

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592478

研究課題名(和文) 微小重力環境における内耳末梢前庭器の遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Effect of microgravity on the gene expression in the mouse vestibular organ

研究代表者

工 穰 (TAKUMI, Yutaka)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：70312501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、異なる重力環境が前庭系の神経伝達機構に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、宇宙サンプルおよび加重力サンプルを用いて、微小重力環境が内耳末梢前庭に及ぼす影響を遺伝子発現解析により同定し、また、過重力(2G)環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子解析を行うことで、重力変化が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響を総合的に解明することを計画した。その結果、微小重力環境への適応に関しては、少なくとも早期適応と考えられる遺伝子発現変化と、後期適応と考えられる遺伝子発現変化の2つのフェーズがあることが示唆される結果となった。

研究成果の概要(英文)：In the microgravity environment, significant decrease of vestibular inputs cause motion sickness. In this study, we compare the gene expression between 90 days space flight mouse and 15 days space flight mouse and its ground control mouse vestibular. As a result, *Oc90*, a major component of otolith expression increased after 15 days space flight, but decreased after 90 days space flight. Similar situation were observed in the calcium binding protein *S100a8* and *S100a9*. These results clearly indicated that the adaptation for micro gravity environment has acute adaptation phase and chronic adaptation phase.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：微小重力 前庭 神経可塑性 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

(1)宇宙開発が進展し、宇宙ステーションなどが登場することによって、人類が微小重力環境に長期間滞在することが可能となってきたが、微小重力が人体に及ぼす影響に関しては必ずしも明らかとなっていない。特に、微小重力環境に置かれた場合、ほとんどが「宇宙酔い」を経験するといわれており、宇宙環境利用が進む中で未だ解決されていない生体の反応の一つである。「宇宙酔い」の一因として、加速度が生じない微小重力下では、内耳末梢前庭器における加速度受容(求心性の入力)に変化が生じるためと推測されているが、その詳細は未だ不明である。

(2)我々はこれまで「異なる重力環境が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響に関する研究」などの地上実験を行い、加重力環境が前庭に及ぼす影響に関して詳細に検討してきた。その結果、過重力環境によりラット末梢前庭器において Syntaxin や CREB などの神経可塑性関連遺伝子の発現が増加していることを明らかにした。また免疫組織化学的検討より、海馬等で可塑性に関連しているとされる糖鎖 PSA, HNK-1 が内耳末梢前庭器でも発現することを明らかにした(Takumi et al., 2002, Iijima et al., 2004, Isawa et al., 2004)。以上の結果より、中枢で行われていると推測されてきた平衡機能の代償が、末梢前庭においても代償されていることが考えられた。特に求心性第一次ニューロンが末梢前庭系の可塑性に重要な役割を果たしている可能性が明らかとなってきた。

(3)この仮説を証明するための研究として我々の提案した「The Effect of Micro Gravity on Vestibular Neurotransmission」が第2回ライフサイエンス国際公募に採択され、微小重力環境における末梢前庭器の遺伝子発現を解析する予定であったが、2003年のスペースシャトル・コロンビアの事故によりサンプルは得られず、実験機会が得られない状態が続いていた。しかし2010年に、イタリア宇宙機関(ASI)によって開発された Mouse Drawer System (MDS)による国際宇宙ステーション内マウス長期滞在実験(STS-128, 129)における Tissue Sharing Program 国際公募によって、微小重力環境に90日間滞在した貴重なマウス内耳サンプルを得ることができた。またこれに引き続き、スペースシャトル内マウス短期滞在実験(STS-131)における Tissue Sharing Program によって、微小重力環境に16日間滞在したマウス内耳サンプルも得ることができた。(スペースシャトルは STS-134 にて退役のため今後の宇宙実験機会は未定である)本研究では、これらの貴重なサンプルを中心に、異なる重力環境が前庭系の遺伝子発現に及ぼす影響に関して詳細に調査を行うものとした。

### 2. 研究の目的

(1)本研究では、異なる重力環境が前庭系の神経伝達機構に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、宇宙サンプルおよび加重力サンプルを用いて、微小重力環境が内耳末梢前庭に及ぼす影響を遺伝子発現解析により同定し、また、過重力(2G)環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子解析を行うことで、重力変化が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響を総合的に解明することを計画した。特に、2010年にイタリア宇宙機関(ASI)によって開発された Mouse Drawer System (MDS)による国際宇宙ステーション内マウス長期滞在実験(STS-128, 129)における Tissue Sharing Program 国際公募によって、微小重力環境に90日間滞在した貴重なマウス内耳サンプルおよび、これに引き続き、スペースシャトル内マウス短期滞在実験(STS-131)における Tissue Sharing Program によって、微小重力環境に16日間滞在したマウス内耳サンプルの比較検討を行う事で、短期間の宇宙滞在および長期間の宇宙滞在前庭系に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。特に、内耳末梢前庭における微小重力応答遺伝子を同定し、微小重力環境滞在期間の違いによる発現変化を明らかにし、過重力(2G)環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子解析を行い、発現遺伝子の内耳局在を検討を行い、重力変化が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響を総合的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)cDNA マイクロアレイによる微小重力応答遺伝子の発現解析  
スペースシャトル STS-129 (90日間滞在, n=3)のマウス、スペースシャトル STS-131 (15日間滞在, n=16)のマウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスから摘出された内耳より、前庭(平衡斑・半規管・前庭神経節)および蝸牛サンプルを RNlater (Ambion) 下で摘出した。前庭および蝸牛のそれぞれより、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。BioAnalyzer 2100 および RNA 6000 pico kit を用いてクオリティチェックを行った。RNA サンプルを逆転写を行い、Cy3 で標識化した後に、マイクロアレイ(Agilent 社 Gene sprint 3G, 62976 遺伝子)を用いて網羅的発現解析を行った。得られたマイクロアレイデータを基に、Agilent 社の GeneSpring ver. 11 を用いて全体的な発現プロファイリングを短期滞在と長期滞在で比較し、前庭全体での発現傾向の変化を把握した。また、蝸牛との発現変化比較や個体間の発現差の検討を行い、微小重力環境に対して前庭で特異的に発現変化している遺伝子を同定した。

(2) Real-time PCR による異なる微小重力環境滞在期間での遺伝子発現変化の定量解析  
cDNA マイクロアレイを用いた解析により、微小重力環境下にそれぞれ、90 日間、16 日間滞在したマウスに関して、それぞれ前庭で発現増加 (2 倍以上)・減少 (1/2 以下) した遺伝子群についてパスウェイ解析および Gene Ontology 解析を行った。また、発現変化の認められた遺伝子群のうち、いくつかの遺伝子について、Taq-Man probe を用いた定量 RT-PCR 法にて定量的発現比較解析を行い、マイクロアレイで認められた発現量変化を確認した。

(3) 過重力 (2 G) 環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子の解析

異なる重力環境下における遺伝子発現変化に関する共同実験を行っている、大阪大学 (大平、河野) にて、STS-129 と同系統のマウスを 2G 環境に同日間 (90 日) 滞在させる実験を行い、微小重力環境に 90 日間滞在したマウスとの発現増加・減少遺伝子を比較することで、重力変化に共通して応答する遺伝子を同定することを目的に検討を行った。具体的には、微小重力環境に滞在したマウスと同様に、2G 環境滞在 (90 日間, n=8) のマウス、および 1G コントロールマウスから摘出された前庭 (平衡斑・半規管・前庭神経節) および蝸牛サンプルを用い、同様に RNA を抽出後、クオリティチェックを行い、逆転写および Cy3 によるラベリングを行い、マイクロアレイ (Agilent 社, 62976 遺伝子) による網羅的発現解析を行った。

(4) 異なる重力環境下において発現量が変化した遺伝子の内耳局在検討

上記 (1)~(3) の検討で微小重力応答遺伝子や重力変化に共通して応答する遺伝子など、異なる重力環境下において末梢前庭器において発現量の変化が認められる遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体を用い、その局在を免疫組織学的に検討し、重力変化に対する遺伝子発現が前庭のどの細胞を中心に起こっているのかを検討した。

#### 4. 研究成果

(1) cDNA マイクロアレイによる微小重力応答遺伝子の発現解析  
スペースシャトル STS-129 (90 日間滞在, n=3) およびスペースシャトル STS-131 (15 日間滞在, n=16) により微小重力環境にそれぞれ 90 日間、15 日間滞在したマウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスの前庭および蝸牛サンプルによる網羅的発現解析の比較検討を行った。その結果、微小重力環境下において末梢前庭器において発現量が変化する遺伝子群を同定した。同定

された遺伝子に関して、定量 PCR 法により遺伝子発現解析を行った。GAPDH をコントロールとして補正し検討を行った結果、90 日間滞在のマウスにおいて、カルシウム結合タンパクである S100a8, S100a9、耳石の構成タンパクである Oc90 などの遺伝子の発現の低下が認められた。一方、ストレス応答タンパクである Hspb7 や GABA 受容体である Gabra2 などの遺伝子発現の増加が認められた。また、これらの遺伝子に関して 15 日間微小重力環境下に滞在したマウスを用いて検討した所、非常に興味深いことに S100a8, S100a9, Oc90 では発現の増加を認め、Gabra2 では発現量の大幅な減少を認めるという真逆の遺伝子発現変化を起こしていることが明らかとなった。一方、ストレス応答遺伝子である Hspb7 に関しては 15 日間、90 日間のどちらのマウスにおいても発現の増加を認めるという結果となっていることが明らかとなった。以上の結果より、マウス末梢前庭器において、微小重力環境への適応に関しては、少なくとも早期適応と考えられる遺伝子発現変化と、後期適応と考えられる遺伝子発現変化の 2 つのフェーズがあることが示唆される結果となった (表 1 および図 1)。

(2) 過重力 (2 G) 環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子の解析

前項のスペースシャトルによる実験と同日間 2G 環境に滞在させた STS-129 と同系統のマウスの発現解析を行った。

その結果、90 日間微小重力環境に滞在した群で大幅に発現減少していた S100a8, S100a9, Oc90 の各遺伝子は、興味深いことに 2G 環境下に 90 日間暴露しても同様の遺伝子発現変化を示していた (表 1 および図 1)。特に、カルシウム結合タンパクである S100a8、S100a9 や耳石タンパクである Oc90 は、微小重力でも過重力でも長期に渡り異なる重力環境下に滞在することによって発現抑制を受けることが明らかとなり、重力変化が耳石代謝に及ぼす変化を表していると思われた。一方、90 日間宇宙滞在群で増加していた Gabra2 は、長期の微小重力環境滞在によって慢性化した前庭系へのシグナル入力減少を補うため発現を増加させることで神経活動を増強している可能性があると思われたが、2G 環境下では発現抑制を受けていた。これは慢性的に増加した前庭系へのシグナル入力を減少させるために発現を抑制させ、神経活動を調整している可能性があると思われた。

	ActB	S100a8	S100a9	Oc90	Gabra2	Hspb7
90日間宇宙滞在群	1.37	0.03	0.03	0.75	1.46	1.53
15日間宇宙滞在群	1.19	1.71	1.58	2.07	0.25	3.17
90日間2G滞在群	1.20	0.05	0.05	0.75	0.47	1.74

表1 異なる重力環境下における遺伝子発現の変化(1G環境を1.0とした場合の相対値で示す)

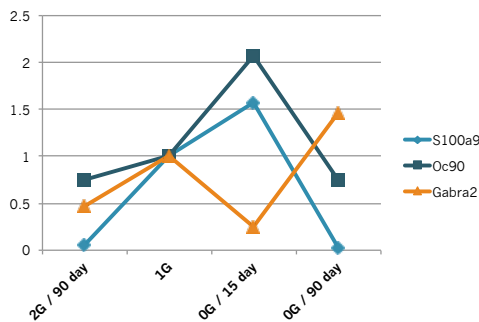


図1 異なる重力環境および期間における遺伝子発現変化(1G環境を1.0とした場合の相対値で示す)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計5件)

- ① 工 穰、小口智啓、鈴木伸嘉、宇佐美真二:微小重力環境における内耳末梢前庭器の遺伝子発現解析. 第71回日本めまい平衡医学会 2012. 11. 29. 東京
- ② 工 穰、小口智啓、鈴木伸嘉、西尾信哉、宇佐美真二:微小重力環境における内耳末梢前庭器の遺伝子発現解析. 第1回耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス 2012. 9. 15. 旭川
- ③ Oguchi T, Nishio S, Suzuki N, Takumi Y, Usami S. The effect of microgravity on gene expression in the vestibular end-organs. Otoconin 90 was up-regulated by microgravity. 27th Barany Society Meeting. 2012. 6. 10-13. Uppsala, Sweden
- ④ Takumi Y, Oguchi T, Suzuki N, Nishio S, Boyle R. Usami S. The effect of Microgravity on mRNA Expression in the Vestibular Endorgans: Comparison of the 90days and 15days space flight. 8th Symposium on the Role of the Vestibular Organs in Space Explorartion 2011. 4. 8-10. ヒューストン
- ⑤ Oguchi T, Suzuki N, Takumi Y, Usami S. The effect of Microgravity on Gene Expression in the Vestibular Endorgans.

8th Symposium on the Role of the Vestibular Organs in Space Explorartion. 2011. 4. 8-10. ヒューストン

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

工 穰 (TAKUMI, Yutaka)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70312501

### (2) 研究分担者

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 10184996

### (3) 連携研究者

鈴木 伸嘉 (SUZUKI, Nobuyoshi)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号: 20377641

小口 智啓 (OGUCHI, Tomohiro)  
信州大学・医学部・委嘱講師  
研究者番号: 10377640

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号: 70467166