

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16536

研究課題名(和文) アデノ随伴ウイルスを利用した疲労調節因子を中心とする疲労分子機構の解明

研究課題名(英文) The Clarification of Molecular Mechanisms of Fatigue Underlying Fatigue Regulation Factors Using Adeno-associated Virus

研究代表者

久米 慧嗣 (Kume, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：30708441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：疲労調節因子が疲労負荷時において動物の疲労行動を本当に制御しているのかを決定し、疲労行動、代謝異常、および組織炎症との関係性を明確にすることを目指した。また、疲労負荷が生体組織(肝組織)の微細構造形態に与える影響を最新型の走査型電子顕微鏡技術により網羅的に調べ、組織オミクス解析「マイクロモルフォミクス」の構築を実現した。

研究成果の概要(英文)：We decided whether the fatigue regulator factors really control the fatigue behavior of the animal model with the fatigue loading, and we aimed to clarify the relationship with fatigue behavior, metabolic abnormality, and tissue inflammation. In addition, the effect of fatigue load on the microstructures of the liver tissue was comprehensively examined by the latest-type scanning electron microscope technology, and the development of tissue omics analysis "micro-morphomics" was realized.

研究分野：疲労科学

キーワード：疲労・代謝・免疫・炎症 予防医学 生物情報学 メタボローム解析 電子顕微鏡技術 モルフォミクス解析 網羅的微小構造解析 顕微鏡オンロジー

## 1. 研究開始当初の背景

疲労・疲労感は日常生活のなかで経験する感覚であり、痛みに続き、医療機関を訪れる主訴の上位に位置する。近年の疲労科学の進歩に伴い、慢性的な疲労は、国民の約40%が自覚しているきわめてポピュラーな病態であるとともに、慢性疲労を感じる人のなかには、日常生活に重篤な支障をきたす慢性疲労症候群（CFS）患者が含まれることが分かってきた。CFSは、原因不明の強い全身疲労倦怠感などが6ヶ月以上に渡り継続する病態である。CFS患者と同様な代謝病態を示す疲労モデル動物を利用した病態解析により、疲労時にはエネルギー産生の低下に加え、疲労調節因子が、疲労時に特異的な代謝回路や組織の炎症反応を制御していることが予測され、CFS病態の理解には、代謝異常を中心とする、疲労行動や炎症反応の分子メカニズムを探ることの必要性が分かりつつあった。

## 2. 研究の目的

当研究では、疲労調節因子がCFS疾患に類似な、動物の疲労行動を本当に制御しているのかを決定するために、疲労調節因子の遺伝子を各臓器に恒常発現させたモデル動物を作製し、疲労行動、代謝異常、および組織炎症との関係性を明確にすることを目指した。また、疲労調節因子の活性化を惹起しうる、疲労負荷ストレスが生体組織の微細構造形態に与える影響を調査するために、疲労モデル動物の肝臓において、その微細構造の変化を最新型の走査型電子顕微鏡（SEM）技術により網羅的に調べる試みを実施した。この取り組みでは、「組織微細構造情報の総体（モルフォーム、Morphome）」を通して、疲労病態を網羅的に理解することを目指した。

## 3. 研究の方法

疲労調節因子、あるいは緑色蛍光タンパク質（GFP）の遺伝子断片を含むアデノ随伴ウ

イルス（AAV）ベクターのプラスミドを設計し、DNAクローニングなどによって目的のAAVベクターを得た。AAVベクターは、大腸菌Stbl3を用いて培養し、目的プラスミドDNAを抽出した。さらに、AVベクターを、ヘルパーベクターなどとともにヒト胎児腎細胞HEK293にトランスフェクションし、約3日間細胞培養を行い、ウイルス精製などを経て、目的とするAAVを取得した。

SEM実験においては、疲労を負荷したラットから灌流固定後に生体試料（肝臓）を取得して、固定、脱水、樹脂包埋した後に、各組織の超薄切片（約70nm）を作製した。さらに、電子染色を行った後に、SEMの反射電子検出法を用いて組織試料を観察し、3,000枚程度の画像データを取得した。さらに、画像撮像までの一連の実験過程、及び画像データを記述するために「顕微鏡オントロジー」を構築した。

## 4. 研究成果

GFPを発現するAAV（AAV-GFP）をポジティブコントロールとして、動物へのAAVの感染実験を行なった。AAV-GFPを動物の尾静脈より投与し、各臓器への感染を調べた。その結果、投与後1ヶ月の肝臓において、強いGFP蛍光が観察され、マウス1個体あたり1千億ウイルスの投与濃度において、50%前後の細胞への感染が確認された。

疲労調節因子遺伝子の1つであるHIF-1 $\alpha$ を対象に、HIF-1 $\alpha$ -AAVの作製を進めている。そのAAVベクターを用いて各臓器に恒常的に遺伝子発現させたモデル動物の作製を進めており、さらに、疲労行動、代謝異常、および組織炎症との関係性を明確にする実験も行っており、それらとの関係性も分かりつつある。

網羅的な組織科学的手法によって画像ビッグデータを取得する方法論は、生命科学分野において「モルフォミクス（Morphomics）」

と言われ、新たなオミックス研究領域の1つとなりつつある。今回、疲労を負荷した動物の肝臓において得られた組織微細構造の画像ビッグデータを詳細に解析することで、ミトコンドリアの変形などを含む、疲労時特有の様々な形態学的な変化が確認された。さらに、微細構造画像データに対して、実験条件や表現型データなどを記述することが可能なオントロジー（共通語彙）を提案し、モルフオミックス解析によって得られた画像データを公開・共有・検索するプラットフォームの構築が達成されつつある。

#### 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 2 件)

1. 久米慧嗣、大和正典、片岡洋祐 複合疲労モデル動物を利用した疲労の潜在的代謝物バイオマーカーの探索研究 日本疲労学会誌、査読有り、11(2):65-70, 2016年3月号
2. 久米慧嗣、大和正典、中野真行、田村泰久、江口麻美、高田孔美、片岡洋祐 疲労モデル動物における血漿メタボローム解析、およびオルニチン投与による抗疲労研究、査読無し、Medical Science Digest 42(1):10-14, 2016年1月号

[学会発表] (計 13 件)

1. Kume, S., Masuya, H., Kataoka, Y., Kobayashi, N., Development of an Ontology for an Integrated Image Analysis Platform to enable Global Sharing of Microscopy Imaging Data, The 15th International Semantic Web Conference, 2016年10月19日、神戸国際会議場(神戸市・兵庫県)
2. 山野恵美、杉本昌弘、平山明由、久米慧

嗣、倉恒弘彦、福田早苗、渡辺恭良、曾我朋義、片岡洋祐 メタボローム解析による慢性疲労症候群バイオマーカーの探索 第10回メタボロームシンポジウム2016、2016年10月21日、慶應義塾大学先端生命科学研究内鶴岡メタボロームキャンパス(鶴岡市・山形県)

3. Nakano, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Yamato, M., Kume, S., Kataoka, Y. NG2 glial cells suppress neuroinflammation and support the survival of hippocampal neurons 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)
4. Yamato, M., Kume, S., Nakano, M., Tamura, Y., Eguchi, A., Kataoka, Y. Deterioration of TCA cycle in the brain induced prolonged suppression of locomotor activity by involvement of neuroinflammation in rats 第39回日本神経科学大会、2016年7月20日、パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)
5. Tamura, Y., Takata, K., Eguchi, A., Yamato, M., Nakano, M., Kume, S. Kataoka, Y. PET imaging for cellular proliferative activity in brain neurogenic regions of adult rats 第39回日本神経科学大会、2016年7月21日、パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)
6. 久米慧嗣、大和正典、山野恵美、片岡洋祐 疲労代謝の分子機構の解明、および疲労の潜在的代謝物マーカーの探索研究 第12回日本疲労学会総会・学術集会、2016年5月21日、パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)
7. 大和正典、久米慧嗣、中野真行、江口麻美、高田孔美、田村泰久、片岡洋祐 エネルギー代謝を低下させた疲労動物モデルにおける脳内神経炎症の惹起 第12回日本疲労学会総会・学術集会、2016

- |  |   |
|--|---|
| <p>年 5 月 21 日、パシフィコ横浜（横浜市・神奈川県）</p> <p>8. <u>久米慧嗣</u>、大和正典、中野真行、江口麻美、田村泰久、片岡洋祐 疲労負荷動物モデルにおけるメタボローム解析と疲労代謝性肝組織炎症の実証 第 9 回メタボロームシンポジウム、2015 年 10 月 1 日、三島市民文化会館・三島商工会議所（三島市・静岡県）</p> <p>9. 片岡洋祐、大和正典、<u>久米慧嗣</u> 疲労病態でみられる代謝変化とオルニチン 第 1 回シトルリン・オルニチン研究会、2015 年 9 月 25 日、大手町サンスカイルーム（千代田区・東京都）</p> <p>10. 大和正典、<u>久米慧嗣</u>、中野真行、田村泰久、江口麻美、片岡洋祐 エネルギー代謝の低下に着目した疲労動物モデルにおける脳内神経炎症の関連 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場（神戸市・兵庫県）</p> <p>11. 大和正典、<u>久米慧嗣</u>、金光華、中野真行、江口麻美、田村泰久、片岡洋祐 エネルギー代謝の低下に着目した疲労動物モデルにおける脳内神経炎症の惹起 第 11 回日本疲労学会総会・学術集会、2015 年 5 月 15 日、山口県総合保健会館（山口市・山口県）</p> <p>12. <u>久米慧嗣</u>、大和正典、中野真行、江口麻美、田村泰久、山野恵美、渡辺恭良、曾我朋義、片岡洋祐 疲労負荷動物モデルを利用した疲労の潜在的バイオマーカーの探索研究 第 11 回日本疲労学会総会・学術集会、2015 年 5 月 15 日、山口県総合保健会館（山口市・山口県）</p> <p>13. 片岡洋祐、中野真行、大和正典、<u>久米慧嗣</u>、田村泰久 中枢神経炎症の調節メカニズムと疲労 第 11 回日本疲労学会総会・学術集会、2015 年 5 月 15 日、山口県総合保健会館（山口市・山口県）</p> | <p>[図書] (計 0 件)</p> <p>[産業財産権]</p> <p>○出願状況 (計 0 件)</p> <p>○取得状況 (計 0 件)</p> <p>[その他]</p> <p>無し</p> <p>6. 研究組織</p> <p>(1)研究代表者</p> <p><u>久米 慧嗣 (Kume, Satoshi)</u></p> <p>国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員</p> <p>研究者番号：30708441</p> <p>(2)研究分担者</p> <p>(3)連携研究者</p> <p>(4)研究協力者</p> |
|--|---|