

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506031

研究課題名(和文)内耳前庭有毛細胞における新規重力センサー繊毛分子の同定

研究課題名(英文)Analysis of mouse behavior under different gravity conditions

研究代表者

芝 大(Shiba, Dai)

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・主任研究開発員

研究者番号：50360722

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)：動物は加速変化を感知する機能を内耳に有しているが、どの程度の変化をどのような仕組みで感知するかについて、分子レベルでは明らかになっていない。また、変化を感知するシステムを有している一方で、変化が恒常的な状態となった場合は、新たな環境に適応(対応)することができる。つまり、感知するシステムは鋭敏でかつ柔軟なものである。

本研究では、加速変化環境下での活動を解析するために、個別飼育可能なカメラ付きケージを遠心機に設置しマウスを飼育した。さらに、その活動を動画から解析する「ピクセル解析系」を構築し、どの時点のマウスが最も重力影響を受けているのかを評価した。

研究成果の概要(英文)：Animals have a function to sense acceleration changes in the inner ear, but it is not clear at the molecular level about how much changes can be detected and how to sense the subtle changes. In addition, while animals have a system to sense changes, they can adapt to a new environment if the change is in a permanent state. In other words, the sensing system is sensitive and flexible.

In this study, in order to analyze the activity under the hyper gravity environment, the cage with video camera, which can be housed individually, was placed in a centrifuge and the mice were reared for 2 weeks. In addition, we developed a "pixel analysis system" that analyzes the activity from mouse behavior, and evaluated the time when the mice were mostly affected by hyper gravity.

研究分野：重力生物学

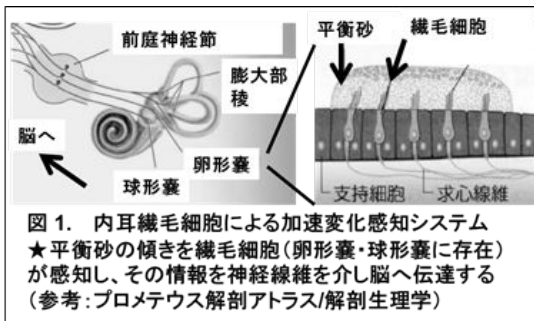
キーワード：重力 前庭機能 平衡機能 行動解析 センサー

1. 研究開始当初の背景

平衡感覚が内耳前庭の平衡斑・膨大部に存在する繊毛細胞に担われていることは広く知られているが、繊毛内の分子シグナルの詳細は明らかでない。一次繊毛は細胞表面から突き出した細胞内小器官であり、外界の情報を感受する細胞センサーであると想定されている。最もよく解析されている腎尿細管上皮細胞の一次繊毛には、Ca²⁺ チャンネル (Pkd1/2 チャンネル, Nauli SM Nature Genetics, 2003) が局在し、効率的に尿流れ刺激を感知する。

内耳においても、腎尿細管の尿流れと同様に、繊毛細胞が平衡砂の動きを感知し活性化した繊毛細胞は、そのシグナルを神経刺激として脳に伝える (図1)。しかしながら、繊毛が平衡砂の動きをどのように感知し、細胞内に情報を伝えているかの分子機構は明らかでない。ここ数年のプロテオミクス解析の進展により、繊毛蛋白の網羅解析が行われており、1000 種以上の蛋白質が繊毛に局在することが明らかになってきた。

プロテオミクス/エピゲノム解析の技術は年々向上しており、広く活用されてきているが、基本は比較解析であり、どのようなサンプルを解析に用いるかが重要である。



2. 研究の目的

本研究では、加速変化環境下での活動を解析するために、個別飼育可能なカメラ付きケージを遠心機に設置しマウスを飼育した。さらに、その活動を動画から解析する「ピクセル解析系」を構築し、どの時点のマウスが最も重力影響を受けているのかを評価することを目的とした。得られた結果からどの時点のマウスを解析のサンプルに用いるか設定する。

3. 研究の方法

マウスを遠心飼育 (2週間-最大4週間) し、その時の飼育動画データ (avi) を保管する。

マウスの活動をピクセル変化として検出するために、取得した動画データを行動解析ソフト (EthoVision) により処理するとともに、ヒストグラム解析 (統計処理言語 R) により定量化することができるような解析法

を設定する。

4. 研究成果

4.1 解析方法の構築

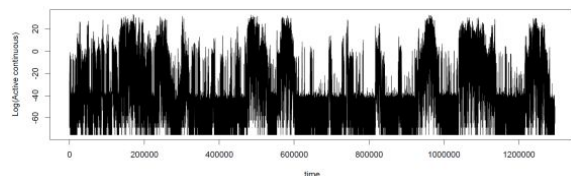
マウスを遠心過重力下 (1.4G) で飼育すると、遠心開始直後はそのG変化に応じ、動かなくなる (伏せる行動を示す)。組織・分子レベルで平衡機能 (前庭機能) を詳細に調べるためには、この個体応答 (活動) を定量化し、組織サンプリングの結果と総合的に解析する必要がある。

個別飼育可能なカメラ付きケージを遠心飼育装置に設置しマウスを飼育し、その活動を動画データとして記録した (図2)。飼育するマウスは一般的に使用されている雄性 C57BL/6J とし、飼育開始週齢を8週齢前後とした。

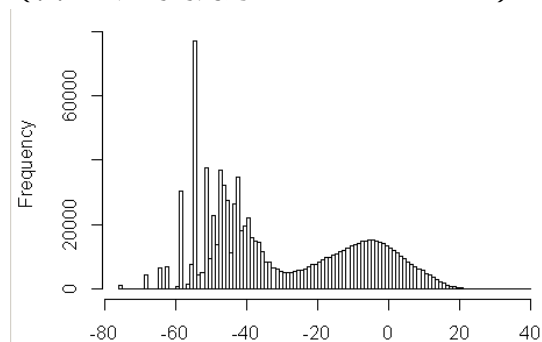


(図2. 飼育動画データ)

これらの動画を利用し、行動量を計算する「ピクセル解析系」を構築した。経時時刻対アクティビティデータから log 変換した経時時刻対アクティビティデータ (図3) を作成した後、ヒストグラム化した。このヒストグラム化されたデータより、左右の2つの山 (活動期・不活動期) に分け、その山間の極小値算出することから活動期・不活動期それぞれの時間を導き出した (図4)。



(図3. 経時時刻対アクティビティデータ)



(図 4 . 活動期・不活動期の分割計算。Log0.9(Active continuous データ) のヒストグラム 横軸 log0.9(Active continuous データ値) 縦軸 Active continuous の頻度)

なお、算出した行動量ヒストグラムの左右の 2 つの山 (活動期・不活動期) において実際のマウス活動を標本的に抽出し確認したところ、確認したすべての点において活動期・不活動期の判断は問題なかった (図 5)



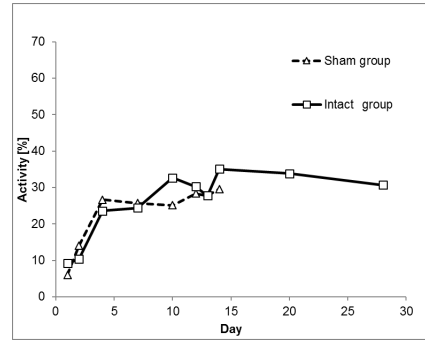
(図 5 不活動期 (上) 活動期 (下) の例)

マウスの活動は明期・暗期で大きく異なることが知られているが、これまでは、S/N 比の高い明期においてのみこのようなピクセル解析が可能であった。活動量の絶対量で行動量を判定するのではなく、行動量ヒストグラムの左右の 2 つの山から活動量を算出するため、どちらの光量においても解析可能なパラメーターの設定に成功した点が重要である。

4.2 サンプル回収時期の設定

定量化解析法を用い、遠心飼育時の活動量を評価した。遠心過重力直後 1 日の活動量は激減し、その後緩やかに回復しおおよそ 14 日目に飼育前と同じレベルまで回復することが分かった (図 5)。加速変化を感知するシステムはこの期間内で大きく機能変換を行っていることが示唆された。

これらの結果をもとに、遠心飼育時のどの時期の加速変化感知システムの状態を組織評価するのか判断するとともに、織毛センサーの関与解析の材料として活用する。



(図 5 . 遠心飼育時の活動量解析データ)

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. Morita H, Yamaguchi A, Shiba D, Shirakawa M, Takahashi S. Impact of a simulated gravity load for atmospheric reentry, 10 g for 2 min, on conscious mice. J Physiol Sci. 2017, in press.

2. Morita H, Obata K, Abe C, Shiba D, Shirakawa M, Kudo T, Takahashi S. Feasibility of a Short-Arm Centrifuge for Mouse Hypergravity Experiments. PLoS One. 10, e0133981, 2015.

[学会発表] (計 1 件)

Dai Shiba. Analysis of mouse behavior under different gravity conditions. International Society for ADAPTIVE MEDICINE (ISAM 2015), Yonago Convention Center.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝 大 (SHIBA, dai)

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・主任研究開発員
研究者番号 : 50360722

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者

森田啓之 (MORITA, hironobu)

岐阜大学医学研究科・教授

研究者番号：80145044

杉山紀之 (SUGIYAMA, noriyuki)

大阪医科大学医学部・講師

研究者番号：90381954

(4)研究協力者

下村道彦 (SHIMOMURA, michihiko)

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・主任研究開発員