

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506007

研究課題名(和文) 微小重力環境が内耳末梢前庭器に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) The effect of microgravity on mRNA expression in the vestibular endorgans

研究代表者

工 穰 (TAKUMI, Yutaka)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：70312501

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)：本研究は、内耳末梢前庭における微小重力応答遺伝子の同定を目的に、STS-129, 131, 135において、スペースシャトル帰還後数時間でマウスより側頭骨サンプルを摘出し、顕微鏡下に前庭(平衡斑・半規管・前庭神経節)と蝸牛に分けて摘出し、RNAを抽出してマイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、GABA関連遺伝子、骨代謝関連遺伝子、DNAダメージ修復遺伝子などの424遺伝子について2倍以上の発現増加を認める一方で、カルシウム結合蛋白などの306遺伝子について1/2以下の発現減少を認めた。これら遺伝子の発現変化は、微小重力環境滞在によって耳石代謝に及ぼす変化を表していると思われた。

研究成果の概要(英文)：Significant decrease of vestibular inputs during space flight is one of the major reasons for space motion sickness. In this study, we analyzed gene expression profiles of 90-day space flight mice and 15-day space flight mice in the inner ear. In the 90-day space flight mice, 424 genes were >2-fold up-regulated, and 306 genes were <0.5-fold down-regulated. Interestingly, in 90-day flight mice vestibular endorgans, S100a9 (calgranulin B), S100a8 (calgranulin A), Oc90 (Otoconin90) gene expressions were remarkably down-regulated. These gene expression changes might lead to alterations of otoconia organization. From these results, we propose that the gene expression changes of vestibular endorgans to novel gravity environments will have at least two adaptation phases: an acute and a chronic phase.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：前庭 平衡 微小重力 遺伝子発現 末梢前庭器

1. 研究開始当初の背景

人類が微小重力環境に置かれた場合、そのほとんどが「宇宙酔い」を経験するといわれ、宇宙環境利用が進む中で未だ解決されていない生体の反応の一つである。「宇宙酔い」の一因として、加速度が生じない微小重力下では、内耳末梢前庭器における加速度受容(求心性の入力)に変化が生じるためと推測されているが、その詳細は未だ不明である。

我々はこれまで「異なる重力環境が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響に関する研究」などの地上実験を行ってきた。その結果、過重力環境によりラット末梢前庭器において Syntaxin や CREB などの神経可塑性関連遺伝子の発現が増加していることを明らかにした。また免疫組織化学的検討より、海馬等で可塑性に関連しているとされる糖鎖 PSA, HNK-1 が内耳末梢前庭器でも発現することを明らかにした(Takumi et al., 2002, Iijima et al., 2004, Isawa et al., 2004)。

以上の結果より、中枢で行われていると推測されてきた平衡機能の代償が、末梢前庭においても代償されていることが考えられた。特に求心性第一次ニューロンが末梢前庭系の可塑性に重要な役割を果たしていると推測している。

この仮説を証明するための研究として「The Effect of Micro Gravity on Vestibular Neurotransmission」が第2回ライフサイエンス国際公募に採択され、微小重力環境における末梢前庭器の遺伝子発現を解析する予定であったが、2003年のスペースシャトル・コロンビアの事故によりサンプルは得られず、さらに NASA が、げっ歯類を使った宇宙実験を中止するとアナウンスして以来、残念ながら新たな知見は得られない状態が続いていた。

しかし 2009 年、イタリア宇宙機関 (ASI) によって開発された Mouse Drawer System (MDS) による国際宇宙ステーション内マウス長期滞在実験 (STS-128, 129) における Tissue Sharing Program 国際公募によって、微小重力環境に 90 日間滞在した貴重なマウス内耳サンプルを得ることができた。またこれに引き続き 2010 年と 2011 年に行われた、スペースシャトル内マウス短期滞在実験 (STS-131, 135) における Tissue Sharing Program によって、微小重力環境に 15 日間および 13 日間滞在したマウス内耳サンプルも得ることができた。(スペースシャトルは STS-135 にて退役したため、今後の宇宙実験機会は未定)

本研究では、これらのサンプルを中心に、(1) 内耳末梢前庭における微小重力応答遺伝子を同定し、(2) 微小重力環境滞在期間の違いによる発現変化を明らかにし、(3) 過重力 (2 G) 環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子解析を行い、(4) 発現遺伝子の内耳局在検討を行い、(5) 重力変化が前庭系神経伝達機

構に及ぼす影響を総合的に解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 内耳末梢前庭における微小重力応答遺伝子の同定

STS-129, 131, 135 において、スペースシャトル帰還後数時間でマウスより側頭骨サンプルを摘出し、顕微鏡下に前庭(平衡斑・半規管・前庭神経節)と蝸牛に分けて摘出し、冷凍にて日本へ空輸されている。平成 23 年~25 年の先行研究にて、これらのサンプルの一部を用いて RNA を抽出してマイクロアレイによる発現解析を行っており、いくつかの発現増加・減少遺伝子が同定されており技術基盤は確立している。

(2) 微小重力環境滞在期間の違いによる発現変化の定量比較

上記解析後、STS-129 (90 日間滞在), STS-131 (15 日間滞在), STS-135 (13 日間滞在) に関して、それぞれで発現増加・減少している遺伝子について、TaqMan probe を用いた real-time PCR にて定量的解析を行い、マイクロアレイのデータの確認を行う。

(3) 過重力 (2 G) 環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子解析

以前から共同実験を行っている大阪大学にて、同系統のマウスを過重力 (2G) 環境に 16 日間および 90 日間滞在させる実験を行っており、微小重力環境に 15 日間および 90 日間滞在したマウスとの発現増加・減少遺伝子を比較することで、1G 環境から 0G や 2G へ重力変化するのに共通して応答する遺伝子、および短期間と長期間での応答遺伝子の変化を同定する。

(4) 発現遺伝子の内耳局在検討

上記 (1) ~ (3) で得られた微小重力応答遺伝子や重力変化に共通して応答する遺伝子などの局在を免疫組織学的に検討し、重力変化に対する遺伝子発現がどの細胞を中心に起こっているのかを解明する。

(5) 重力変化が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響の解明

上記 (1) ~ (4) の結果より、重力変化が前庭系神経伝達機構での遺伝子発現に及ぼす影響をまとめ、「宇宙酔い」の原因となり得る遺伝子発現変化についてまとめる。

3. 研究の方法

STS-129 (90 日間滞在, n=3), STS-131 (15 日間滞在, n=16), STS-135 (13 日間滞在, n=5)

のマウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスおよび 2G 負荷を行った過重力負荷マウスの前庭（平衡斑・半規管・前庭神経節）より RNA の抽出を行い、マイクロアレイおよび real-time PCR を用いて遺伝子発現の解析をおこなうことで、微小重力環境および過重力環境において末梢前庭における遺伝子発現の変化を網羅的に解析することにより、重力変化に応答する遺伝子群を同定する。

（1）マイクロアレイによる微小重力応答遺伝子の発現解析

STS-129 (90 日間滞在, n=3), STS-131 (15 日間滞在, n=16), STS-135 (13 日間滞在, n=5) のマウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスから抽出された前庭（平衡斑・半規管・前庭神経節）および蝸牛サンプルより RNA を抽出後、クオリティチェックを行い、マイクロアレイ (Agilent 社 Gene sprint 3G, 62976 遺伝子) による網羅的発現解析を行うことで、

①全体的な発現プロファイリングを短期滞在と長期滞在で比較し、前庭全体での発現傾向の変化をつかむ。

②蝸牛との発現変化比較や個体間の発現差の検討を行い、微小重力環境に対して前庭で特異的に発現変化している遺伝子を同定する。

（2）Real-time PCR による異なる微小重力環境滞在期間での遺伝子発現変化の定量解析

上記解析後、STS-129, STS-131, STS-135 に関して、それぞれ前庭で発現増加 (2 倍以上)・減少 (1/2 以下) している遺伝子について、Taq-Man probe を用いた real-time PCR にて定量的発現比較解析を行い、マイクロアレイで認められた発現量変化を確認する。

（3）過重力 (2 G) 環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子の解析

以前から異なる重力環境下における遺伝子発現変化に関する共同実験を行っている、大阪大学 (大平、河野) にて、STS-129 と同系統のマウスを 2G 環境に同日間 (90 日および 15 日) 滞在させる実験を行っており、微小重力環境に 90 日間および 15 日間滞在したマウスとの発現増加・減少遺伝子を比較することで、重力変化に共通して応答する遺伝子を同定する。

方法としては、2G 環境滞在 (90 日間および 15 日間, 各 n=8) のマウス、および 1G コントロールマウスから抽出された前庭（平衡斑・半規管・前庭神経節）および蝸牛サンプルを用い、(1) と同様に RNA を抽出後、クオリティチェックを行い、マイクロアレイ (Agilent 社, 62976 遺伝子) による網羅的発現解析を行い、

①全体的な発現プロファイリングを微小重力長期滞在と 2G 環境長期滞在で比較し、前庭全体での発現傾向の変化をつかむ。

②重力環境変化 (微小重力 \leftrightarrow 2G) に対して前庭で特異的に発現変化している遺伝子を同定するため、蝸牛との発現変化比較や個体間の発現差の検討を行う。

（4）発現遺伝子の内耳局在検討

上記 (1) ~ (3) で得られた微小重力応答遺伝子や重力変化に共通して応答する遺伝子からコードされるタンパク質に対する抗体を用い、その局在を免疫組織学的に検討し、重力変化に対する遺伝子発現が前庭のどの細胞を中心に起こっているのかを明らかにする。

同マウスの反対側について研究協力を行っている Richard Boyle (NASA AMES RESEARCH CENTER) らのグループの電子顕微鏡による解析では、平衡斑にある耳石形態の破綻を疑わせる所見が得られており、これら所見と合わせて耳石形成に関わる遺伝子やタンパクを中心に検討を進める。

（5）重力変化が前庭系神経伝達機構に及ぼす影響の解明

上記 (1) ~ (4) の結果遺伝子発現が変化した遺伝子のパターンより、異なる重力環境が前庭系の遺伝子発現に及ぼす影響をまとめ、「宇宙酔い」の原因となり得る遺伝子発現変化について比較検討を行う。

4. 研究成果

（1）マイクロアレイによる微小重力応答遺伝子の発現解析

STS-129 (90 日間滞在, n=3), STS-131 (15 日間滞在, n=16) のマウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスから抽出された前庭（平衡斑・半規管・前庭神経節）および蝸牛サンプルより RNA を抽出後、クオリティチェックを行い、マイクロアレイ (Agilent 社 Gene sprint 3G, 62976 遺伝子) による網羅的発現解析を行った。

まず全体的な発現プロファイリングを 90 日間滞在群と 15 日間滞在群で比較してみたところ、前庭および蝸牛とも 15 日間滞在群に対して 90 日間滞在群では発現のバラツキが小さく、長期に微小重力環境下に滞在することによって新しい重力環境に適応している様子がうかがえた。

続いて地上コントロール群と 90 日間滞在群の前庭における遺伝子発現を比較検討したところ、GABA 関連遺伝子、骨代謝関連遺伝子、DNA ダメージ修復遺伝子などの 424 遺伝子について 2 倍以上の発現増加を認める一方で、カルシウム結合蛋白などの 306 遺伝子について 1/2 以下の発現減少を認めた。また興味深いことに、これら遺伝子群について 15

日間滞在群の発現を検討したところ、90 日間滞在群で発現増加していたものは発現が減少し、90 日間滞在群で発現減少していたものは発現が増加している事が明らかとなった。

また、熱ストレス応答蛋白遺伝子の発現は 15 日間滞在群で地上群の約 3 倍にまで達していたが、90 日間滞在群ではその半分程度まで発現が減少していた。ここからも、長期滞在による微小重力環境への適応の様子がうかがえた。

(2) Real-time PCR による異なる微小重力環境滞在期間での遺伝子発現変化の定量解析

STS-129 (90 日間滞在, n=3), STS-131 (15 日間滞在, n=16) のマウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスの前庭(平衡斑・半規管・前庭神経節)および蝸牛サンプルによる網羅的発現解析結果より、90 日間滞在群と 15 日間滞在群で発現が大きく異なる遺伝子について、real-time PCR にて定量的発現比較解析を行った(表)。

内因性遺伝子である ActB の変化が乏しいにもかかわらず、カルシウム結合タンパクである S100a8, 9 や耳石タンパクである Oc90 などは 90 日間滞在群で大幅に発現減少しており、長期の微小重力環境滞在による耳石代謝の変化を表していると思われた。

また、熱ストレス応答蛋白遺伝子の Hspb7 の発現は 15 日間滞在群で地上群の約 3 倍にまで増加、90 日間滞在群ではその半分程度まで発現減少することを Real Time PCR 法により確認した。

一方、15 日間滞在群で発現が大きく減少していた Gabra2 は、90 日間滞在群で 5 倍以上に増加していた。長期の微小重力環境滞在によって慢性化した前庭系へのシグナル入力減少を補うため、Gabra2 の発現を増加させることで神経活動を増強している可能性があると思われた。またこのことは、Ross MD(2000)によって報告された、微小重力環境滞在による末梢前庭系の 1 次神経終末シナプス増加と深く関係すると考えられた。

(3) 過重力(2 G)環境滞在マウス内耳サンプルとの発現比較による重力変化応答遺伝子の解析

STS-129 (90 日間滞在, n=3), STS-131 (15 日間滞在, n=16) の微小重力環境滞在マウス、およびそれぞれに対する地上コントロールマウスの前庭および蝸牛サンプルによる網羅的発現解析の比較実験として、同日間 2G 環境に滞在させた STS-129 と同系統のマウスの発現解析を行った(表)。

以前から異なる重力環境下における遺伝子発現変化に関する共同実験を行っている大阪大学(大平、河野)にて、人工過重力(2G)環境下(90 日間滞在, n=8)のマウス、および 1G コントロールマウスから摘出された前庭(平衡斑・半規管・前庭神経節)および蝸

牛サンプルを用い、RNA を抽出後、マイクロアレイ(Agilent 社, 62976 遺伝子)による網羅的発現解析および real-time PCR による定量的発現比較解析を行い、重力変化に共通して応答する遺伝子の同定を試みた。

STS-129(90 日間宇宙滞在群)で大幅に発現減少していた S100a8, S100a9, Oc90, Hspb7 の遺伝子は、おもしろいことに 2G 環境下に 90 日間暴露しても同様の遺伝子発現変化を示していた。カルシウム結合タンパクである S100a8, 9 や耳石タンパクである Oc90 は、微小重力でも過重力でも長期に渡る異重力環境滞在によって発現抑制を受けることが明らかとなり、重力変化が耳石代謝に及ぼす変化を表していると思われた。

一方、90 日間宇宙滞在群で増加していた Gabra2 は、長期の微小重力環境滞在によって慢性化した前庭系へのシグナル入力減少を補うため発現を増加させることで神経活動を増強している可能性があると思われたが、2G 環境下では発現抑制を受けていた。これは慢性的に増加した前庭系へのシグナル入力を減少させるために発現を抑制させ、神経活動を調整している可能性があると思われた。

	ActB	S100a8	S100a9	Oc90	Gabra2	Hspb7
90日間宇宙滞在群	1.37	0.03	0.03	0.75	1.46	1.53
15日間宇宙滞在群	1.19	1.71	1.58	2.07	0.25	3.17
90日間2G暴露群	1.20	0.05	0.05	0.75	0.47	1.74

(表) 微小重力環境および 2 G 暴露による遺伝子発現変化

微小重力環境滞在 15 日目と微小重力環境滞在 90 日目の遺伝子発現の変化が著しい遺伝子群。異なる重力環境への応答として、短期の環境応答と長期の環境応答の 2 つの Phase があることを明らかにした。

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 1 件)

- ① Nishio SY, Takumi Y, Usami SI.、Laser-capture micro dissection combined with next-generation sequencing analysis of cell type-specific deafness gene expression in the mouse cochlea.、Hear Res. 査読有、Vol. 348、2017、pp.87-97.
doi: 10.1016/j.heares.2017.02.017.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Nishio S, Takumi Y, Usami S.、Laser-capture micro dissection combined with next-generation sequencing analysis of cell

type-specific deafness gene
expression in the mouse cochlea, ARO
39th MidWinter Meeting, 2016. 2. 20-24,
San Diego (California, USA)

- ② 工 穰、西尾信哉、宇佐美真一、マウス
蝸牛組織における難聴遺伝子の細胞特異
的発現: レーザーキャプチャーと次世代シ
ーケンサーによる解析、第 25 回日本耳科
学会、2015. 10. 7-10、長崎ブリックホール
(長崎市)
- ③ Takumi Y, Oguchi T, Suzuki N, Nishio S,
Boyle R, Usami S、The Effect of
Microgravity on mRNA Expression in the
Vestibular Endorgans: Comparison of the
90-day and 15-day Space Flight、Inner
Ear Biology Workshop、2014. 11. 1-4、京
都国際会議場 (京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工 穰 (TAKUMI, Yutaka)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号: 7 0 3 1 2 5 0 1

(2) 連携研究者

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 1 0 1 8 4 9 9 6

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 7 0 4 6 7 1 6 6