

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03234

研究課題名(和文) 宇宙飛行士の血漿中核酸エピゲノム解析による宇宙環境応答の統合評価

研究課題名(英文) Plasma cell-free DNA and RNA analysis of astronauts for evaluation of space environmental responses

研究代表者

村谷 匡史 (Muratani, Masafumi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50730199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、国際宇宙ステーションでの滞在前、滞在中、帰還後の11のタイムポイントで6名の宇宙飛行士から血液検体を採取し、血漿中の細胞外RNA、DNAの解析を行った。シーケンス解析により、ミトコンドリアと細胞外基質に関連する遺伝子に由来するRNAとDNAの顕著な変化が見られた。さらに組織特異的な遺伝子のプロファイルを解析することで、宇宙環境で応答する組織や細胞種を予想することができた。ミトコンドリアの変化は、マウス実験の宇宙の微小重力環境での飼育と人工1G環境を比較した実験でも同様の変化が見られ、さらに重力環境の変化がその変化の要因の一つであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宇宙の微小重力環境は、地球生命がこれまで経験したことの無い環境に対してどのように応答するのかを観察できるユニークな条件であり、その応答としてミトコンドリア応答が体内でシステミックに起こることがマウスとヒトの両方で示された。これらの応答はヒトの地上での代謝関連疾患等とも関連していると考えられ、宇宙で顕在化する制御機構が地上での医学や基礎生命科学の進歩に寄与することが期待される。また、本研究で得られた知見はヒトの長期宇宙滞在や月、火星への有人ミッションに向けた宇宙医学研究に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Blood samples were collected from 6 astronauts at 11 time points to compare pre-flight baseline, in-flight and post-flight conditions. Consistent with the report from the Twins Study, we observed a significant increase in cell-free mitochondrial DNA in plasma during space flight. Mitochondria-enriched fractions were isolated by surface markers of extracellular vesicles, and RNA-sequencing was performed. The results showed enrichment of tissue-specific RNAs derived from various tissues including cardiovascular and nervous systems, indicating that these tissues are under metabolic stress in space. These results also established successful monitoring of internal tissues using cfRNA-based liquid biopsies.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：宇宙環境 リキッドバイオプシー オミックス解析 セルフリーDNA・RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

宇宙滞在では放射線、微小重力、閉鎖環境ストレスが複合的な影響を生体に加え、深宇宙への有人探査に向けて、その医学的理解と対応策の開発は重要な課題である。また、地球上の生命が進化上経験したことのない微小重力環境に対して示す応答は、生物学的にも非常に興味深い。JAXA と本研究の提案者らは、2016年に国際宇宙ステーション（ISS）で世界初の人工1G環境を対照としたマウス宇宙飼育実験を行い、生命が地球上で普遍的に受ける重力が、環境シグナルとして骨・筋・免疫系、さらに代謝や神経調節の恒常性維持に重要であることを見出した。しかし、限られた実験機会と技術的制約により、その生物学的解釈では不明瞭な部分も多く残されていた。本研究では、モデル生物を用いた実験結果のヒトでの検証と、より柔軟なタイムコース実験の実施を目的として、マウス宇宙飼育実験と並行して宇宙飛行士を対象とした液体生検（リキッドバイオプシー）による宇宙環境応答の評価を行った。

2. 研究の目的

本研究では、6名の宇宙飛行士の血漿中の細胞外 RNA（cell-free RNA, cfRNA）を対象としたトランスクリプトーム解析と細胞外 DNA（cell-free DNA, cfDNA）のメチル化解析を行うことで、ヒトの体内深部で起こる変化を組織・細胞種単位で予測することを目的とした。これにより、モデル生物で得られた結果との統合解析を行い宇宙環境応答の生体影響を複数種間・システムレベルで比較検討した。

3. 研究の方法

本研究では細胞外 DNA および RNA を対象とするリキッドバイオプシー解析を行った。血漿中には、死細胞由来の DNA および RNA が含まれ、体内組織で起こる細胞のターンオーバーのモニタリングを可能にすると期待される（図1）。また、エクソソーム等の細胞外小胞は機能的マイクロRNAなどのRNAを含み、宇宙環境応答のバイオマーカーとしての利用や、細胞間連絡の分子機構の手がかりとなる。このような変化を網羅的にとらえるため、RNA シーケンスおよび DNA メチル化解析を行った。

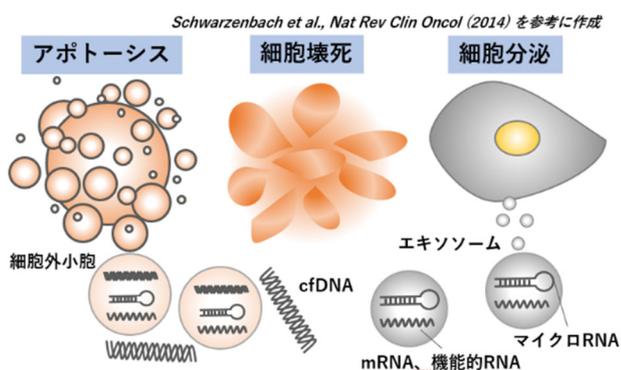


図1 cfDNA, cfRNAの由来と液体生検としての利用

4. 研究成果

(1) タイムコース検体採取と血漿中 cfDNA、cfRNA の定量

本研究では打ち上げ前からフライト後までの11ポイントのサンプリングを行うことで、時系列変化を明らかにすることを目標とした。これにより、宇宙飛行士の打ち上げ前、フライト中、フライト後の検体をそれぞれ比較することが可能となった。初期の宇宙環境応答と再順応の解釈に重要なタイムポイントである打ち上げと帰還後の最初のタイムポイントは、3日程度を目標に運用面での調整を行い、3-5日程度のタイミングを確保した。研究対象者数は必要な研究期間も考慮して6名を目標とした。

血漿中の cfDNA および cfRNA の総量にはフライト前後で変化は見られなかったが、ミトコンドリア DNA およびミトコンドリアゲノムにコードされている遺伝子由来の DNA および RNA 量はフライト中に有意に増加した。この結果は NASA の先行研究である 1 名の宇宙飛行士の長期フライトを対象とした Twins Study の結果を再現するものであった(図 2)。

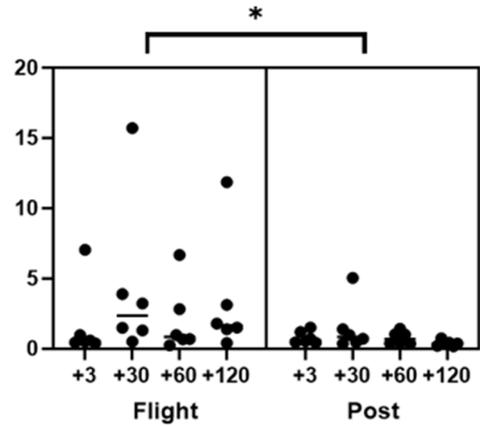


図 2 ミトコンドリアDNAの定量

(2) RNA シーケンス解析

組織特異性が詳しく報告されているマーカー遺伝子が多数データベースに登録されていることから、コーティング遺伝子の RNA シーケンス解析は cfRNA の由来組織の推定に有用である。特定の組織や細胞種に限局して発現する RNA の検出は、cfRNA の由来組織を示唆する情報となるため、RNA シーケンスデータに基づいた宇宙環境に応答する体内深部の組織の同定を目標とした。一方で、幅広い細胞種で発現する細胞周期関連遺伝子や DNA 損傷応答にかかわる遺伝子群の変化が低軌道での宇宙放射線に反応して変化する可能性がある。したがって、cfRNA シーケンスによる環境応答遺伝子の発現変化の推定も目標とした。

血漿 RNA を用いて rRNA-depletion 法による RNA シーケンス解析を行った。シーケンスリードのマッピングをハウスキープ遺伝子領域で可視化することにより、エクソン・イントロンのパターンが検体間でよく揃ったデータが得られていることを確認した。このデータを用いて全ゲノムの遺伝子についてリードの定量値を得た。RNA シーケンス解析では、最も RNA 量の少ない検体では 0.5ng 未満の微量 RNA を用いて解析を行っており、テクニカルなリポート間でのばらつき (technical variation) とベースライン検体間のばらつき (biological variation) の状態を把握するために各研究対象者につき 1 検体を選んで、2 回目のライブラリ作製とシーケンスを行った。テクニカルリポート間では相関係数 $r > 0.8$ 程度と、微量検体の RNA シーケンスとしては良好なデータを得た (図 3)。ベースライン検体間のばらつきを考慮し、統計解析では 6 名分のデータをまとめて各群 N=6 実験として扱った。

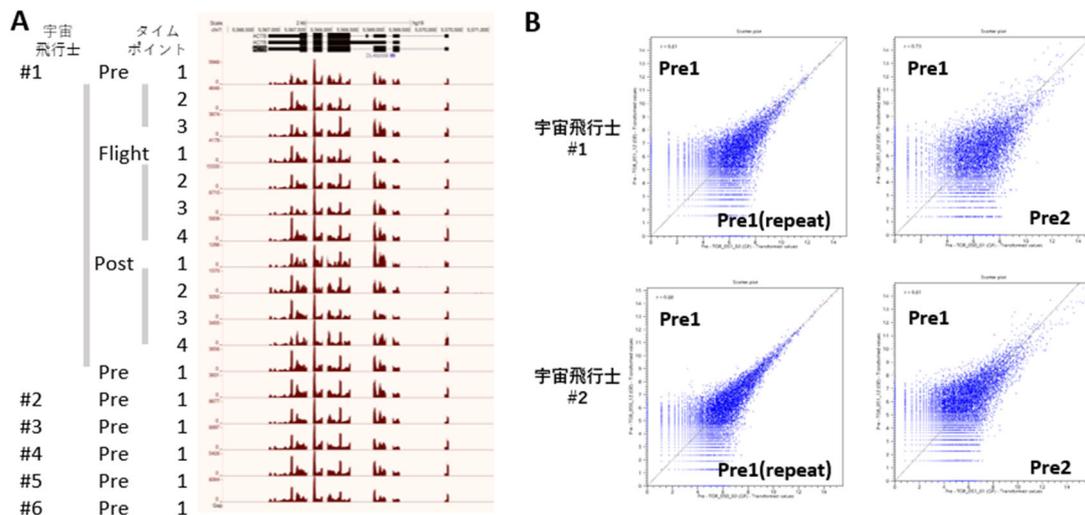


図 3 血漿RNAシーケンス解析のデータ品質確認

6名の研究対象者の11タイムポイントにあたる計66検体のRNAシーケンスデータを取得し、Principal component analysis (PCA)プロットを作成した。1検体は他の65検体から大きく外れていたため、除外し、65検体のデータを用いて解析を行った。PCAプロ

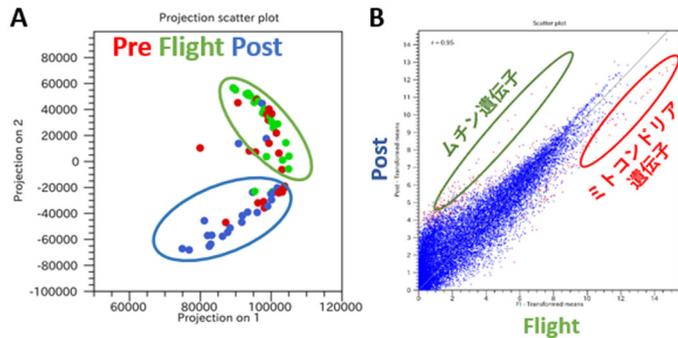


図4 血漿RNAシーケンス定量解析

ットの傾向から、フライト前の検体では、6名の参加者の各タイムポイントでのばらつきが比較的大きいことが示された。一方で、フライト中、フライト後では全ての研究対象者で似通った傾向を示した(図4)。フライト前検体の間ではばらつきがあったことから、これをベースラインとして用いた定量解析ではRNAカウントが有意に変化する遺伝子の数は少ない傾向があった。しかし、フライト中と帰還後の比較ではN=6間でのばらつきが少なかった。本研究の解析では、フライト前・中・後を3群としてANOVA解析を行い有意に変化した遺伝子群を得た。

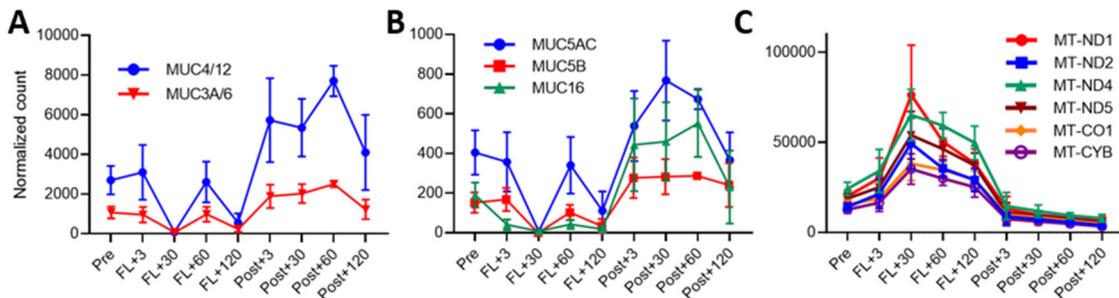


図5 血漿RNAシーケンス解析において顕著な変化があったムチン遺伝子ファミリーとミトコンドリア遺伝子

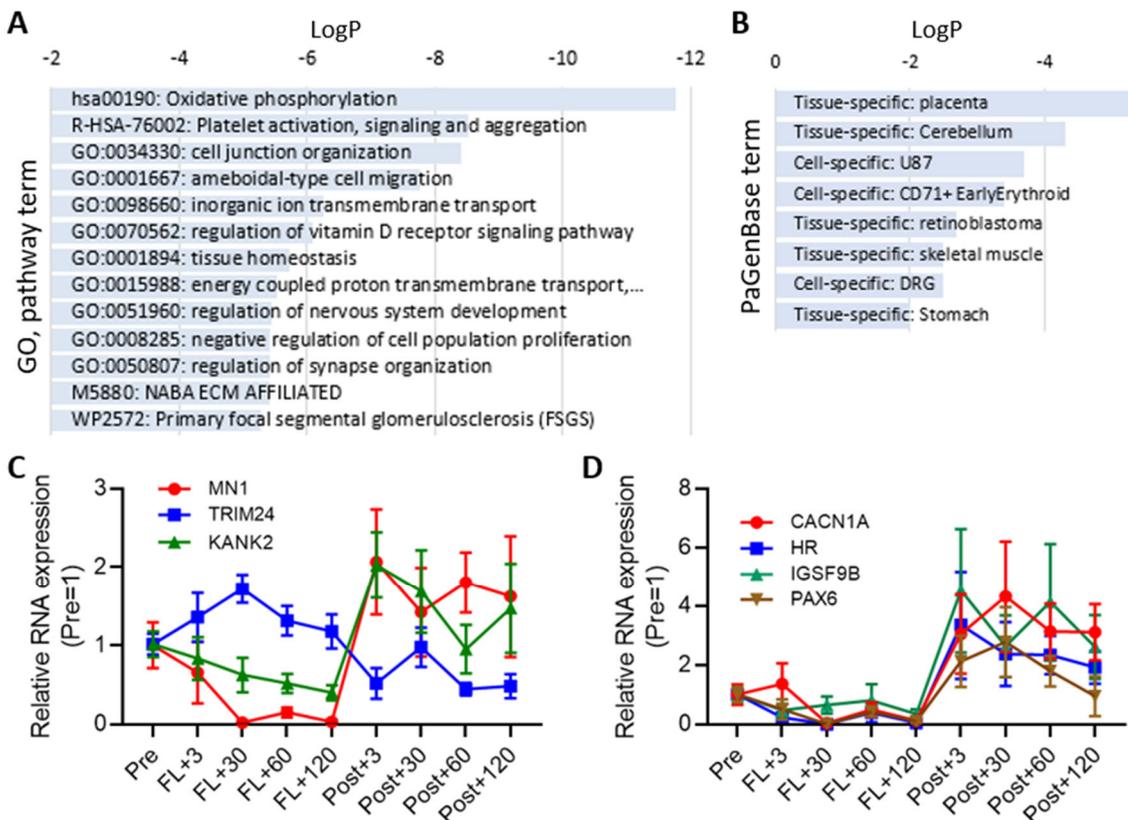


図6 RNAシーケンスで変化が見られた組織特異性に関連する遺伝子

フライト中に顕著に RNA が減少する遺伝子群としてムチン遺伝子ファミリー、上昇する遺伝子群としてミトコンドリア遺伝子が見られた (図 5)。これらの遺伝子は Scatter plot 上では X=Y 直線と平行にプロットされ、発現量の変動の倍率が似ていたことがわかる。このような Scatter plot でのパターンは、個々の遺伝子の発現変化ではなく、これらの遺伝子群を含む細胞外小胞などの総量が増加することにより、複数の遺伝子に由来する RNA が等倍で変化していることを示唆している。さらに各遺伝子の発現量をタイムポイントに分解することで、ムチン遺伝子ファミリー RNA のフライト中の減少、帰還後の増加、さらに帰還後 120 日のタイムポイントではフライト前のレベルに戻る傾向が確認できた。ミトコンドリア遺伝子ではこれと逆の傾向が見られ、フライト中の顕著な増加が見られた。

ムチンファミリー遺伝子、ミトコンドリア遺伝子以外の機能的傾向を検討するために 3 群比較で変化のあった 286 遺伝子について Metascape ツールによるパスウェイ解析を行った。ミトコンドリアに関連する酸化的リン酸化や血液細胞由来の血小板関連遺伝子の他にもビタミン D レセプターシグナリング、神経・シナプス関連遺伝子のエンリッチメント結果が得られた (図 6)。さらに、同解析の細胞・組織特異性の結果からは、小脳、骨格筋関連遺伝子の変化が認められた。これらの結果から、6 名の宇宙飛行士で共通した RNA 発現変化の傾向が見られ、ISS 滞在中と帰還後で変化する血漿 cfRNA を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Okada Risa, Fujita Shin-ichiro, Suzuki Riku, Hayashi Takuto, Tsubouchi Hirona, Kato Chihiro, Sadaki Shunya, Kanai Maho, Fuseya Sayaka, Inoue Yuri, Jeon Hyojung, Hamada Michito, Kuno Akihiro, Ishii Akiko, Tamaoka Akira, Tanihata Jun, Ito Naoki, Shiba Dai, Shirakawa Masaki, Muratani Masafumi, Kudo Takashi, Takahashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome analysis of gravitational effects on mouse skeletal muscles under microgravity and artificial 1 g onboard environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88392-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Takuto, Kudo Takashi, Fujita Ryo, Fujita Shin-ichiro, Tsubouchi Hirona, Fuseya Sayaka, Suzuki Riku, Hamada Michito, Okada Risa, Muratani Masafumi, Shiba Dai, Suzuki Takafumi, Warabi Eiji, Yamamoto Masayuki, Takahashi Satoru	4. 巻 4
2. 論文標題 Nuclear factor E2-related factor 2 (NRF2) deficiency accelerates fast fibre type transition in soleus muscle during space flight	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02334-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Keisuke, Fujita Shin-ichiro, Isotani Ayako, Kudo Takashi, Takahashi Satoru, Ikawa Masahito, Shiba Dai, Shirakawa Masaki, Muratani Masafumi, Ishii Shunsuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Intergenerational effect of short-term spaceflight in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lindsay Rutter, 村谷匡史	4. 巻 279
2. 論文標題 宇宙生命科学研究におけるオミックス解析の標準化・自動化と国際連携	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村谷匡史	4. 巻 279
2. 論文標題 リキッドバイオプシー解析を介したモデル生物研究成果のヒトへの投射	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takafuji Yoshimasa, Tatsumi Kohei, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Muratani Masafumi, Kaji Hiroshi	4. 巻 108
2. 論文標題 MicroRNA-196a-5p in Extracellular Vesicles Secreted from Myoblasts Suppresses Osteoclast-like Cell Formation in Mouse Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 364 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Shin-ichiro, Rutter Lindsay, Ong Quang, Muratani Masafumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Integrated RNA-seq Analysis Indicates Asynchrony in Clock Genes between Tissues under Spaceflight	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 196 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rutter Lindsay, Barker Richard, Bezdán Daniela, 他13名, Galazka Jonathan M., Herranz Raul, Muratani Masafumi	4. 巻 1
2. 論文標題 A New Era for Space Life Science: International Standards for Space Omics Processing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Patterns	6. 最初と最後の頁 100148 ~ 100148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Afshinnekoo Ebrahim, Scott Ryan T., MacKay Matthew J. (他12名)... Muratani Masafumi...(他19名)、Costes Sylvain V., Mason Christopher E., Beheshti Afshin	4. 巻 183
2. 論文標題 Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1162 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.10.050	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村谷匡史, Lindsay Rutter, 藤田晋一郎, 高橋智
2. 発表標題 宇宙飛行士のリキッドバイオプシー解析から見た宇宙環境応答の多臓器連環
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>宇宙生命科学の国際コンソーシアム設立～筑波大学開発の解析技術を世界で活用～ https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20201126124330.html きぼう利用シンポジウム2021 https://iss-kibo.space/2020/profile.html#2-2-2 宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析 https://humans-in-space.jaxa.jp/kibouser/subject/life/70721.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 智 (Takahashi Satoru) (50271896)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------