

遺伝子改変マウスを用いた宇宙放射線の影響の解析

吉田佳世（大阪市大・院医）、稲富裕光（JAXA 宇宙科学研究所）、森田隆（大阪市大・院医）

Assessment of space radiation by using gene-modified mouse

Kayo Yoshida*, Yuko Inatomi, Takashi Morita

*Osaka City Univ., 1-4-3, Asahimachi Abeno, Osaka 545-8585

E-Mail: k-yoshida@med.osaka-cu.ac.jp

Abstract; It becomes more important to evaluate the influence of space radiation on human body or mammalian cells for the longer stay in space including missions to International Space Station (ISS), the moon of the earth, or Mars. In order to assess the effects of space radiation, we are planning to examine biological effect of space radiation using radiation sensitive histone H2AX-deleted mice living in ISS. To realize the project we investigated which organ was fitted for analysis of chromosomes. The cells from various organs, such as bone marrows, thymus, spleen, peripheral blood were collected from wild-type mice and their chromosomes were spread after culturing for 46 hrs. The chromosome spreads from bone marrow cells showed good images by microscope observation. The heterozygously histone H2AX-deleted mice were X-irradiated and their chromosomes samples were examined by FISH analyses. We detected 2.3% of abnormally translocated chromosomes using probes of chromosome 1, 2, and 4. In contrast, wild-type control mice with 2Gy X-irradiation and mutant mice without X-irradiation showed no aberration. Furthermore, we detected chromosome aberration after 7days of X-irradiation in heterozygously histone H2AX-deleted mice, indicating increased possibility of space experiment using living mouse in ISS about 1 month.

Key words; space radiation, mouse HistoneH2AX gene, chromosome aberration, International Space Station

1. はじめに

我々は、これまで国際宇宙ステーション内の「きぼう」実験棟内で凍結したマウス ES 細胞を長期間保存し、地上に回収後、染色体異常の解析などを行ってきた。凍結細胞では、約 4 年間、宇宙放射線に被ばくさせ、宇宙サンプルに染色体異常が経年的に蓄積することを明らかにした。しかし、この方法では細胞が凍結しているため、放射線による二次的効果が少なく、結果的に検出できるダメージが少なくなるという問題があった。また、細胞自身が常に DNA 損傷を修復していることや少ない線量を長期間に受けるという線量率効果も考慮しなければならない。

そこで、2016 年より「きぼう」実験棟内でマウスの長期飼育が可能となったことから、将来、宇宙放射線の影響を放射線に感受性の高いヒストン H2AX 遺伝子欠損マウス個体を用いて、解析することを目指し（図 1）、地上での条件設定を行うことを本研究の目的とした。

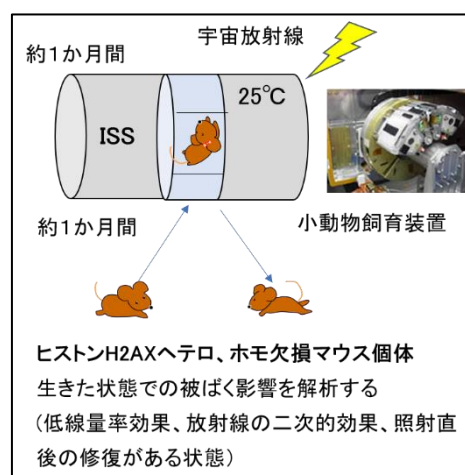


図 1. 想定される宇宙実験の計画

2. 実験計画

現在、マウスの宇宙実験は 1 か月程度の飼育期間のため、この期間内での宇宙放射線による染色体異常の検出ができるよう感度を上げる実験系の確立を目指した。そのため、DNA 損傷修復に関与することが知られ、放射線に感受性の高いヒストン H2AX 遺伝子欠損マウスを使用した。

2020 年度の計画

- ① マウス個体の染色体解析の可能な臓器の選定
- ② X線をヒストンH2AXヘテロ欠損マウスに照射後、染色体異常の検出条件を検討

3. 方法

①野生型の成体マウスから各種臓器の細胞を回収した。これらの細胞を T25 フラスコ (Falcon, Corning Inc. USA) を用い、IMDM 培地 (GIBCO, USA) で培養後、Colcemid (Karyomax, GIBCO, USA) により細胞周期を中期で停止させるとともに、Caliculin A (Fujifilm Wako, Japan) を添加し、休止期の染色体を凝集させた。細胞を固定、スライドガラスに展開しギムザ染色を行った。

②ヒストンH2AXヘテロ欠損マウス個体にX線を照射し、大腿骨と脛骨から骨髓細胞を採取し46時間培養後、固定・展開し、Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)法により、染色体解析を行った。1番染色体を緑色で、2番染色体を赤色で、4番染色体を黄色で染色し、Cytovisionにより解析を行った。また、X線照射後1週間飼育した後に骨髓細胞を採取し、同様に染色体解析を行った。

4. 実験結果

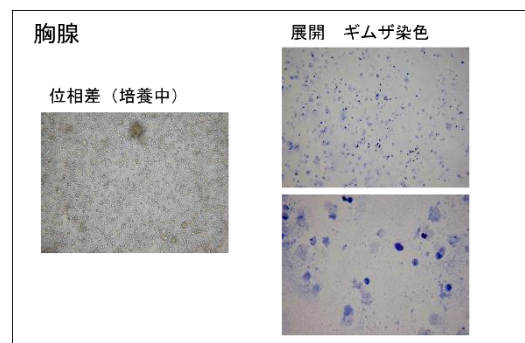
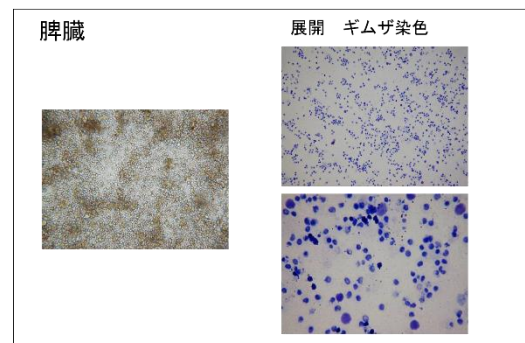
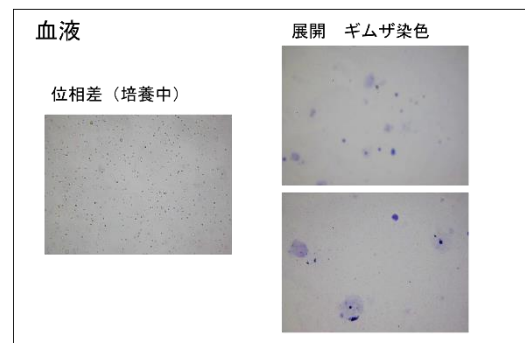
①マウス臓器の選択

マウス成体で細胞が増殖している臓器(参考文献1)として、血液、脾臓、胸腺、骨髓、精巣、肝臓、子宮、小腸から細胞を採取した(表.1)。

表 1. マウス個体からの細胞採取

臓器	摘出量	細胞数 (全体で5ml)	方法
血液	150ul	$6.0 \times 10^6/\text{ml}$	赤血球溶解
脾臓	1個	$1.1 \times 10^7/\text{ml}$	押しつぶし
胸腺	1個	$1.1 \times 10^7/\text{ml}$	押しつぶし
骨髓	大腿骨、脛骨	$6.9 \times 10^6/\text{ml}$	シリンジ
精巣	2個	$1.3 \times 10^6/\text{ml}$	トリプシン
肝臓	1葉	$1.2 \times 10^4/\text{ml}$	トリプシン
子宮	1個	$5.5 \times 10^5/\text{ml}$	トリプシン
小腸	1個	$4.0 \times 10^5/\text{ml}$	トリプシン

採取した細胞を 37℃, 5%CO₂ で 46 時間培養し、染色体標本作製しギムザ染色した。その結果、脾臓、胸腺では、形態の均一な B 細胞、T 細胞などのリンパ球が多く回収されが、培養後、死細胞が増加し染色体が展開している像が見られなかった。血液では、リンパ球の割合が少なく、小腸、肝臓、子宮などでは、トリプシン処理により、細胞を回収したが、細胞の回収が悪く、いずれも染色体像が検出できなかった。精巣では、減数分裂中の精母細胞の染色体像がみられたが、展開が十分でなく解析には適当でないと考えられた。骨髓から得られたリンパ球は培養後も生存率が高く、多くの染色体像がみられ、解析に適していることが分かった(図2)。



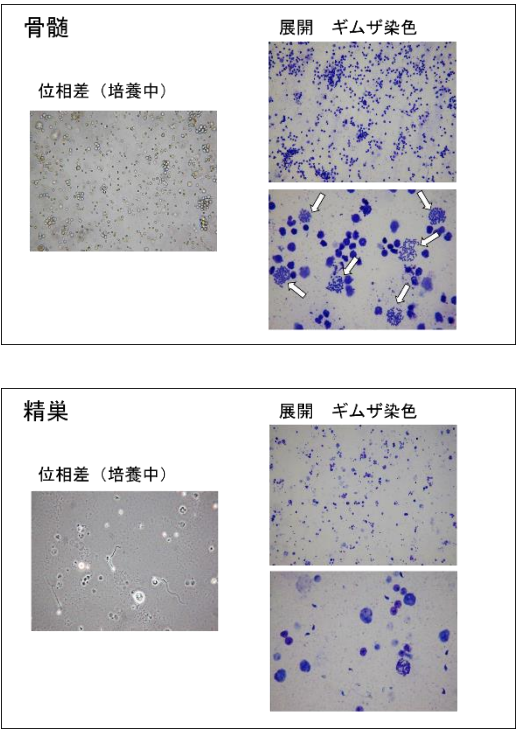


図 2. マウス個体からの採取細胞の位相差像と展開した染色体のギムザ染色像（血液、脾臓、胸腺、骨髓、精巣）
骨髓での白矢印は展開された染色体を示している。

以上の結果から、マウス個体からの染色体異常の検出には、骨髓からリンパ球の採取、培養後、固定し、FISH により染色体解析をすることがよいと結論した。

②ヒストン H2AX ヘテロ欠損マウス個体への X 線照射による染色体異常の解析

成体のヒストン H2AX ヘテロ欠損マウス全身に、X 線 2 Gy を照射し、骨髓細胞を 46 時間培養後、染色体を FISH で解析した。385 個の核の中で 9 個の染色体に転座などが観察された。一方、X 線照射しなかったサンプルからは、転座などは検出できなかった。また、野生型マウスでは 2Gy の X 線を照射しても染色体異常は見られなかった。以上のことから、ヒストン H2AX 遺伝子ヘテロ欠損マウスは、野生型マウスに比べて X 線に対する感受性が高く宇宙放射線を検出する個体として適していることが明らかとなった。また、

ヘテロ H2AX 欠損マウスに 2Gy の X 線照射から 7 日後に、骨髓細胞を採取して解析すると、染色体異常は照射直後とほぼ同じであることがわかった（表 2、図 3, 4）。

表 2. マウス個体への X 線照射による骨髓細胞の染色体異常の解析 (AST; 明確な転座、IT; 不完全な転座、ID; 不完全な二動原体、COM; 複雑な転座、DIC; 二動原体を示す)

遺伝子型	X 線	培養	核数	異常数	染色体異常の種類	割合	標準誤差
H2AX+/-	0Gy	照射直後 46時間	213	0		0	0
H2AX+/-	2Gy	照射直後 46時間	385	9	AST; 3 IT; 1 DIC; 1 ID; 1 COM; 3	0.023	0.008
H2AX+/-	2Gy	1週間後 46時間	467	11	AST; 10, IT; 1	0.024	0.007
H2AX+/+ 野生型	2Gy	照射直後 46時間	1039	0		0	0

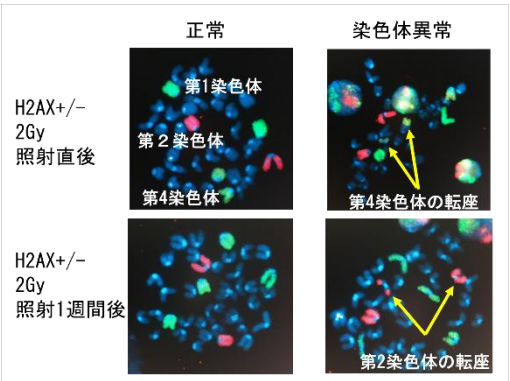


図 3. 染色体異常（転座）

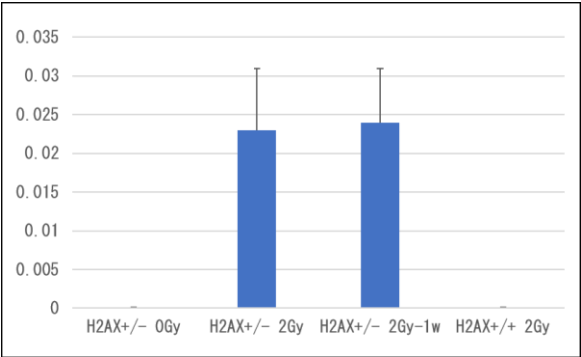


図 4. ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウスの X 線による染色体異常の割合

このことは、ISS での宇宙放射線の影響についてマウス個体の回収に約 1 週間必要であっても、染色体異常を検出できることを示しており、宇宙実験実現の可能性を支持すると考えられた。

5. 考察

ISS 内における宇宙放射線の物理的線量は、約 0.3-0.4mGy/day である。ISS 内で 1 か月間の飼育で受ける線量は、約 12.4mGy となる。今回の実験により H2AX ヘテロ欠損マウスの 2Gy の X 線照射による転座の割合が 0.023 であることから、ISS で受けると予想される染色体異常の割合は、0.00015 となる。一方、宇宙放射線が重粒子線を含むことから生物学的効果が X 線の 1.5-2.0 倍（線質係数）になると考えられる。さらに、ヘテロよりもホモの H2AX 遺伝子欠損マウスを用いれば、その数倍（例えば 5 倍）の感度上昇が期待できると仮定すると 0.0015 となる。この場合、5000 個の核を数えて 7.3 個の染色体異常が検出できる（表 3）。

表 3. 宇宙での放射線量と検出の予測

	全吸収線量	全線量当量	全日数	吸収線量率	線量当量率	Q(線質係数)
	mGy	mSv	days	mGy/day	mSv/day	Q
「きぼう」船内	-	-	-	0.319	0.618	1.95
火星フライト (Zeitlin)	173	660	360	0.481	1.84	3.82

ISSにおける宇宙実験で検出できる染色体異常の予想

$$11/467 \times 1/2Gy \times 12.4/1000 \times 2.0 \times 5 = 0.0015$$

H2AXヘテロマウスX線2Gy X線1Gyでは ISS内の1か月の吸収線量では12.4mGy/月 宇宙線の線質をX線の2倍とする ヘテロからホモへの感受性増加予想 5000個の核に7.3個の染色体異常が検出できる

このことから、マウス個体を ISS に打ち上げて、1 か月後に、その影響を染色体異常として検出し、そのリスクを評価することが可能であると考えられる。また、宇宙実験で得られる結果から逆に ISS における宇宙放射線の線質係数のような係数を計算することが可能になると考えられる。また、このような方法を用いて、宇宙放射線の分布と生物への影響の関係を明らかにし、将来、深宇宙など宇宙のそれぞれの場所における宇宙放射線のリスクを計測あるいはシミュレーションにより表示することが重要であると考えられる。

6. 学会発表・発表論文 等

吉田佳世、稲富裕光、森田 隆「遺伝子改変マウスを用いた宇宙放射線の影響の解析」宇宙環境利用シンポジウム（第35回）2021年1月19-20日、オンライン

7. その他

参考文献

1) Ymamamoto, A., Taki, T., Yagi, H., Habu, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Yamamoto, K., Matsushiro, A., Nishimune, Y., Morita, T.; Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Mol Gen Genet* 251, 1-12 (1996)

謝辞

本研究は、2020 年度 宇宙環境利用専門委員会フロントロディング研究として支援を受け実施した。