

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), 小久保 年章 (量研機構), 森田 隆 (大阪市大・院), 稲富 裕光 (JAXA)

Assessment of space radiation by using gene-modified mouse

Kayo Yoshida*, Toshiaki Kokubo, Takashi Morita, Yuko Inatomi

*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 mammals 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 sensitized histone H2AX-deleted mice living on ISS. To realize the space experiment, we irradiated the histone H2AX heterozygous deficient mice by accelerator HIMAC in Chiba. We used Carbon and Silicon heavy ion beams for the experiments. After irradiation mice were fed for 1-week and bone marrow cells were isolated. The cells were analyzed for their chromosome aberrations by fluorescence in situ hybridization techniques. The results showed that the irradiation by 1 Gy of irradiation by Silicon ion yielded 15 chromosome aberration in 1,010 cells, and that by Carbon ion beam resulted in 3 chromosome aberration in 1,027 cells. From these result we concluded that the method of irradiation of mouse and chromosome analyses is fit for risk assessment of space radiation, even though more the 50,000 cells must be examined for detection of chromosome aberrations in ISS for 1 month.

Key words; space radiation, mouse Histone H2AX 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(文献 1)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。

また、2016 年より「きぼう」実験棟内で、微小重力下と回転による 1G の重力下の両方で、マウスを飼育できる極めて優れた小動物飼育装置を用いてマウスの長期飼育が可能となった。我々は、将来、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、微小重力下と 1G の環境下での宇宙放射線影響を解析することを目指し(図 1)、地上で実験条件の設定を行うことを本研究の目的とした。

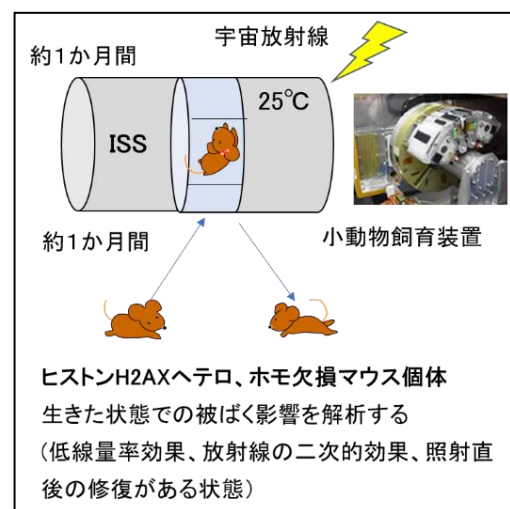


図 1. 想定される宇宙実験の計画

2. 実験計画

現在、マウスの宇宙実験では 1 か月程度の飼育が限界であるため、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

れているヒストン H2AX 遺伝子を欠損(ヘテロ)させることにより放射線に感受性を高めたマウスを使用した(文献2)。また、宇宙実験ではマウス飼育後、解析までに日本への輸送などを考慮し、照射後 1 週間飼育した後、骨髓細胞を採取し解析することとした。

2021 年度の計画

ヒストン H2AX ヘテロ欠損マウスに国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構(量研機構)の重粒子線照射装置(HIMAC)でシリコン(Silicon; Si)線および炭素(Carbon; C)線の重粒子線を照射後、骨髓細胞の染色体異常を検出する。

3. 実験方法

- ①ヒストン H2AX ヘテロ欠損マウス個体(8 週令以上、雌)をアクリルケースに入れ、HIMAC で、シリコン線(490MeV/u)、炭素線(290MeV/u)のエネルギーで 0、0.002、0.1、1.0 Gy で照射した。照射後、量研機構で飼育した。
- ②重粒子線で照射後、1 週間飼育したマウスから骨髓細胞を採取し 46 時間培養後、コルセミドによる M 期停止、カリキュリン A による G1,G2 期の染色体凝集を行った。細胞を固定、スライドガラスに展開し、Fluorescence *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 のソフトにより解析を行った。

4. 実験結果

マウス H2AX 遺伝子ヘテロ欠損個体への重粒子線照射と染色体異常の頻度の解析

HIMAC でシリコン線、炭素線を照射したヒストン H2AX ヘテロ欠損マウス個体を 1 週間飼育後に、骨髓細胞を採取し 46 時間培養後作成した染色体標本について FISH を用いて染色体異常を解析した。染色体異常は、明らかな染色体の 1 か所の転座(Apparently simple translocation; AST)、不完全な染色体転座(Incomplete Translocation)、二動原体(Dicentric; DIC)、不完全な二動原体(Incomplete Dicentric; ID)、複雑な染色体転座(Complex translocation; COM)に分類して表した。それぞれのサンプルは 1000 個以上解析し、異常染色体の頻度を計算した(表 1.)。シリコン線、炭素線ともに、0, 0.02, 0.1Gy のいずれの線量でも染色体異常は検出できなかった。しかし、1Gy の照射では、シリコン線では、1072 個のうち 15 個、炭素では、1010 個のうち 3 個の染色体異常を認めた。

表 1. ヒストン H2AX ヘテロ欠損マウスへの重粒子線照射後の染色体異常頻度

個体遺伝子型 重粒子線 線種	照射 線量	計測 個数	転座の合計 Total translocation	単一の転座 Apparently simple translocation (AST)	複雑な転座 Complex translocation (CT)	不完全な 転座 Incomplete translocation (IT)	二動原体 Dicentric (*incomplete) (DIC+ID)
H2AX+/- control	0	1266	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
H2AX+/- Si	0.02	1009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
H2AX+/- Si	0.1	1083	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
H2AX+/- Si	1	1072	0.014	0.002	0.001	0.011	0.0000
H2AX+/- C	0.02	1009	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
H2AX+/- C	0.1	1042	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
H2AX+/- C	1	1010	0.003	0.0000	0.0000	0.003	0.0000

また、1Gy の照射による染色体異常を分類した結果を示した(図2.)。シリコン線での染色体異常を示す 15 個の異常の内、ほとんどが不完全な染色体転座であり、明らかな単一の染色体転座や複雑な染色体転座がわずかにみられた。複雑な染色体転座は線エネルギー付与(LET)の高い放射線による影響の特徴を表していると考えられる。炭素線については、不完全な染色体転座のみが見られた。

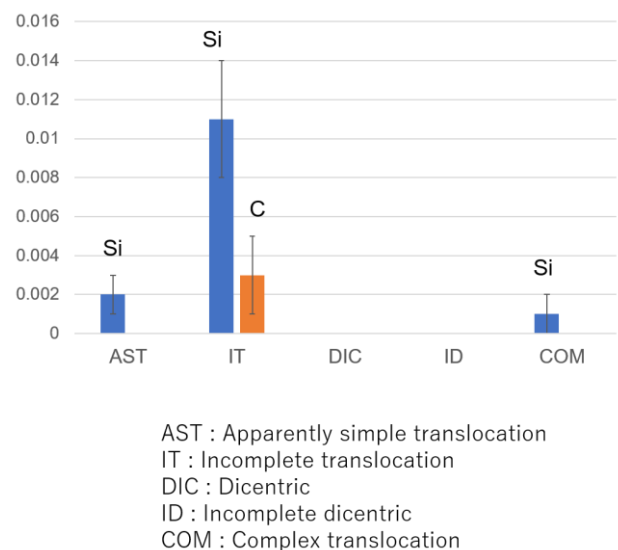


図 2. 重粒子線による H2AX ヘテロ欠損マウスでの染色体異常の種類

さらに、染色体異常のデータをグラフで示した(図 3.)。横軸には照射した吸収線量を Gy で表し、縦軸には、染色体異常の出現頻度を表している。0, 0.02, 0.1Gy のいずれの線量でも染色体異常は検出できなかったが、1Gy の照射では、シリコン線では、1072 個のうち 15 個、炭素では、1010 個のうち 3 個の染色体異常を示した。図 3 で示されたデータをもとに近似直線を描くと、その傾きがシリコン線では、0.014、炭素線では 0.0031 の数値が得ら

れた。これらの数値は、線種による生物影響の違いを表していると考えられた。また、1か月間に ISS で受ける物理学的宇宙放射線の線量(吸収線量)は、JAXA の永松博士らの実験から 1 日約 0.39Gy/day とすると、0.012Gy/month となる(文献 3)。この値を矢印で示した。この図からも明らかなように、1000 個の細胞の核から ISS における宇宙放射線の染色体への影響を 1 か月間で検出することはむずかしいことが示された。一方、シリコン線と炭素線の線種あるいは LET の値に依存して染色体異常の頻度が反映していることから、このような測定が生物学的影響の評価に有効であることが確かめられた。

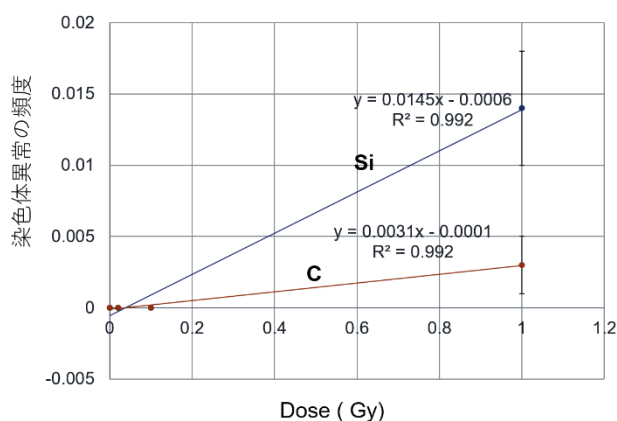


図 3. 重粒子線による H2AX ヘテロ欠損マウスでの染色体異常の発生頻度

5. 考察

永松博士らにより 2008 年 6 月 1 日から 2009 年 3 月 17 日までに ISS 内の 12 か所の測定の実験値は、吸収線量で 0.319Gy/day で ICRP60 勧告書による線質係数から計算された生物学的な影響である線量当量は 0.618mSv/day であることが報告されている(文献 3)。このとき ISS 内の宇宙放射線の線質係数は、1.94 と計算された。このことから ISS での宇宙放射線による生物影響は、ICRP60 勧告により線質係数が 1.96 と計算された炭素線に近いと考えられる。そこで、炭素線による染色体異常に関する今回の結果をもとに、宇宙実験での染色体異常の検出確率を予想すると、ISS 内でマウス個体を 1 か月間、飼育した場合 50,000 個の核を解析すれば、約 1.8 個の異常が検出されると期待される。この場合、サンプルとなる細胞は 1 匹のマウスから十分採取することが可能であり、実際に解析する核の数を増やすこと、さらに技術的に解析することは可能である。したがって、現在のマウス個体を用いた実験系をそのまま用いれば、宇宙放射線のマウス個体への生物学的影響測定(線量当量を

求めること)が可能であると考えられる。さらに、1G の重力下での 2~3 匹のヒストン H2AX ヘテロ欠損マウスを飼育することにより、微小重力と宇宙放射線の生物学的影響についての知見を得ることも可能であると考えられる(表 2.)。さらに、ISS 内では、宇宙放射線を低線量率で連続的に受けるため、低線量率による効果の低減が予想される。この線量線量率効果の係数(dose and dose-rate effectiveness factor;DDREF)を ICRP60 勧告に基づいて 2.0 とすれば、生物学的効果は急性効果の 1/2 となり、本研究の場合、10 万個の核の染色体の中に 1.8 個の染色体異常が観察されると予想される。このような条件での実験も可能であるが、より正確に行うために、FISH プローブを増やし染色体異常を検出する染色体の種類を増やすことが検出に有効である。また、現在使用しているヒストン H2AX 遺伝子ヘテロ欠損マウス放射線により感受性が高いと考えられるヒストン H2AX ホモ欠損マウスを用いて検出することも有効であると考えられる。

表 2. 宇宙空間における宇宙放射線量と染色体異常検出に必要なサンプル数

	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	1.94
火星フライト (Zeitlin et al.)	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

$$\frac{3}{1010} \times \frac{0.012\text{Gy}}{(\text{C}; 1\text{Gy})} = \frac{1.8}{50,000}$$

50,000個の核に5.7個の染色体異常が検出できる

6. その他

学会発表・発表論文等

- 吉田佳世、小久保年章、森田 隆、稲富裕光「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 36 回) 2022 年 1 月 18-19 日、オンライン
- 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

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)
- 2) Yoshida, K., Morita, T. Control of radiosensitivity of F9 mouse teratocarcinoma cells by regulation of histone H2AX gene expression using a tetracyclin turn-off system, *Cancer Res.* 12, 4131-4136 (2004)
- 3) Nagamatsu, A., Kamigaichigek, S., Masukawa, F., Tawara, H., Hayashi, T., Masaki, M., Kumagai, H. Space radiation dosimetry by a combination of CR-39 and TLD, *Biol Sci Space.* 14 178-179 (2000)

謝辞

本研究は 2021 年度宇宙環境利用専門委員会フロントローディング研究として支援を受け実施した。