

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860177

研究課題名(和文) 心臓自律神経系の発達と環境応答のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of autonomic nervous system development and responses to environmental stresses

研究代表者

浅香 智美 (Asaka, Tomomi)

東京大学・新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：90555707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、心臓自律神経系の活動に着目し、メダカを用いて自律神経機能の発達評価、環境擾乱系の確立、およびその解析である。発達評価では、メダカはふ化直後から1ヶ月後に心臓自律神経系機能が発達し、発生初期では低温刺激で誘発する不整脈がメダカ系統によって抵抗性が異なり、かつ1遺伝子に起因することが明らかとなった。環境擾乱系では、恒常明期では副交感神経活動が低下する一方で、放射線刺激では心拍に異常は認められなかった。さらに、メダカを利用した血液の解析や組織の3D解析の可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：This study was focused on the evaluation of activity of the cardiac autonomic nervous system using medaka as a model organism and analyzed the acquirement process of the cardiac autonomic nerve function, establishment of the condition of environmental disturbance and its analysis. Development of cardiac autonomic nervous function starts from the hatching stage and the activity grows in one month old larvae. Low temperature stimulation caused arrhythmia in some medaka strains of heart beat initiation period indicating this cold sensitivity is attribute to single gene. Parasympathetic nervous activity decreased after the continuous photoperiod, however, radiation stimulation did not cause the abnormal heartbeat using the environmental disturbance system. Furthermore, establishment and preliminary analysis of the blood and the 3D analysis of tissues suggests usefulness of medaka as model organism.

研究分野：環境生理学

キーワード：メダカ 発達 自律神経系 心臓

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体は、自律神経系等によるホメオスタシスにより外界に適応している。心臓自律神経系は、脈拍数や血圧などを制御しており、心拍の持つ定期的な変動を利用した心拍変動解析による自律神経活動の評価法が、1980年代より確立されている (Akselrod *et al.*, (1981) 他)。近年、生活習慣の変化から小児の体調不良や自律神経失調症の増加が問題となっている一方、発症の機構や対処法については混沌としている。その一因として、ヒトにおける自律神経を含む神経系の形成が、家庭環境 (母体、授乳) 等の影響を受ける6歳児頃までにほぼ完了するために、研究が容易ではないことが挙げられる。自律神経機能の低下は、免疫低下など体全体へ影響を与える要因となり得ることから、正常な自律神経活動形成は非常に重要である。

(2) 小型魚類は、ヒトと同じボディプランを共有し、突然変異体等の遺伝学的手法が利用可能である。加えて、母体の影響を受けずに環境変化や薬剤等の評価ができることから、分子から組織レベルで自律神経の発育過程を解明するのに非常に有用である。小型魚類における心臓自律神経機能の解析は、近年画像解析技術が飛躍的に向上し、稚魚を用いた侵襲性の低い映像による解析が行われてきている (Mann *et al.*, (2010) 他)。メダカは、飼育適応可能な環境域が広く、放射線、化学物質、温度変化、塩濃度刺激、宇宙環境など各種環境変化における生物影響のモデル生物としても広く利用されている。

2. 研究の目的

本研究では、心臓自律神経系の活動に着目し、親と独立した環境で発生・生育可能なメダカを用いて、(1) 発育に伴う心臓自律神経系の機能獲得過程を記述し、(2) 環境擾乱系の確立およびその自律神経活動変化を解析する。加えて、(3) 環境攪乱時の発現分子変化を明らかにすることを旨とした。

(1) では、胚から成魚までの生育による変化を、無刺激時及び自律神経作用薬の投与により評価し、心臓自律神経機能の獲得段階を解明する。また、生理機能制御の理解のために、自律神経受容体の発現を確認する。(2) では、光、温度、放射線などに着目し、自律神経活動の変化 (低下) を評価する。また、(3) 環境変化により生じるホルモン等の変化について、コルチゾールの定量及び遺伝子発現解析を行う。

ヒトの自律神経活動には、生活リズムなどが影響すると予想されており、外的環境は、メダカにおいても同様に影響を与えると推測される。本研究では、稚魚から成魚まで成長に沿った変化を解析することにより、メダカ自律神経機能の獲得過程について明らかにできる。すなわち、外的擾乱を人為的に加えることによって、環境が自律神経機能などの発育に及ぼす影響について、分子レベルか

ら組織の機能レベルでの解明が期待できる。本研究で得られた結果をヒトに外挿することで、これまでは乳類では成しえなかった発育段階での自律神経獲得機構について、獲得の時期や重要性を明らかにできる。そして、効果的な自律神経機能の獲得と自律神経機能低下時の環境面及び薬剤からの対処法の開発、機能低下を指標にした変異体スクリーニングによる関連遺伝子群の探索などへ直接応用できる。将来的には、近年増加傾向にある小児の自律神経失調症の環境からの予防策或いは、薬剤等による対応策を得ることが可能となる。本研究成果が、最終的に個体レベルでのストレスや環境応答という大きな現象や健康についての社会問題の一端をそのメカニズムから迫ることができる点で、本研究は非常に意義がある。

3. 研究の方法

(1) 自律神経系の機能獲得評価:

高速度映像を用いた心拍解析

安静状態の透明メダカ SK2 の腹側から心拍を 300 fps で撮影した。心拍を心臓内の血液流入に伴う輝度変化と捉え、輝度の経時変化から自律神経活動と連動しうるエラの動き及び心臓の動きを高速度映像から抽出した (Watanbe-Asaka *et al.*, 2012)。抽出したデータを元に、心拍数および高速フーリエ変換による心拍変動解析を行った。メダカ胚 (心臓形成時、ふ化直前)、稚魚 (生後 1 日、1 週間、4 週間)、成魚 (3 ヶ月) の各時期で、成長に伴う安静時の自律神経活動を解析し、機能獲得を評価した。また、2 種の自律神経作用薬 (アトロピン、プロプラノロール) および麻酔薬 (MS-222) を投与し、薬への感受性から自律神経の刺激に対する受動的な機能発達を評価した。

in situ hybridization 及び RT-PCR による交感・副交感神経受容体の発現解析

心臓において発現するサブタイプのムスカリン型アセチルコリン受容体及び β アドレナリン受容体をメダカ心臓由来の cDNA から単離し、*in situ* hybridization および RT-PCR による発現解析を行った。また、 α -tubulin 抗体により神経軸索の染色を行った。

(2) 環境擾乱系の確立およびその自律神経活動変化の解析:

成魚を用いた環境擾乱系の構築と自律神経機能に対する影響評価

メダカ SK2 成魚を用いて、恒常的明期での飼育、放射線照射系 (線による全身照射、炭素イオン線によるメダカ個体の一部分照射) を確立し、攪乱後における心臓自律神経活動を評価した。メダカ個体への部分照射は、日本原子力開発機構高崎量子応用研究センター (群馬県高崎市) の加速器イオン照射施設 (TIARA) の共同利用にて実施した。

メダカ胚を用いた環境攪乱系の構築とその評価

各野生集団および Hd-rR メダカ胚を用いて、15℃ 飼育時の心拍変化を高速度映像から解析した。15℃ に曝露させる時期、期間、使用する系統を変化させて、低温が心拍に与える影響を評価した。

(3)環境擾乱に应答する分子の探索と全身切片を用いた 3D 解析：

血清サンプルの調製とストレスホルモンの測定

メダカ成魚からの採血手法を確立した。また、血液から調製される血清の量及び濃度を決定し、得られた血液を利用して、ストレスホルモン(コルチゾール)量の測定を行った。

血清サンプルの GC-MS での予備検討

メダカ成魚から採血し、既存の脂肪酸測定用カラムを利用してコルチゾール等の測定を行った。

全身切片の作製と 3D 解析

環境攪乱系として利用した放射線照射後に生じた全身変化を検証するために、北里大学医学部病理学教室の協力を得て全身連続切片を作製した。得られた画像データは、山口大学医学部分子病理学分野の協力を得て、データベースに登録した。また、放射線照射によって大きく変化の認められた腎臓の切片画像を元に 3D 組織構築を行った。

4. 研究成果

(1)自律神経系の機能獲得評価：

高速度映像を用いた心拍解析

メダカ成魚の安静時心拍を腹側高速度映像より計測したところ、心拍数における変化に加えて、心拍変動においてもアトロピンにより副交感神経活動、プロプラノロールにより交感神経及び副交感神経活動と予想される周波数帯のシグナルの減弱が観察された。一方、平均心拍数が同じ程度である st.35 メダカ胚において、この自律神経活動によると考えられる心拍変動は観察されなかった。生後 1 日、1 週間の稚魚、1 ヶ月の幼魚において、この心拍変動の大きさは大きくなる傾向があった。1 ヶ月の幼魚においても成魚ほどの変動のシグナル強度はなかったことから、1

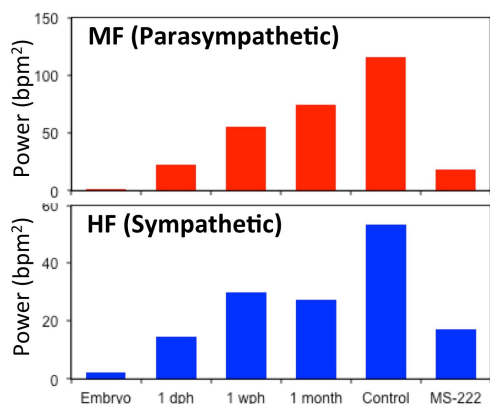


図1 メダカの発達段階における心臓自律神経活動。副交感神経に相当する周波数帯(上図)、交感神経に相当する周波数帯(下図)。

ヶ月程度まで、発達に伴い心臓自律神経活動が増強されていることが認められた(図1)。しかしながらこの実験は、観察容器にて3分間安静状態を維持することが困難であり、有意差を得られるほどの十分な個体数を獲得できなかったことから、今後も引き続き個体数を増やすなどして今回得られた結果を確実にする必要がある。

in situ hybridization 及び RT-PCR による交感・副交感神経受容体の発現解析

メダカ成魚心臓から total RNA を抽出し、心臓において発現しているアドレナリン受容体(アドレナリン受容体 b1)およびアセチルコリン受容体(ムスカリン型アセチルコリン受容体 a2)の配列を単離した。その配列をもとに *in situ* hybridization 用プローブを作製し、心臓形成初期時のメダカ胚、及び稚魚(ふ化後 1 日)における遺伝子発現を評価したが、メダカ胚及び稚魚において、今回作製したプローブでの検出はできなかった。半定量的 PCR にて遺伝子発現を評価したところ、心臓の拍動に揺らぎの認められない st.35 の胚においてどちらの受容体も発現していることが確認できた。また、神経の発達を評価するために、 α チューブリン抗体染色を実施し、孵化直前の胚において心臓自律神経の神経軸索が形成されていることを確認した。したがって、心臓自律神経はふ化前には形成されていること、それが機能として増強されるためには、ふ化や成長が必要であることが明らかとなった。

(2)環境変化による自律神経機能評価：

成魚を用いた環境擾乱系の構築と自律神経機能に対する影響評価

メダカ SK2 成魚を用いて、1 週間の恒明条件において、心拍変動解析を行ったところ、心拍数および交感神経活動には変化がない一方で、副交感神経活動と思われる周波数帯が有意に減弱していた。加えて、環境攪乱予備検討では放射線刺激後に心拍数が有意に減少し、その後回復するという应答が観察されたため、再度検証を行ったが、これは照射時の魚体の健康状態によって生じた結果であり、放射線照射による心拍への影響は本解析手法では検出できないことが示唆された。

メダカ胚を用いた環境攪乱系の構築とその評価

心臓形成期および心拍開始期のメダカ胚を一過的に 15℃ 以下の低温に曝すことで、ほぼ 100%の割合で不整脈を呈し、後の発生期(st.35)において血流の異常を認めることを見いだした。また、高速度映像を用いた解析により、1 回の収縮あたりの大きさは変わらなかったことから、この低温における不整脈心機能異常は、収縮の強度ではなく心臓ペースメーカーのリズム異常によるものであることが強く示唆された(図2)。さらに、複数の野生メダカ集団を利用して、低温ストレスに対する抵抗性を検証したところ、北日本に

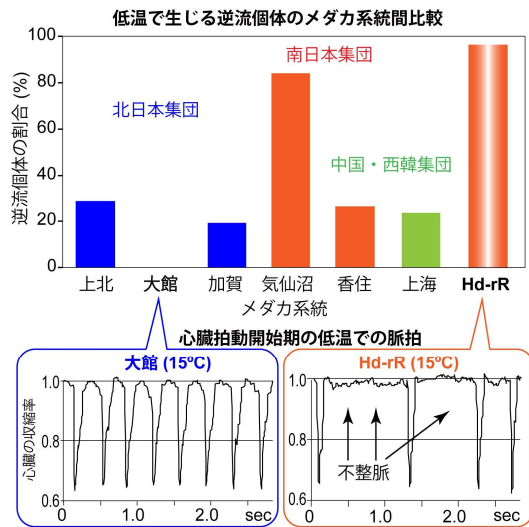


図2 低温環境下における逆流の誘発割合のメダカ系統間での比較(上図)。低温抵抗性系統と南日本系統 Hd-rR との低温での脈拍比較(下図)。

生息する野生メダカ系統の1つ大館は、この低温で誘発される不整脈に抵抗性を有していることを明らかにした。この大館の解析から、この低温性不整脈に対する抵抗性の獲得が一つの遺伝子によることがわかりつつあり、当該遺伝子の多型が温度など環境適応に重要であることを示唆している。

(3)環境擾乱に反応する分子の探索と全身切片を用いた3D解析:

血清サンプルの調製とストレスホルモンの測定

メダカ SK2 成魚の尾側中心動脈から、2 μl の採血手法を確立した。得られた血液から、血清を放射線照射前後での血液を採取した。メダカ血液を元にストレスホルモンの1つコルチゾールを測定することができたが、採取している血液の量が微量であることにより、個体ごとのばらつきが多く、内部標準の必要性が生じた。一方、同じ血液サンプルから、赤血球を主とする血球をサンプリングすることができたため、今後、放射線照射後における血球数や形態変化を解析する予定である。特に、2012年に実施されたメダカの宇宙実験において、宇宙環境2ヶ月滞在メダカのサンプルシェア実験から、造血組織である腎臓において、酸化ストレス応答、赤血球形成、増殖に関連する遺伝子群が発現上昇する知見を得ている。抹消血球においてもストレス応答時には同様の転写翻訳がされている可能性も考えられる。

GC-MSでの予備検討

GC-MSに使用するサンプルの条件および使用するカラムの条件を検討する目的で、予備化後1週間の稚魚1匹から脂溶性画分を抽出し、GC-MS用サンプルとした。GC-MSでの質量解析を行ったが、サンプルから得られた主要ピークのほとんどが細胞膜由来であることがわかり、コルチゾールのピークを検出することができなかった。同条件のサン

プルをコルチゾール検出キットにて検証することができており、これは、サンプル量の少なさと適切なカラムではなかった可能性の双方が考えられることから、今後も引き続き条件を変えて検証する必要がある。

全身切片の作製と3D解析

全身および局所的放射線照射後に心拍に変化が認められなかったことから、どの程度全身影響が出現するかを全身の連続パラフィン切片により解析を行った。特に、局所的な刺激によって生じる全身性の応答を検出するために、背・腹側各2mmの深度まで15 Gyの重粒子線を照射し、全身をパラフィン切片として精査した。その結果、被照射部位における組織学的な変化は、皮膚、精巣、腎臓で顕著であった。メダカにおいて腎臓は造血組織であることに加えて、使用した重粒子線のビーム到達距離の近傍であることから、3D構築を行ったところ、被照射部位のみ造血細胞の欠落と組織の萎縮が観察された(図3)。

上記の被照射部位の影響に加えて、照射されていない部位の組織においても末梢血管に浮腫や毛細血管瘤、出血などが誘導されることを確認した。このような照射部位以外での応答は、血液を介した応答の可能性が考えられる。

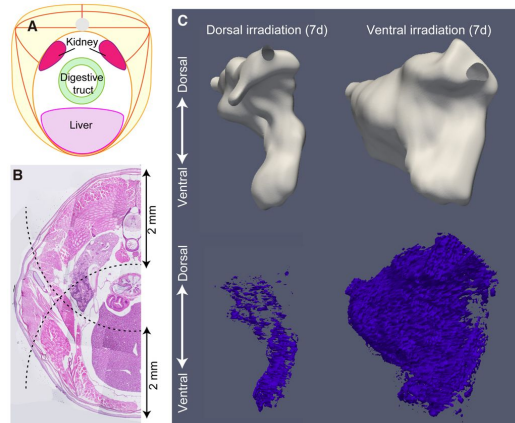


図3 メダカ背側および腹側への局所的放射線照射による腎臓の立体変化。A.メダカの腎臓は背側約2mmに位置する。B.組織切片の例。点線まで放射線が照射される。C.腎臓の立体構築背側照射個体では組織の萎縮と血球(青)の顕著な現象が認められる。

<引用文献>

- Akselrod, S., Gordon, D., Ubel, F. A., Shannon, D. C., Berger, A. C. and Cohen, R. J. (1981). Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213, 220-2
- Mann, K. D., Hoyt, C., Feldman, S., Blunt, L., Raymond, A. and Page-McCaw, P. S. (2010). Cardiac response to startle stimuli in larval zebrafish: sympathetic and parasympathetic components. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, R1288-97.
- Watanabe-Asaka, T., Niihori, M., Terada, M.,

Oda, S., Iwasaki, K., Sudoh, M., Yamada, S., Ohshima, H. and Mukai, C. (2012). Technologies to Analyze the Movement of Internal Organs by High-Speed Movies Using Medaka. *Transac Jpn Soc Aeronautica Space Sci Aerospace Technol Jpn* 10, Pp_1-4

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)

[雑誌論文](計 3件)

Yasuda T., Kimori Y., Nagata K., Igarashi K., Kakimoto F., Watanabe-Asaka T., Oda S., Mitani H. (2016) "Irradiation-injured brain tissues normally self-renewed in the absence of p53, the pivotal tumor suppressor, in medaka (*Oryzias latipes*) embryo." *J Radiat Res*, 査読有, 57 (1), 2016: 9-15. doi: 10.1093/jrr/rrv054

Y. Murata, T. Yasuda, T. Watanabe-Asaka, S. Oda, A. Mantoku, K. Takeyama, M. Chatani, A. Kudo, S. Uchida, H. Suzuki, F. Tanigaki, M. Shirakawa, K. Fujisawa, Y. Hamamoto, S. Terai, H. Mitani. "Histological and Transcriptomic Analysis of Adult Japanese Medaka Sampled Onboard the International Space Station." *PLoS One* 査読有 10(10), 2015, e0138799

Tomomi Watanabe-Asaka, Yoshio Sekiya, Hironori Wada, Takako Yasuda, Ikuya Okubo, Shoji Oda, and Hiroshi Mitani. "Regular heartbeat rhythm at the heartbeat initiation stage is essential for normal cardiogenesis at low temperature" *BMC Developmental Biology*. 査読有 14: 12, 2015. doi: 10.1186/1471-213X-14-12

[学会発表](計 8件)

浅香智美, 関谷義男, 和田浩則, 保田隆子, 大久保郁哉, 尾田正二, 三谷啓志 "メダカ胚では心拍開始期の低温誘発不整脈が心臓機能獲得を妨げる"; 日本動物学会第86回新潟大会 2015年9月17-19日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

Tomomi Watanabe-Asaka, Kazusa Ito, Chika Hashimoto, Takako Yasuda, Kento Nagata, Toshiyuki Nishimaki, Takafumi Katsumura, Hiroki Oota, Hiroko Ikeda, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Shoji Oda, and Hiroshi Mitani "Availability of Medaka as Systemic Effect Model of Local Irradiation by Histological Analysis"; 15th International Congress of Radiation Research, 24th to 29th May 2015, 京都国際会館(京都府京都市)

Tomomi Watanabe-Asaka, "3D Analysis of the irradiation effect by local irradiation with carbon ion particles in medaka (*Oryzias*

latipes)"; Space Radiation and Heavy Ions in Therapy Symposium 2015, 22nd to 24th May 2015, あべのハルカス(大阪府大阪市)

Tomomi Watanabe-Asaka, Yoshio Sekiya, Hironori Wada, Takako Yasuda, Ikuya Okubo, Shoji Oda, and Hiroshi Mitani. "Regular heartbeat rhythm at the heartbeat initiation stage is essential for normal cardiogenesis at low temperature"; The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 20th to 21st September 2014, 慶應義塾大学芝共立キャンパス(東京都港区)

Chika Hashimoto, Tomomi Watanabe-Asaka, Takako Yasuda, Hisako Oonishi, Toshiyuki Nishimaki, Takafumi Katsumura, Hiroki Oota, Hiroko Ikeda, Yuichiro Yokota, Michiyo Suzuki, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Shoji Oda, and Hiroshi Mitani. "Investigation of somatic acute responses induced by local irradiation in adult medaka"; The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 20th to 21st September 2014, 慶應義塾大学芝共立キャンパス(東京都港区)

Tomomi Watanabe-Asaka. "Low temperature acclimation in medaka wild populations during heart development"; 2nd Strategical Meeting for Medaka Research, 10th to 12th April 2014, セビリア(スペイン)

浅香智美, 尾田正二, 岩崎賢一, 馬場昭次, 三谷啓志, 「メダカの心臓自律神経の研究」日本動物学会 第84回岡山大会, 2013年9月26日 - 28日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

Tomomi Watanabe-Asaka, Yoshio Sekiya, Hironori Wada, Ikuya Okubo, Shoji Oda, Hiroshi Mitani. "Regular heartbeat rhythm at heartbeat initiation stage is essential for normal cardiogenesis". European Zebrafish Meeting, 9th to 13th July, 2013, バルセロナ(スペイン)

[その他]

ホームページ等

http://www.k.u-tokyo.ac.jp/info/entry/7_entry18/

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅香 智美 (ASAKA, Tomomi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：90555707