

【総論 想定外との遭遇】

Close encounters of the fourth kind

瀬原 淳子

Atsuko Sehara-Fujisawa

Key words

宇宙生命科学, 重力, 筋萎縮

要約

月にはウサギが住んでいる——遠い昔から、地上に住む私たちは広い宇宙に想いを馳せてきた。いつの間にか人類は火星にまで到達しようとしており、「未知との遭遇（原題“Close Encounters of the Third Kind”, 1977, Steven Spielberg）」を夢見ている。そんな中、本特集では、地球に住む生命体が宇宙に飛び立つ時に遭遇する生体反応に関する、様々な角度からの研究を紹介する。それは地上の生命を理解する上で新たな鍵をもたらす可能性を秘めるものであろう。

1. 生命にとって無重力に 晒されることは 想定外の事態である

地球上に棲む私たちが宇宙に魅せられるのは、未知なる世界の探求とともに、広い宇宙から地球を俯瞰してみたい、という憧れがあるからであろう。「宇宙滞在によって、何故骨格筋が細くなるのか研究している」と話すと、たいていの人は「えーっ、宇宙!？」と身を乗り出して聞いてくださる。ただ、生命科学の研究者の友人たちからは「無重力だと力が要らないから筋肉が痩せる、そういう研究だよ」と、何だかつまらなそうな返事をもらうことも多い。そんな時、私は心の中でニヤリとしてしまう。壊したいのは、この「常識」だ、と。

地球の生命はその誕生以来重力に晒されてきたわけで、無重力環境に置かれることは想定外の事態である。この想定外の事態に遭遇したとき、生命はどのように反応し、危機を回避し、あるいは破綻するのだろうか。そしてそれらの生体反応には、地上で発揮されるどのような生理作用あるいはどのような生体の脆弱性が表出されるのであろうか？

2. 宇宙飛行士と動物たちの挑戦

宇宙から生命は無事に生還できるのか、人類はこのことを知るためにこれまでに幾多の実験を行ってきた。1947年、米国は生命への宇宙放射線の影響などを知るためハエを高高度に打ち上げ、生還させた。1949年初めて弾道飛行させたアカゲザルは残念ながら事故で死んでしまったが、翌年にはハツカネズミをV2ロケットに搭載し、高高度(137km)からの帰還を成功させた。一方、ソ連(現ロシア)は、1951年に初めて犬を大気圏外に送り出して以来、数多くの犬を用いた実験を繰り返し、1960年8月19日、2匹の犬をスプートニク5号に乗船させ、初めて1日地球軌道を周回させたのち帰還させることに成功した。そしてついに1961年4月12日、ボストーク3KA2に乗船したガガーリンが大気圏外・地球周回軌道を2時間足らずで回ったのち生還することに成功した。このような大がかりではあるが地道に積み重ねた実験、宇宙飛行士の勇敢な任務遂行によって、

京都大学大学院医学研究科 再生増殖制御学

Department of Growth Regulation, Institute for Frontier Medical Sciences, Graduate School of Medicine Kyoto University
〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町53 TEL: 075-751-3826

大気圏外の無重力空間でも動物は生きることができ、心臓はその拍動を続け、脳などの臓器が壊れてしまうわけではない、と言うことが証明されたのである。人類の挑戦はとどまるところを知らず、今や「気軽な宇宙旅行」や「火星への人類の到達」が現実的な目標として掲げられている。

一方、宇宙滞在が少しずつ長期化することにより、宇宙飛行士の体には問題が生じていることもわかり、その中で骨量や骨格筋量の減少と機能低下はとりわけ顕著な問題として浮上した。今日、骨格筋や骨の萎縮を防ぐために宇宙飛行士は毎日2時間の運動を欠かさないが、それでも宇宙から帰還するとすぐには歩くことができない。医師でもある古川聡宇宙飛行士が、半年近くの宇宙ステーション滞在から帰還された際、「地球帰還当日、気分は最高だが身体はまるで軟体動物のよう。身体の重心がどこだか全く分からず、立ってられない、歩けない。平衡感覚がわからず、下を見ると頭がくらくらして気分が悪くなる。歩くつもりで足を出す、太腿が思っているほど上がっておらずつまずく・・・物の重さが、宇宙へ行く前の感覚の2倍くらいに感じる（紙、鉛筆、手帳、携帯電話など）。（2011-11-26）」と書かれているように、重力変化がもたらす姿勢維持・運動能力の低下は、宇宙滞在の大きな問題である。

3. 本特集では・・・

「使われないから萎縮する」との常識に反して、宇宙でのこれらの臓器の変化と廃用性萎縮との関連性については、実はまだきちんと解明されていない。宇宙線に晒される大気圏外・無重力環境で、私たちの体の中で何がおこるのか、実は研究は未だに手探り状態である。その大きなポテンシャルに比して、実験の機会や規模が限られることが、宇宙生命科学

の妨げとなってきたのだ。しかし、トランスクリプトームやプロテオームの技術発達によって、実験の機会が限られる宇宙生命科学でもようやく骨格筋などの臓器・組織・細胞の中でどのような遺伝子・タンパク質の変化が起こるのかを網羅的に調べ、その神経系制御などにも着目した研究が行われるようになってきた（本特集の東谷の項）。また、代謝器官である骨格筋の、宇宙滞在によるメタボリックコントロールの変化に着目した研究も行われている（二川の項）。さらに、培養細胞や線虫・ゼブラフィッシュなどの小動物を用いた宇宙実験から、マウスなどの哺乳類を用いた宇宙実験も本格的に始まり、様々な臓器、免疫系への影響などを調べることができるようになった（高橋の項、秋山の項）。宇宙における臓器萎縮や機能低下には重力感知や平衡感覚に関わる前庭器官・神経系の変化が深く関与していることもわかってきた（森田の項）。そもそも、臓器や組織、細胞が重力に抗して形状を保つのはいかなるメカニズムによるのか。本特集では、それらの問題についても近年注目されている Hippo-Yap シグナルを中心に議論する（古谷—清木の項）。

これらの研究に示されるように、宇宙滞在により引き起こされる興味深い生体反応が解明されつつあり、宇宙生命科学研究は新たな段階を迎えている。無重力という極限状態に対する生体のリスポンスとそのメカニズムを知ることによって、我々は生命の新たな力とその限界を知ることができるに違いない。骨や骨格筋の無重力応答についても、廃用性萎縮との共通性や独自性、神経系や血管系との相互作用などを探ることによって、宇宙科学として貢献するだけでなく、地球上における臓器の発達や維持、老化などについての新たな知見や解決の手がかりを得たい。読者の皆様に、筆者の方々と私の、そのような思いが伝わることを願う。

☆ ☆ ☆

【宇宙フライト線虫にみられた運動器への影響】

Effect of microgravity on locomotor system in *C. elegans*

東谷 篤志

Atsushi Higashitani

Key words

BMP/TGF- β , Dopamine,
Microgravity, Muscle, Spaceflight

要約

モデル生物の1つ線虫 *C. elegans* を宇宙の微小重力（以下 μG ）環境で、幼虫から成虫になるまで成育させた実験の網羅的な遺伝子発現の解析から、BMP/TGF- β の低下とドーパミンの低下を強く示唆する結果を得た。そのことは、 μG 環境で自重が失われ力学的刺激や触覚刺激が低減し、骨や筋、関節のみならず神経を含めた運動器全体としての機能低下のリスクが生じること、逆に、地上 1G 下では、全ての生命は重力に伴う力学的刺激を受け、それに抗する適応応答と可塑性が運動器の恒常性と維持に重要といえる。

はじめに

地球上に生命体が誕生して以来、全ての生物は 1G の重力が等しくあるなかで形態形成し生活してきた。生物に及ぼす重力の影響を正しく理解するには、究極的には微小重力環境と地上での比較が不可欠である。これまでに宇宙飛行士の長期宇宙滞在や動物の宇宙実験を通して、骨や筋量が μG 環境で急激に低下すること¹⁾、培養細胞においても、 μG と 1G では遺伝子の発現レベルにおいて大きな違いが生じることが報告されてきた²⁾。さらに、近年、伸展ストレッチや加重力など力学的刺激の負荷に応答する細胞メカノセンシング機構の存在も浮き彫りになり³⁾、生命体は、細胞から組織・器官、個体の各レベルにおいて、重力をはじめとする力学的刺激の感知と適応応答機構を有することが示されてきた。しかしながら、それらの分子基盤やカスケードの全貌は未だ多くが未解明であり、宇宙

での長期滞在による骨や筋の萎縮のみならず高齢化に伴い益々増加するロコモティブ症候群の対策においても、今後の重要な課題といえる。

1. 宇宙フライト線虫にみられる BMP/TGF- β シグナルの低下

線虫 *C. elegans*（以下、線虫）の雌雄同体は、成虫の体長が約 1 mm で 959 個の体細胞からなる小さな生物である。そのゲノムには約 2 万の遺伝子が存在し、4 割がヒトにおいても保存され、近年では、アルツハイマー病、パーキンソン病、糖尿病、デュシェンヌ型筋ジストロフィーや発癌などの病態モデルとして新たな創薬探索にも利用されている⁴⁾。卵から成虫になるライフサイクルは約 4 日間と比較的短く、成虫の体細胞は再生することがないので、発生から老化、寿命の研究にも幅広く利用されている。線虫を用いた宇宙実験は、1992 年、米国ならびに NASA の研究者らによってはじめて実施され、その後、各国の研究者らにより複数回の実験が行われている。なかでも、筆者らは 4 回の線虫宇宙実験を実施する機会を得て、09 年の宇宙実験⁵⁾では、L1 幼虫をスペースシャトルで国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟に運び、軌道上で餌となる大腸菌と混ぜることで同調的に培養を開始し、4 日後の成虫サンプルを「きぼう」実験棟の顕微鏡で観察後、速やかに凍結し、地上に帰還・回収してオミクス解析を行った。「きぼう」の培養装置は、遠心により任意に加重することができ、軌道上で 1G 対照サンプルを調整することもできる。そこで、軌道上の 1G と μG との環境で育った成虫を比較したとこ

東北大学大学院生命科学研究科 分子遺伝生理分野
Molecular genetics and Physiology, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1 TEL: 022-217-5715

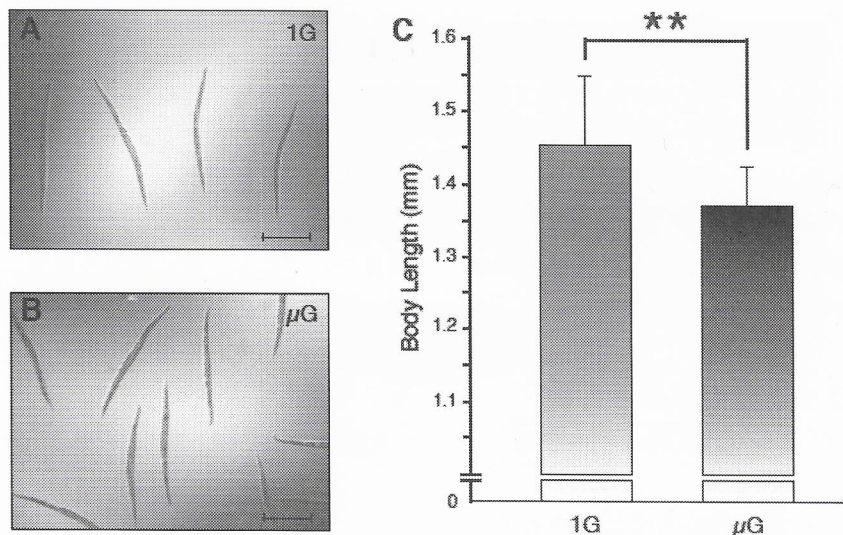


図1 宇宙の mG で成育した線虫では体長が短くなる (文献 9 より引用)。
 A: 宇宙 1G 負荷サンプル 4 日間培養 B: 宇宙 mG サンプル 4 日間培養
 C: 体長の測定結果 ** P<0.01

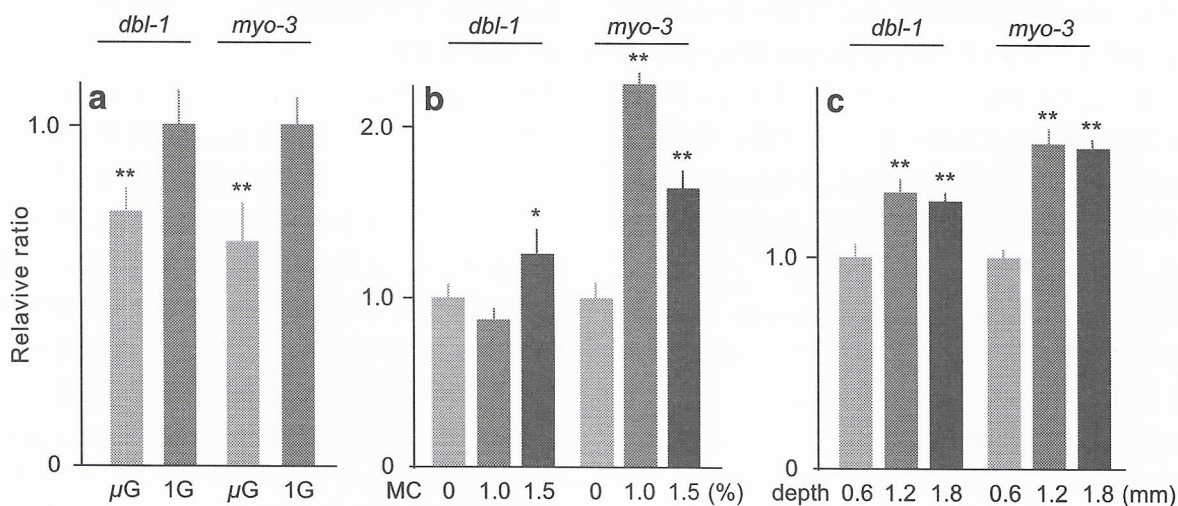


図2 宇宙実験と地上実験での培地粘性、深さの dbl-1, myo-3 遺伝子発現に対する影響
 a: 宇宙 mG と宇宙 1G 負荷サンプルの遺伝子発現 b: 地上実験で液体培地にメチルセルロース (MC) を添加した際の発現変動 c: 地上実験で液体培地の深さを变化させた際の発現変動 いずれも L1 幼虫から 4 日間同調的に培養した成虫を定量的 PCR 法により測定 (文献 11 より引用) *P<0.05, ** P<0.01

ろ、遊泳運動時の速度や振幅が低下するとともに、体壁筋に加えて、細胞骨格、細胞外マトリックス、代謝などに関わる酵素・タンパク質、ならびにそれらをコードする遺伝子群の発現レベルが有意に低下することを見出した^{8,9)}。さらに、線虫の体長も μG では有意に短くなり⁹⁾ (図 1)、その要因として、体長を調節する BMP/TGF-β ファミリーの 1 つ DBL-1¹⁰⁾ の遺伝子発現ならびに体壁筋細胞のミオシン MYO-3 の遺伝子発

現が μG で抑制されることが考察された¹¹⁾ (図 2)。重力環境の変化によって DBL-1 の発現が変動したことから、地上でも液体培地の深さ (静水圧) や粘性を変化させて、力学的負荷に応じて DBL-1 の発現が変動するか確かめる実験を行った。その結果、静水圧ならびに粘性を増加させると DBL-1 の発現が上昇することを明らかにした¹¹⁾ (図 2)。線虫は受精後の細胞系譜ならびに体細胞数が厳密に決定されており、給餌量が

一定であれば、からだの大きさは遺伝的な要因による支配が中心に考えられてきたが、本実験の成果として、重力に伴う力学的刺激が DBL-1 を介したシグナル経路を活性化し、その結果、外骨格である表皮コラーゲンや体壁筋の発現量が増加し、代謝も活性化され、逆に、 μG の力学的刺激が乏しい状況では TGF- β /BMP シグナル経路の活性が低下するものと考察された。

2. 宇宙フライト線虫にみられるドーパミンの低下

線虫の DBL-1 は、主に腹部神経索をはじめとする運動神経、頭部の感覚神経など複数の神経細胞において発現している。つまり、線虫の重力刺激の応答には、これら神経細胞を介した BMP/TGF- β シグナルが存在するものといえる。そこで、力学的刺激から運動神経における DBL-1 の発現変動に至る神経伝達の過程が次なる課題としてあげられる。09 年に続き 14 年 12 月に実施した宇宙実験¹²⁾においては、宇宙 μG 下で線虫を 4 世代、世代交代を繰り返し、その際にみられるゲノム遺伝子発現の網羅的な変動を調べた。その結果、09 年 CERISE 実験ならびに 4 世代の Epigenetics 実験に共通して、 μG のサンプルで再現性良くドーパミンの分解に関わる Catechol-O-Methyl Transferase (COMT) 遺伝子の発現が低下することを見出した (図 3)。本遺伝子発現はドーパミンを添加すると上昇することから、宇宙 μG で成育した線虫ではドーパミン量の低下が生じている可能性が強く示唆された。そこで、3D クリノスタットを用いた疑似微小重力環境で線虫を成育させて、COMT 遺伝子の発現ならびに線虫のドーパミン量の定量を行ったところ、1G の静置条件と比較して、3D クリノスタットのサンプルでは COMT 遺伝子の発現が低下するとともに、ドーパミン量も 1/3 以下のレベルにまで低下することを見出した。

ロシアのバイオサテライト BION-M1 による 1 カ月のマウス宇宙飛行では、骨や筋量の低下に加えて、大脳基底核の黒質線条体において、COMT 遺伝子ならびにドーパミン生合成の律速酵素遺伝子チロシンヒドロキシラーゼやドーパミン D1 受容体の遺伝子の有意な発現低下が報告され¹³⁾、 μG 環境はマウスの脳内においてもドーパミン量を低下させることが強く示唆されている。ドーパミンは、快や意欲、学習に加えて、運

動や筋の調節を担う重要な神経伝達物質であり、線虫においても培養プラスチックシャーレの外から軽く叩くタップ刺激に対する応答と可塑性、餌の有無に伴う運動方向の転換、ターンの角度などに関わることが知られている¹⁴⁾。すなわち、宇宙の μG 環境では、マウス、線虫のいずれも、その飼育や培養において床面との接触が極端に抑えられ、長期に渡るこれら接触刺激の低減が、ドーパミンの産生を低下させた可能性が強く示唆される。

おわりに

μG 環境では自重が失われることにより、からだを支える力が無くなり廃用性筋萎縮が進行する。この過程では、骨格筋の合成の低下に加えて、分解系がより優位に進むものと考えられている。今回、筆者らの線虫を用いた宇宙実験では、4 日間の宇宙飛行であるが、いわゆる赤子から成人になるまでの期間に対応しており、 μG 環境におけるからだの発達、成長過程への影響と捉えることができる。その結果、線虫の宇宙フライトサンプルの網羅的な遺伝子発現の変動パターンからは、筋分解系の促進というよりは、筋タンパク質、エネルギー生産に関わるミトコンドリア代謝酵素などの発現低下など、いずれも筋合成が抑制される方向に進むことが示され、 μG では、運動神経から放出される成長因子 BMP/TGF- β シグナルの低下が少なからず影響した結果と考えられる。さらに、宇宙滞在マウスと線虫の μG ならびに 3D クリノスタット培養で共通に予想されるドーパミンの低下は、1G 環境では必然的に生じる床 (底面) との接触が失われ、いわゆる触覚の長期に渡る感覚遮断に起因した可能性を提唱したい (図 3)。運動によるドーパミンの放出に加えて、皮膚の触覚刺激でラットの側坐核でドーパミン放出が増加するという報告¹⁵⁾もあり、 μG 環境では運動に加えて触覚刺激を施すことが、神経を含めた骨、関節、筋肉の全体からなる運動器の機能低下、さらに、ドーパミンは学習や認知機能にも重要で、これらの機能低下リスクの回避にもつながるものと考察される。

最後に、この場を借りて、線虫の宇宙実験の実施ならびに解析において、多くの国内外の共同研究者ならびに研究協力者のサポートを頂き、深くお礼申し上げます。

	線虫 μG 宇宙フライト*	線虫 疑似微小重力 (3D clinostat)*	マウス μG 宇宙フライト (文献 13)
Dopamine 分解酵素遺伝子発現 (COMT)	down	down	down
Dopamine 合成酵素遺伝子発現	Not change	Not change	down
Dopamine 量	未同定	down	未同定

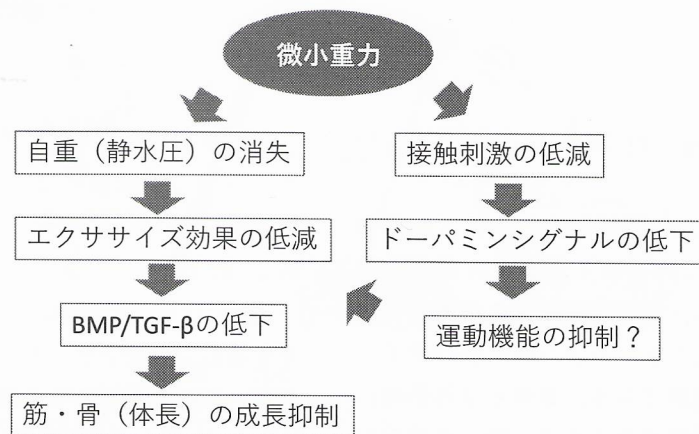


図3 ドーパミンシグナルの変化 (上段) と作業仮説 * 東谷ら未発表データ

文 献

- 1) Space Physiology and Medicine From Evidence to Practice (2016) Editors: Nicogossian AE. *et al.* Springer, ISBN 978-1-4939-6652-3
- 2) Fitts RH. *et al.* Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 2010 Sep 15;588(Pt 18):3567-92. doi: 10.1113/jphysiol.2010.188508.
- 3) Shiba D. *et al.* Development of new experimental platform 'MARS'-Multiple Artificial-gravity Research System-to elucidate the impacts of micro/partial gravity on mice. *Sci Rep.* 2017 Sep 7;7(1):10837. doi: 10.1038/s41598-017-10998-4.
- 4) Vandenburg H. *et al.* Space travel directly induces skeletal muscle atrophy. *FASEB J.* 1999 Jun;13(9):1031-8. PMID: 10336885
- 5) Katanosaka Y. *et al.* TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat Commun.* 2014 May 29;5:3932. doi: 10.1038/ncomms4932.
- 6) O'Reilly LP. *et al.* C. elegans in high-throughput drug discovery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Apr;69-70:247-53. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.001.
- 7) <http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/first/cerise/>
- 8) Higashibata A. *et al.* Decreased expression of myogenic transcription factors and myosin heavy chains in *Caenorhabditis elegans* muscles developed during spaceflight. *J Exp Biol.* 2006 Aug;209(Pt 16):3209-18. PMID: 16888068
- 9) Higashibata A. *et al.* Microgravity elicits reproducible alterations in cytoskeletal and metabolic gene and protein expression in space-flown *Caenorhabditis elegans*. *NPJ Microgravity.* 2016 Jan 21;2:15022. doi: 10.1038/npjmgrav.2015.22.
- 10) Morita K. *et al.* Regulation of body length and male tail ray pattern formation of *Caenorhabditis elegans* by a member of TGF-beta family. *Development.* 1999 Mar;126(6):1337-47. PMID: 10021351
- 11) Harada S. *et al.* Fluid dynamics alter *Caenorhabditis elegans* body length via TGF- β /DBL-1 neuromuscular signaling. *NPJ Microgravity.* 2016 Apr 7;2:16006. doi: 10.1038/npjmgrav.2016.6.
- 12) <http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/epigenetics/>
- 13) Popova NK. *et al.* Risk neurogenes for long-term spaceflight: dopamine and serotonin brain system. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):1443-51. doi: 10.1007/s12035-014-8821-7.
- 14) Sanyal S. *et al.* Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 2004 Jan 28;23(2):473-82. PMID: 14739932
- 15) Maruyama K. *et al.* Tactile skin stimulation increases dopamine release in the nucleus accumbens in rats. *J Physiol Sci.* 2012 May;62(3):259-66. doi: 10.1007/s12576-012-0205-z.

【微小重力環境における筋萎縮発生メカニズムへの新展開】

New insight in muscle atrophy signal under microgravity condition

内田 貴之・二川 健

Takayuki Uchida Takeshi Nikawa

Key words

筋萎縮, ROS, Cbl-b, アコニターゼ

要 約

加齢や消耗性疾患によって引き起こされる筋萎縮は、高齢化社会の進展に伴いますます大きな問題となってきた。しかし、筋萎縮に対する根本的な治療法は存在せず、リハビリテーション等の保存療法に頼らざるを得ないのが現状である。筆者らは筋萎縮に対して有効な治療法を開発するために、特に筋萎縮の発生メカニズムの解明の観点からアプローチを行ってきた。その結果、機械的負荷の減少する unloading な環境においては、酸化ストレス誘導性のユビキチンリガーゼ Cbl-b によって筋量維持のために重要な IGF-1 シグナルが阻害されることで筋タンパク質の分解亢進が誘導されることを示した。さらに、TCA 回路の酵素であるアコニターゼがミトコンドリアの機能異常を介して、筋繊維タイプの変化に関わっていることも明らかにした。本稿では、これらの実験結果に最近の知見を併せて概説していきたい。

1. 筋タンパク質の合成と分解のメカニズム

筋量および筋力の減少は高齢者の QOL と身体活動度を低下させるだけでなく、転倒や骨折による寝たきりの原因となる。一般的に、筋肉は機械的負荷がかかる状態では絶えず合成と分解を繰り返し、そのバランスが保たれることで一定の筋肉量が維持されている。一方で、寝たきりや無重力 (unloading) 環境など、機械的負荷が減少するような環境では筋タンパク質の合成が抑制されると同時に、筋タンパク質の分解が亢進

し、筋萎縮が進展する。そして、これら筋タンパク質の合成と分解調節に特に重要な役割を果たしているのが Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) シグナルである (図 1) 。

IGF-1 は成長や運動刺激などに応答して、筋細胞や骨芽細胞などで合成され、筋肉や骨の成長を促進する。IGF-1 が細胞膜上の受容体に結合すると、内在するチロシンキナーゼが活性化され、自己リン酸化が起こる。そしてそのリン酸化チロシンを認識して Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) が結合し、IRS-1 もリン酸化される。リン酸化 IRS-1 は、Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)、Akt と順々にリン酸化シグナルを伝えていく。リン酸化された Akt は、mammalian Oarget Of Rapamycin (mTOR) を介して S6 Kinase (S6K) や Glycogen Synthase Kinase (GSK) を活性化し、タンパク質合成を促進する。また、リン酸化 Akt は、その下流に存在する転写因子 Forkhead box O (FOXO) をリン酸化し、リン酸化された FOXO はその核内移行が妨げられる。FOXO は Muscle Atrophy F-box protein (MAFbx) /atrogin-1 などの筋萎縮関連遺伝子の転写因子であり、すなわち正常状態であれば IGF-1 シグナルにより Atrogin-1 や Muscle RING-Finger Protein-1 (MuRF-1) の発現は抑制されている。

無重力環境などの機械的負荷が減少した状態においてはこの IGF-1 シグナルが減弱するため下流のシグナルが伝わらず、タンパク質合成の減少と Atrogin-1 などの筋萎縮関連遺伝子の発現増加によるタンパク質分解の亢進が起こり、結果筋萎縮が引き起こされる²⁾。これは、後述するユビキチンリガーゼ Casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) の働きによるところが大きい。

徳島大学大学院医歯薬学研究部 生体栄養学分野
Department of Nutrition Physiology, Faculty of Medicine, Tokushima University
〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15 TEL: 088-633-9116

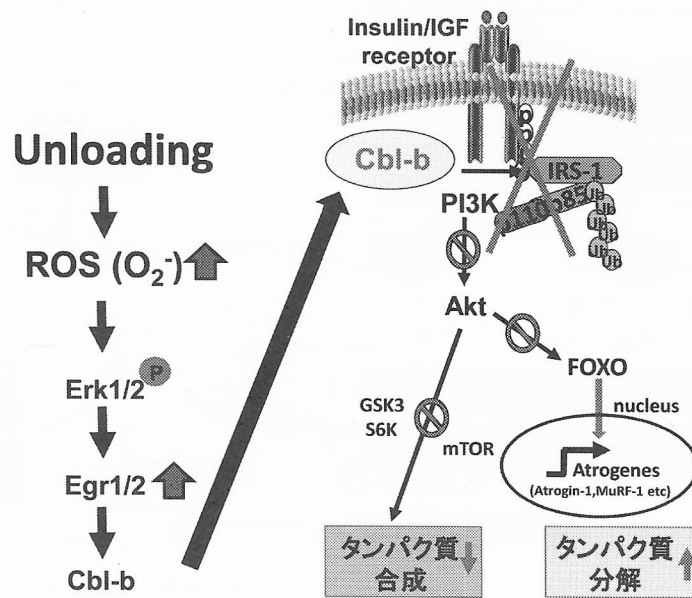


図1 IGF-1 シグナルと Cbl-b

筋タンパク質維持のために重要な IGF-1 シグナルタンパク質について、主要なものを示した。Unloading 環境では ERK のリン酸化と転写因子 Egr を介してユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現上昇が誘導される (左部)。増加した Cbl-b は、IRS-1 をユビキチン化・分解することで IGF-1 シグナルを阻害し、筋タンパク質の合成と分解のバランスを崩壊させる (右部)。

2. Cbl-b を介した筋量減少のメカニズム

タンパク質の分解経路には、カルパイン系、オートファジー・リソソーム系、そしてユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) の3つの主要な分解経路が存在する。筆者らは、宇宙フライトを行ったラットの腓腹筋を解析した結果、筋タンパク質のユビキチン化の増加がみられたことから、無重力環境におけるタンパク質分解の亢進には UPS が重要な働きを担っていることを明らかにした³⁾。UPS はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) から構成される複合酵素群である。分解すべきタンパク質がポリユビキチン鎖で標識され、多量体サブユニット 26S プロテアソームが分解する。中でも筆者らは、DNA マイクロアレイ法での遺伝子の網羅的解析から、著明な発現上昇を示したユビキチンリガーゼ Cbl-b に注目した⁴⁾。

筆者らは、この Cbl-b の基質タンパク質は IGF-1 の細胞内シグナル分子である IRS-1 であることを突き止め、unloading による筋量の減少は Cbl-b を介した IRS-1 のユビキチン化・分解による IGF-1 シグナル伝達の障害によって引き起こされていることを明らかに

した (図1)²⁾。実際、Cbl-b ノックアウトマウスは、unloading による筋量の減少に対して抵抗性を示す。一方で Cbl-b のノックアウトは、unloading による筋繊維タイプの変化には影響を与えなかった。さらに、この Cbl-b の働きを阻害するペプチドである Cblin を投与することで動物レベルでは unloading による筋萎縮を阻害し、細胞レベルでは筋管径の減少や筋萎縮関連遺伝子の発現上昇を抑制することが明らかになっている⁵⁾。

最近筆者らは新たに、unloading 状態における Cbl-b の発現調節には酸化ストレスが関与していることを明らかにした。Cbl-b のプロモーター領域におけるルシフェラーゼアッセイと、酸化ストレス応答領域の配列を用いたゲルシフトアッセイの結果より、我々はこの酸化ストレス誘導性の Cbl-b の発現を制御しているのは転写因子である Early Growth Response (Egr) であることを突き止めた。さらに筆者らは、Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) のリン酸化阻害剤が unloading 誘導性の Egr の発現上昇を抑制したこと、unloading による ERK のリン酸化は TEMPOL などの抗酸化剤の投与によって抑制できたことから、unloading による Cbl-b を介した筋量調節には酸化ストレス (特に O_2^-) が重要な働きを担っていることを報告した (図2)⁶⁾。

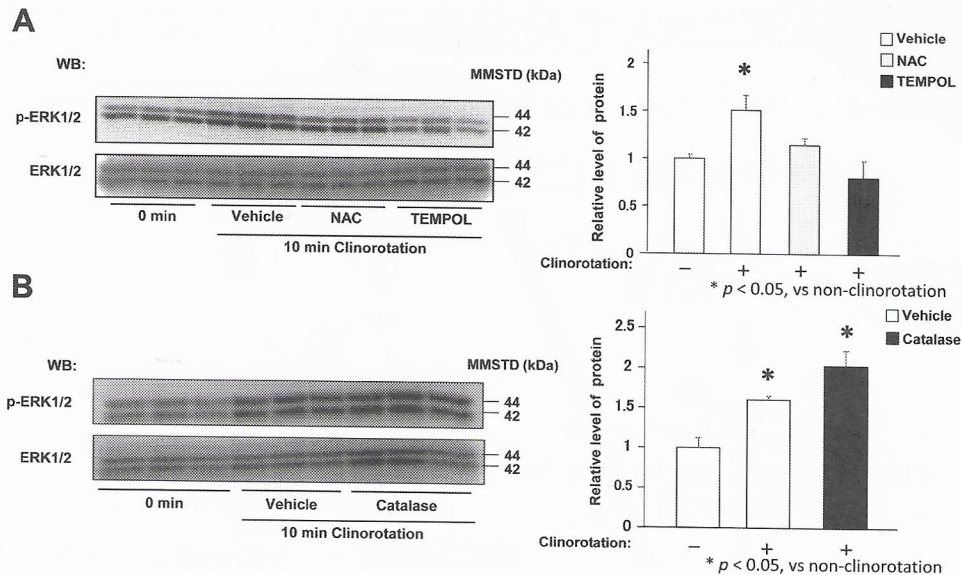


図2 Unloading による ERK の活性化に対する抗酸化剤の効果
 L6 筋管細胞において、unloading 誘導性の ERK の活性化に対する抗酸化剤の効果を確認した。
 NAC, TEMPOL は clinorotation による ERK の活性化を抑制したが(A), catalase は効果が確認できなかった(B)。

3. 筋肉のエネルギー代謝

筋肉は、生体内でも最大規模のエネルギー消費臓器である。筋肉を構成する筋繊維には大きく分けて遅筋（赤筋）型の線維と速筋（白筋）型の線維が存在し、前者はミトコンドリアを豊富に含んでおり好氣的経路が優位な、後者は嫌氣的解糖系経路が優位なエネルギー産生をそれぞれ行う。Unloading による筋萎縮などでは、筋量の減少のほかに、この筋繊維タイプの変化（遅筋の速筋化）がみられ、筋肉におけるエネルギー代謝変動が起こる。

筆者らは、unloading による筋萎縮ではミトコンドリアの形態異常と、遅筋型ミオシン重鎖の減少がみられ、それがミトコンドリアの TCA 回路を制御する酵素アコニターゼの失活によって引き起こされることを見出した（論文投稿中）。アコニターゼは2つのアイソフォームを持っており、アコニターゼ1は細胞質で鉄制御タンパク質として、アコニターゼ2は TCA 回路の律速酵素としてクエン酸からイソクエン酸までの反応を触媒する機能を持っている。いずれのアコニターゼも、その酵素活性の中心に 4Fe-4S 鉄硫黄クラスターを保持しているが、酸化ストレス等によって Fe が酸化されると鉄硫黄クラスターから Fe が遊離し不活化状態となる。Unloading 環境においては、前述

の通り酸化ストレスの産生が増大しているため、実際に細胞に unloading 負荷を加えることでアコニターゼ活性の低下と、それによる ATP 産生量の低下がみられる（未発表のデータ）。一方で、鉄シャペロンタンパク質であるフラタキシンは、不活化状態となったアコニターゼに Fe を補充することで活性化状態へと回復させる機能を有している（図3）。

このアコニターゼ2を siRNA によってノックダウンすると、遅筋型ミオシン重鎖タンパク質の分解と、ミトコンドリアの形態異常（分裂亢進）が誘導された（図3）。ミトコンドリアは融合と分裂を常に繰り返すことでその機能を保っている動的な細胞小器官であり、酸化ストレスが増大する等のストレス環境下では多くの場合分裂が優位となり、断片化したミトコンドリアが多く見られ、細胞内 ATP 産生量は減少する⁸⁾。さらに近年の研究では、ミトコンドリアの分裂はミトコンドリアの分解（mitophagy）に先行して発生するとの報告もあり⁹⁾、筆者らの unloading 環境およびアコニターゼ不活化環境におけるミトコンドリアの分裂亢進においてもミトコンドリアの過剰な分解が誘導されている可能性がある。いずれにせよ、ミトコンドリアの形態異常、あるいは分解亢進は細胞内 ATP 産生量の低下を誘導し、unloading 環境における遅筋繊維特異的な分解亢進と、ひいては unloading 環境における遅筋の速筋化現象に関与していると考えられる。

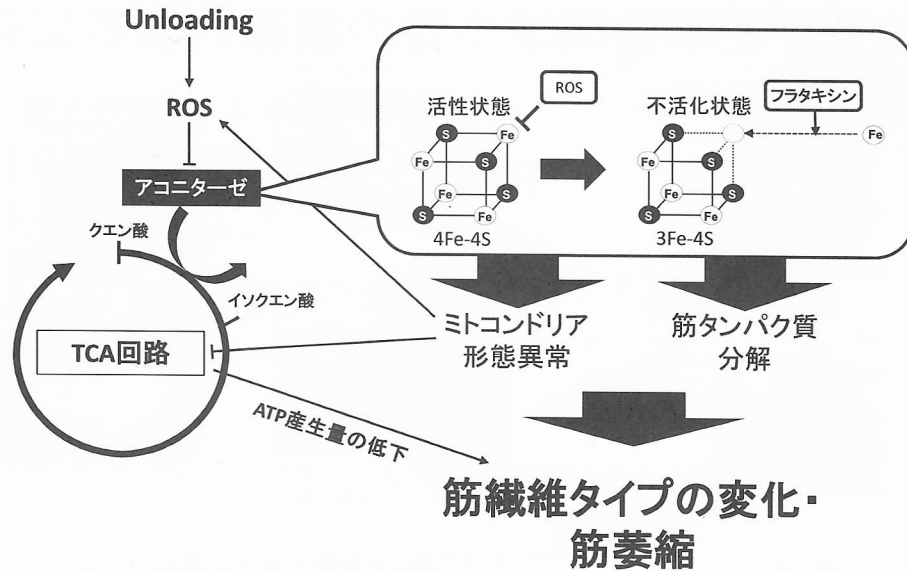


図3 アコニターゼを介した筋萎縮発生メカニズム
アコニターゼを介した筋繊維タイプの変化・筋萎縮のメカニズムを示した。TCA回路の酵素であるアコニターゼは酸化ストレス等によって鉄が遊離すると不活化状態となる。アコニターゼの不活化が亢進すると、ミトコンドリアの形態・機能異常やATP産生量の低下・筋繊維タンパク質の分解が起こり、筋繊維タイプの変化・筋萎縮が進展する。

文献

おわりに

本稿では、筋タンパク質の維持に関わるIGF-1シグナル経路を中心に、分解に関わる因子としてユビキチンリガーゼCbl-bの機能とその制御メカニズム、そしてエネルギー代謝関連酵素であるアコニターゼを介した筋繊維タイプの制御メカニズムについて述べた。本稿で述べた通り、筋萎縮は筋量の減少と筋繊維タイプの変化が複合的に発生する。前者はCbl-bが、後者はアコニターゼがその制御因子として考えられるが、その上流はいずれも酸化ストレスであり、この酸化ストレスは細胞にunloading負荷を加えた非常に早い段階から増大がみられるが、その発生源は未だ不明である。筋萎縮に対する抗酸化剤の投与は一定の効果を示すが、筋機能の完全な回復には至らないため¹⁰⁾、今回筆者らが示した以外にもまだまだ不明な筋萎縮誘導シグナルが存在していると考えられる。今後の更なる研究成果に期待したい。

謝辞

本研究は、名古屋大学(曾我部正博氏)、宇宙航空研究開発機構との共同宇宙実験、科研費新学術領域「宇宙に生きる」からの研究助成により行われた。この場をお借りして御礼申し上げます。

- 1) Perrini S, Laviola L, Carreira MC, et al. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol.* 2010 205 : 201-210.
- 2) Nakao R, Hirasaka K, Goto J, et al. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol.* 2009 29: 4798-4811.
- 3) Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, et al. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 2001 15 : 1279-1281.
- 4) Nikawa T, Ishidoh K, Hirasaka K, et al. Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J.* 2004 18 : 522-524.
- 5) Ochi A, Abe T, Nakao R, et al. N-myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Physiol.* 2015 570:23-31.
- 6) Uchida T, Sakashita Y, Kitahata K, et al. Reactive oxygen species upregulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 314:C721-C731.
- 7) Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, et al. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science.* 2004 305: 242-245.
- 8) Romanello V, Guadagnin E, Gomes L, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J.* 2010 29 : 1774-1785.
- 9) Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta.* 2012 1823:2297-2310.
- 10) Min K, Smuder AJ, Kwon OS, et al. Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol.* 2011 111: 1459-1466.

【マウスを用いた宇宙環境応答の網羅的解析に向けて】

Development of new experimental platform using mouse in Kibo

工藤 崇¹⁾・岡田 理沙^{1,2)}・芝 大²⁾・

Takashi Kudo

Risa Okada

Dai Shiba

水野 浩靖²⁾・白川 正輝²⁾・高橋 智¹⁾

Hiroyasu Mizuno

Masaki Shirakawa

Satoru Takahashi

Key words

マウス, 微小重力, 小動物飼育装置

要 約

2016年に国際宇宙ステーション(International Space Station: ISS)の日本の実験棟「きぼう」にてJAXA主導で日本初のマウス飼育が実施された。宇宙でのマウス飼育の様々な問題点を修正し開発された小動物飼育装置(MHU: Mouse Habitat Unit)によって、約1ヶ月間「きぼう」で飼育された12匹すべてのマウスを生存して地球に戻すことに成功した。さらにこの装置の大きな特徴としては、飼育装置内に遠心機を設置することにより宇宙環境の最大の特徴である重力を制御することができることである。つまり、遺伝子発現解析に必要な新鮮なサンプルの取得と様々な解析に必要なコントロールを設定することが可能になった。本稿では、第1回目の宇宙実験におけるマウス飼育の概要とマウス実験の初期データについて紹介する。

地上の加齢性疾患に類似した変化が急速に進行することから、動物実験により詳細な分子メカニズムの解明が期待できる。日本、米国、カナダ、欧州各国の15カ国が参加する国際協力プロジェクトによって運営されているISSは、地上から400 km上空に建設され、秒速約8 kmで軌道を回っている。そのISSに日本初の有人実験施設となる「きぼう」日本実験棟が2009年に完成して以来、宇宙環境という特殊な環境において様々な科学実験が行われている。宇宙航空研究開発機構(JAXA)は、きぼう利用による生命科学実験として、哺乳動物培養細胞に始まり、植物、線虫、水棲生物等を進めてきたが、ヒトへの還元、医学的課題の克服のために哺乳動物であるマウスを利用した研究を開始した。

1. これまでの宇宙実験

はじめに

環境変化を感知して適応することが生物の生存にとって重要であり、一定の重力は、地球上のほとんどの生物の進化を通じて共有している要因のひとつである。生物が重力にどのように反応するか、また、生物が宇宙環境に適応できるかどうかを証明するためには、高等生物であるマウスを使用した宇宙実験は重要な研究手段になる。ヒトにおいて宇宙環境の影響は、

アメリカ航空宇宙局(NASA)では、マウス・ラット飼育装置 Animal Enclosure Moduleを開発し、20回以上の動物実験をスペースシャトルにて実施している。現在はスペースシャトルの運用廃止によりISSでのマウス実験が進行している。ロシア連邦宇宙局では無人宇宙船Bion-M1を利用したマウス実験が実施され、イタリア宇宙機関は、Mouse Drawer Systemマウス飼育装置を開発して、2009年にISSにて90日間の宇宙環境飼育に成功している。これらの宇宙飼育マウ

1)筑波大学・医学医療系・解剖学発生学

2)宇宙航空研究開発機構 有人宇宙技術部門・きぼう利用センター

1)Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

2)ISS/Kibo experiment, Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA)

1)〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1 TEL: 029-853-7516

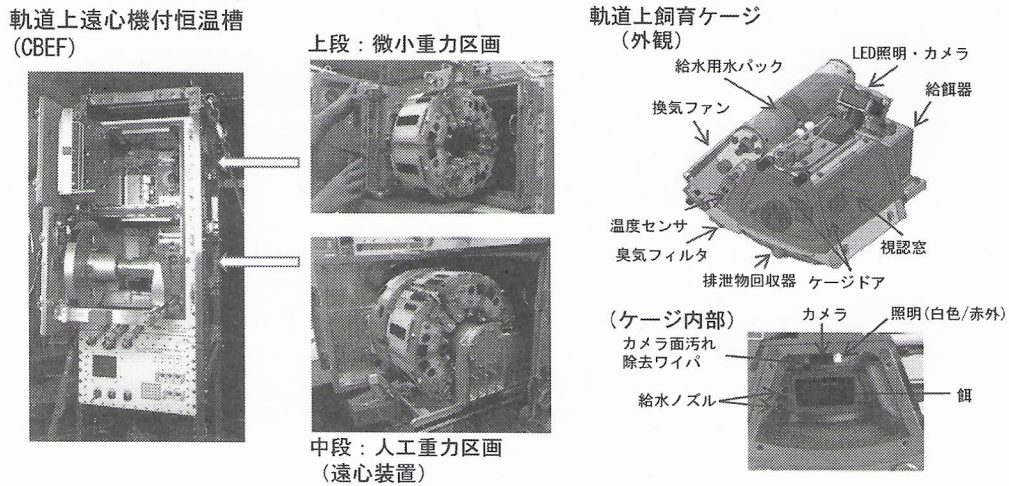


図1 小動物飼育装置の概要

スの実験により、神経、筋肉、骨の生理学などの生物医学的適用に関して重要な知見を提供されたが、科学的証明をするための実験の質を維持することは難しく、検証実験することも容易ではない。宇宙におけるマウス実験は、飼育環境の維持、生存回収、適切な対照実験など通常の地上実験と比較して問題点が多数あり、使用するマウス数の限界もあることから飼育装置設備の充実化の必要性和宇宙環境下における様々な違いを克服するための装置開発の必要性があった。宇宙実験に対する対照実験は、それまで地上で実施されていたために、重力以外の様々な条件（宇宙放射線、微生物環境、対流の不足など）が地上と宇宙環境では異なる。さらに、宇宙船の発射および帰還フェーズ中の振動や衝撃を経験するために地上で実施されるマウス実験を1gの対照群として設定することは微小重力の影響の明確な同定を妨げていた。そこで、JAXAは宇宙で人工重力をつくるための新しい実験プラットフォーム、小動物飼育装置（MHU）の開発に取り組んだ。

2. MHU の開発

ISSでの滞在は、地球上の重力の100万～1万分の1である微小重力や複合放射線等を考慮しなければならない。長期間の微小重力環境下に曝されることにより、骨量減少、筋萎縮、バランス感覚の低下が生じる。これらの変化の原因を探るためには、できるだけ同じ条件の環境下での実験デザインおよび実験装置が必要

であった。今回開発されたMHUとそのケージ部分であるHCU（Habitat cage unit）は、以下の最先端の技術が採用された（図1）。

- 1) 遠心分離機に設置することによる人工重力環境下での飼育：軌道上遠心機付恒温槽（CBEF: Cell Biology Experiment Facility）の上段に微小重力区画、中段に人工重力区画（遠心装置）があり、各区画に6台のHCUを設置して、合計12匹のマウスの飼育が可能である。人工重力区画では0.1gから2gの間の重力を制御できる。
- 2) 個別飼育：同じケージに同居させると喧嘩しやすい雄マウスの飼育が可能となった。
- 3) ワイパ付きのカメラ：長期飼育の場合はレンズの汚染により画像が不鮮明になり観察ができなかった。宇宙空間でのマウスの行動、健康状態を鮮明に観察することができる。
- 4) 給餌装置、給水装置：宇宙空間では通常のペレット飼料は使用できないので固定餌の押出しによる自動給餌カートリッジが開発された。
- 5) 換気および糞尿の処理：飼育装置内空気換気は、個々のHCUに装備されている換気ファンでおこなわれ、温度、湿度、二酸化炭素およびアンモニア濃度も管理されている。尿などの液体は、装置の壁に吸水シートにより排除され、糞などの固体は、装置の底面に空いている円形の穴へ換気ファンからの風力により排泄物回収器へ移動する。

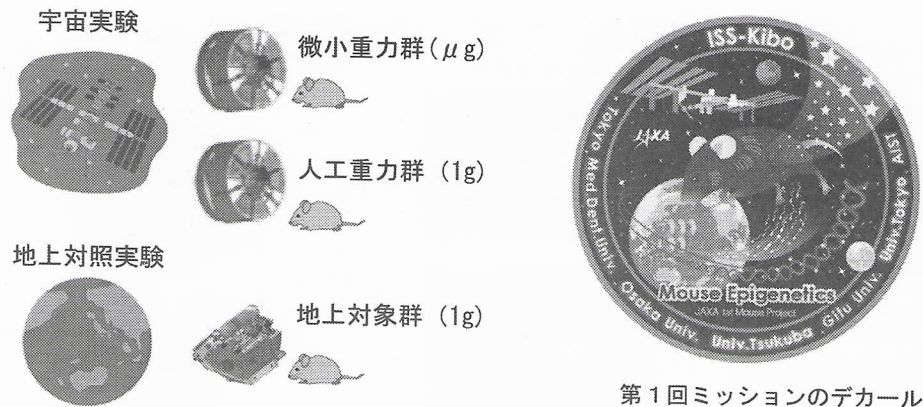


図2 第1回ミッション

3. 第1回目小動物飼育のミッション

宇宙実験と地上実験の成果を統合して、宇宙環境における変化を遺伝子発現およびエピゲノムの観点から明らかにすることを目的に平成24年度「きぼう」利用テーマ重点課題「マウスを用いた宇宙環境応答の網羅的評価：Mouse Epigenetics」が筑波大学とJAXAを中心に6年間のプロジェクトとして始まった。MHUを利用した最初のミッションであり、回収されたマウスの解析には筑波大以外の複数の大学、研究機関が参加している。本プロジェクトの2大テーマとして、1) 遺伝子発現の網羅的解析とヒストン修飾等のエピジェネティクス解析による宇宙滞在による生体への影響の解明と2) 宇宙環境に暴露された精子を回収して、体外受精により次世代を作製し、そのマウスに受け継がれた宇宙環境飼育の影響を遺伝子発現レベルでの解析の実施であり、これらの実現には生存回収による新鮮材料が必要であった。本番実験を成功させるために生物適合性試験、短半径遠心機によるコリオリ効果の影響、打上げ回収装置と飼育装置とを本番と同じ時間で飼育しその影響を観察する組み合わせ試験など多数の地上予備実験をMHUの試作機の段階から実施、また遠心装置を利用した過重力実験や尾部懸垂実験により地上実験のデータ蓄積をおこなった²⁻⁶⁾。2016年8月にISSにおいて12匹のマウス(人工重力群(Artificial gravity; AG, 1g)と微小重力群(Microgravity; MG)それぞれ6匹ずつ)の35日間の飼育を実施した(図2)。その期間におけるマウスのメンテナンスは、宇宙飛行士とJAXAの運用管制チーム、獣医師を含むマウス健康管理チーム、実験装置開発チームがマウスの健康状

態や装置の健全性を24時間体制で観察、管理支援することで、世界初の全個体生存帰還が実現した。帰還したマウスは、研究施設に運ばれてマウス解剖チームによって身体所見、簡単な行動実験の後にあらゆる臓器を採取した。地上対照実験として宇宙実験と同じタイムスケジュールのHCUで飼育したマウスを使用した。

4. 宇宙飼育マウスの解析

高齢化社会を迎えている我が国の問題のひとつである廃用性筋萎縮や加齢性筋肉減弱症、サルコペニアの筋萎縮メカニズムをこの宇宙マウスによって解明できる可能性がある。抗重力筋であるヒラメ筋は、マウス尾部懸垂実験において筋萎縮を生じ、分子メカニズム解明のための材料として最も使用されている。宇宙実験においてMG群とAG群の後肢骨格筋重量の変化を測定した。機器トラブルより体重減少が見られたマウスを除いた場合、MG群ではAG群のマウスと比較して、有意な重量の低下が見られた(図3)。また、AG群と地上対照群(Ground Control; GC)とほぼ同等であったことから、AG群が宇宙環境化で1gの重力の影響を反映していることが証明された。つづいて、正常な飼育環境下のマウスのヒラメ筋のRNAシーケンスの結果からMG群とAG群間でそれぞれ特異的な発現パターンの遺伝子の抽出に成功した。これらが筋萎縮に関連する遺伝子であるかどうかは、筋管細胞株C2C12に候補遺伝子を導入し、萎縮に影響するかを検証しており、いくつかの筋萎縮誘導遺伝子については遺伝子改変マウスの表現型解析が進行中である。骨格筋同様に重力の影響を受ける骨組織は、宇宙飛行士に

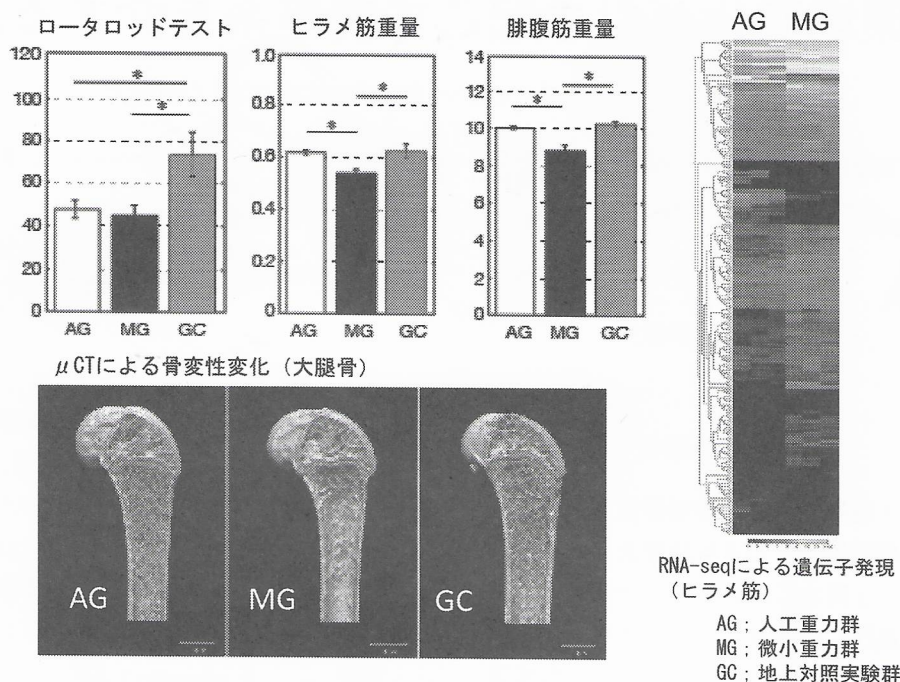


図3 第1回ミッションのマウス表現型解析

として深刻な問題である。μCTの解析により、顕著な骨量の低下および構造変化がMG群で観察された。また、骨格筋と同様にAG群とGC群の比較では、ほとんど違いは見られなかった。

本ミッションの2大テーマのもう一つの次世代への影響についても解析を進めている。宇宙環境飼育による様々なストレスの改善のために環境適応反応が誘導され、それが次世代に引き継がれるかを検証するために、まずは各群のマウスから採取した精子を使用して、体外受精により次世代の作製を試みた。精巣および精巣上体の重量は、3群間で変化は見られなかった。また、体外受精により3群ともに無事に仔マウスは誕生し、成獣に成長した。これは、宇宙環境飼育下において雄性生殖細胞の分化過程に大きな影響を与えないことを示唆している。

おわりに

今回ご紹介した2016年の第1回小動物飼育ミッションを皮切りに、第2回「宇宙環境における健康管理に向けた免疫・腸内環境の総合評価」(2017年9月)、第3回「宇宙ストレスにおける環境応答型転写因子Nrf2の役割」(2018年5月)が実施され、各ミッション、

打ち上げたすべてのマウスの生存回収に成功し、他国からも評価されている。国際的な宇宙探索目的地として、地球と重力が異なる月(地球のおよそ1/6)や火星(地球のおよそ1/3)が挙げられているが、その宇宙実験についても有用なハードウェアであり、この日本独自の技術や発明が活躍することが期待される。

文献

- 1) Shiba D *et al.*, Development of new experimental platform 'MARS'-Multiple Artificial-gravity Research System-to elucidate the impacts of micro/partial gravity on mice. *Sci Rep.* 2017 7(1):10837.
- 2) Ishikawa C *et al.*, Effects of gravity changes on gene expression of BDNF and serotonin receptors in the mouse brain. *PLoS One.* 2017 12(6):e0177833.
- 3) Morita H *et al.*, Impact of a simulated gravity load for atmospheric reentry, 10 g for 2 min, on conscious mice. *J Physiol Sci.* 2017 67(4):531-537.
- 4) Shimbo M *et al.*, Ground-based assessment of JAXA mouse habitat cage unit by mouse phenotypic studies. *Exp Anim.* 2016 May 20;65(2):175-87.
- 5) Tateishi R *et al.*, Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice. *PLoS One.* 2015 Oct 29;10(10):e0141650.
- 6) Morita H *et al.*, Feasibility of a Short-Arm Centrifuge for Mouse Hypergravity Experiments. *PLoS One.* 2015 10(7):e0133981.

【重力環境変化が引き起こす前庭系を介する応答】

Vestibular related responses to gravitational change

森田 啓之

Hironobu Morita

Key words

宇宙不応症候群, 起立性低血圧,
筋萎縮, 骨量減少

要約

前庭器官は重力・直線加速度の感知器官である耳石器と回転加速度の感知器官である半規管よりなる。地上では、前庭器は1g環境に適応し、姿勢制御、眼球運動、自律神経・血圧、筋・骨代謝等多様な身体機能調節に関与している。微小重力環境下では、回転加速度の感知器官である半規管への入力には保たれるが、直線加速度の受容器である耳石への入力は欠落する。宇宙滞在そして地上への帰還という過程は、前庭系にとっては今まで経験したことのない重力環境への適応と地上の1gへの再適応の過程である。この適応—再適応の過程で宇宙飛行に伴う医学的問題が起こる。宇宙不応症候群、平衡障害、起立性低血圧、筋萎縮、骨量減少などである。これらの医学的問題に前庭系の可塑的变化が関与している可能性がある。

はじめに

内耳に存在する前庭器官は、直線加速度・重力を感知する耳石器と回転加速度を感知する半規管よりなり、頭部の傾きや回転を感知して姿勢制御（前庭—脊髄反射）、眼球運動（前庭—動眼反射）、自律神経・血圧（前庭—交感神経反射、前庭—血圧反射）等、多くの身体機能調節に関与している。さらに最近、前庭系が筋量・骨量の調節に関与しているという報告がなされ、その機能の多様性に注目が集まっている（図）。しかし、前庭系は可塑性が強いことが知られており、異なる重力環境に曝されると、その重力環境に適応するため、可塑的变化を起こして機能が変化する可能性

がある。前庭系を介する身体機能調節を考えると、その可塑的变化が宇宙酔い、平衡障害、起立性低血圧、筋萎縮、骨量減少等の宇宙飛行に伴う医学的諸問題に関与している可能性がある。本稿では、重力変化により引き起こされる前庭系を介する身体調節機能の可塑的变化について解説する。

1. 短期間微小重力に対する前庭機能変化

微小重力暴露の初期に起こる最も厄介な医学的問題は、宇宙酔い（space motion sickness, 宇宙動揺病）である。微小重力暴露開始から数時間で地上の乗り物酔いに似た症状や空間識失調を呈し、その状態が3—5日間続き、1週間程度で症状は完全に消失する。初めて宇宙飛行をする飛行士の50—70%が罹患すると言われ、ミッション初期のパフォーマンス低下の原因となる。その発症機序として、感覚混乱説（前庭入力、視覚入力、体性感覚入力のミスマッチ）や耳石機能左右非対称説等、前庭系の関与が想定されているため、微小重力環境下での前庭機能が宇宙医学研究の対象として注目されてきた。特に、1983年11月29日—12月8日にスペースシャトルColumbiaで実施されたEuropean Vestibular Experiments¹⁾及び1998年のNeurolab計画²⁾では、前庭系に関する多くの実験が行われた。

地上では、頭部の運動により半規管と耳石器に入力が入るが、微小重力環境下では、回転加速度の感知器官である半規管への入力は保たれるが、直線加速度の受容器である耳石への入力は欠落する。さらに、球形嚢と卵形嚢への入力が共に欠落する状態となるが、こ

岐阜大学大学院医学系研究科 生理学

Department of Physiology, Gifu University Graduate School of Medicine

〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1-1 TEL: 058-230-6300

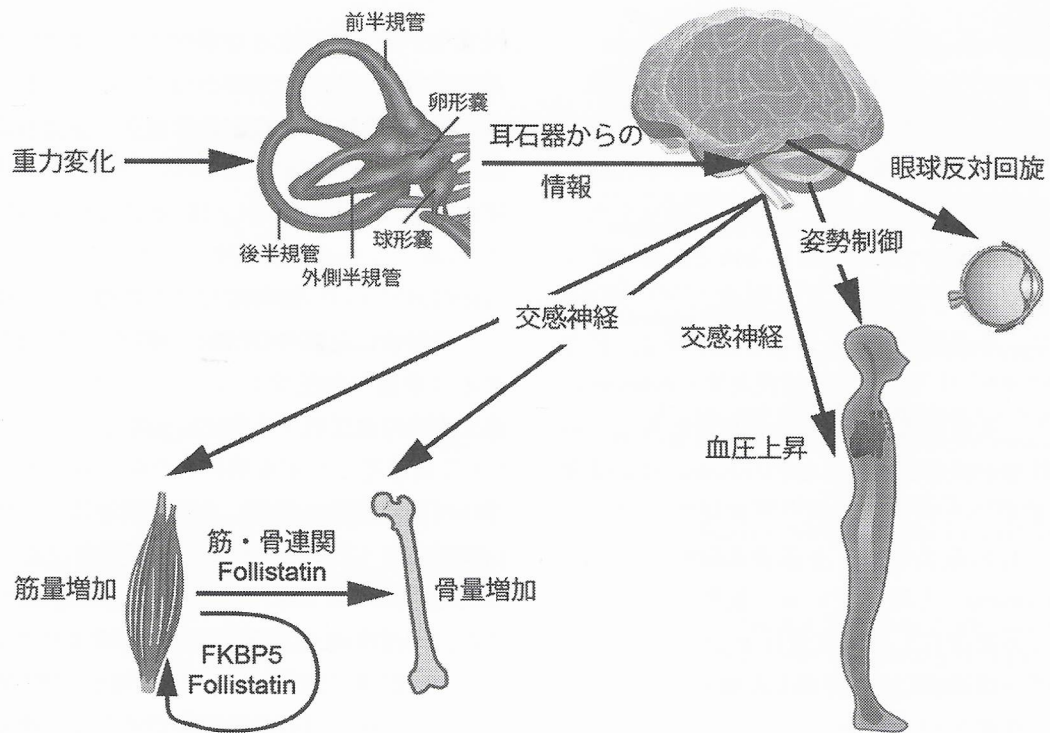


図 耳石器を介する身体機能調節。微小重力環境では耳石器への入力欠落し、これらの調節系が働かなくなる可能性がある。

のような状態は地上ではどのような体位でも起りえない微小重力環境に特有のものである。宇宙環境に対する前庭系の適応は、このような地上とは異なる前庭系の感覚情報と視覚・体性感覚などの他の感覚情報の新しいパターンを基準・標準と見なすことを学ぶ学習プロセスである。

このような微小重力環境の前庭機能に及ぼす影響に関するこれまでの報告をまとめると、①角速度の変化に対する感知閾値は変化しなかったことから、半規管系の閾値は微小重力環境でも変化しないと考えられた。②地上と同じように caloric test による眼振（半規管を介する温度性眼振）が発生した。③直線加速度の変化に対する感知閾値は、飛行中及び帰還直後に上昇し、耳石器のゲインが低下していることが示唆された。④前庭（耳石）-眼反射によって生じる眼球反対回旋（ocular counter rolling）のゲインが僅かに減少した。耳石器のゲイン低下は、入力減少に対する適応とも考えられる。このような前庭系の適応とともに、宇宙酔いの症状は軽減し、宇宙飛行士は微小重力環境下での空間識を獲得していくと考えられる。

2. 地上の重力環境への再曝露

宇宙から地上に帰還直後の宇宙飛行士は自力では立てず、両脇を抱えられるように補助され、頭部をできるだけ動かさないようにしている映像が公開されている (<https://www.youtube.com/watch?v=WVV-EGALWA>)。国際宇宙ステーションでの運動プログラムが充実し、筋力低下が改善されているにも関わらず、自力歩行がままならない帰還直後の症状について医師でもある古川聡宇宙飛行士が興味深いツイートを残している (@Astro_Satoshi)。

- ✓ 2011-11-26 09:40:29 地球帰還当日、気分は最高だが身体はまるで軟体動物のよう。身体の重心がどこだか全く分からず、立ってられない、歩けない。平衡感覚がわからず、下を見ると頭がくらくらして気分が悪くなる。歩くつもりで足を出す、太腿が思っているほど上がっておらずつまづく。
- ✓ 2011-11-27 08:04:47 ドクターの観点から。重力は、耳の奥にある前庭という部分で感知される。前庭がすっかり無重量環境に慣れてしまったため、再び重力に適応するための過程だったのであ

ろう。

- ✓ 2011-11-27 08:07:10 無重量環境では、自分の脚の重さを考えないでよいので、わずかな力で脚を上げることができた。地上でも脳は、わずかに脚の筋肉を動かすことで歩けると判断して指令を出した。しかし、地上では太腿はほとんど上がっておらずつまずきやすかったものと推測。

このように、帰還直後にみられる歩行障害は、筋力の低下だけではなく、平衡障害、推尺異常 (dysmetria) が原因であり、末梢前庭ニューロンの可塑的变化と高次認知機能障害が関与していると思われる。地上帰還直後にも宇宙酔いと同様の症状や平衡障害が起こることから、これらをまとめて宇宙適応症候群 (space adaptation syndrome) と呼んでいる。国際宇宙ステーションに6ヵ月間滞在した宇宙飛行士25名の耳石前庭機能を眼球反対回旋により評価した研究では、眼球の回旋角度が帰還2-3日後および4-5日後には減少し、9-10日後には飛行前値に回復しており³⁾、前庭機能の障害とその回復過程は、宇宙適応症候群の症状改善の過程とよく一致している。

4. 起立性低血圧

2006年9月22日、12日間の宇宙飛行を終え、前日地上に帰還した宇宙飛行士の歓迎式がテキサス州ヒューストンのエリントン空港格納庫で行われていた。Heidemarie Stephanyshyn-Piper 宇宙飛行士が観客の前に挨拶を述べていた時、目がうつろになり言葉が途絶えて、両脇を抱きかかえられるようにして崩れ落ちた (<https://www.youtube.com/watch?v=tK40WwEe1Qc>)。失神発作である。数十秒間横になった後、彼女は立ち上がり再び笑顔で挨拶を始めたが、またしても失神発作を起こしてしまった。彼女に付きそいサポートしていたNASAのフライトサージョンは、「彼女は健康である。彼女に起こったような症状は、宇宙飛行士が地上に帰還した後、地上の重力環境に再適応しようとしている際にみられる、極めて正常な応答である。」と述べた。彼女に起こった失神は、いわゆる立ち眩みと呼ばれるものである。起立に伴い動脈血圧が低下して、脳の血流が低下し、十分な量の血液が脳に供給されなくなることに起因する、一時的な意識消失発作である。

宇宙から帰還後の宇宙飛行士の30-60%に起立性

低血圧が発症することが報告されており、宇宙滞在期間が長くなれば発症頻度が増加することが知られている。機序として、循環血液量減少、圧受容器反射機能低下、心筋萎縮等が報告されているが、最近、耳石前庭系の機能低下も関与していることが明らかになってきた。

耳石前庭系は、姿勢変化時の重力方向変化を感知して、反射性に交感神経活動を増加させて血圧を上昇させる (前庭-血圧反射)。この反射は迅速に起こり、起立直後の血圧低下を防ぐ。国際宇宙ステーションに6ヵ月間滞在した宇宙飛行士の起立時の血圧低下と眼球反対回旋により評価した前庭機能低下の間に有意な相関がある⁴⁾。また、前庭-血圧反射による昇圧応答を測定した報告では、飛行前12 mmHgあった昇圧応答が、帰還直後-2週間後にはほぼゼロとなり、2ヵ月後には前値に回復していた⁵⁾。以上の結果から、宇宙から帰還後は耳石前庭機能が低下し、前庭-血圧反射が全く起こらない状態になり、起立直後の血圧低下の一因となることが考えられる。

4. 筋・骨代謝

かつては、宇宙では地上の骨粗鬆症の10倍のスピードで骨密度が減少し、下腿の筋肉は1日1%ずつ細くなると言われていた。これらの筋・骨量減少は軌道上の運動プログラム充実や骨吸収抑制薬投与により克服されつつあるものの、月や火星への飛行を考えると、機序解明と予防法の確立は喫緊の課題である。その原因として、宇宙での物理的負荷の減少が重要であるのは言うまでもないが、加えて前庭系の関与を示唆する以下の報告がなされている。

末梢前庭器を外科的あるいは化学的に破壊したラットでは、抗重力筋の遅筋線維が減少し⁶⁾、荷重骨の骨量が減少する⁷⁾。前庭破壊による骨量減少は、 β -遮断薬投与により改善する⁸⁾。また、筋肉も交感神経支配を受けており、 β -作動薬投与により筋量が増加することが知られている。これらの結果から、前庭-交感神経反射が筋・骨代謝を調節している可能性がある。宇宙の微小重力環境では、耳石前庭系からの入力が増減し、前庭破壊動物と同じような機序で、筋量・骨量が減少する可能性がある。

重力変化時の筋・骨代謝調節における前庭系の関与

は、過重力実験によっても裏付けられている。マウスを3g環境で飼育するとヒラメ筋の筋量と脛骨の骨量が増加する。これらの増加は、前庭破壊あるいはβ-遮断薬投与により抑制されることから、物理的負荷ではなく、前庭-交感神経反射を介して引き起こされたものと考えられる⁹⁾。また、交感神経を介して筋肉内で発現が増加する液性因子が、筋のみならず骨にも作用する筋・骨連関の存在が示唆されている¹⁰⁻¹²⁾。

おわりに

前庭系は、前庭-脊髄反射、前庭-動眼反射、前庭-交感神経反射、前庭-血圧反射を介して、姿勢制御、眼球運動、血圧調節、筋・骨代謝等種々の身体活動調節に関わっている。可塑的な前庭機能変化により、宇宙不適応症候群、平衡障害、起立性低血圧、筋量・骨量減少等の病態が引き起こされる可能性がある反面、適切に前庭系を刺激することにより、それらの予防・治療に繋がる可能性も秘める。

文 献

- 1) von Baumgarten RJ. European vestibular experiments on the spacelab-1 mission: 1. Overview. *Exp Brain Res.* 1986;64:239-246.
- 2) Highstein SM, Cohen B. Neurolab mission. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9:495-499.
- 3) Hallgren E, Kornilova L, Fransen E, Glukhikh D, Moore ST, Clement G, Van Ombergen A, MacDougall H, Naumov I, Wuyts FL. Decreased otolith-mediated vestibular response in 25 astronauts induced by long-

- duration spaceflight. *J Neurophysiol.* 2016;115:3045-3051.
- 4) Hallgren E, Migeotte PF, Kornilova L, Deliere Q, Fransen E, Glukhikh D, Moore ST, Clement G, Diedrich A, MacDougall H, Wuyts FL. Dysfunctional vestibular system causes a blood pressure drop in astronauts returning from space. *Scientific reports.* 2015;5:17627.
- 5) Morita H, Abe C, Tanaka K. Long-term exposure to microgravity impairs vestibulo-cardiovascular reflex. *Scientific reports.* 2016;6:33405.
- 6) Luxa N, Salanova M, Schiffli G, Gutschmann M, Besnard S, Denise P, Clarke A, Blotner D. Increased myofiber remodelling and nfatc1-myonuclear translocation in rat postural skeletal muscle after experimental vestibular deafferentation. *J Vestib Res.* 2013;23:187-193.
- 7) Levasseur R, Sabatier JP, Etard O, Denise P, Reber A. Labyrinthectomy decreases bone mineral density in the femoral metaphysis in rats. *J Vestib Res.* 2004;14:361-365.
- 8) Vignaux G, Besnard S, Ndong J, Philoxene B, Denise P, Elefteriou F. Bone remodeling is regulated by inner ear vestibular signals. *J Bone Miner Res.* 2013;28:2136-2144.
- 9) Kawao N, Morita H, Obata K, Tamura Y, Okumoto K, Kaji H. The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice. *Physiological reports.* 2016;4.
- 10) Kawao N, Morita H, Nishida K, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Effects of hypergravity on gene levels in anti-gravity muscle and bone through the vestibular system in mice. *J Physiol Sci.* 2017.
- 11) Kawao N, Morita H, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Role of follistatin in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice. *Journal of cellular physiology.* 2018;233:1191-1201.
- 12) Shimoide T, Kawao N, Tamura Y, Morita H, Kaji H. Novel roles of fkbp5 in muscle alteration induced by gravity change in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479:602-606.

< 細胞 ニュース >

◇ 第22回日本肝臓学会大会 JDDW 2018

開催年月日：2018年11月1日(木) - 4日(日)
 代表者：榎本 信幸(山梨大学)
 開催地：神戸市中央区
 会 場：神戸コンベンションセンター
 事務局連絡先：JDDW 事務局
 TEL：03-6550-8751 FAX：03-6550-8752
 常設事務局 URL：<http://www.jddw.jp/>
 開催案内 URL：<http://www.jddw.jp/jddw2018/index.html>
 E-mail：kobe2018@jddw.jp
 備 考：第26回日本消化器関連学会週間として、第60回日本消化器病学会大会、第96回日本消化器内視鏡学会総会、第16回日本消化器外科学会大会、第56回日本消化器がん検診学会大会と同時開催

◇会長講演
 「好酸球性消化管疾患の研究の現状」
 演者：木下 芳一(島根大学・2内科)
 司会：千葉 勉(関西電力病院)

◇パネルディスカッション
 「消化管疾患と肝疾患の関連-消化管・肝臓間の相互の影響-」
 司会：渡辺 純夫(順天堂大・消化器内科)
 小池 和彦(東京大大学院・消化器内科学)
 「Hp未感染胃癌の現状」
 司会：村上 和成(大分大・消化器内科)
 妹尾 浩(京大大学院・消化器内科学)

他多数

【宇宙環境ストレスがリンパ組織胸腺に与える影響】

Impact of space environments on the thymus

秋山 泰身¹⁾・堀江 健太¹⁾・関 崇生¹⁾・秋山 伸子²⁾

Taishin Akiyama

Kenta Horie

Takao Seki

Nobuko Akiyama

Key words

胸腺, T細胞, 重力, 宇宙環境

要約

宇宙へのフライトと滞在による環境の変化は免疫系に影響する。リンパ組織の胸腺は、外部の環境変化により影響を受けやすい器官の一つである。筆者らは、宇宙フライトによる環境変化や精神的ストレス（宇宙環境ストレス）が、胸腺に及ぼす影響とその介在機構の詳細を調べることを最終目的とし、マウスを用いた14日間の過重力実験と尾部懸垂実験を行った。過重力も尾部懸垂も、胸腺の未熟なT細胞を一過性に減少させる。過重力による減少は14日後には回復する。一方、14日間の尾部懸垂は、未熟なT細胞だけでなく、分化が完了したT細胞も減少させた。さらに、胸腺で自己応答性T細胞の除去する上で必要な髄質上皮細胞も、過重力や尾部懸垂により減少した。これらの結果は、宇宙環境ストレスが、胸腺によるT細胞の産生と自己免疫を抑制する機能を障害する可能性を示しており、宇宙研究による検証が今後の重要な課題となる。

はじめに

2030年代にNASAは火星への有人飛行を計画している。また日本でも、民間会社による宇宙旅行の計画が進行中であり、近い将来、宇宙旅行はより身近になるであろう。

人は宇宙フライトにより、重力変化や宇宙放射線など、劇的な環境変化を経験する。また閉所空間の生活や、突発的な事故に対する不安などから、精神的ストレスも大きい。本稿では、これら宇宙フライトの際

の環境変化や精神的ストレスなどを“宇宙環境ストレス”としている。

宇宙環境ストレスは生体に様々な影響を与える¹⁾。安全な宇宙フライトのためには、その影響を詳細に調べ、必要であれば対処法を講じることが重要である。現在でも、無重力状態で起きる筋骨格系の機能低下を軽減するため、トレッドミルによる運動などの対処方法が採られる。宇宙環境ストレスの影響を調べるため、国際宇宙ステーションなどで宇宙医学研究が行われてきた。一方で、費用面の制約から、宇宙実験を模擬した様々な地上実験も行われている。

1. 宇宙環境ストレスと免疫系

生体防御システムである免疫系も、宇宙環境ストレスにより影響を受ける²⁾。宇宙滞在は潜在性ヘルペスウイルスを再賦活化すると報告されたが、これは宇宙環境ストレスにより免疫機能が低下したためと考えられている。リンパ球など免疫担当細胞や血中のサイトカインに与える影響が、宇宙飛行士の血液サンプルなどを使って調べられてきた。例えば、帰還した宇宙飛行士の血液から採取した単核細胞では、T細胞抗原レセプター(TCR)への刺激によるサイトカインの誘導が低下する。さらに無重力を経験したT細胞では、TCR刺激による細胞増殖が抑制されることも報告された。

加えて宇宙環境ストレスは、免疫応答や免疫担当細胞の産生に重要なリンパ組織にも影響する可能性がある。最も影響すると考えられているリンパ組織の一つが胸腺である。

理化学研究所 生命医科学研究センター 1)免疫恒常性研究チーム 2)疾患遺伝研究チーム

RIKEN Center for Integrative Medical Sciences 1)Laboratory for Immune Homeostasis

2)Laboratory for Immunogenetics

URL: http://www.ims.riken.jp/lab/28/index_j.html E-mail: taishin.akiyama@riken.jp

2. 胸腺における T 細胞の分化と選択

胸腺は T 細胞を産生する 1 次リンパ組織であり、その構造は皮質と髄質に分かれる。骨髄由来の前駆細胞は皮質に流入して分化・増殖を開始し、TCR と表面マーカー CD4, CD8 の両方を発現する未熟な T 細胞 (CD4, CD8-Double Positive thymocytes ; CD4CD8DP) に分化する。ついで髄質に移動し、CD4 あるいは CD8 のどちらかを発現する T 細胞へと分化する (図 1)。

この分化過程に、胸腺を構成する上皮細胞 (胸腺上皮細胞) が必要である³⁾。胸腺上皮細胞は、皮質に局在する上皮細胞 (皮質上皮細胞) と、髄質に局在する上皮細胞 (髄質上皮細胞) に分類される。皮質上皮細胞は、前駆細胞を分化・増殖させるとともに、自己の主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex ; MHC) を認識する T 細胞を生存させる。

一方、髄質上皮細胞は、自己免疫を抑制する上で重要である。胸腺で T 細胞が分化する際、自己組織の抗原に反応する T 細胞 (自己応答性 T 細胞) が一定の頻度で生じる。これらが胸腺外に流出すると、自己免疫疾患の原因となるが、通常、その多くは胸腺内で除去される。髄質上皮細胞は、組織特異的なタンパク質 (Tissue-Specific Antigens; TSA) を異所的に発現、抗原提示し、それらを認識する T 細胞を除去する。結果として、TSA を認識する自己応答性 T 細胞は胸腺内であらかじめ除去され、自己免疫疾患の発症が抑制される。転写制御因子 Autoimmune Regulator (Aire) は、髄質上皮細胞で高く発現し、TSA の発現を制御する⁴⁾。重要なことに、Aire の機能不全は自己免疫疾患 Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy (APECED) の発症原因である。すなわち髄質上皮細胞の機能は、自己免疫疾患の発症抑制に必須である。

胸腺は様々なストレスにより萎縮する。宇宙環境ストレスも胸腺の萎縮を引き起こすことが、スペースシャトルなどで飼育したマウスの実験により示された⁵⁾。一方、マウスと異なり、ヒトで胸腺へ影響を直接調べることは難しい。最近、米国のグループは国際宇宙ステーションに滞在した宇宙飛行士の血中単核細胞で TREC (T cell Receptor Excision Circle) アッセイを行い、胸腺で新たに産生した T 細胞の血液内変動について調

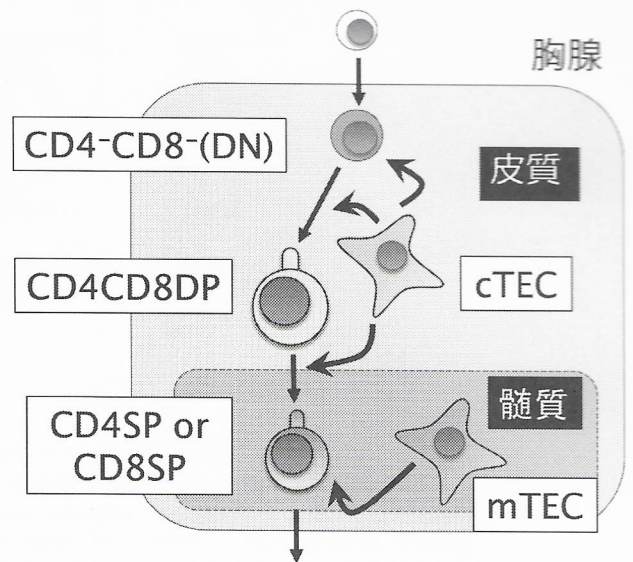


図1 胸腺内における T 細胞分化の模式図
骨髄由来の前駆細胞 CD4-CD8-(DN) は胸腺皮質で増殖し、T 細胞抗原レセプター (TCR) に加えて表面マーカー CD4 と CD8 の両方を発現する未熟な T 細胞に分化する。この過程には胸腺皮質上皮細胞 (cTEC) が必要である。未熟な T 細胞は、髄質領域に移動すると同時に、CD4 あるいは CD8 のどちらかを発現する成熟した T 細胞に分化する。髄質上皮細胞は、分化した T 細胞の中から、自己応答性 T 細胞を除去する。

べた⁶⁾。その結果、宇宙からの帰還直後には、胸腺で新生した T 細胞が減少していた。すなわち、宇宙飛行士においても、宇宙環境ストレスによる胸腺の機能障害が起きており、マウスで見られた胸腺萎縮が起きた可能性がある。

以上の結果は、宇宙環境ストレスが胸腺機能へ影響することを示唆するが、どのような機構で、どの細胞に影響するか、詳細は不明である。私たちは、宇宙環境ストレスが、胸腺に与える影響と、その機構を詳細に調べることを最終目的とし、その準備段階として、2 種類の地上実験を行ってきた^{7,8)}。

3. 過重力がマウス胸腺に与える影響

宇宙へ滞在する際、地球上とは異なる環境の一つが重力の変動である。地球から離れるほど、重力場の影響は小さくなり、さらに周回軌道上は、ほぼ無重力である。一方で、地球から打ち上げのための加速時には、逆に大きな重力を経験する。

筆者らは、マウスを飼育可能な遠心機を用いて過重力 (2G) をマウスに負荷した。過重力を開始して

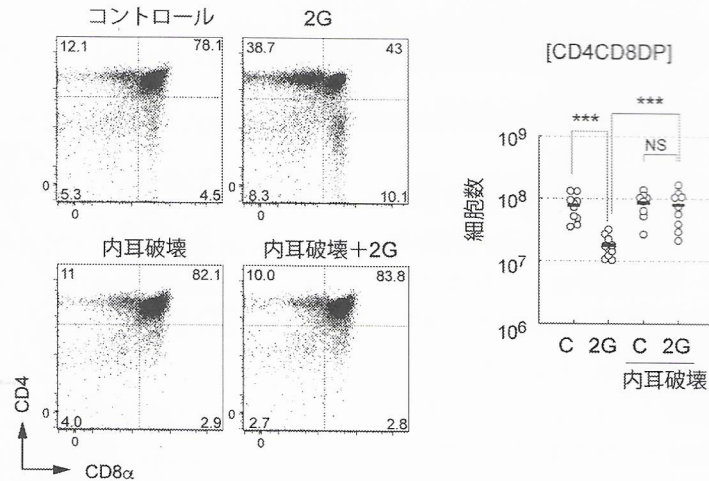


図2 マウス胸腺 T細胞への過重力 (2G) 負荷の影響
 マウスへ2Gを負荷して3日後に、胸腺内のCD4CD8DP (CD4とCD8の両方を発現) が減少する。この減少は内耳を破壊したマウス (内耳破壊) では起きない (Tateishi *et al.*, PLoS One. 10:e014165, 2015より改変)。左は典型的なフローサイトメーター解析の結果。右グラフは結果をまとめている。***はStudent's t-testによる検定でP<0.001。NSは有意な違いがない (P>0.05) を示している。

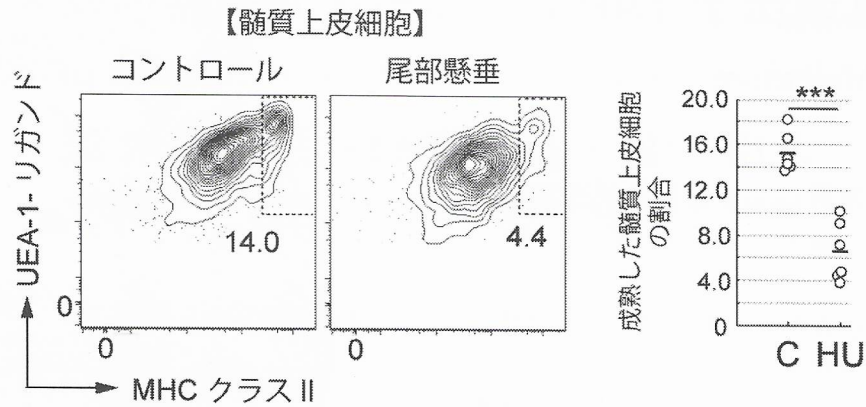
3日後に、マウスの胸腺は萎縮しており、胸腺のT細胞を解析すると、CD4CD8DPが大きく減少した。さらに過重力負荷14日後には、胸腺の大きさはほぼ回復し、CD4CD8DP細胞の減少も回復していた。すなわち過重力負荷は、一過性のCD4CD8DPの減少を引き起こす。ヒトもマウスも重力変動を内耳前庭器官で感知する。過重力によるCD4CD8DPの減少が内耳による感知を介することを検証するために、外科的に内耳を破壊したマウスに対して遠心実験を行なった。その結果、内耳破壊マウスは、3日後でもCD4CD8DP細胞が減少しなかった (図2)。すなわち、マウスは内耳を介して過重力を感知し、そのストレスによりCD4CD8DPが一過性に減少すると結論した。

さらに胸腺上皮細胞についても検討した。フローサイトメーターで解析したところ、過重力負荷して3日後に、髄質上皮細胞が減少した。また通常の胸腺では存在比率が少ない、ケラチン5とケラチン8の両者を高く発現する上皮細胞の割合が増加した。これらは14日後でも観察されることから、過重力による胸腺上皮細胞の変化は持続的と考えられる。また、胸腺上皮細胞の変動も、内耳破壊マウスでは起きないため、T細胞と同様に内耳による重力感知を介すると結論している。これらの結果は、過重力による胸腺への障害は、内耳機能を調整することで克服可能であることを示唆する。

4. 尾部懸垂がマウス胸腺に与える影響

尾部懸垂は、マウスの尻尾を人為的につり上げ、後肢を持ち上げた状態で維持する実験方法である。尾部懸垂は、後肢の筋骨格系への体重負荷がない、頭部への体液移動、活動の制約のためのストレスの点で、宇宙滞在を一部模擬した地上実験と考えられている。また人においても、長期にわたり臥床を維持すること (ベッドレスト) により同様な地上研究が行われてきた⁹⁾。

これまでに、マウスの尾部懸垂を開始して3日後に胸腺が萎縮すること、その萎縮した胸腺では、CD4CD8DPの細胞数がアポトーシスにより選択的に減少することが報告されている⁹⁾。筆者らは、より長期の影響を調べるために、14日間の尾部懸垂をマウスに負荷し、胸腺を解析した。その結果、3日間の尾部懸垂と同様、14日間尾部懸垂したマウスの胸腺は萎縮していた。しかしながら、14日間の尾部懸垂では、CD4CD8DPが選択的に減少することはなく、全ての細胞画分がほぼ同等に減少していた。さらに胸腺上皮細胞を、フローサイトメーターや免疫組織染色法により解析したところ、AireやMHCクラスIIの発現が高い、成熟した髄質上皮細胞の割合が有意に減少していた (図3)。また尾部懸垂したマウス胸腺の遺伝子発現をRNA-seq法で調べたところ、髄質上皮細胞で発現するTSAの一部が有意に減少していた。以上まとめると、14日間の尾部懸垂は、胸腺T細胞を非選択



マウスを14日間尾部懸垂するとMHCクラスIIを高く発現する成熟した髄質上皮細胞の割合が減少する。(Horie et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 501:745, 2018 より改変)。左図は典型的なフローサイトメーター解析の結果。右はそれらをまとめたグラフであり、髄質上皮細胞中の成熟した髄質上皮細胞の割合を示す。右グラフは結果をまとめており、Cはコントロール、HUは尾部懸垂を略している。***はStudent's t-testによる検定でP<0.001。

的に減少させ、一方で Aire や TSA を発現する髄質上皮細胞を選択的に減少させる。すなわち、尾部懸垂は、自己応答性 T 細胞を除去する髄質上皮細胞の機能を損なう可能性がある。

おわりに

これまでの地上予備実験では、過重力や尾部懸垂など宇宙環境ストレスを模擬した状況は、胸腺 T 細胞のみならず、胸腺上皮細胞へ影響することが明らかとなった。胸腺上皮細胞は T 細胞の分化だけでなく、自己応答性 T 細胞の除去にも重要である。宇宙環境ストレスにより、これらの機構が影響を受ける可能性があり、さらなる検証が必要である。

現在、国際宇宙ステーションで飼育したマウスから胸腺を取得し¹⁰⁾、免疫組織染色法による構造解析や RNA-seq 法による遺伝子発現解析を行なっている。今後、地上実験の結果を考慮しつつ、宇宙環境ストレスによる胸腺機能の影響と、それを介在する機構が明らかになると予想している。

文献

1) Demontis GC, Germani MM, Caiani EG, et al., Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment. Front. Physiol. 8:547 (2017).

2) Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit? J. Leukoc. Biol. 86:1027-1038 (2009)

3) Abramson J and Anderson G. Thymic Epithelial Cells. Annu. Rev. Immunol. 35:85-118 (2017)

4) Abramson J and Husebye ES. Autoimmune regulator and self-tolerance - molecular and clinical aspects. Immunol. Rev. 271:127-140 (2016).

5) Gridley DS, Mao XW, Stodieck LS, et al., Changes in mouse thymus and spleen after return from the STS-135 mission in space. PLoS One. 8 :e75097. (2013)

6) Benjamin CL, Stowe RP, St John L, et al., Decreases in thymopoiesis of astronauts returning from space flight. JCI Insight. 1:e88787 (2016).

7) Tateishi R, Akiyama N, Miyauchi M, et al., Hypergravity Provokes a Temporary Reduction in CD4+CD8+ Thymocyte Number and a Persistent Decrease in Medullary Thymic Epithelial Cell Frequency in Mice. PLoS One. 10:e0141650 (2015)

8) Horie K, Kudo T, Yoshinaga R, et al., Long-term hindlimb unloading causes a preferential reduction of medullary thymic epithelial cells expressing autoimmune regulator (Aire). Biochem. Biophys. Res. Commun. 501:745-750 (2018).

9) Wang KX, Shi Y, and Denhardt DT., Osteopontin regulates hindlimb-unloading-induced lymphoid organ atrophy and weight loss by modulating corticosteroid production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:14777-14782 (2007).

10) Shiba D, Mizuno H, Yumoto A, et al., Development of new experimental platform 'MARS'-Multiple Artificial-gravity Research System-to elucidate the impacts of micro/partial gravity on mice. Sci Rep. 7:10837 (2017).

【重力拮抗遺伝子 YAP による三次元臓器形成メカニズム】

Mechanism of YAP-mediated 3D organogenesis against gravity

北川 孝雄・浅岡 洋一・古谷-清木 誠

Takao Kitagawa

Yoichi Asaoka

Makoto Furutani-Seiki

Key words

Yes Associated Protein (YAP),
三次元臓器, アクチン骨格,
メカノホメオスターシス

要 約

私たちの体は絶えず重力に曝されているにもかかわらず、三次元の立体臓器を形成し重力に押しつぶされることはない。将来人類が宇宙環境に適応・生存し続けていくためには、私たちヒトを含めた地上生命がどのようにして重力に拮抗し、または利用して生命活動を維持しているのかを知る必要がある。近年、重力刺激が細胞および個体レベルで増殖、分化、発生に影響を与えていることが明らかとなっている。著者らはモデル生物である小型魚類メダカを用いた変異体スクリーニングから、重力に拮抗できず体が扁平化する *hirame* 変異体を単離し、その原因遺伝子が転写共役因子 Yes Associated Protein (YAP) であることを見出した。本総説では YAP による重力に拮抗した立体臓器形成メカニズムについて概説する。

はじめに

地球上の生物は絶えず重力に曝されているが、重力に押しつぶされることなく立体臓器を形成することができる。英国の数理生物学者 D'Arcy Thompson は、「仮に地球の重力が2倍であったとしたら、私たちヒトは2足歩行ができずにトカゲのような平らな体でノソノソと歩いていただろう。また重力(外力)とそれに拮抗する細胞および組織の力(内力)の均衡がとれる

ことによってはじめて立体臓器を構築することができる。」と記している¹⁾。

人類が宇宙に進出できるようになって半世紀以上がたつ。この間人類は今まで経験してこなかった宇宙環境に長期滞在できるようになった。その結果として、宇宙飛行士は次の3つの変化に曝されることとなった²⁾。一つ目は宇宙船から出ることのできない閉鎖環境での心理的な変化であり、二つ目は地球上では防護されてきた宇宙放射線の影響である。そして三つ目は無重力下での体内組織の変化である。無重力環境においては、宇宙飛行士の筋肉の萎縮や骨密度の低下など身体に著明な変化が引き起こされることから、筋肉や骨は機械的ストレスの影響を受けやすい運動器官として長年メカノバイオロジーの研究対象とされてきた。特に近年では筋細胞を宇宙で培養することが可能となり、骨格筋細胞自体による重力感知のメカニズムの理解が進みつつある³⁾。一方で、重力に抗して立体臓器を形成・維持するためのメカニズム(メカノホメオスターシス)については依然として不明な部分が多い。このような背景のもと、著者らは最近メカノホメオスターシスを制御するマスター遺伝子として YAP を同定した。そこで本章では細胞外環境から受ける力学的刺激のトランスデューサーとしての YAP について概説し、メダカ変異体 *hirame* (*hir*) から明らかになった YAP のメカノエフェクター：重力拮抗メカニズムについて紹介する。

山口大学 大学院医学系研究科 システムズ再生・病態医化学講座

Department of Systems Biochemistry in Pathology and Regeneration, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

〒755-8505 山口県宇部市南小串 1-1-1 TEL: 0836-22-2213

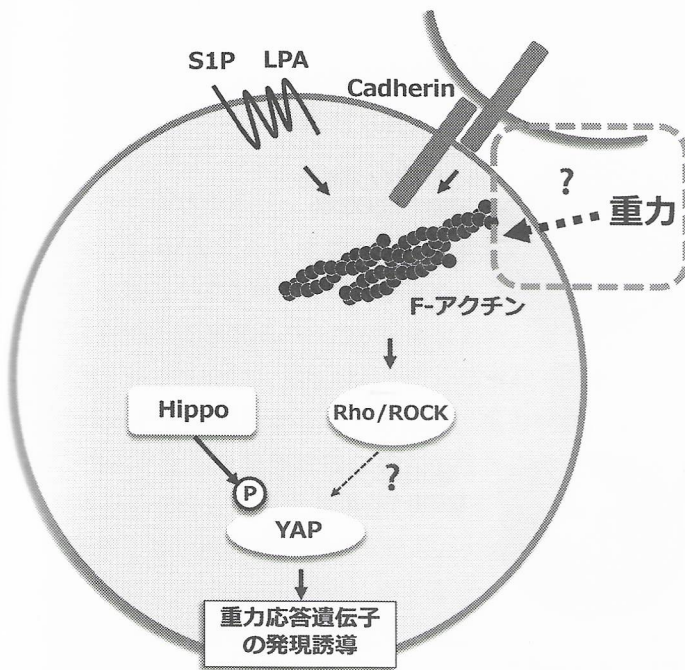


図1 重力刺激による YAP の活性化モデル
重力は Cadherin などの細胞接着分子あるいは細胞膜直下のアクチン骨格に作用することにより Rho/ROCK を活性化し、最終的に YAP の活性化を惹起することで重力応答遺伝子の発現が誘導されると考えられる。

1. 細胞外基質の硬さと Hippo-YAP を制御するメカニズム (図1)

Hippo-YAP シグナルは、細胞外接着、ホルモン刺激、栄養シグナル、張力刺激などにより、細胞の増殖・分化・遊走などをコントロールする器官サイズ制御シグナルとして知られる。YAP は脱リン酸化状態では核移行し転写共役因子として遺伝子発現を活性化する一方、上流の Mst1/2, Lats1/2 キナーゼカスケードによるリン酸化を受けると、細胞質にとどめられることにより不活性化される。近年、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) やリゾフォスファチジン酸 (LPA) などの多様な細胞外刺激により活性化した Rho/ROCK を通じて、YAP はアクチンストレスファイバー形成シグナルを感知することが示された⁹⁾。さらに、細胞外基質が硬くなるとアクチンストレスファイバーを介して YAP が活性化することが Dupont らにより見出された⁹⁾。重力刺激を受けることにより細胞は硬くなりアクチンストレスファイバーが形成されることから、重力刺激が YAP を活性化することが想定される。このように YAP は細胞外環境から受ける物理的シグナルのトランスデューサーとして重力などの力学的刺激と遺伝子発

現の橋渡しの役割を担い、細胞が周囲の物理特性に応答するためのシグナル伝達分子として機能すると考えられる。

2. 三次元の臓器形成に異常を呈するメダカ変異体 *hirame* (*hir*)

今からおよそ 1 世紀前に D'Arcy Thompson は、地球上の生物の形態は重力に強く影響を受けているとの仮説を提唱した¹⁰⁾。だが、これまで重力拮抗メカニズムを直接的に個体レベルで解析できるモデル生物が存在しなかったため、長きにわたりこの仮説を検証することは困難であった。このような背景のもと、著者らは体の形態形成に関する全く新しいメカニズムを見出すために、メダカを用いて表現型を指標にした網羅的な変異体スクリーニングを世界で初めて実施した⁶⁾。同定された 2,500 余りの胚性致死変異体の中で著者らが注目した *hir* 変異体は、重力に抗した体の形作りができないため体が扁平化するという、線虫からマウスを通して例を見ない、既知の発生学的メカニズムでは説明不可能な表現型を示した⁷⁾。具体的には *hir* 変異体は 1) 発生の進行につれて神経管や体節などの上皮組織の三次元形態を維持することができないことに加え、2) 組織配置の異常として、眼のレンズが網膜神経上皮に陥入することなく網膜から離脱するといった特徴的な表現型を示す。その後のポジショナルクローニングにより *hir* 変異体の原因遺伝子は YAP をコードしていることが判明した⁷⁾。

3. *hirame* 変異体での組織張力低下と組織配置異常

著者らは *hir* 変異体の詳細な観察過程で、体の扁平化の方向が胚ごとに微妙に異なることに気がつき、*hir* 胚を地球の重力に対して様々な方向に向けて発生させたところ、*hir* 胚が常に重力方向へ崩壊することを突き止めた。これは、まさに D'Arcy Thompson が予言した重力拮抗メカニズムに異常を呈する初めての動物モデルになりうると著者らは直感した。実際、著者らはピペット吸引法やレーザー切断法など組織・個体レベルでの力学特性を計測する手法を用い、YAP が重力に拮抗するための組織張力を生み出すアクトミオシンの

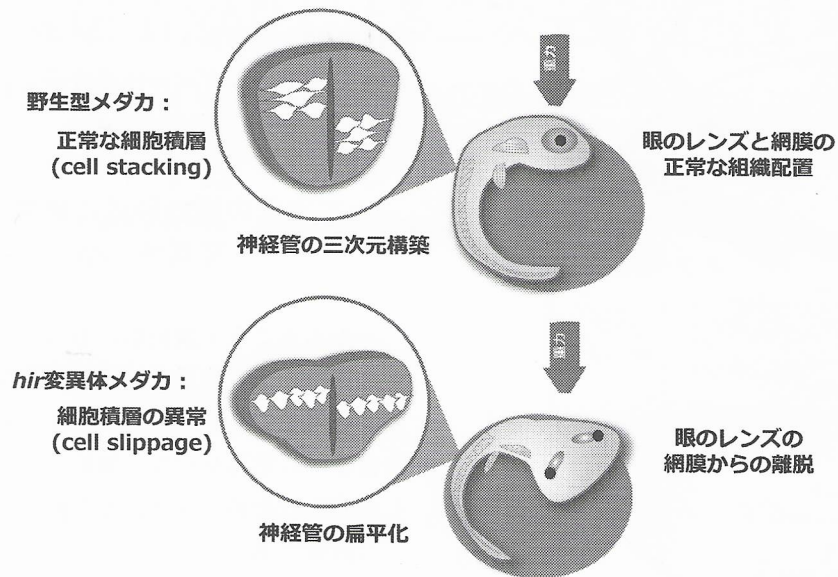


図2 メダカ *hir* 変異体の主要な表現型
hir 変異体の神経管の形成過程では、組織張力の異常により分裂後の娘細胞の位置関係にずれ (cell slippage) が生じることで、細胞積層 (cell stacking) が正常に起こらず神経管が扁平化したと考えられる。

活性を制御していることを見出した。これに加えて単一細胞レベルのライブイメージング解析から、*hir* 変異体では組織張力の異常により細胞の積み重ね (cell stacking) が正常に起こらないため、結果として神経管などの上皮組織が扁平化したと考えられた (図2)。

眼形成過程におけるレンズと眼杯の協調的な形態形成には、レンズ-眼杯間のフィロポディアが重要な機能を果たしていることが既に知られていたが、興味深いことに *hir* 変異体ではこのフィロポディアの形成がほとんど認められなかった。このレンズ-眼杯間のフィロポディア形成には、アクトミオシンだけでなくフィブロネクチン (FN) - インテグリンシグナルも大きく関与している⁸⁾。実際、野生型胚においてはレンズ-網膜間に重合化したFN線維の形成が確認されたが、*hir* 変異体においてはFNの正常な重合化はほとんど認められず、インテグリンシグナルも異常をきたしていた。さらに、FNのドミナントネガティブ体⁹⁾を野生型胚に導入しFNの重合化を阻害すると、レンズが眼杯から外れる様子が観察された。以上から、YAPはアクトミオシンの活性制御を通じて、FNの重合化とインテグリンシグナルの活性化を引き起こし、レンズと網膜の正常な配置の制御においても重要な役割を果たしていると考えられる。

4. 重力拮抗メカニズムとしての YAPメカノホメオスタシス

上述のメダカで発見されたYAPの新機能がヒトにおいても進化的に保存されているかどうかを確かめるため、著者らはヒト網膜色素上皮由来hTERT-RPE1細胞の三次元スフェロイド培養系を用いてYAPのノックダウン解析を試みた。その結果、YAPをノックダウンしたスフェロイドは*hir*変異体と同様に外力に対する耐性が低く、実際にアクトミオシン活性の低下とFNの重合化不全も認められた。さらにマイクロアレイ解析から、YAPノックダウンスフェロイドにおいて発現低下する遺伝子としてRhoGAPのひとつであるARHGAP18を同定した。そこでARHGAP18のノックダウンスフェロイドを解析した結果、上記のYAPノックダウンスフェロイドと同様の異常が観察されたことから、YAPがARHGAP18の発現を介してアクトミオシンの活性をコントロールしていると考えられた⁷⁾。これまでYAPはメカノトランスデューサーとして細胞の増殖および分化を制御することが知られていたが、*hir*変異体の解析によりYAPがメカノエフェクターとしてフィードバックループを形成し、重力に抗した組織メカニクスの恒常性維持を担う中心分子であることが新たに明らかとなった¹⁰⁾ (図3)。

おわりに

著者らが見出したメダカ *hir* 変異体の解析から YAP が ARHGAP18 を介してアクチン骨格形成をフィードバック制御する仕組みが明らかとなり、YAP を介した立体臓器の構築機構の一端が解明された。重力刺激が F-アクチンを介した細胞骨格形成を活性化し、その刺激が YAP を活性化するのであれば、重力刺激によって YAP を介した立体臓器の拡大が起きることが期待される。著者らは現在、無重力環境下での *hir* 変異体の解析とヒト臓器拡大のメカニズムの解明のため、国際宇宙ステーション (ISS) の「きぼう」日本実験棟内における宇宙実験を計画している。今後、これら宇宙実験を通じて重力と YAP をつなぐ分子実体を明らかにし、立体臓器構築メカニズムのさらなる解明を目指したい。

謝辞

メダカ突然変異体スクリーニングは、近藤寿人教授のご指導のもとに行われました。Carl-philipp Heisenberg 教授にはメダカ変異体の表現型解析にあたり大変お世話になりました。また、本文の内容の一部は、科研費 16H01643 の助成を受けた研究を基礎にしています。この場を借りて心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Thompson DW, On Growth and Form. Cambridge University Press, Cambridge, UK, (1917).
- 2) White RJ, and Averner M, Humans in space. Nature, 409: 1115-1118 (2001).
- 3) 二川健. メカノバイオロジー - 曾我部正博編. 113-124 (2015).
- 4) Yu FX, Zhao B, and Guan KL, Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. Cell, 163: 811-828 (2015).
- 5) Dupont S, *et al.*, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. Nature, 474: 179-183 (2011).
- 6) Furutani-Seiki M, *et al.*, A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. Mech Dev., 121: 647-658 (2004).
- 7) Porazinski S, *et al.*, YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. Nature, 521: 217-221 (2015).
- 8) Chauhan BK, *et al.*, Cdc42- and IRSp53-dependent contractile filopodia tether presumptive lens and retina to coordinate epithelial invagination. Development. 136: 3657-3667 (2009).
- 9) McDonald JA, *et al.*, Fibronectin's cell-adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast pericellular matrix. J Biol Chem. 262: 2957-2967 (1987).
- 10) Asaoka Y, and Furutani-Seiki M, YAP mediated mechano-homeostasis - conditioning 3D animal body shape. Curr Opin Cell Biol. 49: 64-70 (2017).

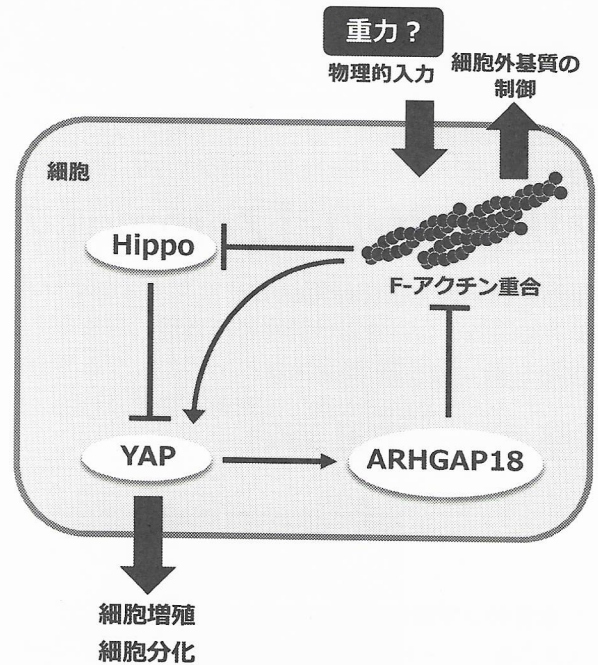


図3 YAP を中心としたメカノホメオスタシス制御機構のモデル

重力などの細胞外からの物理的刺激は F-アクチンの重合を促進し、Hippo 依存性的および非依存性的な経路を通じて YAP の活性化を引き起こすと考えられる (メカノトランスデューサーとしての YAP)。活性化した YAP は、ARHGAP18 遺伝子の発現誘導を介してアクチノモシ活性を抑制し、FN などの細胞外基質を変化させ、その後 YAP の活性は再び恒常状態に戻る (メカノエフェクターとしての YAP)。こうした YAP を中心とした負のフィードバック機構により、細胞は常に自ら置かれた物理環境の変化を感知し適応することができる。→は促進作用、-は抑制作用を示す。

< 細胞 ニュース >

◇ 第 12 回 IIRS 可視化技術ワークショップ

開催年月日: 2018 年 11 月 10 日 (土)
 開催地: 東京都文京区
 会場: 東京大学 武田ホール (武田先端知ビル 5F)
 事務局連絡先: 総合画像研究支援
 TEL 03-3515-6477
 開催案内 URL: <http://www.jiirs.org/index.html>

◇ 第 12 回 IIRS 可視化技術ワークショップ

「病原細菌、モリクテス鋼にみられる三種の運動メカニズム」
 演者: 宮田 真人 (大阪市立大学大学院)
 「生体分子の構造ダイナミクス 1 分子計測法 & 微小リアクタを用いたデジタル分析技術」
 演者: 野地 博行 (東京大学工学部)

◇ 第 18 回アカデミックサロン

オーガナイザー: 澤口 朗 (宮崎大学医学部)

他多数

クリノスタット「Zeromo」のご紹介

Microgravity culture device

株式会社北川鉄工所 開発本部

石原 玲一・市田 春治

要 約

宇宙実験は実験期間が限られている事と費用的な負担が大きい為、ハードルが高い実験である。しかし、模擬的な微小重力環境を生成できるクリノスタットであれば、手軽に宇宙実験の予備実験を行うことができるため注目されている。本稿では、模擬微小重力環境及び過重力環境下で研究可能なクリノスタット、Zeromo(ゼロモ)を紹介する。

はじめに

宇宙飛行士が長期間宇宙に滞在すると、筋骨格系に及ぼす影響があり、筋萎縮や骨密度の低下が引き起こされると言われている。また、植物の芽や根も重力の影響を受けることが知られており、微小重力環境下で動物や植物がどのような影響を受けるかの研究が進められている。微小重力環境の実験は、宇宙実験の他、航空機を利用したパラボリックフライトや落下試験があるが、いずれも微小重力環境を保てる時間は短く、費用負担も大きい。クリノスタットは、手軽に長時間の実験に使用できるため、100年以上前から、植物の重力実験装置として利用されてきた。近年では動物細胞や組織での研究も進められており、本稿では、微小重力環境細胞培養装置「Zeromo」の機構・特徴及び活用例などを述べる。

1. 微小重力環境細胞培養装置「Zeromo」

1) 機器

Zeromo(本装置)を図1aに示す。本装置は2軸機構になっており、試料を三次元で回転させることで、試料

Key words
微小重力, 過重力, 重力応答

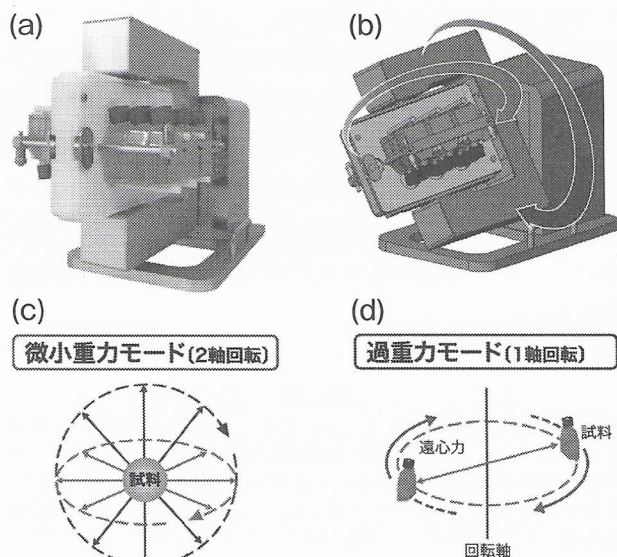


図1 (a) Zeromo 本体 (b) 動作イメージ図
(c, d) 各モードのイメージ図

に作用する重力ベクトルを均等に分散させ(図1c), 模擬的に微小重力環境を生成する装置である。また、微小重力だけではなく、1軸回転による遠心力で2~5Gの過重力環境(図1d)を生成できる機能も有している。

2) 特徴

本装置は、動物細胞や植物を搭載して実験するため、CO₂ インキュベーター及び人工気象器に設置して使用することが可能である。標準で搭載できる実験容器は、細胞培養用のフラスコだが、シャーレや植物生育用のプレートなど研究者の要望に合わせた搭載ラックをカスタマイズすることが可能で、搭載できる試料の幅を広げている。また、操作はタッチパネルで行うが、運転・停止、微小重力・過重力モードの切替、速度設定など、簡単な操作となり、初めてでも容易に使用できる装置である。

Reiichi Ishihara, Shunji Ichida :
Development Division, Kitagawa Corporation
〒726-8610 広島県府中市元町77-1 TEL: 0847-40-0563

2. 研究利用領域

先に述べたように、本装置は、模擬微小重力と過重力環境を生成できるため、重力応答をはじめ物理刺激をテーマとしている研究者にも使用されている。動物細胞では、幹細胞（間葉系幹細胞、iPS細胞等）や筋芽細胞等で増殖、未分化維持、分化についての研究が進められている。また、植物では、シロイヌナズナ、コケ類、その他の生体組織では、メダカ、ゼブラフィッシュ、魚類・両生類の受精卵等で重力応答の研究事例がある。

3. 幹細胞での実験例

ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSCs) を用いて、模擬微小重力環境下と通常培養の増殖についての評価を行った。模擬微小重力環境下では、通常培養に比べ、培養期間を短縮（図2a, b）させて選択的（図2c）に培養できていることが確認できた¹⁾。

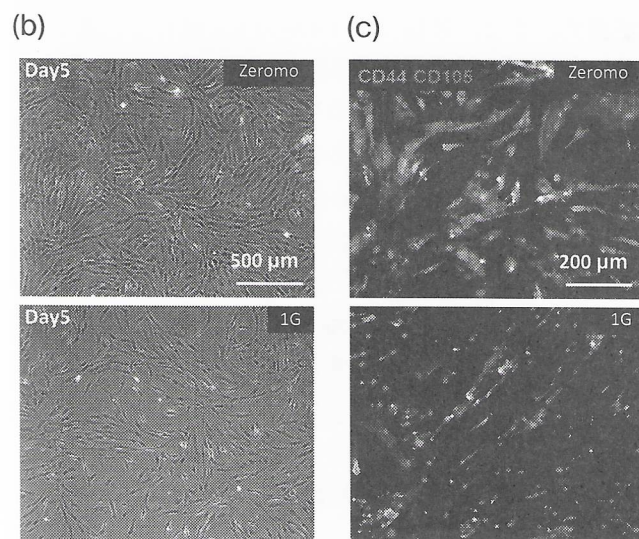
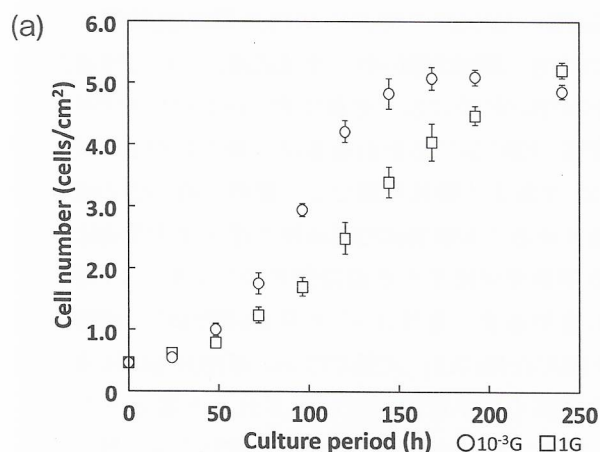


図2 (a) 増殖曲線 (b) 培養状態 (c) 免疫染色

また、iPS細胞由来ヒト骨格筋幹細胞を用いて、模擬微小重力環境が「骨格筋幹細胞の維持」に与える影響について検討した。その結果、模擬微小重力環境下では、Pax7陽性の骨格筋幹細胞の維持制御機構が阻害され、多核の筋管細胞数が減少することが明らかとなった（図3a）。さらにその分子機序として、TRAF6/ERKシグナル伝達経路が微小重力環境において阻害され、維持制御機構の破綻による幹細胞の枯渇が生じることが明らかとなり（図3b）、微小重力環境における筋萎縮機構の一端が解明された²⁾。

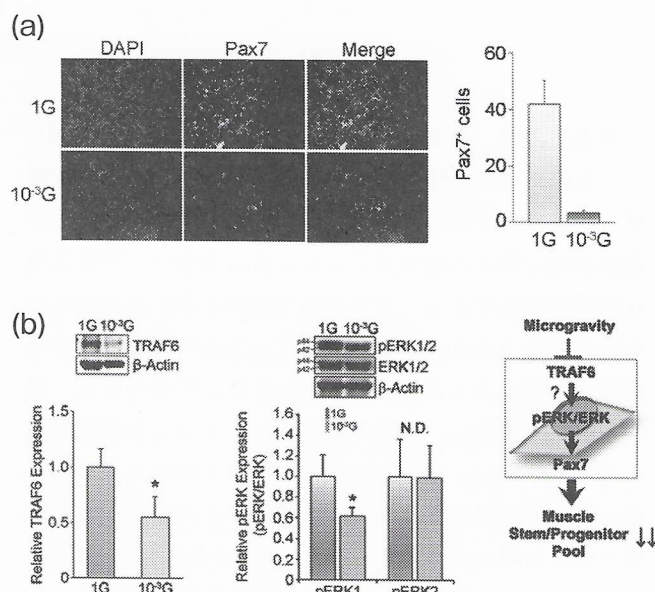


図3 (a) Pax7⁺骨格筋幹細胞数の減少 (b) 微小重力環境下での骨格筋幹細胞の維持機構の破綻メカニズム

おわりに

本稿では、模擬的に微小重力及び過重力環境を生成できるZeromoを紹介した。ここで述べた細胞培養の実験だけではなく、重力応答、物理刺激の研究で幅広く活用できる装置として、今後も皆様の研究支援ができれば幸甚である。

文献

- 1) Nakaji, T. *et al.* “グラビティーコントロールがヒト間葉系幹細胞の増殖・分化に与える影響” 日本再生医療学会誌 VOL. 16 Suppl 2017
- 2) Hosoyama, T. *et al.* “Microgravity influences maintenance of the human muscle stem/progenitor cell pool.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 493 (2017) 998-1003.