

万能細胞 (ES, iPS 細胞) を用いた宇宙環境が哺乳動物細胞の発生と生殖細胞に及ぼす影響の研究

森田 隆¹、吉田 佳世¹、吉田 周平¹、笠井清美²

¹大阪市立大学大学院医学研究科遺伝子制御学、

²放射線医学総合研究所生体影響機構研究グループ

The Study of Environmental Effect of Space to Mammalian Development and Germ Cell by Using ES or iPS Cells

Takashi Morita¹, Kayo Yoshida², Shuhei Yoshida², Kiyomi Kasai²

¹Department of Molecular Genetics, Osaka City University, Graduate School of Medicine,

²Radiation Effects Mechanism Research Group, National Institut of Radiation Science

E-mail: tmorita@med.osaka-cu.ac.jp

Abstract: As International Space Station (ISS) has been completed, long-term space flight and stay have become a reality. But, space is full of space radiation, so that it is extremely important to analyze the influence of radiation to human body. In order to elucidate the effect of space radiation, we planned to launch ES cells or iPS cells to space in frozen state. After exposing for months or a year in space, the cells will be returned to the ground and will be microinjected to mouse 8-cell stage embryos to examine their development in vitro and in vivo by transplanting to pseudopregnant mouse uterus. The results will be compared and extrapolated to human case.

【研究目的と意義】

国際宇宙ステーションの日本の実験棟「きぼう」も完成し、宇宙で日本人が長期間活動し、月探査することも現実となってきた。しかし宇宙空間は電離放射線や粒子線などが交錯する空間であり、それらの影響からヒトを守るため、生物への影響を解析し、予測し対策を立てることは極めて重要

である。とくに宇宙空間で子孫を増やせるかどうかは長期的な宇宙滞在を考える上で非常に重要な問題である。宇宙線による哺乳動物の生殖細胞への影響は、不妊、流産、先天性異常児の出産の原因となると考えられるため、我々は、宇宙線による受精卵から初期発生、さらに個体発生に至る過程に対する影響を解析する。

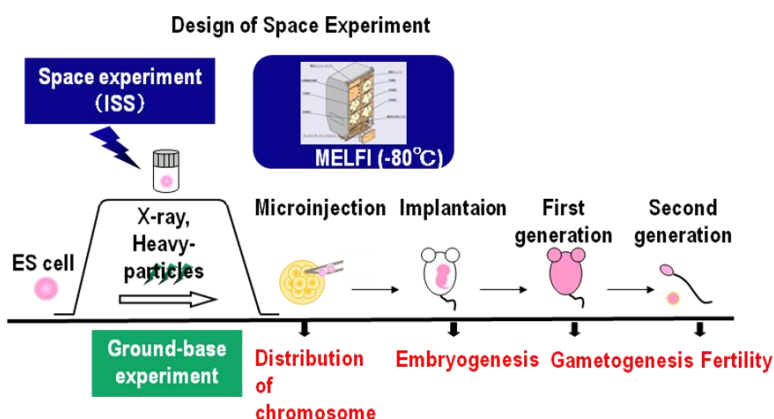


Fig. 1. Design of Space Experiment
ES cells or iPS cells will be frozen and launched into space. Half of the samples will be returned to the ground soon, and the rest will be stored for several months. After their return, both of the cells will be microinjected to embryos and their development will be examined.

【想定する実験と解析項目】

実際に宇宙環境で哺乳動物の個体を用いて生殖細胞への宇宙放射線の影響を検討するのが最も適切な方法である。しかし、現時点でマウス個体を宇宙ステーションで長期間飼育し実験することは困難である。そこで、我々は、ES、iPS細胞を宇宙ステーションに凍結した状態で打ち上げる。そして長期間宇宙空間のなかで凍結状態で宇宙放射線に被曝した後、細胞を再び地上に戻し、発生工学的手法によりマウス個体に戻して宇宙放射線の影響を解析することが有効であると考え（図1）。このように万能細胞は個体にすることが可能である点が優れているが、さらに、このような細胞の放射線に対する感受性を増加させるため、DNA損傷に関与する遺伝子を欠損させる相同組換えが利用できることも有利である。

このようなシステムを用いながら、図2に示すような項目について解析していく予定である。まず、ES細胞のDNAに対する損傷をヒストンH2AXのリン酸化で解析する。さらに胚へのマイクロインジェクションにより*in vitro*で培養し、胚盤胞までの発生が進行するか解析する。つぎに正常に胚盤胞を形成した胚については、偽妊娠マウスの子宮に移植し、その後の個体発生を追跡する。実際には、20日後の誕生が自然分娩であるか、帝王切開が必要であるか、さらに吸収胚や異常な胚が多いかなどを検討する。また、正常に生まれた場合についても、生殖細胞が正常に発生し、不妊とならないか、染色体の以上やがんの発生が上昇しないかなど検討する予定である。宇宙放射線は低線量で長期に被曝することが問題であり、このように継世代にわたって追跡することが重要であると考えられる。我々の考案したES細胞を用いた系は受精卵の発生を模倣的に再現するものであるが、少しでも、哺乳動物の発生や生殖に対する宇宙放射線の影響を定量的に評価ができれば、宇宙飛行士などの安全基準が策定され、将来の有人月探査や火星探査、さらに移住など長期的な安全性と防御対策に大きく貢献できると考えられる。

【マウス受精卵に対する放射線の影響】

宇宙放射線の哺乳動物の初期発生への影響を調べる際に、ES細胞でなく、正常なマウス胚への影響を調べておくこと、とくに、宇宙線のなかでも生物学的効果が高い重粒子線に対する影響を解析することは重要である。我々

は、マウス8細胞期胚にX線、Feイオン線を照射したのち、*in vitro*で発生を観察した。その結果、X線照射に対して、Fe鉄イオン線のほうが、影響が強く、1から3Gyで正常な胚盤胞が顕著に少なくなることが分かった。一方、異常な胚が増加することも明らかとなった（図3）。

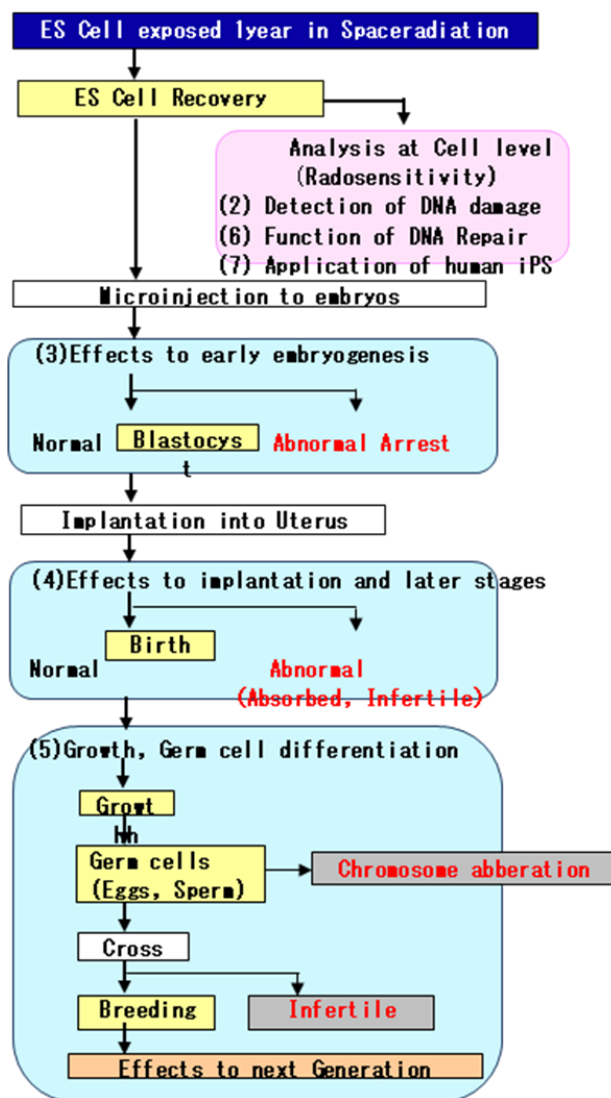


Fig. 2. Analyses of Irradiated ES Cells in Space

ES cells or iPS cells returned from space will be analysed by immunostaining by gamma-histone H2AX antibody to detect the DNA breaks. The cells will be microinjected to examine their developmental capability. The neonates will be analysed their sterility and chromosome aberration.

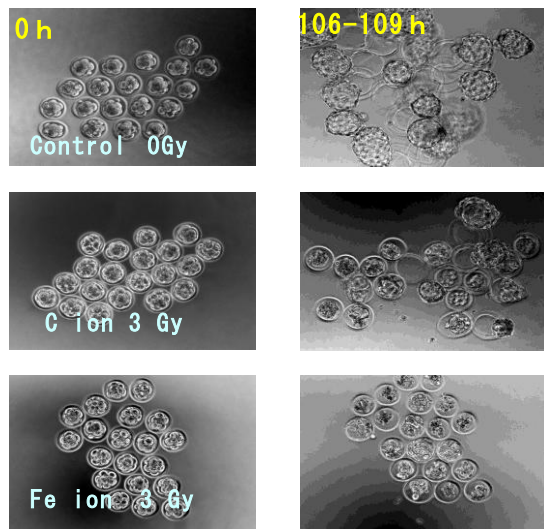


Fig. 3. Influence of X-ray, C ion, and Fe ion beams to mouse 8-cell stage embryos.

8-cell embryos were irradiated with X-ray, C ion, and Fe ion beams (HIMAC at NIRS in Chiba), and they were culture in vitro. The development of 3 Gy of Fe ion irradiated embryos significantly

【放射線照射したマウス ES 細胞のマイクロインジェクションとその後の発生】

凍結したマウス ES 細胞に X 線および、Fe 重粒子線を照射し、8 細胞期胚にマイクロインジェクションして、その後の in vitro での発生を観察した。ES 細胞には、その後の発生を追跡できるよう GFP) を発現しているものを用いた。図 4 に示すように、Fe 重粒子線を 5 Gy 照射した ES 細胞をマイクロインジェクションした場合は、その後の発生が妨げられた。

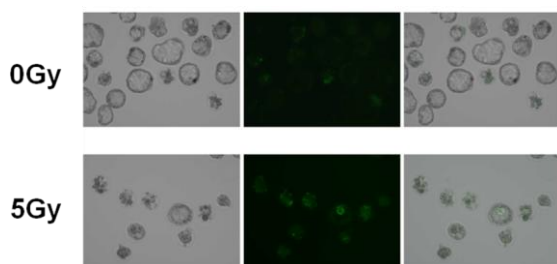


Fig. 4. Impaired Development of Fe ion irradiated mouse ES cells after Microinjection to 8-cell Embryos
Most of embryos including 5 Gy of Fe ion irradiated ES did not developed normally.

このような結果は、正常胚への放射線照射がその後の発生に影響するように、ES 細胞への放射線照射がそれを含む胚の発生の異常を導くことを明らかにするものであり、我々の系の有効性を示すものである。

【マウス iPS 細胞の発生】

我々は、さらに、マウス、ヒト iPS 細胞を用いた同様の実験が、マウス ES 細胞を用いた実験と相互に比較することにより、ヒト細胞の宇宙放射線に対する感受性を検討することができると考えている。現在 iPS 細胞に重粒子線を照射し、その後の発生をマイクロインジェクションと凝集法で解析し(図 5)し、定量化を行っている。凍結した ES, iPS 細胞が宇宙へ打ち上げられることが期待される。

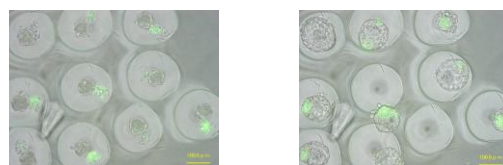


Fig. 5. Development of embryos aggregated with GFP-expressing mouse iPS cells

【謝辞】

この研究は日本宇宙フォーラムより次期宇宙利用研究(平成 18-22 年)として援助を受けたものである。また、放射線医学総合研究所の HIMAC を用いた共同利用研究である。

【発表】

1. Yoshida, K., Yoshida, S., Kasai, K., Morita, T.: Effect of Heavy ion Radiation to mouse ES cells.

Heavy Ion in Therapy and Space Symposium (July, 2009), Koln, Germany

2. Takashi Morita¹, Kayo Yoshida¹, Shuhei Yoshida¹, Kiyomi Eguchi-Kasai², Development of Heavy Ion-Irradaited Mouse Mouse ES Cells

日本宇宙生物科学会第 23 回大会(10 月、2009)、つくば

3. Morita, T., Yoshida, K., Yoshida, S., Kasai, K.,: Effects of X-radiation to development of mammalian embryos.

19th Annual NASA Space Radiation Investigators Workshop (July, 2008), Philadelphia, USA

4. 吉田佳世、吉田周平、森田隆; 宇宙放射線が哺乳動物の生殖細胞に及ぼす影響の研究

日本宇宙生物科学会第 22 回大会(9 月、2008)、奈良