性を理解するための技術開発
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪上 沢野 朝子、宮脇 敦史
2. 発表標題 疑似宇宙環境における基本的生命現象の可視化
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会 第33回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asako Sakaue-Sawano and Atsushi Miyawaki
2. 発表標題 Visualization of Homeostatic Disturbances in Space
3. 学会等名 Resonance Bio International Symposium (RBIS) 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asako Sakaue-Sawano
2. 発表標題 Observing heterogeneity in cell society 細胞の個性を理解するための技術開発
3. 学会等名 第10回国際放射線神経生物学会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪上一沢野 朝子
2. 発表標題 「宇宙での細胞機能を理解するための可視化技術開発」
3. 学会等名 科研費新学術領域研究「宇宙に生きる」一般公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阪上-沢野 朝子
2. 発表標題 生命現象をダイレクトに解読するためのバイオイメージング技術開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 2021年12月 ワークショップ「エンハンスドバイオ」
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Fucci https://cfds.riken.jp/material/fucci
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩野 智 (Iwano Satoshi) (10734832)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・客員研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------