

宇宙線および微小重力による細胞内酸化ストレスの誘発

鹿児島大学 馬嶋秀行、犬童寛子、富田和男、岩下洋一朗

日本宇宙フォーラム 鈴木ひろみ、嶋津 徹

宇宙航空研究開発機構 東端 晃、石岡憲昭

Induction of Intracellular Oxidative Stress by Space Radiation and Microgravity

Hideyuki J Majima^{1,2,5}, Hiroko P Indo¹, Kazuo Tomita¹, Yoichiro Iwashita¹, Hiromi Suzuki², Toru Shimazu², Akira Higashibata^{2,4,5} and Noriaki Ishioka^{2,4,5}

¹ Department of Oncology and ² Department of Space Environmental Science, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Kagoshima 890-8544

³ Life Science Research Group, Space Utilization Promotion Department, JSF, Chiyoda, Tokyo 100-0004

⁴ Department of Space Biology and Microgravity Sciences and ⁵ ISS Science Project, Institute of Space and Astronautical Science, JAXA, Tsukuba, Ibaraki 305-8505
E-Mail: hmajima@denta.hal.kagoshima-u.ac.jp

Abstract: Long term manned space missions of International Space Station (ISS) is in progress, and a plan to explore Moon as well as to visit the Mars is also underway. In space environment, 0.2~1 mSv a day of space radiation exposure and micro gravity environment will affect body, tissue and cellular metabolisms. In this study, the effects of "Low-dose Irradiation" and "Micro gravity" on total gene expressions change were tested using two human neuron-like cell lines, NB-1 and SK-N-SH. The cells were treated with 1) 0.1 mGy X-irradiation, or 2) micro gravity environment for 24hr, or 3) with 0.1 mGy X-irradiation and the microgravity for 24hr. After the treatments, mRNA was isolated from the cells and DNA expression was studied with DNA microarray analysis. The results showed that the gene categories with intensive expression change in all irradiated or microgravity exposed conditions were "mitochondrial genome" (8/13; 61.5%) and "ribosomal protein" (70/184; 38.0%), and the two were downregulated in every condition. The results also showed that up-regulated specific gene was only one in every condition, that was "Small Nuclear RNA Activating Complex, Polypeptide 5;SNAPC5, which activate RNA transcription. The individual genes that appeared intensively downregulated in every condition were "forkhead box m1 (foxm1)", a gene for oxidative stress related transcription factor, "HSPA8", a constitutive expressed heat shock protein, "ALDOB", a glycolysis gene. These results suggest that the space low-dose irradiation and micro gravity condition decrease newly production of protein, and may affect mitochondrial bio-energy production ability, and may induce intracellular oxidative stress. The results also suggest that 0.1 mGy irradiation and microgravity condition may decrease cellular anti-stress ability.

長期有人宇宙飛行が21世紀に入って20年以内に実現される計画である。国際宇宙ステーション (ISS) のプロジェクトが既に開始され、火星への飛行計画も進行中である。このような計画の中で宇宙環境における人類の長期滞在が実現され、宇宙で様々な実験が出来るようになる。しかし、宇宙線による1日の被ばく量がほぼ0.2~1 mSvに達し、宇宙飛行が宇宙飛行士にとって必然的に大量の線量を浴びる結果となる状況であることを考えると、宇宙における人間の安全性確保が不可欠である。物理生物学的知識に基づく適切な防護に対する要請が益々高まっている。宇宙飛行に伴う現実的なリス

クを評価する有効な方法、さらにその低減を図る手段の開発が急務となっている。

本研究では、その基礎検討実験として、2種類のヒト神経細胞株 (NB-1, SK-N-SH) を用い、低線量放射線照射 (0.1 mGy) (LowX) およびクリノスタットによる24時間微小重力 (MG) および LowX + MG の条件にて DNA アレイにて2万個の遺伝子発現を調べた。その結果、微小放射線被曝および微小重力の環境が酸化的ストレスを細胞に負荷し、さらに細胞内ストレス環境に弱い様相を示していることが示唆された。

方法：

2種類の人神経細胞株 (NB-1,SK-N-SH) を用いた。放射線照射には MBR-1505R (Hitachi Corp.) を用い、細胞に 0.1mGy の照射を行った。微小重力処理はクライノスタットを用い 2 4 時間行った。各処理後、細胞から AGPC 法により RNA を採取し、そのうちの 1 μg を鋳型として Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit (Ambion inc.)を用いて逆転写および antisense RNA の増幅を行い、Cy3 および Cy5 を antisense RNA に標識して DNA マイクロアレイに供した。DNA マイクロアレイスライドは Acegene 20k (DNA Chip Research Inc.)を用い、ScanArray Express (Perkin Elmer Inc.)にて蛍光強度をスキャンし、得られたデータは当教室にて解析を行った。

結果：

DNA マイクロアレイ解析により、NB-1, SK-N-SH 両細胞において LowX, MG および LowX+MG の条件で同様に発現が変化したものを調べると、全ての条件で発現がアップレギュレートされていたのは 1 遺伝子のみで、それは RNA ポリメラーゼの活性化に関わる遺伝子 SNAPC5 であった (Table 1)。また、全ての条件でダウンレギュレートされていた遺伝子は 267 個あり、その中で変化の割合の大きいものを調べると、ミトコンドリアコード遺伝子、解糖系の酵素である ALDB、熱ショックタンパク質のひとつ HSPA8(HSP70c)および細胞のストレス応答に関与するフォークヘッド遺伝子ファミリーに属する転写因子のひとつ FOXM 1 であった (Table 2)。また、遺伝子をカテゴリー別に分けてカテゴリーごとの遺伝子発現変化を見てみると、リボゾームタンパク質およびミトコンドリアコード遺伝子のカテゴリーにおいて、それぞれ 38.0% および 61.5% の遺伝子が全ての条件においてダウンレギュレートされていた (Table 3)。

これらの結果を総合すると、低線量放射線被曝及び微小重力によって、リボゾームタンパク質タンパク質発現が減少し、すなわち、タンパク質生成が減少される可能性とそれをコンペイトする様に転写を活性化する "Small Nuclear RNA Activating Complex, Polypeptide 5";SNAPC5 遺伝子の発現が増加していた。そして、ミトコンドリア DNA コード遺伝子の発現減少によってエネルギー合成及び内在性の酸化ストレスに影響が現れる可能性が示され、さらに、ヒートショックタンパク質が低下し、細胞内の抗酸化能が低下するごとく示されていた (Fig. 1)。宇宙線と微小重力の環境では、一時的にストレスに弱くなる可能性があることを示唆している。

Table 1. Significantly up-regulated gene with both NB-1 and SK-N-SH in 3 conditions (0.1mGy X-irradiation (LowX), Microgravity for 24h (MG), and X-irradiation & Microgravity (LowX+MG)).

Symbol	Description	LowX		MG		LowX+MG	
		NB-1 Av(Sd) p	SK-N-SH Av(Sd) p	NB-1 Av(Sd) p	SK-N-SH Av(Sd) p	NB-1 Av(Sd) p	SK-N-SH Av(Sd) p
SNAPC5	small nuclear RNA activating protein complex 19kda subunit: snap19	1.31 ± 0.08 (p=0.02)	1.64±0.13 (p=0.01)	1.49±0.16 (p=0.04)	2.61±0.20 (p=0.01)	1.96±0.07 (p=0.00)	1.78±0.31 (p=0.05)

Table 2. Significantly down-regulated genes with both NB-1 and SK-N-SH in 3 conditions.

Symbol	Description	LowX		MG		LowX+MG	
		NB-1 Av(Sd) p	SK-N-SH Av(Sd) p	NB-1 Av(Sd) p	SK-N-SH Av(Sd) p	NB-1 Av(Sd) p	SK-N-SH Av(Sd) p
HSPAB	heat shock 70kd protein 8; hspa8	0.42 ± 0.02 (p=0.00)	0.38±0.17 (p=0.03)	0.65±0.05 (p=0.01)	0.61±0.08 (p=0.01)	0.63±0.02 (p=0.00)	0.60±0.07 (p=0.01)
FOXM1	forkhead box m1; foxm1	0.44 ± 0.07 (p=0.01)	0.33±0.12 (p=0.01)	0.34±0.05 (p=0.00)	0.45±0.03 (p=0.00)	0.35±0.06 (p=0.01)	0.42±0.09 (p=0.01)
ALDOB	aldob	0.39 ± 0.07 (p=0.00)	0.35±0.10 (p=0.01)	0.30±0.03 (p=0.00)	0.39±0.03 (p=0.00)	0.29±0.02 (p=0.00)	0.45±0.07 (p=0.01)

Table 3. Significantly changed genes that with both NB-1 and SK-N-SH at 3 conditions.

Condition	up-up-up	dn-dn-dn	Total
0.1mGy (LowX)	↑↑	↓↓	
Microgravity (MG)	↑↑	↓↓	
LowX + MG	↑↑	↓↓	
Category	1/19968 (0.01%)	267/19968 (1.3%)	268/19968 (1.3%)
cat-1 Mitochondria	0/539 (0.0%)	22/539 (4.1%)	22/539 (4.1%)
cat-2 Apoptosis	0/523 (0.0%)	6/523 (1.1%)	6/523 (1.1%)
cat-3 Cancer	1/614 (0.2%)	5/614 (0.8%)	6/614 (1.0%)
cat-4 Cell cycle	1/346 (0.3%)	3/346 (0.9%)	4/346 (1.2%)
cat-5 DNA replication repair	0/271 (0.0%)	4/271 (1.5%)	4/271 (1.5%)
cat-6 Protein synthesis	0/126 (0.0%)	3/126 (2.4%)	3/126 (2.4%)
cat-7 Signal transduction	0/165 (0.0%)	0/165 (0.0%)	0/165 (0.0%)
cat-8 Transcription	1/1292 (0.1%)	12/1292 (0.9%)	13/1292 (1.0%)
cat-9 Ion channel	0/224 (0.0%)	1/224 (0.4%)	1/224 (0.4%)
cat-10 Nucleus, nuclear, DNA	1/2236 (0.0%)	26/2236 (1.2%)	27/2236 (1.2%)
cat-11 Interleukin	0/93 (0.0%)	0/93 (0.0%)	0/93 (0.0%)
cat-12 Growth factor	0/321 (0.0%)	3/321 (0.9%)	3/321 (0.9%)
cat-13 Ribosomal protein	0/184 (0.0%)	70/184 (38.0%)	70/184 (38.0%)
cat-14 Mitochondrion complete genome	0/13 (0.0%)	8/13 (61.5%)	8/13 (61.5%)
cat-0 Other categories	0/14895 (0.0%)	139/14895 (0.9%)	139/14895 (0.9%)

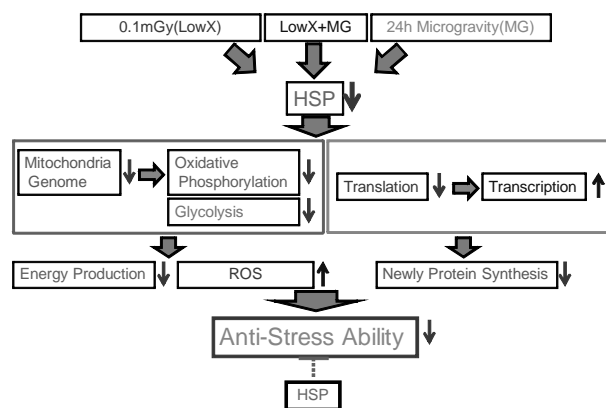


Fig.1. Influence of space environment on cellular anti-stress condition.