

## 「きぼう」におけるツメガエル細胞の培養実験 Xenopus cell culture experiments in 'KIBO'

伊藤弓弦<sup>1</sup>、中島由郎<sup>1</sup>、嶋津徹<sup>2</sup>、内田智子<sup>3</sup>、矢野幸子<sup>3</sup>、浅島誠<sup>1,4</sup>

1, 産総研・器官発生; 2, JSF; 3, JAXA; 4, 東大院・総合文化

Yuzuru Ito<sup>1</sup>, Yoshiro Nakajima<sup>1</sup>, Toru Shimazu<sup>2</sup>, Satoko Uchida<sup>3</sup>, Sachiko Yano<sup>3</sup>, Makoto Asashima<sup>1,4</sup>

1, AIST ODRL; 2, JSF; 3, JAXA; 4, The Univ. of Tokyo

Microgravity and space radiation are key factor of space environment. Moreover, expression of various genes was affected by simulated-microgravity in A6 and A8 cell lines. These findings suggest that microgravity may affect cell morphology and gene expression during a space flight. Our studies will contribute significantly to the understanding of cellular responses and organ functions in space.

宇宙での安全・安心な世代交代を実現するためには、微小重力と宇宙放射線の個体発生に対する影響を調べる必要がある。有人飛行の確立以降、我々は様々な生物を軌道に持ち込み、それらの影響を解析してきた。特に軌道上での管理のしやすさの点から、水生生物を用いた実験が多く行われてきたが、個体全体に対する研究が多く、より詳細な細胞レベルでの研究が待ち望まれていた。そこで我々は、軌道上で培養した細胞の遺伝子発現を網羅的に解析することにした。

ツメガエル腎尿細管より樹立されたA6細胞は、コンフルエントになった後しばらくそのまま培養を続けると、中に液体が満たされた「ドーム」と言われる構造を作る(Fig. 1)。

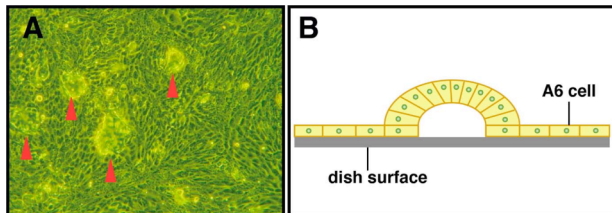


Fig. 1. Dome formation by A6 cells. (A) The A6 epithelial cell line forms a dome structure in culture. The arrowheads indicate the dome structure. (B) Schematic representation of the dome structure, showing how the cells detach from the surface of the culture dish.

ドームは構造の面からも、発現している遺伝子の点からも腎尿細管との類似性が高く、そのモデル系と考えられている。一方 A8 細胞はツメガエル肝臓実質細胞より樹立され、ドーム構造を形成しない。1993 年に採択された Dome Gene プロジェクトにおいて、我々はこれら A6、A8 細胞に対する微小重力及び宇宙放射線の影響を、顕微鏡観察及び網羅的に遺伝子発現パターンを調べることで解析した。

これまで予備実験として3D クリノスタットを用いた模擬微小重力条件下での培養実験を行い、A6 細胞のドーム形成が阻害されることを明らかにした。また、ツメガエル 44K マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

により、A6 細胞では 283 の遺伝子が 2 倍以上発現変動する(153 遺伝子が上昇、130 遺伝子が減少)ことを、また A8 細胞では 132 の遺伝子が 2 倍以上発現変動する(98 遺伝子が上昇、34 遺伝子が減少)ことをそれぞれ明らかにした。特に A6 細胞では、ドーム形成への関与が予測されている epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の発現が、模擬微小重力条件下において減少していることを見いだした。こうした知見は、「きぼう」での培養実験を解析する上で、非常に有用である。

Dome Gene プロジェクトは Fig. 2 に示した実験プランに従って行われた。

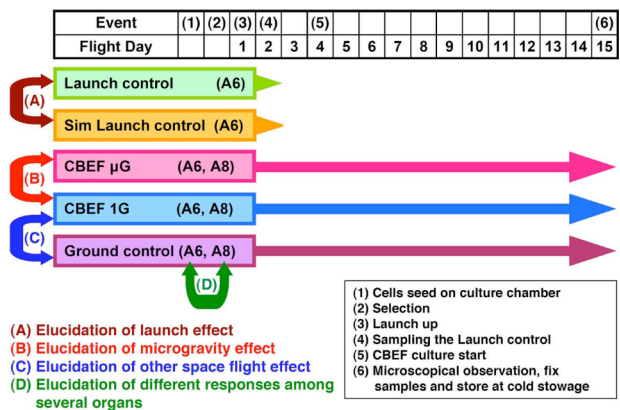


Fig. 2. Cell culture kinetics for the DomeGene experiments. Comparisons with control experiments reveal the effects on *Xenopus* cells of microgravity and other environmental parameters of space flight.

打ち上げ直後の加重力の影響を解析するために“Launch control(打ち上げ直後のシャトル内にて培養中のA6細胞を凍結)”と“Sim Launch control(KSCで培養中のA6細胞をLaunch controlと同時に凍結)”の2群を設定した。さらにA6及びA8細胞を15日間培養後に凍結する3つの実験群“CBEFμG(CBEFμG部で培養)”、“CBEF1G(CBEF1G部で培養)”、“Ground control(KSCで培養)”を準備した。CBEFμGとCBEF1Gの比較により、細胞に対する微小重力の影響を、CBEF1Gと

Ground controlの比較により、細胞に対する宇宙放射線の影響を調べることにした。また、各実験群においてA6細胞とA8細胞の遺伝子発現パターンを比較することにより、臓器ごとの微小重力及び宇宙放射線に対する応答能の違いについて考察することとした。

15日間の培養後、Ground controlのA6細胞において多くのドーム構造が観察されたのに対し(Fig. 3C)、CBEF $\mu$ Gにおいては、ドームが観察されなかった(Fig. 3A)。さらにCBEF1Gにおいて僅かだがドームが観察された(Fig. 3B)。一方、A8細胞はどの群にも細胞像に差が見られなかった(Fig. 3D-F)。

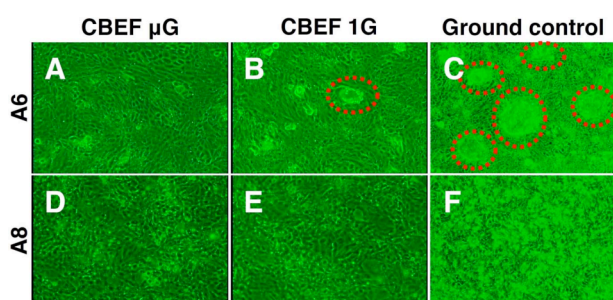


Fig. 3. Morphologic analyses of *Xenopus* cells in culture. The A6 and A8 cells were cultured under three different gravitational conditions: A, D, microgravitational conditions in the CBEF; B, E, artificial 1G condition in the CBEF; and C, F, 1G condition on the ground. For the A6 cells, dome formation was suppressed under microgravitational conditions (A), as compared with the artificial 1G condition (B). For the A8 cells, there were no marked differences in cell morphology among the three different gravitational conditions tested (D-F).

また、CBEF $\mu$ GとCBEF1GはGround controlと比べて、A6細胞、A8細胞共に細胞増殖の遅れが観察された。CBEF1Gにおけるドーム形成がGround controlと比べて悪い原因としては、温度低下・宇宙放射線等による増殖の遅延、CBEF1G部にセットされる前に一時的に微小重力に晒されたこと、等が考えられる。

顕微鏡観察の後にはLaunch controlと同様に凍結し、地上への帰還後全サンプルからRNAを抽出し、ツメガエル44Kマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。Ground controlと比較してCBEF1Gで1.5倍以上発現変動した遺伝子の機能を調べると、代謝関連、発生関連の遺伝子が多く含まれた(Fig. 4)。また、変動した遺伝子の中にHSP等も含まれており、このことは宇宙放射線の影響を受けたためと思われる。

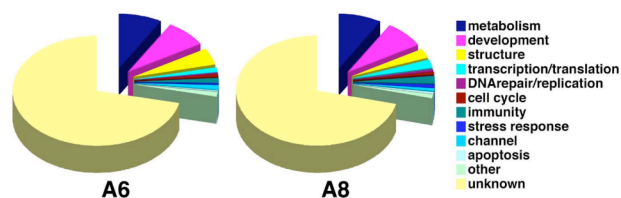


Fig. 4. Global gene expression profiles of A6 and A8 cells cultured under simulated 1G in ISS were determined using the *Xenopus* microarray. We selected genes showed  $\geq 1.5$ -fold up-regulation or down-regulation in comparison to Ground condition. 1666 genes (614 up-regulated and 1052 down-regulated in ISS) were identified from A6 cells. 703 genes (412 up-regulated and 291 down-regulated in ISS) were identified from A8 cells.

CBEF1Gと比較してCBEF $\mu$ Gで1.5倍以上発現変動した遺伝子の機能を調べると、代謝関連、発生関連の遺伝子が多く含まれた(Fig. 5)。また、模擬微小重力条件下での培養で変動していた遺伝子の殆どは発現変化していなかった。ドーム形成と遺伝子発現の関連性については、今後の検討課題である。

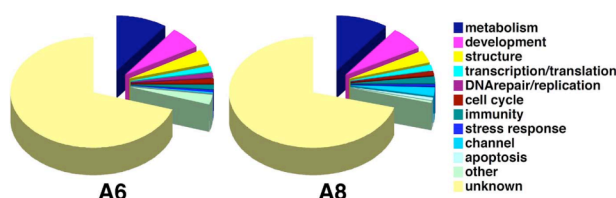


Fig. 5. Global gene expression profiles of A6 and A8 cells cultured under  $\mu$ G in ISS were determined using the *Xenopus* microarray. We selected genes showed  $\geq 1.5$ -fold up-regulation or down-regulation in comparison to simulated 1G condition. 220 genes (120 up-regulated and 100 down-regulated in  $\mu$ G) were identified from A6 cells. 486 genes (166 up-regulated and 320 down-regulated in  $\mu$ G) were identified from A8 cells.

さらに詳細な解析を進めることにより、宇宙環境の腎臓及び肝臓に対する影響を明らかにするであろう。さらには地上では機能しない、「新規の転写制御系」が明らかになるかもしれない。本プロジェクトにより、宇宙空間における細胞・臓器の動態をより詳細に明らかにし、宇宙空間における安全な世代交代実現に向けて、重要な多くの情報を得られると期待される。