

マウス ES 細胞を用いた宇宙環境の影響の解析

吉田佳世(大阪市大)、秦 恵(USRA, USA)、寺村岳士(近畿大)、吉田周平(大阪市大)、
笠井(江口) 清美(放医研)、島谷(宮國) 美津穂(大阪市大)、鈴木ひろみ(JSF)、嶋津徹(JSF)
福井啓二(JSF)、渡邊郁子(JAMSS)、笠原春夫(JAMSS)、矢野幸子(JAXA)、谷垣文章(JAXA)
F. A. Cucinotta(NASA)、森田 隆(大阪市大)

Study on the effects of space environment using mouse ES cells

K. Yoshida, M. Hada, T. Teramura, S. Yoshida, K. Eguchi-Kasai, M. Miyaguni-Shimatan, H. Suzuki
T. Shimazu, K. Fukui, I. Watanabe, H. Kasahara, S. Yano, F. Tanigaki, F. A. Cucinotta, T. Morita*

*Department of Molecular Genetics, Osaka City University, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka
545-8585 Japan

E-Mail; tmorita@med.osaka-cu.ac.jp

Abstract: It is important to estimate the influence of space radiation on the human body during longer stays in space including missions to ISS, the Earth's moon, or Mars.

We are planning to launch frozen mouse embryonic stem (ES) cells to estimate radiation effects in space. The frozen ES cells are found to be resistant to radiation including high energy Fe particles ion beam, so that we sensitized the frozen cells by making DNA repair-deficient mouse ES cells. The histone H2AX gene is involved in signaling and repair of DNA double-strand breaks. We found the deletion of the gene sensitized the ES cells to radiation. Therefore a shorter exposure time will be required to detect influence of space radiation to ES cells including cell viability and chromosome aberration using H2AX-deficient ES cells.

Keywords; Space experiment, International Space Station, ES cells, Stem cells, Radiosensitivity,

はじめに

宇宙での長期有人活動において、宇宙放射線の人体への影響を調べることは重要である。とくに、哺乳動物の発生や生殖に関する影響はこれまであまり解析されていない。しかし、現時点では、宇宙にマウスなど哺乳動物を打ち上げて、その影響を長時間観察することはむずかしい。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、数か月から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、2012 年末からの[Stem Cells]プロジェクトとして宇宙実験を予定している。

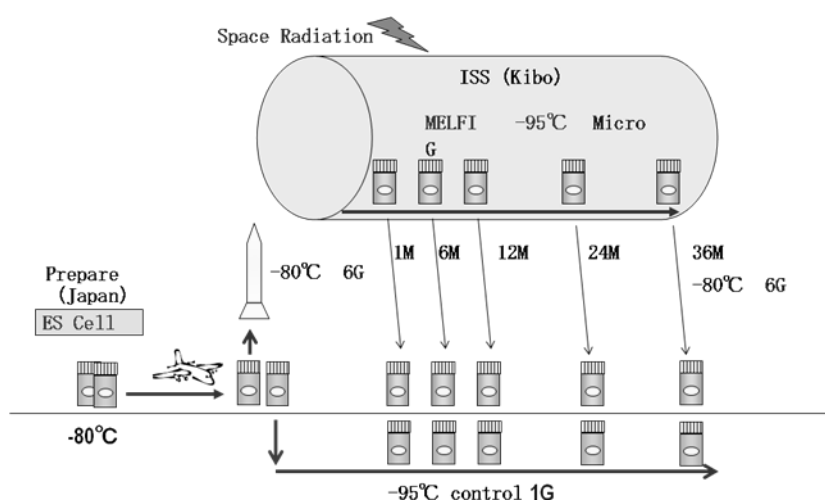


Fig.1. This is a design of our space experiment. We plan to launch frozen mouse ES cells to ISS (International Space Station). We will keep the cells in MELFI at -95 °C for months or years.

After bought back, the ES cells will be examined their viabilities, DNA damages, chromosome aberrations.

実験結果

我々は、マウス ES 細胞を打ち上げ、長期間国際宇宙ステーション(ISS)内にある冷凍庫(MELFI)に凍結保存し、それを半年、1年、2年経過した後、地上に

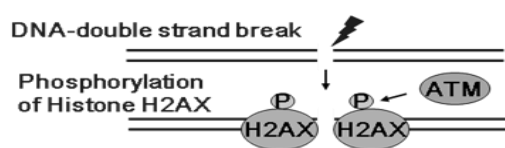
戻して、地上で保管したものと、その影響、とくに宇宙放射線の影響について解析する。

しかし、すでに、我々の研究から、-80°Cで凍結したマウス ES 細胞は、37°Cで培養している細胞より、

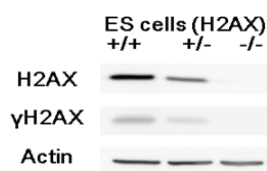
Fe イオン線など重粒子線も含めて、放射線に対する感受性が低いことがわかった。

ISS 内での宇宙放射線による被曝線量は、一日 0.4-1mSv と予測されている。このことは、1 年で、146-365 mSv で、2 年では、292-730 mSv となる。地上実験では、0.4Gy の線量で、凍結した野生型 ES 細胞への影響がでることから、このままでも検出が可能である。しかし、より短期間で、あるいは十分な差をだすために、DNA 修復系遺伝子を欠損したマウス ES 細胞を作製し、用いることが有益である。

(A) Role of Histone H2AX



(B) Histone H2AX Knock-out



(C) Fe-ion Sensitivity of ES cells

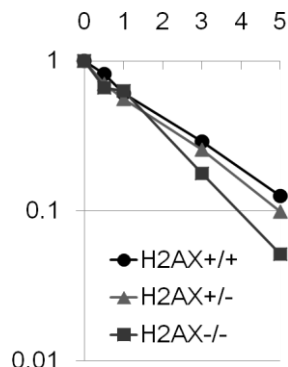


Fig.2. (A) Histone H2AX is phosphorylated by ATM kinase near DNA double-strand break regions of chromosomes. (B) Western blot analysis of Histone H2AX proteins.

(C) Radiosensitivity of Mouse ES cells (H2AX+/+, +/-, -/-) frozen at -80°C were exposed to Fe-ion (HIMAC, 500 MeV), and they were cultured at 37°C for a week. Numbers of colonies formed were counted.

そこで、我々は、マウスヒストン H2AX 遺伝子欠損したマウスを作製した。ヒストン H2AX 遺伝子は、放射線による DNA 二重鎖切断が起こるとその近傍で ATM によりリン酸化される。この部分に Mre11, Rad50, NBS1 などのタンパクが結合して、DNA 末端が単鎖と

なり、次に、Ku70, Ku80, DNAPKcs, ERCC4, Lig4 などにより、非相同末端結合 (NHEJ) が起こって再結合したり、また、Rad51, Rad52 などにより相同組換え (HR) が起こったりして DNA が修復される (図 2A)。

我々は、ヒストン H2AX 遺伝子の一方を欠損したヘテロマウス (+/-) を交配させた雌マウスからその初期胚を採取し、培養することにより、種々の遺伝子型 (H2AX+/+, +/-, -/-) を持つマウス ES 細胞を樹立することができた。これらの細胞から、タンパクを抽出し、ウェスタンブロットにより、遺伝子欠損によるタンパクの減少 (+/-) と欠失 (-/-) が認められた。また、リン酸化ヒストン H2AX に対する抗体 (γH2AX) 染色からも、同様の結果が得られた (図 2B)。

得られた H2AX 遺伝子欠損マウス ES 細胞を用いて、放射線に対する感受性への影響を解析した。マウス ES 細胞を -80°C に凍結し、Fe、イオン線を照射し、その後、37°C で培養した。1 週間培養後、コロニー形成したものの数をギムザ染色後、計数した。

その結果、野生型に対して、H2AX 遺伝子ヘテロ欠損型ではややコロニー形成能は落ちるものの、ほぼ同様の感受性であるのに対して、H2AX 遺伝子を欠失したホモ ES 細胞では、図 2C に示すように、感受性が野生型、ヘテロ型に比較して高まることが分かった。

これらのことから、我々は、ヒストン H2AX 遺伝子欠損マウス ES 細胞を宇宙実験に用いれば、より感度高く放射線の影響を解析することができると考えられる。今回のように細胞のコロニー形成能だけでなく、染色体の異常もこのような遺伝子欠損 ES 細胞をもちいることで感度良く検出できると考えている。現在さらに、感受性が上がると予想される非相同結合末端修復にかかわる Ku80 遺伝子欠損マウスを得ており、これから Ku80 遺伝子欠損 ES 細胞を作製し、同様の効果を検討する予定である。

謝辞

本実験における凍結ヒストン H2AX 欠損 ES 細胞への照射実験は、放射線医学総合研究所重粒子線共同研究として HIMAC で行われた。本研究は、JAXA の委託により、日本宇宙フォーラムからの共同研究費で実施された。

発表

1. Yoshida K., Yoshida S., Kasai K. and Morita T. (2010) Biol. Sciences Space 24, 11-15.
2. Yoshida, K. Hada, M. et al. 18th IAA Humans in Space Symposium 2011, April, Houston, USA
3. Takashi Morita., et al. 14th International Congress of Radiation Research, 2011, Sept Warsaw, Poland, ,
4. Yoshida, K., Hada, M. et al. 2011, 22nd Annual NASA Space Radiation Investigators' Workshop Texas,
5. Yoshida, K., et al. Increase of chromosome aberration by Fe ion irradiation in Histone H2AX-deficient mouse ES cells 宇宙生物科学会第 25 回大会 2011, Sept, Yokohama