

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24620005

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュの骨格筋に対する微重力環境の影響

研究課題名(英文)Influence of microgravity environment on skeletal muscle of zebrafish

研究代表者

佐藤 文規 (SATO, Fuminori)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教

研究者番号：10588263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：水棲動物であるゼブラフィッシュを用いて宇宙滞在実験を実施し、微重力環境下における筋萎縮に関して解析を行った。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析(網羅的遺伝子発現解析)の結果より、宇宙滞在ゼブラフィッシュの骨格筋において、様々な遺伝子の発現に変動が認められた。このことより、水棲動物であるゼブラフィッシュの骨格筋も陸生動物と同様に微重力環境の影響を受けることが明らかとなった。また、一般的に筋萎縮を誘発することが知られている、運動抑制および老化で認められる遺伝子の発現変動とは異なる多くの点を確認された。

研究成果の概要(英文)：We performed space stay experiments using zebrafish which are aquatic organisms for analyzing microgravity environment-dependent skeletal muscle atrophy. As a results of transcriptome analysis (comprehensive analysis of gene expression) using a next-generation sequencing, the variation was detected in a number of gene expression in skeletal muscle of space stay zebrafish. This result indicates that the skeletal muscle of zebrafish is affected by microgravity environment similar to that of terrestrial animals. Compared with the variation of gene expression on movement suppression and aging which are generally known to induce skeletal muscle atrophy, there are many differences in variation of gene expression on microgravity environment.

研究分野：発生生物学 分子生物学

キーワード：微重力環境 ゼブラフィッシュ 骨格筋 トランスクリプトーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

人類初の有人宇宙飛行以来、微重力環境が人体に与える様々な影響を対象にした研究が行われてきた。特に、骨密度低下および筋萎縮に代表される筋骨格系に与える影響は明確であり、宇宙飛行士の健康維持という観点からだけでなく、筋骨格系の萎縮/維持メカニズムの解明という観点からも非常に興味深い研究対象となっている。

しかし、この筋骨格系が機能するためには、もう一つ筋肉の収縮を骨に伝える“腱”という重要な組織が必要となる。腱も筋肉や骨と同様に‘腱を構成する細胞’である‘腱細胞’を有している。最近の研究からこの腱細胞の分化・腱の形成には筋細胞からの FGF シグナルおよび筋収縮が必要(参考文献①②)であることが明らかにされたが、筋形成・維持における腱細胞の機能は全く知られていない。当然、微重力環境で起こる筋萎縮の際に腱細胞が受ける影響およびその影響が筋肉におよぼす影響も全く知られていない。しかし、腱がなければ筋収縮によるエネルギーは骨に伝達されることはなく、筋骨格系システム自体が成立しないことから、腱細胞が筋骨格系に必須であることは明らかである。これらの理由から、腱に関しても、筋骨格系の構成する組織として筋肉や骨と同様に研究が行なわれる必要がある。また、注目すべき重要な点として、腱細胞は筋収縮によるメカニカルストレスに対してカルシウムイオンを介した反応(参考文献③)をする点、その結果腱細胞における IGF-1 の発現増加が認められる点(参考文献④)が挙げられる。IGF-1 は筋肥大に関わる重要な因子であり、このことは腱細胞の筋肥大・維持への関わりを示唆するものである。よって、腱細胞の筋肉に対する機能を明らかにすることは、筋肉の形成・維持を知る上でも非常に重要なことである。

一方、長期間におよぶ微重力環境を対象とした研究を実施する方法として、宇宙滞在実

験以外に方法は無い。しかし、宇宙滞在実験に関しては絶対的なサンプル数の不足や微重力環境特有の厳しい実験手法的制限があり、解析が進んでいない。代表的な実験動物であるマウスを用いた微重力環境実験も試みられてはいるが、実験期間を通して生存を維持することが非常に困難であり、現在のところ宇宙滞在筋萎縮実験の対象として実用的ではない。ゼブラフィッシュは発生生物学を中心にモデル動物として非常に多くの研究の対象となっている。様々な細胞やシグナルを可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュを容易に入手することもでき、研究の目的に合うトランスジェニックゼブラフィッシュを作製することも比較的容易である。また、国際宇宙ステーション内には水棲生物飼育装置が設置されており、微重力環境実験が可能であり、ゲノムデータベースもあることから、トランスクリプトーム解析などの網羅的解析にも適している。

## 2. 研究の目的

水棲生物であるゼブラフィッシュの骨格筋が陸生生物と同様に微重力環境の影響を受けるかを明らかにする。また、一般的に筋萎縮を誘発すると考えられている筋収縮抑制(運動抑制)および加齢による骨格筋への影響も同様に調べ、微重力環境下での影響と比較することにより、筋萎縮/維持のメカニズムを総合的に明らかにする。さらに、筋萎縮/維持メカニズムにおける腱組織(腱細胞)の機能を明らかにすることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

微重力環境下にある国際宇宙ステーション内で飼育したゼブラフィッシュより骨格筋組織を採取し、次世代シーケンサーを用いた

トランスクリプトーム解析を行う。同様に麻酔処理による筋収縮抑制ゼブラフィッシュおよび加齢ゼブラフィッシュより骨格筋組織を採取し、トランスクリプトーム解析を行う。また、筋細胞および腱細胞をそれぞれ赤色、緑色蛍光タンパク質で可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュの骨格筋組織内より FACS により細胞を分離した後、それぞれの細胞のトランスクリプトーム解析を行う。

#### 4. 研究成果

宇宙滞在ゼブラフィッシュのサンプルとして、打ち上げから 2 日目、微重力環境下 34 日目、45 日間の微重力環境下飼育後に地上帰還 2 日目、地上帰還後 33 日目のゼブラフィッシュの個体を得ることができた。各サンプルの骨格筋より totalRNA が抽出し、トランスクリプトーム解析を実施した。これらの解析結果と筋収縮抑制ゼブラフィッシュおよび加齢ゼブラフィッシュの解析結果より、共通して発現が増加傾向にある遺伝子と共通して発現が減少傾向にある遺伝子が多数同定された。(図 1)

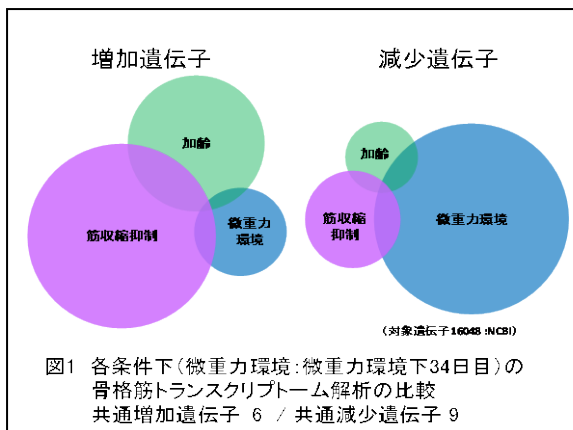


図1 各条件下(微重力環境:微重力環境下34日目)の骨格筋トランスクリプトーム解析の比較  
共通増加遺伝子 6 / 共通減少遺伝子 9

次に単一の遺伝子に注目するのではなく、パスウェイ(関連遺伝子群)解析をしたところ、各条件下によって増減に相違が認められるパスウェイが複数確認された。(図 2)

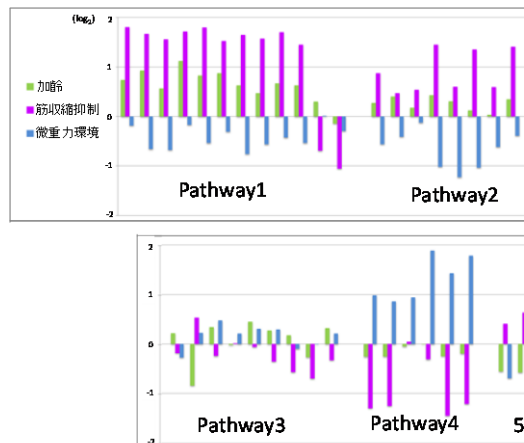


図2 各条件下(微重力環境:微重力環境下34日目)の骨格筋トランスクリプトームデータのPathway解析

さらにこれらの変動遺伝子が筋細胞と腱細胞のどちらかで特異的に発現している遺伝子であるかを明らかにするために、ゼブラフィッシュの骨格筋組織から筋細胞と腱細胞を分離しトランスクリプトーム解析を行った。この結果を基に各細胞の発現遺伝子プロファイルを作成した。(表 1)

発現量(RPKM)の比率 (腱細胞/筋細胞)	遺伝子数
$\geq 2$	397
$\geq 3$	86
$\geq 4$	27
$\geq 5$	9

表1 腱細胞・筋細胞の発現遺伝子プロファイル

以上の結果から、微重力環境下で飼育されたゼブラフィッシュの骨格筋において多数の遺伝子/パスウェイに変動が確認された。これは、水棲動物であるゼブラフィッシュの骨格筋も微重力環境の影響を受けていることを示す結果である。また、これらの変動には同様に筋萎縮を誘発することが知られている筋収縮抑制や加齢における変動と比較して、共通/非共通なものが認められた。(図 2)

これらの変動遺伝子と筋細胞と比較して腱細胞で多く発現している遺伝子(表 1)を照らし合わせることにより、微重力環境による筋萎縮および筋収縮抑制、

加齢による筋萎縮において腱細胞の機能も考慮した総合的解明を可能になると考えられる。

〈参考文献〉

1. Brent AE, et al. A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*. 113: 235-248. 2003
2. Blitz E, et al. Bone ridge patterning during musculoskeletal assembly is mediated through SCX regulation of Bmp4 at the tendon-skeleton junction. *Dev Cell*. 17: 861-873. 2009
3. Wall ME, et al. Early responses to mechanical load in tendon: role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 5: 70-84. 2005
4. Olesen JL, et al. Expression of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, and collagen mRNA in mechanically loaded plantaris tendon. *J Appl Physiol*. 101: 183-188. 2006

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Xiao Y, Faucherre A, Pola-Morell L, Heddleston JM, Liu TL, Chew TL, Sato F, Sehara-Fujisawa A, Koichi Kawakami, López-Schier H. High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair. *Dis Model Mech*. doi:10.1242/dmm.018184

Nishimura D, Sakai H, Sato T, Sato F, Nishimura S, Toyama-Sorimachi N, Bartsch JW, Sehara-Fujisawa A. Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration. *Mech Dev*. 135:58-67. 2015. doi: 10.1016/j.mod.2014.12.001.

〔学会発表〕(計 5 件)

Sehara-Fujisawa A. Novel Molecular and Cellular Mechanisms of Skeletal Muscle Regeneration. KEY Forum: From Stem Cells to Organs 熊本医学・生物科学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」(2014. 9. 5 熊本県)

Sato T, Sato F, Kamezaki A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Exploring Mechanisms of Neurogenesis in the Developing Brain with Live Zebrafish Embryos. シンポジウム7「細胞生物学における小型魚類の魅力」, 第66回日本細胞生物学会大会 (2014. 6. 12 奈良県)

Sato F, Kawahara A, Kangawa H, Arai H, Tsumagari K, Fukuhara S, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Roles of ADAM19 in

cranial nerve and blood vessel development. International Vascular Biology Meeting. (2014. 4. 14 京都府)

Sato F, Kangawa H, Arai H, Tsumagari K, Kawahara A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Roles of ADAM Proteases in Development of Zebrafish. The 8th General Meeting of the International Proteolysis Society (2013. 10. 23 Cape Town, South Africa)

佐藤文規, 瀬原淳子「ゼブラフィッシュの筋維持における増殖因子の役割とその制御」日本宇宙生物科学会 (2012. 9. 27 徳島県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc03/index-j.html>

JAXA ウェブサイト

<http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/zebrafishmuscle/>

NASA ウェブサイト

[http://www.nasa.gov/mission\\_pages/station/research/news/zebrafish\\_muscle/#.VTiKx5N2N-5](http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/zebrafish_muscle/#.VTiKx5N2N-5)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 文規 (SATO, Fuminori)  
京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教  
研究者番号: 10588263

### (2) 研究分担者

瀬原 淳子 (SEHARA, Atsuko)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号: 60209038

### (3) 連携研究者

川上 浩一 (KAWAKAMI, Koichi)  
国立遺伝学研究所・教授  
研究者番号: 70195048

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号: 40323646

### (4) 研究協力者

内田 智子 (UCHIDA, Satoko)  
谷垣 文章 (TANIGAKI, Fumiaki)