

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2014～2018

課題番号：26520101

研究課題名(和文) 老年学モデルとしてのゼブラフィッシュ活用の試み

研究課題名(英文) Use of zebrafish as a model animal for gerontology

研究代表者

小林 麻己人 (Kobayashi, Makoto)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50254941

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)：本研究では高齢者の生活様式・遺伝的背景の多様性理解のためのモデルとしてのゼブラフィッシュの有効性を調査した。その結果、1) 成魚老年度測定システムの構築に成功し、老魚では運動量と聴力が減弱することを見出した、2) 同居実験を行い、老雄の健康度が若雌と同居させると維持される傾向を見出した、3) ストレス防御機構Nrf2経路と健康寿命の関係を探るためにNrf2破壊魚を解析したが、壮年期では明かな表現型はなかった、4) 食による健康寿命を目指したゼブラフィッシュ活用を試み、その有用性を実証した。以上、老年学モデルとしてのゼブラフィッシュの有効性を示せた。ただし、より大規模の研究を行う必要性も浮かび上がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集団飼育と行動学的表現型解析のし易さ、さらには飲食品関連物質の機能性解析のし易さを示せたことから、学術的意義は、ゼブラフィッシュの老年学研究モデルとしての有効性、特に健康や老化における遺伝子機能の解析に優れた解析系となることを示唆した点である。一方、ヒト健康への応用に向けた説得力のある有意なデータを示すことができず、社会的意義という観点からは、解析数を増やすなどより大規模な研究を行う必要があることとヒト解析と連動させた研究を行う必要があることが分かり、今後の研究に向けての課題となった。

研究成果の概要(英文)：We investigated a usefulness of zebrafish for understanding effects of lifestyle and genetic background on aging. As a result, 1) we succeeded in setting up the evaluation system of zebrafish aging degree, and showed that swimming and hearing abilities were lower in aged fish than young fish; 2) we found that there is a tendency that old male fish was healthy when we bred it together with young females; 3) to elucidate the relationship between aging and the Nrf2 pathway, a cellular master antioxidant system, we compared aging degrees of wild-type and Nrf2-mutant zebrafish, and showed that there was no clear difference between these two at the middle age stage; 4) we demonstrated that zebrafish is a good system to evaluate the effects of food phytochemicals. From these results, we conclude that zebrafish will be a useful model for gerontology, while more larger-scale and longer-term studies will be required to obtain meaningful data.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 老年度 運動量 聴力 学習力 Nrf2経路 食品ファイトケミカル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 老化研究には、線虫からサルまでさまざまなモデル動物が活用されている。一方、高齢者の多様化に関しては、解析対象は専らヒトであり、モデル動物は未開発である。老年学研究に適した動物モデルが開発できれば、“老い方”の違いの要因や“老い方”の違いがもたらす障害を生物学観点から調べることができ、医学的見地に立った諸問題解決の方策が図れると期待される。老年学研究の動物モデルの条件は、1) 数多くのパターンでの集団飼育ができること、2) 遺伝的個体差を最小限にできること、3) 寿命が長期でないこと、4) ヒト高齢者の応用可能なこと、が挙げられる。ゼブラフィッシュが老年学モデルになるかは未知であるが、狭い居住空間での集団飼育が可能で、1ペアの親魚から数百匹の同腹魚が産生されること、寿命が2~3年と比較的短いこと、ヒトと類似した遺伝子セットと組織・細胞を持つこと、などから最有力候補と期待される。

(2) 申請者は、18年前の米国出向を機にゼブラフィッシュを知り、以後今日まで、その有用性から主解析システムとして活用し続けている。十数年前には、老化にも関連するストレス防御機構 Nrf2 経路の研究を開始し、そのストレス感知機構と生体における重要性を、ゼブラフィッシュの利点を活かして明らかにしてきた。この過程で、Nrf2 変異ゼブラフィッシュが、酸化ストレスや小胞体ストレスに弱いことを見出し、また、細胞老化が亢進する突然変異系統も樹立した。酸化ストレスと老化の関連性はよく知られていたため、保持するゼブラフィッシュ系統の長期飼育を開始したが、その結果、同腹由来の同じ月齢の個体でも、高齢化の表現型がさまざまであり、生活環境や健康度低下の影響で、見た目が大きく異なる多様な老魚が作出されることがわかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、老年学モデル動物としてのゼブラフィッシュ活用の有効性を検証することを目的とし、そのためのゼブラフィッシュの老年度評価系の確立とこれを用いた成魚の解析を行った。

(2) さらに、機能性食品により活性化される Nrf2 経路を活用した健康寿命延伸を見据え、動物個体における Nrf2 活性化ファイトケミカルのストレス緩和能も解析した。

3. 研究の方法

(1) まず、ゼブラフィッシュ老年度の評価システムの確立を行った。具体的には、運動量・聴力・学習力の測定システムを機器開発とともに行い、これを用いて老魚と若魚の老年度の違いを測定した。

(2) 次に同じ水槽内に飼育する成魚の個体識別の方法を蛍光色素注入などにより試みた。これを用いて、性別や月齢の異なる成魚を同じ水槽内で同居させ、老雄魚の老年度に対する同居の影響を観察した。

(3) ストレス Nrf2 変異系統を用いて、老年度と Nrf2 経路の関係を調べた。また、種々食品ファイトケミカルの処理実験を通して、Nrf2 経路のストレス緩和能を調べた。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ老年度の評価システムの確立

運動量に関しては、各ゼブラフィッシュ個体の動きをビデオで撮影し、その泳ぎの早さや量をコンピューターで解析する方法と条件を設定した。聴力に関しては、水中スピーカーを設置した水槽にゼブラフィッシュ個体を入れ、さまざまな高さの周波数の音を聞かせ、変動させた周波数に反応できた否かをビデオ撮影して解析した魚の動きから判断できるような方法と条件を設定した。学習力に関しては、行き来できる2水槽を連結した水槽にゼブラフィッシュ個体を入れ、片方の水槽で電球点灯に引き続いて電気ショックを与えるしくみにし、もう片方の水槽に逃げ込むように学習させる方法と条件を設定した。

(2) 月齢の違う成魚を用いた測定

(1)で確立した評価システムを用いてさまざまな月齢の成魚を解析した。6ヶ月齢の若成魚と比して16ヶ月齢の老魚が、運動量及び高周波数音に対する応答が少ないことがわかり、これらに関しては老年度評価に有用であることを示すものとなった。一方、学習力に関しては明快な違いは見いだせず、より月齢の進行した老魚の活用等、さらなる条件検討を必要とする可能性がでてきた。

(3) 成魚の個体識別法の確立

イラストマー蛍光タグ(田中三太郎商店)を皮下に微注入することにより、同一水槽内で集団飼育するゼブラフィッシュ個体の個体識別ができるようになった(図1)。この標識は数ヶ月にわたり維持されるため、10個体程度であれば、複数の蛍光色の活用により、同一水槽内の個体全てを識別することが可能となった。

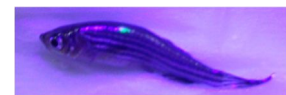


図1 蛍光タグ個体識別

(4) 性別や月齢の異なる個体との集団飼育効果

2L 水槽に 7 匹の老雄魚を飼育し、これに対し 3 匹の性別や月齢の異なる成魚を集団飼育した時の効果を調べた。老雄魚・老雌魚・若雄魚の場合と比して、若雌魚を同居させた場合に元の老雄魚の弱り方が少ない傾向を示した。ただし、個体差が多く、有意なデータを得るためには、より解析数を増やす必要があることがわかった。ゼブラフィッシュの有用性は示せたものの、解析数の問題は大きな課題として残った。

(5) 老年度と Nrf2 経路の関係

老年度の進行に対する Nrf2 の影響を遺伝学的に検証するために、Nrf2 変異ゼブラフィッシュ系統 *nrf2a^{th318}* の雄成魚と野生型雄成魚の月齢毎の老年度を (1) で確立した評価システムを用いて測定比較した。その結果、11 ヶ月齢までの段階では明かな違いを見出すことはできなかった。現在、解析は継続しており、より遅い月齢で違いが出てくるものと期待している。

(6) Nrf2 経路活性化ファイトケミカルによるストレス予防能

Nrf2 経路は様々な食品ファイトケミカルで活性化させることが知られている。特に、ブロックリースプラウトに多量に含まれるスルフォラファンというイソチアシネート類は、安全に Nrf2 を強力に活性化するものとして国内外の多くの企業からサプリメントとして販売されるまでになっている。ただ、動物個体で Nrf2 依存的にどのようなストレスをどのくらい緩和するのかというのは明快ではない局面が多い。

そこでまず野生型と Nrf2 変異ゼブラフィッシュを活用して、動物個体における種々ストレスに対するスルフォラファンのストレス予防効果を調べた。ここでは迅速簡便な稚魚期を活用した。その結果、酸化ストレスに加えて、同じく各種生活習慣病の原因と考えられている小胞体ストレスも、スルフォラファンの前処理で緩和できることがわかった (図 2、下記文献)。一方、亜ヒ酸毒性に関してもスルフォラファンは予防効果を発揮するが、同時に Nrf2 非依存的共毒性を発揮することも見出した (文献)。Nrf2 活性化剤でもある抗リウマチ薬オーラノフィンの前処理では亜ヒ酸毒性に対する共毒性は示さなかったが、スルフォラファンほどの予防効果は示さなかった (文献)。

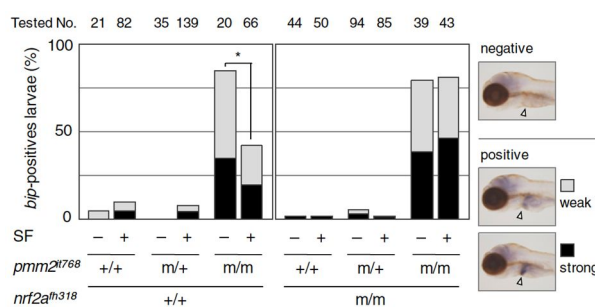


図 2 スルフォラファンの Nrf2 依存的な小胞体ストレス緩和効果 (文献より)

スルフォラファンだけでなく、ウコンのクルクミンやニンニクのジスルフィドなど Nrf2 経路を活性化させる食品ファイトケミカルは多い。ただし、ファイトケミカル間のストレス種毎に対する薬効と共毒性を動物個体レベルで比較解析した例は皆無で有り、本研究ではゼブラフィッシュを活用した食品ファイトケミカルの評価システムの構築に取り組んだ。その結果、24 穴プレートを活用した系を構築し、これを用いて各種香辛料や大豆由来の食品ファイトケミカル 20 種の薬効と共毒性の比較解析をパイロット試験的にを行い、本評価系の有効性を実証した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

Ko, S., Russell, J.O., Tian, J., Gao, C., Kobayashi, M., Feng, R., Yuan, X., Shao, C., Ding, H., Poddar, M., Singh, S., Locker, J., Weng, H.L., Monga, S.P. and Shin, D. (2019) Hdac1 regulates differentiation of bipotent liver progenitor cells during liver regeneration via Sox9b and Cdk8. *Gastroenterology* 156:187-202.

Mukaigasa, K., Tsujita, T., Nguyen, T.V., Li, L., Yagi, H., Fuse, Y., Nakajima-Takagi, Y., Kato, K., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. (2018) Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115:2758-2763.

Fuse, Y., Endo, Y., Araoi, S., Daitoku, H., Suzuki, H., Kato, M. and Kobayashi, M. (2018) The possible repositioning of an oral anti-arthritis drug, auranofin, for Nrf2-activating therapy: The demonstration of Nrf2-dependent anti-oxidative action using a zebrafish model. *Free Radic. Biol. Med.* 115:405-411.

Fuse, Y. and Kobayashi, M. (2017) Conservation of the Keap1-Nrf2 system: An evolutionary journey through stressful space and time. *Molecules* 22:436.

Tran, M.T.N., Hamada, M., Jeon, H.J., Shiraishi, R., Asano, K., Hattori, M., Nakamura, M., Imamura, Y., Tsunakawa, Y., Fujii, R., Kulathunga, K., Andrea, C.S., Koshida, R., Kamei, R., Matsunaga, Y., Kobayashi, M., Oishi, H., Kudo, T. and Takahashi, S. (2017) MafB is a critical regulator of complement component C1q. *Nature Commun.* 8:1700.

Nguyen, T.V., Fuse, Y., Tamaoki, J., Akiyama, S., Muratani, M., Tamaru, Y. and

- Kobayashi, M. (2016) Conservation of the Nrf2-mediated gene regulation of proteasome subunits and glucose metabolism in zebrafish. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016:5720574.
- Fuse, Y., Nguyen, V.T. and Kobayashi, M. (2016) Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 305:136-142.
- Osborne, O.J., Mukaigasa, K., Nakajima, H., Stolpe, B., Romer, I., Philips, U., Lynch, I., Mourabit, S., Hirose, S., Lead, J.R., Kobayashi, M., Kudoh, T. and Tyler, C.R. (2016) Sensory systems and ionocytes are targets for silver nanoparticle effects in fish. *Nanotoxicology* 10:1276-1286.
- Vong, L.B., Kobayashi, M. and Nagasaki, Y. (2016) Evaluation of the toxicity and antioxidant activity of redox nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Mol. Pharm.* 13:3091-3097.
- Takeuchi, M., Fuse, Y., Watanabe, M., Andrea, C.S., Takeuchi, M., Nakajima, H., Ohashi, K., Kaneko, H., Kobayashi-Osaki, M., Yamamoto, M. and Kobayashi, M. (2015) LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblasts through downregulation of Etv2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:13922-13927.
- Fuse, Y., Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y., Nakajima, O. and Kobayashi, M. (2015) Heme-mediated inhibition of Bach1 regulates the liver specificity and transience of the Nrf2-dependent induction of zebrafish heme oxygenase 1. *Genes Cells* 20: 590-600.
- Kim, J.D., Park, K.E., Ishida, J., Kako, K., Hamada, J., Kani, S., Takeuchi, M., Namiki, K., Fukui, H., Fukuhara, S., Hibi, M., Kobayashi, M., Kanaho, Y., Kasuya, Y., Mochizuki, N. and Fukamizu, A. (2015) PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. *Sci. Adv.* 1: E1500615.
- Ichijo, H., Hamada, M., Takahashi, S., Kobayashi, M., Nagai, T., Toyama, T. and Kawaguchi, M. (2015) Lateralization, maturation, and anteroposterior topography in the lateral habenula revealed by ZIF268/EGR1 immunoreactivity and labeling history of neuronal activity. *Neurosci. Res.* 95:27-37.

その他 4 件

[学会発表](計 69 件)

- 小林麻己人: 酸化ストレス毒性を軽減させる香辛料成分の動物モデルを駆使した探索 . 第 27 回スパイス&ハーブ研究成果セミナー, 東京, 2019年2月13日 .
- 遠藤優佳、村木恭二、玉置隼也、小林麻己人: ゼブラフィッシュを用いた食品ファイトケミカルの機能性評価 . つくば医工連携フォーラム 2019, つくば, 2019年1月25日 .
- Nguyen, V.T., Mukaigasa, K. and Kobayashi, M. : Sulforaphane-induced Nrf2 activation suppresses genetic endoplasmic reticulum stress in zebrafish. 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018年11月28日-30日 .
- Nguyen, V.T., Mukaigasa, K. and Kobayashi, M.: The protective role of Nrf2 in response to phosphomannomutase 2 mutation-induced endoplasmic reticulum stress in zebrafish. The 13th International Zebrafish Conference, Madison, June 20-24, 2018
- Fuse, Y., Nguyen, V.T., Endo, Y. and Kobayashi, M.: Nrf2-dependent anti-oxidative action of an anti-arthritis drug, auranofin: the possible repositioning for oxidative stress-related diseases. The Society of Toxicology 58th Annual meeting and ToxExpo, San Antonio, March 11-15, 2018
- Kobayashi, M.: Study of the Keap1-Nrf2 pathway using a zebrafish model. International Meeting on Non-Mammalian Models in Biomedical Research: Current Status and Future, Mangalore, India, October 5-6, 2017
- 小林麻己人 : Nrf2 システムの基礎 . 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会「酸化ストレススクール」, つくば, 2017年6月28日 .
- 小林麻己人, Nguyen Vu Thanh, 布施雄士 : 酸化ストレス障害に対するゼブラフィッシュ Nrf2 活性化による保護作用 . 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, つくば, 2017年6月28日 .
- 小林麻己人 : ゼブラフィッシュを活用した Nrf2 システムの研究と応用 . 第 90 回日本薬理学会年会 ワークショップ「ゲノム創薬からフェノミクス創薬へのパラダイムシフト」, 長崎, 2017年3月15日-17日 .
- Nguyen, V.T., Mukaigasa, K., Fuse, Y. and Kobayashi, M.: Activation of Nrf2 attenuates genetic endoplasmic reticulum stress in zebrafish. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016年9月25日-27日 .
- 布施雄士、Vu Thanh Nguyen、小林麻己人 : 亜ヒ酸の毒性に対する Nrf2 依存的生体防御の遺伝学的解析 . 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016年9月25日-27日 .

Fuse, Y., Nguyen, V.T. and Kobayashi, M. : Nrf2-dependent Protection against Acute Arsenite Toxicity in Zebrafish. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research , 岡崎 , 2016 年 3 月 18 日-19 日 .

Mukaigasa, M., Nguyen, V.T., Sato, H., Fuse, Y. and Kobayashi, M. : A Zebrafish Model of Human Congenital Disorder of Glycosylation Ia. International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research , 岡崎 , 2016 年 3 月 18 日-19 日 .

小林麻己人 : ゼブラフィッシュを用いた環境ストレス応答の研究 . 第 42 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム「ゼブラフィッシュ研究の最前線」, 金沢 , 2015 年 6 月 29 日-7 月 1 日 .

小林麻己人 : Keap1-Nrf2 システムの化学物質およびストレス応答機序 . 第 42 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム「毒性発現の細胞内シグナル伝達機構」, 金沢 , 2015 年 6 月 29 日-7 月 1 日 .

小林麻己人、大坪士朗、布施雄士 : ゼブラフィッシュ Nrf2 システムを活用した毒性研究 . 第 1 回ゼブラフィッシュ創薬研究会 , 津 , 2015 年 11 月 6 日 .

Fuse, Y., Nakajima, H., Nakajima-Takagi, Y. and Kobayashi, M. : Bach1 and heme are involved in liver-specific and transient induction of heme oxygenase 1 in zebrafish. 第 37 回日本分子生物学会年会 , 横浜 , 2014 年 11 月 25 日-27 日 .

小林麻己人 : ゼブラフィッシュを用いた医生物学研究 . 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム「マウス以外のモデル動物を使った医生物学研究」, 京都 , 2014 年 10 月 16 日-18 日 .

その他 51 件

〔図書〕(計 2 件)

「魚類発生学の基礎」(2018) 分筆 (大久保範聡・吉崎悟朗・越田澄人編) 恒星社厚生閣 第 12 章 pp130-144.

南山堂「医学大辞典」第 20 版 (2015) 分筆 (秋澤忠男ら編) 南山堂 .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/MDBiology/mbiol.index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。