

ヒト線維芽細胞における重粒子線と微小重力の複合影響による遺伝子発現解析

池田 裕子 (群大), 村谷 匡史 (筑波大), Anggraeini Puspitasari (群大),

Kathryn D. Held (群大), 日出間 純 (東北大), 吉田 由香里 (群大), 高橋 昭久 (群大)

Gene expression analysis of human fibroblasts after combined exposure to heavy-ions and simulating microgravity

Hiroko Ikeda, Masafumi Muratani, Anggraeini Puspitasari, Kathryn D. Held, Jun Hidema,

*Yukari Yoshida, Akihisa Takahashi**

* Gunma University Heavy Ion Medical Center, Maebashi, Gunma 371-8511

E-Mail: a-takahashi@gunma-u.ac.jp

Abstract: Astronauts are constantly exposed to microgravity and space radiation including high-energy charged particles, during long-term stays in space. However, many aspects of the biological effects of combined microgravity and space radiation remain unclear. In the field of space biology, it is presently difficult to investigate the combined effects of microgravity and radiation because of the restricted nature of space experiments and replicate experiments. In 30th symposium 2016, we reported the concept of new devices that analyze the combined effects of radiation and microgravity. We report here the development and performance evaluation of three-dimensional (3D) clinostat-synchronized heavy-ion irradiation systems. The systems could irradiate rotating samples using the 3D clinostat simultaneously with samples in a horizontal position. The samples were completely irradiated by the flatness and symmetry of the irradiation fields. Doses calculated using the Carbon-ion calibration curve were almost the same for standing and rotation conditions, with the difference being less than 5% under the assumption of 1 Gy irradiation. It was possible to maintain a suitable temperature under atmospheric conditions. Live imaging revealed that cellular adhesion and growth were almost the same for the standing control sample and rotation sample over 48 h.

Next, the purpose of our study is to obtain data on comprehensive gene expression for the combined effects of radiation and simulated microgravity using a newly developed system to provide information for the assessment and management of human health risks in space. Normal human fibroblasts 1BR-hTERT cells were cultured with CO₂-independent medium in a disposable closed cell culture chamber on a static stage (standing) or the 3D clinostat (rotation). The 3D clinostat synchronized carbon-ion (290 MeV/n, 50 keV/μm) irradiation of 1 Gy was performed without stopping rotation. The cells were maintained in standing or rotation condition for 3 or 24 h after carbon-ion irradiation as part of a total culture time of 2 days. Gene expression was analyzed at Tsukuba i-Laboratory LLP. Under the rotation conditions for 3 h treatment after irradiation, 27 or 1 genes were up-regulated by the independent effect of radiation or microgravity, respectively. In addition, 11 genes were up-regulated by the combined treatments. Meanwhile, 22 or 13 genes were down-regulated by the independent effect of radiation or microgravity, respectively. Under the rotation conditions for 24 h treatment after irradiation, up- and down-regulated gene expression was observed for 23 and 28 genes, respectively, after exposure only to combined treatments. We are now able to determine the gene expression profile of normal human fibroblasts exposed to heavy-ion irradiation and/or microgravity.

In future, this information by clarifying genetic roles that can be expected to have a greater role in space radiation biology. In addition, using the newly developed system, we can replicate experiments to obtain biological data and mechanisms of the combined effects.

Key words; space radiation, heavy-ion, microgravity, combined effects, gene expression

1. はじめに

宇宙空間は生物効果の高い重粒子線(一粒子でも飛跡に沿って DNA を切断する)を含めて線質の異なる混合放射線が、低線量・低線量率で降り注いでいる。また、微小重力環境であり、月や火星では地上の 1/6, 1/3 の重力環境である。宇宙における人類の健康リスクを正しく評価し、管理するためには、微小重力下の放射線に対する複合影響について、基盤的知見を取得する必要がある。しかしながら、宇宙実験を繰り返し実施することは困難であるため、宇宙放射線と重力環境変化との複合影響は、未だ不明な点が多い。

本研究では、搭載試料が重力刺激を受ける前に、直交する2軸により3次元回転させて重力方向を連続的に変化させることで、重力影響をキャンセルすることが可能な3Dクリノスタットを用いて、地上で宇宙環境を模擬した疑似微小重力環境の下、インキュベータの外で、搭載試料が水平に位置したときのみ試料に対して炭素線同期照射することが可能なシステムを新規開発し、この装置を用いて、重粒子線と微小重力の複合影響により発現が変動する遺伝子を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法：

3D クリノスタット(Advanced Engineering Services Co. Ltd., Ibaraki)を用いて、群馬大学における重粒子線がん治療の炭素線加速器(290 MeV/n, Linear Energy Transfer (LET) = 50 keV/μm)および呼吸同期照射システムと組合せて、炭素線同期照射システムを開発した。同期能はオシロスコープで測定した。また、3D クリノスタットの対照装置として、1G 環境の静置固定装置(AES)を作製した。密閉培養容器 DCC (Chiyoda Co., Kanagawa) の特殊形状に合わせて、試料ホルダー(Konno Co., Tokyo)を作製し、温度制御能を測定した。さらに、ライブイメージングを用いて、ヒト正常線維芽細胞(1BR-hTERT 細胞)の増殖速度および形態変化の比較による生物学的検証と、ガフクロミックフィルムの黒化度変化を指標に、照射試料における線量の平坦度および線量分布の対照性について物理学的検証を行った。

さらに、ヒト正常線維芽細胞を静置固定装置に2日間セットした①非照射、②炭素線 1 Gy 同期照射後 3 時間、③炭素線 1 Gy 同期照射後 24 時間、3D クリノスタットに2日間セットした④非照射、⑤炭素線 1 Gy 同期照射後 3 時間、⑥炭素線 1 Gy 同期照射後 24 時間のサンプルにつき、RNA を抽出し、RNAseq を i-Laboratory LLP (筑波)にて実施した。

3. 結果：

回転および静置の両システムにおいて、3D クリノスタットの回転センサーの情報から、搭載試料が水平に位置したときのみ同期照射(1分おきに0.2秒照射)を可能にした。加えて、試料への均一な熱伝導と安定的な温度制御も実現した。3D クリノスタット上で回転した細胞と静置

固定台上の細胞を経時的に約2日間モニタリングしたところ、細胞増殖や接着性および形状について両者に大きな変化は見られなかった。さらに、ガフクロミックフィルムの黒化度変化から、回転試料および静置試料ともに照射野内に試料配置領域が十分に含まれており、両者とも線量の平坦度と線量分布の対照性に有意な差がないことが分かった。3D クリノスタットと静置固定台上のガフクロミックフィルムに炭素線 1 Gy を照射した場合、校正曲線から算出した線量の差は回転と静置間で5%以下の誤差であり、正確な照射ができ、同期照射の精度に問題はなかったことが証明された。

複合影響で炭素線同期照射3時間後および24時間後に11および23遺伝子が発現増加し、その内、3つの遺伝子が共通であった。同様に、5および28遺伝子が発現減少し、その内、一つの共通な遺伝子を見出した。

4. 考察：

地上において大気条件下で適切な温度を保ちながら、疑似微小重力環境の下、正確に放射線照射可能な3Dクリノスタット炭素線同期照射システムを新規開発した。また、本システムを用いて、微小重力下の放射線に対する複合影響を解析した。データの解析については詳細な検討が必要ではあるが、繰り返すことに制限があった宇宙実験の結果を検証できるだけでなく、遺伝子発現変化のあった遺伝子のはたらきを調べることで、放射線と微小重力の生物影響を予測することも可能となるであろう。新たな知見を取得するための有効なツールとして宇宙生物学での貢献が期待される。

さらに、我々はX線同期照射システムを新規開発しており²⁾、この装置とも比較することで、将来的に生物学的効果比を取得できる可能性がある。

参考文献

- 1) Ikeda, H., Souda, H., Puspitasari, A., Held, K.D., Hidema, J., Nikawa, T., Yoshida, Y., Kanai, T. and Takahashi, A.; Development and performance evaluation of a three-dimensional clinostat synchronized heavy-ion irradiation system: *Life Sci. Space Res.*, in press.
- 2) Ikeda, H., Souda, H., Puspitasari, A., Held, K.D., Hidema, J., Nikawa, T., Yoshida, Y., Kanai, T. and Takahashi, A.; A new system for three-dimensional clinostat synchronized X-irradiation with a high-speed shutter for space radiation research: *Biol. Sci. Space*, 30, 8-16 (2016).