

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21000

研究課題名（和文）宇宙飛行に伴う微小重力曝露が生体における筋・骨連関に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）The investigation for the effect of spaceflight on muscle-bone crosstalk in mice

研究代表者

大平 宇志（Ohira, Takashi）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40633532

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：国際宇宙ステーション内の微小重力または人工1-g環境で飼育したマウスの骨格筋のタンパク発現プロファイルを解析し、ヒラメ筋および腓腹筋は非荷重に伴い顕著に速筋化することを確認した。同筋では血液凝固や線溶系に関係するタンパク質の増加も確認し、これらのタンパク質が両筋の特性変化に関与する可能性も示唆された。線溶系は骨格筋の再生過程において重要な役割を担うことが既に知られているが、その骨格筋の廃用に伴う量および機能的特性の変化における役割は不明である。本課題について今後の研究で追究することは、これまでとは異なる視点からの運動器機能低下の分子メカニズム解明および予防策確立につながることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

月・火星有人探査の実現性が高まる中、宇宙飛行士の健康維持だけでなく業務遂行の安全性や確実性を高めるためにも、微小重力曝露に伴う運動器機能低下に対する予防策の確立は喫緊の課題である。本研究では、国際宇宙ステーション内の微小重力または人工1-g環境で飼育したマウスのヒラメ筋、長趾伸筋、腓腹筋のタンパク発現プロファイルを解析し、宇宙飛行中のマウスを人工1-g環境で飼育することは、骨格筋の萎縮だけでなく、速筋化に伴う代謝特性の変化を抑制するのにも有効であることを確認した。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the protein expression profile of skeletal muscles of mice raised under microgravity or artificial 1-g on the International Space Station. The altered protein expression profiles in response to gravitational unloading indicated that the shift of fiber phenotype toward fast-twitch type in soleus and gastrocnemius muscles was significantly induced. Simultaneously, the expression levels of proteins involved in blood coagulation and fibrinolysis increased in the gravitational-unloaded muscles. Fibrinolysis plays important roles in removing fibrin clots generated by the blood coagulation system as well as in facilitating skeletal muscle repair following injury. However, the roles of the fibrinolysis system in the gravitational-unloaded muscles are still unknown. This needs to be elucidated in the future to expand our understanding of the mechanism underlying the skeletal muscle responses to gravitational unloading.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：微小重力 マウス 骨格筋 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

地上における臥床や宇宙飛行などにより生体の抗重力活動が慢性的に抑制されると、特にヒラメ筋や長内転筋などの抗重力筋に顕著な萎縮が誘導されるとともに、遅筋型(タイプ I)ミオシン重鎖アイソフォームを発現する筋線維が減少し、速筋型(タイプ II)ミオシン重鎖アイソフォームまたは遅筋型と速筋型両方のミオシン重鎖アイソフォームを発現する筋線維が増加する筋線維タイプ変化も誘導されることが知られている(Fitts et al., J. Physiol., 2010; Narici and de Boer, Eur. J. Appl. Physiol., 2011)。筋線維タイプ変化は、酸化的リン酸化の低下や解糖系の亢進など、筋組織全体のエネルギー代謝様式の変化にも関係し、以上の結果生じる骨格筋の機能低下(筋力低下、持久力低下など)は、長期臥床患者や宇宙飛行士が再び重力環境での生活を開始する際に障害となる。地上の患者であれば整備された体制のもとでリハビリテーションを行い、日常生活を送る上でも健常者のサポートを受けながら運動機能を回復させることが可能である。しかし、月・火星探査ミッションに従事する宇宙飛行士は、リハビリテーション等の体制が皆無である現地において、自ら運動機能を回復させ、安全かつ確実に業務を遂行しなければならないため、より深刻な健康問題となり得る。したがって、月や火星に到着するまでの生体への非荷重状態が継続する間に運動機能低下を可能な限り予防することが重要である。

非荷重に伴う運動器機能低下は、メカニカルストレスや筋活動の低下に起因することから、現在、運動が有効な予防策とされている(Trappe et al., J. Appl. Physiol. (1985), 2009)。しかし、長期臥床患者や宇宙飛行士が実施可能な運動は限られており、その他の対策を講じる必要もある。これまでに解明された運動器機能低下の分子メカニズムの知見をもとに開発された薬剤を用いた対策はその一つであり、中でも Myostatin シグナル阻害剤については、運動器疾患やサルコペニア、骨粗鬆症などに対する予防・治療効果を検証する臨床研究が現在進行中である(Lee and Jun, Front Physiol, 2019)。しかし、いずれの薬剤も未だ実用化には至っていない。したがって、これまでとは異なる視点から運動器機能低下の分子メカニズムを追究し、創薬の新規標的因子の探索も平行して進める必要がある。

プロテオミクス解析の技術は、様々な環境変化に伴い細胞内または臓器内で生じる変化を包括的に調査する際に有用であり、重力負荷レベルの変化に対して骨格筋が適応する分子メカニズムを解明するためにも役に立つ。しかし、骨格筋に発現するタンパク質の広いダイナミックレンジは、質量分析装置を使用したプロテオミクス解析において網羅性を低下させる要因となる(Deshmukh, Proteomes, 2016)。そこで、骨格筋のプロテオミクス解析では、高速液体クロマトグラフ法やゲル電気泳動法によりタンパク質サンプルの複雑さを軽減する前処理を実施することが一般的である。ただし、この前処理において、タンパク質またはペプチドレベルでの分画数が増えるほど、各サンプルの処理手順が煩雑化し、解析のスループットは低下してしまう。そこで、我々はマウス骨格筋からのタンパク抽出法を工夫することに、質量分析装置を使用したプロテオミクス解析のスループットは維持しながら、同定されるタンパク質の網羅性を高める解析方法を確立した(Ohira et al., J Proteomics, 2020)。本研究では、この解析方法を用いて宇宙飛行中の微小重力環境曝露がマウスのヒラメ筋、腓腹筋、長趾伸筋のタンパク発現プロファイルに及ぼす影響を検討した。

2. 研究の目的

宇宙飛行に伴う環境変化は微小重力環境曝露に限らず、生体は宇宙放射線曝露や高濃度の二酸化炭素曝露、大気圏への再突入と地球への着陸に伴う重力再負荷などの複合的な影響を受ける。近年、宇宙航空研究開発機構はマウスの遠心飼育装置を開発し、国際宇宙ステーション内でマウスを微小重力環境または人工 1-g 環境下で飼育することを可能にした(Shiba et al., Sci. Rep., 2017)。両者への宇宙飛行に伴う微小重力環境曝露以外の影響はほぼ同等であると考えられるため、両者を比較することにより微小重力環境曝露の影響を明確に評価することができる。したがって、本研究では、国際宇宙ステーション内の微小重力環境または人工 1-g 環境で 30 日間飼育したマウスから抽出したヒラメ筋、腓腹筋、長趾伸筋のタンパク発現プロファイルを比較し、重力負荷抑制に伴い骨格筋の量および機能的特性が変化するメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスより抽出した骨格筋(ヒラメ筋、腓腹筋、長趾伸筋)を、まず 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer (タンパク分解酵素阻害剤含)中で破碎し、遠心分離後の上清(SUP-1)を回収した。続いて、上記遠心分離後の沈殿物を 8 M urea, 50 mM NH₄HCO₃, 4% sodium deoxycholate buffer (タンパク分解酵素阻害剤含)中で再破碎し、遠心分離後の上清(SUP-2)を回収した。その後、SUP-1 および SUP-2 各々のタンパク質発現パターンを液体クロマトグラフ質量分析装置(Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて分析した。

各々の骨格筋において、宇宙飛行中の微小重力環境曝露に伴って変化したタンパク質発現プロファイルの生物学的な意味づけは、DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) またはパスウェイ解析ソフトウェア (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 微小重力環境曝露がマウスのヒラメ筋と長趾伸筋のタンパク発現プロファイルに及ぼす影響とフラクトオリゴ糖 (FOS) 摂取によるその抑制効果に関する検討

宇宙飛行に伴うマウスのヒラメ筋、腓腹筋、長趾伸筋の湿重量の減少は、マウスを人工 1-g 環境で飼育することにより顕著に軽減されることを確認した。その後、国際宇宙ステーション内の微小重力または人工 1-g 環境で 30 日間飼育したマウスのヒラメ筋および長趾伸筋から抽出したタンパク質サンプルについて、液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて発現プロファイルを解析し、微小重力環境飼育が及ぼす影響を評価した。また、各々の飼育環境で飼育したマウスの半数には FOS を含む餌を摂取させていたため、微小重力環境飼育に起因する両骨格筋のタンパク発現プロファイルの変化が FOS 摂取により抑制される可能性についても検討した。結果、1253 種のタンパク質の発現量について解析することができ、特にヒラメ筋 (遅筋) において、微小重力環境飼育に伴う速筋化に起因するタンパク発現プロファイルの変化が確認された。また、同筋では、血液凝固や線溶系にかかわるタンパク質の発現変動も確認され、これらが微小重力下における抗重力筋の特性変化にも関与する可能性も示唆された。さらに、FOS 摂取はヒラメ筋の速筋化に起因するタンパク発現プロファイルの変化を軽微に抑制した。近年、腸内細菌による難消化性炭水化物の発酵により産生される短鎖脂肪酸 (酢酸、酪酸およびプロピオン酸) は、循環血を介して骨格筋に作用し、その量および酸化的代謝能力の維持に寄与することが報告され、加齢に伴う骨格筋量の減少や筋機能の低下の予防や治療に有用な物質として関心を集めている (Frampton et al., *Nat. Metab.*, 2020)。また、難消化性の炭水化物の一種である FOS を 5% 含む餌を摂取することにより、げっ歯類の盲腸の短鎖脂肪酸含有量が有意に増加することが確認されている (Carvalho et al., *Biomed. Pharmacother.*, 2021)。以上の先行研究結果とも合わせ、FOS 摂取による微小重力環境飼育マウスのヒラメ筋の速筋化抑制効果は、FOS による直接的な作用というよりは、腸内に到達した FOS をもとに腸内細菌によって産生され血中で増加した短鎖脂肪酸による間接的な作用によってもたらされた可能性が高いと考えられる。しかし、本研究では、FOS 摂取の宇宙飛行士に対する実用化を検討するに値する十分な効果は確認されなかった。

(2) 微小重力環境曝露に伴う骨量減少に関与する新規マイオカインの探索

近年、骨格筋は内分泌器官としても注目を集め、骨格筋から分泌される液性因子 (マイオカイン) が骨代謝の制御にも関与する (筋・骨連関) ことが明らかにされている (Kawao and Kaji, *J Cell Biochem*, 2015)。したがって、微小重力環境で飼育したマウスのヒラメ筋において顕著に発現量が増加し、液性因子としても報告されているタンパク質が、微小重力下で劇的に進行する骨量減少にも関わる可能性を *in vitro* の実験系を用いて検討した。具体的には、Pvalb について、骨吸収促進または骨形成抑制に関わる可能性を検討した。Pvalb は骨格筋の中でも速筋に多く発現することが知られており、微小重力環境で飼育したマウスのヒラメ筋においては速筋化に伴って発現が誘導されたものと考えられる。まず、マウスの大腿骨より単離した骨髄細胞をリコンビナントタンパク添加群と非添加群に分け培養し、RANKL 刺激に応答して形成された破骨細胞数を比較することにより Pvalb が骨吸収促進に関わる可能性を検証した。次に、新生マウスの頭蓋骨より単離した骨芽細胞を同群に分け培養し、骨芽細胞分化関連遺伝子発現および ALP 活性を比較することにより Pvalb が骨形成抑制に関わる可能性を検証した。しかし、いずれの実験においてもリコンビナントタンパク添加による顕著な影響は確認されなかった。したがって、Pvalb は非荷重環境において産生が高まるマイオカインである可能性はあるが、破骨細胞や骨芽細胞に直接作用し、骨代謝を制御する因子である可能性は低いと考える。

(3) 宇宙飛行中の微小重力環境曝露がマウスの腓腹筋のタンパク発現プロファイルに及ぼす影響と人工 1-g 環境飼育によるその抑制効果に関する検討

国際宇宙ステーション内の微小重力または人工 1-g 環境、地上の 1-g 環境で 30 日間飼育したマウスの腓腹筋から抽出したタンパク質サンプルについて、ヒラメ筋と長趾伸筋と同様にプロテオミクス解析を行い、宇宙飛行または微小重力曝露によるタンパク発現プロファイルの変化を分析した。質量分析装置で同定された 892 種のタンパクのうち、地上の 1-g 環境飼育群に比べて微小重力環境飼育群において有意に発現量が変化したタンパク質について Ingenuity Pathway Analysis を行った結果、特に速筋化に起因すると推定される好氣的代謝能の有意な低下が示唆された。この代謝能の変化は、人工 1-g 環境飼育マウスでは抑制された。また、地上の 1-g 環境飼育群に比べて人工 1-g 環境飼育群において有意に発現量が変化したタンパク質についての Ingenuity Pathway Analysis の結果からは、ミトコンドリア機能を正に調節する Estrogen Receptor Signaling の活性化が示唆された。しかし、骨格筋の遅筋化を示唆するタンパク発現

プロファイルの変化は確認されなかった。以上の結果から、宇宙飛行中のマウスを人工 1-g 環境で飼育することは、骨格筋の萎縮だけでなく、速筋化に伴う代謝特性の変化を抑制するのにも有効であると言え、そのメカニズムにはミトコンドリアの機能亢進が関わる可能性がある。

さらに、微小重力環境飼育マウスの腓腹筋では、ヒラメ筋と同様に血液凝固や線溶系に関係するタンパク質が増加していた。したがって、これらのタンパク質は両筋の非荷重に伴う特性変化にも関与する可能性が示唆された。特に線溶系については、骨格筋の損傷からの再生過程において重要な役割を担うことが既に知られているものの、骨格筋の廃用に伴う量および機能的特性の変化における役割はこれまでに検討されていない。本課題について今後の研究で追究することは、これまでとは異なる視点からの運動器機能低下の分子メカニズム解明および予防策確立につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohira Takashi, Kawano Fuminori, Goto Katsumasa, Kaji Hiroshi, Ohira Yoshinobu	4. 巻 136
2. 論文標題 Responses of neuromuscular properties to unloading and potential countermeasures during space exploration missions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience & Biobehavioral Reviews	6. 最初と最後の頁 104617 ~ 104617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neubiorev.2022.104617	査読の有無 有
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 Ohira Takashi, Kawao Naoyuki, Takafuji Yoshimasa, Mizukami Yuya, Kaji Hiroshi	4. 巻 131
2. 論文標題 Effects of Growth Hormone on Muscle and Bone in Female Mice: Role of Follistatin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes	6. 最初と最後の頁 228 ~ 235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-2003-5704	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naoyuki Kawao, Takashi Ohira, Yuya Mizukami, Yoshimasa Takafuji, Hiroshi Kaji
2. 発表標題 Effects of growth hormone on skeletal muscle and bone in mice
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大平宇志、河尾直之、水上優哉、高藤義正、梶 博史
2. 発表標題 成長ホルモンが骨格筋と骨におよぼす影響におけるマイオカインの役割
3. 学会等名 第114回近畿生理学談話会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------