

令和元年6月13日現在

機関番号：82645

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06548

研究課題名（和文）宇宙環境における骨格筋萎縮のエピゲノム解析による新規筋萎縮治療標的の探索

研究課題名（英文）Identification of therapeutic target genes involved in skeletal muscle atrophy in space through epigenomics

研究代表者

岡田 理沙（Okada, Risa）

国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・研究開発員

研究者番号：20803498

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：宇宙空間において骨格筋は急激かつ重度に萎縮するが、微小重力における骨格筋萎縮メカニズムはほとんど明らかにされていない。微小重力において骨格筋萎縮を引き起こし、さらに萎縮状態を持続させる制御メカニズムの解明するため、マウス軌道上飼育装置を用いて、国際宇宙ステーションで35日間の宇宙空間飼育したマウスの骨格筋を用いて次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現とヒストン修飾の網羅的解析を行った。抽出した候補遺伝子をC2C12筋間細胞に遺伝子導入しスクリーニングを行うことにより、これまで筋萎縮との関連が報告されていない筋萎縮を誘導する遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋萎縮は、寝たきりなどの不活動（廃用性萎縮）や加齢に伴う老化（サルコペニア）などが原因で生じ、骨格筋としての機能は著しく障害される。近年、高齢化社会を迎えている我が国では骨格筋萎縮は解決すべき大きな社会問題の1つであるにもかかわらず、有効な予防法、治療法は未だ確立されていない。本研究では、宇宙環境で起こるエピゲノム変化を伴う発現変動遺伝子に着目し、筋萎縮を誘導し持続させる候補遺伝子を見出すことで、これらの遺伝子の今後の治療標的としての可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle is one of the most robustly affected organs under different gravitational conditions and it is known that space environment causes muscle weakness, however the molecular mechanism of muscle atrophy in space is largely unknown. To reveal the molecular mechanism of muscle atrophy, we conducted transcriptome and epigenetics analysis of soleus muscles of mice housed under microgravity or artificial-1g in space to measure the gene expression and epigenetic modification patterns, resulting a significantly up- or down-regulation of genes in MG mice compared with AG mice. To examine the relations of these genes and muscle atrophy, we introduced some of them into C2C12 myotubes using recombinant adenovirus vectors and identified several genes as candidates that cause a reduction in myotube diameter. These results suggest that candidate genes that we found through the comprehensive analysis and in vitro screening may have roles in microgravity-induced muscle atrophy.

研究分野：生化学

キーワード：骨格筋 微小重力 エピゲノム 国際宇宙ステーション（ISS）

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

1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮は、寝たきりなどの不活動（廃用性萎縮）や加齢に伴う老化（サルコペニア）などが原因で生じ、骨格筋としての機能は著しく障害される。近年、高齢化社会を迎えている我が国では骨格筋萎縮は解決すべき大きな社会問題の1つであるにもかかわらず、有効な予防法、治療法は未だ確立されていない。一方、宇宙滞在により宇宙飛行士の骨格筋はこれらの変化に比べて著しく萎縮することが報告されており、その主な原因は微小重力環境と考えられるが、どのような分子メカニズムで宇宙滞在において骨格筋萎縮が起こるのかは殆ど明らかになっていない。

宇宙滞在において生じる筋萎縮の速度や程度は、地上で不活動が原因で生じる廃用性筋萎縮と比べて、時間軸で約 30 倍の速さで、変化幅では約 20 倍の変化量で進行することが知られている。このことから宇宙滞在時の急速な筋萎縮は、廃用性萎縮とサルコペニアの複合で起こっていることが推測される。骨格筋はその活動状態により量的に変化し、寝たきりなどの廃用性萎縮の場合は筋量が顕著に減少する一方、運動トレーニングにより筋量を回復できる。しかしながら、サルコペニアの場合、そのような骨格筋の可塑性が失われることが報告されており（Chakravarthy MV, et al. *J. Appl. Physiol.*, 2000, Morris RT, *J. Appl. Physiol.*, 2004）その原因としてエピゲノム変化が予想されている。

2. 研究の目的

エピゲノム変化を伴う発現変動遺伝子に着目し、骨格筋の可塑性を失わせる原因となるエピゲノム変化を伴う骨格筋萎縮のメカニズムを明らかにすることを目的とする。これまでに、宇宙航空研究開発機構（JAXA）との共同研究により、国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」におけるマウスの軌道上飼育向けに新たなマウス飼育ケージを開発した（Shimbo M, et al. *Exp. Anim.*, 2016）。従来の宇宙実験には、微小重力の適切な対照がないと、個体数に限りがあることといった問題があった。そこで、本研究においては、微小重力群 6 匹に加えて、同じ宇宙環境で飼育するものの、人工的に地球と同じ 1G の重力を生じさせ、重力環境以外を同じ条件に揃えた適切な対照群（人工重力群）6 匹を飼育するという新たな試みのもと、軌道上飼育実験を実施した。これにより、微小重力環境が骨格筋に与える影響を直接比較することが可能となり、宇宙滞在による重力以外の要因を除いたマウスの個体における微小重力環境の骨格筋への影響を直接比較できる。これらの軌道上飼育したマウスのヒラメ筋を対象に、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現変動とエピゲノム変化を網羅的に解析することにより、宇宙滞在によるエピゲノム変化を伴った発現変動をする遺伝子を同定する。さらに、マウス横紋筋由来である C2C12 細胞株にアデノウイルスベクターを用いて候補遺伝子を過剰発現させることで、上記で同定した遺伝子が骨格筋萎縮に関与するかを検証する。さらに新生仔マウス骨格筋にアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させ、上記で同定した遺伝子発現量の増加が *in vivo* で骨格筋萎縮を誘導するのかが検討する。

3. 研究の方法

(1) 微小重力環境で起こる遺伝子発現変化とヒストン修飾変化の網羅的解析

宇宙滞在によりエピゲノム変化を伴った発現変動をする遺伝子を明らかにするため、軌道上飼育マウスのヒラメ筋の次世代シーケンサーを用いた RNA-sequence および抗ヒストン修飾抗体による ChIP-sequence により、網羅的なエピゲノム、遺伝子発現解析を実施した。

(2) 候補遺伝子の *in vitro* スクリーニングによる萎縮関連遺伝子の同定

候補遺伝子を発現する組換えアデノウイルスを作製し、C2C12 細胞株にアデノウイルスベクターを用いて候補遺伝子を過剰発現させることで、候補遺伝子が骨格筋萎縮を誘導するかを検証した。

(3) *in vivo* 遺伝子導入による個体レベルでの骨格筋萎縮誘導の検証

上記の *in vitro* スクリーニングで同定された骨格筋萎縮関連遺伝子を新生仔マウス骨格筋に、アデノウイルスベクターを用いて過剰発現させることにより、遺伝子発現変化が骨格筋萎縮の誘導するのかが検証した。

(4) 遺伝子改変マウスの作製と個体レベルでの候補遺伝子の機能解析

マウスのヒラメ筋を対象に機能解析を実施し、骨格筋萎縮が誘導される分子メカニズムを明らかにするため、CRISPR/Cas9 システムを用いて、全身で当該遺伝子が欠損する遺伝子改変マウスを作製する。この遺伝子改変マウスを用いて廃用性筋萎縮のモデルである尾部懸垂実験を実施し、筋萎縮誘導に対する抵抗性があるか、検証した。

4. 研究成果

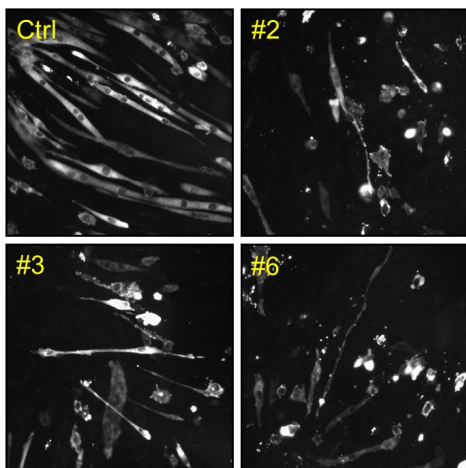
(1) 次世代シーケンサーによる、微小重力でエピゲノム変化を伴った発現変動をする遺伝子の同定

軌道上飼育したマウス 2 群（人工重力群、微小重力群、各 3 個体）のヒラメ筋を対象に、ヒストン修飾（H3K4me3、H3K27ac）に対する抗体を用いた ChIP-sequence 解析を行った。既に実

施していた RNA-sequence 解析とこの ChIP-sequence 解析の結果を比較することにより、遺伝子発現が有意に増加していた 247 遺伝子のなかで、109 遺伝子に転写の活性化マークである H3K4me3 および H3K27ac のヒストン修飾がされていることを明らかにした。さらに、この 109 遺伝子と、廃用性筋萎縮モデルである尾部懸垂実験のヒラメ筋の RNA-sequence 解析との比較により、筋萎縮に関連する可能性の高い遺伝子群を抽出した。

(2) C2C12 細胞株とアデノウイルスベクターを用いた in vitro スクリーニング

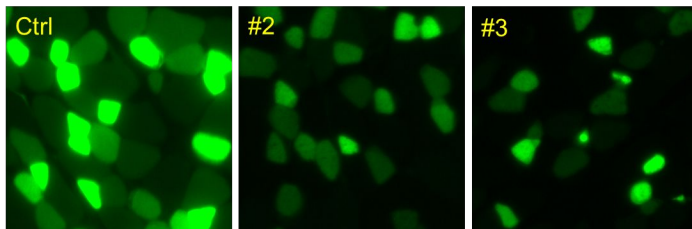
上記の同定された候補遺伝子を、アデノウイルスベクターを用いて C2C12 筋管細胞に導入し、候補遺伝子の発現が筋萎縮を誘導するかを検討した。その結果、候補遺伝子のうち 6 つの遺伝子が in vitro で筋萎縮を誘導することを見出し (図 1)。



(図 1)

(3) in vivo 遺伝子導入による個体レベルでの骨格筋萎縮誘導の検証

これら 6 つの遺伝子について、in vitro スクリーニング同様に組換えアデノウイルスを用いて、新生仔マウス骨格筋に当該遺伝子を遺伝子導入することにより、当該遺伝子の発現量の増加が骨格筋萎縮を引き起こすかを検証した。その結果、6 つのうち 2 つの遺伝子において、その遺伝子の発現量の増加が筋萎縮を誘導することがわかった (図 2)。



(図 2)

(4) 遺伝子改変マウスの作製と個体レベルでの候補遺伝子の機能解析

マウスのヒラメ筋を対象に機能解析を実施し、骨格筋萎縮が誘導される分子メカニズムを明らかにすることを目的に、これら 2 つの遺伝子について遺伝子欠損マウスを作製した。作製した遺伝子欠損マウスについて骨格筋重量および骨格筋の組織学的解析を行ったが、いずれも野生型と違いはみられなかった。さらに、これらのマウスを用いて、廃用性筋萎縮のモデルである尾部懸垂実験を実施し、筋萎縮誘導に対する抵抗性があるか、検証した結果、野生型尾部懸垂群と比べて、骨格筋重量に違いはみられなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Satoru Takahashi, Risa Okada, Takashi Kudo, Akane Yumoto, Hiroyasu Mizuno, Dai Shiba and Masaki Shirakawa “Transcriptome analysis of gravitational effects on muscles of mice – Baseline data of gene profiling under micro-g and onboard artificial 1-g conditions for upcoming NASA-JAXA rodent collaboration” 2018 ISS R&D Conference (SF, USA), 2018

坪内鴻奈、岡田理沙、鈴木 陸、布施谷清香、林 卓杜、中村勇輝、久野朗広、村谷匡史、工藤 崇、高橋 智 “微小重力環境下でのエピジェネティクスによる骨格筋制御因子の

探索” 第 41 回日本分子生物学会年会（横浜）、2018 年
岡田理沙、坪内鴻奈、新保未来、濱田理人、村谷匡史、芝 大、白川正輝、工藤 崇、高
橋 智 “微小重力環境における新規骨格筋萎縮関連遺伝子の探索” 第 95 回日本生理学会大
会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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

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。