

JDX-2022344

2021 年度

「きぼう」利用テーマ・船内科学研究に係る

科学成果評価結果

報告書

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. 概要

本資料は、2021年度(2021年7月から2022年3月)に実施した、「きぼう」船内を利 用した科学研究テーマの科学成果評価の結果および評価への入力となった対象テー マの成果報告書等を取り纏めたものである。

2. 評価対象

評価対象となったテーマを表1に示す。

これらのテーマは、2009年度~2019年度の間に軌道上実験を実施した5件の科学研究テーマである。

3. 評価の目的、評価指標

「きぼう」で行われた研究成果の達成状況とその意義、分野学術や社会への貢献、波 及効果に対する評価を通じて、各々の研究成果のアピールポイントを効果的に情報発 信すること、また、きぼう利用に関する改善点、利用の方向性等へ提言を得て、今後の 利用計画設定に資することを目的として評価が行われた。この目的に照らし、表2に示 す各評価項目に基づき、書類審査、面接審査(成果報告会)が実施され、評価結果 は、最終的に、以下の4段階の総合評価指標および提言として取り纏められた。

S:目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた(エクストラサクセス相当).

- A:目標を充分に達成した(フルサクセス相当).
- B:目標を一部達成した(ミニマムサクセス相当).
- C:成果として不足・不十分であり、目標を達成していない.

※2017 年度までの基準(以下)と異なる。

- S:目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた.
- A:目標を充分に達成した(エクストラサクセス相当以上).
- B:目標を達成した(フルサクセス相当).
- C:目標達成に不足・不十分な点があり、引き続き解析・検討を要す.
- 4. 評価体制

評価は、生命医科学分野あるいは物質・物理科学分野のきぼう利用テーマ選考評価 委員会(以下、「選考評価委員会」)により実施された。また、分野専門家3名のピアレ ビューアをテーマ毎に設定し、書類審査を併せて行い、選考評価委員会は、これを参 考として審査を行った。

ここで、選考評価委員会は、きぼう利用において、応募されたテーマ等の選考、設定された利用テーマ等の評価を行うために設置された JAXA 有人宇宙技術部門長の諮問 委員会であり、物質・物理科学分野及び生命医科学分野の2分野が設定されている。 今回、評価に当った選考評価委員会の構成員リストを表3に示す。

5. 評価プロセス

研究成果報告の提出から成果評価の公表までの評価プロセスを図4に示す。

6. 科学成果評価に係る文書

本資料に含めるテーマ毎の研究成果報告書、科学成果評価結果等を、表5に示す。

テーマ名	研究代表者 (評価時)	実験時期(※)	成果評価 (委員会)	分 野
宇宙ストレスにおける環境応答型 転写因子 Nrf2 の役割 (Mouse Stress Defense)	東北大学 教授 山本雅之	2018 年 4 月 ~5 月	2021 年 7 月 5 日	生命医
ほ乳類の繁殖における宇宙環境 の影響(Space Pup)	山梨大学 教授 若山照彦	2013 年 8 月 ~2019 年 6 月	2022 年 3 月 1 日	科学
宇宙におけるコケ植物の環境応 答と宇宙利用(スペース・モス)	北海道大学 教授 藤田知道	2019 年 7 月 ~2020 年 1 月	2022 年 3 月 10 日	
沸騰・二相流体ループを用いた気 液界面形成と熱伝達特性(TPF)	九州大学 名誉教授 大田治彦 神戸大学 教授 浅野等	2017 年 7 月 ~2019 年 7 月	2021 年 12 月 24 日	物質物理科
「マランゴニ対流における時空間 構造(Marangoni UVP)	JAXA ISAS 教授 依田眞一	2009 年 11 月 ~2020 年 2 月	2022 年 3 月 18 日	学

表1 評価対象テーマ (所属は報告書提出当時)

※ 地上対照実験は含まない。

+ -	= = 1 - = = = = = = = = = = = = = = = =	
表2	評価項目	

	(1)	研究目標の意義および達成度
		• 研究目標の意義は高いか(ミッション選定/準備段階移行以降に修正された
		場合). また、時間経過により減じていないか.
		• 研究目標は達成されたか. サクセスクライテリアに照らした達成度のレベル.
科学	(2)	実施体制
一		• 研究チームおよび JAXA の体制は適切であったか.
技	(3)	科学的、技術的成果
術		 得られた成果は、国際的なレベルに照らして、高いか。
的		 設定された目標を越える成果があったか。
〕 〕 単	(4)	活用、波及効果
*		 関連科学分野・技術領域への波及効果があったか、また、期待されるか。
		 科学的、技術的に活用が見込めるか、成果活用の意義・重要性は高いか。
	(5)	きぼう利用の必然性
		 きぼうで行う必然性があったか。
総	(6)	総合評価
合提		 成果インパクト、応用・波及効果などのポテンシャル、他、アピールポイント。
評音		 今後の宇宙実験に向けての課題、改善すべき点。
1曲		 当該科学分野・領域におけるきぼう利用の発展性、継続の意義。

表3 きぼう利用テーマ選考評価委員会 構成員

(評価時)

物質·物理科学分野

委員長	長井 寿 国立研究開発法人 物質・材料研究機構 名誉研究員
委員	石川 正道 同志社大学高等研究教育院 客員教授
	江刺 正喜 株式会社メムス・コア CTO
	東北大学 マイクロシステム融合研究開発センター シニアリサーチフェロー
	福山 博之 東北大学 多元物質科学研究所 副所長/教授

生命医科学分野

委員長	山口 朗 東京歯科大学口腔科学研究センター 客員教授
委員	牛田 多加志 東京大学大学院工学系研究科 名誉教授
	武田 伸一 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 名誉所長
	田村 宏治 東北大学大学院生命科学研究科 教授
	中村 耕三 医療法人社団 大坪会 東和病院 院長
	中村 幸夫 国立研究開発法人 理化学研究所バイオリソース研究センター
	細胞材料開発室 室長
	本間 研一 北海道大学 医学部 名誉教授
	諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院 主幹教授



実験終了後、概ね2年後に、研究代表者より提出

テーマごとに 3 名程度の専門家が、専門的見 地から審査する。

ピアレビューの結果をもとに、選考評価委員会 の各委員が各テーマを審査する。

研究者による成果報告、事前に実施済みの書 類審査結果(ピアレビュー結果、委員評価結 果)をもとに、委員会としての科学評価結果をま とめる。

図4 科学成果評価プロセス

テーマ名	研究成果 報告書	評価結果	研究成果 概要書(日)	研究成果 概要書(英)
宇宙ストレスにおける環境応答型転	史山玄丘 1_1	兄山幺氏 1_0	兄山幺氏 1_2	史山玄氏 1_1
今回す Nn2 の反割 (Mouse Stress Defense)	万小市氏 1一1	万小和、1−2	万小和、1-3	万小和八 1-4
ほ乳類の繁殖における宇宙環境の 影響(Space Pup)	別紙 2−1	別紙 2−2	別紙 2−3	別紙 2−4
宇宙におけるコケ植物の環境応答と 宇宙利用(スペース・モス)	(※)	別紙 3−2	別紙 3−3	別紙 3−4
沸騰・二相流体ループを用いた気液 界面形成と熱伝達特性(TPF)	(※)	別紙 4−2	別紙 4−3	別紙 4−4
「マランゴニ対流における時空間構造 (Marangoni UVP)	(※)	別紙 5−2	別紙 5−3	別紙 5−4

表5 添付文書の構成

(※) 論文公表後に公開(別紙 3-1、別紙 4-1、別紙 5-1)

以上

ISS・きぼう利用ミッション 「宇宙ストレスにおける環境応答型転写因子 Nrf2 の役割 (Mouse Stress Defense)」 研究成果報告書 代表研究者:山本 雅之(東北大学) 2021 年 4 月

1. 諸言

1.1 研究概要

人類の宇宙進出が身近になった現在、私たちが宇宙環境に滞在した場合に直面する医学的 リスクについて明らかにし、如何にその宇宙ストレスを回避するかその術を開発すること は重要な課題である。宇宙環境が生体に与える主な影響は、宇宙放射線と微小重力によるも のである。宇宙放射線は、活性酸素種・酸化ストレスを発生し、細胞に DNA 障害や細胞死 を引き起こす。一方、微小重力は、細胞への機械的刺激メカニカルストレスを与え、細胞内 シグナル伝達の乱れを引き起こす。本研究では、一群の生体防御遺伝子を制御する転写因子 Nrf2 に着目し、宇宙ストレスにおける Nrf2 の生理的貢献を明らかにする。

1.2 背景·意義

我々はこれまで、生体が酸化ストレスや外来異物などの環境ストレスへの曝露された際に は、転写因子 Nrf2 が酸化ストレス・異物代謝に関わる遺伝子群の発現を統一的に制御し、 恒常性維持に働くことを明らかにしてきた(参考文献1:Suzuki et al., 2013,参考文献2: Yamamoto et al., 2019)。Nrf2 は、非ストレス刺激下では、Keap1 を介してユビキチン化さ れプロテアソームにより迅速に分解されている。一方、Keap1 はストレスセンサー分子と しても機能し、ストレスを感知すると Nrf2 ユビキチン化反応を速やかに停止する。安定化 した Nrf2 は核内に蓄積して抗酸化遺伝子群などの転写を活性化する。Nrf2 欠失マウスは放 射線や紫外線によるストレスに対して脆弱になる(参考文献3:Hirota et al., 2011)ことか ら、Nrf2 はこれらのストレスに対して防御的に働くことが窺われる。また、Nrf2 が血流シ ェアストレスなどメカニカルストレスに対する応答(参考文献4:Hosoya et al., 2005)や 骨形成(参考文献5:Sun et al., 2015)に関与することなども明らかにされている。即ち、 Nrf2 は一群の酸化ストレス防御系の遺伝子を活性化することに加えて、メカニカルストレ スに対する応答にも寄与することが期待される。このように、Nrf2 は人類の宇宙ストレス 耐性に寄与する可能性があり、本研究が Nrf2 に注目したことは極めて合理的である。

これまでの遺伝子改変マウスを用いた宇宙実験の試みは限定的であり(参考文献 6: Cancedda et al., 2012)、その有効性や有用性の評価にまで到達したものはない。本研究は Nrf2 欠失マウスを用いて、Nrf2 の宇宙ストレスに対する応答強化を調べるものであり、実 現することができれば、宇宙環境が遺伝子改変病態モデルマウスに与える影響について世 界で初めて評価する報告となり、その新規性は極めて高い。

Nrf2 活性化による生体防御機能の増強作用の有用性は国内外で大きな注目を浴びており、 様々な疾患の予防・治療への活用を目指して、多くの Nrf2 誘導剤の開発が進んでいる。本 研究により Nrf2 活性化が宇宙ストレスに対する応答・適応に有効であることを示すことが できれば、今後、人類の宇宙滞在に際してのリスク軽減に Nrf2 誘導剤応用が期待できる。 即ち、人類の宇宙進出を推し進める一助になるものと期待される。 ところで、人口の約5%にNrf2活性が低い人が存在する(参考文献7:Suzuki et al., 2013) ことが知られている。また、東北メディカル・メガバンクには、日本人一般住民約15万人 の遺伝子情報と健康調査データが連結可能な形で蓄積されている。これらのデータを活用 し、マウスで得られた知見の当否を、ヒトデータで検証し、ヒューマンバイオロジーへの還 元を図ることが可能である。即ち、マウス宇宙滞在実験の成果を活かして、骨量低下・筋萎 縮など、地上におけるヒトの加齢性疾患の克服に向けた新たな展開が期待される。

2. 研究計画

2.1 研究目標

本研究では、転写因子 Nrf2 に注目し、野生型マウス、Nrf2 欠失マウスを宇宙で飼育し、宇 宙ストレスが Nrf2 活性に与える影響、また、Nrf2 活性化が宇宙ストレスに対する応答をい かに制御するのかを調べる。宇宙ストレスに対する Nrf2 の貢献を明らかにするために、次 世代シークエンサーを用いた RNA-sequence (RNA-Seq) 解析を中心に、組織解析レベル の変化には至らないような宇宙ストレスの影響もバイオマーカーとして検出・定量するこ とを試みる。さらに、東北メディカル・メガバンクの一般住民コホートデータベースを利用 して、マウスとヒトのデータの統合解析を目指す。得られた Nrf2 を標的にした酸化ストレ スやメカニカルストレスへの応答・適応戦略の開発は、地上での高齢化・高ストレス社会が 抱える課題を克服するための方策として新たな応用・展開が期待される。

	サクセスクライテリア	補足 【判断時期など】
ミニマム サクセス	軌道上で飼育した Nrf2 欠失マウス について、生存、死亡(凍結)に関 わらず、サンプル回収ができ、野生 型マウスで得られなかった知見(行 動、飼育状態、各臓器の所見など) を獲得できること。	【判断時期】試料回収時 【設定根拠】 一群の酸化ストレス防御系の遺伝子を活 性化する Nrf2 遺伝子を持たない Nrf2 欠 失マウスの試料は、生存、死亡に関わら ず、宇宙環境ストレスにおいて野生型マ ウスでは得られない知見につながる。
フル サクセス	上記に加え、軌道上から回収したマ ウスの様々な組織・臓器において、 組織レベル、遺伝子発現レベル (RNA-seqなど)、あるいは代謝産 物レベル(メタボローム解析など) で比較解析を行い、宇宙環境ストレ スに対する Nrf2 の生理的貢献を総 合的に判断するエビデンスを得る ことができること。	【判断時期】地上対照実験終了後1年 【設定根拠】 左記により、「宇宙放射線や無重力環境に よる宇宙環境ストレスに対して Nrf2 が防 御的に働く」という仮説が実証でき、かつ Nrf2 が防御的に機能する場合は、その誘 導剤がストレス関連疾患の治療薬として 有望であることが提示できる。

本研究では、以下に示すようなサクセスクライテリアを設定した。

	サクセスクライテリア	補足 【判断時期など】
エクスト ラ サクセス	Nrf2 欠失マウスにおいて、野生型マ ウスと比較して明らかな加齢の加 速が見られた場合、上記に加え、東 北メディカル・メガバンクでの地上 の 5-10 年にわたる大規模コホート 研究データと、約4週間の宇宙滞在 マウスでのデータを比較参照し、宇 宙滞在における加齢変化の加速を Nrf2 を中心に解析できること。ま た、それにより、地上での加齢性疾 患の端緒を開くような Nrf2 を基軸 とした概念の確立ができること(マ ウスからヒトへの外挿可能なスト レス/加齢性疾患因子の評価系の確 立など)。	【判断時期】地上対照実験終了後2年以内 【設定根拠】 人口の約5%はNrf2活性が低いことが知られており、東北メディカル・メガバンクにはその遺伝子情報とリスク要因が連結されたビッグデータが蓄積されている。これらを活用し、マウスからヒトへの還元を図ることで、宇宙滞在のみならず、地上での骨量低下・筋萎縮などの加齢性疾患の克服にNrf2誘導剤の新たな応用・展開が期待される。

2.2 体制

2.2.1 研究チーム体制

本研究における研究チーム体制を以下に示す(フライト実験実施時)。

各組織・臓器の解析を担当する研究者に加え、東北メディカル・メガバンク機構のゲノム・ オミックス解析部門の解析担当者も参画し、様々な組織・臓器において、組織レベル、遺伝 子発現レベル、代謝産物レベルでの網羅的な解析が可能な研究体制を構築した。また、東北 メディカル・メガバンクに蓄積された一般住民のビックデータを活用し、ヒトとマウスのデ ータの連携解析およびそのデータベース化を目指している。



本価は 2000 加齢医学研究所 遺伝子発現制御 分野	分子血液学分 野	附属創生応用 医学研究センタ 一 酸素医学分野	附属動物実験施 設	加齢医学研究所 脳機能開発研究 分野	中村卓史CI 小児発達歯科学 分野/歯科薬理 学分野	工藤崇CI 筑波大 医学医療系 生命医科学域
中枢系 生殖系	血液系	腎臓系	心血管系	心理・行動系	顎口腔系	骨格筋系

(PI: 代表研究者(Primary Investigator)、CI: 共同研究者(Co-Investigator))

解析チーム	氏名	所属(注)	役割分担
	山本 雅之		代表研究者 研究総括
	鈴木 隆史	東北大学 医化学分野	研究チームとりまとめ
研究統括	田口 恵子		消化管組織
	宇留野 晃		代謝組織、視神経、眼
	池畑 広伸		皮膚組織
	鈴木 未来子		呼吸器、免疫組織
中枢系、生殖系	本橋 ほづみ	東北大学加齡医学研究所 遺伝子発現制御分野	全脳、側頭骨、精子、精巣
血液系	清水 律子	東北大学 分子血液学分野	脾臓、骨髄組織
腎臓系	鈴木 教郎	東北大学 創生応用医学研 究センター 酸素医学分野	腎臓
心血管系	原田 伸彦	東北大学 動物実験施設	心臓、大動脈
心理・行動系	領家 梨恵	東 北 大 学 加 齢 医 学 研 究 所 脳機能開発研究分野	行動
顎口腔系	福本 敏	東北大学小児発達歯科学分	一 雪 下 咱 下 雪
	中村 卓史	野/歯科薬理学分野	「現」が承、「、現
骨格筋系	高橋 智	筑波大学 医学医療系	後吐丹拔笠
	工藤 崇	生命医科学域	1支版 1白肋

*精子および心臓尖部は筑波大学(高橋 智 CI)へ提供し、精子からは、次世代マウスを作 出した。また、後肢骨の CT 解析は大阪大学(西川 恵三 CI)へ依頼し実施した。 (注)所属はフライト実験実施時

連携研究

氏名	所属 (注)	連携研究内容
勝岡 史城		次世代シークエンサー解析
小柴 生造	東北メディカル・メガバンク 機構ゲノム解析部門	NMR 血漿メタボローム解析
三枝 大輔		質量分析メタボローム解析

(注)所属はフライト実験実施時

2.2.2 JAXA 支援体制

本研究における研究チームと JAXA の役割分担を以下に示す。研究チームは、下記分担にしたがい、JAXA 有人宇宙技術部門 きぼう利用センターと協力しながら、それぞれの作業を 実施した。

作業項目	研究者チーム	JAXA
実験要求、運用要求、実験条件の検討、 策定	0	支援
実施計画の策定	支援	0
実験供試体の検討、製作	_	0
実験試料・供試体の適合性・安全性の 評価、確認	0	支援
地上実験実施	0	支援
運用準備(手順書作成、宇宙飛行士訓 練など)、輸送	支援	0
実験試料準備	〇 (マウス提供)	○ (米国輸送・射場飼 育)
フライト実験実施	0	0
地上対照実験	0	0
飛行後解析、成果発表	0	支援

2.2.3 倫理審査

実験計画については、JAXA (審 017-001)、アメリカ航空宇宙局 (NASA) (Protocol Number: FLT-17-112) および米国西海岸の動物実験施設 (Explora BioLabs) (Study Number: SP15-010) などのそれぞれの機関の動物実験委員会の承認を得て実験を実施した。また、JAXA 宇 宙飛行士が参加する研究開発業務等に関する審査会 (ARRB 4-3-1) および NASA Institutional Review Board (Pro2495) の承認を得て実施した。

2.3 スケジュール

本研究テーマ採択から飛行後解析までのスケジュールを以下に示す。スケジュールは、輸送 機打上遅延により、計画段階(実験準備フェーズ移行審査時点)と比較すると、約3ヶ月程 度の遅延が生じたが、研究実施上の問題はなかった。



実験準備・運用

3.1 実験要求の検討・策定

本研究テーマは、平成27年(2015年)12月に、「平成27年度きぼう」利用フィージビリ ティスタディテーマ(一般募集区分 生命科学)」として選定された。選定後のフィージビ リティスタディ期間において、研究チーム体制、フライト実験要求の詳細化の検討を行った。 平成29年(2017年)8月、実験準備フェーズへの移行にあたり、実験要求、サクセスクラ イテリアが設定され、装置開発や試験、運用準備などの作業に着手した。

本実験の準備にあたっては、地上予備実験の一環として適合性確認試験に参加し、宇宙実験 実現に向けた実験条件・運用条件等の検討やテーマ選定時の課題に対する対応等を JAXA と 協力して行った。実験試料を表 1、解析対象組織を表 2 に示す。

また、初となる遺伝子改変マウスの打ち上げのため、米国でのフライト用遺伝子改変マウス 準備実現性の検討を行った。フライトスケジュールの大幅な変更に対応するため、自然交配 による繁殖ラインを長期間維持するのではなく、打上げ日に合わせて必要個体数のみ受精 卵から復元し、フライトマウスを準備する方針とし、日本チャールスリバーにて、凍結受精 卵の作製・保管を行った。

試料名称	ストレイン	週齡	性別	飼育数/ ケージ	微小重力群 (FL)	地上対照群 (GC)
マウス	野生型 C57BL6/J	打上時 8週齡程度 回収時 50 週齡以内	雄性	1	6 匹	6 巴
	Nrf2 欠失 (Nrf2-KO C57BL6/J)				6 匹	6
					合計:24 匹	

表1 実験試料

【マウス入手先】

微小重力群(flight mice; FL): Charles River Laboratories (Japan) 地上対照群(ground control mice; GC): Charles River Laboratories (Japan)

解析チーム	対象組織
RNA-seq 解析	胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、全脳、下垂体、側頭骨、顎下腺、下顎、 腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、アキレス腱、心臓尖部、大動脈直 線部、背部皮膚、後肢骨格筋、白血球、精巣
メタボローム解析	下大静脈血(血漿)、尾部採血(血漿)、精巣周囲白色脂肪、鼠径 白色脂肪、褐色脂肪、肝臓、糞
消化管組織	舌、胃、食道、腸
代謝組織	精巣周囲白色脂肪、腸間膜白色脂肪、褐色脂肪、肝臓、副腎、膵 臓
皮膚組織	背部皮膚、前肢足底皮膚
呼吸器、免疫組織	肺、胸腺、気管、甲状腺、腸管リンパ節、腋窩リンパ節、鼠径リ ンパ節
腎臓	腎臓、膀胱
眼	視神経、眼
中枢系	全脳、側頭骨
生殖系	精子、精巣
血液系	脾臓、骨髄細胞
心血管系	心臓、大動脈
心理行動系	行動
顎口腔系	顎下腺、下顎
骨格筋系	後肢骨格筋、後肢骨左

表2 解析対象組織

3.2 技術開発

3.2.1 軌道上尾部採血治具の概要(成果リスト学術論文1、Fig 1c & d)

採血により個体のストレス変化等を経時的に評価することができる。NASA では既にマウス

に対する軌道上での安楽死後の全血採血を実施しているが、多大なクルータイム(運用リソ ース)を必要とし、また、採血時に安楽死をともなうため NASA 手法を本ミッションに採 用しなかった。そのため、採血にかかる新しい手順策定を行った。地上での既存法を本ミッ ションに適用するために必要な要素を下表のように識別し、手順設定を進めた(下表は軌道 上ミッション前に識別したものであるため、実績は「無」とした)。

軌道上での作業は宇宙飛行士が実施するため、簡便かつ精度よく採血できる手順が必要で ある。そのため、必要な技術練度を整理するとともに、適切な NIH プロトコールに基づき 訓練等を設定した(フライトミッションでの採血手順・治具等は 4.1 項に示す)。

作業ステップ	内容	地上での既存法の適用有無	軌道上作業実績有無	NIH法
マウスの移動	HCUからの取り出し	○:動物用ピンセットによる移し替え	O:JAXA1回目実験	
保定(固定)	保定器での一時的拘束	O:市販筒状保定器具	∆ : TCU 筒状飼育ケージへの動物移 動は実施済み(JAXA 1 回目実験)	
採血	シリンジ・キャピラリー 等での採血	 〇:尾静脈注射針/シリンジ(技術・高) 〇:ニック/キャピラリー(技術・中) 〇:尾部切断(技術・低:5mm程度・DNA 解析で実施) ム:尾部切断(1mm程度)+キャピラリー 	O:注射針/シリンジ(NASA-RR:ただし、 マウス心臓から(安楽死となる)) ×:ニック ×:キャピラリー ×:尾部切断(2mm 程度)	ニック法もしくは 1mm以下の切 断
止血	採血後の止血	○∶圧迫もしくは止血剤、組織癒着剤	×	
マウスの移動	HCUへ戻し	O:動物用ピンセットによる移し替え	O:JAXA1回目実験	
遠心分離・保管	血液サンプルの処理	○:市販チューブでの遠心	△:市販チューブと軌道上遠心機との 適合性確認が必要(スペック上は課 顎無し)	

表3 採血手順設定と設定時の軌道上ミッションでの実績有無

3.2.2 健康観察(成果学術論文リスト2)

動物実験における管理基準の明確化は、動物愛護の観点だけでなく、実験の信頼性を高める ためにも必要不可欠である。地上実験においては、動物実験の適正化が図られてきている。 一方で、重力の無い宇宙環境下での動物実験の飼養管理基準は明確にされていないのが現 状である。近年増加する実験に伴い、動物の管理基準を制定していく必要性も高まっていた が、宇宙における動物管理においては、専門人員の現地配置の困難さを踏まえ、新たに宇宙・ 地上間の制約された通信による評価手法を検討・導入することが必要であった。

そこで、新たなビデオダウンリンクシステムによる評価手法を確立し、宇宙にて飼育中のマ

ウスの観察および評価を 行い、宇宙実験においても 地上における観察と同等 レベルの定量的な評価が 可能なことを確認した。ビ デオにより評価した項目 を表に示す。

新たに作成した毛並みと 呼吸を軸においた評価基 準により、日毎の健康状態 の変化を可視化すること ができ、不具合の早期対処 につなげることができた。

	Pre-flight		DV 1.	Post-flight	
	Acclimation	Before launch	Flight	(After retrieval)	
<base item=""/>					
Fur condition	0	0	0	0	
Respiratory	×	×	0	×	
<additional item=""></additional>					
Ears	0	0	0	0	
Mouth	0	0	0	0	
Eye	0	0	0	0	
Nose	0	0	0	0	
Proctology	0	0	×	0	
Tail	0	0	0	0	
Limbs	0	0	0	0	
Whisker	0	0	×	0	
Teeth	×	0	×	0	
Abdominal tone	×	0	×	0	

3.3 運用

本実験は、JAXA が開発した小動物飼育装置(Mouse Habitat Unit; MHU)を利用して実施 された。また、これまでの JAXA 小動物ミッションにおいて構築された装置およびマウスの 健康観察に関する実運用体制にて実施した。

3.4 フライト実験実施(射場作業・軌道上実験モニタ・回収場作業など)

本実験の実験個体であるマウスは、NASA ケネディスペースセンター(KSC;米国フロリダ 州)から、宇宙機(米国 SpaceX 社ドラゴン宇宙船)で国際宇宙ステーション(ISS)に輸 送され、到着とするとすぐに実験が開始された。軌道上実験中は、筑波宇宙センターにてモ ニタが行われた。図3にフライト実験の実施概要、図4に軌道上マウスおよび装置操作フ ローを示す。



図3 フライト実験の実施概要

搭載マウス(野生型マウスおよび Nrf2 欠失マウス)の準備は、日本チャールスリバーにて、 2017 年 12 月より開始し、の凍結受精卵から個体復元を行った。8 週齢で、日本から KSC へ輸送し、2018 年 3 月 5 日(現地時間、以下同)から、KSC にて、研究チームと JAXA、 KSC スタッフにより、マウスのフライト用の餌および給水ノズルへの馴化等、打ち上げ準 備作業を行った。馴化期間中に、研究チームにより、肝臓シャントの表現型の確認、尾部採 血を実施し、その結果と、馴化状況を合わせて、搭載マウスを選抜した。打上げの約 24 時 間前にマウス(12 週齢)を打上げ/回収支援装置(Transportation Cage Unit; TCU)に搭載し、 宇宙機側に引き渡した。

マウスを搭載した宇宙機は、4 月 2 日に打ち上げられた。宇宙機が ISS に係留し、TCU が きぼう船内に運び込まれた後、マウスはグローブボックス内で宇宙飛行士により TCU から 軌道上飼育ケージ(Habitat Cage Unit; HCU)に移し替えられ、HCU が CBEF に取り付けら





図4 軌道上マウスおよび装置操作フロー

軌道上飼育期間を通して、微小重力環境で飼育を継続することができた。HCU は、宇宙飛 行士により定期的に餌カートリッジ交換、給水バルーンへの水補給(図 4(2))、臭気フィ ルタ交換、排泄物回収等のメンテナンス(図 4(3))作業が行われた。

また、軌道上での飼育2週間を目安に、宇宙飛行士が尻尾より微量採血を行い(図4(4))、 血液サンプルは遠心分離後、帰還まで冷凍保管された。

マウス帰還時は、宇宙飛行士がマウスを HCU から TCU に移し換え、TCU を宇宙機内に設置した(図4(5))。当初5月2日に帰還予定だったため、ISS から宇宙機を切り離す前日(5月1日)に、マウスは TCU に移し替えられた。その後、宇宙機の切り離しが遅延となったが、そのまま TCU 内で飼育が継続された。宇宙機は5月5日に米国カリフォルニア沖に着水し、船による回収、着岸後、5月7日に TCU を NASA から受領した。米国西海岸の動物実験施設(Explora BioLabs:米国カリフォルニア州)で開梱した時点で、外部の観察から、全匹が健康な状態で帰還したことを確認した。

同日、Explora BioLabs において、研究チームにより、帰還したマウス(17週齢)全匹のヘ ルスチェックおよび行動テストの実施後、解剖フロー(図5)にしたがって解剖が行われた。 冷凍および冷蔵保存した試料は、5月9日に現地で輸送業者に引き渡された後、5月11日 に筑波宇宙センターに到着し、翌日、東北大学にて研究者チームへ引き渡された。

また、地上対照実験は、JAXA 筑波宇宙センターにて、地上用飼育装置を用いて、フライト 実験の飼育条件、スケジュールに準じて実施した(8月21日馴化開始、10月23日解剖作 業終了)。

なお、フライト実験に先立ち、マウスの打上げ準備作業のリハーサルを KSC にて実施し、 輸送手続き、施設・設備、作業環境、消耗品等の調達、作業手順、作業実施体制などを確認 し、その結果をフライト実験に反映させた。



4. 実験結果および成果

4.1 Mouse Stress Defense (MHU-3) プロジェクト概要

(成果リスト学術論文1、Fig. 1)

宇宙ストレスに対する生体防御、および宇宙滞在中の恒常性維持における Nrf2 の寄与を検 証するために、Mouse Stress Defense(第3回マウス飼育ミッション; MHU-3)プロジェクトを 実施した。オスの Nrf2-KO マウス(参考文献 10: Itoh et al., 1997)と野生型(WT)マウス を飼育し、フライト用に選択した。この目的のために、8週齢の WT マウス 60 匹と Nrf2-KO マウス 60 匹が、打ち上げの3週間前にケネディ宇宙センター(KSC)に届けられ、個々 の飼育ケージに順応させた。順応後、体重、摂餌量と水分摂取量のレベル、および肝臓シャ ントの表現型の欠如に基づいて、ISS への飛行用に 12 匹のマウスを選択した(3)実験準 備・運用を参照)。

マウスは TCU に収納後、Space X 社のドラゴン補給船運用 14 号機(SpX-14)に搭載され、 2018 年 4 月 2 日 (GMT) に KSC から打ち上げた(図 6a)。ISS に到着した後、マウスは宇 宙飛行士によって HCU に移された。ケージごとに 1 匹のマウスを収容できる HCU を使用 した(参考文献 8: Shiba et al., 2017、3. 実験準備・運用を参照)。地球に帰還する前に、 マウスは再び TCU に戻され、ドラゴンカプセルに収納された後、5 月 5 日に南カリフォル ニアから沖合の太平洋に着水して回収された。5 月 7 日にマウスを受領したが、すべてのマ

ウスは帰還時に生存していた。一般的な 健康評価と一連の行動テストの後、全て のマウスを安楽死させ、実験室で解剖し て組織を収集した。

2018年9月17日から10月20日まで、 JAXA で軌道上実験を正確に模擬した 地上対照実験(GC)を実施した。フラ イト実験(FL)と同じ飼育装置にWTマ ウス6匹とNrf2-KOマウス6匹を個別 に飼育した。TCU およびHCUは、12時 間の明/暗サイクルで空調された部屋に 配置され、HCU内の気流(0.2 m/s)は FLと同じ条件に調整された。

軌道上のマウスの健康状態は、ダウンリ ンクされたビデオを介して地上の獣医 によって毎日確認された(成果リスト学 術論文2:Yumoto et al., 2021)。HCU 内の12匹のマウスの代表的な画像を図 6bに示す。フライト中、温度と湿度は 十分に管理され、二酸化炭素とアンモニ アの濃度は低レベルに維持された(3. 実験準備・運用を参照)。飛行中の吸収 線量率は0.29 mGy/day であった。

宇宙でマウスの尾から末梢血を採取す



図 6 MHU3 概要と軌道上マウスの様子と軌道上採血

るための新しい装置を開発した(図 6c)。溶血を最小限に抑えながら、各マウスから約 40 µL の血液を採取した(図 6d)。尾からの採血は、打ち上げ前と帰還後、および GC 実験と 同じ方法で実行された。

地球に戻ったマウスの最初の行動観察において、帰還マウスと野生型・Nrf2-KO は一様に平 衡覚・バランスの喪失と筋力の低下を示した。Nrf2-KO フライトマウス No. 4(FL04)は、 解剖時に重度の腸出血が観察された。原因は不明であったが、解剖所見から、これは比較的 急性期、恐らく帰還時のショックによるものと推定された。その後の FL04 のデータは、多 くの測定で外れ値と見なされたので、以降の解析では FL04 のデータは除外した。

4.2 宇宙ストレスによる Nrf2 経路の活性化 (成果リスト学術論文 1、Fig. 2)

本研究の最大の興味の一つ は、 宇宙ストレスが Nrf2 経 路を活性化するのかどうか である。この課題にアプロ ーチするために、さまざま な臓器のトランスクリプト ーム (RNA-seq) 解析を行 った。この目的で、マウス は帰還した直後に安楽死の 後に解剖し、側頭骨(TpB)、 下顎骨(MdB)、脾臓(Spl)、 肝臓 (Liv)、胸腺 (Thy)、白 色脂肪組織 (eWAT)、褐色 脂肪組織(iBAT)、腎臓 (Kid)、および全脳(Cbr) などの組織から RNA サン プルを採取し、RNA-seg 解 析を行なった(図 7a)。

解毒酵素および抗酸化タン パク質など既知の Nrf2 標 的遺伝子である 26 遺伝子 を選択し、ヒートマップを 作成したところ、GC_WTマ ウスと比較して、FL_WTマ ウスと比較して、FL_WTマ ウスのさまざまな組織で典 型的な Nrf2 標的遺伝子の 発現が広く活性化されてい た(図 7b)。一方、これらの 26 遺伝子の発現は、GC・ FL 両者の Nrf2-KO マウス 組織で著しく低下していた (図 7b)。即ち、Nrf2 の発



現は、宇宙ストレス環境下で著しく活性化 図7 宇宙ストレスは Nrf2 経路を活性化する していること、また、Nrf2 は宇宙ストレス に応答する遺伝子群の発現に大きく関与していることが実証された。

さらに、胸腺における典型的な Nrf2 標的遺伝子 Nqo1 および Hmox1 の発現を調べたところ、上述のヒートマップ結果と一致して、FL_WT で見られた発現誘導が FL_KO で減弱化していた(図 7c)。しかし、FL_WT で見られた発現誘導は、Nrf2-KO において完全に消失するのではなく、相変わらず若干の発現誘導が認められることから、宇宙ストレスによって他の制御経路も同時に影響を受けており、これらの遺伝子発現に多少とも寄与していることが示唆された。

以上の結果は、宇宙ストレスによって多くの影響が見られる中で、Nrf2 活性が実際に宇宙 飛行中に誘導され、細胞保護遺伝子の発現を増強することを明確に示しており、生体が Nrf2 シグナル伝達経路を利用して宇宙ストレスに対抗・適応することを実証している(図 7d)。

4.3 宇宙ストレスおよび Nrf2 欠失による遺伝子発現への影響 (成果リスト学術論文 1、 Fig. 3)

宇宙ストレスが遺伝子発現 に及ぼす影響と Nrf2 の寄与 をさらに明らかにするため に、RNA-seq データ中のすべ ての転写産物の発現レベル を主成分分析 (PCA) した。 その結果、フライトと Nrf2 欠 失の両方が遺伝子発現プロ ファイルに影響を及ぼし、4 つの異なるパターンをもた らすことが明らかになった。

胸腺 (Thymus) と白色脂肪組 織 (eWAT) では、PC1 は FL とGCを分離し、PC2はNrf2-KOとWTを分離した(図8a、 b)。対照的に、 肝臓(Liver) と脾臓 (Spleen) では、第1 主成分 (PC1) は Nrf2-KO と WT を分離し、PC2 は FL と GC を分離した(図 8c、d)。 これらの結果は、宇宙ストレ スと Nrf2 欠失の両方が独立 して、遺伝子発現プロファイ ルにおける特定変化を誘発 して、第1および第2のパタ ーンを形成したものと解釈 される。



第3番のパターンは褐色脂肪(iBAT)で見られたもので、PC1はFLとGCを分離したが、 PC2は他のグループをまったく分離しなかった(図8e)。これは、宇宙ストレスがiBATに おける遺伝子発現に影響を与えたのに対し、Nrf2欠失は影響を与えなかったことを示して いる。

第4番目のパターンは全脳(Cbr)であり、PCAによる遺伝子発現パターンの明確な分離は 見られなかった(図8f)。これは、Cbrが多様で不均一な細胞を含むためと推測される。以 上の RNA-seqによる解析から、宇宙ストレスとNrf2欠失は独立して遺伝子発現に影響を与える ものと考えられたが、その影響は臓器により大きく異なることが明らかとなった。

4.4 骨密度および筋重量への影響(成果リスト学術論文1、Supplementary Fig. 2)

第1回マウス飼育ミッション (MHU1)と第 2 回マウス飼 育ミッション(MHU2)の報告 によると、骨密度や筋肉量 の減少などの老化の表現型 は、約1か月にわたる宇宙 飛行中に加速された(参考 文献 8: Shiba et al., 2017、 参考文献 9: Tominari et al., 2019)。本研究の結果は、こ れらの観察結果をうまく再 現した。マイクロコンピュ ーター断層撮影画像は、 GC_WT および GC_KO マ ウスの骨と比較して FL_WT および FL_KO マウ スの骨の骨密度の低下を明 確に示した(図 9a、b)。

しかし、予想に反して、Nrf2 欠失はフライトによる骨塩 密度 (BMD)の減少を加速 しなかった。ヒラメ筋 (Soleus muscle)と腓腹筋 (Gastrocnemius muscle)

の筋肉量もフライトにより



大幅な減少を示したが(図 9c、d)、Nrf2 欠失はこれ 図9 骨密度および筋重量への影響 らの筋重量減少には影響しなかった。

しかし、さらなる解析の結果、筋萎縮においては Nrf2 の貢献は見られなかったものの、筋 繊維タイプの移行において Nrf2 が貢献していることが見出された(4.12 参照、Hayashi et al.,投稿中)。 4.5 宇宙ストレスが引き起こす加齢変化 (成果リスト学術論文1、Fig. 4)

FL WT と比較して FL KO マウス の宇宙旅行中に、骨と筋肉の変化 の明らかな加速がなかったため、 加齢に関連する血漿代謝物の変化 を調べることにした。特に、代謝物 の加齢に伴う変化が Nrf2 によって 制御される細胞保護システムの減 弱によって加速されるかどうかに 注目した。そこで、帰還直後のマウ スの下大静脈から血漿を収集し、 NMR を用いたメタボローム解析を 行った(図 10a)。メタボローム解析 の PCA では、トランスクリプトーム解 析よりは軽微であったものの、PC1 でFL KOとFL WTの分離を認めた ことから(図10b)、宇宙ストレスと Nrf2 欠失の両方が血漿代謝物の変 化に寄与したことを示唆さる。

次に、宇宙ストレスのみ、または 宇宙ストレスと Nrf2 欠失の両方に よって変化する血漿代謝物を探索 した。その結果、代表例として、 グリセロール、グリシン、および コハク酸を見出した。(図 10ce)。グリセロールレベルは、WT マウスと Nrf2-KO マウスの両方 で、GCマウスと比較して宇宙フ





図 10 血漿メタボローム解析

ライトによって増加し、Nrf2 欠失の影響はほ

とんど見られなかった(図 10c)。一方、グリシン(図 10d)とコハク酸(図 10e)の血漿 レベルは、FLWTマウスにおいてGCWTマウスよりも低かった。GCKOマウスのグリ シンとコハク酸のレベルも GC_WT マウスよりも低かったが、これについては宇宙ストレ スでさらに低下することはなかった。これらの結果は、後者の代謝物については、Nrf2 欠 失と宇宙ストレスが同様の変化を引き起こしたものと理解される。

これらの代謝物の変化が、ヒトの老化に伴う代謝物の変化を再現するか調べるために、東北 メディカル・メガバンク機構(ToMMo)で蓄積されたヒトメタボロームデータを活用した。 ToMMoの前向きコホート研究で、若年(20-40歳)および老年(60~80歳)の参加者の血 漿中の代謝物を調べたところ、グリセロールレベルは60-80歳のグループで増加し(図10f)、 フライトマウスの結果と非常によく一致した。また、グリシン (図 10g) およびコハク酸 (図 10h)の血漿レベルは、20-40歳のグループよりも 60-80歳のグループの方が低かった。こ れらの変化も、フライトマウスの変化と非常によく一致した。後者の2つの代謝物は、Nrf2 欠失マウスでも減少し、Nrf2 が老化を遅らせる働きをしているという考えを支持する。し

たがって、これらの結果から、宇宙ストレスが血漿代謝物の老化様変化を引き起こすこと、 また、Nrf2 欠失も同様の老化様変化を引き起こすことが示唆される(図 10i)。

4.6 Nrf2 欠失によるフライト中の体重増加の障害 (成果リスト学術論文 1、Fig. 5)

帰還マウスの健康状態を調べた後、解剖して各組織重量の測定および組織学的解析を行った。この解析において、最も明白な表現型の1つは、フライト Nrf2-KO マウスの体重増加が欠如していたことであった(図11a)。打ち上げ時のマウスは11週齢であり、マウスの体重はまだ増加する時期である。実際、FL_WT マウス、GC_WT マウス、GC_KO マウスはいずれも、ほぼ同じ程度に体重が増加していた。この表現形の背景となるメカニズムについては、現時点では不明であるが、今後、メタボローム解析やトランスクリプトーム解析を活用して、解明に挑む予定である。

次に、eWAT、iBAT、肝臓、脾臓、肺、胸腺、心臓、精巣、腎臓などの組織重量を調べた。 体重あたりeWAT 重量は、フライトによって大幅に増加したが、この増加は FL_KO マウス で大幅に低下した(図 11b)。重要なことは、この eWAT 重量の減少は、GC_KO マウスで は見られなかったことである。同様に、iBAT の重量は FL_WT マウスで有意に増加した。し かし、eWAT とは異なり、FL_KO マウスではむしろさらに増加した(図 11c)。即ち、これ らの 2 つの脂肪組織の挙動はまったく対照的であった。一方、肝臓の重量は、フライトまた は Nrf2 欠失によって大きな変化は見られなかった(図 11d)。

ISS 滞在中のマウスの摂餌量および摂水量について、給餌や給水記録をもとに算出した(図 11e)。その結果、フライト群と地上対照群の両方で、WT マウスと Nrf2-KO マウスの間で 摂餌量および摂水量に有意差は見られなかった(図 11f、g)。これらの結果は、摂餌量およ び摂水量を変えることなく、Nrf2 欠失によって宇宙飛行中の体重増加が障害されたことを 示す。以上の結果は、白色脂肪組織の増加が抑制されたために Nrf2 欠失マウスの宇宙飛行 中の体重増加が障害されたことを示唆する。

宇宙ストレスが脂質や糖の代謝の状態に及ぼす影響についてさらに調べるために、軌道上 (打ち上げ後 18 日目、L+18)と帰還後 2 日後(R+2)にマウス尾から採血されたサンプル を用いて、少量血漿のメタボローム解析を行った(図 11h)。なお、これは宇宙滞在中にマ ウスから採取された血液の最初の解析である。

血漿質量分析メタボローム解析の結果、軌道上滞在中の WT マウスと Nrf2-KO マウスの間 で総コレステロールエステル (CE) レベルに差はなかった (L+18) (図 11i)。帰還時 (R+2) の FL_WT マウスでは総 CE レベルの上昇が見られたが、Nrf2-KO では見られなかった。一 方、総トリグリセリド (TG) レベルは、軌道上 (L+18) では各群間で大きな変化はなく (図 11k)、帰還時 (R+2) では WT と Nrf2-KO いずれも低下した (図 111)。帰還時の WT マウ ス (R+2) のみでの総 CE レベルの増加が見られたことについてはまだ確固たる説明はない が、帰還時に観察された FL_KO マウスの eWAT の減少 (図 11b) は、総 CE レベルに関連 している可能性がある。さらに詳細な血漿メタボローム解析の結果については別途後述す る (4.9 参照、Uruno et al., 投稿準備中)。



図 11 宇宙旅行による体重および組織重量の変化

次に、白色脂肪組織(eWAT)の 組織学解析を行なったところ、 GC_KO マウスの eWAT の脂肪滴 サイズは GC WT マウスの脂肪 滴サイズよりも有意に大きいこ とが観察された(図 12a)。ただ し、eWAT の重量はこれらの地上 対照群間では同等であった(図 11b)。驚くべきことに、宇宙スト レスは FL WT および FL KO マ ウスの脂肪滴サイズの著しい増 加を引き起こした(図 12a)。

すべてのマウスの脂肪滴サイズ を測定したところ、フライトによ る脂肪滴サイズ増加は非常に再 現性が高かった(図 12b)。また、 脂肪滴サイズの分布を測定し、地 上対照マウスグループ(点線)と 比較すると、WT マウスと Nrf2-KOマウスの両方で宇宙ストレス が脂肪滴サイズの増加を引き起 こしていた(図12c、実線)。

以上のデータを利用して eWAT の脂肪細胞数を算出したところ、 Nrf2-KO マウス eWAT の脂肪細 胞数は WT マウスよりも有意に 少ないことが明らかになった(図 12d)。また、地上対照群の Nrf2-KO マウスの eWAT 重量は、脂肪 滴サイズの補完的な増加によっ て維持されているものと考えら れる。

興味深いことに、FL WT マウス eWAT の 脂肪滴サイズは、宇宙飛行後に地上対照

4.7 Nrf2 は白色脂肪の維持に必須 (成果リスト学術論文 1、Fig. 6)



図 12 宇宙ストレスによる白色脂肪への影響

マウスよりも大きくなった。しかし、FL_KO マウスの eWAT の脂肪滴サイズは FL_WT マ ウスとほぼ同等であり(図 12b)、Nrf2-KO マウスの eWAT が既に大きいためにフライトに よってそれ以上大きくならない(図 12e)。即ち、宇宙ストレスによって白色脂肪組織の恒 常性は大きく影響を受けること、また、Nrf2 はこの白色脂肪組織の恒常性維持に重要な役 割を果たすことが明らかになった。

ところで、フライトによって脂肪が増加することは、他の組織においても観察された。脂肪滴サイズと皮下脂肪の厚さがフライトによって増加したが、その増加に対してWTマウスとNrf2-KOマウスの間に有意差は見られなかった(図13)。

さらに、フライトにより、肝臓のオイ ルレッド O 陽性脂肪滴の数が増加した (図 14)。WT マウスと Nrf2-KO マウ スの間に違いは見られなかった。

褐色脂肪細胞(iBAT)の組織重量と脂 防滴サイズも、宇宙飛行によって、 WTマウスとNrf2-KOマウスの両方で 増加した(図15)。これらの広範囲に わたる観察は、全身の脂肪組織が宇宙 ストレスに応答して大きくなったこと を示しており、Nrf2が全身の脂肪組織 の恒常性の維持に重要であることを示 している。





Oil Red O staining of liver



図 13 宇宙旅行による皮下脂肪への影響



4.8 宇宙ストレスおよび Nrf2 欠失が白色脂肪の遺伝子発現に及ぼす影響(成果リスト学術論文 1、Fig. 7)

宇宙ストレスと Nrf2 欠失がどのように白色脂肪の恒常性維持に影響するのかを解明するために、eWAT の RNA-seq データを用いて詳細に遺伝子発現を調べた。その結果、呼吸鎖(図 16a)、および脂肪酸 β 酸化(図 16b)に関与する遺伝子の発現レベルが、地上対照に比べ てフライトマウスの eWAT で著しく減少したことが明らかになった。この変化は、WT および Nrf2-KO の両方で観察されたが、GC_KO マウスでは、軽度ではあるがフライトマウスと 同様の変化が観察され(図 16a、b)、地上においても Nrf2 欠失が宇宙ストレスと同様な eWAT の代謝障害を引き起こしていることが伺われる。以上の結果は、ミトコンドリアの呼 吸鎖および脂肪酸 β 酸化の活性低下が、FL_WT および GC_KO マウスの脂肪細胞の肥大を もたらしている可能性を示している。

さらなる遺伝子発現解析によ り、糖尿病関連ケモカイン遺 伝子の発現レベルが、地上対 照マウスと比較して、両方の 遺伝子型のフライトマウスの eWAT で増加したことが明ら かになった(図16c)。この 観察と一致して、マクロファ ージ(Cd68、Lgals3 および Adgre1) および血管新生 (Kdr および Pecam1)のマ ーカー遺伝子の発現レベル も、地上対照マウスと比較し て、両遺伝子型フライトマウ スの eWAT で増加していた (図 16d)。血管新生は炎症 細胞に酸素と栄養素を供給す ることによって炎症を維持 し、炎症はインスリン抵抗性 を引き起こす可能性があるた め、これらの結果は、宇宙ス トレスが炎症と血管新生によ って脂肪組織の肥大を誘発し ていた可能性を示唆する。

なぜ地上対照の Nrf2 欠失マ ウスの脂肪細胞数が減少する のか調べるために、GC_KOマ ウスからの eWAT における遺 伝子発現の変化を探索したと ころ、多くの PPARγ 標的遺伝 子の発現レベルが GC_KOマ



図 16 宇宙ストレスと Nrf2 欠失が白色脂肪の遺伝子発現に 及ぼす影響

ウス eWAT で低下していた(図 16e)。PPARy は脂肪細胞の分化に重要であるため、GC_KO

マウスにおける PPARγの活性低下は脂肪細胞分化に影響を及ぼして、脂肪細胞数の減少を 引き起こし、さらに、脂肪細胞の代償的肥大を引き起こして eWAT の脂肪量を維持すると 考えられる(図 16f)。



図 17 Nrf2 は宇宙ストレスによる代謝応答に貢献する

宇宙ストレスによる代謝変化および Nrf2 経路の役割を解明するために、血漿中の代謝物濃度について解析を行った。射場(L-17)、軌道上(L+18)、回収場(R+2)にてマウス尾部から採取した血漿を用いて、オービトラップ質量分析によるメタボローム解析を実施した。その結果、野生型フライトマウス(FL-WT)では、軌道上採血(L+18)でのコレステリルエステル(CE)、グリセロリン脂質(リゾホスファチジルコリン(Lyso-PC)およびホスファチジルコリン(PC))、スフィンゴ脂質(SL)の血漿中濃度が増加していた(図 17 左)。この血漿濃度の変化は、Nrf2 ノックアウトマウス(FL-KO)では減弱していた。また、FL-WTにおける CE および SL は、回収場採血(R+2)でも血漿中濃度の上昇を認めたものの、多くの Lyso-PC および PC の回収場採血の血漿中濃度は低下しており、軌道上採血と回収場採

^{4.9} 宇宙ストレスによる代謝応答と Nrf2 経路(成果リスト投稿準備中 Uruno et al.)

血で異なる結果であった。一方、地上対照試験(GC)では、上記の代謝物変化を認めなかった(図 17 右)。

以上より、宇宙ストレスは、血漿中の CE、Lyso-PC、PC、SL の濃度上昇を伴う代謝応答 を引き起こし、Nrf2 経路はその応答に貢献していた。さらに、これらの代謝応答は軌道上 採血により明らかになったが、回収場採血では同定することができなかったことから、軌 道上での解析の重要性が示された結果となった。

4.10 腎臓による宇宙環境応答機構と Nrf2 の役割〜宇宙ストレスによる生理活性脂質の代謝制御(成果リスト投稿準備中 Suzuki et al.)

宇宙環境における微小重力は、血圧、体液 量、骨密度を変化させるが、これらの主要な 宇宙環境応答機構において、腎臓は中心的 役割を担う。また、Nrf2 は腎臓の形成と機 能および環境変化に対する腎保護に必要で あることが報告されている。そこで、腎臓に よる宇宙環境応答機構における Nrf2 の役割 を検討した。

まず、腎臓における Nrf2 標的遺伝子群 (Nqo1, Hmox1, G6pd, Pgd など)の発現 を調べたところ、宇宙ストレスは腎臓の Nrf2 活性に大きな影響を及ぼさないことが 示された。また、腎臓で発現する血圧調節お よび骨代謝に関連する遺伝子について解析 したところ、宇宙ストレスによって発現量 が変動するものの Nrf2 欠失の影響は認めら れなかった。

次に、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解 析データから、Nrf2 依存性に宇宙ストレス によって発現変動する遺伝子として、Ugt1a 遺伝子群を同定した。UGT1A はグルクロン 酸抱合酵素であり、不要な代謝物の解毒・ 排泄に必要となる。Ugt1a 遺伝子群の腎臓 での発現は、フライト(FL)によって上昇 することを RT-PCR 法により確認した(図



図 18 宇宙ストレスによる腎 UGT1A 発現誘導と その意義

18a)。また、腎 Ugt1a 遺伝子群発現は Nrf2 欠失(KO)によって地上対照(GC)において 有意に低下し、フライトによる誘導はほとんど観察されなかった。

Nrf2 は基礎レベルでの腎 Ugt1a 遺伝子群発現に必要であるが、腎臓では Nrf2 は宇宙ストレスによって活性化しないことから、宇宙ストレスによる Ugt1a 遺伝子群発現の誘導に関与する Nrf2 以外の分子経路の同定を試みた。RNA-seq データを再検討したところ、Cyp2a23, Cyp4a10, Cyp4a14 などの生理活性脂質産生酵素の遺伝子発現が宇宙ストレスによって腎臓で誘導されることがわかった。これらの遺伝子は、転写因子 PPAR によって発現誘導されるが、PPAR の他の標的遺伝子群も一様に宇宙ストレスによって腎臓で発現変動した。また、PPAR は様々な臓器で Ugt1a 遺伝子群の発現を誘導することが知られている。なお、

Ugt1a 遺伝子群発現様式が腎臓と類似している膀胱では、宇宙ストレスによる Ugt1a 遺伝 子群および PPAR 標的遺伝子群の発現変化は観察されなかった。

以上の結果から、腎臓は骨代謝や血圧調節することにより、宇宙環境応答において重要な役割を担うことが確認された。また、これらの生体応答系に Nrf2 は必要ないことがわかった。 他臓器の解析から、宇宙ストレスによって基礎代謝レベルが低下し、脂質が蓄積することが わかっている。また、脂質は血圧を上昇させる生理活性脂質の供給源となる。今回の解析か ら、宇宙ストレスは PPAR の活性化を介して、生理活性脂質産生を誘導することが新たに 示唆された(図 18b)。また、PPAR は UGT1A の発現も誘導し、過剰な脂質の解毒・排泄を 促すと考えられた。Ugt1a 遺伝子群の基礎レベルでの発現には Nrf2 が必要であり、Nrf2 欠 失により基礎レベルでの発現が低下すると宇宙ストレスによる腎 Ugt1a 遺伝子群発現誘導 が抑制されることが明らかとなった。

4.11 宇宙ストレスによる赤血球分化抑制と血小板活性化・供給サイクルの亢進 (成果リスト投稿準備中 Shimizu et al.)

宇宙ストレスが造血システムに及ぼす影響と、そのストレス抑止に関わる Nrf2 の機能を解 析するために、末梢血血算およびマウスの主要造血組織である脾臓のフローサイトメトリ 一解析と RNA-Seq 解析を行った。帰還マウスは、Nrf2 の有無にかかわらず、末梢血中の赤 血球数(RBC)が増加していた(図 19a)。また、脾臓の赤血球系細胞割合や、赤血球分化 におけるマスター転写因子である Gata1 遺伝子の発現は有意に低下、または、低下傾向を 示し、造血組織における赤血球造血が抑制されていた(図 19 b, c)。



図 19 宇宙ストレスは赤血球分化抑制と血小板活性化・供給サイクルの亢進を引き起こす

地上飼育下の Nrf2-KO マウスでは野生型に比して、脾臓の赤血球系細胞割合が増加し、 Gata1 遺伝子の発現が上昇しているなど、赤血球造血亢進を示唆する所見を呈していたが、 その傾向は帰還マウスでは軽微となっていた(図 19 b, c)。赤血球造血を抑制する宇宙スト レスが、Nrf2 欠失による赤血球 造血亢進を上回るほど強く影響 したためと推察される。

また、Nrf2の有無にかかわらず、 帰還マウスの末梢血中のプレー トレットクリット (PCT)、平均 血小板容積 (MPV)、血小板分布 幅 (PDW)が有意に増加してい た (図 19d)。さらに、脾臓にお ける CD41 陽性 CD61 陽性の巨 核球割合の増加傾向が認められ (図 19e)、血小板の回転亢進が 示唆された。Nrf2-KO マウスで は、野生型に比較して、これらの 変化がより顕著であった。

さらに末梢組織(肝臓、腎臓、胸 腺)における遺伝子発現プロフ ァイルを精査したところ、肝臓 において、炎症にかかわる複数 のパスウェイに関連する遺伝子 群の発現変化が認められるこ と、この発現変化がNrf2欠失に より増強されることがわかった (図 19f)。腎臓や胸腺において も、同様の傾向が認められた。

代表例として、肝臓におけるア ラキドン酸代謝パスウェイ関連 遺伝子の発現変化を図 19g に示 す。前述の血小板回転亢進を示す 結果と合わせ、これらの結果は、



図 20. 骨格筋重量、組織学的解析および遺伝子発現解析

宇宙飛行により誘発される炎症病態が血小板の活性化を惹起し、消費と供給のサイクルを 亢進させること、Nrf2 欠失はこの過程を増強することを示唆している。すなわち、宇宙スト レスは末梢組織での血小板活性化を惹起して微小血栓形成を促進し、血栓塞栓症発症の危 険性を高めるが、Nrf2 の活性化によりその発症リスクを減弱できると考えられる。

4.12 微小重力環境下における Nrf2-KO マウスの骨格筋の筋萎縮および筋線維タイプの検 討(成果リスト投稿中 Hayashi et al.)

宇宙ストレス環境下の Nrf2 経路による骨格筋への影響を調べるために、5 種類の後肢骨格筋を採取した。ヒラメ筋を薄切して、その切片により組織学的解析および RNA-seq 解析を実施した。微小重力の影響を受ける抗重力筋であるヒラメ筋の湿重量は、FLマウスでは WT、 Nrf2-KO ともにそれぞれの GC マウスと比べ、有意な減少を示した(図 20a)。しかし、その変動率(GC から FL)は、WT、Nrf2-KO 間で差は見られなかった。HE 染色により、骨格筋異常の指標である中心核形成や白血球浸潤は、いずれのグループでも認められなかった。 筋横断面積測定により FL マウスでは WT、Nrf2-KO ともにそれぞれの GC マウスと比べ、 有意な減少を示すが、その変動の割合に差は見られなかった(図 20b)。一方、RNA-seq 解 析により 62 種類の筋萎縮関連遺伝子(atrogene)について検証した結果、FL、GC 間の遺 伝子発現の変化は WT と Nrf2-KO 間で大きな違いは見られなかった。これらの結果より微 小重力環境の長時間曝露による骨格筋量の維持に Nrf2 が関与しないことが示唆された。

微小重力環境下では、ヒラメ筋は遅筋から速筋へ筋線維タイプが移行することが知られている。そこで、ヒラメ筋横断切片を筋線維タイプ I, IIa, IIb の免疫組織学的解析をおこなった。各筋線維タイプの割合を計測した結果、FL-KO で GC-KO に対して、WT では見られない有意差のある Type I の減少、および Type IIa の増加が観察され、Nrf2-KO のヒラメ筋は宇宙環境においてより速筋化が進んでいることが明らかになった(図 20c)。

RNA-seq 解析により、遅筋関連遺伝子である Myoglobin と Troponin T1 遺伝子は WT と Nrf2-KO 共に FL マウスで減少していたが、速筋関連遺伝子である Actinin3 (*Actn3*)遺伝 子の発現が FL-KO で GC-KO に対して有意に増加しており、表現型と一致していた(図 20d)。

以上の結果は、Nrf2 は微小重力環境において、骨格筋の筋萎縮には関与はしていないが、 遅筋であるヒラメ筋の速筋化の抑制、または遅筋の維持に作用する可能性を示している。

4.13 行動解析

宇宙ストレスが行動に与える影響および宇宙環境下の行動における Nrf2 の役割を調べるために、オープンフィールドテスト、明暗選択箱テスト、Y字迷路テストを行った。オープンフィールドテストの総移動距離および中央部滞在時間の結果、Nrf2 欠失による不安傾向が見られたものの、フライトによる不安様行動への影響は見られなかった。また、フライトと Nrf2 欠失の両方によって不安行動が強まることは観察されなかった。

同様に、明暗選択箱テストの明箱での滞在距離および滞在時間を調べた結果、地上対照の Nrf2 欠失による不安傾向が見られたものの、フライトによる不安様行動への影響は見られ なかった。むしろ、Nrf2 欠失マウスは地上対照で見られた不安様行動の傾向が、フライト 群では見られなくなった。また、Y 字迷路テストの交替行動を測定した結果、フライトに より空間作業記憶の低下傾向は見られたものの、Nrf2 欠失による影響は見られなかった。

以上の解析では、統計学的有意な結果は得られなかったが、宇宙ストレスおよび Nrf2 欠失 が行動に及ぼす影響がないことを結論するものではない。むしろ、Nrf2 欠失による不安や フライトによる空間作業記憶の低下が示唆されるが、結論を得るためにはより大きい n 数 の解析が必要になると考えられる。 以上の解析から、サクセスクライテリアに対する達成度は以下のように自己評価した。

MHU-3の解析データの一部については、宇宙でのマウス実験による生命科学データベース ibSLS(宇宙生命科学統合バイオバンク、Integrated Biobank for Space Life Science) にて 2020 年 11 月 26 日に公開した。これにより、より広範にかつ簡潔に、小動物飼育ミッションのサンプルや解析データを研究者に配布することが可能となり、今後さらに宇宙の知見が、地上での加齢研究および高齢者の健康を守る研究等に発展することが期待される。以上のような成果から、エクストラサクセスに達成したと判断する。

サクセス	クライテリア	達成
ミニマム サクセス	軌道上で飼育した Nrf2 欠失マウスについて、 生存、死亡(凍結)に関わらず、サンプル回 収ができ、野生型マウスで得られなかった知 見(行動、飼育状態、各臓器の所見など)を 獲得できること	 ○(達成) 軌道上で飼育した Nrf2 欠失 マウスを生存回収し、体重変 化に差が見られるなど、野生 型マウスと異なる知見が得ら れた
フルサクセス	上記に加え、軌道上から回収したマウスの 様々な組織・臓器において、組織レベル、遺 伝子発現レベル(RNA-seqなど)、あるいは 代謝産物レベル(メタボローム解析など)で 比較解析を行い、宇宙環境ストレスに対する Nrf2の生理的貢献を総合的に判断するエビデ ンスを得ることができること	 (達成) 軌道上から回収したマウスの 各組織・臓器について、組織 レベル、遺伝子レベル、代謝 産物レベルの解析により、宇 宙環境ストレスが生体に及ぼ す影響への Nrf2 の生理的貢 献を明らかにした
エクスト ラ サクセス	Nrf2 欠失マウスにおいて、野生型マウスと比 較して明らかな加齢の加速が見られた場合、 上記に加え、東北メディカルメガバンクでの 地上の 5-10 年にわたる大規模コホート研究デ ータと、約4週間の宇宙滞在マウスでのデー タを比較参照し、宇宙滞在における加齢変化 の加速を Nrf2 を中心に解析できること。ま た、それにより、地上での加齢性疾患の端緒 を開くような Nrf2 を基軸とした概念の確立が できること(マウスからヒトへの外挿可能な ストレス/加齢性疾患因子の評価系の確立な ど)	 ○(達成) 血漿メタボローム解析から宇 宙ストレスによって引き起こされる変化が、ヒトの加齢変化においても同様な変化を引き起こすことを見出し、マウスからヒトに外挿可能な新しい加 齢変化の知見を見出すことに成功した

5. 結言

ISS・きぼう利用ミッション「宇宙ストレスにおける環境応答型転写因子 Nrf2 の役割 (Mouse Stress Defense)」により、以下の成果が得られた。

- 宇宙滞在によって様々な臓器で Nrf2 が活性化することが明らかになった。
- 宇宙滞在マウスでは各臓器における遺伝子発現や血中代謝物の変化が確認され、その 一部は東北メディカル・メガバンク機構(ToMMo)コホートデータで観察されているヒトの 加齢性変化と同じ変化であったことが明らかになった。
- 宇宙滞在において Nrf2 は白色脂肪細胞の恒常性維持に重要であるが明らかになった
- 宇宙滞在による骨密度低下は Nrf2 欠失マウスにおいても同程度に起こることが明らか になった。
- 宇宙滞在による骨格筋重量低下は Nrf2 欠失マウスにおいても同程度に起こるが、遅筋 であるヒラメ筋の速筋化の抑制、または遅筋の維持に作用する可能性が示唆された。
- 軌道上採血の結果、宇宙滞在中でのみ生じる血漿代謝物の変化があることが明らかに なった。またその応答に Nrf2 が貢献していることがわかった。
- 腎臓は骨代謝や血圧を調節することにより、宇宙環境応答において重要な役割を担う ことが確認された。
- 宇宙ストレスは末梢組織での血小板活性化を惹起して微小血栓形成を促進し、血栓塞 栓症発症の危険性を高めるが、Nrf2の活性化によりその発症リスクを減弱できると考 えられた。

[参考文献]

- 1 Suzuki, T. et al., Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. Trends Pharmacol Sci. 34, 340-346. doi: 10.1016/j.tips.2013.04.005. (2013).
- 2 Yamamoto M. et al., The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. Physiol Rev. 98, 1169-1203. doi: 10.1152/physrev.00023.2017. (2018).
- 3 Hirota, A. et al., Acceleration of UVB-induced photoageing in nrf2 gene-deficient mice. Exp Dermatol 20, 664-668. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01292.x. (2011).
- 4 Hosoya, T. et al., Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. J Biol Chem 280, 27244-27250. doi: 10.1074/jbc.M502551200. (2005).
- 5 Sun, Y.X. et al., Role of Nrf2 in bone metabolism. J Biomed Sci 29, 101. doi: 10.1186/s12929-015-0212-5. (2015).
- 6 Cancedda, R. et al., The Mice Drawer System (MDS) experiment and the space endurance record-breaking mice. PloS One. 7, e32243. doi: 10.1371/journal.pone.0032243. (2012).
- 7 Suzuki T. et al., Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. Mol Cellr Biol. 33, 2402-2412. doi: 10.1128/MCB.00065-13. (2013).
- 8 Shiba, D. et al., Development of new experimental platform 'MARS'-Multiple Artificialgravity Research System-to elucidate the impacts of micro/partial gravity on mice. Sci Rep 7, 10837, doi:10.1038/s41598-017-10998-4. (2017).
- 9 Tominari, T. et al., Hypergravity and microgravity exhibited reversal effects on the bone and muscle mass in mice. Sci Rep 9, 6614, doi:10.1038/s41598-019-42829-z. (2019).
- 10 Itoh, K. et al., An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. Biochem Biophys Res Commun 236, 313-322. doi: 10.1006/bbrc.1997.6943. (1997).

[成果リスト]

学術論文

- Suzuki T, Uruno A, Yumoto A, Taguchi K, Suzuki M, Harada N, Ryoke R, Naganuma E, Osanai N, Goto A, Suda H, Browne R, Otsuki A, Katsuoka F, Zorzi M, Yamazaki T, Saigusa D, Koshiba S, Nakamura T, Fukumoto S, Ikehata H, Nishikawa K, Suzuki N, Hirano I, Shimizu R, Oishi T, Motohashi H, Tsubouchi H, Okada R, Kudo T, Shimomura M, Kensler TW, Mizuno H, Shirakawa M, Takahashi S, Shiba D and Yamamoto M. (2020) Nrf2 contributes to the weight gain of mice during space travel. *Commun Biol.* 3, 496. doi: 10.1038/s42003-020-01227-2.
- 2 Yumoto A, Kokubo T, Izumi R, Shimomura M, Funatsu O, Tada MN, Ota-Murakami N, lino K, Shirakawa M, Mizuno H, Kudo T, Takahashi S, Suzuki T, Uruno A, Yamamoto M, Shiba D. (2021) Novel method for evaluating the health condition of mice in space through a video downlink. *Exp Anim.* In press doi: 10.1538/expanim.20-0102.

総説

1 Afshinnekoo E, Scott RT, MacKay MJ, Pariset E, Cekanaviciute E, Barker R, Gilroy S, Hassane D, Smith SM, Zwart SR, Nelman-Gonzalez M, Crucian BE, Ponomarev SA, Orlov OI, Shiba D, Muratani M, Yamamoto M, Richards SE, Vaishampayan PA, Meydan C, Foox J, Myrrhe J, Istasse E, Singh N, Venkateswaran K, Keune JA, Ray HE, Basner M, Miller J, Vitaterna MH, Taylor DM, Wallace D, Rubins K, Bailey SM, Grabham P, Costes SV, Mason CE, Beheshti A. (2020) Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration. *Cell.* 183, 1162-1184. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.050.

2 芝大、湯本茜、岡田理沙、小林拓恵、上村大輔、白川正輝、山本雅之 "新たなステージに入った宇宙ライフサイエンス研究" 実験動物ニュース Vol. 70 No.1、2021 年 1月

投稿中・投稿予定

- 1 Hayashi T, Kudo T, Fujita R, Fujita S, Tsubouchi H, Fuseya S, Suzuki R, Hamada M, Okada R, Muratani M, Shiba D, Suzuki T, Warabi E, Yamamoto M, and Takahashi S. Nrf2 deficiency accelerates muscle fibre type transition but not atrophy during space flight. 投稿中
- 2 Uruno A, et al., Nrf2 plays critical roles in metabolic response during and after spaceflight. 投稿準備中
- 3 Shimizu R et al., Nrf2 restrains platelet consumption caused by space stress-induced inflammation. 投稿準備中
- 4 Suzuki N, et al., Space-travel inducible and Nrf2-dependent expression of the Ugt1a isoform genes in kidneys: implication in bioactive lipid excretion. 投稿準備中

学会発表

- 1 山本雅之、宇宙ストレスにおける環境応答型転写因子 Nrf2 の役割~国際宇宙ステーションでの JAXA-東北大連携~ 東北大・宇宙航空研究連携拠点 発足記念第一回シンポジウム 2019 年 10 月 5 日 東北大学片平生命科学研究科
- 2 山本雅之、生体防御機能強化による宇宙ストレス克服法の開発 JAXA 小動物飼育ミッション 宇宙実験 知見交換会 2019 年 12 月 24 日 TKP ガーデンシティお茶ノ水
- 3 鈴木隆史、宇宙ストレス克服を目指した転写因子 Nrf2 の生理機能解析 新学術領域「宇宙に生きる」2019 年度 第1回全体会議 2019 年8月 22-23 日 岐阜大学

報道

- 1 NHK ニュース 2017 年 12 月 17 日 JAXA Nrf2 マウス(遺伝子欠失マウス)を打ち上げる
- 2 マイナビニュース 2018 年 3 月 16 日 普通の人も宇宙に行ける時代へ JAXA、3 度目の 小動物飼育ミッションに挑戦
 - <u>https://news.mynavi.jp/article/20180316-601268/</u> BS朝日 2018年3月24日 宇宙飛行士の健康管理術
- 3 BS 朝日 2018 年 3 月 24 日 宇宙飛行士の健康管理術 http://www.bs-asahi.co.jp/uchuu kenko/
- JAXA プレスリリース 2018 年 4 月 6 日 JAXA 宇宙ステーション・「きぼう」での実験、「きぼう」にて、第 3 回小動物飼育ミッションが開始されました。
 http://iss.jaxa.jp/kiboexp/news/180406.html
- 5 仙台放送 NEWS 2018 年 4 月 27 日 宇宙で解明「Nrf2」の可能性~がん予防などに"光" ~ <u>http://ox-tv.jp/nc/smp/article.aspx?d=20180427&no=27</u>
- 6 JAXA プレスリリース 2018 年 5 月 11 日 JAXA 宇宙ステーション・「きぼう」での実験、世界初、遺伝子ノックアウトマウス(特定遺伝子を欠失した)の全数生存帰還に成功~「きぼう」
での第3回マウス長期飼育ミッションが終了しました~ http://iss.jaxa.jp/kiboexp/news/180511.html

- 7 日刊工業新聞(36 面) 2018 年 5 月 24 日 宇宙実験 効率的に、メンテ短時間で安全 「き ぼう」恩恵大きく日本宇宙開発支える宇宙でマウス飼育 遺伝子改変で新知見
- 8 ニュースイッチ 2018 年 5 月 24 日 うつ・認知症の治療薬開発、宇宙からのヒント https://newswitch.jp/p/13055
- 9 マイナビニュース 2018 年 5 月 28 日 宇宙を旅したマウス、12 匹無事帰還 金井宇宙飛 行士が給餌

https://news.mynavi.jp/article/20180528-637395/

- 10 仙台放送「Live News it!」 2020 年 9 月 9 日 加齢性疾患解明へ一歩 宇宙マウスに長寿 のヒント 東北大学と JAXA
- 11 仙台放送 2020年9月9日(水)加齢性疾患解明へ一歩 宇宙マウスに長寿のヒント 東北 大学とJAXA <u>https://nc.ox-tv.co.jp/news/detail/2020090900027</u>他転載(goo ニュース、yahoo ニュー ス)
- 12 ITmedia NEWS 2020年9月9日 宇宙では加齢変化が加速 ISS「きぼう」でのマウス実験から明らかに 加速を食い止める遺伝子も発見 <u>https://www.itmedia.co.jp/news/articles/2009/09/news144.html</u>他転載(BIGLOBEニュ ース、mixiニュース)
- 13 ニュースイッチ 2020 年 9 月 10 日 宇宙に長期滞在で加齢変化が加速する、JAXA などが 解明

<u>https://newswitch.jp/p/23732</u> 他転載(d menu ニュース、goo ニュース)

- 14 財経新聞 online 2020 年 9 月 10 日 宇宙ストレスによる加齢 阻止する遺伝子突き止め る JAXA らが ISS で実験 https://www.zaikei.co.jp/article/20200910/584674.html
- 15 Qlifepro 2020 年 9 月 10 日 宇宙長期滞在マウスで加齢変化、Nrf2 活性化が食い止めに 重要と判明一東北大ほか http://www.glifepro.com/news/20200910/nrf2-2.html
- 16 サイエンスポータル 2020 年 9 月 24 日 宇宙での老化加速が判明 東北大、遺伝子欠損マ ウス調べ <u>http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash review/newsflash/2020/09/20200924 0</u> <u>1.html</u> 他転載(マイナビニュース、biglobe ニュース)
- 17 スポーツ栄養 WEB 栄養で元気になる! 2020 年 9 月 25 日 宇宙マウス研究から健康長 寿のヒントを発見 JAXA・東北大などのグループが報告 <u>https://sndj-web.jp/news/000972.php</u>
- 18 マイナビニュース 2020 年 9 月 25 日 宇宙長期滞在で加齢が加速することが判明、食い止める遺伝子も 東北大など https://news.mynavi.jp/article/20200925-1333885/
- 19 日刊工業新聞 2020 年 9 月 10 日 宇宙長期滞在で加齢化 JAXA・東北大が解明 疾患予防・治療に応用
- 20 日本経済新聞 2020年9月20日 長寿のヒント 宇宙マウスで 東北大などが実験

2021年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

宇宙ストレスにおける環境応答型転写因子Nrf2の役割 (Mouse Stress Defense)

代表研究者 山本 雅之(東北大学)

総合評価

S: 目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた(エクストラサクセス相当)

本研究では、世界で初めて遺伝子ノックアウトマウスを用いて宇宙実験を行った。形 態学的解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析などを駆使して、宇宙ストレス 環境下でNrf2転写因子が活性化され、Nrf2シグナルが宇宙ストレスに関与することを示 した。Nrf2の宇宙における作用を種々の臓器、組織で詳細に解析し、特筆すべき成果を 上げたものと評価する。東北メディカル・メガバンク機構の有する膨大なヒト遺伝子デー タベースを活用した研究体制を確立したこと、及び、JAXAと連携して本ミッションの成果 を基盤とした宇宙生命科学複合バイオバンク(Integrated Biobank for Space Life Science; ibSLS)を構築したことも評価できる。

2021年7月

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学分野)

ISS・きぼう利用ミッション 「宇宙ストレスにおける環境応答型転写因子 Nrf2 の役割 (Mouse Stress Defense)」 研究成果概要書 代表研究者:山本 雅之(東北大学) 2021 年 4 月



人類の宇宙進出が身近になった現在、私たちが宇宙環境に滞在した場合に直面する医学 的リスクについて明らかにし、その宇宙ストレスを回避する術を開発することは重要な 課題である。宇宙環境においては、主に宇宙放射線と微小重力が生体に悪影響を与える。 宇宙放射線に被ばくすると、活性酸素種(酸化ストレス)が発生し、DNA 障害や細胞死 を引き起こす。微小重力は、細胞にメカニカルストレスを与え、細胞内シグナル伝達の 乱れを引き起こす。本研究では、生体防御系遺伝子群を制御する転写因子 Nrf2 に着目 し、宇宙ストレスにおける Nrf2 の生理的貢献を明らかにすることを目的とした。

これまでの研究から、酸化ストレスや外来異物などの環境由来ストレスに対して、Nrf2 は抗酸化応答・異物代謝に関わる遺伝子群を統一的に制御し、恒常性維持に働くことが 明らかになっている。Nrf2 は、非刺激下では Keap1 を介してユビキチン化されプロテ アソームにより分解されるが、一方、Keap1 はストレスセンサー分子としても機能し、 ストレスを感知すると Nrf2 ユビキチン化反応を停止する。その結果、安定化した Nrf2 は核内に蓄積して転写を活性化する。Nrf2 欠失マウスは放射線や紫外線によるストレ スに対して脆弱になることから、これらのストレスに対して Nrf2 は防御的に働くこと が理解される。また、血流によるシェアストレスなどのメカニカルストレスに対する応 答や骨形成に Nrf2 が関与することなども明らかにされている。即ち、Nrf2 は一群の酸 化ストレス防御系の遺伝子を活性化するとともに、メカニカルストレスに対する応答に も寄与することも期待されるため、宇宙ストレス耐性に寄与する可能性を秘めている。 このような知見から、Nrf2 に注目した本ミッションの着想に至った。

本研究の研究チーム体制では、各組織・臓器の解析を担当する研究者に加え、東北メディカル・メガバンク機構(ToMMo)のゲノム解析部門担当者も参画し、様々な組織・臓器において、組織レベル、遺伝子発現レベル、代謝産物レベルでの網羅的な解析が可能な研究体制を構築した。また、ToMMoに蓄積されたコホートデータを活用し、ヒトとマウスのデータの連携解析およびそのデータベース化を目指した。

野生型および Nrf2 遺伝子ノックアウトマウスの雄それぞれ 6 匹、合計 12 匹をケネデ ィ宇宙センターから打ち上げ、ISS・「きぼう」で 31 日間飼育した。12 匹すべてが軌道 上滞在を終え、生存帰還した。これまでに遺伝子改変マウスを用いた宇宙実験の試みに おいて、完全な形で生存帰還を実現し、その有効性を十分に評価できたものはない。本 研究は、世界初の遺伝子ノックアウトマウスの宇宙滞在生存帰還実験に成功したもので ある。即ち、本研究成果は、今後の病態モデルマウスを用いた宇宙実験のロールモデル になるものと期待される。特に、地上では何年もかかるような加齢の実証実験を宇宙で 短期間に再現できることが明らかになったので、今後様々な研究への応用が期待される。

帰還マウスのサンプルを用いて、RNA シークエンス解析による網羅的遺伝子発現解析を 行った結果、宇宙滞在によって様々な臓器でNrf2が活性化していた。この事象は、Nrf2 活性が実際に宇宙滞在により誘導され、生体防御遺伝子群の発現を増強することを明確 に示しており、生体が Nrf2 シグナル伝達経路を利用して宇宙ストレスに応答・対抗し ていることを示している。また、地上における加齢により引き起こされる遺伝子変化が、 宇宙滞在マウスにおいても一部であるが再現されていることも観察された。

また、帰還マウスの血漿メタボローム解析の結果、宇宙滞在マウスでは血中代謝物の顕 著な変化が確認されること、さらに、その一部は ToMMo が有するコホートデータで観 察されているヒトの加齢性変化と同じ変化であることがわかった。宇宙に滞在すると、 筋肉量や骨量の低下など加齢に似た現象が起きることは知られていたが、血中代謝物の 加齢変化が確認されたのは初めてである。以上の成果から、宇宙ストレスは様々な加齢 変化を早回しで引き起こすこと、そして Nrf2 はその加齢変化に対抗して、その変化を 食い止める役割を果たしていることが理解された。

さらに本研究では、軌道上採血により得られた微量な血漿を用いてメタボローム解析を 実施した。その結果、これまでの宇宙から帰還直後の解析データとは異なり、宇宙滞在 中でのみ生じる血漿代謝物の変化があることが明らかになった。また、その応答に Nrf2 が貢献していた。本研究は、宇宙環境滞在中マウスから採血を行い、打ち上げ前、およ び帰還後のマウスからの採血サンプルと併せて詳細なメタボローム解析を実施した初 めて例はであるが、その重要性が大きく実証された。

帰還マウスを詳細に調べた結果、野生型マウスでは白色脂肪組織量が宇宙滞在により増加することが明らかになったが、この変化は Nrf2 欠失マウスではほとんど起こっていなかった。この結果から、宇宙ストレスによって白色脂肪組織の恒常性は大きく影響を受けること、一方、Nrf2 はこの白色脂肪組織の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

本研究の成果である網羅的遺伝子発現解析や血漿メタボローム解析のデータは、宇宙で のマウス実験による生命科学データベース ibSLS(宇宙生命科学統合バイオバンク、 Integrated Biobank for Space Life Science)にて公開した。これにより、より広範にか つ簡潔に、小動物飼育ミッションのサンプルや解析データを研究者に配布することが可 能となり、今後さらに宇宙の知見が、地上での加齢研究および高齢者の健康を守る研究 等に発展することが期待される。

これまでに Nrf2 発現量の低いヒト遺 伝子多型が知られており、本研究成果 はこの多型を持つ人は宇宙滞在にお ける健康リスクが高いことを示して いる。月や火星への長期滞在を考える と、ヒト Nrf2 遺伝子多型を調べるこ とで健康リスクの高い個人を事前に 予想することが可能になるものと期 待される。さらに本研究成果は、Nrf2 を活性化する薬剤が宇宙滞在時の健 康リスクを克服するために有効であ ることを示唆している。これまでに Nrf2 活性化剤は、糖尿病やアルツハイ マー病など加齢性疾患の予防や治療 に有効であることが知られており、多



くの製薬企業により開発が進んでいる。今後、Nrf2 活性化剤は宇宙滞在時のみならず、 地上における高齢者の健康を守る薬の研究に発展することが期待される。 Summary report of the ISS-Kibo utilization mission, "Role of Environmental Stress-responsive Transcription Factor Nrf2 in Space Stress" (Mouse Stress Defense) Principal Investigator, Masayuki Yamamoto (Tohoku University) April 2021



Now that human beings are familiar with space exploration, it is important to clarify the health problems that occur when we stay in the space environment and to develop the technique to protect our bodies against the space stress. The main effects of the cosmic environment on living organisms are due to cosmic radiation and microgravity. When exposed to cosmic radiation, reactive oxygen species (ROS or oxidative stress) are generated, causing DNA damage and cell death. Microgravity exerts mechanical stimulus and stresses on cells, and disrupts the intracellular signal transduction. In this study, we focused on the transcription factor Nrf2, a master regulator of stress defense genes, and aimed to clarify contributions of Nrf2 to the space stress.

Our previous studies have shown that Nrf2 regulates expressions of genes involved in anti-oxidative and anti-electrophilic response, and helps to maintain homeostasis. Nrf2 is ubiquitinated via Keap1 and degraded through the proteasome under basal condition. Keap1 also functions as a stress sensor and stops ubiquitination reaction of Nrf2 when it senses a stress stimulus. Stabilized Nrf2 accumulates in the nucleus and activates transcription. Nrf2-deficient mice are susceptible to the stress caused by ultraviolet radiation. In addition, it has been clarified that Nrf2 is involved in the response to mechanical stress. Thus, Nrf2 not only activates anti-oxidant genes, but also contributes to vascular protection against mechanical stress and bone formation. Therefore, it has been suggested that Nrf2 has a potential to counteract to cosmic stress.

We have established a research team that enables comprehensive analyses of the gene and metabolite expression by including researchers of Department of Integrative Genomics at the Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo). In addition, by utilizing the cohort data accumulated in the ToMMo, we aimed to collaborate and analyze human and mouse data and create a database thereof.

Six wild-type and six Nrf2 gene knockout mice, a total of 12 male mice, were launched from the Kennedy Space Center and bred on the International Space Station (ISS) "Kibo". After 31-days stay in ISS, all 12 animals returned safely to the earth. This study succeeded in the first gene knockout mouse survival and return experiment in space. The results of this research will become role models for future space experiments using pathological model mice. In particular, since aging-related experiments that take many years on Earth can be reproduced in space in a short period of time, and application to various experiments is expected in the future.

Comprehensive gene expression analysis by RNA-sequencing of the returned mouse sample showed that Nrf2 is activated in various organs during the space stay, clearly demonstrating that Nrf2 activity is actually induced by space travel and enhances the

expression of cytoprotective genes. This result indicates that the Nrf2 pathway is utilized to counteract against the space stress. In addition, some of the gene expression alterations related to aging were also observed in space mice.

Plasma metabolome analysis identified changes in blood metabolites in space flight mice. Of note, some of the changes are the same as human aging-related changes observed in the cohort data of ToMMo. Whereas aging-like phenomena such as atrophy of muscle and bone when staying in space have been known, aging-related changes in blood metabolites are identified for the first time in this study. From the above results, it was found that space stress causes various aging-related changes at a rapid rate, and that Nrf2 has a role to counteract and stop the aging-related changes.

In this study, we have developed a new blood collection procedure that is minimally invasive and easy-for-use for astronauts. Capitalizing on the development of the new device, we successfully collected small amounts ($40-\mu$ L) of blood from mouse tails during the flight. Subsequent mass spectrometry-based metabolome analysis successfully detected plasma metabolites in the small volumes of plasma. Our results show that there are changes in plasma metabolites that are found only in in-flight samples, but not in post-flight samples. We also found that Nrf2 contributes to the specific metabolic response during the spaceflight. This is the first analysis of blood that was collected from mice during their stay in the space environment and detailed metabolome analysis.

Detailed examinations of the returned mice revealed that Nrf2 disruption impairs bodyweight gain and white adipose tissue volume change in mice during the spaceflight. This result indicate that Nrf2 is important for maintaining white adipose tissue homeostasis.

A part of the data of comprehensive gene expression analysis and plasma metabolome analysis is released to public in the life science database ibSLS (Integrated Biobank for Space Life Science). This makes possible to distribute samples and analysis data of space mouse missions to researchers more broadly. Further research on space will be valuable for aging research on the ground and research to protect the health of the elderly.

It has been known that there is a specific regulatory single nucleotide polymorphism in the NRF2 gene that downregulates the expression of Nrf2 and increases the risk of diseases in humans. The results of this study suggest that people with this polymorphism have a high health risk during space stay. Furthermore, the results of this study show that drugs that activate Nrf2 are effective in overcoming the health risks of staying in space. In the future, Nrf2 activators are expected to develop into research on drugs that protect the health of the elderly on the ground, not only when staying in space.



【別紙2-1】

きぼう利用テーマ

ほ乳類の繁殖における宇宙環境の影響 (Space Pup)

研究成果報告書

研究代表者;若山 照彦(山梨大学)

2021年12月

1. 諸言

(1) 背景・国内外の関連研究の現状

将来月面基地やスペースコロニーなどが建設され永住する時代が来た時、人類だけでな く家畜の生殖・繁殖も必要になる。だが宇宙環境は無重力や強力な宇宙放射線が降り注ぐ ため、継世代への影響が懸念されている。そのため宇宙空間での受精及び発生に関する研 究が魚類や両生類で行われ、それらの動物種は微小重力環境でも問題なく繁殖可能なこと が確かめられている¹⁻⁷。ところがほ乳類の宇宙生殖に関する研究は、妊娠後期における微 小重力の影響について調べられているだけであり、受精及び初期発生についての研究や、 宇宙放射線の影響についてはほとんど調べられていない。なぜならほ乳類は環境の変化に 敏感であり、せっかく宇宙へ運んでも交尾をしない可能性が高いためである。実際に宇宙 でラットの繁殖を試みたコスモス 1129 の実験では、宇宙どころか地上のコントロール実 験でも繁殖行動をせず失敗している⁸⁻¹³。

そこで失敗する可能性の高い動物を宇宙に運ぶ代りに、生殖細胞を用いた研究が計画さ れたこともある。だがほ乳類の生殖細胞は小さすぎるため顕微鏡を使わなければ扱うこと ができず、熟練技術を要することから宇宙飛行士に ISS 内で実施してもらうことはほぼ不 可能である(過去にマウスの受精卵を ISS へ打ち上げて培養を試みた実験があるが失敗し た。詳細は発表されていない)。また、受精卵の培養器内での発生可能な期間はわずか 4-5 日間しかなく、どんなに急いでも ISS へ到着前に胚は死んでしまう。凍結した卵子や受 精卵を打ち上げれば、ISS 内で解凍し微小重力で胚が発生可能か調べることが出来るかも しれないが、凍結胚の解凍―洗浄―培養作業は非常に難しく、宇宙飛行士にこの実験を依 頼することは非常に困難であった(Space Embryo ミッションで実現できた)。このような 事情により、哺乳類の宇宙生殖に関する研究は微小重力を再現できる 3D クリノスタット を用いた擬似宇宙実験に限定されていた。我々も擬似宇宙実験により、ほ乳類の初期胚は 微小重力環境下では細胞分化が阻害され発生できなくなる可能性を報告している¹⁴。もし この結果が宇宙でも事実なら、ほ乳類は宇宙での繁殖が不可能ということになってしま う。そのため「きぼう」を利用した本当の宇宙実験が必須であることが分かっているが、前 述した理由によりこれまで本格的な哺乳類の宇宙生殖実験は実施することが出来なかっ た。

(2) 本研究の特徴

これまで ISS へ凍結した生殖細胞を運ぶ実験は行われたことが無いが、それはロケット や ISS で液体窒素が使用不可だからである。しかし我々は1998年に精子の凍結乾燥保 存技術を開発し、従来は液体窒素でなければ保存出来なかった精子を短期間であれば室温 でも保存可能にした¹⁵。その後、さらなる検討を加えて、現在では室温での長期間保存す ることも可能となった。この精子の凍結乾燥技術を用いれば、ロケットでの運搬と地上へ の回収時を室温で行うことが可能であり、ISS 内での長期保存は ISS にある冷凍庫を利用 すればよいため、低コストで実施可能である。そして ISS で長期保存した精子を調べるこ とで、宇宙環境(主に宇宙放射線)の生殖細胞への影響を調べることが可能になるだけで なく、次世代以降への影響についても初めて明らかにすることが出来るだろう。また、こ の研究は ISS で精子を保存するだけなので、顕微鏡下での習熟した操作を必要とせず、保 存後に宇宙から回収した精子を我々が解析するため、宇宙飛行士が担当する作業もほとん どない。

一方、自然災害が話題となる昨今、種の保存を目的とした遺伝資源保存プロジェクトが 世界各国で行われているが、地震などのアクシデントで電力供給がストップしてしまえ ば、保存した生殖細胞はすべて溶けて全滅してしまう。しかし本研究によって宇宙での哺 乳類精子の長期保存が可能であることが証明できれば、スペースコロニーあるいは月面の 裏側などが維持コスト不要な遺伝資源の究極的な保管場所となるはずである。このように 本研究課題は人類の宇宙での繁栄のためだけでなく、種の保存という点でも重要な成果を なるだろう。

(3) 意義・波及効果

科学・技術への貢献/長期宇宙滞在への貢献/地上社会への貢献

宇宙で長期保存した精子から産仔(宇宙マウス)の作出に成功した。スペースコロニー や月面で人類が繁栄可能であることを始めて示し、宇宙開発のためのモチベーションを高 めることになる。また長期的な視点に立てば、「ノアの方舟」と称される遺伝子資源保全 プロジェクトにおいて宇宙空間や月面は、電力供給など人為的な関与を一切必要としない 究極の永久保管場所になることを証明したことになる。

このように 本研究で作られるほ乳類初の宇宙産仔の作出は世界的なインパクトを与えると思われる。

2. 研究計画

2. 1 研究目標

宇宙(ISS)でマウスの凍結乾燥精子を長期間保存し、地上でそれらの保存精子における DNA 損傷を調べ、宇宙放射線が産仔および次世代へどのような影響を与えるのか明らかにする。また、地上で X 線照射によるリファレンス実験を行い、ISS で理論上の保存可能期間を明らかにする。

サクセスクライテリアと達成状況を表1に示す。

サクセス	クライテリア	達成状況
Minimum Success	 軌道上で1年以上保管したサンプルの回収 を行い、地上において以下が実施できる こと。 ・精子の状態、DNA修復度、初期胚の質を 評価する。 ・産仔の出産率を評価する。 	◎達成した
Full Success	 軌道上で2年以上保管したサンプルを含め、経時的に評価できる間隔で3回の回収 を行い、地上において以下が実施できること。 ・精子の状態、DNA修復度、初期胚の質を経時的に評価する。 ・産仔の出産率を経時的に評価する。 ・生まれたマウスは、宇宙放射線の遺伝子への影響を調べるため数世代交配を繰り返し、保存期間と突然変異率の関係を評価する。 	 ◎達成した 宇宙生物学史上最も長い5 年10か月間、軌道上で保管した。 正常な産仔が多数得られた。 網羅的な遺伝子発現解析および次世代への影響はなかった
Extra Success	フルサクセスを超える新たな発見やメカ ニズム解明に至ること。 (柿沼テーマとの合同での解析、考察を 含む)	 ◎5年10カ月年間保存でも宇宙放射線の影響をほぼ受けないのは予想外であり、本方法が室温かつメンテナンスフリーでより長期間の宇宙放射線測定の新たな手段(Bio Dosimeter)となることが判明した。 ◎凍結乾燥精子を用いれば、地球外(月の地下など)を遺伝子資源の半永久保存場所として利用できる可能性が示された

表1. サクセスクライテリア

このサクセスクライテリアでは、精子の保存期間を1ヶ月、1年、および2年で計画し ていた。しかしロケットのアクシデント(回収予定ロケットの打ち上げ失敗)などにより 当初の予定を大幅に超えた長期間の宇宙保存となった。それにより精子の宇宙での保存可 能期間は我々の予想を超える長さであることが判明し、保存期間の延長はExtra success に貢献した。2016年11月にRun3の実験期間延長について、きぼう利用テーマ選考評価委員 会において、評価・承認された。

2.2 体制

研究チーム体制および JAXA 支援体制は、各フェーズで充分に機能し、役割を果たした。 研究チーム体制および JAXA 支援体制を表 2 および表 3 に示す。

分担	氏名	所属	担当			
研究代表者	若山 照彦	山梨大学 発生工学研究センター	研究全般、実験責任者			
共同研究者	若山 清香	山梨大学 発生工学研究センター	研究全般、実験遂行者			
共同研究者	石野 史敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	実験遂行者(回収試料 の解析)			
共同研究者	幸田 尚	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	実験遂行者(回収試料 の解析)			
共同研究者	柿沼 志津子	放射線医学総合研究所 放射線防護 研究センター	実験遂行者(試料の提 供および回収試料の解 析)			

表2.研究チーム体制

表 3 . JAXA 支援体制(2021 年 12 月)

氏名・所属	担当
東端 晃・宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・きぼう利	とりまとめ
用センター	
山﨑 誠和・宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・きぼう	とりまとめ支援
利用センター	
嶋津 徹	研究者支援
日本宇宙フォーラム・宇宙利用事業部	
山盛 徹	研究者支援
日本宇宙フォーラム・宇宙利用事業部	

2. 3 スケジュール

テーマ選定から飛行後解析までのスケジュールを表4に示す。回収の遅延により軌道上実 験期間が延長された。

F T T		
	実験準備段階移行時点の計画	実績スケジュール
		(口个时间)
船内実験室第2期後半候補	2010 年 3 月 26 日	_
テーマ選定		
フライト実験準備移行審	2011年7月4日	
査		
試料打ち上げ(Run1~	2012 年 10 月	2013 年 8 月 4 日
Run3)		
回収(Run1)	2012 年 12 月	2014年5月19日
回収(Run2)	2013 年 11 月	2016年5月12日
実験計画変更評価		2016 年 11 月 29 日
(Run3 実験期間延長)		
回収 (Run3)	2015 年 1 月	2019年6月4日
実験実施後評価	2016年3月	2020年9月7日
(飛行後解析進捗確認会)		
実験実施後評価	2017年3月	2022年3月1日
(最終評価)		

表4. テーマ選定から飛行後解析までのスケジュール

3. 実験準備·運用

・フェーズ移行までの実施事項 選定後のフェーズ移行準備時期において、研究代表者とJAXA が協力して、以下の作業を 行い、実験要求書案、実験計画書案を作成した。

- ▶ 実験要求、供試体概念検討、運用性検討、安全性検討
- ▶ 実験項目、コスト、スケジュール、体制の具体化
- 付帯条件への対応
- ▶ 技術的課題の洗い出しと解決策の検討
- 予備的な実験

選定時の付帯条件ならびに技術的課題に対する対応をそれぞれ表5、表6に示す。また、 実験計画最適化の検討結果を図1に示す。

大きな改善点としては、テーマ選定時には、放射線遮蔽材の利用を検討していたが、予 備検討の結果、遮蔽材は採用せず実験期間を複数設定することで被ばく放射線量を変更す ることとした。

No	付帯条件	回答
1	他の細胞等凍結保管実	実験試料、予備実験進捗が異なるため、JAXA および提案
	験と同時実験実施の可	者間で、情報交換を行い、打上げ・回収機会、器具類等
	能性を検討すること	の有効活用を念頭に進めた。
		さらに、柿沼テーマでは、複数の放射線感受性または遺
		伝子修復欠損マウス系統を用いるので、これらのマウス
		系統の精子を本テーマでも用いることで、発生に対する
		放射線影響に関して、多面的な解析の可能性を検討中で
		ある。
2	対照群の設定について	地上でフライト実験と同条件で保存した試料を対照群
	十分検討すること	とし、宇宙放射線など宇宙環境で精子の受ける影響を解
		析する。予備実験で、想定される JEM での線量では産仔
		を得られることが示され、個体レベルで次世代への影響
		が解析可能である。

表5.付帯条件に対する対応

FS 選定時の技術的評価		対応状況
評価項目	コメント	
実施体制	(指摘無し)	—
実験試料	(指摘無し)	—
装置等 (コスト見込)	(指摘無し)	—
試料量 輸送条件	凍結乾燥細胞の室温による打ち 上げ、回収、軌道上における冷 蔵、冷凍のみの要求であり実現 性を低減する要素は少ないと考 えられる。	打上、回収は室温、軌道上では冷 凍保存、保存期間は1カ月、12カ 月 24 カ月とする。 *
運用条件 (クルー時間・ 打 上 / 回 収 質 量)	実験条件に関する定量的な記述 がない(放専線遮蔽、低温保管、 実験期間など)	実現可能な研究計画を作成した。
安全性	(指摘無し)	—
その他	船外被ばくの要求があるが、今 回の募集・評価の範囲外。	対象外とした。

表6.技術的課題に対する対応

*保存期間はその後9か月、約3年、約6年に延長された(前述)。

【採択時の実験計画】	【フェーズ移行時の実験計画】
・ほ乳類を用いた実験が困難であることは 十分理解するが、本提案研究についてど の程度意味があるかは不明	 試料保管は小スペースであり、将来的に 遺伝子資源保全の究極の保管場所となり 得る可能性もある。
・観察が主であるが、遺伝子解析等も望ま れる。	・コメットアッセイ、γH2Ax 免疫染色解析に 加えて DNA マイクロアレイ解析を実施す る。
・実験条件に関する定量的な記述がない (放射線遮蔽、低温保管、実験期間など)	 ・放射線遮蔽は実施せず、実験期間は1ヶ月 回収、12ヶ月回収、24ヶ月回収、試料数 はガラスアンプル 48 本 x3 群、保管温度 は輸送時常温、軌道上は冷凍。
・宇宙環境の影響を特定するための対照群 の設定が重要となるので、十分な検討が 必要である。	・地上でフライト実験と同条件で保存した 試料を対照群とし、宇宙放射線など宇宙 環境で精子の受ける影響を解析する。

図1. 実験計画の最適化検討

・フライト実験準備移行審査 外部評価

2011 年 7 月 4 日に、実験目的・意義、付帯事項に対する対応結果など、実験要求の妥当 性について、きぼう利用テーマ選考評価委員会による外部評価を受けた。

【評価結果の概要】

フェーズ移行が妥当との評価を得た。

打上試料準備

2012 年 12 月に精子の凍結乾燥を開始し、2013 年 2 月末までに地上対照群、予備を含め て66匹のマウスそれぞれから約30本、合計2000本以上のガラスアンプル入りの凍 結精子を作製し、凍結保存した。図2に示すように作製した凍結乾燥精子のロットチェッ クを行い、最も質の高い凍結乾燥精子を作ることが出来た個体を4系統から12匹選び出 し、さらにそれぞれの個体で作成した30本のアンプルビンを顕微鏡で詳細に調べ、最高 品質の24本を選び出した。この同一雄から作製した24本の試料を4本ずつ1セット、 合計6セット作り、JAXAが準備したフライト用ステンレス容器6箱に緩衝材(NP ゲル)で 包んで、収納した。したがってそれぞれの箱には、12匹×4アンプルビン=48本入っ ている。



図2. 宇宙実験の試料作製方法と解析内容

・打ち上げ(Run1~Run3 用全て)

2013 年 8 月 4 日、Space Pup サンプル(Run1~Run3 用、各 1 容器)は、HTV-4 号機に搭載して種子島宇宙センターから打ち上げられた。種子島宇宙センターまでは冷凍温度で輸送し、搭載時からは常温として打ち上げられた。ガラスアンプル、容器、作業風景などを図3に示す。



図3. 凍結乾燥精子の作製、打ち上げ、および本ミッションデカール

凍結乾燥精子の入ったアンプルビンは、破損防止用カプトンテープでくるんだ後、小さな金属の箱に48本詰め込みます(上の写真)。種子島宇宙センター内の巨大な無塵室で凍結乾燥精子を保冷箱に詰め、「こうのとり4号機」の頭部に収納(中下段左側と中段右)。 本ミッション名はSpace Pup(宇宙仔ネズミ)(右下)。 軌道上保管

HTV-4 号機で打ち上げられ、国際宇宙ステーションにドッキング後、2013 年 8 月 10 日から、軌道上の MELFI 冷凍庫内で-95℃で保管された。実験概要を図 4 に示す。

・試料回収(Run1~Run3)

軌道上で MELFI 冷凍庫で保管された後、回収時は常温として、Run1 は 2014 年 5 月 19 日、 Run2 は 2016 年 5 月 12 日、Run3 は 2019 年 6 月 4 日(いずれも日本時間)に地上(米国)に 回収された。回収後は冷凍温度で日本まで輸送された。



図4 実験概要

放射線計測

宇宙放射線量計測は JAXA で開発された、受動型線量計 Bio PADLES を用いてサンプル近傍の宇宙放射線量を計測した。PADLES の軌道上保管期間は 10 カ月程度とされているため、 Space Pup 実験用として5 個の Bio PADLES を打ちあげ、他実験で打ち上げた Bio PADLES のデータを合わせて全期間での宇宙放射線量を測定することができた(図5)。

PADLESの設置期間



図5 PADLES による全期間の宇宙放射線量の測定

・飛行後解析

回収されたサンプルを受領後、各々のサンプルについて、ガラスアンプルから凍結乾燥 精子を回収し、顕微授精法により産仔を得ることができた。コメットアッセイで DNA 二重 鎖切断を解析し、γH2AX を免疫染色法で解析した。得られた産仔について次世代シーケン ス解析を実施している。

4. 実験結果および成果

(1) 9か月保存の結果について

フライトサンプルの作製方法と Run1の結果概要を図6に示す。フリーズドライ精子への宇宙放射線被ばく量(図6D)は、1日当たり0.6ミリシーベルト(0.4mGy)、9か月間の合計で178ミリシーベルト(117mGy)であった。これは地上で同期間計測した放射線環境の(9か月間で1.8ミリシーベルト)のほぼ100倍に相当した。宇宙保存精子のDNA損傷度をコメットアッセイ法により調べたところ、4系統中3系統でDNA損傷の割合が地上保存に比べ有意に高くなっていた(図6G~I)。



図6. ISS・「きぼう」日本実験棟で保存したマウスのフリーズドライ精子および精子 DNA の損傷について(Run1)

合計 70 匹の雄マウスからフリーズドライ精子を作成し、すべての個体の精子について顕 微授精を行い(ロットチェック)、もっとも出産成績がよかった 12 匹を打ち上げ用に選抜 した。(A)フリーズドライ精子が入ったアンプルビン。フリーズドライ精子は白い粉状に なっている(真ん中のアンプルビン)。(B)1 匹当たり4本のアンプルビンを12 匹分、NASA 指定のカプトンテープでまとめたもの。また放射線測定器を入れた白い四角いパウチ袋 (PADLES)も用意する。(C)合計48本のアンプルビンを小型輸送箱に入れ、最後に PADLES を入れて蓋をする。(D) PADLES で放射線の量を測定したもの。プラスチック基板上に放射 線が当たった跡。(E,F) 地上保存精子(E) と宇宙保存精子(F) の顕微鏡像。宇宙保存によ る影響は見られなかった。(G,H) コメットアッセイにより個々の精子 DNA の損傷を測定し たもの。地上保存精子(G) と宇宙保存精子(H) を比較。彗星の尾のように見える部分が DNA 損傷を示しており、長いと DNA ダメージが大きい。(I) コメットアッセイのデータをグ ラフ化したもの。4 系統のマウスそれぞれで地上保存精子(オレンジ)と宇宙保存精子(青) を比較すると、B6 系統以外は宇宙保存精子の方が DNA 損傷が高い。(J,K) 受精卵における 精子由来の核(雄性前核)の DNA 損傷度を調べたもの。地上保存精子による受精卵(J)と 宇宙保存精子による受精卵(K)を比較。左上:DAPI 染色ですべての DNA を青く染色。右 上:H3K9me2 抗体で卵子由来の核を緑色に染色。左下: γH2AX 抗体で損傷している DNA を 赤く染色。右下:3 色を合わせたもの。(L) γH2AX 染色の結果をグラフ化したもの。黒丸 は地上保存、白丸は宇宙保存。1 つの丸が 1 つの受精卵を指す。4 系統とも宇宙保存精子の 方が地上保存精子より γH2AX の輝度(赤色)が高い傾向があったが、BC 系統以外は有意差 が無かった。

しかし、マイクロマニピュレーターを用いて宇宙保存精子を卵子内へ注入(顕微授精) すると(図7)、宇宙保存精子の大部分は卵子と受精した。受精後の DNA 損傷を調べたとこ ろ、精子由来の核 DNA 損傷は4系統中1系統でのみ有意な損傷が観察されただけだった(図 6J~L)。おそらく卵子が持つ DNA 修復能により、精子 DNA 損傷は受精後直ちに修復され たのだと思われる。



図7。マイクロマニピュレーターを用 いた顕微授精

本研究ではマイクロマニピュレーター を最大で9台同時に使用した。このマ イクロマニピュレーターを使うこと で、宇宙放射線が次世代へどのような 影響を及ぼすのか調べることが可能に なった。

おそらく発生中に DNA 損傷が修復されたため、宇宙保存精子で受精した胚は外見的に正常 な胚盤胞へ発生することが出来た(図8A~F)。宇宙保存精子由来の受精卵を偽妊娠 (借り腹)メスに移植したところ、4系統のマウス精子すべてから合計 73 匹の宇宙精子 由来のマウス(宇宙マウス)を得ることに成功した(表1、図8G,H)。どの系統も地上 保存マウスとほぼ同じ出産率で、宇宙保存による出産率への影響は見られなかった。宇宙 マウスは順調に成長し、正常な妊性を示し、宇宙マウス同士の子供にも異常は見られなか った。また、宇宙マウスの網羅的遺伝子発現解析を行った結果、地上対照区のマウスと違いは見られなかった(図8I)。



図8. 宇宙保存精子で受精した胚の発生と宇宙マウスの誕生(Run1) (A-D) 宇宙保存精子で受精した胚の初期発生。(E,F) 地上保存および宇宙保存精子で受 精した胚盤胞を染色し、胚の品質を調べたもの。地上保存精子由来の胚盤胞(E) より宇 宙保存精子由来の胚盤胞(F)の方が若干細胞数が少なかったが、構造は正常だった。

 (G)今回の実験の出産成績。灰色はフリーズドライ精子を作成した直後、オレンジは地 上保存、青は宇宙保存の精子による出産成績。作製直後に比べると地上保存も宇宙保存も 出産率が下がっているが、どの系統とも地上保存と宇宙保存の間に差は見られなかった。
 (H)宇宙保存精子から生まれた宇宙マウス。(I)網羅的遺伝子発現解析。地上保存精子 由来の6匹の産仔(G1-G6)と宇宙保存精子由来の7匹の産仔(S1-S7)の間で遺伝子発現 を比較した結果、多少の違いがみられるものの統計的に有意な差は無かった。

この実験によって、2013 年 8 月 4 日~2014 年 5 月 19 日の ISS 船内の宇宙放射線環境で は、約 9 か月間の保存により精子由来の核 DNA に若干損傷を生じるが、それらの損傷は受 精や出産に影響のない範囲であり、生まれた産仔はほぼ正常であることが明らかとなった。

(2)3年および6年間保存の結果

最初にリファレンス実験として行った地上でのX線照射実験について述べる。X線は放 射線医学総合研究所にて、新鮮精子およびフリーズドライ精子に対して 0~30Gy を照射し た。フリーズドライ精子の DNA 損傷度は被ばく量が増加するにつれて増加したが、放射線 耐性は新鮮精子に比べ非常に高く、最大で 30Gy まで照射した精子からも産仔を得ること ができた(図9)。これは新鮮精子の約10倍の耐性があることになる。





(A) BDF1 マウスの凍結乾燥精子に X 線を 5~30Gy まで 5Gy 刻みで照射した(放射線医学 総合研究所で実施)。コメットアッセイで精子の DNA 損傷を調べた結果、DNA 損傷は線量 が増えるにつれ増加し、コントロールを 1 とした場合、20Gy では 1.23 まで上昇した。

(B) X線照射精子を卵子へ注入し、雄性前核のγH2A.xの輝度を調べた結果、コメットア

ッセイと同様に DNA 損傷度(正確には DNA 修復がなされている個所)は線量が増えるにつ れ増加した。(C)X線照射精子を卵子へ注入して得られた受精卵を移植して、産仔への 発生を調べた結果、最高の 30Gy を照射した精子からも産仔を得ることに成功した。一方 新鮮な精子へX線照射した場合は、5Gy および 10Gy それぞれから1匹ずつ生まれただけ だった。(D) C57BL/6の凍結乾燥精子を C57BL/6の卵子へ注入し、得られた産仔をすぐ に解剖し、脳を取り出して、DNA マイクロアレイにより網羅的に遺伝子発現を調べた。ま た、放射線だけでなく 95℃で1時間加熱した凍結乾燥精子についても同時に行った。そ の結果、新鮮精子、放射線未照射、5Gy 照射、および熱処理で生まれた産仔、合計16匹 の間に遺伝子発現の差はまったく見られなかった。

ついで、宇宙ステーションで約6年間保存した精子の宇宙放射線被ばく量を測定したところ、合計被ばく量は788mGy(1,192mSv)であった。1日当たりにすると0.37mGy(0.56mSv)である。これは地上で自然に受ける線量の約86倍に相当した。

フリーズドライ精子の宇宙保存の影響については、コメットアッセイ法を用いて、宇宙 で3年間、および6年間保存した精子のDNAダメージを、地上で3年間および6年間保存 した精子と詳細に比較した。その結果、宇宙で3年間保存と6年間保存との間に精子DNA のダメージは差が無いことが明らかとなった(図10C~E)。おそらく打ち上げ直後に は振動などの要因で地上保存区と差が生じるが、ISS内で安定した保存を継続した場合、 3年程度では差が出ないのだと思われた。

それらの精子を卵子へ顕微注入したところ、約10%程度は卵子が活性化せず受精に失敗した。これは精子に含まれる受精因子が保存期間中に減少・変性したためだと考えられるが、地上と宇宙で受精失敗率に差が見られなかったことから、フリーズドライおよびアンプビン保存による影響だと思われた。



図10 宇宙保存した凍結乾燥精子に見られる DNA ダメージ(Run1/Run2) (A)宇宙保存したガラスアンプルビン。(B)マイクロマニピュレーターで精子をピック アップしている様子。(C-E)コメットアッセイ。宇宙3年保存と宇宙6年保存の間でコ メットテールの長さを比較した。系統間でばらつきは見られたが、宇宙3年保存と宇宙6 年保存に明確な差(DNA損傷)は見られなかった。(F)顕微授精を行った瞬間。(G)宇

宙保存精子を卵子へ注入すると、ほぼすべての卵子は正常に受精した。(H)卵子内に注入した精子(左:明視野;右:ヘキスト染色)。(I)系統ごと、および宇宙3年と宇宙 6年保存した精子を用いた場合の受精率。

次に、卵子へ注入した後の DNA 修復について γ H2A. x 抗体を用いて免疫蛍光染色法で調べた。若干だが系統間で DNA 修復箇所に差がみられるが有意ではなく、また地上保存と宇宙保存との間、および3年保存と6年保存の間にも差は見られなかった(図11A~C)。

コメットおよび γ H2A.x では微細な DNA ダメージは測定できるが大きなダメージは調べ られない。そこで、重度の DNA 損傷で生じる染色体分配異常を 2 細胞期の胚で測定し た。その結果、同じ保存期間で比較すると地上より宇宙で保存した精子で、重度の DNA ダ メージが増える傾向が見られた(図11)。だが保存期間が長くなると、地上でも宇宙で もダメージが減るような傾向があった。



図11 宇宙保存精子と受精した胚におけるDNA ダメージの測定(Run1/Run2/Run3) (A, B) 地上6年保存と宇宙6年保存の精子で受精した胚におけるγH2A. Xを免疫蛍光染色 法で測定したもの。(C) 4系統および地上3年、地上6年、宇宙3年、及び宇宙6年保 存の精子で受精した胚のγH2A. Xの輝度をグラフで示したもの。系統間では多少の違いが あるように見えるが、地上保存と宇宙保存、あるいは宇宙3年保存と宇宙6年保存の間に 有意な差は見られなかった。(D, E) 地上6年保存と宇宙6年保存の精子で受精した2細 胞期胚における染色体異常(ACS:遊離している異常な微小核)を調べたもの。(F) 地上 3年、地上6年、宇宙3年、及び宇宙6年保存の精子で受精した2細胞期胚に見られた ACSについて、そのレベルを軽い異常(Light)から致死(Lethal)までの4段階、および 正常な2細胞期胚(NCS)で分け、その割合をグラフで示したもの。地上保存と宇宙保 存、あるいは宇宙3年保存と宇宙6年保存の間に有意な差は見られなかった。

次に受精卵の正常性について胚盤胞への発生率と形態およびアポトーシス陽性率を比較 した。胚盤胞への発生率については系統間でばらつきがみられたが、全系統を合計した場 合、地上と宇宙保存および3年と6年保存のいずれでも差が見られなかった(図12A, B)。この実験で得られた胚盤胞を免疫染色により内部細胞塊と栄養外胚葉に染め分け細 胞数を比較した所、宇宙で6年間保存すると若干だが胚盤胞の細胞数が低下する傾向が見 られた(図12C~E)。一部の胚盤胞については、TUNEL 法を用いてアポトーシス陽性 細胞数を調べた結果、地上保存に比べ宇宙保存の方がややアポトーシス陽性細胞が増える 傾向が見られた(図12F~G)。



図12 受精卵の品質検査(Run2/Run3)

(A) 宇宙で6年間保存した GFP-TG マウスの精子で受精し、胚盤胞まで発生した胚。 GFP 遺伝子の発現により緑色に光っている。(B) 地上3年、地上6年、宇宙3年、及び 宇宙6年保存の精子で受精した胚を5日間培養し胚盤胞への発生率を調べたグラフ。差は なかった。(C,D) 地上6年および宇宙6年保存した精子で受精し、胚盤胞まで発生した 胚を免疫蛍光染色したもの。(E) 4系統および保存区間で、内部細胞塊(Nanog 陽性細 胞) と栄養外胚葉(Cdx2 陽性細胞)に染め分け、細胞数を比較したグラフ。全部の区を まとめた Total のグラフを見ると、地上と宇宙および3年保存と6年保存の間に差が無い ことが分かる。(F-H) 地上6年及び宇宙6年保存した精子で受精し胚盤胞へ発生した胚 のアポトーシス陽性細胞を調べたもの。(H) 4系統および保存区間でアポトーシス陽性 細胞の面積(画像処理により胚盤胞内の割合を算出)を比較したグラフ。全部の区をまと めた Total のグラフを見ると、地上と宇宙および3年保存と6年保存の間に差が無いこと が分かる。

しかし受精卵をメスマウスへ移植して産仔への発育率を調べると、宇宙で3年間保存した場合(12.3%)と6年間保存した場合(12.9%)とで差はなく、また、地上3年保存(12.4%)や6年保存(12.1%)とも差は見られなかった(図13I)。本研究では宇宙で6年間保存した精子から合計168匹の産仔が生まれたが(表7)、いずれも外見は正常であり(図13J)、網羅的遺伝子発現解析でも異常は見られなかった(図13)。一部のマウスについては性成熟後に交配し、健康な仔および孫が生まれることを確認した(図14)。



図13 受精卵の品質検査と産仔の正常性(Run2/Run3)

(A) 出産率のグラフ。4系統および保存区間ではばらつきがみられるが、全部の区をま とめたTotalのグラフを見ると、地上と宇宙および3年保存と6年保存の間に差が無いこ とが分かる。(B) 宇宙6年間保存で生まれた産仔(宇宙マウス)。(C) C57BL/6系統の 地上6年保存と宇宙6年保存で生まれた産仔(それぞれ8匹)の脳を取り出して、RNAseqによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。両者にほとんど違いはなかった。

		Period of	No. of oocytes	No. (%) of		No. (%) of two-cell		No. (%) of	
Mouse	保存場所*	preservation	surviving after	fertilized embryos		embryos at 24 h*		offspring	
strain			ICSI						
BDF1	Original	0	89	74	(83.1)	68	(76.4)	20	(29.4)
	Ground	1y	216	208	(96.3)	165	(76.4)	19	(11.5)
		3у	502	452	(88.1)	408	(90.3)	8	(2.0)
		6y	418	338	(80.9)	284	(84.0)	30	(10.6)
	Space	1y	367	359	(97.8)	262	(71.4)	24	(9.2)
		3у	862	783	(90.8)	636	(81.2)	38	(6.0)
		6y	434	425	(97.9)	396	(93.2)	49	(12.4)
BCF1	Original	0	98	98	(100)	74	(75.5)	23	(31.1)
	Ground	1y	423	366	(86.5)	278	(65.7)	10	(3.6)
		3у	266	289	(94.4)	253	(87.5)	58	(22.9)
		6у	329	320	(97.3)	303	(94.7)	66	(21.8)
	Space	1y	282	256	(90.8)	182	(64.5)	15	(8.2)
		3у	581	664	(93.7)	597	(89.9)	94	(15.7)
		6у	348	343	(98.6)	324	(94.5)	51	(15.7)
129B6F1	Original	0	49	48	(98.0)	38	(77.6)	16	(42.1)
	Ground	1y	242	231	(95.5)	213	(88.0)	27	(12.7)
		3у	214	181	(84.6)	167	(92.3)	15	(9.0)
		6у	204	165	(80.9)	137	(83.0)	14	(10.2)
	Space	1y	341	327	(95.9)	279	(81.8)	24	(8.6)
		3у	418	395	(94.5)	345	(87.3)	55	(15.9)
		6у	225	180	(80.0)	155	(86.1)	43	(27.7)
C57BL/6	Original	0	75	75	(100)	55	(73.3)	17	(30.9)
	Ground	1y	140	133	(95.0)	97	(69.3)	15	(15.5)
		3у	142	161	(99.4)	138	(85.7)	39	(28.3)
		6y	565	418	(74.0)	297	(71.1)	14	(4.7)
	Space	1y	86	75	(87.2)	61	(70.9)	10	(16.4)
		3у	550	479	(87.1)	403	(84.1)	56	(13.9)
		6у	617	498	(80.7)	426	(85.5)	25	(5.9)
Total	Original	0	311	295	(94.9)	235	(79.7)	76	(32.3)
	Ground	1y	1021	938	(91.9)	753	(80.3)	71	(9.4)
		3у	1124	1083	(96.4)	966	(89.2)	120	(12.4)
		6у	1516	1241	(81.9)	1021	(82.3)	124	(12.1)
	Space	1y	1076	1017	(94.5)	784	(77.1)	73	(9.3)
		3у	2411	2321	(96.3)	1981	(85.4)	243	(12.3)
		6у	1624	1446	(89.0)	1301	(90.0)	168	(12.9)

表7 本ミッションで実施した胚移植実験の全出産成績(Run1~Run3)



図14 次々世代も正常(Run3)

宇宙6年保存精子で生まれた産仔をランダムに選び、性成熟後に交配し次世代を作出。その次世代が性成熟した後、次世代間で兄妹交配し次々世代を作出した。精子に生じたDNA 変異がホモとなり発現する可能性を考え、多数の次々世代を作出しているが、いまだミュ ーテーションは見つかっていない。

(3) 今後の期待

将来、人類が宇宙で生活する時代には、不妊治療や家畜の人工授精のために、保存精子 から子孫を作ることが今以上に行われると考えられる¹⁶⁻¹⁸。本研究は、宇宙でも保存精子を 使った生殖が可能であることを初めて示すことができた。本研究で行ったリファレンス実 験からフリーズドライ精子の放射線耐性は非常に高く(最大30Gy)、実際にISS内で6年間 の保存期間中に被ばくした宇宙放射線量(0.37mGy/日)から、フリーズドライ精子は宇宙 ステーションで理論上約200年間保存できることもわかった(30,000mGy÷0.37mGy÷365日 =222年)。本研究では放射線防護を一切行っていないことから、今後放射線防護方法を開 発することで、より長期間の宇宙保存が可能になると思われる。

遠い未来には、人類は他の星へ移住し生活することになるであろう。新天地で地球の動物種を維持するためには、近交退化を避け生物多様性を持たせるために、それぞれの種で 多数の個体を新天地へ運ばなければならない。本研究は、精子を凍結乾燥で運ぶことにより、動物種を他の星へ運搬するためのコストを大きく減らせることを示している。

また今回の研究から、フリーズドライ精子は生物および次世代への放射線被ばく量を測 定する線量計としても利用できることが明らかとなった。宇宙放射線の次世代への影響を 調べることができる線量計はこれが初めてである。しかし高度400kmを回る国際宇宙ステー ションは地球の磁場に保護されており、月や火星に行くときに被ばくする深宇宙の放射線 を研究することはできない。2024年から建設が始まる月周回軌道の新国際宇宙ステーショ ン「ゲートウェイ」を用いれば深宇宙放射線の研究は可能になるが、そこに宇宙飛行士は 常駐しないため、維持管理が必要な実験は実施できない。一方、本研究で用いた凍結乾燥 精子は室温保存が可能であり、維持管理が不要である。この技術を組み合わせれば、宇宙 飛行士が常駐しないゲートウェイであっても長期間の宇宙保存実験が可能になると思われ る。

一方、現在の地球においても、生物多様性、すなわち遺伝資源は人類の貴重な財産であ り、可能な限り多くの遺伝子資源を永久に保存する必要がある。植物の種子は、ビルゲイ ツらが出資して永久凍土の地下に種子貯蔵庫が作られ保存が始まっているが(スパールバ ル世界種子貯蔵庫)、動物の生殖細胞の保存には液体窒素が必要であり、そのような施設は ない。本研究者らが開発した精子の凍結乾燥保存技術を用いれば、動物の遺伝子資源も植 物の種子と同様に室温で簡単に長期保存できると思われる。ところが、地球上には大地震 や洪水、温暖化、原発事故による放射能汚染などがあるため、長期間確実に保管できる場 所はない。もし月の縦孔やその先にある溶岩洞に動物の凍結乾燥した生殖細胞を保管する ことができれば、地球に大きな災害が起こった場合でも安全に半永久的に保存できるかも しれない。

本研究はこれらの可能性を初めて証明した画期的なもので、インパクトファクターの高 い2つの雑誌に掲載された(Wakayama et al., PNAS 2017, IF=10 およびWakayama et al., Science Advances 2021, IF=14)。また国内だけでなく世界のメディアで紹介された(図15)。



図15 本研究は様々な新聞や雑誌、テレビ、ホームページなどで紹介された。

5. 結言

きぼう利用テーマ「ほ乳類の繁殖における宇宙環境の影響(Space Pup)」により、以下の成果が得られた。

(1) 国際宇宙ステーションで長期保存して持ち帰ったフリーズドライ精子を使って、世界 初の宇宙精子由来のマウス(宇宙マウス)が誕生した。保存期間は宇宙生物学史上最長で ある。

(2) 宇宙放射線は精子DNAにダメージを与えるが、卵子の持つDNA修復能力により修復され、受精や発生に影響を与えないことが明らかとなった。

(3) 地上でのX線照射実験の線量をリファレンスとして単純に比較した場合、フリーズド ライ精子は宇宙で200年以上保存できる可能性が示された。ただし宇宙放射線はX線と は線種が大きく異なるため、実際の保存可能期間は今後の研究が必要である。

(4) 網羅的遺伝子発現解析などにより宇宙マウスが正常であることを証明し、次世代への影響もないことを証明した(孫も元気)。哺乳類の宇宙生殖と次世代への影響を調べた 世界初の報告である。

(5)本方法は、生物の次世代への影響を調べられる唯一のバイオドシメーターになるだけでなく、保管するだけで長期間の影響を調べることが可能であるため、月近傍有人拠点 ゲートウェイにおける深宇宙環境での放射線研究にも利用が期待される。

[参考文献]

- 1 Aimar, C. *et al.* Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander Pleurodeles waltl (urodele amphibian). *Biol Reprod* **63**, 551-558 (2000).
- Ijiri, K. Ten years after medaka fish mated and laid eggs in space and further preparation for the life-cycle experiment on ISS. *Biological sciences in space = Uchu seibutsu kagaku* 18, 138-139 (2004).
- 3 Schatten, H. *et al.* Effects of spaceflight conditions on fertilization and embryogenesis in the sea urchin Lytechinus pictus. *Cell biology international* **23**, 407-415 (1999).
- 4 Serova, L. V. [Effect of weightlessness on the reproductive system of mammals]. *Kosmicheskaia biologiia i aviakosmicheskaia meditsina* **23**, 11-16 (1989).
- 5 Souza, K. A., Black, S. D. & Wassersug, R. J. Amphibian development in the virtual absence of gravity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1975-1978 (1995).
- 6 Tash, J. S., Kim, S., Schuber, M., Seibt, D. & Kinsey, W. H. Fertilization of sea urchin eggs and sperm motility are negatively impacted under low hypergravitational forces significant to space flight. *Biol Reprod* **65**, 1224-1231 (2001).
- 7 Ubbels, G. A., Berendsen, W. & Narraway, J. Fertilization of frog eggs on a Sounding Rocket in space. *Adv Space Res* **9**, 187-197 (1989).
- 8 Amann, R. P. *et al.* Effects of microgravity or simulated launch on testicular function in rats. *J Appl Physiol* **73**, 174S-185S (1992).
- 9 Fedorova, N. Spermatogenesis of the dogs. Ugolyok and Veterok after their flight on board the satellite Kosmos 110. *Kosm. Biol. Med* **1**, 28 (1967).
- Philpott, D. E. *et al.* Reduction of the spermatogonial population in rat testes flown on Space Lab-3. *The Physiologist* 28, S211-212 (1985).
- 11 Sapp, W. J. *et al.* Effects of spaceflight on the spermatogonial population of rat seminiferous

epithelium. Faseb J 4, 101-104 (1990).

- 12 Serova, L. V. & Denisova, L. A. The effect of weightlessness on the reproductive function of mammals. *The Physiologist* 25, S9-12 (1982).
- Zhang, S. *et al.* Simulated Microgravity Using a Rotary Culture System Compromises the In
 Vitro Development of Mouse Preantral Follicles. *PloS one* 11, e0151062,
 doi:10.1371/journal.pone.0151062 (2016).
- 14 Wakayama, S. *et al.* Detrimental effects of microgravity on mouse preimplantation development in vitro. *PLoS One* **4**, e6753, doi:10.1371/journal.pone.0006753 (2009).
- 15 Wakayama, T. & Yanagimachi, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* **16**, 639-641 (1998).
- Kupka, M. S. *et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 29, 2099-2113, doi:10.1093/humrep/deu175 (2014).
- European, I. V. F. M. C. f. t. E. S. o. H. R. *et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 31, 1638-1652, doi:10.1093/humrep/dew151 (2016).
- 18 Funk, D. A. Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *J Dairy Sci* 89, 1362-1368, doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72203-2 (2006).

成果リスト

●論文発表

- Wakayama S, Kamada Y, Yamanaka K, Kohda T, Suzuki H, Shimazu T, Tada MN, Osada I, Nagamatsu A, Kamimura S, Nagatomo H, Mizutani E, Ishino F, Yano S, Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 May 22. pii: 201701425. doi: 10.1073/pnas.1701425114. IF:10.7
- Wakayama S, Ito D, Kamada Y, Yonemura S, Ooga M, Kishigami S, Wakayama T. Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from -196 °C to 150 °C. Scientific Reports 2019 Apr 5;9(1):5719. doi: 10.1038/s41598-019-42062-8. IF:4.38
- 3. Wakayama S, Ito D, Kamada Y, Shimazu T, Suzuki T, Nagamatsu A, Araki R, Ishikawa T, Kamimura S, Hirose N, Kazama K, Yang L, Inoue R, Kikuchi Y, Hayashi E, Emura R, Watanabe R, Nagatomo H, Suzuki H, Yamamori T, Tada MN, Osada I, Umehara M, Sano H, Kasahara H, Higashibata A, Yano S, Abe M, Kishigami S, Kohda T, Ooga M, Wakayama T. Evaluating the long-term effect of space radiation on the reproductive normality of mammalian sperm preserved on the International Space Station. Science Advances 2021 Jun 11;7(24):eabg5554. doi: 10.1126/sciadv.abg5554. IF:14.143

●新聞等

2017年5月23日 山梨日日新聞 1面 "宇宙マウス「遺伝子正常」" 毎日新聞28面、"宇宙マウスひ孫まで元気" 産経新聞22面"宇宙マウス誕生" 日刊工業27面 "宇宙保存のマウス精子から正常な子ども誕生" その他ネット検索により、共同新聞など 海外メディア(ネットで掲載) National Geographic誌、The guardian誌、Discover誌(表紙) 2019年4月12日 読売新聞 "高温環境の精子 マウス誕生" 毎日新聞 "哺乳類 DNA に温度耐性" "DNA に驚きの耐性" 山梨日日新聞 2021年6月12日 読売新聞29面 "ISS 保管精子 マウス誕生" 産経新聞22面 "ISS 長期保存精子でマウス繁殖"

山梨日日新聞1面 "宇宙で6年保管精子からマウス"

2021年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

哺乳類の繁殖における宇宙環境の影響 (Space Pup) 代表研究者 若山照彦(山梨大学)

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究は、哺乳類の宇宙環境での繁殖の可能性を探索することを目的として、長期間にわたって軌道上保管した凍結乾燥精子を、様々なアッセイ方法で解析したものである。その放射線耐性が予想外に高いことを示したことは、重要な成果である。

本研究による成果が、宇宙での哺乳類生殖研究に端緒を与えたことは高く評価で きる。今後、研究体制を引き続き維持、また強化し、当該分野をリードする研究へ発 展させることを期待する。

2022年3月

別紙2-2

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学分野)

きぼう利用テーマ

<u>ほ乳類の繁殖における宇宙環境の影響(Space Pup)</u> 研究成果概要書

研究代表者;若山 照彦(山梨大学)

2022年3月

【背景】将来月面基地やスペースコロニーなどが建設され永住する時代が来た時、人類だ けでなく家畜の生殖・繁殖も必要になるが、宇宙環境は無重力や強力な宇宙放射線が降り 注ぐため、宇宙飛行士本人だけでなく継世代への影響が懸念されている。だが、マウスな どの哺乳類を ISS で長期間飼育することは困難であり、液体窒素が使えない ISS では生殖 細胞を長期間保存することも出来ないため、哺乳類の生殖に関する研究は全く行われてい なかった。一方我々は精子のフリーズドライ保存技術を開発し、従来は液体窒素でなけれ ば保存出来なかった精子を短期間であれば室温でも保存可能にした。この技術を用いれば、 ロケットでの運搬と回収時が室温で行え、ISS 内では-95℃の冷凍庫で保管することで、 精子の長期保存が可能になり、宇宙放射線の生殖細胞への影響、およびそれらの精子から 生まれた次世代への影響を初めて明らかにすることができた。また、この研究は ISS で精 子を保存し回収後に我々が解析するため、生殖細胞の研究で要求される顕微鏡下での習熟 した操作を必要とせず、宇宙飛行士が担当する作業もほとんどない。さらに、この研究に より宇宙での哺乳類精子の長期保存方法が開発できれば、保存維持コストの不要な宇宙空 間あるいは月面の裏側などが遺伝資源の究極的な保管場所となるはずである。このように 本研究課題は人類の宇宙での繁栄のためだけでなく種の保存という点でも重要な成果をな るだろう。

【結果】4種類のマウスから採取したフリーズドライ精子は、2013年8月に打ち上げ られ、ISS内の冷凍庫で9か月、約3年、約6年間保存されたのちに回収された。対象区 として全く同じ個体から採取したフリーズドライ精子を筑波で同じ条件で保存した。また リファレンスとして地上でX線照射実験も行った。ISSから回収後、PADLESによる放射線 被ばく量を調べた結果、フリーズドライ精子の平均被ばく量は0.4mGy/dayであり、地上 の約170倍の放射線を被ばくしていることが分かった。我々はこの精子を使って、精子 のDNAダメージ、受精能、発生能、産仔への影響などを様々な方法で検証した(図1)。



図1. 回収した精子のダメージと受精卵の正常性の解析

精子そのもののDNAダメージを解析した結果、宇宙で長期保存した精子のDNAダメージは地 上保存と比較してやや増える傾向が見られたが(図2C,D)、それらの精子を卵子へ注 入した場合の受精率、胚盤胞への発生率、および胚の品質には、宇宙保存と地上保存、お よび宇宙3年保存と6年保存の間に有意な差は見られなかった(図E~K)。



図2 精子の DNA ダメージ、受精能、および胚盤胞の正常性

受精卵を、借り腹雌の卵管へ移植した結果、地上保存および宇宙保存精子から多数の健康 な産仔(宇宙マウス)を得ることに成功し、地上と宇宙、および保存期間の間で成績に差 は見られなかった。一部の産仔についてはRNA-seqによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、 宇宙保存の影響を調べたが、地上保存の産仔と有意な違いはなかった。また、たとえ宇宙 保存精子のDNAに変異があっても受精卵はヘテロとなり、産仔には影響が出ない可能性が



Fig 3. 宇宙マウスの孫世代。ミュ-テーションは見つかっていない 高いため、宇宙6年保存精子で生まれた産仔をラ ンダムに選び、性成熟後に交配し次世代を作出。 その次世代が性成熟した後、次世代間で兄妹交配 し次々世代を作出した。精子に生じたDNA変異がホ モになれば遺伝子発現する可能性があるため多数 の次々世代を作出しているが、いまだミューテー ションは見つかっていない(図3)。地上で行っ たX線照射実験を元に線種を考慮せず単純に線量だ けで比較すると、フリーズドライ精子はISSで約 200年保存可能という結果になった。

【結論】本研究は、世界で初めて宇宙保存精子由来のマウス(宇宙マウス)を作ることに 成功し、宇宙放射線の精子や子孫への影響は6年間の宇宙保存ではほとんど無いことを初 めて示した。本方法は保管するだけで生物の次世代への影響を調べられるバイオドシメー ターとしても利用できるため、月近傍有人拠点ゲートウェイにおける深宇宙環境での放射 線研究にも利用可能なことを証明した。本研究はインパクトファクターの高い2つの雑誌 に掲載された(Wakayama et al., PNAS 2017, IF=10 およびWakayama et al., Science Advances 2021, IF=14)。また国内だけでなく世界のメディアで紹介された。
Summary report of the ISS-Kibo utilization mission, "Effect of space environment on mammalian reproduction (Space Pup)" Principal Investigator, Teruhiko Wakayama (Univ. Yamanashi) March/2022

Currently, NASA and several organizations are beginning to plan manned missions to Mars. In the future, humans will probably live in other space habitats or planets for over many generations with animals such as dogs, cats, and livestock. However, interplanetary deep space is populated not only by microgravity, but also by strong radiation such as galactic cosmic rays. If radiation were continuously irradiated into the body of a species and several mutations accumulated in germ cells over a long period of time, then the species would become a different species. Therefore, it is very important to examine the effects of space radiation on not only living organisms, but also on future generations before the "space age" arrives. However, it was almost impossible to use live animals on the International Space Station (ISS) for longer periods of time. Similarly, mammalian oocytes, embryos, and spermatozoa cannot used on the ISS, because these cells require liquid nitrogen or ultradeep freezers for cryopreservation, which are not available to rockets or on the ISS. In this study, we decided to use mouse freeze-dried spermatozoa (FD sperm) for space radiation experiments because FD sperm can be preserved at room temperature for more than one year, which allows us to launch and keep the FD sperm on the ISS without the need for a deep freezer.



Fig 1. Schematic diagram of the preparation of FD sperm and experiments The 12 best males were selected from 66 males by the quality lot check of ampules, and the 24 best ampoules were divided into 6 boxes. Three boxes were preserved on the ISS for up to 6 years, and the other three boxes were preserved on Earth (Fig 1A). After preservation on ISS, damage of spermatozoa and the quality of embryos after injection of those sperm were examined (Fig. 1B).

When space-preserved FD sperm were rehydrated, some of the sperm heads separated from the tails (Fig. 2B). The Comet DNA breakage assays showed that although there were significant differences between their preservation periods in space, it was very small. This result suggests that long-term exposure to space radiation on the ISS did not cause DNA damage to the FD sperm (Fig. 2C, D).FD sperm were injected into fresh oocytes, then most of oocyte fertilization with FD sperm irrespective of preservation period on ISS (Fig. 2E-G). These results suggest that space radiation did not affect the cytoplasmic factors of spermatozoa too. When embryos were cultured for 5 days, the developmental rate to the blastocysts derived from space preserved spermatozoa was comparable to the ground control (Fig. 2H, I). Immunostaining of blastocysts showed that the quality of blastocyst is also similar to ground control (Fig. 2J, K). After embryo transfer into recipient female,



Fig 2. Examination of sperm damage and the quality of embryos after fertilization

healthy offspring were obtained from 6 years space preserved spermatozoa without reduce the success rate compare to the ground control. There was no difference in the gene expression profiles between all ground control pups and all space pups, and randomly selected offspring grew to adulthood without exception. Although, the lifespan of the randomly selected five C57BL/6 space pups were slightly shorter (ranged from 387 days to 816 days) than general mice (around 800-900 days), when randomly selected male and female space pups were mated each other and then, the next generation were mated again and the third generation was obtained, all the offspring appeared normal (Fig. 3).



Fig 3. Healthy third generation of mice derived from space pups

From reference experiment of X-ray irradiation to the FD sperm on ground, although there are differences between X-rays and space radiation, it can roughly predict that FD sperm can be preserved on the ISS for over 200 years. These results suggest that the effect of deep space radiation on mammalian reproduction can be evaluated using spermatozoa, even without being monitored by astronauts in Gateway. In the future, when the time comes to migrate to other planets, we will need to maintain the diversity of genetic resources, not only for humans, but also for pets and

domestic animals. For cost and safety reasons, FD sperm would be the optimal material for such studies due to their high tolerance. These studies were published to the high impact journals (Wakayama et al., PNAS, 2017; Wakayama et al., Science Advances 2021).

2021年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

宇宙におけるコケ植物の環境応答と宇宙利用 (Space Moss)

代表研究者 藤田 知道(北海道大学)

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究は、宇宙で長期培養したコケ植物を生存回収し、発育速度の遺伝子発現依 存性と物理的要因の解析を実施している。世界的に見ても我が国の強みを生かせる 研究分野であり、幅広い専門分野の研究者が結集して、本研究を達成した意義は大 きいと評価できる。

ただし、コケ植物の結果を、宇宙実験データが蓄積された高等植物と比較すること で宇宙空間における植物の成長や応答の共通性を理解するという目標に関しては、 興味深いデータが得られているものの、さらなる検討が必要であり、研究を継続し成 果創出を目指すことを期待する。

2022年3月

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学分野)

きぼう利用テーマ <u>宇宙におけるコケ植物の環境応答と宇宙利用(スペース・モス)</u> 研究成果概要書

研究代表者;藤田 知道(北海道大学)

2021年12月

近年加速する人類の宇宙への進出において、宇宙空間における生態系の構築、利用は重要な課題である。特に生産者である植物の宇宙利用は最も重要な喫緊の課題の1つである。 これまでにシロイヌナズナやいくつかの作物種を用いた宇宙実験が進められ、地上と宇宙 環境での生育状況の違いが報告されているが、宇宙空間での植物栽培実験の機会が非常に 限られていることから植物が宇宙環境でどのように成長し形態形成するのか、その仕組み や生理応答は地上の場合とどの程度共通で、またどの部分がどの程度異なるのかなどにつ いてはまだ多くの点で明らかにできていない。また被子植物以外の他のさまざまな植物が 宇宙空間でどのように成長するのかを比較研究することも多様な植物資源を宇宙環境下で 有効に活用するために重要である。

コケ植物は極地や都市、火山荒原など地球上の厳しい環境地域を含んだ陸上のあらゆる ところに生育している重要なパイオニア植物である。コケ植物の中でもヒメツリガネゴケ は、相同組換え率が高く、遺伝子ターゲティングによる遺伝子の機能解析が可能なコケ植 物としていち早く注目を浴び、全ゲノム解読が完了し、ゲノムワイドな研究が可能なモデ ルコケ植物である。また十分小型であるため、限られた国際宇宙ステーション(ISS)内で も多検体の実験を1度に行うことができ、繰り返し実験に有利である。したがって、宇宙 における微小重力(µg)など異なる重力環境下での成長や形態の変化、光合成機能をはじ めとした生理応答の変化、遺伝子発現や細胞応答の変化などを同時にかつ多角的に分子細 胞レベルから器官や個体・集団レベルで解析することが可能である。

本テーマでは、ISS 日本実験棟「きぼう」で開発されてきた植物栽培技術を活用し、既存 の培養システムを最小限に改変することで、多数のヒメツリガネゴケを育てる。そして栽 培したヒメツリガネゴケ試料を地上に持ち帰り、成長や生理応答の変化を明らかにし、組 織構造や細胞、遺伝子発現の変動を調査し、地上と宇宙での成長や環境応答の相違を明ら かにすることを目的とした。また ISS で生育するコケ植物や細胞の成長のありさまをリア ルタイムで観察することに挑戦し、µg 環境が植物の成長に与える影響をこれまでになく 多角的かつ高精度に調査した。またヒメツリガネゴケで得られた結果をシロイヌナズナ等 の他の植物でのデータと比較することで、宇宙空間における植物の成長や応答の共通性や 多様性を理解することも目的とした。

地上において、µg 環境とは逆の過重力環境でヒメツ リガネゴケを栽培すると、ヒメツリガネゴケの成長速 度が亢進することを見出した(図1)。その原因は、葉緑 体サイズと茎葉体数の増加率の増大にあり、結果とし て光合成速度が高まるため成長が促進したのではない かと考えられた。一方でこのような結果から、µg 環境 である ISS や月や火星の低重力環境では、植物の成長



図1 ヒメツリガネゴケ過重力栽培

速度は低下するものと予想された(図 2)。重力変 化による成長速度の変化は①遺伝子発現依存的 な効果と②細胞内流動の変化などによる物理的 な効果の何れか、もしくは両方が複合した効果 に起因すると考えられる(図 3)。そこで本研究は これらの作業仮説を、過重力下における栽培と ISS内での栽培を比較することで、重力刺激がど のような仕組みで成長を調整するのか理解する ことを目標とした。この仕組みを理解すること で、将来、宇宙環境で植物を栽培するときに予想 される成長低下に対する新しい成長促進方法の 提案を目指した。得られる新しい科学的成果は、 宇宙での植物栽培だけではなく、地上における 植物生産性の向上や環境浄化、緑化にも活用で き、人類社会に大いに貢献できるはずである。



植物分子細胞生物学、ゲノム進化学、生理生態学および環境物理学などをそれぞれ得意 とする多様な研究者で研究チームを構成し、2015 年 12 月にフィジビリティスタディに選 定され、JAXA 側の支援体制と協力して研究を進めた。そして 2 度の打ち上げ(2019 年 7 月、 12 月)により ISS「きぼう」実験棟でヒメツリガネゴケの µg 下での栽培実験やタイムラプ ス観察を実施し、全行程を予定通り完了し、地上に回収したサンプルやデータの解析を進 めた。またこれら ISS 実験と並行して地上における過重力栽培実験等も実施した。

以上の研究を通じて、µgから10 gまでの範囲でヒメツリガネゴケの茎葉体や仮根は形態や成長速度を変えており、光合成速度も変化していた。たとえば、µg 区と対照1 g 区の間で、茎葉体数、茎の機械的性質には有意な差は検出されなかったものの、µg 区では茎は長く細くなる傾向があった。ISS で栽培したコケの光合成を地上で測定すると、µg 区では対照区と比較して有意に光合成速度が低く、葉緑体の大きさも有意に小さかった。ヒメツリガネゴケの茎葉体は、重力の増加に伴って断面形状を変化させることにより茎の強度を増加させているが、茎の材質は逆に柔らかくなるため、結果として茎の曲げに対する強

度は一定に保たれていることがわかっ た。RNA-seq 解析により発現変動する 遺伝子群の解析を実施したところ、転 写因子やタンパク質のリン酸化に関わ る酵素が有意に変動していることが明 らかになった。中でもある特定の転写 因子が重力の変化に伴う総成長量の変 化に重要な役割を担っていることを明 らかにすることができた。従ってこの 転写因子の発現を制御することで、微 小重力や低重力下で予想される成長量 の減少を抑えられる可能性が示唆され た。また重力の変化に伴い、細胞小器 官の動きも変化していた。従って、細 胞内の物理的状態の変化によって、成 長制御が可能であると考えられた。





Summary report of the ISS-Kibo utilization mission, Environmental response and utilization of mosses in space –Space Moss– (Space Moss) Tomomichi FUJITA (Hokkaido University) Dec./2021

The establishment and utilization of ecosystems in space is an important issue in the recent accelerated human expansion into space. In particular, the space utilization of plants as primary producers in ecosystems is one of the most important and urgent issues. However, the opportunities for plant cultivation experiments in space are very limited. In addition, we have not yet been able to clarify the mechanisms and physiological responses of plant growth and morphogenesis in the space environment: To what extent they are the same as those on the ground, and to what extent they differ. In addition, comparative studies of how other plants besides flowering plants grow in space are also important for the effective utilization of diverse plant resources in the space environment.

Mosses are important pioneer plants that grow everywhere on land, including harsh environmental regions such as polar regions, big cities, and volcanic deserts. Among the mosses, *Physcomitrium patens* was the first to attract attention as a moss that has a high rate of homologous recombination and can be used for gene function analysis by gene targeting. Since the whole genome has been determined, genome-wide studies can be performed on *P. patens*. In addition, its small size makes it possible to conduct repeated experiments even in the limited space of the International Space Station (ISS). Therefore, under the microgravity (μg) environment of space, changes in physiological responses such as growth, morphology, and photosynthetic function, as well as gene expression and cellular responses, can be simultaneously and multilaterally analyzed.

In this research, we utilized the plant cultivation technology developed for the ISS Japanese Experiment Module "Kibo" to grow a large number of *P. patens* by minimally modifying the existing culture system. We succeeded in bringing the cultivated samples back to the ground, and clarified the differences in growth and environmental responses between the ground and space. In addition, we challenged to observe the growth of the moss cells growing on the ISS in real time. Furthermore, by comparing the results obtained for *P. patens* with other plants such as *Arabidopsis thaliana*, we aimed to understand the commonality and diversity of plant growth and response in space.

On the ground experiments, we found that the growth rate of *P. patens* was enhanced when it was grown under hypergravity (Fig. 1). The reason for this was the increase in chloroplast size and the number of gametophores, which resulted in an increase in the rate of photosynthesis per biomass and in promoting growth. On the other hand, these results suggest that the growth rate of the plant is



Figure 1 Hypergravity cultivation

expected to decrease in the μg environment of the ISS and in the low gravity environments of the Moon and Mars (Fig. 2). The change in growth rate due to gravitational changes can be attributed to either (1) gene expression-dependent effects, (2) physical effects such as changes in intracellular flow, or a combination of both (Fig. 3). Therefore, the goal of this research was to understand the mechanism by which gravitational stimuli regulate growth by comparing these working hypotheses with cultivation under hypergravity and on the ISS. By understanding this mechanism, we aimed to propose a new method of growth promotion to cope with the expected



Figure 2 Gravity change and moss growth

reduction in growth when plants are grown in the space environment in the future. The outcome obtained in this research can be used not only for plant cultivation in space, but also for increasing plant productivity, environmental conservation, and greening on the ground, which should contribute greatly to human society.

In December 2015, the Space Moss project was selected for the feasibility study and conducted the study in cooperation with JAXA's support team. After two launches (July 2019 and December 2019), we conducted cultivation experiments and time-lapse observations of *P. patens* under μg on the ISS, Kibo, and completed the entire process on schedule. In parallel with these ISS experiments, hypergravity cultivation experiments on the ground were also conducted.

Through these studies, we found that the morphology and growth rate of gametophores and rhizoids changed from μg to 10 g, and the photosynthetic rate also changed. RNAseq analysis of the expressed genes revealed significant changes in transcription factors and enzymes involved in protein phosphorylation. In particular, a member of

transcription factors was found to play an important role in the change of total growth rate with the change of gravity. Therefore, we propose that controlling the expression of this transcription factor may be able to suppress the expected decrease in growth rate under μg or low gravity. The movement of cell organelles also changed with the change in gravity. Therefore, it is also considered that growth control could be achieved by changing the physical state in the cell.



Figure 3 Working model that hypergravity increases total growth

2021年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

沸騰・二相流体ループを用いた気液界面形成と熱伝達特性 (TPF1/TPF2)

代表研究者;大田治彦(九州大学),浅野等(神戸大学)

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

透明伝熱管に代表される高度に工夫された装置の粘り強い開発と、精緻に練られた実験 計画により、気液沸騰二相流現象に関する系統的なデータ取得に世界で始めて成功した。こ の成果は、議論が本格化する国際宇宙探査計画に必須となる、宇宙機の熱管理技術の高度 化・高信頼性化に対する知見を与えた点で極めて高く評価される。

地上実験実施により軌道上実験相当のデータを取得し、軌道上実験で得られたデータと比 較検討することにより、気液沸騰二相流現象における精密なモデル化を図れば、ヒートポンプ などにおける、熱管理に対する大きな貢献も期待される。

今後は、AI手法による動画解析の導入なども検討し、本ミッションにより得られた貴重な データの解析を、さらに深化することを推奨する。

2021年12月

別紙4-2

きぼう利用テーマ選考評価委員会(物質・物理科学分野)

ISS・きぼう利用ミッション

「沸騰・二相流体ループを用いた気液界面形成と熱伝達特

性」研究成果概要書

代表研究者;大田 治彦 (九州大学), 浅野 等 (神戸大学)

2021年10月

1. 背景

国際宇宙探査や大型商業通信衛星では大容量化が進んでおり,搭載される電子機器も高性能化に よって発熱密度が増大している.そのため熱輸送量,発熱密度の増大,熱輸送距離の長大化に対応 できる小型・軽量な排熱システムの実現が国際競争力強化のためにも必須となっている.これらの 要求性能を満たすには,従来技術の延長であるヒートパイプ,単相流体ループでは対応できず,ル ープヒートパイプによっても広い冷却面の等温冷却には対応できない.

本研究は、冷却材の蒸発潜熱を利用することで、高熱流束除熱、半導体などが配された広い発熱 面の等温冷却を実現できる沸騰・二相流体ループによるアクティブ熱制御技術の開発を目的とする. 潜熱輸送によって、冷却材単位質量当たりの熱輸送量が大きくなるため液単相流体ループに対して 小型軽量化が可能となる.さらにループ内圧力の制御で、飽和温度すなわち冷却材温度を操作する ことができる.沸騰流の熱伝達、圧力損失特性は気液界面構造に強く依存するが、微小重力場では 気液間の密度差による浮力が消失するため、沸騰現象は地上場と異なると予想され、冷却面での気 泡滞留によるドライアウト、急激な蒸気生成による作動流体の体積変化とそれに伴うループ内の急 激な圧力変化、流量変動が懸念されることから技術開発が進んでいない状況にある.

そこで,安定した微小重力場での二相流体ループによる除熱および熱輸送の実証,沸騰熱伝達現 象への重力の影響を明らかにするため, ISS で沸騰・二相流体ループの実験を行った.

2. 実験概要

実験ループ構成を図 1 に示す. ギアポンプで 冷却材を循環させる閉ループである.実験装置 の構成要素 [冷却材循環システム(ポンプ,流量 計,アキュムレータ),プレヒータ,加熱試験部 (金属製,発熱膜付透明ガラス製),観察部,凝 縮器,温度計測]は、それぞれ担当の研究者が主 体となって設計,機種選定するとともに要素試 験を行った.特に,金属伝熱管,透明伝熱管,観 察部,そして熱電対による温度計測用冷接点は、 トラブルの事前予測や解決への方法の議論を経 て独自に開発された.流路径,作動流体の種類に ついては,地上参照データとの比較によって重 力の影響を評価できることを条件に選定した.



3. 結果概要

本実験で得られた主な成果は以下のようにまとめられる.

- (1) 二相流体ループが軌道上において安定して動作することが実証された.特に,超低流量条件(質 量速度 G=30 kg/(m²s)),そして壁温オーバーシュートを伴う突沸条件においても不安定流動は確 認されなかった.
- (2) アビオニクスエアが流れる環境下では、実験装置からのヒートロスが試験部での入口条件や加 熱条件に与える影響が大きい.そこで、実験での限られた計測データからヒートロスを予測する 計算モデルを構築し、流動条件を高精度に計測することができた.
- (3) 実験計画で設定した全ての実験条件で、高精度なデータ取得に成功した.
- (4) 金属伝熱管では、管壁を介した軸方向の熱輸送の計算モデルを構築することで、熱流束および 熱伝達係数の分布を高精度に評価することができた.また、高乾き度でのドライアウトが発生す る CHF に至る過程を詳細に計測した.その時の金属伝熱管壁温の時間変化を加熱試験部出口圧

カ,流量,熱流束とともに図2 に示す.図中,#1~#10は壁温 であり,その数字は上流からの 計測位置を示す.ドライアウト による熱伝達係数の低減と銅 管の熱容量のバランスでゆっ くりとした壁温上昇を観察で きた.実用では発熱部熱容量を 大きくし,熱拡散率の高い材料 の使用で壁温が急激に上昇す る沸騰危機を回避できること がわかった.

- る研腐氾機を回避でさること がわかった. (5)透明伝熱管では,壁温と気液 界面構造の相関を高精度に評 価することができた(図3).長 大スラグ気泡通過時には,壁温 が上昇,すなわち熱伝達係数が 低下するが,小気泡群流動時に熱伝 達係数が上昇し,壁温が低下する様 子が明確に計測された.さらに,加熱 部長さ5mmの短縮管試験部で局所 熱伝達係数を計測することができた.
- (6) 流動観察部では気液界面構造の 3 次元計測に成功した.微小重力場での特異な流動様式である連続気泡流を世界で初めて観察し,その発生条件を特定することができた(図4). この流動形態の発生メカニズムを明らかにすることで加熱部での核沸騰熱伝達現象,さらには今後実用化にむけて検討されるべき沸騰伝熱促進面での流動予測につなげることができる.
- (7) 凝縮器では、全ての実験条件で凝縮が完全に行われることが実証された.数学モデルを構築し、凝縮器性能を予測できることが示された.

4. 今後の展開

Phase I および II で取得された定常データに基いて熱除去および熱輸送を目的とした二相流体ループ設計基準の構築は可能である.しかし,二相流体ループの信頼性を確立するには,流量および熱負荷の過渡変化時のループ内気液流動,熱伝達および熱輸送特性を把握する必要がある.さらには,Phase I および II では伝熱管の破損を防ぐため実験条件に制約を設けていた部分もあったことから,解析モデルの適用範囲拡大や妥当性検証が求められる.高熱流束除熱,高密度エネルギー輸送を実現できる二相流体ループの早期実現のためにも,過渡現象を中心とした追加実験(Phase III)が不可欠である.現在,実験装置は ISS 内に健全な状態で保管されており,容易に実現可能である.



#5

#10

s)]

110

-#7

出口圧力に対する飽和温度

#8

#9

壁温

#1

#6

100

70

60

50 130

[편 120 스포 110

15

10

5

0E

ତ୍ର ₉₀

_見80

相関(入口温度 50.3℃,熱流束 19.5 kW/m², 質量速度 101 kg/(m²·s))



図4 ステレオ撮影された連続 気泡流(質量速度 330 kg/(m²·s), 乾き度 0.024)

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission Interfacial Behaviors and Heat Transfer Characteristics in Boiling Two-Phase Flow Principal Investigator, Haruhiko Ohta (Kyushu Univ.), Hitoshi Asano (Kobe Univ.) October, 2021

1. Introduction

Requirements in power capacity for international space exploration and large commercial communication satellites are increasing. Since heat generation density are also increasing, it is essential to realize a compact and lightweight thermal control system that can realize the high heat flux cooling and high-density heat transportation in order to enhance international competitiveness. Therefore, an innovative thermal control system with the ability beyond liquid single-phase flow loop and loop heat pipe system is necessary.

The purpose of this research is to develop an active thermal control technology based on boiling and two-phase flow loops, which can realize high heat flux cooling and isothermal cooling of a large heating area by utilizing the latent heat of evaporation of the refrigerant. It is expected that latent heat utilization increases the heat transportation amount per unit mass flow rate, making it possible to reduce the size and weight of the system compared to a liquid single-phase flow loop. Furthermore, the cooling temperature can be controlled by changing the saturation pressure of the refrigerant.

Heat transfer and flow characteristics of boiling two-phase flows strongly depend on gas-liquid interface structure, and boiling flow characteristics under microgravity would be different from those under normal gravity due to the loss of buoyancy. Boiling two-phase flow loop experiments had been carried out under the stable microgravity condition in ISS in order to verify the heat transport ability and clarify the effect of gravity on the boiling heat transfer.

2. Experimental outline

A schematic diagram of experimental setup of boiling two-phase flow loop is shown in Fig. 1. Perfluolohexane was used as the refrigerant. The refrigerant was circulated by a gear pump. All the components, such as a refrigerant circulation system including pumps, flowmeters, and accumulators, and preheater, copper heating section, transparent glass heating section with thin Au coating as a heater, observation section, condenser, and temperature measure system, were designed, selected, and tested by researchers in charge. Especially, the copper heating tube, the transparent glass heating tube, observation section, and the cold junction for thermocouples were originally developed. The channel



Fig. 1 Experimental setup of two-phase flow loop.

diameter and the kind of refrigerant were also selected by the researchers.

3. Experimental results

The obtained results are summarized as the followings.

- (1) It has been successfully demonstrated that the two-phase flow loop operates stably on ISS. Especially, flow instability had not been observed under the condition with very low mass velocity of $G=30 \text{ kg/(m^2 \cdot s)}$ and at a sudden boiling with a wall temperature overshoot.
- (2) Heat loss from the two-phase flow loop affecting the experimental condition might be not low in the flow of avionics air. A numerical model based on the limited experimental data to predict the heat loss had been developed, and the inlet condition of refrigerant and heating condition were calculated with high accuracy.
- (3) High accurate data had been completely acquired under all the experimental conditions set in the experimental design.
- (4) At the copper heating tube, a numerical model considering the axial heat transfer through the heat transfer wall had been developed. The axial distribution of heat flux and heat transfer coefficient could be evaluated with pretty high accuracy. On the other hand, the wall temperature during the process leading to CHF, where dryout occurs at high vapor quality, was measured in detail. An example of the transient change of the wall temperatures, the pressure at the outlet, flow rate, and heat flux is shown in Fig. 2. The numbers of #1 to #10 show the wall temperatures from the upstream. The wall temperatures were gradually increased due to

the balance between the deterioration of the heat transfer coefficient caused by dryout and the heat capacity and heat diffusion of the copper tube. In practical use, it was found that the boiling crisis, in which the wall temperature rises rapidly, could be avoided by increasing the heat capacity of the heating equipment.

ũ

Wall temperature

Pressure

- (5) At the transparent heating tube, correlation between wall temperature and gas-liquid interface structure can be evaluated with high accuracy (Fig. 3). During the passage of long slug bubbles, the wall temperature increased, i.e., the heat transfer coefficient decreased, but during the flow of small bubble clusters, the wall temperature decreased, i.e., the heat transfer coefficient increased. Local heat transfer coefficient could be measured by using the short heating tube with the heating length of 5 mm.
- (6) At the observation section, threedimensional measurement of the vaporliquid interface structure was successfully carried out. Continuous bubble flow (Fig. 4), a unique flow pattern under microgravity, was observed for the first time in the world, and the observed conditions were identified. Clarification of the mechanism of this flow pattern will contribute to the prediction of the nucleate boiling heat transfer, and also to the prediction of the flow on the boiling heat transfer enhancement surface, which should be studied for practical use in the future.
- (7) For the condenser, it was demonstrated that vapor had perfectly condensed under all experimental conditions. A numerical model had been developed to predict the condenser

4. Future work

performance.

Design criterion for two-phase flow loop system can be constructed based on the present experimental results under the steady condition. However, to confirm the reliability of the two-phase flow loop, it is necessary to clarify the transient characteristics of vapor-liquid two-phase flow, heat transfer and heat transportation. Furthermore, since the experimental conditions in Phase I and II were limited in some areas to prevent heat transfer tube failure, expansion of the range of application and validation of analytical models are required. Additional experiments focusing on transient phenomena (Phase III) are essential for the early realization of a two-phase flow loop for high heat flux cooling and highdensity energy transportation. Under the current situation, the experimental setup are stored in the ISS in a healthy condition, so it is easily feasible.



Fig. 3 Correlation between wall temperature and gas-liquid interface structure measured at the transparent heating tube $(T_{\rm in} = 50.3^{\circ}{\rm C}, q = 19.5 \text{ kW/m}^2, G = 101 \text{ kg/(m}^2 \cdot \text{s}))$



Fig. 4 Continuous bubble flow captured by stereo observation $(G = 330 \text{ kg/(m^2 \cdot s)}, x = 0.024)$

2021年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

マランゴニ対流における時空間構造 (Marangoni UVP)

代表研究者;依田 眞一(JAXA)

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究は、きぼう利用によってのみ得られる、直径 50 mm, アスペクト比0.5 という 大型液柱を実現できる微小重力環境を生かし、超音波流速分布計測法の開発により、流体内部運動の直接観測を可能としたことで、マランゴニ対流における時空間構 造を実験的に明らかにし、遷移現象を明確化した。流体対流の性質を重力の影響を 加味して、本質的に理解する上で貴重な成果であると高く評価する。

今後は、計算機シミュレーションの専門家との連携を強化し、一連の先行宇宙実験の成果と併せ、引き続き解析を進め、時空間構造を更に突き詰めることを期待する。

2022年3月

きぼう利用テーマ選考評価委員会(物質・物理科学分野)

ISS・きぼう利用テーマ 「マランゴニ対流における時空間構造(Marangoni UVP)」 研究成果概要書

代表研究者;依田 眞一(JAXA)

2022 年 1 月

1. 諸言

マランゴニ対流は表面張力勾配に駆動される流れであり、液滴・気泡・液膜などに生じるマ イクロ流れ、ヒートパイプ内部における冷媒の流れ、微細気泡のハンドリング、混合溶媒の凝 縮、沸騰における気泡底面の液体挙動、混合液の混合促進や分離など、我々の身の回りや 工業界で幅広く観察され、利用されている流れである。上述の流れは、表面張力勾配が気液 界面に沿う温度差で与えられる系であり、thermocapillary convection とも呼ばれる。一般に、 温度差は密度差を伴うため、温度差駆動のマランゴニ対流は通常重力下では密度差対流の 影響を受ける(場合によっては、覆い隠されてしまう).このことは、特に、マランゴニ対流に起 因する流れの不安定性を調べる上で致命的となる恐れがある。そこで、密度差対流の存在し ない微小重力環境において、温度差駆動のマランゴニ対流の不安定性と関連する特性を調 べようということが、本研究テーマの原点である。微小重力を利用した類似の宇宙実験では 定常流から振動流への遷移や粒子集合構造(Particle Accumulation Structure; PAS)につ いて体系的な研究がなされ、多くの知見が蓄積された。

一方,対流不安定性の観点においては,振動流から乱流への遷移過程についても基礎的 現象の理解において重要である.マランゴニ対流は,浮力対流のように体積力により駆動さ れる対流と異なり,駆動力が界面にのみ作用する流動であり,乱流への遷移シナリオについ て統一的に理解できるかは明らかではない.

本研究では液柱に発生するマランゴニ対流を,超音波流速分布計測法(Ultrasonic Velocity Profile method; UVP),赤外放射表面温度計測法などの観測手法を駆使することで,マランゴニ対流遷移現象に伴う時空間構造を明らかにすることを目的とする.それにより,流体力学分野の学問的進展に寄与するとともに,結晶成長プロセスの高度化への基礎的知見を提供することにより成果を社会に還元する.

2. 実験方法

軌道上実験では、地上ではできない直径 50 mm の大型の液柱による流れ場、温度場の 観測を行う. 試験流体としては 高プラントル数流体である動粘性係数 5 mm²/s (5cSt) のシ リコーンオイルを用いる. 液柱に発生するマランゴニ対流を、超音波流速分布計測法 (Ultrasonic Velocity Profile method; UVP)、表面温度計測などの観測手法により、マランゴ ニ対流遷移現象に伴う時空間構造を解析する. 観測の概略図および液柱を図 1 に示す.



3. 実験結果および成果

3.1 臨界温度差∆Tcr の決定

アスペクト比 0.5 (D=50mm) のときの臨界温度差 Δ Tor の決定を行った. 加熱ディスク温度 TH と冷却ディス ク温度 TC を一定にし, 幾つかの温度差を液柱に与え, そ のときの界面近傍の温度を計測しその変動振幅より臨界 温度差を決定し, ΔTor = 3.84 °C を得た(図 2).

3.2 界面温度振動特性

マランゴニ対流の駆動力となっている液柱表面温度の 特性を調べるために、振動流から乱流域の液柱界面近 傍の温度について、周波数特性とカオス特性について調 べた. 表面温度の複雑性についてグローバルエントロピ ー H_a を用いて評価する. 図 3 に各 ε における液柱表 面温度分布の H_a を示す. H_a は ε が 1.3 から 7 付近 にかけて 0.07 から 0.14 に上昇し、その間、表面の Hydrothermal Wave による温度分布構造は複雑化してい ると考えられる. それ以降、HG はほぼ横ばいであり、温 度分布構造は複雑化した状態を維持している.

3.3 液柱内部流動の時空間構造

冷却ディスクに設置された超音波トランスデューサーに よって超音波トランスデューサーの測定線上の速度ベクト ルの時系列データを取得し時空間構造を作成した(図 4).

流動の複雑性についてもグローバルエントロピー H_a を用いて評価した.内部流動の H_a は ε の上昇に伴って 0.65 から 0.18 に減少し,流速分布構造は単純化していると考えられる.これは,表面温度場の傾向と逆であるが,モード解析の結果,時間方向の複雑性は増すものの,内部流動は空間モード数 m=1 が支配的になることから,全体として規則性が増すことになったと考えられる.

4. 結言

きぼう利用テーマ「「マランゴニ対流における時空間構 造」により、以下の成果が得られた.

- (1) Pr 数 68 の試験流体を用い, 直径 50 mm, アスペクト比 0.5 の液柱において定常流から振動流へと遷移する臨界温度を 3.84 ℃と精度よく決定した.
- (2) 振動流遷移後に更に温度差を大きくすることで、流れの駆動力が増しカオス・乱流へ と遷移し、その過程をカオス解析等により明らかにした。
- (3) 駆動力が大きくなることで表面温度分布は複雑化し乱雑性が増した. 一方, 内部流動 については, グローバルエントロピーはむしろ小さくなり, 規則性が増す結果であった.
- (4) モード解析により、空間のモード数として m=1 が卓越することによりグローバルエン トロピーが小さくなったものと考えられる.しかし、時間変動について駆動力を大きくす ることで乱雑性を増す結果となった.



図2 臨界温度差△Tcr の決定



図3 温度場のグローバルエントロピー



図4 流速の時空間構造 ((a) 元の時空間構造, (b) モード1 (c) モード1~5を再構成)

Summary report of the ISS-KIBO utilization mission [Spatio-temporal structure of Marangoni convection(Marangoni UVP)] Principal Investigator, YODA Shinichi (JAXA) January 2022

1. Introduction

Marangoni convection is a flow driven by a surface tension gradient, which is a micro flow generated in droplets, bubbles, liquid film, a coolant flow inside a heat pipe, condensation of mixed solvent, and bubble surface vicinity of heated surface in boiling. It is a flow that has been widely observed and used in our daily lives and in the industry, such as liquid behavior, mixing enhancement and separation of mixed liquids. This flow is a system in which the surface tension gradient is given by the temperature difference along the gas-liquid interface, and is also called the thermocapillary convection. In general, temperature difference is accompanied by density difference, so temperature difference driven Marangoni convection is usually affected by buoyancy convection under gravity (in some cases, it is obscured).

This can be fatal, especially in investigating flow instability in Marangoni convection. Therefore, the origin of this research is to investigate the characteristics related to the instability of Marangoni convection utilizing microgravity environment where buoyancy does not exist. In a series of space experiments in KIBO, a systematic study was conducted on the transition from a steady flow to an oscillating flow and clarified the formation of the Particle Accumulation Structure (PAS), and many findings were accumulated.

On the other hand, from the viewpoint of convective instability, the transition process from oscillating flow to turbulent flow is also important in understanding the basic phenomenon. Unlike buoyancy convection, which is driven by body force, Marangoni convection is a flow in which the driving force acts only on the interface, and it is not clear whether the transition scenario to turbulence can be understood in a unified manner.

In this study, the flow transition toward the chaotic and turbulent of the Marangoni convection is investigated by making full use of observation methods such as the Ultrasonic Velocity Profile method (UVP) and the infrared surface temperature measurement method. The results will contribute to the academic progress in the field of fluid mechanics and return the results to society by providing basic knowledge for the sophistication of the crystal growth process.

2. Experimental method

In the space experiment, the flow and temperature fields were observed with a large liquid column with a diameter of 50 mm and a height of 25 mm, which cannot be formed on the earth. As the test fluid, silicone oil with a kinematic viscosity of 5 mm2 / s (5cSt), which is a high Prandtl number fluid, was employed. The spatiotemporal structure of the Marangoni convection generated in the liquid column is analyzed by observation methods such as the Ultrasonic Velocity Profile method (UVP) and surface temperature measurement. A schematic diagram of the observation and a liquid bridge is shown in Fig.1.



3. Results and discussion

3.1 Critical temperature difference

The critical temperature difference ΔT_{cr} was determined when the aspect ratio was 0.5 (D = 50 mm). The heating disk temperature T_H and the cooling disk temperature T_C are kept constant, some temperature differences are given to the liquid column, the temperature near the interface at that time is measured, the critical temperature difference is determined from the fluctuation amplitude, and ΔT_{cr} can be determined 3.84 °C (Fig. 2).

3.2 Interface temperature fluctuation

In order to investigate the characteristics of the surface temperature of the liquid column, which is the driving force of the Marangoni convection, we investigated the frequency characteristics and chaos characteristics of the temperature near the liquid column interface in the turbulent flow region from the oscillating flow. The complexity of the surface temperature is evaluated using the global entropy H_G . Figure 3 shows the H_G of the liquid column surface temperature at each ϵ . In H_G, ϵ rises from 0.07 to 0.14 from 1.3 to around 7, and during that time, the temperature distribution structure due to Hydrothermal Wave on the surface is considered to be complicated. Since then, H_G has remained almost flat and the temperature distribution structure has remained complicated.

3.3 Spatio-temporal structure of flow inside liquid bridge

The time-series data of the velocity vector on the measurement line of the ultrasonic transducer was acquired by the ultrasonic transducer installed on the cooling disk, and the spatiotemporal structure was created (Fig. 4).

4. Conclusion

The following results were obtained from the Kibo utilization mission "Spatio-temporal structure in Marangoni convection".

- (1) Using a test fluid with a Pr number of 68, the critical temperature at which the transition from the steady flow to the oscillating flow was accurately determined at 3.84 °C in a liquid
- (2) By further increasing the temperature difference after the oscillating flow transition, the driving force of the flow increased and the transition to chaos and turbulence was made,
- and the process was clarified by chaos analysis.(3) As the driving force increased, the surface temperature distribution became complicated and disordered. On the other hand, with regard to internal flow, the global entropy was rather small, and the result was that regularity increased.
- (4) It is considered that the global entropy became smaller due to the predominance of m = 1 as the number of modes in space by mode analysis. However, increasing the driving force with respect to time fluctuations resulted in increased randomness.

