



平成29年 5月18日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学
国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構

国際宇宙ステーションの「きぼう」で長期保存した精子 DNA の正常性と宇宙マウス について ー人類の宇宙生殖の可能性を示すー

本学大学院総合研究部発生工学研究センターの若山清香特任助教、若山照彦教授、宇宙航空研究開発機構（JAXA）の矢野幸子主任研究開発員らの研究グループは、国際宇宙ステーションにある日本実験棟「きぼう」で長期保存したマウス精子の DNA 損傷度を明らかにし、健康な産仔を作出することに初めて成功しました。この成果は米国科学アカデミー紀要（PNAS）の「In This Issue」にノミネートされ、オンライン掲載（5月22日付け：日本時間5月23日（火）午前4時）されます。

タイトル：Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months.

本研究のポイント

- 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
- 宇宙放射線は精子 DNA にダメージを与えるが、受精や発生に影響を与えない
- 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
- 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となる。

1. 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・繁殖も必要になりますが、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ます。魚類や両生類と異なり、マウスなどの哺乳類は環境の変化に

敏感で飼育が難しく、これまで宇宙での哺乳類の生殖に関する実験実績はほとんどありません。生殖細胞は、生体外では数日間しか培養できないため、動物個体の代わりに宇宙実験に使用することはできません。凍結した生殖細胞を搭載すれば長期間保管することはできますが、数十 μ mしかない生殖細胞の取り扱いには、非常に高度な専門的な技術や経験が必要となり、地上と同様の手法での宇宙実験を行うのは困難です。このような制約から、これまで哺乳類の生殖に関する宇宙実験はほとんど行われたことがありませんでした。

山梨大学の研究グループらは、これまで哺乳類の生殖に関して様々な研究を行っており、宇宙での生殖に関する地上シミュレーション実験も報告しています（注1）。しかし、長期間安定した微小重力や宇宙放射線環境を正確に地上で再現することはできないため、実宇宙環境での生殖細胞への影響を検討する方法を模索してきました。そして2009年、研究代表者らが開発した“フリーズドライ精子”（注2）を用いた哺乳類初の宇宙生殖細胞実験が、JAXAの国際宇宙ステーション利用実験 国際公募宇宙実験テーマとして採択されました。フリーズドライ精子を用いることにより、哺乳類の宇宙生殖実験を阻む数々の制約を取り払うだけでなく、室温でも打ち上げが可能、軽量で場所も取らないため、宇宙実験の柔軟性が格段にあがったからです。国際宇宙ステーションでは、太陽活動や船内の遮蔽環境によっては地上の数百倍程度にも達する宇宙放射線の被ばく量が計測されます。本プロジェクトにより、このような国際宇宙ステーション（ISS）（<http://iss.jaxa.jp/med/research/radiation/>）の船内環境でフリーズドライ精子を長期間保存することで、宇宙放射線が哺乳類の精子DNAにどのような影響を与えるのか明らかにすることが出来ました。

本プロジェクトは、生命環境学部生命工学科の若山清香特任助教、若山照彦教授、東京医科歯科大学 難治疾患研究所の石野史敏教授、幸田尚准教授、JAXAの矢野幸子主任研究開発員、永松愛子技術領域主幹、一般財団法人日本宇宙フォーラムの鈴木ひろみ研究員、嶋津徹主任研究員、有人宇宙システム株式会社の多田基紀研究員、長田郁子研究員などによる共同研究であり、プロジェクト名は「Space Pup」（図1A、<http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/spacepup/>）です。

2. 研究方法

(1) 打ち上げた試料の種類と保存期間

遺伝的背景の異なる4系統（BDF1、BCF1、C57BL/6および129B6F1-GFP系統）の雄マウス12匹からそれぞれ24本のフリーズドライ精子のアンブルビンを作り（図2A-C）、4本ずつ6箱に詰め、宇宙保存用3箱、対照区の地上保存用3箱に分けました。宇宙保存用3箱は、それぞれ9か月、約3年間および約5年間、ISSにある日本の実験棟「きぼう」内の冷凍庫で保存したのち回収します。地上保存用は、JAXAの筑波宇宙センター内の冷凍庫で、宇宙保存用と同じ温度条件と保管期間で保存しています。

宇宙保存用の3箱は2013年8月4日にH-IIBロケット4号機/宇宙ステーション補給機「こうのとり」4号機で打ち上げられ（図1B）、第1回の回収となる1箱目は2014年5月19日にアメリカのスペースX社のドラゴン補給船運用3号機にて地上に回収されました。第1回の試料のISSでの保存期間は288日、約9か月間になります。

(2) 行った実験内容

回収された精子（宇宙保存用および地上保存用）は、長期間保存による宇宙放射線の影響を調べるために以下の解析を行いました。

1). 精子 DNA の損傷度の測定

個々の精子の損傷した DNA を電気泳動で移動させ、蛍光色素により発色させて損傷度を測定する方法。核から流れ出た DNA が彗星の尾のように見えることからコメットアッセイと呼ばれています。損傷が多ければゲル中を移動する DNA 量が増え、彗星の尾の長さが伸びます。

2). 顕微授精による受精能の測定

マイクロマニピュレーターで精子を卵子内へ直接注入して受精させる方法。運動性の弱い精子などを受精させる不妊治療の技術です。フリーズドライ精子はすべて死んでしまうため、顕微授精しなければ子供を作ることはできません。

3). 受精卵における精子由来 DNA の損傷度の測定

DNA に傷が生じると、直ちにその部分のヒストン蛋白がリン酸化されガンマ H2AX (γ H2AX) と呼ばれる状態になります。したがって γ H2AX を認識する抗体で免疫染色を行えば DNA の傷の量を調べる事が出来ます。一般的には染色されたスポット数 (= 傷の数) を計算しますが、本研究ではスポットが多すぎるため核全体の相対輝度で測定しました。

4). 受精卵の初期発生と胚盤胞の正常性

宇宙精子で受精した胚を 4 日間培養して、胚盤胞への発生率とその細胞数や細胞分布を測定し、地上コントロール精子で受精した胚と比較しました。

5). 世界初の宇宙マウスの作出と産仔率の測定

宇宙精子で受精した胚を借り腹メスへ移植して出産させました。

6). 宇宙マウスの健康状態や妊性の観察

生まれた宇宙マウスを育てて、外見の異常の有無や交配して子孫を作れるか調べました。

7). 宇宙マウスの網羅的遺伝子発現解析 (RNA-Seq)

細胞内の mRNA の配列を解読して、発現量の定量を網羅的に行う解析方法です。本研究では産仔の脳の組織を調べ、解析結果をヒートマップと呼ばれる図で示しました。

3. 結果

フリーズドライ精子への宇宙放射線被ばく量は、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) でした。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 倍に相当します。

宇宙保存精子の DNA 損傷度を調べたところ、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ました (図 2 G-I)。しかし、顕微授精を行うと宇宙保存精子の大部分は卵子と受精し、正常な胚盤胞へ発生しました (図 3 A-F)。受精後の DNA 損傷を調べたところ、精子由来の核 DNA 損傷度は減少していました (4 系統中 1 系統でのみ DNA 損傷が観察されました) (図 2 J-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ため、正常な胚発生が可能であったのだと示唆されます。

次に、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ました（表1、図3G,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ませんでした。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ませんでした。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ませんでした（図3I）。

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に若干損傷を生じますが、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りました。

4. 今後の期待

将来、人類が宇宙で生活する時代には、凍結精子から子孫を作る不妊治療技術や家畜の人工授精技術が今以上に活用されると考えられます。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しました。一方、今回の研究によって、約9か月間宇宙で保存するだけでも、宇宙放射線によって精子のDNAにダメージを与えることが分かりました。本実験におけるDNAダメージは産仔へは影響していませんでしたが、畜産業などで行われている人工授精では数十年の間保存された精子が使われることもあるため、より長期間宇宙で保存した場合の影響を調べるのが不可欠です。我々は、試料の一部をISS内で保存しており、今後、3年間および5年間に及ぶ長期間保存したフリーズドライ精子の実験を行うことにより、宇宙放射線が生殖細胞や継世代に対してどのような影響を与えるのか明らかにしていく予定です。

もし長期間の保存により、著しいDNA損傷の増加が確認できれば、積極的に宇宙放射線の影響を軽減する方法を考えなければなりません。たとえば、月で発見された遮蔽の厚い溶岩洞窟に精子を保管することで、フリーズドライ精子への放射線影響をできるだけ低減させた状態で半永久的に保存することも可能かもしれません。これは「ノアの箱舟」のように、地球に大きな災害が起こった場合に備えた究極の遺伝子資源の保管場所になるはずです（植物の種子はすでにスバル諸島で保存が始まっています（注3））。

我々は、宇宙の無重力環境でマウス初期胚を培養する実験も予定しています（2015年にISSの国際公募で採択されたプロジェクト、注4）。これらの実験と合わせて、哺乳類の宇宙生殖全般について明らかにしていく予定です。

<補足説明>

※1 胚発生への無重力の影響

我々は以前、地上で疑似無重力環境を再現する装置を用いて、マウスの体外受精および胚の発生が無重力でも可能かどうか調べる実験を行いました。その結果、マウス初期胚は無重力環境では胎盤の発育が悪くなり、出産率が大きく減少してしまうことが示されました。（論文：Wakayama et al., Detrimental effects of microgravity on mouse preimplantation development in vitro. PLoS One, 2009, 4:e6753）プレスリリース：<http://www.riken.jp/pr/press/2009/20090825/>

※2 フリーズドライ精子

マウスの精子はフリーズドライ状態にすると死んでしまいますが、室温なら数か月間、冷凍ならほぼ永久に保存可能であり、顕微鏡下で卵子内に精子を注入（顕微授精：※1 1）してあげれば、健康な産仔を得ることが出来ます。これは我々が 1998 年に世界で初めて成功した技術です（Wakayama and Yanagimachi, Nature Biotechnology 1998,16 : 639-641）。

※3 スバルバル世界種子貯蔵庫

世界中の種子を集めて保存しており、世界各地で大規模災害などにより種が絶滅しても再開できるようにすることを目的としています。

<https://www.regjeringen.no/en/topics/food-fisheries-and-agriculture/jordbruk/svalbard-global-seed-vault/id462220/>

※4 ISS でマウス初期胚を培養するプロジェクト「Space Embryo」

2014 年の国際公募に応募し、2015 年に打ち上げ候補として採択されました。

http://iss.jaxa.jp/kiboexp/participation/application/2014_selected_theme.html

（注）別紙にはカラー写真等がありますので、ご入用の方は下記広報担当までお知らせください。

（本件に関する問い合わせ先）

山梨大学大学院総合研究部生命工学専攻

特任助教 若山 清香 sayakaw@yamanashi.ac.jp

教授 若山 照彦 twakayama@yamanashi.ac.jp

TEL : 055-220-8826 FAX : 055-220-8827

（広報担当）

同 総務部総務課広報グループ

TEL : 055-220-8006 FAX : 055-220-8799

E-mail : koho@yamanashi.ac.jp

（国際宇宙ステーション（ISS）/きぼう利用に関する問い合わせ）

国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構 広報部

Tel. 050-3362-4374、Fax. 03-3258-5051

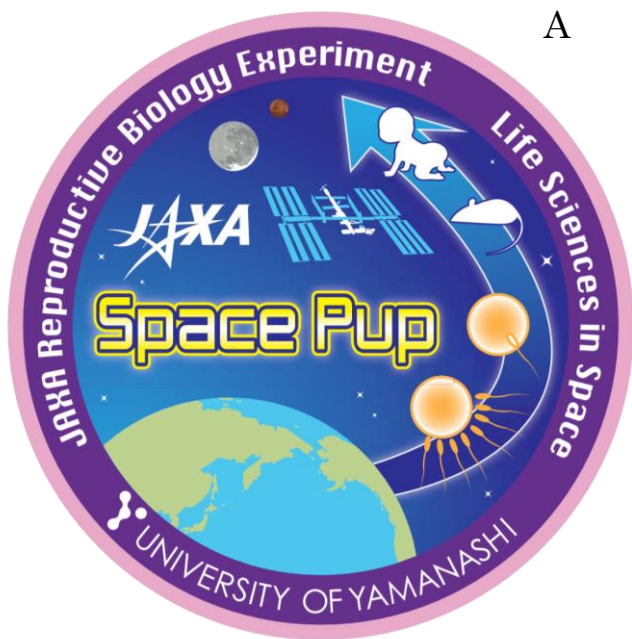


図1. 本プロジェクトのステッカーと宇宙ステーション補給機「こうのとり」4号機にマウス精子を積み込んでいる様子

(A) 本プロジェクト名は Space Pup(宇宙仔ネズミ)。JAXA との共同研究の名称は JAXA Reproductive Biology Experiment (宇宙生殖生物学実験) です。宇宙で哺乳類の受精から産仔への発育の可能性を明らかにすることが目的です。(B)「こうのとり4号機」(後ろに見える白い円錐状のも) にフリーズドライ精子を入れた保温箱が収納される場所。

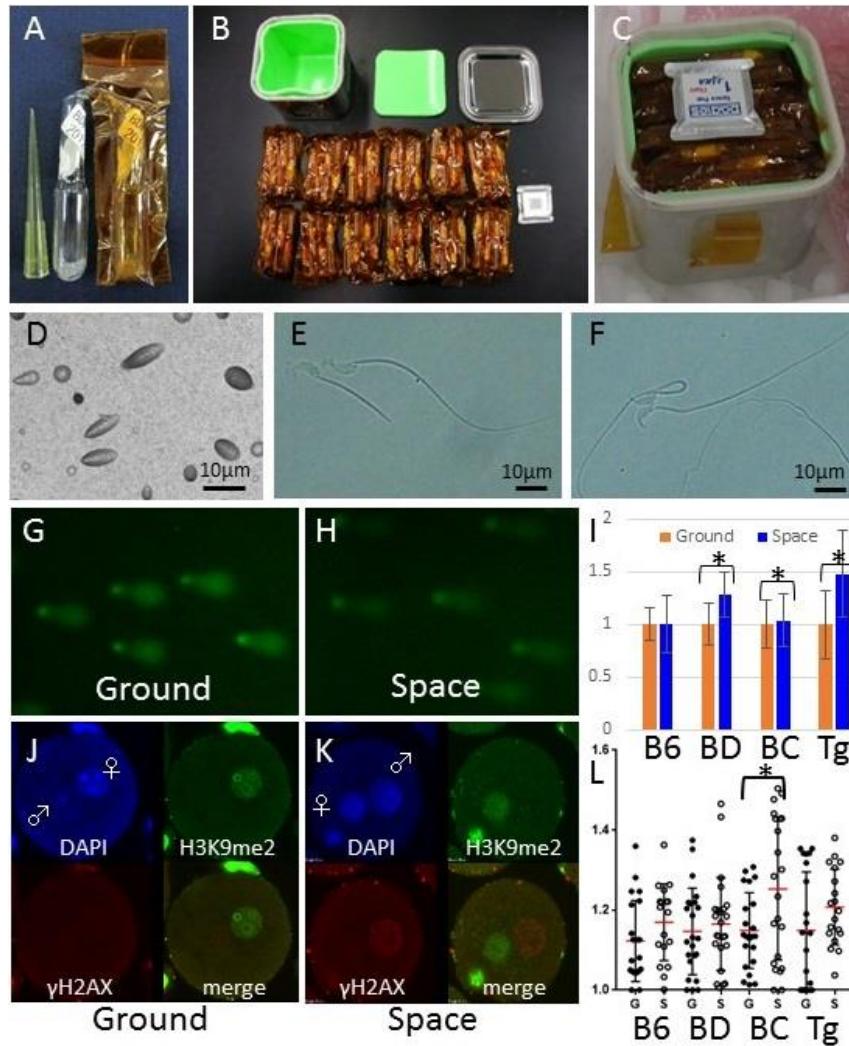


図2. ISS・「きぼう」日本実験棟で保存したマウスのフリーズドライ精子および精子 DNA の損傷について

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。(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： γ H2AX 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) γ H2AX 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 γ H2AX 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。

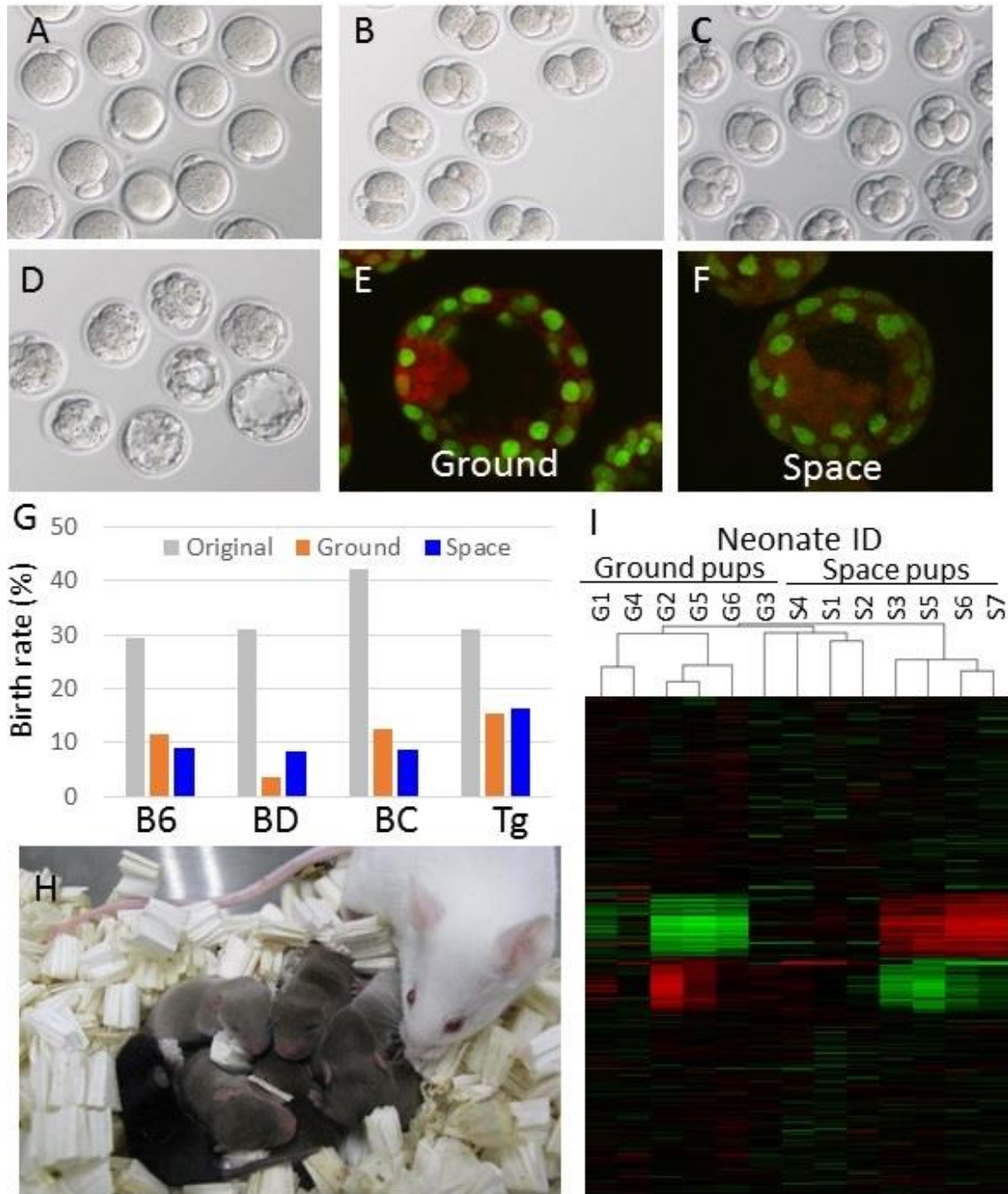


図 3. 宇宙保存精子で受精した胚の発生と宇宙マウスの誕生

(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。

表 1. 宇宙保存精子からの産仔作出

| マウスの系統 | 精子の保存条件* | 使用卵子数 | 顕微授精した卵子数 | 正常に受精した卵子数(%) | 翌日 2 細胞期へ発生した胚数 (%) | 出産数 (%)* |
|-------------|----------|-------|-----------|---------------|---------------------|----------------------|
| C57BL/6 | 保存開始前 | 111 | 89 | 74 (83) | 68 (76) | 20 (29) ^a |
| | 地上保存 | 267 | 216 | 208 (96) | 165 (76) | 19 (12) ^b |
| | 宇宙保存 | 452 | 367 | 359 (98) | 262 (71) | 24 (9) ^b |
| BDF1 | 保存開始前 | 110 | 98 | 98 (100) | 74 (76) | 23 (31) ^a |
| | 地上保存 | 572 | 423 | 366 (87) | 278 (66) | 10 (4) ^b |
| | 宇宙保存 | 345 | 282 | 256 (91) | 182 (65) | 15 (8) ^b |
| BCF1 | 保存開始前 | 78 | 49 | 48 (98) | 38 (78) | 16 (42) ^a |
| | 地上保存 | 270 | 242 | 231 (95) | 213 (88) | 27 (13) ^b |
| | 宇宙保存 | 400 | 341 | 327 (96) | 279 (82) | 24 (9) ^b |
| 129B6F1-GFP | 保存開始前 | 102 | 75 | 75 (100) | 55 (73) | 17 (31) ^a |
| | 地上保存 | 180 | 140 | 133 (95) | 97 (69) | 15 (15) ^b |
| | 宇宙保存 | 120 | 86 | 75 (87) | 61 (71) | 10 (10) ^b |

^a vs ^b: $P < 0.05$.

* : 移植した胚に対する出産率