

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11919

研究課題名(和文) 国際宇宙ステーション内に長期保存したマウス胚性幹細胞を用いた宇宙放射線の影響研究

研究課題名(英文) Study on effects of space radiation using mouse embryonic stem cells kept long time in International Space Station

研究代表者

森田 隆 (Morita, Takashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号：70150349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙での長期にわたる有人活動が可能となり、火星への有人飛行も視野にはいつてきた現在、宇宙放射線の人体へのリスクの評価は、重要課題の一つと考えられる。我々は、凍結したマウス万能細胞(ES細胞)を「きぼう」内のMELFI(冷凍庫)に長期間保管し、本年7月、最長52か月を経て、地上へ回収した。染色体異常やDNA損傷、また、マウス個体への発生過程での影響を観察することにより宇宙放射線の影響を解析した。さらに、被ばくした物理学的線量と細胞への影響の対応を地上での実験とで比較した。細胞の生存率、キメラ作製などへの影響は少ないと考えられた。染色体異常については、差が見られた。

研究成果の概要(英文)：It is important to evaluate the influence of space radiation on human body or mammalian cells during a longer stay in space including missions to International Space Station (ISS), the moon of the earth, or Mars. Mouse embryonic stem (ES) cells are good candidate to estimate the space radiation effects, because they have normal karyotypes of chromosomes. The frozen mouse ES cells were launched by Space X-II in March 1, 2013 as project named "Stem Cells". The frozen ES cells have been kept in the Japanese experiment module called "KIBO" in ISS and stored in a freezer (MELFI) at -95C. The ES cells exposed to space radiation were examined by their DNA damages by detecting histone H2AX foci and their chromosomal aberrations by FISH. The ES cells were also microinjected into normal embryos and cultured in vitro to see the developmental defects. The ES cells were thawed and their viabilities, formation of chimeras and chromosome aberrations were tested.

研究分野：分子生物学

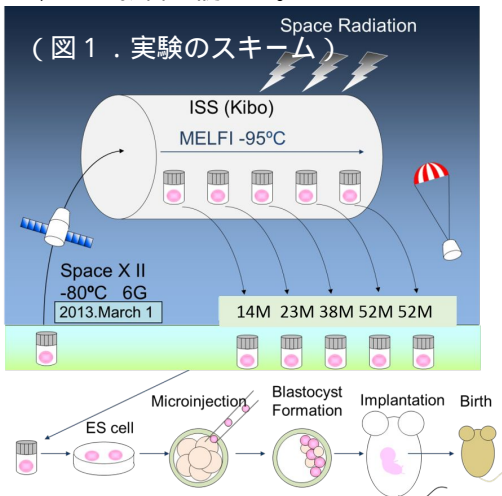
キーワード：宇宙放射線 マウスES細胞 染色体異常 DNA 損傷 国際宇宙ステーション

1. 研究開始当初の背景

宇宙は、重粒子線など、いろいろな種類の放射線が錯綜する空間である。近年、宇宙での長期、滞在、火星への探査などが現実となりつつある。宇宙放射線の人体への影響を知ることにはこのような宇宙計画を実施する上で重要である。そこで、我々は、マウス ES 細胞を凍結させ、国際宇宙ステーションに打ち上げて、数年凍結保存した後、地上に戻し、放射線による細胞生存率の低下、DNA 損傷、染色体の異常、さらに、受精卵に移植後の発生を調べ、長期滞在へのリスクを評価することを計画した。2013 年 3 月にマウス ES 細胞をスペース X II 号機で国際宇宙ステーション (ISS) に ES 細胞を打ち上げ、2014 年 5 月には、約 1 年経過し、宇宙放射線に被曝したサンプルが冷凍状態で回収された。さらに、2015 年 2 月には、1 年 11 か月保存された 2 回目の ES 細胞サンプルが回収された。2016 年 5 月には、3 回目回収され、2017 年には 4 年目のサンプル回収が予定された。これらのサンプルについて、宇宙放射線による DNA 損傷や染色体異常を検出し、その影響を考察する予定である。

2. 研究の目的

宇宙放射線の影響を解析することは、長期的な有人宇宙飛行、有人火星探査などを想定する場合、リスクの評価および防御対策の策定に重要である。しかし、生物を長期間、宇宙放射線の影響を調べる実験は行われていない。我々は、マウス ES 細胞を凍結させて宇宙にあげ、長期間凍結保存したものについて、その影響を調べる。



3. 研究の方法

われわれ今年度の研究は、粒子線のなかでも、重要と考えられる陽子線と鉄線について、マウス ES 細胞に照射し、その影響を染色体異常、H2AX 抗体によるフォーカス形成、遺伝子発現などで解析し、宇宙放射線を被曝したサンプルとの比較を行った。マウス ES 細胞で、ヒストン H2AX 遺伝子の野生型細胞、ヘテロ、ホモについて、Fe 線 (500 MeV/u) 及び陽子線で、0.2 Gy および 1 Gy で照射実験を行った。これらのサンプルは現在、凍結中である。平成 29 年 7 月に回収された、宇宙保管 4 年目のサンプルの回収と同時に、地上でのコントロールとして解析を始めた。

4. 研究成果

(1) ES 細胞の生存率、コロニー形成能の解析

凍結保存サンプルを融解し、細胞の生存率、コロニー形成能を測定した。これまでのところ、52 か月サンプルについても、特に、生存率コロニー形成について、地上サンプルと大きな差は認められず、他の解析も含め、解析が可能と考えられた

(2) ES 細胞の染色体異常の解析

凍結 ES 細胞を短時間培養し、染色体異常を FISH により、定量的に解析する。第一番染色体を緑で、第二番染色体を赤のプロープで染色し、解析した。宇宙で保管したものと、地上で保管した細胞を ES 細胞として、解凍後、培養し、細胞周期が回り過ぎないようにコントロールし、ガラススライド上に展開した。その後、ハイブリダイゼーションを行い、染色体の解析を行った。その結果、染色体切断などは、宇宙サンプルでは地上サンプルより多く観察された。ヒストン H2AX 遺伝子欠損細胞は、DNA 修復遺伝子として、その欠損は、染色体異常を増やすことを明らかにしているが、このことから、ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウス ES 細胞を用いて、同じ実験を行うと感度よく結果が解析できると考えた。

(3) ES 細胞の DNA 損傷の定量

(H2AX フォーカスの測定)

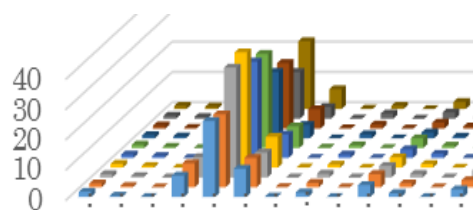
凍結マウス ES 細胞に、Fe イオン線を照射し、リン酸化ヒストン H2AX のフォーカスの

形成で定量する地上実験を行った。凍結マウス細胞に Fe イオン線 (500MeV) を 0-1Gy 照射し、解凍した後、培養し、H2AX のフォーカスを計量した。生じた DNA 損傷をリン酸化ヒストン H2AX のフォーカスの形成で定量する実験を行った。凍結細胞融解後の 37 での培養時間は 1, 6, 24 時間とした。Fe イオン照射した野生型マウス ES 細胞を用いて H2AX フォーカス形成数を調べた。凍結状態で照射した後、培養後、H2AX のフォーカスが観察された。Fe イオン線を照射線量が 0.5, 1 Gy と増加するにしたがって、細胞内のフォーカスの数は増加し、6 個存在するものも検出された。また、1 Gy 照射の場合、培養後 24 時間では、フォーカス数が減少することが明らかとなり、6 時間の方がよいと考えられた。X 線照射した胎生線維芽細胞を用いて、リン酸化 H2AX の発現の蛍光強度の変化についてフローサイトメトリーを用いて定量的に調べた。0Gy と 5Gy の X 線照射した細胞のリン酸化 H2AX の発現量は、リン酸化 H2AX の蛍光強度のヒストグラムにおいて 0Gy より 5Gy 照射の細胞が右方移動しており、発現が増加していることが分かった。ドットプロットにおいても、リン酸化 H2AX 陽性の細胞集団が上方にシフトしており、5Gy 照射細胞のリン酸化 H2AX 陽性細胞が増加していることが示唆された。しかし、宇宙サンプルについては、放射線量が 150mGy / 年と低線量であるため、フローサイトメトリーでの検出は難しいと考えられた。

(4) 遺伝子発現解析

Fe で照射したマウス ES 細胞を 2, 8, 24, 48 時間培養後、RNA を抽出して、遺伝子発現を RNA sequencing により解析した。DNA array では、相対的な遺伝子発現の変化は検出できるが、絶対的な転写量については、プローブにより差があることがあり、定量的解析には、再度 RT-PCR などの解析が必要となる。そこで、RNA-sequence を網羅的に行う解析により、転写量を反映した解析のできる RNA sequence による重粒子線による遺伝子発現への影響解析について検討した。Fe 線の非照射と、3Gy 照射したサンプルで比較した。照射後の時間を 0, 2, 8, 24, 48 時間で比較し

た結果の例を図 2 に示した (図 2 は、RNA sequence による発現量を示す。手前から、0 時間、非照射、照射、2 時間、非照射、照射、4 時間、非照射、照射、8 時間、非照射、照射、24 時間、非照射、照射、48 時間、非照射、照射のサンプルである。いくつかのサンプルについて例示した)。多くの遺伝子で転写は、細胞融解後 2 - 8 時間で増加し、24 時間、48 時間後には、低下する傾向が見られた。DNA 修復遺伝子の中で 3Gy の照射により、遺伝子発現が顕著に増加するものは見られなかった。前回、ISS と地上でも修復遺伝子での発現変化は少なかった。しかし、解析した遺伝子のなかには、3Gy の照射で RNA 量が増加するものもあり、それらについて、時間的変化や、宇宙サンプルでの発現変化について、さらに解析が必要である。



(図 2 . 遺伝子発現解析)

(5) キメラマウスの作製による次世代への影響の解析

マウス ES 細胞 (C57BL/6 GFP) を解凍後、培養し、ICR マウス受精卵に移植した。さらに、発生したマウス胚を偽妊娠マウスの子宮に移植した。キメラマウスにより次世代に ES 細胞が伝わるか検討した。3 年目のマウス ES 細胞については、地上コントロール、ISS 保存ともに、キメラマウスが作製でき、さらに生殖キメラも生まれ、影響がほとんどないと考えられた。さらに、数を増やして検討する必要があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(1) [雑誌論文](計 2 件)

Low-dose irradiation of mouse embryos increases Smad-p21 pathway activity and preserves pluripotency.

Hayashi M, Yoshida K, Kitada K, Kizu A, Tachibana D, Fukui M, Morita T, Koyama M. J Assist Reprod Genet. 2018 Mar 16. (査読有)

JW. Norbury T. Morita, et al. Galactic cosmic ray simulation at the NASA Space Radiation Laboratory, Life Sci Space Res (Amst). 8:38-51 (2016) (査読有)

[学会発表](計 6 件)

吉田佳世, 木津あかね, 秦 恵, 江口 - 笠井清美, 寺村岳士, 山崎千秋, 鈴木ひろみ, 嶋津 徹, 永松愛子, 鈴木智美, 東端晃, 矢野幸子, 白川正輝, P. Saganti, 笠原春夫, F. A. Cucinotta, 森田 隆; 国際宇宙ステーションで 52 か月間凍結保存したマウス ES 細胞への宇宙放射線影響の解析; シンポジウム「宇宙における放射線防護を考える-影響の多面性と評価-」日本放射線影響学会大 60 回大会、千葉、(2017)

吉田佳世, 木津あかね, 秦 恵²⁾, 江口 - 笠井清美, 寺村岳士, 山崎千秋, 鈴木ひろみ, 嶋津 徹, 永松愛子, 鈴木智美, 東端晃, 矢野幸子, 白川正輝, P. Saganti, 笠原春夫, F. A. Cucinotta, 森田 隆; 宇宙放射線によるマウス凍結 ES 細胞への影響: 宇宙生物学会第 2 回大会、前橋 (2017)

K. Yoshida, A. Kizu, K. Kitada, M. Hada², K., Eguchi-Kasai, T. Teramura, H. Suzuki, T. Shimazu, S. S. Yano, M. Shirakawa, I. Osada, H. Kasahara, F. A. Cucinotta, T. Morita. Space Experiment to estimate effects of space radiation mouse ES cells in ISS; ワークショップ「粒子線を利用した研究へのいざない」日本放射線影響学会大 59 回大会、広島、(2016)

吉田佳世, 木津あかね, 北田紘平,

秦 恵, 江口 - 笠井清美, 寺村岳士, 鈴木ひろみ, 嶋津 徹, 永松愛子, 矢野幸子, 白川正輝, 長田郁子, 笠原春夫, F. A. Cucinotta, 森田 隆; 凍結マウス ES 細胞を用いた宇宙放射線影響の解析: 宇宙航空環境医学会・宇宙生物学会合同大会シンポジウム、名古屋(2016)

Morita, T. "Stem Effects to Frozen Mouse Embryonic Stem Cells in International Space Station, Human Research Project; Investigators' workshop, Jan 13-15 (2015) Galveston, Texas, USA

Yoshida, K, Kizu, A, Kitada, K, Hada, M, Eguchi-Kasai, K, Teramura, T, Suzuki H., Shimazu, T., Nagamatsu, A, Yano, S, Shirakawa, M, FA, Cucinotta, Morita, T. Evaluation of Space Radiation Effects to Mouse Embryonic Stem (ES) Cells Stocked in MELFI in ISS for Fourteen Months as "Stem CELLS" Project; Space Radiation and Heavy Ions in Therapy Symposium 2015, May 22-24, 2015 in Osaka, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 隆 (MORITA Takashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号: 70150349

(2) 研究分担者

吉田 佳世 (YOSHIDA Kayo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 30311921

木津あかね (KIZU Akane)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号: 30623201