

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11917

研究課題名(和文) Pathway 解析による微重力環境下筋萎縮メカニズムの解明と原因療法の開発

研究課題名(英文) Pathway analysis to elucidate mechanism of muscle atrophy under microgravity and development of causal therapy

研究代表者

佐藤 文規 (SATO, Fuminori)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュを用いた長期宇宙滞在実験により、微重力環境下での筋萎縮に関して解析を進めてきた。しかし、長期宇宙滞在実験によって確認された発現変動遺伝子が、微重力依存性であるのか、宇宙放射線等の他の要因も関与するのかが不明であった。そこで、長期宇宙滞在実験を模擬した低線量線照射実験を実施したところ、宇宙滞在によって発現変動する遺伝子には、放射線によって発現変動するものが含まれていた。より詳細な解析のために、ISS内で1G環境を設定し、これを対照群として短期宇宙滞在実験を実施した。これらの全ての結果を統合的に解析することによって、微重力環境感受性の遺伝子を同定することが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted long-term space stay experiments using zebrafish which is an aquatic animal, and analyzed muscle atrophy in microgravity environment. However, it was unknown whether the expression changed genes confirmed by this long-term space staying experiment were microgravity dependent or other factors such as cosmic radiation. Therefore, a low dose ray irradiation experiment simulating long-term space stay was carried out. As a result, it was suggested that genes which were changed in expression level by space stay include genes which were changed in expression level by radiation. Due to the need for more detailed analysis, we conducted a short-term space stay experiment of zebrafish using an artificial 1 G environment in the ISS on orbit as a control. By integrally analyzing these results, it is thought that it becomes possible to identify genes which is responsible to the microgravity environment

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ 骨格筋 トランスクリプトーム 微重力環境 宇宙滞在

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、微重力環境を対象とした宇宙滞在実験は、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、思うように解析が進んでいない状態であった。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たが、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、まだまだ宇宙滞在による筋萎縮実験の対象としては実用的ではないとされていた。長期的かつ安定的に宇宙滞在実験が可能な脊椎動物としてはメダカを代表とする小型魚類が用いられており、既に他の研究グループによりメダカを用いて骨密度低下に関する宇宙滞在実験が行われていた。さらに、骨密度低下に関しては上宇宙飛行士を対象にしたビスフォスフォネート剤による骨密度維持の研究も進んでおり、原因療法の確立も近いと思われる。しかし、筋萎縮に関しては薬物投与等による筋肉を維持する方法は確立されておらず、宇宙飛行士は毎日2時間の強制運動という対症療法により筋萎縮を抑えていた。この2時間の強制運動は宇宙飛行士自身だけでなく、少数の飛行士による宇宙ステーション運航という観点からも非常に大きな負担となっていた。

今後の有人火星探査などでは、これまで人類が経験をしたことのない超長期宇宙滞在が想定されることから、宇宙滞在による筋萎縮メカニズムの解明およびその予防法(治療法)の開発は喫緊の課題と考えられた。

2. 研究の目的

筋萎縮には様々な因子が関与することが示唆されており、ある特定の遺伝子の発現変動に注目する実験ではその全体像を理解できない。そこで、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム/Pathway解析を行い、微重力環境下の筋組織を中心に運動抑制・加齢および宇宙滞在実験を模擬した低線量放射線照射条件下の筋組織で変動する遺伝子群を調査比較することによって、微重力環境依存的筋萎縮の分子基盤を同定する。また、それらを標的とした原因療法開発の可能性を検証する。

3. 研究の方法

これまでに宇宙滞在をはじめとする様々な筋萎縮条件におけるゼブラフィッシュ骨格筋トランスクリプトーム解析を実施した。しかし、宇宙滞在実験には、微重力環境による影響と宇宙放射線等の影響を区別するこ

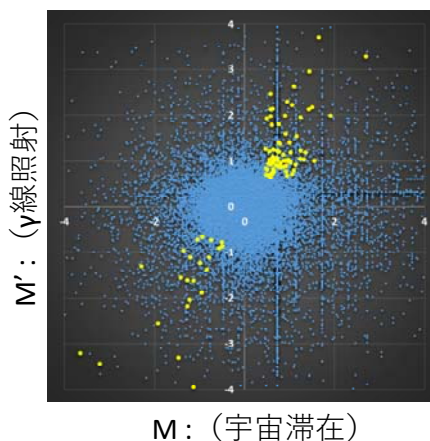
とができず、宇宙滞在による筋萎縮メカニズムを解明するには大きな障害となっていた。そこで、宇宙滞在実験を模擬した低線量放射線照射実験を実施することにより、宇宙滞在における微重力環境の影響と宇宙放射線の影響を区別して調べる。また、より詳細な持続的な研究を可能とすることを旨とした、クリノスタットを用いたゼブラフィッシュ模擬微重力実験法の検証、さらには特定遺伝子(パスウェイ)を標的とした予防法(治療法)開発の際に必須になる骨格筋可視化トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた簡易的な筋線維面積測定法の開発。

4. 研究成果

・宇宙滞在実験を模擬した低線量放射線照射実験

ゼブラフィッシュ長期宇宙滞在実験における実際の被ばく線量は測定していないため不明であった。しかし、以前と同じ装置を用いて実施されたメダカ長期宇宙滞在実験の際に測定していた結果を調べたところ約0.3mGy/dayであったことからこれを基準としてγ線による低線量放射線照射実験を行った。長期宇宙滞在実験の軌道上2日目、軌道上5週目、地球帰還後2日目にあたる低線量照射をしたゼブラフィッシュ骨格筋のトランスクリプトーム解析を実施した。図1にあるように、軌道上5週目と低線量照射5週目を比較すると、同様に有意(p<0.01)な発現変動が認められる遺伝子(黄色plot)が多数認められた。一方で、有意に反対の発現変動が認められる遺伝子も多数確認された。これらの結果は、長期宇宙滞在実験において発現変動が確認された遺伝子の中には宇宙放射線依存的な発現変動も含まれていることを示唆している。この低線量照射実験に結果を用いることにより、長期宇宙滞在実験の結果から、より詳細に微重力環境依存的な遺伝子の発現変動を抽出することが可能となった。

図1



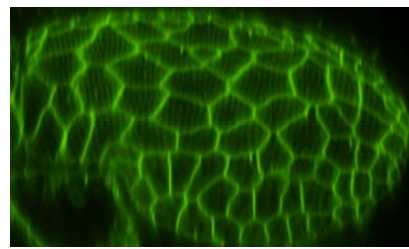
・クリノスタットを用いたゼブラフィッシュ
模擬微重力実験

宇宙実験の機会を得ることは非常に難しいことであり、実際の宇宙環境を用いて微重力環境の生物への影響を持続的に研究することは困難である。そこで多くの生物種においてはクリノスタットを用いた模擬微重力環境を用いて実験が行われている。しかし、ゼブラフィッシュやメダカなど宇宙滞在実験が実施されているにもかかわらずこの模擬微重力を用いた実験の報告はない。そこで、模擬微重力環境のゼブラフィッシュへの適応を検証した。クリノスタットはその特性上、対象となる生物を固定（上下反転した姿勢を維持）する必要があるが、水生生物は常に体を水平状態に保つためにこれができない。そこで、魚体への損傷等を考慮したシリコンチューブを用いた固定方が可能であることを確認し、この方法により模擬微重力環境に暴露されたゼブラフィッシュの骨格筋トランスクリプトーム解析を実施した。その結果を実際の宇宙滞在ゼブラフィッシュの骨格筋トランスクリプトーム解析の結果と比較した。有意に同様の発現変動が認められる遺伝子が少なく、宇宙滞在実験の結果との比較によると、微重力環境を模擬していることを示唆する結果は得られなかった。現在の方法では暴露期間としては数日が限界であり、さらなる検証を進めるためには数週間にわたって模擬微重力環境に暴露することが可能な方法を開発する必要があると考えられた。

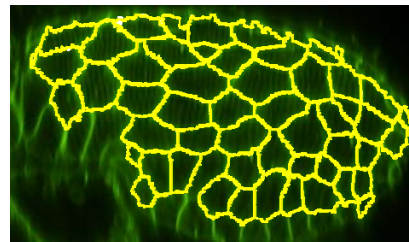
・骨格筋可視化トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた簡易的な筋線維面積測定法の開発

一般的な筋萎縮を対象とした研究では筋組織の切片を作成することにより筋線維の面積や径を測定し、骨格筋萎縮の有無を判定する。しかしこの方法は非常に煩雑であり、今後筋萎縮予防（治療）薬開発を目的とした、ハイスループットスクリーニングに適さない。そこで、より簡易的な方法の開発に着手した。ゼブラフィッシュ胚をスクリーニングに使用することを想定し、共焦点顕微鏡と骨格筋細胞の細胞膜を蛍光タンパク質で標識したトランスジェニックゼブラフィッシュの組み合わせにより、図2にあるような骨格筋の断面像を得ることができ、さらには筋線維の面積を半自動で測定することを可能とした。この方法は非侵襲的であり、生きた状態のゼブラフィッシュで計測可能であることから、継続的な筋萎縮状態の計測等にも非常に有用である。

図3



共焦点顕微鏡による撮像



筋線維面積の自動計測

まとめ

宇宙滞在を中心とした様々な骨格筋萎縮条件下の骨格筋トランスクリプトーム解析を比較・検討することによって、微重力環境依存性の骨格筋萎縮メカニズムおよび関連パスウェイの解明を試みたが、その特定には至っていない。しかし、その特定に必須となる様々な条件下の骨格筋トランスクリプトーム解析のデータを蓄積することができ、さらには、今後予防（治療）薬探索を行う際のゼブラフィッシュ胚を用いたハイスループットスクリーニングの基盤を構築することができた。また、研究期間終了直前には、これまでの解析結果をさらに検証することが可能となる2度目の宇宙滞在実験を実施することができた。これは軌道上の人工1G環境を利用することによってより厳密に微重力環境に感受性のある遺伝子を同定するための実験であり、既に予定していた全てのデータを得ることに成功している。この結果と前回の長期宇宙滞在実験の結果を合わせるにより詳細かつ厳密に微重力環境依存性の骨格筋萎縮メカニズムを明らかにすることが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

Tsumagari K, Shirakabe K, Ogura M, Sato F, Ishihama Y, Sehara-Fujisawa A. Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation. *Genes Cells*. 22:237-244. 2017
DOI:10.1111/gtc.12466

Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Matsuzaki F, Sehara-Fujisawa A. Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 6:28873. 2016
DOI:10.1038/srep28873

〔総説・解説〕(計 1件)

佐藤文規、Choi Minyong、瀬原淳子「ゼブラフィッシュの宇宙環境への適応」『生体の科学』“特集宇宙の極限環境から生命体の可塑性をさぐる”
DOI:10.11477/mf.2425200767

〔学会発表〕(計 22件)

Mao Kuriki, Fuminori Sato, Kenta Sumiyama, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa 「Roles of a transcription factor 19A in the ossification of sternum」CDB Symposium 2018 Dynamic Homeostasis (2018.3.26-28 兵庫県)

Atsuko Sehara-Fujisawa 「Studies on skeletal muscle atrophy in space - what zebrafish experienced in a space tour」CDB Symposium 2018 Dynamic Homeostasis (2018.3.26-28 兵庫県)

堀新平、佐藤文規、瀬原淳子「骨格筋再生の代謝制御」第40回日本分子生物学会年会(2017.12.6-9 兵庫県)

佐藤文規、Choi Minyong、王梓、岩瀬海里、今村聖実、堀内映美、内田智子、谷垣文章、村谷匡史、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、鈴木稜、川上浩一、瀬原淳子「魚が宇宙で過ごすはどうなるの? ~宇宙滞在実験の結果より~」第40回日本分子生物学会年会(2017.12.6-9 兵庫県)

栗木麻央、佐藤文規、隅山健太、川上浩一、瀬原淳子「胸骨骨化における転写因子19Aの機能」第40回日本分子生物学会年会(2017.12.6-9 兵庫県)

Atsuko Sehara-Fujisawa 「Studies on skeletal muscle regeneration and atrophy? What zebrafish experienced in a space tour」第12回研究所ネットワーク国際シンポジウム(2017.11.28 東京都)

佐藤文規、Choi Minyong、王梓、岩瀬海里、今村聖実、堀内映美、内田智子、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、鈴木稜、川上浩一、瀬原淳子「宇宙滞在が骨格筋に及ぼす影響 - 重力負荷減少だけではなさそう?」日本宇宙生物学会第31回大会(2017.9.20 群馬県)

瀬原淳子「筋維持・萎縮機構の研究:宇宙か

ら学ぶこと」宇宙科学談話会(2017.9.6 神奈川県)

Hiroyuki Arai, Fuminori Sato, Takuya Yamamoto, Hiroshi Kiyonari, Atsuko Sehara-Fujisawa 「Involvement of Adam19 in the fate decision of murine cardiac neural crest cells」International Society for Stem Cell Research (2017.6.14-17 Boston, USA)

Mao Kuriki, Fuminori Sato, Kenta Sumiyama, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa 「Roles of a transcription factor 19A in the osteoblast development of sternum」50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2017.5.10-13 東京都)

Tabuchi M, Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A 「Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding in motor neurons in zebrafish」50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2017.5.10-13 東京都)

Hiroyuki Arai, Fuminori Sato, Takuya Yamamoto, Hiroshi Kiyonari, Atsuko Sehara-Fujisawa 「Involvement of Adam19 in the fate decision of cardiac neural crest cells」50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2017.5.10-13 東京都)

佐藤文規、Choi Minyong、王梓、岩瀬海里、今村聖実、堀内映美、内田智子、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、鈴木稜、川上浩一、瀬原淳子「“宇宙遊泳”がゼブラフィッシュ骨格筋へおよぼす影響」第62回日本宇宙航空環境医学会大会・日本宇宙生物学会第30回大会(2016.10.13 愛知県)

佐藤文規「宇宙で過ごした魚の骨格筋はやせるのか? ~宇宙実験の結果より~」第14回日本予防医学会学術総会(2016.6.18 東京都)

Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A 「Development of a probe to monitor ectodomain shedding of Neuregulin 1 in vitro and in vivo」International FishMed Conference on Zebrafish Research (2016.3.18 Warsaw, Poland)

佐藤智美、佐藤文規、亀崎青沙、坂口和弥、谷米竜馬、梶原健、永島雅文、川上浩一、瀬原淳子「ニューレグリン-ErbBシグナルは脳室下帯において基底前駆細胞から神経細胞

を生ま出す分裂を促進する」第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 会日本生化学会大会 合同大会 (2015.12.4 兵庫県)

佐藤文規、Choi Minyong、内田智子、谷垣文章、鈴木穰、川上浩一、瀬原淳子「宇宙滞在によって変化するゼブラフィッシュの骨格筋トランスクリプトーム」日本宇宙生物科学会第 29 回大会 (2015.9.26 東京都)

Nishimura D, Sakai H, Sato T, Sato F, Nishimura S, Toyama-Sorimachi N, Bartsch JW, Sehara-Fujisawa A. 「Role of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration」44th European Muscle Conference (2015.9.22 Warsaw, Poland)

Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara A. 「NRG1-ErbB4 signaling promotes generation of neurons from neural progenitor cells in the developing brain.」第 58 回日本神経化学会大会 (2015.9.13 埼玉県)

西邨大吾、酒井大史、佐藤貴彦、佐藤文規、西村智、反町典子、Bartsch JW、瀬原淳子「骨格筋再生に先行する損傷筋除去における ADAM8 の役割」第 1 回日本筋学会学術集会 (2015.8.8 東京都)

Sato F, Nishimura D, Hori S, Arai H, Hiramuki Y, Sogabe M, Kuriki M, Choi M, Wang Z, Kawahara A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. 「What can we learn by exploring the interstitial space of skeletal muscle during development and regeneration」48th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2015.6.5 茨木県)

Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Kawakami K, Fukuhara S, Mochizuki N, Sehara-Fujisawa A. 「Real time imaging of Neuregulin 1 ectodomain-shedding in the developing zebrafish embryos」48th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2015.6.3 茨木県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：NRG1 の切断検出用プローブ、NRG1 の切断検出用プローブをコードするポリヌクレオチド、NRG1 の切断検出

用プローブの発現ベクター、NRG1 の切断検出用形質転換体、NRG1 の切断検出方法、および NRG1 切断酵素の阻害剤のスクリーニング方法

発明者：瀬原淳子、亀崎青沙、佐藤文規、青木一洋、川上浩一

権利者：瀬原淳子、亀崎青沙、佐藤文規、青木一洋、川上浩一

種類：特許

番号：特開 2017-165688

出願年月日：2016.3.16

国内外の別：国内

○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/>

JAXA ウェブサイト

http://iss.jaxa.jp/kiboexp/news/171226_zeb_rafish.html

NASA ウェブサイト

<https://blogs.nasa.gov/stationreport/2017/12/18/iss-daily-summary-report-12182017/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 文規 (SATO, Fuminori)

京都大学・ウイルス再生医科学研究所・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・ウイルス再生医科学研究所・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)

加藤 充康 (KATO, Mitsuyasu)

谷垣 文章 (TANIGAKI, Fumiaki)