

2023 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、2023年度(2023年12月から2024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研究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、2017年度～2021年度の間に軌道上実験を実施した3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: 目標を十分に達成した(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: 目標を十分に達成した(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、評価にあた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。

表1 評価対象テーマ（所属は報告書提出当時）

No	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
1	「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究 (Medical Proteomics)	横浜市立大学 准教授 木村弥生	2017 年 8～9 月 (マウス) 2017～2020 年 (ヒト)	2023 年 12 月 26 日	生命医科学
2	微小重力下における翻訳制御の網羅的解析 (Ribosome Profiling)	理化学研究所 主任研究員 岩崎信太郎	2021 年 3 月	2023 年 12 月 26 日	
3	無重力や寝たきりによる筋萎縮の予防に有効なバイオ素材の探索 (Anti-Atrophy)	徳島大学 教授 二川健	2021 年 8～9 月	2024 年 3 月 14 日	

※ 地上対照実験は含まない。人対象研究については年単位の記載としている。

表2 評価項目

科学的・技術的成果	(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。
	(2) 実施体制 研究チームおよび JAXA の体制は適切であったか。
	(3) 科学的、技術的成果 - 得られた成果は、国際的なレベルに照らして、高いか。 - 設定された目標を越える成果があったか。
	(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。
総合評価・提言	(6) 総合評価 - 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。 - 今後の宇宙実験に向けての課題、改善すべき点。 - 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)

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
副委員長	武田 伸一 国立精神・神経医療研究センター 名誉所長
委員	牛田 多加志 東京大学大学院工学系研究科 名誉教授
	緒方 徹 東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 リハビリテーション医学分野 教授
	田村 宏治 東北大学大学院生命科学研究科 教授
	本間 研一 北海道大学 医学部 名誉教授
	諸橋 憲一郎 久留米大学医学部 客員教授、九州大学 名誉教授

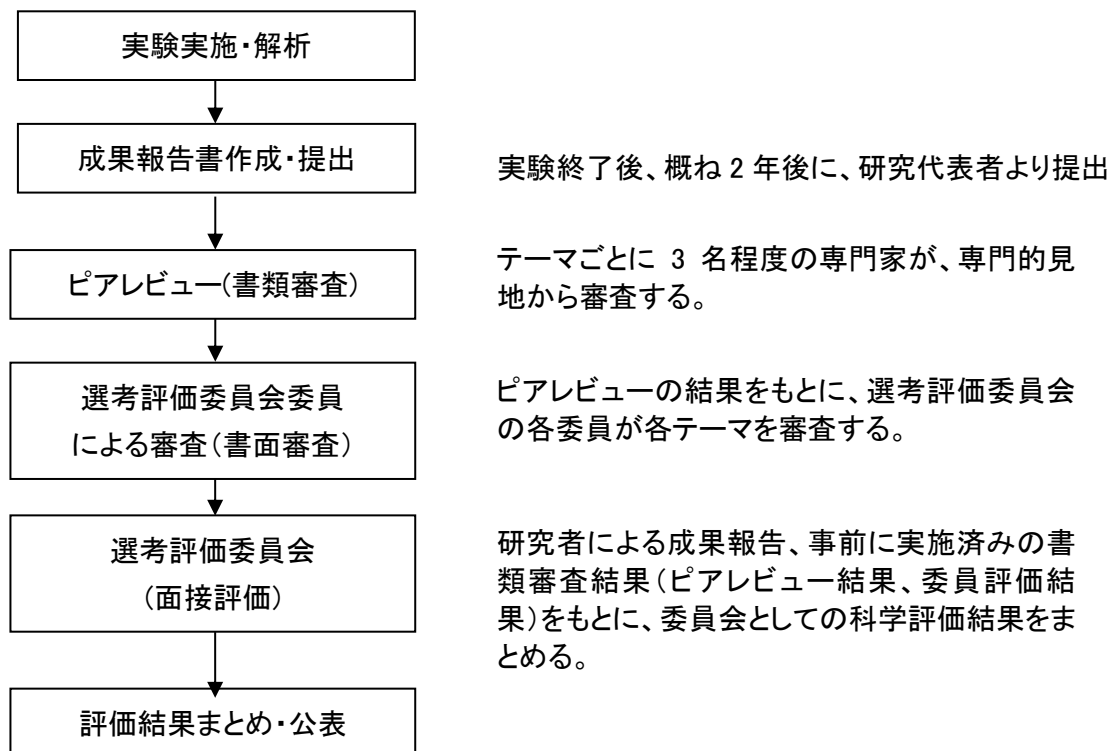


図4 科学成果評価プロセス

表5 添付文書の構成

No	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)
1	「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究 (Medical Proteomics)	別紙 1-1	別紙 1-2	別紙 1-3	別紙 1-4
2	微小重力下における翻訳制御の網羅的解析 (Ribosome Profiling)	(※)	別紙 2-2	別紙 2-3	別紙 2-4
3	無重力や寝たきりによる筋萎縮の予防に有効なバイオ素材の探索 (Anti-Atrophy)	(※)	別紙 3-2	別紙 3-3	別紙 3-4

(※) 論文公表後に公開(別紙 2-1、別紙 3-1)

以上

ISS・きぼう利用テーマ

「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究

(Medical Proteomics)」

(マウス実験/ヒト実験)研究成果報告書

代表研究者： 木村 弥生（横浜市立大学）

令和 5 (2023) 年 10 月



1. 緒言

1.1 研究内容、目標の概要

長期宇宙飛行ミッションでは、微小重力(μ -g)、宇宙放射線、閉鎖環境下でのストレスなどの環境要因により、様々な身体的・生理的変化が生じる^{1, 2)}。特に、機械的刺激(メカニカルストレス)の影響を強く受ける骨や骨格筋などの運動器は、体内外の環境変化を認識し応答して骨量減少などを生じる。また地上においても、加齢や不活動などの要因により、骨量減少や骨組織の微細構造異常などを特徴とする骨粗鬆症を発症することがある。その原因としては骨代謝異常が考えられているが、骨組織におけるメカニカルストレス応答や骨量減少誘導等に関する詳細な分子メカニズムは、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、国際宇宙ステーション(ISS)に長期滞在した宇宙飛行士(I-A)や小動物飼育ミッション(MHU-2)にて ISS で1ヶ月間飼育されたマウス(II-A)を研究対象とした「宇宙実験」と、地上における骨量減少/骨粗鬆症患者(I-B)や非荷重/過重力モデルマウス(II-B)を研究対象とした「地上実験」から、骨、骨格筋、血清におけるメカニカルストレス応答性の骨量減少関連蛋白質を特定し、ISS 滞在との関係や骨代謝を含む運動器機能との関連性を明らかにすることを目指す(図 1)。さらに、その結果を宇宙飛行士や地上の臨床現場に早期に還元し、骨量減少などの運動器機能モニタリング技術や骨折高リスク診断技術の開発などに貢献する。

1.2 研究動機、バックグラウンド

生物は生きていく上で多様なストレスを受けている。中でもメカニカルストレスは、生体内組織・細胞の形態や運動、増殖、分化などを制御する重要な刺激として作用するため、その過不足は骨量減少や筋萎縮、器官形成不全、循環器異常などを誘導することがある。例えば、宇宙飛行による μ -g 環境や骨折による患部の固定、寝たきりなどによる不活動などは、骨量減少や筋萎縮を誘導することが良く知られており、一定量のメカニカルストレスは生体内の恒常性維持において重要な役割を果たしている。これまで、生体内組織・細胞がメカニカルストレスを感知して化学的信号へと変換・伝達し、生物が周辺環境に適応する機構を解明するための様々な研究が実施されているが³⁾、その分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

近年、蛋白質の網羅的な解析(プロテオーム解析)技術が飛躍的に発展した結果、生体内組織・細胞に由来する極微量試料中に含まれる数千種類の蛋白質の定量解析が可能となり、様々な分野の研究に活用され、多くの成果をあげている。しかし生体内の蛋白質量は、環境ならびに遺伝的要因の影響を受け個体差が大きくなることもあるため、特にヒトを対象としたプロテオーム研究では、研究対象となる検体の選定が研究成功のための非常に重要な要素となる。その点、軌道上 ISS に滞在した宇宙飛行士は、比較的短期間で健康な個体に骨量減少や筋萎縮などの運動器機能低下や、循環器や免疫系などの障害を生じることがあり⁴⁾、宇宙

飛行士に由来する試料を使用することで、遺伝的背景を排除した上で宇宙飛行ミッションにより影響を受けて誘導される生体内応答に関連した蛋白質変動を検出できる可能性が高いと考えた。ただし宇宙飛行ミッションでは、軌道上 ISS 滞在中の μ -g 曝露だけでなく、宇宙放射線や高濃度炭酸ガスなどの曝露、大気圏再突入や地球着陸時の重力リロードなどの影響も受ける。そのため、宇宙飛行士を研究対象とした「宇宙実験」だけでは、 μ -g 曝露に由来するメカニカルストレスに対してのみ応答して変動を示す蛋白質を特定することは難しいと考えた。この問題については、近年宇宙航空研究開発機構(JAXA)が開発した MARS (Multiple Artificial-gravity Research System)を使用し、軌道上 ISS 内で重力以外の環境要因を極力同じにした状態でマウス(宇宙飛行マウス)を同時個別飼育することで、 μ -g 曝露に起因した蛋白質の量的変動を検出できると考えた。しかしマウスを研究対象とする「宇宙実験」も、マウスを生存帰還させてから試料を採取するため、摂餌量差や μ -g 曝露からの回復差が結果に影響する可能性を否定できない。そこで、宇宙飛行と同様の表現型(骨量減少など)を示す、後肢懸垂(Hindlimb unloading; HU)による非荷重環境飼育マウスや遠心による過重力(3-g)環境飼育マウスなどの地上モデルマウスや、骨粗鬆症患者等の地上ヒトを研究対象とした「地上実験」を実施し、これと「宇宙実験」の結果とを比較することで、各実験に共通する特徴であるメカニカルストレス応答と骨量減少に係わる蛋白質を特定できるのではないかと考えた。さらに本研究の成果は、骨量減少などの生体内の状態を把握し、骨折高リスク診断のための客観的指標となる蛋白質を特定するためのシーズ探索研究としても非常に意義のある研究となる。また研究開始当初より研究チームに横浜市立大学附属病院の臨床医が参画し、横浜市立大学附属病院等と連携して本研究の成果を臨床現場に還元する取り組みを早期に実現することで、臨床応用の可能性も大いに高まると期待された。

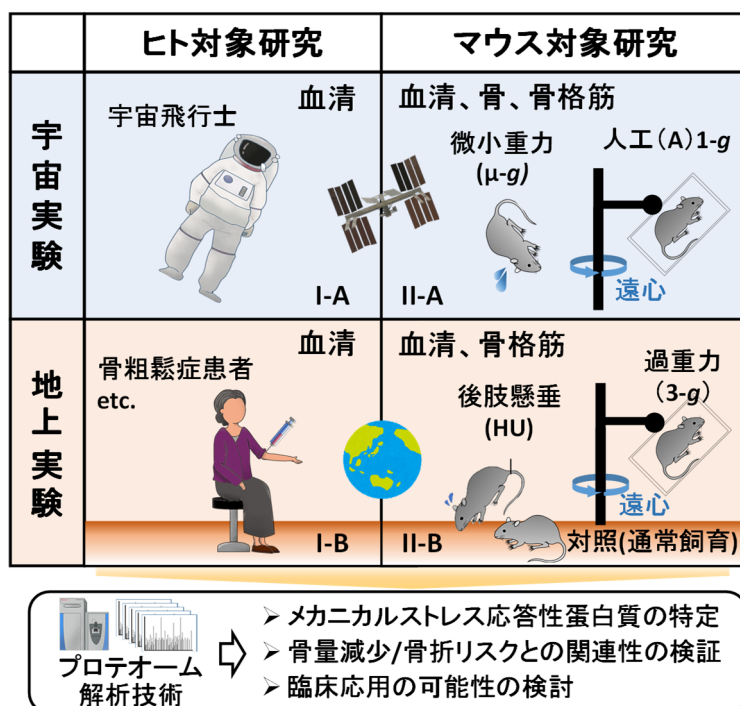


図 1 Medical Proteomics 研究概要

プロテオーム解析技術により、各試料に特徴的に発現する蛋白質を探索し、取得した結果を比較することで目標達成を目指す。I-A,B および II-A,B は各研究の記載項を示す。

1.3 研究内容の重要性、分野・領域での位置づけ、意義

月・火星探査ミッションに従事する宇宙飛行士は、リハビリテーション等の体制が整っていない現地において、自ら運動器機能の状態を把握・回復させ、安全かつ確実に業務を遂行しなければならない。これは、ミッションの成功とクルーの安全という点で深刻な課題である。また骨量減少などは骨折の原因となり、健康寿命を阻害する大きな要因となる。現在本邦では高齢化の加速に伴い、1,300 万人の骨粗鬆症患者が存在すると推定されている。そのため既に骨粗鬆症と診断された患者のみならず、医療機関を受診したことがない骨折高リスク患者の早期発見・的確な治療介入の実施が重要な課題とされている。したがって、骨量減少などの生体

内の状態を把握し、骨折高リスク診断のための客観的指標となる蛋白質の特定や、それを活用した新規診断法の開発が急務となる。本研究では、軌道上 ISS に長期滞在した宇宙飛行士や、ISS 内で飼育された宇宙飛行マウスを研究対象とした「宇宙実験」と、地上において骨量減少症や骨粗鬆症と診断された患者や、非荷重/過重力環境で飼育した地上マウス(骨量減少モデル)を研究対象とした「地上実験」を行う(図 1)。各実験において生体内組織・細胞は様々な影響を受け、骨量減少にも多くの要因が寄与すると考えられる。しかし、本研究の「宇宙実験」と「地上実験」を統合的に評価・検討することで、多くの外的・内的要因の影響を排除でき、メカニカルストレス応答に限定した骨量減少関連蛋白質の特定が容易になるため、二つの実験を行う意義は非常に大きいと考える。またメカニカルストレス応答性蛋白質を特定することは、 μ -g 環境に対する生体内適応機構に関する包括的な理解に寄与すると同時に、その結果が長期間宇宙空間に滞在する宇宙飛行士の骨量減少を含む運動器機能モニタリングによる健康管理につながる可能性が高く、宇宙飛行ミッションに伴う様々なリスクが軽減される。さらに、この成果を臨床現場へと還元することで、地上における骨強度低下の初期段階から骨折のリスクを軽減し、健康寿命延伸と QOL 向上、医療や社会経済コストの低減に貢献できるという潜在的価値を有している。またこれまでに、宇宙飛行士や宇宙飛行マウスから採取した試料を対象とした研究は行われているが、質量分析装置(MS)を用いたプロテオーム解析技術を活かして、血清、骨、骨格筋の数千種類の蛋白質の発現変動を網羅的に調べる研究はほとんど行われていない。このような網羅的な解析は、個々の蛋白質を標的とする従来の研究法と異なり、まったく新しい視点からこれまで予測していなかった知見を提供することが多く、本研究が本分野に対してブレークスルーとなる発見・発想につながる可能性は非常に高いと考える。

2. 研究計画

2.1 研究目標

宇宙飛行ミッションによる骨量減少や、地上での骨粗鬆症の発症には、何らかの蛋白質が係わっている可能性がある。本研究では、プロテオーム解析技術を用いて、軌道上の ISS に長期滞在した 6 名の宇宙飛行士を対象に、宇宙飛行前後および軌道上 ISS 滞在中の宇宙飛行士の血中蛋白質の量的変動を網羅的に調べ、骨量減少の原因となる蛋白質を検出・同定する。同時に、MHU-2 により取得した宇宙飛行前後のマウスの血液、骨、骨格筋の発現変動蛋白質を検出する。そして、本研究の結果を、別途 JAXA の人を対象とする研究開発倫理審査委員会にて承認されている「プロテオーム解析による骨粗鬆症に係わる蛋白質の網羅的探索」において実施されている地上予備研究「骨粗鬆症および骨量減少の患者より血液を採取し、プロテオーム解析により発現している蛋白質を網羅的に調査する。」の解析結果と比較し、 μ -g による非荷重環境における骨量減少と地上における骨粗鬆症との関連性を明らかにする。さらに、論文「Protein expression changes caused by spaceflight as measured for 18 Russian cosmonauts, Scientific Report. 7:8142, 2017⁵⁾」から推測される、例えば、心・血管系や免疫等に関する蛋白質の変動にも着目し、宇宙飛行がヒトの生体内へ及ぼす影響の解釈を加える。

2.1.1 実験理論(作業仮説)

プロテオーム解析技術を用いて宇宙飛行前後、ISS 滞在中の宇宙飛行士の血液、宇宙飛行マウスの血液、骨、骨格筋の発現異常蛋白質を検出すれば、骨量減少原因蛋白質を特定できる。また、地上の骨粗鬆症患者の発現異常蛋白質との関連がわかれば、その蛋白質を診断や治療の対象として利用できる。

2.1.2 サクセスクライテリア

本研究では、以下をサクセスクライテリアとして設定した(2017 年 2 月 24 日)。

サクセス レベル	サクセスクライテリア	補足(設定根拠等)
ミニ	以下をすべて達成すること。 1) 宇宙飛行士、マウスの骨量減少に係わる蛋白質の検出・同定 2) 地上の骨粗鬆症と同蛋白質との関係の解明	【判断時期】 マウス実験、およびヒト実験の全検体入手の、各々3ヶ月後に速報、6ヶ月後に第2速報、1年後に中間報告、2年後に目標達成が可能 【設定根拠】 目標達成に必要な分析技術があるため
フル	ミニマムサクセスに加えて、以下をすべて達成すること。 3) 骨量減少、骨粗鬆症関連蛋白質の臨床検証	【判断時期】 マウス実験、およびヒト実験の全検体入手の、各々3ヶ月後に速報、6ヶ月後に第2速報、1年後に中間報告、2年後に目標達成が可能。 【設定根拠】 多数の臨床検体を用いて検出された蛋白質と骨量減少や骨粗鬆症との関係を精査する必要があるため
エクストラ	作業仮説を超える、以下のいずれかを達成すること。 4) 骨量減少、骨粗鬆症関連蛋白質の機能解明 5) 骨量減少、骨粗鬆症の診断薬及び治療法の開発	【判断時期】 令和6年頃 【設定根拠】 治験、臨床性能試験などに、短くとも7-8年の期間が必要であるため

2.2 体制

本研究における研究チーム体制を以下に示す(2022年9月時点)。

	参加者	分担内容
代表提案者	木村 弥生 ¹⁾	研究全般の統括・調整、プロテオーム解析の統括
共同提案者	熊谷 研 ²⁾	地上骨粗鬆症患者、臨床データ・プロテオームデータと宇宙データとの比較解析と管理
	大平 宇志 ¹⁾	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	井野 洋子 ¹⁾	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	中居 佑介 ¹⁾	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	江頭 健二 ^{1,4)}	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
研究協力者	平野 久 ¹⁾	プロテオーム研究助言
	齋藤 知行 ³⁾	臨床研究助言
	武田 裕里子 ²⁾	統計解析助言
	山本 幸夫 ⁴⁾	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	秋山 知子 ¹⁾	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	森山 佳谷乃 ¹⁾	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	山本 悠 ^{1,4)}	宇宙実験データ(宇宙飛行士、マウス)との比較解釈
	梁 明秀 ^{1,2)}	プロテオーム研究助言
	稲葉 裕 ²⁾	臨床研究助言

所属: 1) 横浜市立大学先端医学科学センター、2) 横浜市立大学大学院医学研究科

3) 横浜市立脳卒中・神経脊椎センター、4) ライオン株式会社

なお、本テーマの代表研究者は、選定当初、現在、研究協力者の平野久（横浜市立大学名誉教授）であったが、2021年7月に、木村弥生准教授に交代した。責任者変更については、倫理、きぼう利用選考評価委員会等で承認済みである。

JAXA 関係者 (2022 年 9 月時点)

総括責任者(所属長等):久留 靖史 宇宙飛行士運用技術ユニット・ユニット長
研究コーディネータ (宇宙実験の準備、運用、本宇宙実験の資料・情報の収集)
:古川聡 技術領域上席、井上夏彦 主任研究開発員、相羽達弥 主任研究開発員、
日高信幸 主任研究開発員

研究チームと JAXA は下記分担表に基づき、調整、各作業を実施した。

作業項目	研究者チーム	JAXA飛行ユニット
実験要求、運用要求、実験条件の検討、策定	○	支援
実施計画の策定	—	○
地上予備実験	○	支援
生物適合性試験	支援	○
ヒト倫理対応(JAXA、NASA)	支援	○
運用準備(ODF作成)、輸送	支援	○
軌道上サンプル回収	—	○
地上対照実験	○	支援
飛行後解析	○	支援
小動物飼育ミッションとの連携解析	○	—
成果発表※	○	○

※成果発表:研究者はサイエンスの観点、JAXAは有人宇宙活動の観点

2.3 スケジュール

宇宙飛行士および宇宙飛行マウスを対象とした研究は、「2015 年「きぼう」利用フィジビリティスタディテーマ募集」国の戦略的研究区分・宇宙実験候補テーマとして、2015 年 12 月に選定された。マウス対象研究は JAXA MHU-2 の大野テーマ「宇宙環境における健康管理に向けた免疫・腸内環境の総合評価(Multi-Omics)、PI:大野博(理研)」の相乗り(サンプルシェア要求)として、ヒト(宇宙飛行士)対象研究は単独テーマとして、共に 2017 年 2 月に外部審査会(きぼう利用選考評価委員会)、同年 6 月に実験準備フェーズ移行審査会が行われ、宇宙実験として各承認された後、実験準備を開始した。

MHU-2 における ISS でのマウス飼育は、米国 SpaceX CRS-12(SpX12)により、2017 年 8 月 17 日から 9 月 16 日の 31 日間実施され、地球帰還後の 9 月 19 日に米国カルフォルニア州 Explora BioLabs にて解剖が行われた。地上対照として行われたマウス(地上対照マウス)の飼育は、2018 年 2 月 18 日から 3 月 20 日まで JAXA 筑波宇宙センター(TKSC)にて 31 日間実施され、3 月 22 日に解剖が行われた。その後、サンプルシェアされた試料は、現地および研究者チームラボにて解析が進められた。

宇宙飛行士対象研究は、1 人目の第 1 回宇宙飛行前採血(#Pre1)の 2017 年から、最終第 6 人目の第 5 回宇宙飛行後採血(#Post5)の 2020 年まで、約 3 年間 6 名に対し実施された。取得した血清は、COVID-19 影響による海外出張や輸送調整制約により約 1 年間遅延したが、2021 年 5 月に研究者チームの全サンプル一括受領が完了し、研究者チームにて解析、論文化が進められた。

なお、フェーズ移行審査から飛行後解析までの当初の全体スケジュールは図 2.3-1 に、最終的な実績スケジュールは図 2.3-2 に示した。

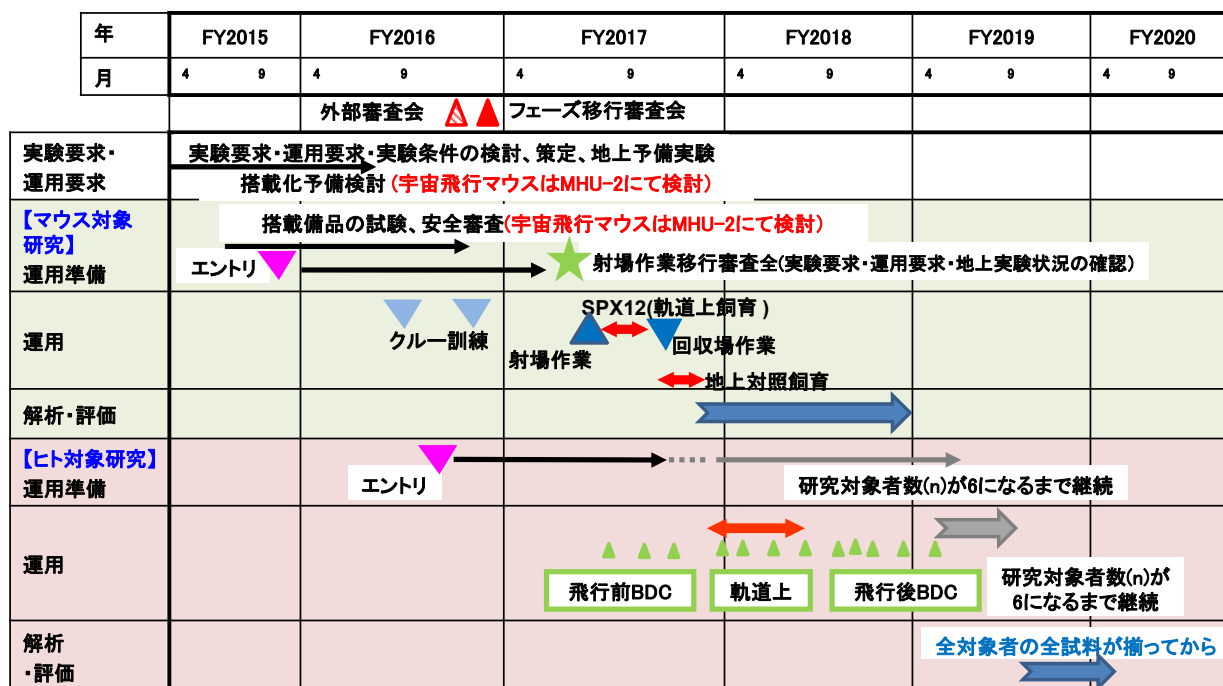


図 2.3-1 フェーズ移行審査から飛行後解析までの当初全体スケジュール

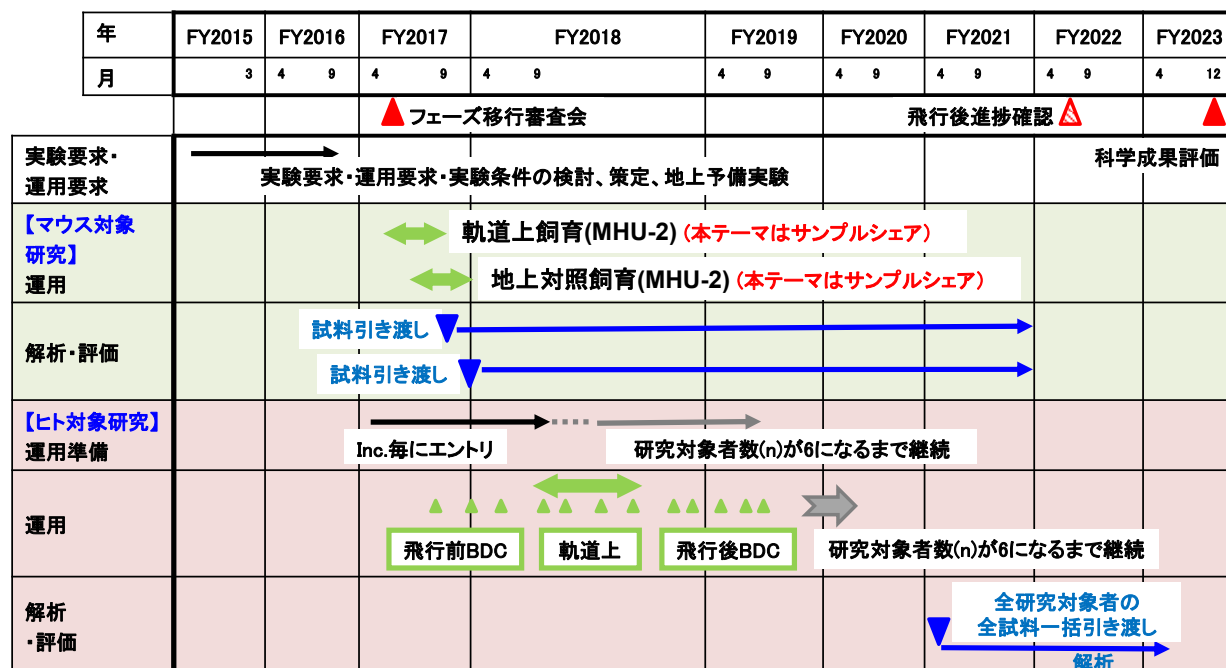


図 2.3-2 フェーズ移行審査から科学成果評価までの実績

また、これ以降の「3.実験準備・運用」と「4.実験結果及び成果」は、I.ヒト対象研究[I-A.宇宙飛行ヒト(宇宙飛行士)、I-B.地上ヒト(骨粗鬆症患者等)]、II.マウス対象研究[II-A.宇宙飛行マウス、II-B.地上マウス(骨量減少モデル)、II-A/B.宇宙飛行および地上マウス(骨量減少モデル) 骨、骨格筋、血清プロテオーム解析]に分けて報告する(図 1 参照)。

【I. ヒト対象研究】

I-A 宇宙飛行ヒト(宇宙飛行士)

I-A-3 実験準備・運用

I-A-3.1 実験要求の検討・策定(地上予備実験・地上適合性試験)

宇宙実験フェーズ移行審査までのフィジビリティスタディ期間は、宇宙実験要求の詳細化検討のため、(1)ISS 滞在中血清採取(NASA 実績のある採血管 BD#367987 利用、血餅凝集、遠心)プロトコル検証、(2)血中蛋白質の網羅的解析に向けた血清プロテオーム定量解析技術の検証、(3)骨・骨格筋に関わらない宇宙環境において変化する血清蛋白質の同定等の地上予備実験・地上適合性試験を行った。本検討から詳細化した宇宙実験の研究対象者要件および採血ポイントを I-A-3.2 項に示す。

I-A-3.2 研究対象者要件

- ◇ 宇宙飛行士要件: 3 ヶ月以上 ISS 滞在の宇宙飛行士 6 名
【除外基準】: 国籍、性別、年齢、民族、言語の選択・除外基準はなし
【実験中止基準】: 研究対象者が参加辞退を申し出た場合
- ◇ 採血: 研究対象者 1 名につき合計 12 回、血清用 7.5mL 採血を実施
宇宙飛行前は打上げ(L) 24 週間前(L-168[±14]d)【#Pre1】、16 週間前(L-112[±14]d)【#Pre2】、8 週間前(L-56[±14]d)【#Pre3】の計 3 回; 軌道上 ISS 滞在中は、打上げ 5 日後(L+5[±1]d)【#F1】、30 日後(L+30[±7]d)【#F2】、60 日後(L+60[±14]d)【#F3】、120 日後(L+120[±14]d)もしくは帰還(R) 8 日前(R-8[-14/+0]d)【#F4】の計 4 回; 宇宙飛行後は、ISS から帰還 0 日後(R+0[+4]d)【#Post1】、5 日後((R+5[±1]d)【#Post2】、30 日後((R+30[±7]d)【#Post3】、60 日後((R+60[±14]d)【#Post4】、120 日後((R+120[±14]d)【#Post5】の計 5 回の計画で採血を行った
- ◇ 採血条件: 採血前最低 8 時間絶食後の翌朝朝食前、7.5 mL/回を採血
- ◇ 干渉事項に関する制約: 採血前 24 時間以内にアルコール摂取、筋生検、激しい運動(VO2max の 80%以上、標準運動以外の筋力測定)を、採血前 48 時間以内に船外活動訓練、船外活動を、採血前 5 日以内に NASA の侵襲性の強い実験(Direct ICP)、特殊な運動実験への参加、例えば ESA Sarcolab 実験を実施しない、とした

I-A-3.3 データシェア要求およびクルー質問票:

研究対象者の性別、年齢の他、宇宙飛行前後・軌道上 ISS 滞在中の宇宙飛行士健康管理用(MEDB)下記データを要求し(NASA 側の提供遅延により一部未受領)、研究対象者への質問票として毎採血時に、7 日以内の薬剤履歴や運動履歴等の情報を入手した

- ◇ MEDB データ: DEXA (MEDB1.11)、薬剤履歴(MEDB 1.1/1.3)、血液生化学検査(MEDB2.1)、栄養学データ(N3.06, E.204, J4.03, C1.03)、運動履歴(MEDB4.1, 5.1, 5.2, 5.3, ASCR Exercise)、線量計による放射線モニタリング(MR004L)、バイオドシメトリデータ(MEDB2.04)
- ◇ 宇宙飛行士向け質問票: 7 日間以内の薬剤、筋生検、運動、国際旅行、スリープシフトの各履歴

I-A-3.4 実験装置・運用・手順・安全性評価

◇ 実験装置・運用

【軌道上 ISS 滞在中】

ISS 既存遠心分離機、ISS 冷凍冷蔵庫(MELF: Minus Eighty degree Celsius Laboratory Freezer for ISS, -95℃)、NASA 搭載実績のある 7.5mL 血清用採血管(抗凝固剤 EDTA な

し・血清分離ゲル入り, BD Vacutainer® plastic molecular diagnostics tube, Product Number: 367987)、NASA 共有品採血キット等を使用し、採血は訓練を受けた宇宙飛行士が行った

【宇宙飛行前後】

米国 NASA ジョンソン宇宙センター(JSC:Johnson Space Center) Clinical Lab および、欧州宇宙飛行士訓練センター(EAC:The European Astronaut Center) Lab 内の遠心分離機、冷凍庫[-80℃]、採血キットを使用し、採血管は軌道上同品番を準備、地上血清分注用 2.0 mL マイクロチューブは JAXA にて調達し、採血は現地の有資格者が行った

◇ 実験手順

【軌道上 ISS 滞在中】

- ① 7.5 mL 採血を行う(宇宙飛行士向け質問票を依頼)
- ② 採血管を水平に 10 回程度振り混ぜる
- ③ 30 分間の凝血を行う
- ④ 凝血後 30 分以内に遠心分離(g 条件は下限 1,000g～上限 2,000g の間で変更可能、遠心時間は 15 分～30 分の間で変更可能、常温)を行う
- ⑤ 血清分離後 2 時間以内に採血管のまま-95℃MELFI にて凍結保存する

【宇宙飛行前後】

- ① 7.5 mL 採血を行う(宇宙飛行士向け質問票を依頼)
- ② 採血管を穏やかに 5 回転倒混和する
- ③ 20℃から 24℃の室内で 30 分間の凝血を行う
- ④ 2,000g、15 分間遠心分離を行う
- ⑤ 上清血清を 15 本程度のバイアルに分注する
- ⑥ 遠心後 45 分以内に冷凍庫[-80℃]にて凍結保管する

宇宙飛行前後の回収された採血管または分注後の血清および地上に回収された ISS 滞在中の採血管は、共に JSC Clinical Lab にて冷凍保管し、全試料が揃った後 TKSC を経由し、研究者チームへ輸送した

◇ 安全評価

軌道上装置以外の利用機器・消耗品類は全て市販品であり、医療機器として承認されているものを使用し、採血手順は軌道上および JSC、EAC の医療機関で標準的に実施されているものであり、JAXA/NASA/ESA/国際倫理委員会で承認を経て、TRR (Test Readiness Review) の承認を得ており、安全体制は、ISS 滞在中は ISS 計画での通常運用時の医療体制に、宇宙飛行前後は各機関の医療体制の運用に従った

JSC、EAC での採血では、事前に JSC 安全審査である TRR を、医療監視レベル 4 (基本的にリスクが最小限に抑えられた手順、医師による電話相談が可能、※2020 年 6 月時点のレベル区分け)に準じ書類審査として受審し、承認され、倫理申請と共に年次更新を継続した

ISS 滞在中の採血は、軌道上安全審査 SAR (Safety Assessment Review)の承認を得た上で実施されたが、全ミッションにおいて、これらの安全評価に基づく対象となる事例はなかった

I-A-3.5 倫理関連準備

地上予備実験および宇宙実験実施に先立ち、横浜市立大学(#B160401019)、JAXA 倫理委員会(ライオン(株)、横浜市立脳卒中・神経脊椎センターは委任審査、#JX-IRBA-20-033)、NASA 倫理委員会 (#Pro2516)、欧州宇宙機関倫理委員会 (ESA MB、#Pro2516)、国際倫理(HRMRB: Human Research Multilateral Review Board、#Pro2516)に付議し、承認を得た。また、

本研究は子孫に受け継がれるゲノム又は遺伝子に関する情報を明らかにする目的の研究ではないが、試料や個人情報の取り扱い等は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の倫理指針(平成 26 年 11 月 25 日一部改正:文部科学省、厚生労働省、経済産業省)」に準じて実施した。

I-A-3.6 研究対象者の個人情報の保護・リスク対策・同意取得

試料・個人情報の取り扱いは、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」(令和 3 年 3 月 23 日制定、令和 4 年 3 月 10 日一部改正:文部科学省、厚生労働省、経済産業省)」に準じた。個人情報に繋がるデータは連結可能匿名化され、JAXA 個人情報管理者(匿名化担当者)が情報セキュリティ規程および個人情報保護規定に基づき管理した上で、研究者チームに渡された。

検体採取に伴うリスク(採血穿刺部分の一時的な不快感、痛みなど)については、有資格者あるいは訓練を受けた宇宙飛行士(ISS 滞在中)が採血する等の対策が取られた。個人・機密情報漏洩のリスクについては、JAXA 個人情報管理者による管理や、間接的に身元が特定されるデータは成果公表しない等の対策が取られた。また研究者チームによる研究対象者特定を回避するため、JAXA 研究コーディネータによる ICB 代理実施・代理署名、全研究対象者の全検体が揃ったのちに一括で研究者チームに渡す等の対策が取られた。

当該宇宙飛行士の ISS 滞在の約 12 ヶ月前に、同意文書に基づき、面接もしくは電話会議にて研究対象候補者に説明を行い、研究同意が得られた場合に、同意文書に研究対象者ならびに JAXA 研究コーディネータが代理署名した。

I-A-4 宇宙飛行士血清プロテオーム解析

I-A-4.1 実験背景と意義

血液は全身を循環し、様々な組織・細胞から分泌または放出された蛋白質を多く含むため、血液中の蛋白質を網羅的に調べることで生体内の状態を推定することができる。また血液は低侵襲に採取が可能であり、研究対象者への負担も少ない。そこで本研究では、宇宙飛行士から宇宙飛行前、軌道上 ISS 滞在中、さらには宇宙飛行後と経時的に採血し、血液から調製した血清をプロテオーム解析技術により網羅的に解析し、宇宙飛行ミッションに伴う血清蛋白質の量的変動を明らかにすることで、宇宙飛行ミッションの影響を受けて生体内組織・細胞に生じる様々な変化に関連する蛋白質の量的変動を検出できると考えた。またこれにより、長期間の軌道上 ISS 滞在が生体内に及ぼす影響やメカニカルストレスに対する生体内適応に関する分子メカニズムを理解するためのブレークスルーとなる発見・発想が得られる可能性がある。

I-A-4.2 実験結果及び成果

I-A-4.2.1 ヒト血清プロテオーム解析技術の確立(地上予備実験)

血清は全蛋白質量の 99%が約 30 種類の高濃度蛋白質で占められ、構成蛋白質の濃度差が大きい。このような複雑性の高い試料の場合、従来プロテオーム解析に利用されている MS を用いた Data dependent Acquisition[DDA]法(DDA-MS)では、一度の測定でわずか 200 種類程度の蛋白質しか同定できない。そこで本研究では、より網羅的な解析を目指し、MS を用いた Data Independent Acquisition [DIA] 法(DIA-MS)による血清プロテオーム解析技術の開発に取り組んだ。本法では、試料の複雑性の影響は受けにくい、あらかじめ各蛋白質に由来するペプチドの質量情報を収集・蓄積したスペクトルライブラリを準備する必要があり、DIA-MS で解析できる蛋白質数や種類はこのライブラリの規模や内容に依存する。そこで本研究では、電気泳動法やカラムクロマトグラフィー法などによりヒト血清蛋白質を分画し、複雑性を低減した試料を解析することで、ヒト血清中に存在する 1,500 種類以上の蛋白質を同定し、その情報を含む独自のヒト血清スペクトルライブラリを構築することにより、DIA-MS による高濃度か

ら低濃度の血清蛋白質を迅速に定量解析できる技術確立した⁶⁾。

I-A-4.2.2 宇宙飛行ミッションに伴う骨量変化

ISS に 6 ヶ月以上滞在し、本研究への参加に同意した宇宙飛行士 6 名について、MEDB 取得情報から、宇宙飛行ミッション前後の骨密度(BMD)から計算され、骨粗鬆症診断基準でもある T-score は測定した全箇所において減少傾向を示したことが明らかとなった(図 I-A-4-1)。

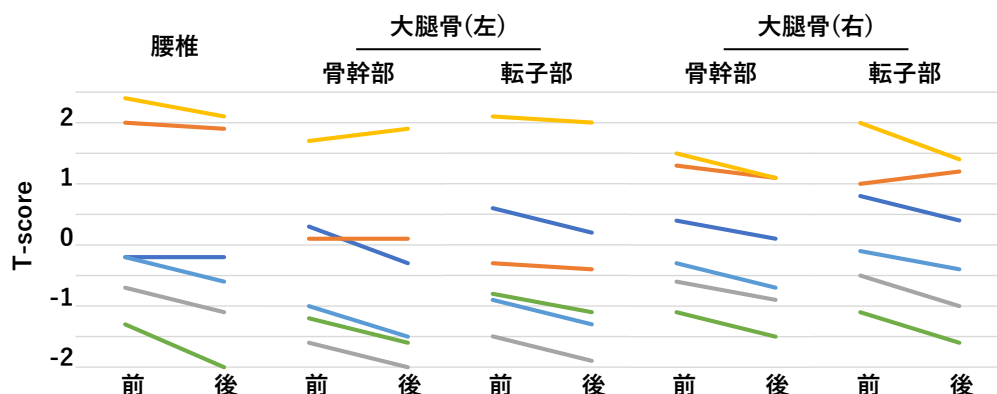


図 I-A-4-1 宇宙飛行前(前)と飛行後(後)の T-score 変化

I-A-4.2.3 宇宙飛行士血清試料の採取

6 名の宇宙飛行士から、宇宙飛行前後および ISS 滞在中に合計 12 ポイントで予定通り採血を行った(図 I-A-4-2)。ただし、打上げスケジュールの変更および新型コロナウイルス感染症(COVID-19)感染拡大のため、宇宙飛行前(#Pre1、#Pre2、#Pre3)と宇宙飛行後(#Post4、#Post5)の採血日数に幅が生じたが、許容範囲内であった。

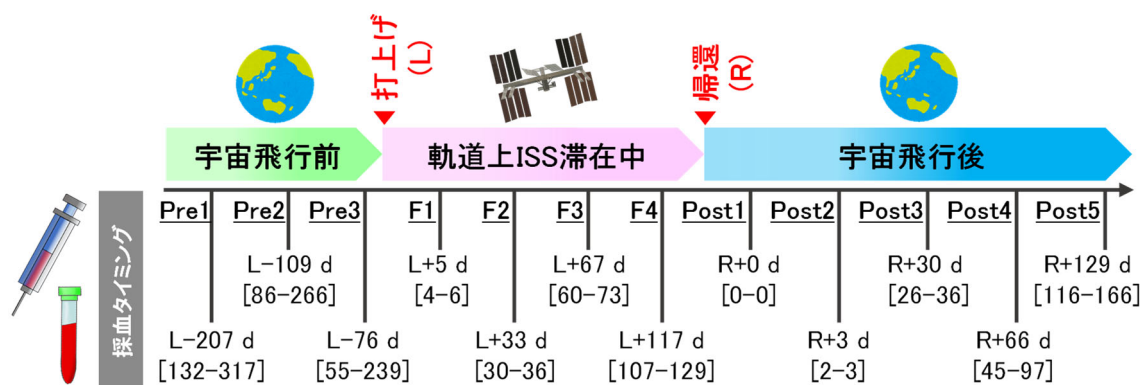


図 I-A-4-2 宇宙飛行士血清試料採取スケジュール

6 名の宇宙飛行士から宇宙飛行前 3 ポイント(#Pre1、#Pre2、#Pre3)、ISS 滞在中 4 ポイント(#F1、#F2、#F3、#F4)、宇宙飛行後 5 ポイント(#Post1、#Post2、#Post3、#Post4、#Post5)で採血した。採血実施日は、宇宙飛行前・ISS 滞在中は打上げ日(L)から数えた日数(d)、宇宙飛行後は地球への帰還日(R)から数えた日数(d)を、全宇宙飛行士の中央値[最小-最大]で示す。

I-A-4.2.4 長期宇宙飛行ミッションに伴うヒト血清蛋白質の経時的発現変動解析

宇宙飛行前(#Pre)から軌道上 ISS 滞在中(#F)および宇宙飛行後(#Post)の血清プロテオームの経時変化に関する新たな知見を得るため、本研究で採取した 72 血清試料(12 採血ポイント×6 名分)を対象に DIA-MS(各試料 2 回測定)による解析を行い、144 の MS データを取得した。ただし、想定以上の溶血が認められた 2 試料(#F1、2 名分)については、蛋白質プロファイルが他と大きく異なっており定量解析に使用できなかった。そのため、最終的に 70 試料か

ら取得した合計 140 の MS データを、これ以降の解析に活用した。なお主成分分析より、血清採取時期毎、特に ISS 滞在直後(#F1)と ISS 滞在後の地球帰還直前(#F4)間や ISS 滞在中(#F)と地上(#Pre と #Post)間で蛋白質発現パターンが大きく異なることが示唆された(図 I-A-4-3)。

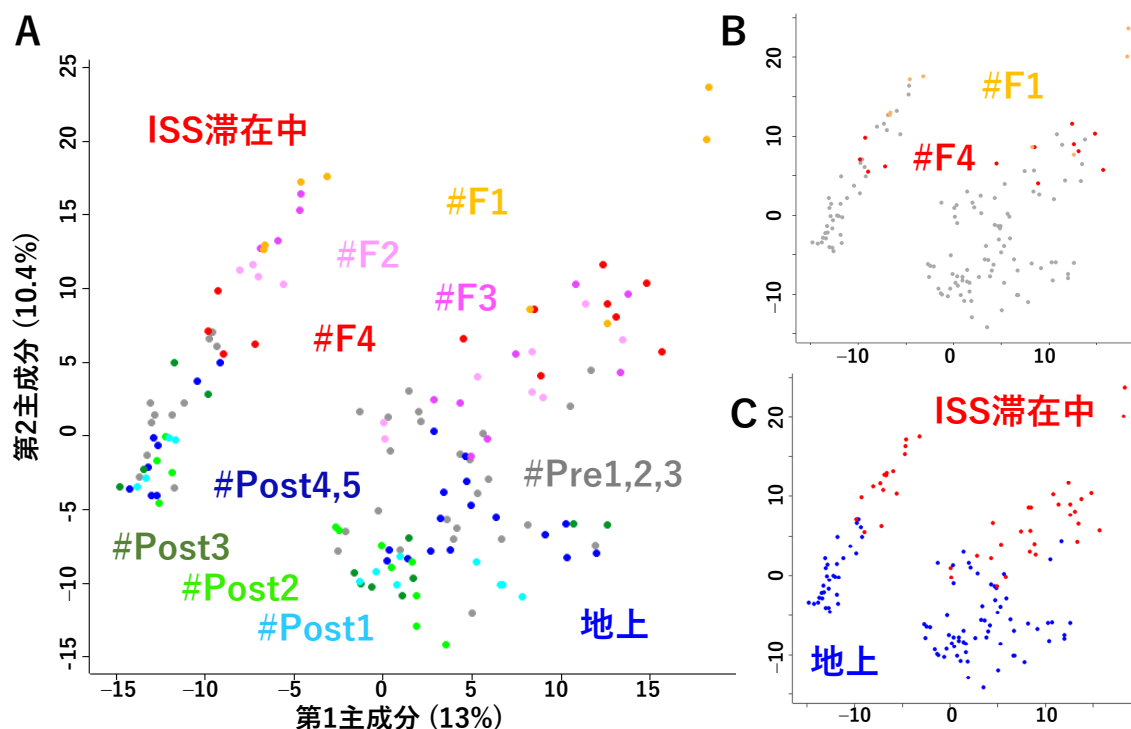


図 I-A-4-3 宇宙飛行士血清プロテオーム解析データを用いた主成分分析

A, 全行程、B, ISS 滞在直後(#F1:黄)と ISS 滞在後の地球帰還直前(#F4:赤)、C, ISS 滞在中(#F:赤)と地上(宇宙飛行前後, #Pre と #Post:青)。

i) ISS 滞在が生体内に及ぼす影響～ISS 滞在直後(#F1)と地球帰還直前(#F4)間の血清中蛋白質発現変動解析

ISS 滞在直後(#F1)と ISS 滞在後の地球帰還直前(#F4)に採取した血清から同定した 541 種類の蛋白質について比較定量解析を実施した。その結果、本研究に参加した宇宙飛行士において ISS 滞在中に有意に量的変動を示した血清蛋白質はわずか 11 種類(#F4 で増加; COL1A1、POSTN、PEBP4、CADM1、ALPL: #F4 で減少; ACTN1、CAP1、LTF、CORO1A、ARPC2、LY6G6F)であり、その他多くの蛋白質はそれほど大きな変動を示さないか、個人差が大きいことがわかった。また変動した血清蛋白質の中で、アクチン細胞骨格構成関連蛋白質(CAP1 や CORO1A など)は、ISS 滞在直後(#F1)に最も高値を示し、ISS 滞在中に徐々に減少し、宇宙飛行直後(#Post1)には宇宙飛行前(#Pre)のレベルに戻っていた(図 I-A-4-4)。一方、軟骨内骨化や骨芽細胞分化などに関与する蛋白質(COL1A1、ALPL)量は、ISS 滞在中に徐々に増加し続け、宇宙飛行後も少なくとも 1 ヶ月(#Post3 まで)程度は高いレベルを維持し、その後減少に転じた(図 I-A-4-4)。この結果は、これら蛋白質の量的変動は μ -g 曝露などの宇宙ストレスに適応する過程で誘導されている可能性が高いが、その影響が宇宙飛行直後(#Post1)に回復する蛋白質と、宇宙飛行後 1 ヶ月(#Post3)程度継続する蛋白質が存在することを示唆している。

ii) ISS 滞在が生体内に及ぼす影響～ISS 滞在中と地上間の血清中蛋白質発現変動解析

ISS 滞在中(#F)と地上(宇宙飛行前後, #Pre と #Post)、それぞれで採取した血清から同定し

た 530 種類の蛋白質について比較定量解析を実施した。その結果、ISS 滞在により量的変動を示す 74 種類の蛋白質(増加 53 種類、減少 21 種類)を検出した。IPA(Inguity Pathway Analysis。オミックスデータから上流制御因子や生物学的機能の予測、パスウェイ解析などを行うソフトウェア)を用いた上流制御因子解析は、これら血清蛋白質の量的変動を誘導する上流因子として、EDN1 の阻害および/または IL-15 の活性化を示唆した。別グループによる先行研究では、模擬 μ -g 環境下で増殖した内皮細胞では、EDN1 遺伝子発現が有意に抑制され、上清中への放出量も有意に減少することが報告されている⁷⁾。また別のグループは、宇宙飛行士の血漿中 IL-15 濃度が宇宙飛行前(#Pre)と比べて ISS 滞在中(#F)に有意に増加することを示している⁸⁾。これらの結果は、本研究から推測された情報と一致していた。血圧調節は、神経、循環器、ホルモン、腎臓の体液バランスなどの複雑な因子が関与する統合的なプロセスであるが、EDN1 はこのような調節機構において重要な役割を果たす^{9, 10)}。そのため EDN1 活性阻害は、ISS 滞在中の宇宙飛行士の血圧低下現象^{11, 12)}に寄与する可能性がある。一方で EDN1 は、骨の恒常性維持や骨芽細胞機能の制御における役割についても広く議論されており¹³⁾、EDN1 欠損マウスは、下顎の発育不良と骨量低下を伴う頭蓋顔面異常を示し、EDN1 は骨形成細胞の増殖と遊走制御に関与することが報告されている^{14, 15)}。また炎症性サイトカインである IL-15 も、運動に応じて筋肉から分泌されるマイオカインとして機能し¹⁶⁾、破骨細胞前駆細胞の分化を促進する¹⁷⁾と共に、骨芽細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている^{17, 18)}。さらに、骨壊死を起こした IL-15 欠損マウスでは、大腿骨 BMD が部分的に回復し、骨芽細胞活性の評価マーカーである血清オステオカルシン、BAP、BGP が、骨壊死を起こした野生型マウスと比較して有意に増加することも報告されている¹⁹⁾。したがって、本研究に参加した宇宙飛行士の血清蛋白質の量的変動から推測された EDN1 阻害および/または IL-15 活性化は、ISS 滞在により誘導される宇宙飛行士の骨代謝活性変化と関連する可能性があり、これら因子には宇宙飛行士における骨代謝異常のリスク増大を予測する潜在的な能力があると考えられる。

iii) 宇宙飛行ミッションが生体内に及ぼす影響～全行程中の血清蛋白質発現変動解析

本研究では、宇宙飛行前(#Pre)に比べ、ISS 滞在直後(#F1)に量的変動を示す血清蛋白質が多く検出された。IPA を用いた機能解析により、これらの蛋白質の量的変動は、血液細胞の増殖や関節炎の活性化などに関連していることが示唆された。さらにこのような蛋白質の中でも、ISS 滞在直後(#F1)に血清中量の減少を示した蛋白質(細胞接着・細胞外マトリックス構成関連蛋白質を含む)のほとんどは、ISS 滞在 1 ヶ月後(#F2)には宇宙飛行前(#Pre)のレベルにまで回復しており、このような減少反応の多くは一過性のものであることがわかった。一方で、先にも述べた CAP1 と COL1A1 のように(図 I-A-4-4)、ISS 滞在直後(#F1)に血清中量の増加を示した蛋白質(自然免疫応答関連蛋白質を多く含む)の多くは、宇宙飛行直後(#Post1)に宇宙飛行前(#Pre)のレベルまで減少した。したがって、これら蛋白質の量的変動は、打上げに伴うストレス応答や宇宙空間での μ -g 曝露などの宇宙ストレスに対する生体内組織・細胞の適応機構を反映している可能性があるが、その影響は一過性であると考えられた。

また本研究では、宇宙飛行前(#Pre)と比べて ISS 滞在直後(#F1)では有意な変動を示さなかったが、ISS 滞在後の地球帰還直前(#F4)で有意な変動を示した蛋白質を、13 種類(#F4 で増加;PRL、COL1A1、FTL、SPP1、TPI1、GSTO1、HTRA1: #F4 で減少;LILRB5、ACE、MCAM、CACNA2D1、HIST1H4A、LY6G6F)検出した。中でも骨芽細胞分化マーカーである COL1A1 と SPP1²⁰⁾は、本研究に参加した宇宙飛行士の血清中で ISS 滞在 1 ヶ月後(#F2)には増加傾向を示し、その後の ISS 滞在中(#F3、#F4)および宇宙飛行後 1 ヶ月(#Post3)でも高いレベルを維持する傾向が示された(図 I-A-4-4)。IPA を用いた上流制御因子解析からも、他の蛋白質

の量的変動から SPP1 は ISS 滞在中から地球帰還直前 (#F4) まで活性化していることが示唆されている。さらに、別のグループでも μ -g 環境下で培養した後の細胞において SPP1 の発現が、1-g 対照と比較して、わずかではあるが有意に増加することが示されている⁷⁾。したがって、血清中 COL1A1 と SPP1 は μ -g 曝露に応答して増加する骨芽細胞分化マーカーであると考えられた。さらに、別の骨形成マーカーである POSTN²⁰⁾ は、本研究に参加した宇宙飛行士の血清中では、ISS 滞在中直後 (#F1) に有意に減少したが、その後の増加に転じ、それ以降の変動パターンは血清中 COL1A1 や SPP1 と類似していた(図 I-A-4-4)。先行研究において、ISS に滞在した宇宙飛行士の血清中では、BSAP(骨特異的アルカリフォスファターゼ)や P1NP(プロコラーゲンタイプ 1 アミノ末端プロペプチド)などの骨形成バイオマーカーの濃度も ISS 滞在中直後から徐々に上昇し、宇宙飛行後約 1 ヶ月 (#Post3) 間は高いレベルを維持し、その後減少することが示されている^{21, 22)}。宇宙飛行ミッションで ISS に長期間滞在した宇宙飛行士は、宇宙飛行後 (#Post)、神経・筋骨格系に焦点を当てたリコンディショニングを受ける²³⁾。IPA を用いた機能解析は、宇宙飛行後 1 ヶ月 (#Post3) に結合組織細胞の量が増加し、血液細胞の細胞死と血管系の損傷が回復していることを示唆した。したがって骨代謝に関連する蛋白質の量的変動は、

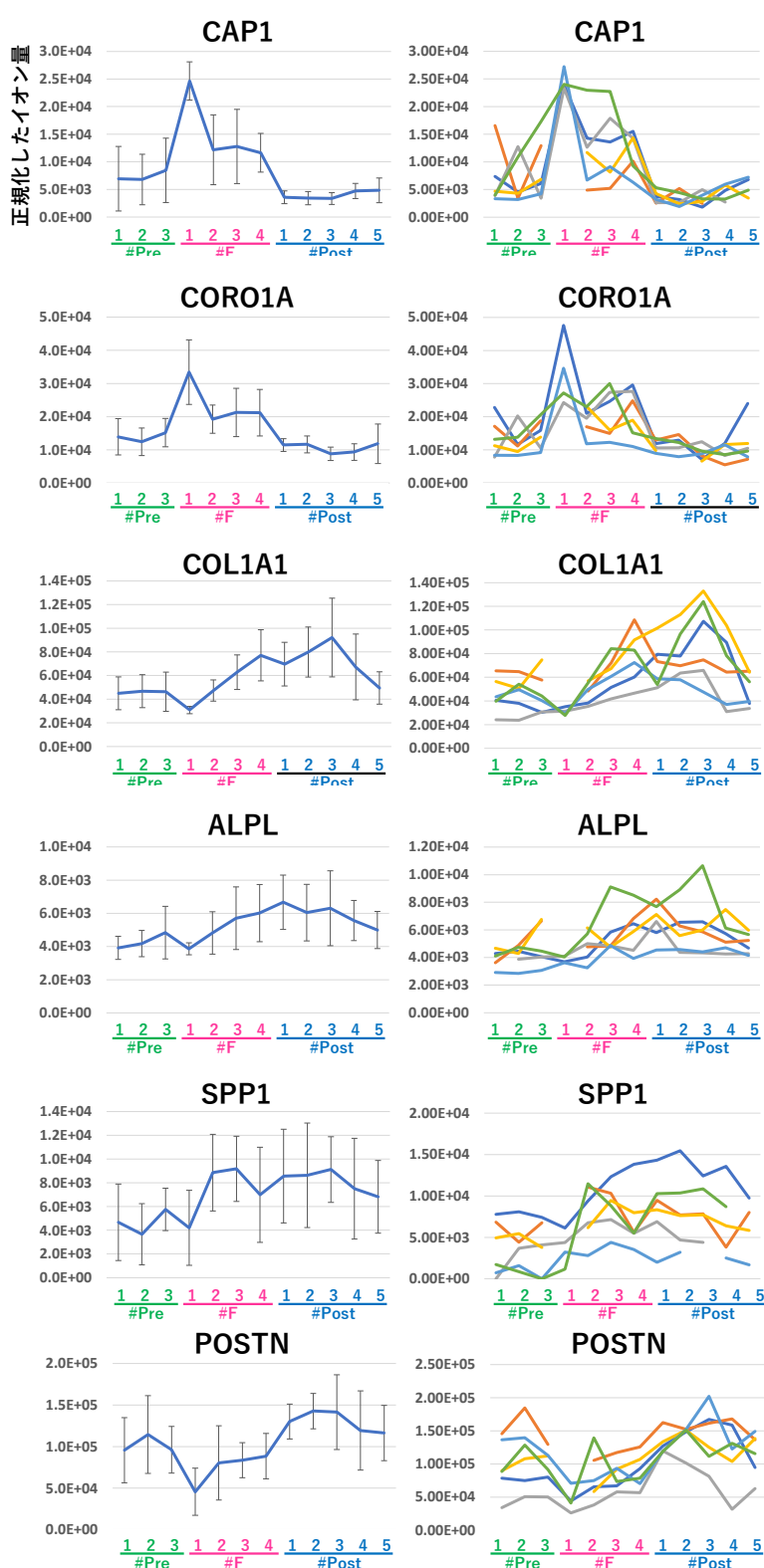


図 I-A-4-4 宇宙飛行士血清蛋白質の経時的変動
左: 正規化されたイオン量の中央値±SD、右: 宇宙飛行士毎の正規化されたイオン量。採血ポイントは図 I-A-4-2 を参照。

宇宙飛行士が宇宙飛行後 1 ヶ月(#Post3)を経過した後に身体的・生理的状态が回復し始めることも示している可能性がある。ISS 滞在によって誘発されたこれらの血清蛋白質量の変動が、生体内適応機構とどのように関連するのかについては、さらなる調査が必要であるが、血清 COL1A1、SPP1、POSTN 量は、宇宙飛行ミッションによって誘発される宇宙飛行士の骨代謝の客観的指標としても役立つ可能性がある。

I-B. 地上ヒト(骨粗鬆症患者等)

I-B-3 実験準備・運用

I-B-3.1 研究対象者要件

骨粗鬆症/骨量減少患者:194 例(うち解析利用数約 100 例)、対照群:100 例

【選択基準】:

- 骨粗鬆症/骨量減少患者
 - ✓ 登録時年齢が 20 歳以上の男性および女性患者
 - ✓ 骨粗鬆症または骨量減少と診断された患者(原発性骨粗鬆症の診断基準 2012 年度改訂版およびステロイド性骨粗鬆症の管理と治療ガイドライン 2014 年度改訂版に準じる)。
 - ✓ 本研究の参加に関して同意が文書で得られる患者
- 対照群
 - ✓ 横浜市立大学バイオバンク室に保管されている健常者で検体採取時 20 歳以上の男女

【除外基準】:(※スクリーニング条件含む)

- 骨粗鬆症/骨量減少患者
 - <診断時>医師の判断により対象として不適当と判断された患者(骨量測定に影響を及ぼす所見のある患者など)
 - <スクリーニング時 194 例⇒約 100 例>解析に影響を与える基礎疾患や治療(ステロイド剤服用など)、BMD 検査未実施などの患者は排除する

I-B-3.2 実験手順

臨床的評価のため、保険診療内において DEXA(Dual Energy X-ray absorptiometry)法により腰椎および大腿骨頸部の BMD 測定を行う。骨形成および骨吸収の骨代謝回転を評価するため、血中の骨形成マーカーである I 型プロコラーゲン N-プロペプチド(PINP, エクルーシス試薬 total PINP)、骨型アルカリフォスファターゼ(BAP, アクセス オスターゼ)および骨吸収マーカーである酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRACP-5b, オステオリックス TRAP-5b)を測定すると共に、臨床所見(骨折の有無/腰痛の評価[VAS])の評価を行う。なお本研究では、臨床・診断で採血した残血清(解析を行うまで冷凍庫[-80℃]に保管)を利用し、独自試料採取は行わない。

I-B-3.3 倫理関連準備

実験実施に先立ち、横浜市立大学倫理委員会(#B160401019)と JAXA 倫理委員会(#JX-IRBA-20-070)に付議し、承認を得た。

I-B-4 骨粗鬆症患者血清プロテオーム解析

I-B-4.1 実験の背景と意義

骨粗鬆症は、骨量減少や骨組織の微細構造異常を特徴とし、骨折高リスクを有する疾患である。骨折は QOL の低下につながるため、骨粗鬆症と診断されていない骨折リスクがある患者に対しても骨の健康を維持するための早期治療介入を実施する必要がある。現在、骨粗鬆

症の診断は、T-score に基づき判定され、WHO(世界保健機関)では、 $T\text{-score} \leq -2.5$ を原発性骨粗鬆症の診断基準としている。しかし骨折(または脆弱性骨折)を生じた閉経後の女性の約 50%は正常な BMD 値を示したとの報告もあり²⁴⁾、T-score だけで骨折リスクがある患者を的確に診断することはできない。そこで本研究では、DIA-MS による網羅的なヒト血清プロテオームの解析技術を利用し、骨粗鬆症性脆弱性骨折の既往を有する骨量減少症患者や骨折の既往がない骨粗鬆症患者において、共通して特徴的に発現する血清蛋白質を探索することで、骨量減少などの生体内の状態を把握するための客観的指標となる蛋白質を特定できると考えた。そのため本研究は、骨折高リスク診断の客観的指標となるシーズ探索としても非常に意義のある研究となる可能性が高い。

I-B-4.2 実験結果および成果

I-B-4.2.1 骨粗鬆症患者血清プロテオーム解析

骨粗鬆症性脆弱性骨折の既往がない $T\text{-score} \leq -2.5$ の骨粗鬆症患者(OPnF) 9 名と、対照群(Control; 横浜市立大学に勤務する 50~60 歳) 10 名を研究対象とした DIA-MS による血清プロテオーム解析を行った。654 種類の血清蛋白質を同定し、574 種類の蛋白質を定量解析に供した結果、患者に特有の量的変動を示す血清蛋白質 18 種類を検出した(図 I-B-4-1 左)。この中には炎症反応や細胞接着に関連する蛋白質が含まれていた。また骨粗鬆症性脆弱性骨折の既往がある $T\text{-score} > -2.5$ の骨量減少症患者(FF, WHO 基準では骨粗鬆症と診断されない患者) 7 名と対照群(Control; OPnF と同人) 10 名を対象とした DIA-MS による血清プロテオーム解析も行い、665 種類の血清蛋白質を同定し、594 種類の蛋白質を定量解析に供した。結果、患者特有の量的変動を示す血清蛋白質として検出された 14 種類(図 I-B-4-1 右)の中には、軟骨内の骨成長に関連する ECM1 と EXT1 が含まれていた。さらに、Control 群に対し両患者群において共通の量的変動を示す血清蛋白質 6 種類(CFHR5、ECM1、MSN、PRAP1、TAGLN2、VWF)を見出すことにも成功した。中でも、最も有意な差を示した ECM1 は、細胞外マトリックス蛋白質であり、骨形成や血管新生に関与する分泌型糖蛋白質である。またこれまでに、高濃度組換えヒト ECM1 をマウス中足骨の器官培養上清に添加した場合に、用量依存的に骨形成の異常を誘導することが報告されている²⁵⁾。そこで次に、骨折高リスクを有する疾患である骨量減少症や骨粗鬆症患者の診断における血清 ECM1 の有用性を検証した。

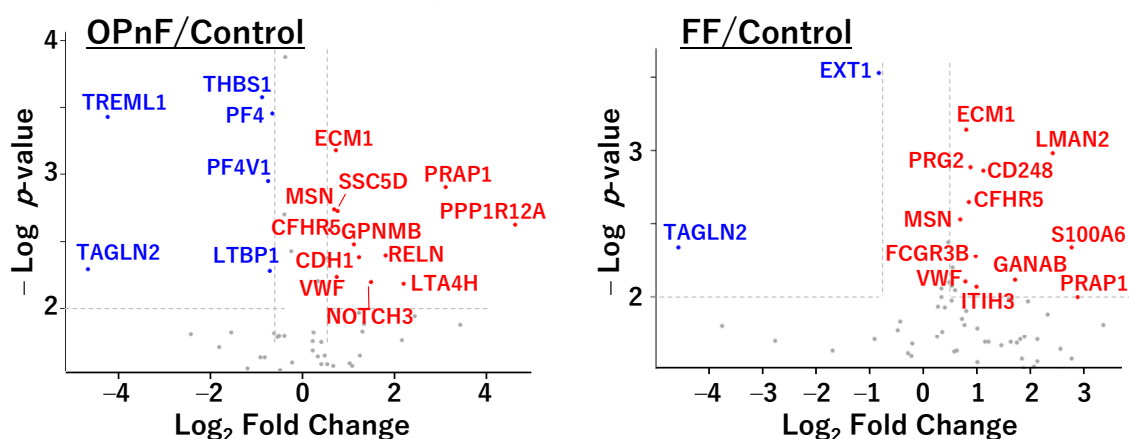


図 I-B-4-1 骨粗鬆症患者の血清プロテオーム解析

Control と比べて OPnF(左)または FF 群(右)で血清中量が増加(赤)または減少(青)した蛋白質を示す ($p < 0.01$ 、 $|\text{Difference [OPnF or FF/Control]}| \geq 1.5$)。

I-B-4.2.2 骨粗鬆症患者血清を用いた ECM1 の臨床的有用性の検証

血清 ECM1 の臨床的有用性を評価するため、Human ECM1 ELISA Kit (abcam)を用いて、

異なる病状の一般診療患者の血清 ECM1 濃度を測定した。この検証実験では、探索研究とは異なる患者群(n = 58)と対照群(Control; 横浜市立大学に勤務する 50~61 歳, n = 26)の血清を用いた。結果、骨粗鬆症性脆弱性骨折の既往に関係なく T-score ≤ -2.5 により骨粗鬆症と診断された患者群(OP, n = 53)と FF 群(n = 5)の間に有意差は認められなかったが、OP 群と FF 群の血清 ECM1 濃度は共に Control 群よりも高い傾向があった。さらに、OP 群と FF 群を合わせた患者群(OP+FF 群)においても、血清 ECM1 濃度は Control 群よりも有意に高かった(図 I-B-4-2)。また ROC 曲線解析から、血清 ECM1 は OP+FF 群を診断するための客観的な血清指標として有用であることが示唆された(AUC = 0.689 [95% CI, 0.571-0.807])。さらに、OP+FF 群の血清 ECM1 濃度と骨代謝マーカー 3 種類(BAP、P1NP、TRACP-5b)との間に相関関係はなかった。したがって、血清 ECM1 は、従来から骨粗鬆症の診断基準とされている T-score や治療効果指標とされている骨代謝マーカーとは無関係に、骨折高リスク診断のための客観的な血清指標となり、骨粗鬆症の臨床診断を補完する可能性がある。この結果を基に特許を出願し(特願 2023-003073, 2023.1.12.)、臨床応用の早期実現を達成する目的で、企業(社名非公表)と共同で診断薬開発に取り組むと共に、臨床的有用性を検証するための新たな臨床研究に着手した。

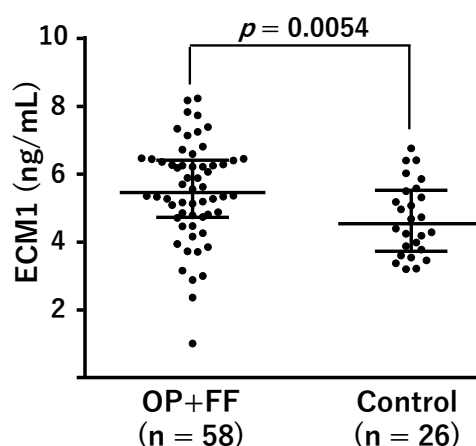


図 I-B-4-2 血清 ECM1 濃度

OP+FF: 5,472 [4,746-6,421] ng/mL*

Control: 4,554 [3,750-5,536] ng/mL*

* 中央値 [IQR]

**Mann-Whitney U-test

I-B-4.2.3 宇宙飛行士血清を用いた ECM1 のメカニカルストレス応答性の検証

血清 ECM1 のメカニカルストレス応答性を検証する目的で、ELISA を用いて宇宙飛行士の宇宙飛行前後および ISS 滞在中の血清 ECM1 濃度を測定した。その結果、血清 ECM1 は全宇宙飛行士において ISS 滞在中(#F)に増加傾向を示した(図 I-B-4-3)。また宇宙飛行後 3 日目(#Post2)に一旦減少傾向を示す宇宙飛行士もいたが、宇宙飛行後 1 ヶ月(#Post3)には宇宙飛行前(#Pre)よりも高値を示した。したがって、骨折高リスク診断のための客観的指標として有用な血清 ECM1 は、その他の骨代謝関連蛋白質と同様、メカニカルストレス応答性を示し、宇宙飛行ミッションによって誘発される飛行士の生体内の状態変化を把握するための客観的指標としても役立つ可能性がある。ただし、その分子メカニズムは依然不明であり、今後さらなる検討が必要である。

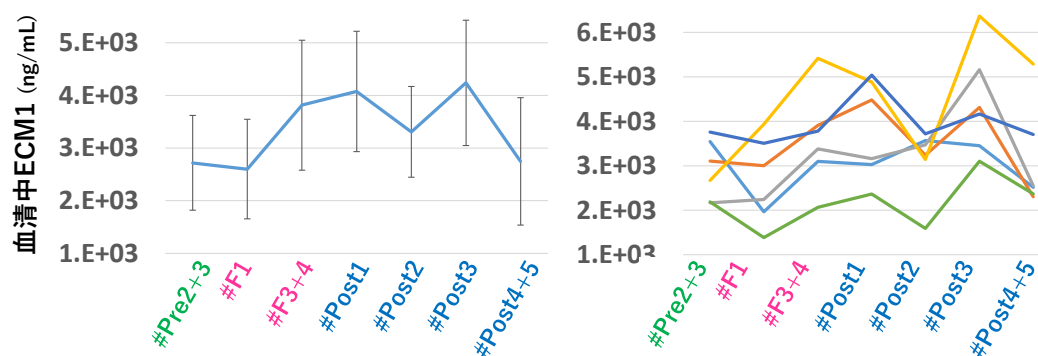


図 I-B-4-3 宇宙飛行士血清中の ECM1 濃度

左: 正規化されたイオン量の中央値 $\pm$ SD、右: 宇宙飛行士毎の正規化されたイオン量。採血ポイントは図 I-A-4-2 を参照。

【II. マウス対象研究】

II-A 宇宙飛行マウス

II-A-3 実験準備・運用

II-A-3.1 実験要求の検討・策定(地上予備実験・地上適合性試験)

宇宙実験フェーズ移行審査までのフィジビリティスタディ期間は、サンプルシェア要求の詳細化検討のため、(1) 地上モデルマウスの血清・骨・筋肉プロテオーム解析による骨粗鬆症関連蛋白質の探索、(2)宇宙飛行マウス解析用プロトコル確認検証、(3)マウス生物適合性試験・過重力実験、(4)筋肉中の大量発現蛋白質の除去技術の確立、(5) DIA 法によるマウス骨、血清プロテオーム解析技術の確立、(6) 重力環境の異なる条件下でのマウス骨・骨格筋細胞の培養条件確立/細胞内外蛋白質の定量解析、(7) ヒト骨粗鬆症患者と宇宙飛行マウスでの発現変動蛋白質の関連性解析等の地上予備実験を行った。

II-A-3.2 動物実験委員会等関連準備

各試験や軌道上マウス飼育ミッションの実施に先立ち、MHU-2(大野テーマ[#])において各動物実験委員会(理化学研究所、横浜市立大学動物実験委員会、#T-A-15-005)、JAXA(宇宙:#審 016-018、地上試験:#016-012)、NASA IACUC(the Institutional Animal Care and Use Committee)(#JAX-17-001-Y1[FLIGHT])、米国カルフォルニア州 Explora BioLabs(#EB15-010A)にて、実験計画の承認を得、宇宙飛行士が参加する研究開発業務等の審査については JAXA ARRB、NASA eIRB(#Pro2158)に付議し各承認を得た。各申請には、本テーマの必要内容、メンバー登録を行った。

II-A-3.3 実験装置・運用・安全性評価

JAXA が MHU-1 で開発・検証した小動物飼育装置(Mouse Habitat Unit: MHU)を利用し、MHU-2 として実施した。本テーマは MHU-2 の相乗り(サンプルシェア)であり利用実験装置と運用プロトコル詳細は大野テーマ[#]を参照されたい。実験区分については、表 II-A-3-1 に示す。

[#] <https://humans-in-space.jaxa.jp/kibouser/subject/life/70547.html>

試料 名称	ストレイン	週齢	性別	飼育数/ ケージ	微小重力(μ -g)実験 匹数		人工(A)1-g 実験 匹数	
					FOS 餌 [*]	通常餌 [*]	FOS 餌 [*]	通常餌 [*]
マウス	C57BL/6J	打上時 8 週齢以降 回収時 16 週齢以内	雄	1	3	3	3	3
					合計匹数: 12			

表 II-A-3-1 宇宙飛行マウス実験試料

^{*}通常餌はオリエンタル酵母の改変 AIN93G 餌(AIN93G に長期保存のためにビタミン増量・抗酸化剤添加)を使用。FOS 餌はセルロース成分を 5% fructo-oligosaccharide (FOS)に置換したものを使用。

II-A-3.4 打上げ・ISS 滞在中・回収手順

＜打上げ・ISS 滞在中＞2017 年 8 月 17 日から 9 月 16 日の 31 日間、ISS で飼育が実施され、地球帰還後の 9 月 19 日に解剖が行われた。詳細は大野テーマ[#]を参照されたい。解剖では表 II-A-3-2 に示すサンプルのシェアを受けた。

＜回収＞ISS で TCU(回収用)にマウス 12 匹を収納し帰還ビークルへ設置して、適切な温度・空気環境下で帰還し、地上にて生存回収を行った。宇宙機は着水、船による回収、着岸後、Explora Biolab にて、糞便、血液採取後、解剖が行われた。各処理後、日本の横浜市立大学とライオン(株)等にて、表 II-A-3-2 に示す各臓器の CT 撮影、プロテオーム解析を行った。

採取サンプル		解析項目	
血液 ● 軌道上:地球帰還後採取 ● 地上対照:実験後採取		プロテオーム解析	-
組織 ● 軌道上:地球帰還後採取 ● 地上対照:実験後採取	下顎骨(左右顎) (抗重力骨の比較 対照として要求)	プロテオーム解析	CT 撮影
	左大腿骨	プロテオーム解析	重量測定 CT 撮影
	左ヒラメ筋	プロテオーム解析	重量測定
	両腓腹筋	プロテオーム解析	重量測定
	両長趾伸筋	プロテオーム解析	重量測定

表 II-A-3-2 宇宙飛行マウス解析対象試料と解析項目一覧

II-B 地上マウス(骨量減少モデル)

II-B-3 実験準備・運用

II-B-3.1 地上予備実験と検体採取

☆非荷重環境モデル実験 [HU マウス]

後肢懸垂(HU)による非荷重環境 (HU 群, n = 8)と通常環境(Cont 群, n = 8)で、通常餌(固形食)にて同時個別飼育した。飼育開始後 6 週間で体重を測定し、解剖により血清、大腿骨、後肢筋を採取し、骨の CT 撮影、各臓器の湿重量測定、プロテオーム解析を行った。

☆過重力環境モデル実験 [3-g マウス]

遠心による過重力(3-g)環境(3-g 群, n = 6)と、対照となる通常(1-g)環境(Cont 群, n = 6)で、通常餌(固形食)により同時飼育した。飼育開始後 28 日で体重を測定し、解剖により血清、大腿骨、後肢筋を採取した。その後、骨の CT 撮影および各臓器の湿重量測定、プロテオーム解析を行った。

II-B-3.2 動物実験委員会関連準備

各試験に先立ち、JAXA、横浜市立大学、岐阜大学の動物実験委員会にて、実験計画の承認を得た(HU:JAXA:016-026, 市大:T-A-16-066、3-g:JAXA:017-006A, 岐阜大:28-31)。

II-A/B 宇宙飛行および地上マウス(骨量減少モデル) 骨、骨格筋、血清プロテオーム解析

II-A/B-4a 骨プロテオーム解析

II-A/B-4a.1 背景と意義

骨は生涯を通し代謝され、周囲の環境に合わせ変化する組織である。そのため、 μ -g 環境などの非荷重環境下では、骨ミネラル/構造変化や骨細胞死などの変化を伴う骨量減少が認められるが、その分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、脱ミネラル工程を経る蛋白質抽出法と DIA-MS を組み合わせた骨プロテオーム解析技術を確立して、 μ -g 環境下で骨量減少を示す宇宙飛行マウス大腿骨における蛋白質の量的変動を網羅的に明らかにし、その結果を μ -g 環境下で骨量減少を示さない宇宙飛行マウス下顎骨のプロテオーム解析結果と比較することで、メカニカルストレス応答性の骨量減少関連骨蛋白質を特定できると考えた。さらに骨代謝との関連性を評価することで、本研究はメカニカルストレス応答性の骨量減少分子メカニズム解明に寄与する非常に意義のある研究となる可能性が高い。

II-A/B-4a.2 実験結果および成果

i) 骨プロテオーム解析技術確立(地上予備実験)

微量骨試料を用いた網羅的なプロテオーム解析を可能にするために、脱ミネラル工程による二段階蛋白質抽出法と DIA-MS を組み合わせた、マウス骨プロテオーム解析法を検討した。そこでまず、二段階抽出法(図 II-A/B-4-1)により抽出した大腿骨蛋白質について、DDA-MS によるプロテオーム解析を行った。その結果、非脱灰試料(抽出物 A)から 1,336 種類、脱灰試料(抽出物 B)から 740 種類、脱灰後の残渣抽出試料(抽出物 C)からは 1,017 種類の蛋白質が同定でき、蛋白質種類は抽出物 A を解析した場合が最も多かった。しかし、抽出物 B と C からは細胞外マトリックス構築や骨化に関連する蛋白質が複数検出されたため、骨量調整に係わる蛋白質を探索する観点においては、解析対象として抽出物 B と C が最適であると考えた。また各抽出液の解析結果を統合し、1,459 種類の蛋白質情報を含む独自のマウス骨スペクトルライブラリを構築し、DIA-MS によるマウス骨プロテオーム解析技術を確立した。

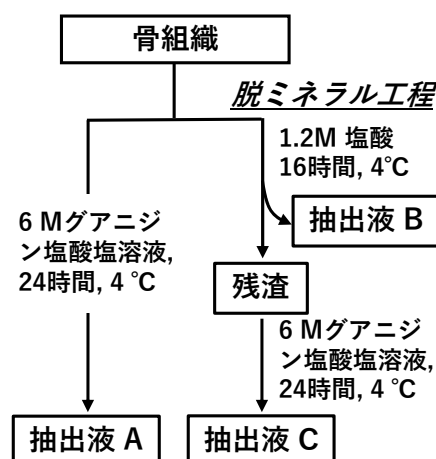


図 II-A/B-4-1 骨蛋白質二段階抽出法の流れ

ii) 宇宙飛行マウスの骨量 BV/TV[%]

MHU-2 では、重力環境の違いに加え、異なる FOS 摂取量でマウスを飼育した(表 II-A-3-1)。FOS は、腸からの食事性ミネラル吸収を促進することにより骨量を増加させ²⁶⁾、卵巣摘出骨粗鬆症モデルでは骨形成を促進することが知られている²⁷⁾。

しかし本研究の宇宙飛行マウスの大腿骨では、 μ -g 曝露による骨量減少は確認できたが、それに対する FOS 摂取の効果は認められなかった。一方、下顎骨では、FOS 摂取・ μ -g 曝露共に骨量に影響しなかった(図 II-A/B-4-2)。これは、摂食に伴う咬合によるメカニカルストレスが、 μ -g 環境においても下顎骨の骨量維持に寄与していることを示唆するものである。

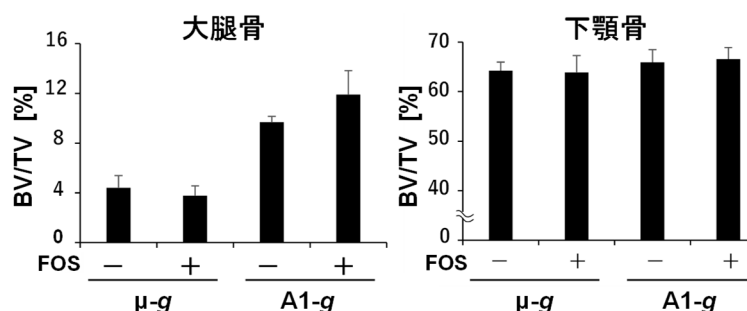


図 II-A/B-4-2 宇宙飛行マウスの骨量

μ CT (CosmoScan GX) にて取得した画像から TRI-3D-BON ソフトウェア(ラトックシステムエンジニアリング)を用いて大腿骨および下顎骨を 3 次元再構成し、骨量/組織量(BV/TV)を評価した。

iii) 大腿骨および下顎骨のプロテオーム解析結果

骨におけるメカニカルストレス応答性蛋白質を同定するために、大腿骨骨幹部と下顎骨の抽出物(B/C 混合物)について、DIA-MS によるプロテオーム解析を行った。大腿骨は ISS 内の μ -g と A1-g 環境下で飼育した宇宙飛行マウス各 6 匹から採取したが、各群 1 試料の骨蛋白質回収量が不十分であり、MS 解析対象からは除外し、各群 5 試料を用いて解析した。主成分分析により、大腿骨骨幹部で同定した 1,202 種類蛋白質は FOS 摂取よりも μ -g 曝露による影響を強く受けており、FOS 摂取の効果は限定的であることが改めて示唆された。さらに大腿骨骨幹部において量的変動を示す蛋白質を 40 種類検出し($p < 0.01$ 、 $|\text{Log}_2 [\mu\text{-g 群}/\text{A1-g 群}]| \geq 1.5$)、その中から下顎骨(各群 6 試料で解析)では量的変動を示さない蛋白質 ($|\text{Log}_2 [\mu\text{-g 群}$

/A1-g群] < 0.37851) 22 種類を絞り込んだ(図 II-A/B-4-3)。の中には骨の恒常性維持に係わるカルシウムイオン結合蛋白質や骨関連細胞の活性・分化に影響を与える細胞外マトリックス結合蛋白質などの非コラーゲン性蛋白質が多く含まれていた²⁸⁾。またこれまでに、カルシウムイオン結合能を有する細胞外マトリックス蛋白質が、骨芽細胞と破骨細胞分化に影響を与えることも報告されていたため²⁹⁻³¹⁾、本研究では、このような特徴をもつ Sparcl1 に注目した。なお特異的抗体を用いた解析でも、大腿骨骨幹部の Sparcl1 量は μ -g 曝露により増加することを確認した(図 II-A/B-4-4)。

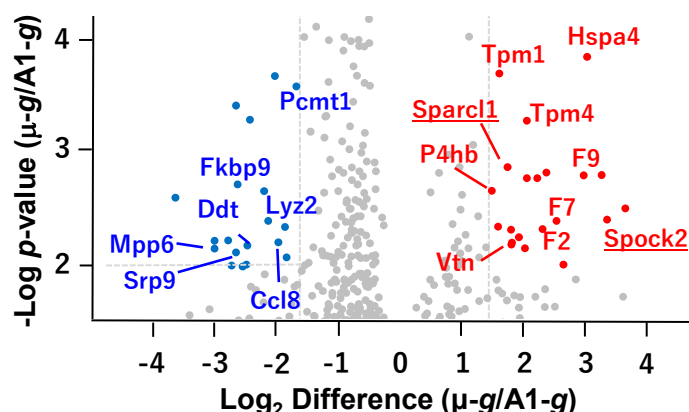


図 II-A/B-4-3 宇宙飛行マウス骨プロテオーム解析
遺伝子名は、A1-g に比べて μ -g 曝露により大腿骨骨幹部で増加(赤)または減少(青)した蛋白質の中で、下顎骨では量的変動を示さない蛋白質を表す。

iv) Sparcl1 の破骨細胞分化への影響

SPARC ファミリーに属する Sparcl1 は、分泌型細胞外マトリックス蛋白質で、C 末端カルシウム結合ドメインをもち、IV型コラーゲンと結合するが、骨代謝への直接的な関与は未だ解明されていない。また炎症性骨吸収を伴う変形性関節症患者の半月板では、Sparcl1 の遺伝子発現が顕著に増加することが報告されている³²⁾。本研究では、qPCR による遺伝子発現解析により、Sparcl1 は破骨細胞(RAW264.7)ではなく、骨細胞(MLO-Y4)で特に発現していることを示した。骨細胞は破骨細胞分化の主要調節因子として機能する RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) を産生し、時間的・空間的に骨吸収を活性化することが知られている³³⁾。そこで、RANKL (50 ng/mL) 処理したマウス骨髄細胞由来の破骨細胞前駆体に対する Sparcl1 の役割を明らかにするために、培養上清にマウス Sparcl1 (2 μ g/mL) を添加した。結果、Sparcl1 は RANKL 誘導性破骨細胞形成をより促進することが明らかになり(図 II-A/B-4-5)、 μ -g 曝露により増加した Sparcl1 が RANKL と協調して破骨細胞分化に寄与する可能性が示された。

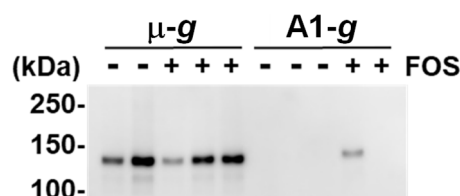


図 II-A/B-4-4 大腿骨骨幹部
Soarcl1 量
検出: 抗 Sparcl1 抗体

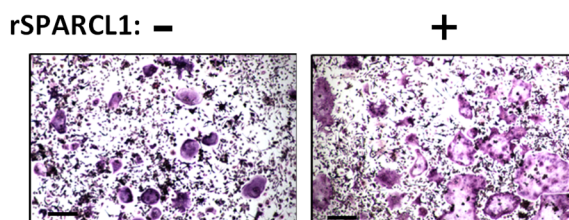


図 II-A/B-4-5 分化破骨細胞の TRAP 染色

II-A/B-4b 骨格筋プロテオーム解析

II-A/B-4b.1 背景と意義

生体の抗重力活動は、筋量やその特性を維持するために重要である。その応答は骨格筋毎に異なり、 μ -g 曝露などにより抗重力活動が慢性的に抑制されると、特に遅筋であるヒラメ筋などの抗重力筋には顕著な萎縮が誘導される。対照的に 3-g 環境で飼育したマウスでは、遅筋であるヒラメ筋には肥大が誘導されるが、速筋である腓腹筋などには肥大が誘導されにくい。このような筋線維タイプの違いは、生体の抗重力活動抑制に伴う酸化的リン酸化の低下や解糖系の亢進など、筋組織全体のエネルギー代謝様式の変化にも関係する(図 II-A/B-4-6)。しかし、非荷重に対する感受性が骨格筋毎に異なる分子メカニズムは、未だ明らかにされていない。

ない。また近年、骨格筋と骨とのクロストークが骨代謝に重要との知見もある。そこで本研究では、骨格筋のためのプロテオーム解析技術 (DDA-MS) を確立し、宇宙飛行マウスや地上モデルマウスを用いて非荷重に応じて量的変動を示すマウス骨格筋蛋白質を明らかにすると共に、その結果を統合的に評価することで、メカニカルストレス応答性蛋白質を特定できると考えた。さらに筋萎縮や骨量減少との関連性を評価することにより、本研究はメカニカルストレスに対する生体内の適応機構解明に寄与する非常に意義のある研究となる可能性が高い。

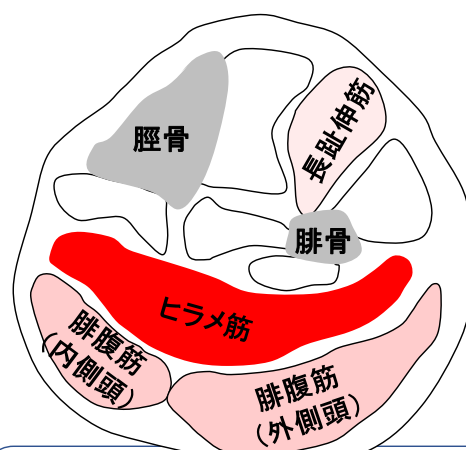
II-A/B-4b.2 実験結果および成果

i) 骨格筋プロテオーム解析技術の確立 (地上予備実験)

骨格筋はミオシン、アクチン、クレアチンキナーゼを多く含み、非常に大きい蛋白質間の濃度差が MS を用いたプロテオーム解析における網羅性低下の主要因となる。そこでまず、解析のスループットは維持しつつ蛋白質同定数を増やすための骨格筋蛋白質抽出法の検討を行った。その結果、プロテアーゼ阻害剤を含む 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 中で筋組織を破碎し溶出した蛋白質(可溶性画分)と、さらにその残渣から 8 M urea を含む溶液にて溶出した蛋白質(不溶性画分)を回収する、二段階抽出を行った場合に、827 種類の蛋白質を検出でき、一段階抽出に比べ 300 種類以上同定数を増やすことに成功した。さらに、この方法は電気泳動や液体クロマトグラフィーなどを用いる方法に比べて、より簡便にサンプルの複雑性を軽減でき、再現性も高かった。

ii) 体重と筋湿重量

マウスの骨格筋(ヒラメ筋、長趾伸筋、腓腹筋)(図 II-A/B-4-6)の湿重量は、 μ -g 曝露によって減少した(図 II-A/B-4-



遅筋(ヒラメ筋)

(ミトコンドリアに富んで酸素を利用したエネルギー代謝、持続的な収縮が特徴)

速筋(長趾伸筋、腓腹筋)

(ミトコンドリアは比較적으로少なく解糖系によるエネルギー代謝、瞬発的な収縮が特徴)

図 II-A/B-4-6 筋線維の種類

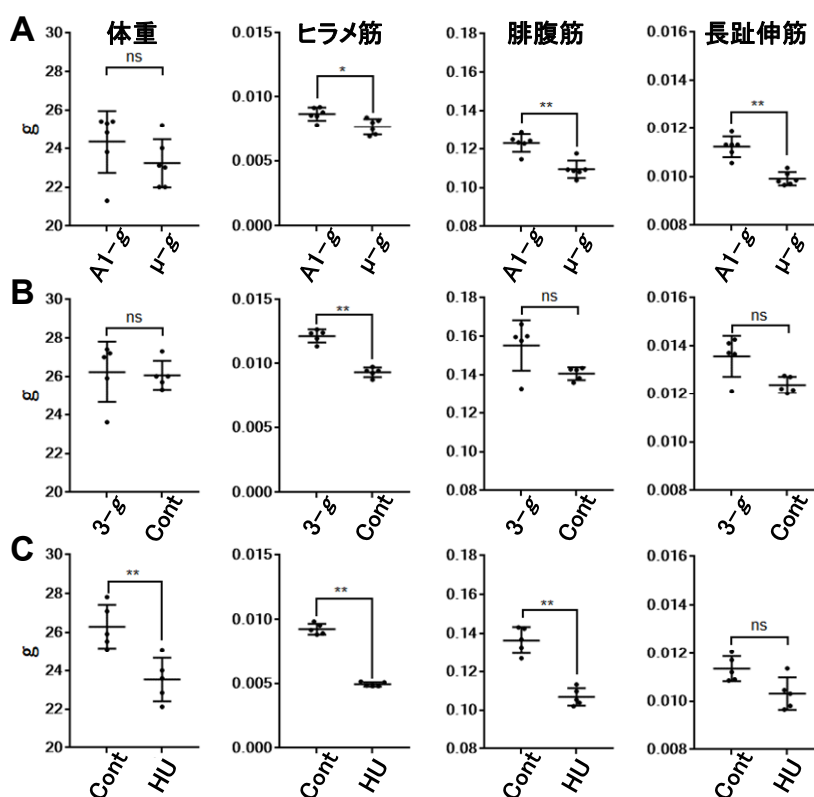


図 II-A/B-4-7 宇宙飛行マウス[A]と地上マウス(骨量減少モデル)[B, C]の体重と筋湿重量

A, 表 II-A-3-1 参照; B; II-B-3.1 過重力環境モデルの項参照、C; II-B-3.1 非荷重環境モデルの項参照。

7A)。抗重力筋であるヒラメ筋は、 μ - g 曝露に伴う筋活動量およびメカニカルストレス減少に対する感受性が高く、筋萎縮が誘導されやすいことが知られており、 μ - g 曝露に伴う湿重量の減少にもこの特性が大きく寄与していると考えられる。同じくふくらはぎ側の腓腹筋の湿重量も、非荷重に伴う筋活動量およびメカニカルストレスの減少の影響を受けたと考えられる。なおヒラメ筋と腓腹筋の湿重量は、地上モデルマウス(非荷重/荷重)においても、宇宙飛行マウスと同様の变化を示した(図 II-A/B-4-7B, C)。一方、長趾伸筋は非荷重に伴う筋萎縮が生じにくいとされているが、宇宙飛行マウスにおいて湿重量の減少が認められた。これについては筋活動量およびメカニカルストレスの減少よりも、マウスが ISS を出て解剖するまでの期間の摂餌量の減少など、他の要因が寄与した可能性が高いと考える。また本研究では、骨格筋の酸化的エネルギー代謝を亢進させ、 μ - g 曝露に伴う抗重力筋の速筋化に対する予防策となり得ると期待される FOS 含有餌の影響も検討したが、体重および各骨格筋湿重量に対する FOS 摂取の影響は認められなかった。

iii) 各種骨格筋のプロテオーム解析結果

<ヒラメ筋および長趾伸筋プロテオーム解析>

遅筋と速筋の特性の違いを理解するために、遠心による 3- g 環境と通常(1- g)環境(Cont)で飼育したマウスのヒラメ筋および長趾伸筋について、DDA-MS によるプロテオーム解析を行った。その結果、1,332 種類の蛋白質(可溶化画分 1,050、不溶化画分 720)を同定し、可溶化画分においては 359 種類(ヒラメ筋)および 113 種類(長趾伸筋)が、不溶化画分においては 251 種類(ヒラメ筋)および 105 種類(長趾伸筋)の蛋白質が 3- g 曝露により量的変動($p < 0.05$)を示した。またこれら蛋白質の変動から、3- g 曝露に応答し筋肉の成長に寄与する細胞骨格・インテグリンシグナル伝達経路が活性化し、細胞死に関するシグナル伝達経路が不活性化している可能性が示された。また長趾伸筋では、3- g 曝露により酸化的エネルギー代謝関連経路(fatty acid β -oxidation, glutaryl-CoA degradation, oxidative phosphorylation, PPAR α /RXR α activation, TCA cycle)が不活性化している可能性も示された。一方、ヒラメ筋では、3- g 曝露により蛋白質合成と骨格筋の成熟を促進することが知られているシグナル伝達経路(Cdc42 signalling, EIF2 signaling, PI3K)/AKT signaling, RhoA signaling, signaling by Rho family GTPases)と酸化的リン酸化が活性化し、解糖系が不活性化している可能性も示された。3- g 曝露されたマウスでは、ヒラメ筋の筋湿重量が顕著に増加しており、ヒラメ筋における蛋白質合成と骨格筋の成熟に関与する多くの経路の活性化は妥当であると考えられる。さらに、以上の結果からマウス全身の骨格筋組織では、筋組織毎に非荷重に伴い誘導される分子メカニズムが異なることが明らかになった。そのため、非荷重が生体に及ぼす影響を追究するためには、顕著な変化が生じる抗重力筋だけでなく、他の骨格筋組織の詳細な分析も必要と考えた。

同様に、DDA-MS により、宇宙飛行マウスのヒラメ筋および長趾伸筋のプロテオーム解析を行い、ヒラメ筋および長趾伸筋から合計 1,253 種類の蛋白質を同定し、 μ - g 曝露の影響を受ける蛋白質を抽出した($p < 0.01$)。その結果、長趾伸筋では μ - g 曝露により酸化的リン酸化によるエネルギー代謝が活性化し、解糖系によるエネルギー代謝が不活性化している可能性が示され、ヒラメ筋では μ - g 曝露により筋線維タイプの遅筋型から速筋型へのシフトに関連するエネルギー代謝の変化が示唆された。したがって、今後の有人宇宙開発では、抗重力筋の萎縮に加えて、筋組織の特性変化に対しても予防策を検討する必要があることが示唆された。またヒラメ筋および長趾伸筋のプロテオーム解析の結果からも、 μ - g 曝露の影響に比べて FOS 摂取の影響が限定的である可能性が示された。

<腓腹筋プロテオーム解析>

腓腹筋における非荷重に伴う筋活動量減少の影響を明らかにするために、宇宙飛行マウス

の腓腹筋のプロテオーム解析を実施した。その結果、 μ -g曝露により萎縮した腓腹筋では線溶系関連因子が増加していることが明らかになった。これは線溶系関連因子が非荷重に伴う筋萎縮や機能的特性変化(速筋化など)に関係することを示唆している。そこで、線溶において中心的な役割を担う蛋白質である Plasminogen の遺伝子欠損マウスと野生型マウスを後肢懸垂(HU)の状態に21日間飼育した場合の各骨格筋湿重量を比較した。その結果、野生型に比べて Plasminogen 遺伝子欠損マウスでは、HUにより後肢筋がより萎縮することが明らかになり(図 II-A/B-4-8)、非荷重環境では線溶系関連因子は一部速筋の筋萎縮に対して保護作用を有する可能性がある。

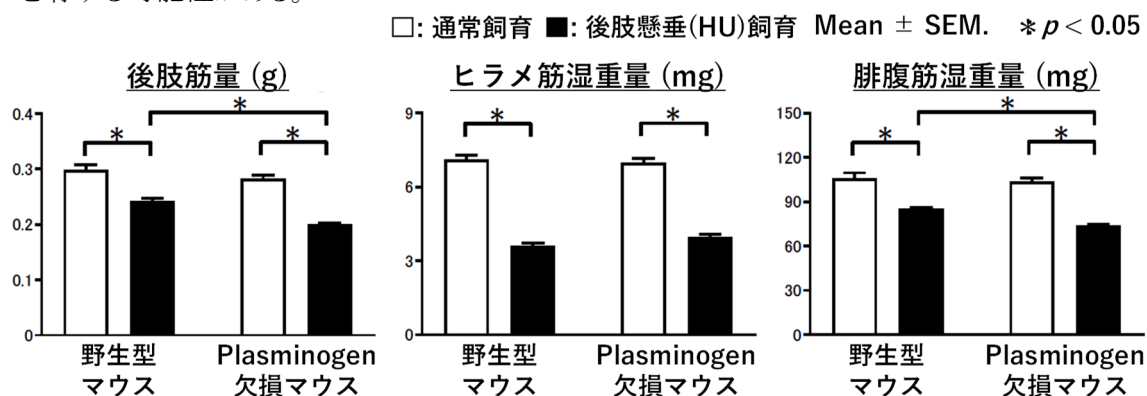


図 II-A/B-4-8 非荷重環境における Plasminogen 遺伝子欠損マウスの筋湿重量変化

<宇宙飛行マウス/地上モデルマウスのヒラメ筋プロテオーム解析結果の統合的評価>

メカニカルストレス応答性ヒラメ筋蛋白質を明らかにするために、宇宙飛行マウスと、非荷重(HU)/過重力(3-g)モデルマウスの各ヒラメ筋プロテオーム解析結果を統合的に評価し、非荷重または過重力に応じて共通した量的変動を示す蛋白質を探索した。その結果、ヒラメ筋が遅筋から速筋へと筋線維タイプを変化させていることを示唆する5種類の蛋白質を見出すことに成功した。その中の4種類の蛋白質については、特異的抗体を用いた解析でも、3-g曝露によりマウスヒラメ筋においてDDA-MS解析と同様の変動を示すことを確認した(図 II-A/B-4-9A)。その中でも、カルシウムイオン結合能を有する分泌蛋白質 Parvalbumin (Pvalb)は、HUマウス血清中においても非荷重に応じて骨格筋と同様の量的変動を示した(図 II-A/B-4-9B)。なお本研究に供したHUマウスは、非荷重環境下での大腿骨の骨量減少を示しており、血清Pvalb量と骨量減少が関連している可能性が考えられた。そこで、骨量減少などを特徴とし、骨折高リスクを有する疾患である骨粗鬆症患者群(OP群;平均68.9歳、腰椎T-score ≤ -2.5)46名と対照群(Control群;横浜市立大学に勤務する50~63歳)30名の血清を用いて、Human Pvalb ELISA Kitにより血清Pvalb濃度を測定した。その結果、OP群とControl群の血清Pvalb濃度には有意差が認められた(図 II-A/B-4-10)。またROC曲線解析から、血清PvalbはOP群を診断するための客観的な血清指標として有用であることが示唆された(AUC = 0.7145 [95% CI, 0.5925-0.8365])。また、極端に濃度が高い5検体(1 > ng/mL)を除いた解析においても、OP

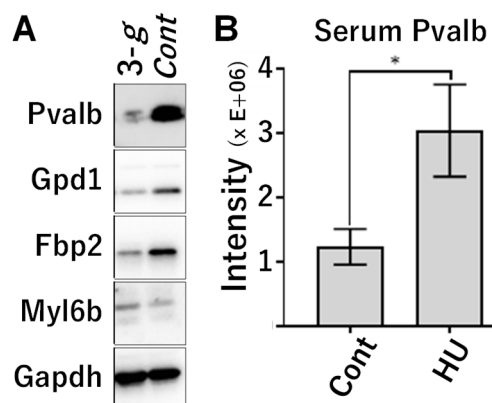


図 II-A/B-4-9 ヒラメ筋蛋白質の発現変動

A: 特異的抗体を用いた検証。3-gマウスヒラメ筋蛋白質使用。B: 抗Pvalb抗体を用いた検証。HUマウス血清使用。Cont; 通常飼育マウス。

したHUマウスは、非荷重環境下での大腿骨の骨量減少を示しており、血清Pvalb量と骨量減少が関連している可能性が考えられた。そこで、骨量減少などを特徴とし、骨折高リスクを有する疾患である骨粗鬆症患者群(OP群;平均68.9歳、腰椎T-score ≤ -2.5)46名と対照群(Control群;横浜市立大学に勤務する50~63歳)30名の血清を用いて、Human Pvalb ELISA Kitにより血清Pvalb濃度を測定した。その結果、OP群とControl群の血清Pvalb濃度には有意差が認められた(図 II-A/B-4-10)。またROC曲線解析から、血清PvalbはOP群を診断するための客観的な血清指標として有用であることが示唆された(AUC = 0.7145 [95% CI, 0.5925-0.8365])。また、極端に濃度が高い5検体(1 > ng/mL)を除いた解析においても、OP

群と Control 群の血清 Pvalb 濃度には有意差 ($p = 0.0021$) があり、AUC は 0.7126 [0.5871-0.8382] であった。したがって、血清 Pvalb は、骨折高リスク診断のための客観的指標であり、骨粗鬆症の臨床診断を補完する可能性がある。なお、この結果を基に特許を出願し(特願 2023-003073, 2023.1.12.)、臨床応用の早期実現を達成する目的で、臨床的有用性を検証するための新たな臨床研究にも着手した。今後は血清 Pvalb 量と骨量との関係だけでなく、骨格筋量を含めたさらなる検証を行う予定である。

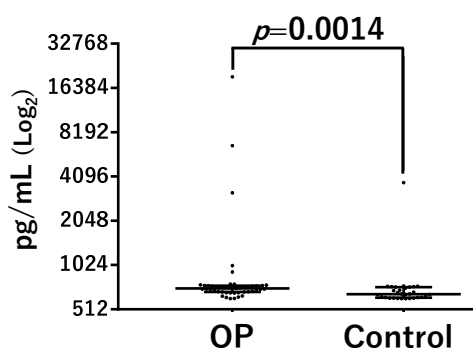


図 II-A/B-4-10 骨粗鬆症患者(OP) 血清 Pvalb 濃度

OP: 709.8 [672.7-739.3] pg/mL*

Control: 649.0 [616.0-722.3] pg/mL*

* 中央値 [IQR]

**Mann-Whitney U -test

II-A/B-4c 血清プロテオーム解析

II-A/B-4c.1 背景と意義

ISS 滞在中の μ - g 曝露や HU のような非荷重環境は、様々な生理的・身体的変化を引き起こすが、メカニカルストレスに対する適応機構に関与する血清蛋白質は、未だ十分に解明されていない。マウスは宇宙飛行士と違い遺伝的背景は全て同じである。また、MHU-2 では軌道上 ISS 内で重力(μ - g と A1- g)以外の環境要因を極力同じにした状態で同時個別飼育が可能である。また、このような状態で飼育された宇宙飛行マウスの網羅的な血清プロテオーム解析については未だ報告がない。そこで本研究では、DIA-MS による網羅的なマウス血清プロテオーム解析技術を確立して、「きぼう」を利用して飼育された宇宙飛行マウスの血清プロテオーム解析を行うことで、 μ - g 曝露により生じる様々な生体内変化に関連して量的変動を示す血清蛋白質を容易に検出できると考えた。またその結果を地上非荷重環境で飼育された HU マウスのプロテオーム解析結果と比較することで、非荷重などのメカニカルストレスに応答する蛋白質を絞り込み、生体内適応に係わる分子メカニズムを理解するための知見が得られる可能性が高い。

II-A/B-4c.2 実験結果および成果

i) マウス血清プロテオーム解析技術の確立(地上予備実験)

ヒト血清と同様の方法でマウス血清中に存在する 1,106 種類の蛋白質情報を含む独自のマウス血清ライブラリを構築し、高濃度から低濃度のマウス血清蛋白質を迅速に定量解析できる DIA-MS によるプロテオーム解析技術を確立した。

ii) 宇宙飛行マウス血清プロテオーム解析結果

宇宙飛行に伴う μ - g 曝露に応答して量的変動を示す血清蛋白質に関する情報を収集するために、DIA-MS による宇宙飛行マウス血清プロテオーム解析を行った。その結果、568 種類の蛋白質を同定し、その中の 515 個の蛋白質について比較定量解析を実施した。なお骨および骨格筋同様、血清プロテオームにおいても FOS 摂取の影響は認められなかった(図 II-A/B-4-11)。そのため、FOS 摂取の有無にかかわらず、 μ - g 群と A1- g 群間で定量解析を行った結果、 μ - g 曝露により有意に変動する血清蛋白質として、増加 14 種類、減少 35 種類を検出した ($p < 0.05$, $|\text{Log}_2 [\mu\text{-}g/\text{A1-}g]| \geq 0.58496$) (図 II-A/B-4-12)。 μ - g 曝露に応答して減少した蛋白質の中には 3 種類のメカニカルストレ

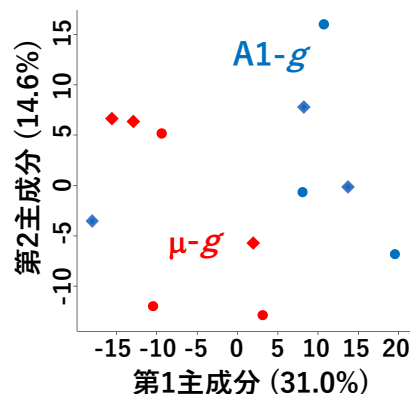


図 II-A/B-4-11 宇宙飛行マウス血清プロテオーム解析データを用いた主成分分析

●FOS 含有餌、◆通常餌使用

ス応答性蛋白質 (Mmp2、Postn、Tnc)が含まれていた。血液は全身を循環し、様々な組織・細胞から分泌または放出された蛋白質を多く含む。宇宙飛行マウスの血清は宇宙飛行後に地上で採取しているため、 μ -g 曝露だけでなく大気圏再突入や地球着陸に伴う重力リロードなどの影響も受けて変動している可能性は否定できない。そこで、地上非荷重環境モデルである HU マウスについても同様に DIA-MS による血清プロテオーム解析を行い、宇宙飛行マウス血清の結果との比較を行った。その結果、宇宙飛行マウスで量的変動が認められた 3 種類のメカニカルストレス応

答性蛋白質は、通常飼育(Cont)マウスと比べて HU マウスでは有意な量的変動を示さなかった。HU マウスにおいても、非荷重により後肢の骨量減少と筋萎縮が誘導されるが、体液シフトや前肢への荷重など³⁴⁾は、全身で非荷重の影響を受ける宇宙飛行マウスとは異なるため、このような差が血清蛋白質の量的変動に影響した可能性がある。一方で、2 つの実験で非荷重により共通して減少する血清蛋白質として、Cdh5 と Pmel を検出した。

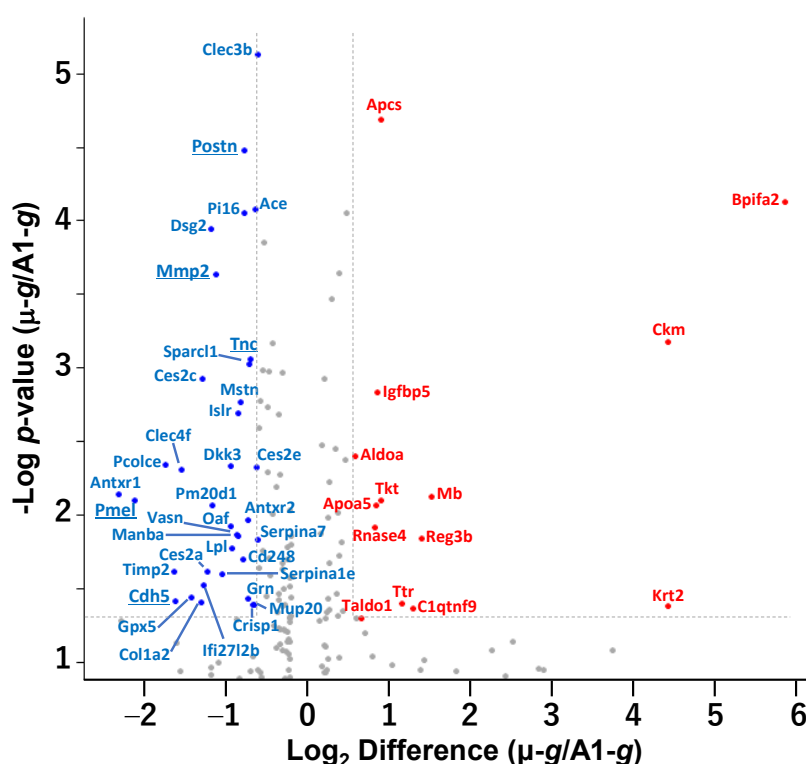


図 II-A/B-4-12 宇宙飛行マウス血清プロテオーム解析
A1-g 群と比べて μ -g 群で血清中量が増加(赤)または減少(青)した蛋白質を示す ($p < 0.01$, $|\text{Difference } [\mu\text{-g}/\text{A1-g}]| \geq 1.5$)。

iii) 宇宙飛行士血清を用いた非荷重に対する応答の検証

次に、宇宙飛行マウス血清において、非荷重による影響を受け量的変動を示した 5 種類の血清蛋白質 (MMP2、POSTN、TNC、CDH5、PMEL) が、宇宙飛行士血清中で宇宙飛行ミッションに伴いどのような量的変動を示すかを調べた (図 I-A-4-4、図 II-A/B-4-13)。骨の性質を変化させ、骨代謝の調節に重要な役割を果たすことが報告されている POSTN^{35, 36)} は、I-A-4.2.4- iii の項においても示したように、

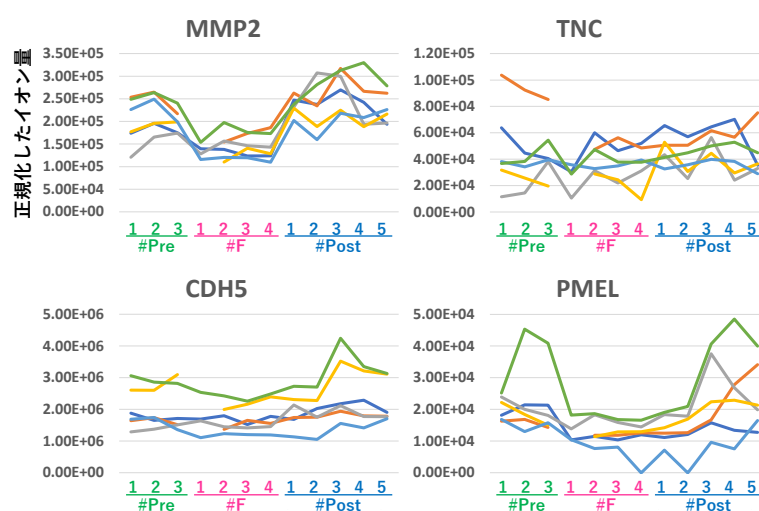


図 II-A/B-4-13 蛋白質変動プロファイル

左: 正規化されたイオン量の中央値 $\pm$ SD、右: 宇宙飛行士毎の正規化されたイオン量。採血ポイントは図 I-A-4-2 を参照。

宇宙飛行士血清においても ISS 滞在直後(#F1)に有意に減少し、その後は増加傾向を示したが(図 I-A-4-4)、ISS 滞在 1 ヶ月後(#F2)では宇宙飛行前(#Pre)の状態まで回復しなかった。飼育期間が 1 ヶ月程度の宇宙飛行マウスでも、この μ -g 曝露に伴う減少から回復していない状態を反映している可能性が考えられた。また、主に骨組織の骨芽細胞で発現し、その欠乏は BMD の低下や骨の脆弱性と関係がある MMP2^{37, 38)}や、現時点で μ -g 曝露との関係が不明な PMEL、ヒト血管内皮細胞を模擬 μ -g 曝露した場合に発現量が減少する CDH5^{39, 40)}は、宇宙飛行前(#Pre)を基準とした場合に、ISS 滞在中(#F)に減少傾向を示しており、 μ -g 曝露により宇宙飛行マウスと同様の量的変動を示すことがわかった。一方、発現阻害が骨形成と骨ミネラル化を著しく抑制する TNC^{41, 42)}は、概ね ISS 滞在中(#F)から宇宙飛行後(#Post)にかけて徐々に増加しており、宇宙飛行マウスとは異なる反応を示した。これら血清蛋白質の μ -g 曝露に伴う量的変動については、今後詳細を検討することで、宇宙飛行ミッションに伴う生体内のメカニカルストレス応答機構や骨量減少との関連性が解明されることを期待する。

I/II-A/B-4.3. 研究成果のまとめ

サクセスクライテリア達成状況を研究項目ごとに以下の表 II-A/B-4-1 にまとめた。

	項目	対象	サクセスクライテリア			該当ページ	成果リスト
			ミニマム	フル	エクストラ		
ヒト 対象研究	宇宙実験 (宇宙飛行士)	①血清	◎	-	-	9-14	(8)
	地上実験 (臨床患者)	②血清	◎	◎	◎	15-16	(4)、(10)
マウス 対象研究	宇宙実験	③ヒラメ筋(Sol)/ 長趾伸筋(EDL)	◎	-	-	20-22	(2)
		④両腓腹筋(Gast)	◎	-	◎	22-23	(6)、(9)
		⑤大腿骨/ 下顎骨(左右顎)	◎	◎	◎	18-20	(5)
	宇宙実験/ 地上実験	⑥血清 (HUモデルと比較)	◎	-	-	24-25	(7)
		⑥ヒラメ筋(Sol) (HU/過重力との比較)	◎	◎	◎	23-24	(3)、(10)
	地上実験	⑦ヒラメ筋(Sol)/ 長趾伸筋(EDL)	◎	-	-	-	(1)

表 II-A/B-4-1 研究項目ごとのサクセスクライテリアの事項評価

各項目について記載した本報告書内の該当ページ数および成果リスト中の番号を示す。

骨や骨格筋などの運動器は、メカニカルストレスに応答して骨量減少などの大きな変化を生じる。しかし、そのようなメカニカルストレス応答機構に関する詳細な分子メカニズムは、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、「宇宙実験」と「地上実験」を組み合わせ、メカニカルストレスに応答性の骨量減少関連蛋白質を特定し、ISS 滞在との関係や骨代謝を含む運動器機能との関連性を明らかにすることを目指した。当初の計画では、宇宙飛行士や骨粗鬆症患者などのヒト血清を対象としたプロテオーム解析結果と、MHU-2 や地上モデル実験にて取得したマウス骨・骨格筋・血清を対象としたプロテオーム解析結果を、統合的に評価し、骨量減少に係わる蛋白質を特定する予定であった。しかし研究を進めた結果、各組織で検出できる蛋白質は共通性に乏しく、また同じ血清を対象とした研究であっても宇宙飛行士と患者等を対象とした研究では、特徴的な量的変動を示す蛋白質が異なっていた。そこで研究グループでは、研究対象ごとに結果をまとめた上で、「宇宙実験」と「地上実験」、さらにヒトとマウスを対象とし

た研究を比較し、統合的に評価することで、最終的にメカニカルストレス応答性蛋白質の臨床応用の可能性を検討した。

I) ヒト対象研究(宇宙飛行士および臨床患者)

ISS 滞在が血清プロテオームに及ぼす影響を経時的に観察し、生体内組織・細胞の適応機構に関する新たな知見を得ることを目的として、「宇宙実験」では、宇宙飛行前後および ISS 滞在中の合計 12 ポイントで 6 名の宇宙飛行士から採取した血清試料について、定量プロテオーム解析を実施した。その結果、ISS 滞在によって誘発された血清蛋白質の量的変動が、宇宙飛行士の生体内の状態を把握するための客観的な指標としても役立つ可能性を示した【**成果リスト(8), review 中**】。さらに「地上実験」では、骨量減少などの客観的指標となる蛋白質の特定を目的として、骨折高リスクを有する疾患である骨量減少症や骨粗鬆症患者等の血清プロテオーム解析を行った。その結果、患者に共通して特徴的な量的変動を示すカルシウムイオン結合能を有する非コラーゲン性細胞外マトリックス蛋白質 ECM1 を特定し、血清 ECM1 が骨折高リスク診断に有用であることを示唆した【**成果リスト(4), review 中**】。また、本研究成果を知財化し【**成果リスト(10)**】、企業(社名非公表)と共同で診断キット開発に取り組み、臨床的有用性を検証するための新たな臨床研究に着手した。さらに、この「地上実験」の結果を「宇宙実験」に反映させた結果、宇宙飛行士血清中の ECM1 はメカニカルストレス応答性を示し、宇宙ミッションに参加する飛行士の生体内の状態を把握するための客観的指標となる可能性を示した。

II) マウス対象研究(宇宙飛行マウスおよび地上マウス)

骨量減少に係わる生体内組織・細胞におけるメカニカルストレス応答性蛋白質を特定することを目的として、宇宙飛行マウスおよび非荷重/過重力モデルマウスから採取した骨、骨格筋、血清についてのプロテオーム解析を実施した。「宇宙実験」では、MHU-2 で飼育した宇宙飛行マウスから採取した試料を用いて、 μ -g 曝露に応答し骨量減少を示した大腿骨で特徴的な量的変動を示すが、骨量が変化しなかった下顎骨ではほとんど量的変動を示さない骨蛋白質 22 種類を特定した。その中で、 μ -g 曝露に応答して大腿骨中の蛋白質量が増加するカルシウムイオン結合能を有する細胞外マトリックス蛋白質(Sparcl1)が、RANKL が誘導する破骨細胞分化の新規モジュレーターとなることを明らかにした【**成果リスト(5)**】。また、マウス全身の骨格筋は組織毎に非荷重に伴い誘導される分子メカニズムが異なることを明らかにする【**成果リスト(2)**】と共に、非荷重環境では線溶系関連因子(Plasminogen)が一部速筋の筋萎縮に対して保護作用を有する可能性を示した【**成果リスト(6), review 中; 成果リスト(9)**】。さらに「宇宙実験」と「地上実験」の統合解析では、非荷重または過重力により共通した量的変動を示す 5 種類のメカニカルストレス応答性ヒラメ筋蛋白質を検出し、中でもカルシウムイオン結合能を有する分泌蛋白質(Pvalb)は HU マウスおよび骨粗鬆症患者血清中でも高値を示し、骨量減少を評価する客観的指標になり得ることを示唆した【**成果リスト(3)**】。また、本研究成果を知財化し【**成果リスト(10)**】、臨床的有用性を検証するための新たな臨床研究に着手した。さらに、宇宙飛行マウスと HU マウスの血清プロテオーム解析結果を統合的に評価し、メカニカルストレス応答性血清蛋白質を検出した【**成果リスト(7), review 中**】。またこの結果を、ヒトを研究対象とした「宇宙実験」に反映し、これら血清蛋白質は ISS 滞在中の宇宙飛行士血清においても生体内の状態を把握するための客観的指標となる可能性を示した。

I/II-A/B-4.4 サクセスクライテリアに関する自己評価

研究計画時におけるサクセスクライテリアの内容および自己評価を以下の表にまとめる。

サクセスレベル	サクセスクライテリア	補足(設定根拠等)	自己評価(◎、○、△)
ミニ	以下をすべて達成すること。 1) 宇宙飛行士、マウスの骨量減少に係わる蛋白質の検出・同定 2) 地上の骨粗鬆症と同蛋白質との関係の解明	【判断時期】 マウス実験、およびヒト実験の全検体入手の、各々3ヶ月後に速報、6ヶ月後に第2速報、1年後に中間報告、2年後に目標達成が可能。 【設定根拠】 目標達成に必要な分析技術があるため。	1) ◎:達成 ⇒プロテオーム解析により、宇宙飛行士および宇宙飛行マウスの各試料中で量的変動を示す骨量減少関連蛋白質を検出・同定した。 2) ◎:達成 ⇒地上骨粗鬆症患者(血清)プロテオーム解析結果と、1)の(血清・骨・筋)プロテオーム解析結果をそれぞれ比較検討し、異同等を検討した。結果、共通するものと共通しないものを明らかにし、共通して同定されたタンパク質については個別に関連性を示した。
フル	ミニマムサクセスに加えて、以下をすべて達成すること。 3) 骨量減少、骨粗鬆症関連蛋白質の臨床検証	【判断時期】 マウス実験、およびヒト実験の全検体入手の、各々3ヶ月後に速報、6ヶ月後に第2速報、1年後に中間報告、2年後に目標が達成が可能。 【設定根拠】 多数の臨床検体を用いて検出された蛋白質と骨量減少や骨粗鬆症との関係を精査する必要があるため。	ミニマムサクセスの1)、2)の結果を受けて、 3) ◎:達成 ⇒プロテオーム解析により同定した蛋白質について、骨粗鬆症患者等の検体(血清)を用いた試験により、骨量減少・骨粗鬆症診断のための客観的指標としての臨床的有用性を明らかにした。
エクストラ	作業仮説を超える、以下のいずれかを達成すること。 4) 骨量減少、骨粗鬆症関連蛋白質の機能解明 5) 骨量減少、骨粗鬆症の診断薬及び治療法の開発	【判断時期】 令和6年頃 【設定根拠】 治験、臨床性能試験などに、短くとも7-8年の期間が必要であるため。	4) ◎:達成 ⇒骨量減少大腿骨骨幹部において増加するメカニカルストレス応答蛋白質がRANKL誘導破骨細胞分化を促進し、骨量減少メカニズムに関与する可能性を示す結果を得た。 5) ◎:達成 (開発に着手したことにより達成できたと判断・解釈する) ⇒本研究成果の一部を知財化し(特許出願1件)、企業*と共同で診断キット開発に取り組み、臨床的有用性を検証するための新たな臨床研究にも着手するなど、骨量減少・骨粗鬆症のための診断薬開発の足掛かりができた。*社名非公表

5. 結言

本きぼう利用テーマ、「「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究(Medical Proteomics)」により、以下の成果が得られた。

- (1) ヒト血清およびマウス骨、骨格筋、血清のためのプロテオーム解析技術を確立した。
- (2) 宇宙飛行士血清プロテオーム解析により、宇宙飛行ミッションに伴う血清蛋白質の量的変動を明らかにした。
- (3) 骨量減少・骨粗鬆症患者血清で高値を示すカルシウムイオン結合能を有する細胞外マトリックス蛋白質 ECM1 が、骨折高リスク診断に有用であることを示唆すると共に、宇宙飛行士の生体内の状態を把握するための客観的指標となる可能性を示した。
- (4) マウス骨、骨格筋、血清中のメカニカルストレス応答性蛋白質を検出した。
- (5) 非荷重環境に応答して骨量減少を示したマウス大腿骨でのみ蛋白質量が増加する分泌型細胞外マトリックス蛋白質 Sparcl1 が、RANKL 誘導性破骨細胞分化に関与する新規モジュレーターとなることを明らかにした。
- (6) マウス全身の骨格筋は、筋組織毎に非荷重誘導分子メカニズムが異なることを示した。
- (7) メカニカルストレス応答性分泌蛋白質 Pvalb が骨折高リスクを評価する客観的指標になり得ることを示唆した。
- (8) 非荷重環境に応答して量的変動を示すマウス血清蛋白質が、宇宙飛行士血清中でも非荷重環境に応答して変動することを明らかにした。
- (9) 上記の結果から、計 4 報の英語論文を公表し、計 4 報の英語論文が review 中である(2023 年 10 月 10 日時点)。また特許 1 件を出願し、企業(社名非公開)と共同で診断薬開発を進めると共に、マーカーとして臨床的有用性を評価するための新たな臨床研究に着手した。

【参考文献】

- [1] P. Jirak, et al., *Eur J Prev Cardiol*, 29, 1399, 2022.
- [2] Q. Liu, et al., *Mil Med Res*, 3, 15, 2016.
- [3] K. Poole, *Annu Rev Physiol*, 84, 307, 2022.
- [4] E. Afshinnnekoo, et al., *Cell*, 183, 1162, 2020.
- [5] I.M. Larina, et al., *Sci Rep-Uk*, 7, 2017.
- [6] Y. Kimura, et al., *Sci Rep*, 11, 20638, 2021.
- [7] M. Infanger, et al., *J Cell Biochem*, 101, 1439, 2007.
- [8] S.S. Krieger, et al., *Front Immunol*, 12, 725748, 2021.
- [9] K. Kostov, *Life (Basel)*, 11, 2021.
- [10] E.L. Schiffrin, *Am J Hypertens*, 14, 83S, 2001.
- [11] R.M. Baevsky, et al., *J Appl Physiol* (1985), 103, 156, 2007.
- [12] P. Norsk, et al., *J Physiol*, 593, 573, 2015.
- [13] A. Sin, et al., *Osteoarthritis Cartilage*, 23, 516, 2015.
- [14] Y. Kitano, et al., *J Bone Miner Res*, 13, 237, 1998.
- [15] Y. Kurihara, et al., *Nature*, 368, 703, 1994.
- [16] M.W. Hamrick, *Bonekey Rep*, 1, 60, 2012.
- [17] Y. Ogata, et al., *J Immunol*, 162, 2754, 1999.
- [18] H. Takeda, et al., *Inflammation*, 37, 657, 2014.
- [19] Z. Zhou, et al., *Immun Ageing*, 17, 19, 2020.
- [20] F. Paoletta, et al., *J Biomed Mater Res A*, 107, 2774, 2019.
- [21] L. Gabel, et al., *Sci Rep*, 12, 9446, 2022.
- [22] J. Sibonga, et al., *Bone*, 128, 112037, 2019.
- [23] G. Lambrecht, et al., *Musculoskelet Sci Pract*, 27 Suppl 1, S15, 2017.
- [24] N.D. Nguyen, et al., *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 955, 2007.
- [25] M.M. Deckers, et al., *Bone*, 28, 14, 2001.
- [26] S. Takahara, et al., *J Nutr*, 130, 1792, 2000.
- [27] K. Porwal, et al., *Biomed Pharmacother*, 129, 110448, 2020.
- [28] M.S. Carvalho, et al., *Polymers (Basel)*, 13, 2021.
- [29] M. Wang, et al., *Biochem Pharmacol*, 166, 23, 2019.
- [30] K. Terai, et al., *J Bone Miner Res*, 14, 839, 1999.
- [31] A. Ueno, et al., *J Cell Physiol*, 209, 322, 2006.
- [32] R.H. Brophy, et al., *Osteoarthritis Cartilage*, 26, 422, 2018.
- [33] P. Cabahug-Zuckerman, et al., *J Bone Miner Res*, 31, 1356, 2016.
- [34] R.K. Globus, et al., *J Appl Physiol* (1985), 120, 1196, 2016.
- [35] B. Merle, et al., *Osteoporos Int*, 23, 1199, 2012.
- [36] N. Bonnet, et al., *PLoS One*, 8, e78347, 2013.
- [37] K. Inoue, et al., *J Biol Chem*, 281, 33814, 2006.
- [38] J.S. Nyman, et al., *J Bone Miner Res*, 26, 1252, 2011.
- [39] N.R. Harris, et al., *Circ Res*, 130, 5, 2022.
- [40] A.K. Barry, et al., *J Cell Sci*, 128, 1341, 2015.
- [41] C. Li, et al., *Drug Discov Ther*, 10, 82, 2016.
- [42] Z. Li, et al., *Ann Rheum Dis*, 80, 891, 2021.

以上

【成果リスト】

本きぼう利用テーマ、「「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究 (Medical Proteomics)」により、以下の成果が得られた。

1. 論文

- (1) Ohira T, Ino Y, Nakai Y, Morita H, Kimura A, Kurata Y, Kagawa H, Kimura M, Egashira K, Moriya S, Hiramatsu K, Kawakita M, Kimura Y, Hirano H: Proteomic analysis revealed different responses to hypergravity of soleus and extensor digitorum longus muscles in mice. *J. Proteomics* 217:103686, 2020.
- (2) Ohira T, Ino Y, Kimura Y, Nakai Y, Kimura A, Kurata Y, Kagawa H, Kimura M, Egashira K, Matsuda C, Ohira Y, Furukawa S, Hirano H: Effects of microgravity exposure and fructo-oligosaccharide ingestion on the proteome of soleus and extensor digitorum longus muscles in developing mice. *NPJ Microgravity* 7:34, 2021.
- (3) Ino Y, Ohira T, Kumagai K, Nakai Y, Akiyama T, Moriyama K, Takeda Y, Saito T, Ryo A, Inaba Y, Hirano H, Kimura Y: Identification of mouse soleus muscle proteins altered in response to changes in gravity loading. *Sci Rep.* 13:15768, 2023.
- (4) Nakai Y, Kumagai K, Ino Y, Akiyama T, Moriyama K, Takeda Y, Egashira K, Ohira T, Ryo A, Saito T, Inaba Y, Hirano H, Kimura Y: Use of data-independent acquisition mass spectrometry to identify an objective serum indicator of the need for osteoporotic therapeutic intervention. *Under review.*
- (5) Egashira K, Ino Y, Nakai Y, Ohira T, Akiyama T, Moriyama K, Yamaoka Y, Kimura M, Ryo A, Saito T, Inaba Y, Hirano H, Kumagai K, Kimura Y: Identification of gravity-responsive proteins in the femur of spaceflight mice using a quantitative proteomic approach. *J. Proteomics* 288, 104976, 2023.
- (6) Ohira T, Ino Y, Kawao N, Mizukami Y, Okada K, Matsuo O, Hirano H, Kimura Y, Kaji H: Plasminogen deficiency exacerbates skeletal muscle loss during mechanical unloading in mice. *Under review.*
- (7) Kimura Y, Nakai Y, Ino Y, Akiyama T, Moriyama K, Ohira T, Saito T, Inaba Y, Kumagai K, Ryo A, Hirano H: Identification of gravity-responsive proteins in mouse serum using a quantitative proteomic approach with data-independent acquisition mass spectrometry. *Under review.*
- (8) Kimura Y, Nakai Y, Ino Y, Akiyama T, Moriyama K, Aiba T, Ohira T, Egashira K, Yamamoto Y, Takeda Y, Inaba Y, Ryo A, Saito T, Kumagai K, Hirano H: Changes in the astronaut serum proteome during prolonged spaceflight. *Under review.*

2. 学会発表

- (9) 大平宇志、井野洋子、河尾直之、水上優哉、岡田清孝、松尾理、平野久、木村弥生、梶博史. 非荷重による筋萎縮における線溶系因子 Plasminogen(Plg)の役割. 第 41 回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2023 年 7 月 27-29 日.

3. 知財

- (10) 【発明の名称】骨強度の低下を伴う疾患検査用バイオマーカー
【発明者】堀内弥生、齋藤 洋子、中居佑介、梁明秀、熊谷研、平野久
【出願日】2023 年 1 月 12 日
【出願番号】特願 2023-003073

「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究
(Medical Proteomics)

代表研究者 木村 弥生（横浜市立大学）

総合評価

A: 目標を十分に達成した(フルサクセス相当)

本研究は、タンパク質の発現を網羅的に解析するプロテオーム法を用いて、宇宙環境に起因する血液、骨、骨格筋の発現変動タンパク質を明らかにするとともに、宇宙環境に起因する骨量減少と地上における骨粗鬆症との関連性を明らかにすることを目標として、マウスおよびヒトを対象とした実験を計画したものである。その結果、宇宙滞在したマウスおよびヒトの試料から骨量減少関連タンパク質を検出・同定し、宇宙と地上での骨量減少の解析結果の異同を検討し、関連性を示した。しかし、その中には既に骨代謝に関連するものが含まれているので、その他のタンパク質の解析も期待する。

また、骨量減少・骨粗鬆症診断のための客観的指標としての臨床的有用性や骨量減少メカニズムに関連するタンパク質等を明らかにした。さらに、本成果の一部を知財化(特許出願)し、企業と共同研究に取り組むなど、大変多くの成果を上げた。

一方で、SPARC1の機能解明を含めた分子メカニズム解析などへの取組みや、解析成果のデータベースへの登録などについて今後に期待したい。

2023年12月26日

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学)

ISS-きぼう利用テーマ
「「きぼう」を利用した骨粗鬆症に係わる蛋白質の臨床プロテオーム研究
(Medical Proteomics)」
(マウス実験/ヒト実験)研究成果概要書

代表研究者： 木村 弥生（横浜市立大学）

令和 5 (2023)年 10 月

機械的刺激(メカニカルストレス)の影響を強く受ける骨や骨格筋などの運動器は、体内外の環境変化を認識し応答して骨量減少や筋萎縮などを生じる。地上においても加齢や不活動などの要因により、骨量減少と骨組織の微細構造異常などを特徴とする骨粗鬆症を発症することがある。その原因としては骨代謝異常が考えられているが、骨組織におけるメカニカルストレス応答や骨量減少誘導等に関する詳細な分子メカニズムは、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト血清およびマウス骨、骨格筋、血清のためのプロテオーム解析技術を確立し、国際宇宙ステーション (ISS) に長期滞在した宇宙飛行士(I-A)や小動物飼育ミッション(MHU-2)にてISSで1ヶ月間飼育されたマウス(II-A)を研究対象とした「宇宙実験」と、地上における骨量減少/骨粗鬆症患者(I-B)や非荷重/過重力モデルマウス(II-B)を研究対象とした「地上実験」を行い、骨、骨格筋、血清におけるメカニカルストレス応答性の骨量減少関連蛋白質を特定し、ISS 滞在との関係や骨代謝を含む運動器機能との関連性を明らかにすることを目指した(図 1)。さらに、その結果を宇宙飛行士の健康管理や地上の臨床現場に早期に還元し、骨量減少などの運動器機能モニタリング技術や骨折高リスク診断技術の開発などに貢献する。

I) ヒト対象研究

ISS 滞在が血清プロテオームに及ぼす影響を経時的に観察し、生体内組織・細胞の適応機構に関する新たな知見を得ることを目的として、「宇宙実験」では、宇宙飛行士から経時的に採取した血清の定量プロテオーム解析を実施し、ISS 滞在によって誘発された血清蛋白質の量的変動を明らかにした。さらに「地上実験」では、骨量減少などの客観的指標となる蛋白質の特定を目的として、骨折高リスクを有する骨量減少症や骨粗鬆症患者等の血清プロテオーム解析を行い、患者に共通して特徴的な量的変動を示す蛋白質

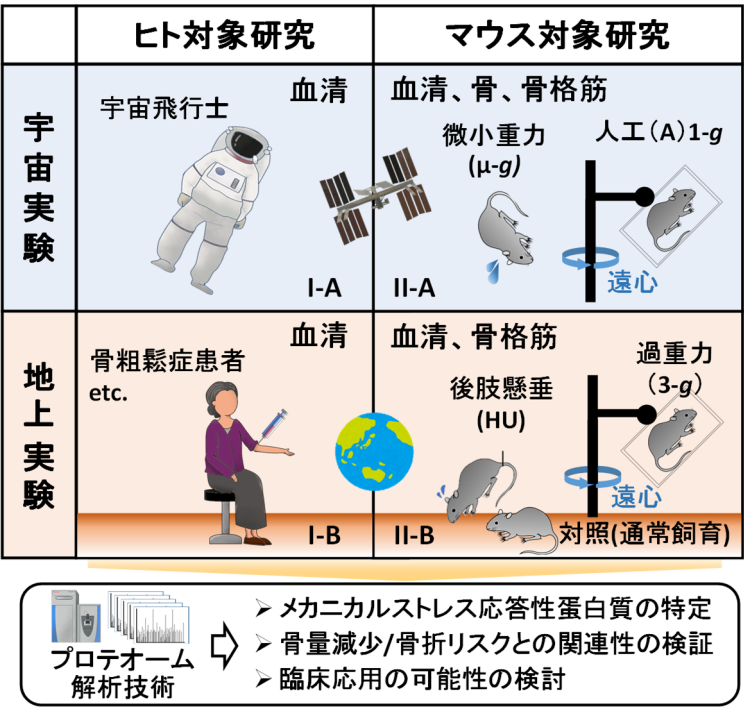


図 1 Medical Proteomics 研究概要
プロテオーム解析技術により、各試料に特徴的に発現する蛋白質を探索し、取得した結果を比較することで目標達成を目指す。

を検出し、その中の非コラーゲン性細胞外マトリックス蛋白質が骨折リスクの高い患者の診断に有用であることが示唆された。またこの蛋白質は、宇宙飛行士血清においてもメカニカルストレス応答性を示し、生体内の状態を把握するための客観的な指標となる可能性を示した。

II) マウス対象研究

骨量減少に係わる生体内組織・細胞におけるメカニカルストレス応答性蛋白質を特定することを目的として、宇宙飛行マウスおよび非荷重/過重力地上モデルマウスから採取した骨、骨格筋、血清についてのプロテオーム解析を実施した。「宇宙実験」では、骨プロテオーム解析により、非荷重環境に应答して骨量が減少した大腿骨でのみ量的変動を示す蛋白質を検出し、その中のカルシウムイオン結合能をもつ分泌型細胞外マトリックス蛋白質 (Sparcl1)が RANKL 誘導性破骨細胞分化の新規モジュレーターとなることを明らかにした。さらに「宇宙実験」と「地上実験」の統合解析では、ヒラメ筋プロテオーム解析によりメカニカルストレス応答性蛋白質を検出し、その中のカルシウムイオン結合能をもつ分泌蛋白質(Pvalb)が、後肢懸垂(HU)マウスおよび骨粗鬆症患者血清中で高値を示し、骨折高リスクを評価する客観的指標になり得ることを示唆した。また血清プロテオーム解析によりメカニカルストレス応答性蛋白質を検出し、これら蛋白質が ISS 滞在中の宇宙飛行士血清においても量的変動を示し、生体内の状態を把握するための客観的指標となる可能性を示した。

III) まとめ

- (1) ヒト血清およびマウス骨、骨格筋、血清のためのプロテオーム解析技術を確立した。
- (2) 宇宙飛行士血清プロテオーム解析により、宇宙飛行ミッションに伴う血清蛋白質の量的変動を明らかにした。
- (3) 骨量減少・骨粗鬆症患者血清で高値を示すカルシウムイオン結合能を有する細胞外マトリックス蛋白質が、骨折高リスク診断に有用であることを示唆すると共に、宇宙飛行士の生体内の状態を把握するための客観的指標となる可能性を示した。
- (4) マウス骨、骨格筋、血清中のメカニカルストレス応答性蛋白質を検出した。
- (5) 非荷重環境に应答して骨量減少を示したマウス大腿骨でのみ蛋白質量が増加する分泌型細胞外マトリックス蛋白質 Sparcl1 が、RANKL 誘導性破骨細胞分化に関与する新規モジュレーターとなることを明らかにした。
- (6) マウス全身の骨格筋は、組織毎に非荷重誘導分子メカニズムが異なることを示した。
- (7) メカニカルストレス応答性分泌蛋白質 Pvalb が、骨折高リスクを評価する客観的指標になり得ることを示唆した。
- (8) 非荷重環境に应答して量的変動を示すマウス血清蛋白質が、宇宙飛行士血清中でも非荷重環境に应答して変動することを明らかにした。
- (9) 上記の結果から、計 4 報の英語論文を公表し、計 4 報の英語論文が review 中である(2023 年 10 月 10 日時点)。また特許 1 件を出願し、企業(社名非公開)と共同で診断薬開発を進めると共に、マーカーとして臨床的有用性を評価するための新たな臨床研究に着手した。

Summary report of the ISS-Kibo utilization theme,
 “Medical proteome analysis of osteoporosis- and bone mass-related proteins
 using the Kibo Japanese Experiment Module of International Space Station
 (Medical Proteomics)”

Principal Investigator: Yayoi Kimura
 (Yokohama City University)

October 2023

The locomotor system, including the bones and skeletal muscles, is strongly affected by mechanical stresses and responds to environmental changes inside and outside the body, in some cases resulting in bone loss and muscle atrophy. At ground level, osteoporosis, characterized by bone loss and abnormal bone tissue microstructure, can be caused by gravity unloading. However, the detailed molecular mechanisms of mechanical stress responses in the involved tissues remain unclear. This study aimed to identify mechanical stress-responsive proteins in bone, skeletal muscle, and serum in both space and ground experiments, and to clarify their roles in a spaceflight mission and in musculoskeletal functions such as bone metabolism (Figure). The results will help establish techniques for monitoring musculoskeletal function, which will promote astronaut health management and the development of early diagnostic methods for patients at risk of bone loss and fractures.

I) Human

To clarify the adaptation mechanisms involved in gravity unloading, space experiments consisted of quantitative proteome analysis of serum collected from astronauts to clarify the protein expression profiles induced during a spaceflight mission. In ground experiments, serum proteome analysis of patients with osteopenia and osteoporosis assessed proteins that might be objective indicators of musculoskeletal health, and identified an extracellular matrix protein that exhibits characteristics commonly expressed in patients

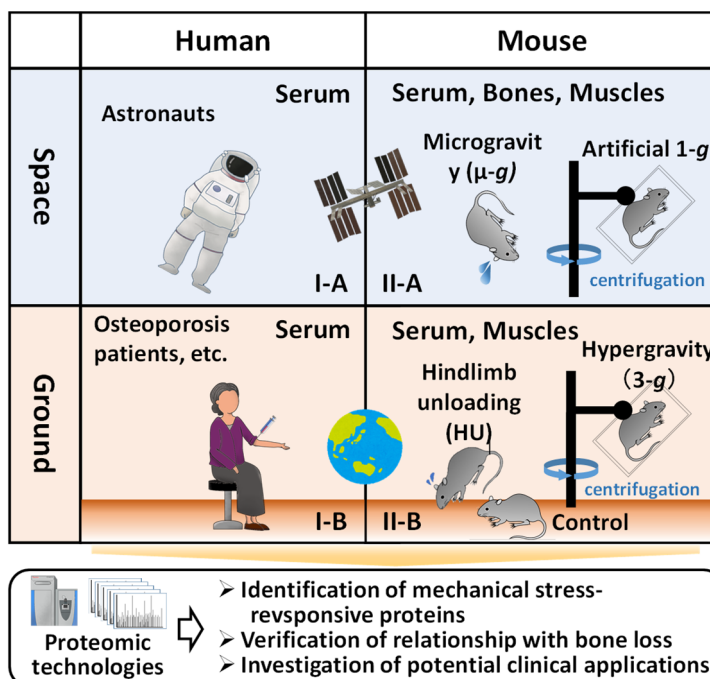


Figure Overview of Medical Proteomics

Using proteomic techniques, we aimed to identify proteins that were differentially expressed in each sample, and compared the results with those of other studies.

and that may be useful in diagnosing those at high risk of fractures. This protein also exhibits mechanical stress responsiveness in astronaut serum and may be an objective indicator for monitoring astronaut conditions *in vivo*.

II) Mouse

To identify mechanical stress–responsive proteins involved in bone loss, we performed proteomic analyses of bone, skeletal muscle, and serum from spaceflight mice and gravity unloading / hypergravity ground model mice. These space experiments revealed that a secreted extracellular matrix protein with a calcium ion–binding domain (Sparcl1), whose levels are elevated in the femur of spaceflight mice exposed to gravity unloading, is a novel modulator of RANKL-induced osteoclast differentiation. Furthermore, integrated analysis of space and ground experiments showed that among mechanical stress–responsive muscle proteins, a secreted protein with a calcium ion–binding domain (Pvalb), whose levels were elevated in the serum of hindlimb suspension (HU) mice and osteoporosis patients, could be an objective indicator for identifying people at high risk of fracture. The mechanical stress–responsive serum proteins identified by proteomic analysis in spaceflight and HU mouse studies may also objectively reflect conditions *in vivo* during spaceflight missions.

Conclusion

- (1) Proteomic techniques for bone, skeletal muscle, and serum were established.
- (2) Astronaut serum proteomic analysis identified serum protein variations during spaceflight missions.
- (3) The extracellular matrix protein, which showed elevated levels in serum of patients with osteopenia / osteoporosis, may be useful in identifying people at risk of fracture, and may be an objective indicator of astronaut conditions *in vivo* during spaceflight.
- (4) Mechanical stress–responsive proteins were identified in mouse bone, skeletal muscle, and serum.
- (5) Sparcl1, which showed elevated levels in the femurs of mice exposed to gravity unloading, was a novel promoter of RANKL-mediated osteoclast differentiation.
- (6) Gravity unloading–induced molecular mechanisms differ between skeletal muscle tissue types throughout the mouse body.
- (7) Pvalb, a mechanical stress–responsive secreted protein, may be an objective indicator of high fracture risk.
- (8) Mechanical stress–responsive proteins in mouse serum may be an objective indicator of astronaut conditions *in vivo* during spaceflight.
- (9) Four papers have been published and four are under review (as of October 10, 2023). One patent application has been filed, development of a diagnostic agent is underway with a private company (name withheld), and a new clinical study has been initiated.

2023年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

「微小重力下における翻訳制御の網羅的解析」 (Ribosome Profiling)

研究代表者：岩崎 信太郎(理化学研究所)

総合評価

A: 目標を十分に達成した(フルサクセス相当)

本研究では、微小重力環境が動物細胞の翻訳に影響を与えるかについて、網羅的・定量的に翻訳の状態を解析することができるリボソームプロファイリング法を用いてアプローチし、当該環境下でミトコンドリアの翻訳活性が顕著に抑制されることを見出した。また、疑似微小重力と過重力、培地基質の弾性力などの外力への細胞応答、過去にISSで培養した線虫及び尾部懸垂マウスに対する個体レベルの応答に関する解析結果からシグナル伝達経路を明らかにするなど、大変興味深い知見を得た。今後、この現象の意義を明らかにしていくことで宇宙生物学・基礎生物学の進展や宇宙滞在のリスク軽減等の宇宙医学への波及効果が期待される。

さらに、微小重力環境が翻訳に与える生物学的な意味づけのさらなる検討と、今回の研究成果と老化様症状等の関連性を解析することを期待する。

一方で、これらの貴重な実験データに基づく優れた成果が、現時点で論文化されていないため、これらの研究成果を早急に論文化することを期待する。

2023年12月26日

きぼう利用テーマ選考評価委員会(生命医科学)

ISS・きぼう利用ミッション
「微小重力下における翻訳制御の網羅的解析 (Ribosome Profiling)」
研究成果概要書
研究代表者：岩崎信太郎 (理化学研究所開拓研究本部)
2023 年 10 月

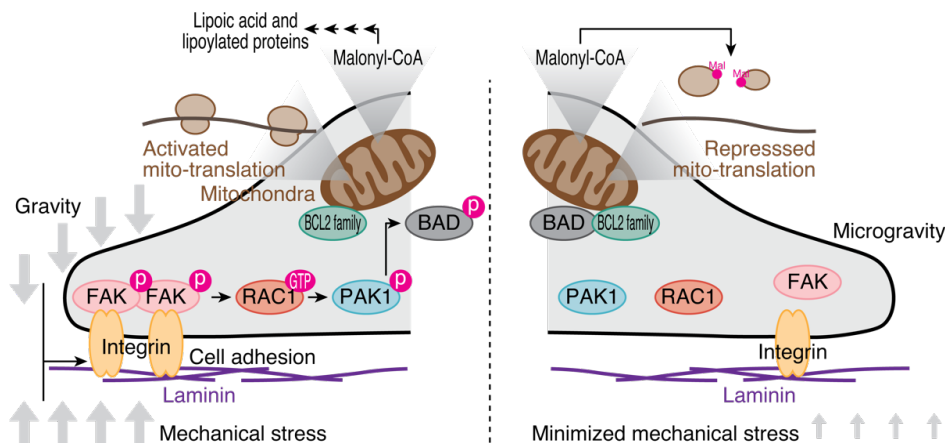


1950 年代に哺乳動物として初めてイヌが宇宙へ飛び立って以来、生物学的・医学的研究により、宇宙環境における生命のユニークな反応が明らかにされてきた (Afshinnekoo et al., 2020)。放射線に加えて、微小重力は宇宙空間における細胞への主要なリスク因子の一つであり、酸化ストレス (da Silveira et al., 2020; Goodwin and Christofidou-Solomidou, 2018)、ミトコンドリア機能不全 (da Silveira et al., 2020; Garrett-Bakelman et al., 2019; Zhang et al., 2014)、エピジェネティック変動 (Adrian et al., 2013; Garrett-Bakelman et al., 2019)等を引き起こすことが報告されている。しかしながら、現在に至るまで、宇宙飛行実験の制約上、微小重力における細胞反応の全体像が完全に理解されたとは言い難い。

このギャップを埋めるため、宇宙飛行士からのサンプルを含むフライトサンプルコホートを用いて、マルチオミックス解析が実施されてきた (Berrios et al., 2021; Ray et al., 2019)。これらの研究では、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームが探索されている (Beheshti et al., 2019, 2018; Bezdan et al., 2020; da Silveira et al., 2020; Gertz et al., 2020; Higashibata et al., 2016; Higashitani et al., 2021; Jonscher et al., 2016; Mhatre et al., 2022; Overbey et al., 2019; Vitry et al., 2022)。その一方で、これらの従来の宇宙飛行研究では重要な細胞応答機構である「翻訳制御」は全く見過ごされている。翻訳の制御機構は内的・外的環境変化に早急に対応するための遺伝子発現調節機構として広く認識されており、翻訳制御の後にトランスクリプトームが変化することが一般的である (Advani and Ivanov, 2019; Costa-Mattioli and Walter, 2020; Pan, 2013; Roux and Topisirovic, 2018)。このことから、微小重力下でのタンパク質合成速度の変動が想定される。

そこで我々は、国際宇宙ステーション「きぼう」実験棟の設備を利用し、ヒト培養細胞および線虫における微小重力に対する翻訳反応についてリボソームプロファイリング法を用いて網羅的に計測した。その結果、ミトコンドリアの翻訳が微小重力によって劇的に減少することを見出した。更に、この重力の過多を認識する分子機構としてラミニン・インテグリンによる細胞接着、また FAK、RAC1、PAK1、BAD、Bcl-2 ファミリータンパク質、mtFAS (ミトコンドリア脂肪酸合成経路)を介した下流のシグナル伝達が、ミトコンドリアの翻訳に重力を伝えることを見出した。ラミニン・インテグリンが生理学的にメカノセンサーとして機能することを考慮すると、微小重力応答はメカニカルストレス応答障害の現れである可能性がある。実際に、後肢を固定しメカニカルストレスを減弱させたマウスではミトコンドリア翻訳が減衰した。

本研究は、重力およびメカニカルストレスを細胞が感知し、エネルギー生産工場であるミトコンドリア内タンパク質合成を促進させるという、これまで明らかにされていなかった新規細胞応答機構を明らかにするものである。



本研究で得られた結果のモデル図。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission
 “Genome-wide survey of translational control in microgravity
 (Ribosome Profiling)”

Principal Investigator; Shintaro Iwasaki
 (RIKEN, Cluster for Pioneering Research)

October, 2023

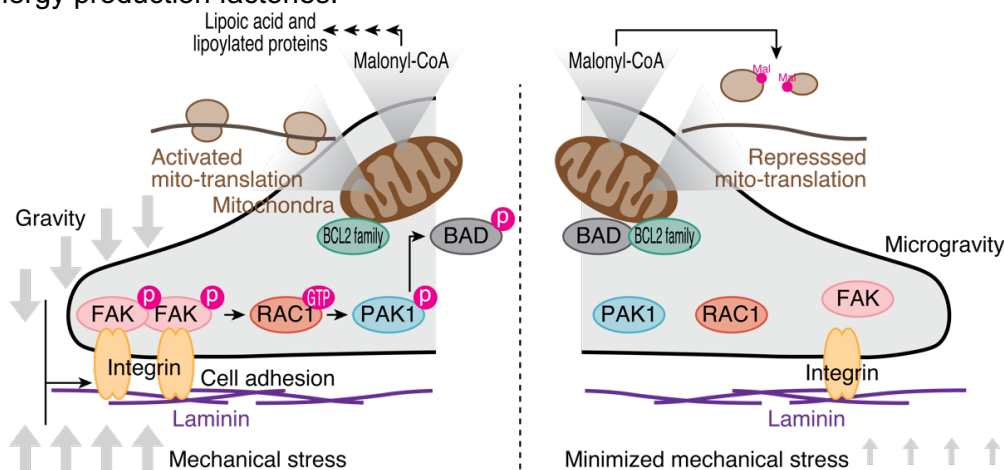


Since the first mammal, the canine, flew into space in the 1950s, biological and medical studies have elucidated responses specific to space environment (Afshinnekoo et al., 2020). Microgravity is one of the major risk factors for cells in space, leading to oxidative stress (da Silveira et al., 2020; Goodwin and Christofidou-Solomidou, 2018), mitochondrial dysfunction (da Silveira et al., 2020; Garrett-Bakelman et al., 2019; R. Zhang et al., 2014), and epigenetic variation (Adrian et al., 2013; Garrett-Bakelman et al., 2019). To date, however, the full picture of cellular responses in microgravity has remained elusive.

To fill this gap, a wide array of “omics” approaches have been conducted using flight sample cohorts that include samples from astronauts (Berrios et al., 2021; Ray et al., 2019). These included the epigenome, transcriptome, proteome, and metabolome (Beheshti et al., 2019, 2018; Bezdán et al., 2020; da Silveira et al., 2020; Gertz et al., 2020; Higashibata et al., 2016; Higashitani et al., 2021; Jonscher et al., 2016; Mhatre et al., 2022; Overbey et al., 2019; Vitry et al., 2022). On the other hand, an important cellular response mechanism, “translational control,” has been completely overlooked in these conventional spaceflight studies. The regulatory mechanism of translation is widely recognized as a regulatory mechanism for gene expression to rapidly respond to internal and external environmental changes, and it is common for the transcriptome to change after translational control (Advani and Ivanov, 2019; Costa-Mattoli and Walter, 2020; Pan, 2013; Roux and Topisirovic, 2018). Therefore, we assume that the rate of protein synthesis fluctuates under microgravity conditions.

Therefore, we surveyed the translational status under microgravity in cultured human cells and *C. elegans* using the facilities of the Kibo laboratory of the International Space Station in orbit. For this purpose, we harnessed ribosome profiling, a deep-sequencing-based method. Indeed, we observed that microgravity dramatically attenuates mitochondrial translation. Furthermore, we found that the microgravity signal is relayed to the mitochondrial translation by laminin-integrin, FAK, RAC1, PAK1, BAD, Bcl-2 family proteins, and mtFAS (mitochondrial fatty acid synthesis pathway). Given that laminin integrin physiologically functions as a mechanosensor, the microgravity response may be a manifestation of a mechanical stress response disorder. Indeed, the loss of mechanical stress in hindlimbs in mice led to the attenuated mitochondrial translation.

This study reveals a novel cellular response mechanism that has not been previously elucidated, in which cells sense gravity and mechanical stress and promote protein synthesis in mitochondria, which are energy production factories.



Schematics of the results of this study.

2023年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

無重力や寝たきりによる筋萎縮の予防に有効なバイオ素材の探索
(Anti-Atrophy)

研究代表者：二川 健（徳島大学）

総合評価

A： 目標を十分に達成した(フルサクセス相当)

本研究では、筋タンパク質分解を抑制する「Cblinペプチド」と、筋タンパク質合成を促進する「Celastrol」の効果につき、微小重力環境下においてラット筋細胞L6に対して添加し、その効果（単独および相加）の評価を行った。結果として、それぞれ単独での筋萎縮を抑制する効果を示し、相加的な効果はないことを明らかにした。さらに、地上実験において、Cblinペプチドの機能性食品としての可能性・発展性を提示した。

CblinペプチドおよびCelastrolそれぞれの地上模擬実験と微小重力実験での作用機序の違いの解明には至らなかった。また、相加的な効果に関し、地上試験との結果の相違についての考察ができていない。

宇宙実験の成果は、現時点で論文化されていないため、これらの研究成果を早急に論文化するとともに、地上実験において*in vivo*研究を推進し、CblinペプチドおよびCelastrolの作用機序を解明するエビデンスを固め、将来的に臨床研究として発展させていくことを期待する。

2024年3月14日

きぼう利用テーマ選考評価委員会（生命医科学）

平成 24 年度「きぼう」利用テーマ募集一般募集区分
「無重力や寝たきりによる筋萎縮の予防に有効なバイオ素材の探索」

研究成果概要書

代表研究者: 徳島大学教授 二川 健

2023 年 12 月

1. 研究目標

本研究の目標は、①大豆由来のユビキチン化阻害ペプチドミリスチル化 Cblin ペプチド と ②台湾ツル由来の熱ショック蛋白質誘導剤 Celastrol について、 μ G 環境下での抗筋萎縮効果を確認することである。

具体的には、

- これら天然の抗筋萎縮物質が、実際の宇宙微小重力による筋萎縮に有効であるかどうかを証明する。
- これら物質の抗筋萎縮作用メカニズムは異なるので、相加的な治療効果の有無も検討する。

2. 実験結果

1) 顕微鏡による形態観察

Celastrol, Cblin ペプチドの L6 筋管径へ影響を観察した。微小重力環境での培養により L6 筋管細胞の直径は有意に減少した。Celastrol および Cblin ペプチド単独の処理により、それぞれ有意に上昇したが、共処理による相加効果は見られなかった。

2) 次世代シーケンスによる遺伝子発現解析

①HSPs発現への影響

Celastrol の効用を確認するために、微小重力環境下で培養した筋管細胞での HSP 発現への影響を調べた。微小重力は、HSP70, HSC70, HSP25, HSP90 の遺伝子発現にはほとんど影響を与えなかった。予想通り、Celastrol はこれら HSP 遺伝子の発現を有意に上昇させた。一方、Cblin ペプチドには HSP 発現の刺激効果は全くなかった。また、共処理による相加効果も見られなかった。

②ミオシン重鎖(MyHC)発現への影響

微小重力環境下で培養した筋管細胞はその筋管の直径が小さくなっており、Celastrol や Cblin ペプチド処理によりこの筋管直径が有意に回復していたので、主要な筋構成蛋白質の一つであるミオシン重鎖の発現量を調べた。微小重力により、MyHC typeI の遺伝子発現が有意に減少していた。Celastrol はその抑制された MyHC typeI の遺伝子発現を回復する傾向を示した。Cblin ペプチドは、MyHC の遺伝子発現にほとんど影響しなかった。

③筋蛋白質分解系酵素発現への影響

(廃用性)筋萎縮に関連するユビキチンリガーゼを Atrogenes と総称している。Atrogenes として、MuRF-1, MAFbx (Atrogen-1) や Cbl-b が報告されており、それらの発現を検討した。微小重力により MAFbx (Atrogen-1) の発現のみが有意に上昇した。興味深いことに Celastrol および Cblin ペプチドの単独投与により、この微小重力により発現の亢進し MAFbx (Atrogen-1) の発現がそれぞれ有意に抑制された。ただし、両者による相加的な効果は見られなかった。その他のユビキチン関連遺伝子の発現には、微小重力ならびに Celastrol や Cblin ペプチドの処理はほとんど影響しなかった。

3) Simple Western 法による蛋白質発現解析

①Celastrol と Cblin ペプチドの IGF-1 シグナルへの影響

Celastrol も Cblin ペプチドも IGF-1 シグナルに影響を与える生理活性物質である。IGF-1 シグナルが活性化しているかどうかを、シグナル分子の蛋白質量やそのリン酸化状態で解析した。微小重力により IRS 分子の分解が亢進することや、Cblin ペプチドがその IRS-1 の分解を抑制することをすでに報告している。本実験では、予想通り微小重力により IRS-1 の蛋白質レベルが低下傾向を示し、Cblin ペプチドにより回復する傾向を示した。さらに興味深いことに、IRS-1 の下流分子である FoxO3 のリン酸化が有意に亢進していることから、Celastrol や Cblin ペプチド処理により IGF-1 シグナルが活性化していることを強く示唆した。Celastrol は HSP 蛋白質を増大させることにより、Cblin ペプチドは IRS-1 の分解を抑制することにより、それぞれ IGF-1 のシグナルを亢進したと考えられた。両者による FoxO3 のリン酸化には相加的な効果は見られなかったことは、遺伝子発現や筋管径に対して相加的な効果が見られなかったことと矛盾しない。

②Celastrol と Cblin ペプチドの MyHC 量への影響

Celastrol や Cblin ペプチドの処理により IGF-1 シグナルの刺激効果が確認されたことより、骨格筋の主要蛋白質であるミオシン重鎖量を解析した。微小重力により遅筋タイプや速筋タイプのミオシン重鎖量は有意に減少した。総ミオシン重鎖量も微小重力により減少する傾向を示した。興味深いことに、Celastrol または Cblin ペプチド単独処理で、有意にすべてのタイプのミオシン重鎖量が回復した。先述の結果と一致して、Celastrol または Cblin ペプチド処理は、実際の微小重力による筋管萎縮の回復に有効であることが証明できた。残念ながら、両者の共処理による相加効果はなかった。

③Celastrol と Cblin ペプチドの Atrogene への影響

微小重力は Atrogenes、とくに MAFbx (Atrogin-1)の発現上昇が観察されたので、それらの蛋白質レベルも解析した。遺伝子発現の解析データと一致して、MAFbx (Atrogin-1)の蛋白質レベルは微小重力により有意に上昇したが、MuRF-1 量は微小重力によりほとんど変化しなかった。驚いたことに、Cbl-b は、遺伝子発現レベルでは微小重力による変化は観察されなかったものの、蛋白質発現レベルでは有意に上昇した。Cbl-b は MAFbx (Atrogin-1) や MuRF-1 遺伝子発現を調節するユビキチンリガーゼであるので、微小重力により早期に反応するユビキチンリガーゼである。我々が用いた細胞は微小重力に暴露して 5 日目になるので、おそらく遺伝子発現の上昇は沈静化し、蛋白質レベルでの上昇のみ検出できたのだろうと推測している。これまでの知見と一致して、Celastrol または Cblin ペプチド処理は MAFbx (Atrogin-1)の発現を蛋白質レベルでも抑制することがわかった。MAFbx (Atrogin-1) は IGF-1 シグナルが活性化すると発現量が減少することがわかっているため、これらの結果は非常に合目的であった。一方、Cblin ペプチドは、これまでの地上における模擬微小重力実験では Cbl-b ユビキチンリガーゼの発現には影響を与えなかったため、今回蛋白質レベルが有意に減少したことは予想外の出来事であった。Cbl-b の安定化に何らかの効果があるのかもしれない。MAFbx (Atrogin-1)および Cbl-b の蛋白質レベル量に対しても Celastrol と Cblin ペプチドによる相加的な効果は見られなかった。

3. まとめ

きぼう利用テーマ「無重力や寝たきりによる筋萎縮の予防に有効なバイオ素材の探索」により、以下の成果が得られた。

- (1) 台湾ツル由来の HSP 誘導剤である Celastrol と大豆蛋白質由来のユビキチン化阻害ペプチドである Cblin は、それぞれ単独で微小重力による筋萎縮の抑制に有効であった。
- (2) 両者による相加的な阻害効果は見られなかった。
- (3) Celastrol も Cblin ペプチドも天然に存在する生理活性物質であることから、抗筋萎縮活性を有する機能性宇宙食の開発に科学的エビデンスを与えた。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission,
**"Exploration of Bio-Materials Effective in Preventing Muscle Atrophy Due to Weightlessness
 and Bed Rest (Anti-Atrophy)"**

Principal Investigator; Nikawa Takeshi (Tokushima University, Professor)

December, 2023

1. Research Objective

The goal of this study is to verify the drug efficacy under μ G (microgravity) conditions for:

- ① the ubiquitination-inhibiting peptide derived from soy, Myristoylated Cblin peptide, and
- ② the heat shock protein inducer Celastrol derived from Taiwanese Kadsura vines.

Specifically, ●To prove whether these natural anti-muscle atrophy substances are effective against actual muscle atrophy caused by microgravity. ●Since the anti-muscle atrophy mechanisms of these substances are different, the study will also investigate the presence of any additive therapeutic effects.

2. Experimental Results

1) Morphological Observation by Microscopy

The effects of Celastrol and Cblin peptide on the diameter of L6 myotubes were observed. The diameter of L6 myotubes significantly decreased under microgravity conditions. Treatment with Celastrol and Cblin peptide individually significantly increased the diameter, but no additive effect was observed with co-treatment.

2) Gene Expression Analysis by Next-Generation Sequencing

①Effect on HSPs Expression

To confirm the efficacy of Celastrol, the impact on HSP expression in L6 myotubes cultured under microgravity was examined. Microgravity had little effect on the gene expression of HSP70, HSC70, HSP25, HSP90. As expected, Celastrol significantly increased the expression of these HSP genes. On the other hand, Cblin peptide had no stimulating effect on HSP expression. Also, no additive effect was observed with co-treatment.

②Effect on Myosin Heavy Chain (MyHC) Expression

Myotubes cultured under microgravity, which had smaller diameters, showed significant recovery of myotube diameter after Celastrol or Cblin peptide treatment. Therefore, the expression of MyHC, a major muscle structural protein, was examined. Microgravity significantly reduced the gene expression of MyHC type I. Celastrol tended to restore the suppressed gene expression of MyHC type I. Cblin peptide had little effect on MyHC gene expression.

③Effect on Muscle Protein Degradation Enzyme Expression

Ubiquitin ligases associated with (disuse) muscle atrophy are collectively referred to as Atrogenes. The expression of MuRF-1, MAFbx (Atrogin-1), and Cbl-b, reported as Atrogenes, were examined. Microgravity significantly increased the expression of MAFbx (Atrogin-1) only. Interestingly, individual administration of Celastrol and Cblin peptide significantly suppressed the microgravity-induced overexpression of MAFbx (Atrogin-1). However, no additive effect was seen with the combination of both. Other ubiquitin-related genes were largely unaffected by microgravity, Celastrol, or Cblin peptide treatment.

3) Protein Expression Analysis by Simple Western Method

①Effect of Celastrol and Cblin Peptide on IGF-1 Signaling

Celastrol and Cblin peptide are biologically active substances that affect the IGF-1 signal. We analyzed whether the IGF-1 signal was activated by measuring the protein amount of the signaling molecule and its phosphorylation state. We have already reported that microgravity

accelerates the degradation of IRS molecules and that Cblin peptide inhibits this degradation of IRS-1. In this experiment, as expected, the protein level of IRS-1 tended to decrease under microgravity and showed a tendency to recover with Cblin peptide treatment. More interestingly, significant increase in phosphorylation of FoxO3, a downstream molecule of IRS-1, strongly suggested that IGF-1 signaling was activated by Celastrol or Cblin peptide treatment. Celastrol increased IGF-1 signaling by increasing HSP proteins, while Cblin peptide did it by inhibiting the degradation of IRS-1. The lack of an additive effect on the phosphorylation of FoxO3 by both agents is consistent with the absence of an additive effect on gene expression and muscle fiber diameter.

② Effect of Celastrol and Cblin Peptide on MyHC Quantity

Given the confirmed stimulatory effects of Celastrol or Cblin peptide treatment on IGF-1 signaling, the quantity of myosin heavy chain (MyHC), a major skeletal muscle protein, was analyzed. Microgravity significantly reduced the amount of both slow and fast MyHC types. The total MyHC amount also showed a decreasing trend under microgravity. Interestingly, significant recovery of all types of MyHC was observed with individual treatments of Celastrol and Cblin peptide. Consistent with previous results, Celastrol or Cblin peptide treatment was proven effective in recovering actual microgravity-induced myotube atrophy. Unfortunately, no additive effect was observed with combined treatment.

③ Effect of Celastrol and Cblin Peptide on Atrogenes

Since microgravity induced an increase in the expression of Atrogenes, particularly MAFbx (Atrogin-1), their protein levels were also analyzed. Consistent with gene expression data, MAFbx (Atrogin-1) protein level significantly increased under microgravity, but MuRF-1 quantity changed little. Surprisingly, Cbl-b showed a significant increase at the protein expression level, although no change was observed at the gene expression level under microgravity. Cbl-b is a ubiquitin ligase that regulates the expression of MAFbx (Atrogin-1) and MuRF-1 genes, responding early to microgravity. As the cells used in our study were exposed to microgravity for 5 days, it is speculated that gene expression increases might have subsided, and only the protein level increase was detectable. Consistent with previous knowledge, Celastrol and Cblin peptide treatment suppressed MAFbx (Atrogin-1) expression at the protein level as well. Since MAFbx (Atrogin-1) is known to decrease in expression when IGF-1 signaling is activated, these results were highly logical. On the other hand, the significant reduction in Cbl-b protein level by Cblin peptide was unexpected, as in previous ground-based simulated microgravity experiments, Cblin peptides showed no effect on Cbl-b ubiquitin ligase expression. This might indicate some effect on Cbl-b stabilization. No additive effect on the protein levels of MAFbx (Atrogin-1) and Cbl-b was observed with Celastrol and Cblin peptide treatment.

3. Summary

The following results were obtained from the Kibo Utilization Theme "Exploration of Bio-Materials Effective in Preventing Muscle Atrophy Due to Weightlessness and Bed Rest":

- (1) Celastrol, a heat shock protein inducer derived from Taiwanese Kadsura vines, and Cblin, an ubiquitination-inhibiting peptide derived from soy protein, were each effective individually in inhibiting muscle atrophy caused by microgravity.
- (2) No additive inhibitory effects were observed when both substances were used together.
- (3) Since both Celastrol and Cblin peptide are naturally occurring bioactive substances, they provide scientific evidence for the development of functional space food with anti-muscle atrophy activity.