

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640052

研究課題名(和文) 低重力環境で起こりうる次世代の形態・機能変化とその分子基盤

研究課題名(英文) The effect of low gravity on morphologies and functions of offsprings

研究代表者

本道 栄一 (Eiichi, Hondo)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：30271745

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)：低重力環境下(0.58g)で認められたアルツハイマー関連遺伝子近傍のエピゲノム変化は、脳でのエピゲノム変化とは一致しなかった。今回、現実的に火星程度の低重力環境下で脳のエピゲノム変化を検出したことは宇宙生物学的に意義のあることである。本研究は、生殖細胞のエピゲノムの遺伝メカニズム解析も含むため、より解析のしやすい、つまり生殖細胞のエピゲノムと体細胞のmRNA発現が相関するモデルの開発を行った。糖尿病マウスの生殖細胞および膵島のエピゲノムは、インスリン関連遺伝子群で相関し、血中を流れているエクソソームRNAとも関連性を持っている。従って、1型糖尿病マウスの雄由来胚盤胞よりES細胞の樹立を試みた。

研究成果の概要(英文)：Epigenome of spermatogenic cells around Alzheimer related genes in mice, changed under the low gravity environment, was not consistent with that of the brain. However, it was quite intriguing that epigenome of the brain was changed under low gravity, almost the same gravity in Mars. This study also aimed to investigate how epigenomic changes by low gravity in spermatogenic cells inherit to the offsprings. Therefore, we developed the study model, in which the epigenome of germ cells correlate with mRNA expression in somatic cells. The epigenome of germ cells and pancreatic islet cells correlate in insulin related genes, and with exosomal RNAs circulating in the blood. Here, establishment of embryonic stem cells from the blastocysts derived from type II diabetic males.

研究分野：形態学

キーワード：低重力 エピゲノム 遺伝 獲得形質

1. 研究開始当初の背景

人類が地球外で生活することを目的とした宇宙科学技術開発が進む一方、重力が減じられた空間で、我々は果たして世代を越えて健康な生活を送ることが出来るのだろうか？この疑問に答えるべく、平成24年度～平成25年度の2年間、挑戦的萌芽研究「低重力環境は次世代のゲノムと形態を変化させるか？」(課題番号 24650232)を展開してきた。この科学的背景は、Transgenerational epigenetic inheritance である。つまり、ゲノムの配列によらず、親世代で変化した形質が次世代へと引き継がれる現象であり、その仕組みを解決することである。それには、3つの段階を踏まなければならない。1. 重力変化の影響を受けた体細胞がどのように生殖細胞へ情報を送るのか。2. 重力変化の情報を送るメッセンジャーは何なのか。3. 生殖細胞に乗った情報は、受精後、胚発生の間で起こるゲノムリセットの間に、どのようにしてリセットをかいくぐって次世代へ送られるのか、そしてそれが定着するのか。本研究ですべてを扱うことはできないこと、以下に述べるが、脳と精巣でのエピゲノム相関性が見られなかったため、2について最終的に研究をすすめることとした。

実際の低重力環境で実験を行うには、大気圏外へと出る以外に方法はない。そこで、代わりとなる擬似的低重力試験環境が開発されてきた。我々は、より低重力環境に近いモデルを開発した。超電導磁石を用いる方法である。磁石内部では、どの位置でも磁力は等しいが、位置によって磁場勾配が異なる。磁場勾配の大きい場所では、水分子は重力と逆向きの揚力を受け、磁場勾配がゼロのところでは磁力は同じでも揚力は1gを重力と反対方向に受ける。これを利用し、マウスを飼育する位置を調節することで磁力に対する対照をとりながら、低重力暴露試験を実現するのである。このシステムを用いると、体内のすべての水分子が揚力を受けることになる。体の外表面だけでなく、脳、心臓、肝臓、腎臓など内部臓器の細胞のすべての水分子が同様に揚力を受ける。つまり、細胞が感知できないと思われる方法で揚力を与えるのである。今回使用する磁石の能力では、マウス全体の水分量を考えても、細胞の受ける重力は理論上0.58gを実現できる。

2. 研究の目的

低重力環境下で受けた親世代のエピゲノムの変化は次世代のエピゲノムへ引き継がれるのか、またその分子基盤はどのようなになっているのかを、上述の超電導磁石を用いて実験的に調査するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究の申請時点で、超電導磁石による低重力環境群と対照群の間での精巣エピゲノムの比較を行っていた。結果、ゲノム全体で、40箇所のエピゲノムが変化していることを見出した。そのうちの38か所は、遺伝子内部もしくは近傍(第1エクソンと最後エクソンから1kb以内)に存在した。これらのうちにはアルツハイマー関連遺伝子群を含んでいた。

従って、本研究ではまず、精巣と脳における低重力環境下でのエピゲノムと遺伝子発現の相関性を明らかにするため、マウス脳を用いて、低重力環境下および対照群におけるマイクロアレイ解析を行った。結果、マイクロアレイの結果、低重力環境下ではmRNA発現プロファイルが著しく変化した。低重力群で最も増加した遺伝子は対照群と比較して4.65倍、減少したものは対照群の方が6.23倍増加していた。低重力群で4倍以上増加した遺伝子群は以下の通りである。

olfactory receptor 492

predicted gene 5796

nuclear encoded rRNA 5S 48

predicted gene 4567

heat shock protein 1

nuclear encoded rRNA 5S 176

predicted gene 10663

microRNA 3475

small nucleolar RNA H/ACA box 16A

本マイクロRNAの結果を先の40個の遺伝子と比較したところ、上記遺伝子リストと重複するものはなかった。一方マイクロアレイの結果、低重力環境下での増加率が1.61倍のもののみが、40個の遺伝子の中に見つかった。変化は認められたものの、1.61倍という数字は、必ずしも大きいものではなく、相関性の高さを論じるには弱い結果だった。すなわち、精巣のエピゲノムと脳のmRNAの相関性は、0.58g低重力環境下と1.00g環境下では低く、遺伝子発現調節機構が複雑である可能性が示唆された。本実験により、脳の遺伝子発現と精巣のエピゲノムの相関性は低かったが、低重力環境下にマウスを置くとその脳の遺伝子発現が変化することが明らかになったのは宇宙生物学的に意義が大きい。

一方、上記相関性が低いことは、獲得形質の遺伝について分子生物学的に難しいことを示している。そこで、この部分に関しては(すなわち Transgenerational epigenetic inheritance の部分)、既知の報告および我々

の理論から、II型糖尿病モデルマウスを使用して獲得形質の遺伝モデルの作製を試みた。過去の報告では、実験的II型糖尿病では、膵島エピゲノムの変化と精子エピゲノムの変化は相関している。そこで、まず膵島と精子の間を結んでいるメッセンジャーがなんなのかを考えた。その一つを **exosome RNA** であると推測し、II型糖尿病マウスと正常マウスの血中 **exosome RNA** 種の解析を行った。II型糖尿病モデルマウスの作成にあつては、粉末の高脂肪の餌（エネルギー比 33 %脂肪）を3週間与え、4時間の絶食後、ストレプトゾトシン (STZ) を100 mg/kg体重の投与量で、1回腹腔内投与した。STZ投与後4週間同じ食事を続け、空腹時血糖値を毎週測定し、血糖値 400 mg/dl 以上の個体を2型糖尿病マウスとした。

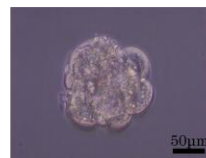
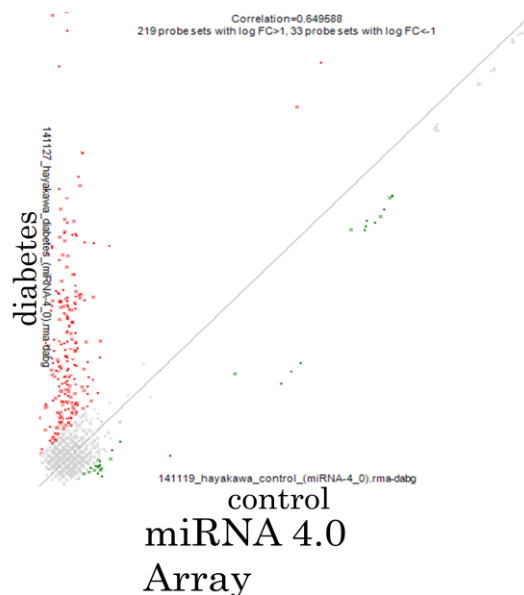
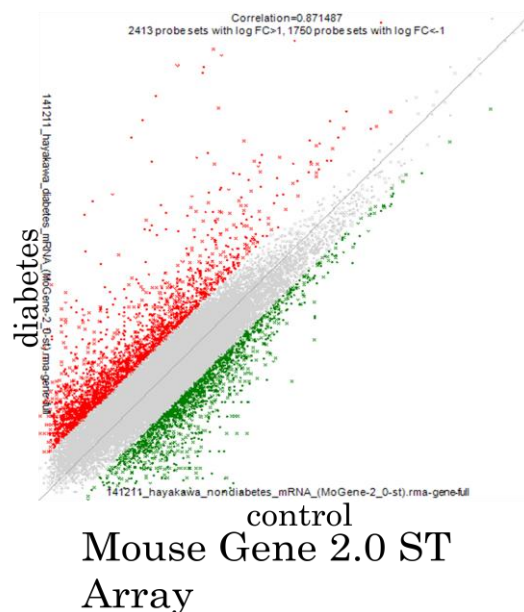
RNA解析は、mRNAおよびmiRNAを対象としてマイクロアレイ解析を行った。また、精子のエピゲノムが次世代に対しどのような分子基盤で遺伝するのかを調べるため、II型糖尿病雄マウスと正常雌マウスを交配させ、胚盤胞まで分化した胚よりES細胞の樹立を試みた。これにより、親世代の膵島→親世代の精子→子のES細胞までのエピゲノム遺伝メカニズムを解析することが可能となる。

4. 研究成果

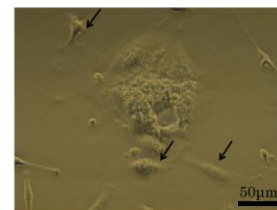
方法の文中で、経時的に得られた研究成果については順次述べた。ここでは今後の展望を含めてエクソソームRNAに関する成果を述べる。

血中 Exosome RNA のプロファイルは次ページの図に示した。上図は mRNA プロファイル、下図は miRNA プロファイルを示している。それぞれの DNA 配列および対応する DNA 配列 ID は明らかにしてある。diabetes=control のラインより上が、II型糖尿病の血中で上昇している mRNA 種および miRNA 種を示している。膵島および精子でエピゲノムが変化しているインスリン関連遺伝子もしくはそれと相関性のある miRNA 種はともにラインの上に位置しており、このことは、膵島 - 精子を結ぶメッセンジャーが血中 exosome RNA である可能性を示している。また、実際には次の研究で、正常マウスに対して、exosome で包埋した同 RNA 種を静脈内注射し、精子のエピゲノムが変化するかどうかを確認する実験を行うべきであろう。このことは、次に行う予定である。

次に、II型糖尿病マウス由来 ES 細胞の樹立を試みた (左の写真)。ES 細胞マーカーでの染色は行わなかったが、ES 細胞様細胞の作製には成功した。今後は、ES 細胞マーカーでの ES 細胞の同定を行ったのち、生殖細胞へと分化させ、その過程でのエピゲノムの変化を解析する予定である。

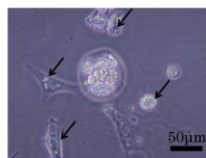


・フィーダー細胞上にない細胞塊



・200 µmほどのES細胞様細胞塊

矢印：フィーダー細胞



・透明帯から脱出できなかった胚盤胞

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 3 件)

1. Kobayashi R, Terakawa J, Kato Y, Azimi S, Inoue N, Ohmori Y, Hondo E. The contribution of leukemia inhibitory factor (LIF) for embryo implantation differs among strains of mice. *Immunobiology* 2014; 219(7), 512-521. 査読あり

2. Rosario GX, Hondo E, Jeong JW, Mutalif R, Ye X, Yee LX, Stewart CL. The LIF-mediated molecular signature regulating murine embryo implantation. *Biol Reprod* 2014; 91(3). 1-18
査読あり

3. Ishikawa A, Sugiyama M, Hondo E, Kinoshita K, Yamagishi Y. Development of a novel pink-eyed dilution mouse model showing progressive darkening of the eyes and coat hair with aging. *Exp Anim* 2015; 64(2), 207-220. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1. Hondo E. Where are we gonna go? The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015. Special lecture.

2. Hondo E. Southeast Asian fruits bats as the carrier of microbes. International symposium of research center for thermotolerant microbial resources (RCTMR) memorial for moving from faculty center to University Center "New Era for Microbiology Facing to Global Climate Change", Yamaguchi University, Japan, March 9, 2015 (Invited speaker)

3. Hondo E. Long distance flight of flying foxes in ASIA. The Thailand Research Expo 2015, "Innovative Researches on Microbial Resources and Ecosystem in Tropical Areas" Centara Grand and Bangkok Convention Centre, Central World, Bangkok, Thailand.

4. Yupadee Hengjan, Eiichi Hondo, Yasushige Ohmori, Thongchai Ngamprasertwong. Behavior analysis on the flying fox, *Pteropus lylei*, in Wat Pho Bangkok, Thailand. The 5th Congress of Asian Association of Veterinary

Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015.

5. Terutaka Nakagawa, Eiichi Hondo, Makoto Sugiyama, Shoei Sugita, Yasushige Ohmori. Distribution of the receptors for avian and human influenza virus in the respiratory tract and intestinal canal of wild animals. The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015.

6. Kousuke Najima, Eiichi Hondo, Yasushige Ohmori. Viscerotopic representation in the dorsal motor nucleus of vagus nerve of the chicken. The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015.

7. Satomi Saito, Eiichi Hondo, Yasushige Ohmori. M-like cells in the intestinal villi of chickens. The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015.

8. Ayako Yamamoto, Eiichi Hondo, Yasushige Ohmori. Efferent and Afferent vagal innervation of the esophagus and stomach in musk shrew (*Suncus murinus*). The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015.

9. Moyuha Hayakawa, Ryosuke Kobayashi, Yasushige Ohmori, Eiichi Hondo. The role of exosomal RNAs in transgenerational epigenetic inheritance. The 5th Congress of Asian Association of Veterinary Anatomist, Discovery Kartika Plaza Hotel, Bali, Indonesia, February 12-13, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本道栄一 (HONDO, Eiichi)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：30271745

(2) 研究分担者

廣田憲之 (HIROTA, Noriyuki)
物質材料研究機構・強磁場研究センター・主任研究員
研究者番号：10302770

大松 勉 (OMATSU, Tsutomu)
東京農工大学・農学部・講師
研究者番号：60455392

(3) 研究協力者

小林良祐 (KOBAYASHI, Ryosuke)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士 2
年

HENGJAN, Yupadee
名古屋大学・大学院生命農学研究科・博士 1
年