

「きぼう」での Rad Gene 宇宙実験報告 3

大西武雄^{1,2}, 高橋昭久^{1,2}, Xiaoming SU¹, 鈴木雅雄³, 鶴岡千鶴³, 鈴木ひろみ^{4,5}, 嶋津徹⁴, 関真也^{5,6}, 橋爪藤子^{5,6}, 永松愛子², 大森克徳², 石岡憲昭^{2,5}

¹ 奈良県立医科大学, ² 宇宙航空研究開発機構, ³ 放射線医学総合研究所, ⁴ 日本宇宙フォーラム,

⁵ 鹿児島大学, ⁶ AES

Space experiment “Rad Gene” at Kibo-report 3

Takeo Ohnishi^{1,2}, Akihisa Takahashi^{1,2}, Xiaoming Su¹, Masao Suzuki³, Chizuru Tsuruoka³, Hiromi Suzuki^{4,5}, Toru Shimazu⁴, Masaya Seki^{5,6}, Toko Hashizume^{5,6}, Aiko Nagamatsu², Katsunori Omori², Noriaki Ishioka^{2,5}

¹Nara Med. Univ., ²JAXA, ³JSF, ⁴Kagoshima Univ., ⁵AES

E-Mail: tohnishi@naramed-u.ac.jp

Abstract: To identify DNA damage induced by space radiations such as the high linear energy transfer (LET) particles, phospho-H2AX (γ H2AX) foci formation was analyzed in human cells frozen in an International Space Station freezer for 133 days. After recovering the frozen sample to the earth, the cells were cultured for 30 min, and then fixed. Here, we show a track of γ H2AX positive foci in them by immuno-cytochemical methods. It is suggested that space radiations, especially high LET particles, induced DSBs as a track. From the formation of the tracks in nuclei, exposure dose rate was calculated to be 0.7 mSv per day as relatively high-energy space radiations of Fe-ions (500 MeV/u, 200 keV/ μ m). From the physical dosimetry with CR-39 plastic nuclear track detectors and thermo-luminescent dosimeters, dose rate was 0.5 mSv per day. These values were similar between biological and physical dosimetries. In addition, the aim of this study was to clarify the effect of space radiations on the radio-adaptive response. Two human lymphoblastoid cell lines were used; one cell line bears a wild-type *p53* (*wtp53*) gene, and another cell line bears a mutated *p53* (*mp53*) gene. The frozen cells were kept in spaceflight on Space Shuttle and International Space Station (ISS) freezer for 133 days from Nov 15th, 2008 to Mar 29th, 2009. After the frozen samples were returned to earth, the cells were cultured for 6 h, and then exposed to challenging X-irradiation doses of 1.2 Gy or 2 Gy. Cellular sensitivity, apoptosis and chromosome aberrations were scored using a dye-exclusion assay, Hoechst33342 staining assay, and chromosomal banding techniques, respectively. In the cells exposed to a space environment, all of radio-adaptive responses such as the induction of radio-resistance and the depression of radiation-induced apoptosis, chromosome aberrations and mutant frequencies investigated here were found in *wtp53* cells, but not in the *mp53* cells. These results confirmed that the cells exposed to a space environment were likely to the exposed cells to radiation in the specific low dose range which can lead to an adaptive response on ground-base experiments, and that the cells preserved an effect from the space-radiation exposure, even at such low doses in space.

Key words; International Space Station, space radiations, DNA damage, radio-adaptive response, *p53*.

(1)はじめに

宇宙空間は2つの大きな環境の特徴がある。1つは微小重力であり、もう1つは宇宙放射線である。今回、国際宇宙ステーションにおけるKiboでの生命科学の最初の宇宙実験として、2008年11月15日から2009年3月29日の間に全て順調に行われた[1]。133日間のフライトの間に受ける宇宙放射線被曝線量の生物学的・物理学的線量測定に成功した。なによりも、宇宙放射線による遺伝子損傷のDNA二本鎖切断を可視化することに世界で初めて成功した

[2]。宇宙放射線の飛跡が連続した損傷の傷跡(トラック)として確認できた。

また、133日間の被曝線量(生物学的線量で70 mSv)が放射線適応応答(抵抗性の獲得、アポトーシス出現頻度の抑制、染色体異常誘発の抑制、突然変異誘発の抑制)を示す線量域(window)にピッタリ一致することを解明した。若田宇宙飛行士を乗せていくシャトルのフライトが約1カ月も遅れたことが、放射線適応応答のwindowの最大側にシフトしてくれたという思いがけない幸運にも恵まれた。実は我々の研

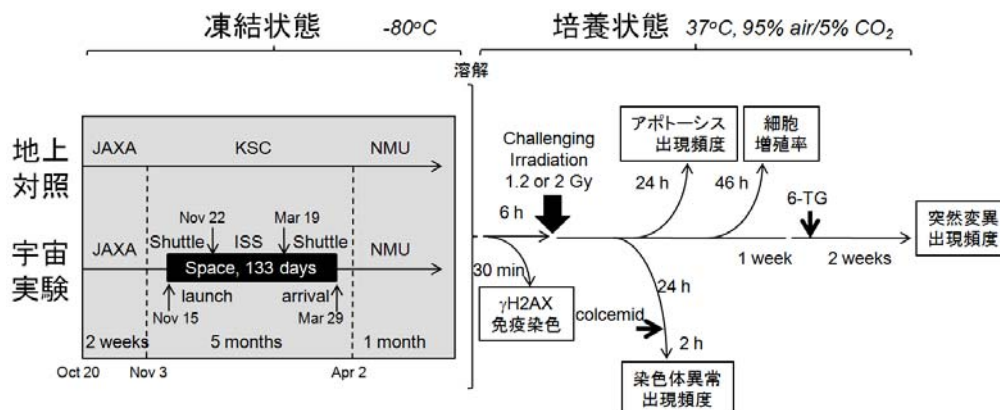


図1. 宇宙飛行細胞の放射線適応応答.

a, 宇宙飛行サンプル; *b*, 地上対照サンプル. KSC, ケネディ宇宙センター.

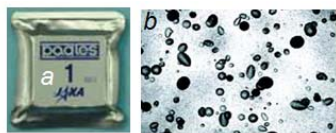
研究室でこの放射線適応応答機構の研究が目覚ましく進展し、この3年間に数多くの論文を発表できていた[3-5]. それもフライトが遅延してくれたおかげとも考えられる. 実に多くの幸運に恵まれて、当初の目標以上の成果が出せたことに心から酔っている状況である.

(2)宇宙サンプルの準備

細胞はヒトリンパ芽球 TK6 細胞由来の正常型 *p53* 細胞 TSCE5 および変異型 *p53* 細胞 WTK1 を用いた [1]. 宇宙実験用サンプルを凍結状態でシャトル発射 1 週間前にケネディスペースセンター(KSC)へと運搬した. 地上対照は筑波 JAXA に置いた(図 1).

(3)物理測定

宇宙放射線物理測定具(PADLES package 図 2a)を宇宙実験用の培養キットに密着させ、宇宙実験を行った[2]. PADLES には 4 枚の CR-39 固体飛跡検出器と、7 枚の TLD 熱ルミネッセンス線量計を入れた. 地上対照として KSC で -80°C で保管しておいた. 線量の校正は放射線医学総合研究所の鉄と炭素粒子であらかじめ求めておいた. 宇宙飛行サンプル CR-39 のアルカリのエッチング処理によって、重荷電粒子の飛跡によるエッチピット(図 2b)を測定した. 吸収



c Total absorbed dose $43.5 \pm 2.8 \text{ mGy}$	
$\leq 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$	$40.9 \pm 3.2 \text{ mGy}$
$> 10 \text{ keV}/\mu\text{m}$	$2.7 \pm 0.5 \text{ mGy}$
Total dose equivalent $71.2 \pm 2.5 \text{ mSv}$	
0.5 mSv/day	

図2. 宇宙放射線物理学的測定装置. *a*, PADLES package; *b*, エッチング処理した CR-39.宇宙放射線の数,方向性,エネルギーが分かる. *c*, 物理学的測定結果をまとめたもの.エネルギーを分けて測定した.

線量, 線量当量などを求めた結果を図 2c に示した. 15 年ほど前の向井宇宙飛行士による IML2 宇宙実験ではリアルタイムで宇宙放射線の物理測定がなされてきた[6,7]. それによると, 宇宙放射線は太陽の黒点活動によっても異なるものである. これまでの線量率は約 1 mSv/day とされてきたが, 今回の物理測定ではその半分の 0.5 mSv と測定された (図 2). 昨年, NASA の Cucinotta のグループはファントム(人間の模型)での宇宙放射線量測定の結果, 今回の我々の結果と全く同様に 0.5 mSv/day であったと報告している[8].

(4)DNA 損傷の確認

宇宙放射線が ISS の中までたどりつくのはこれまで物理学的測定で確認されてきた. 一方, 生物が宇宙放射線に被曝した結果起こる生物影響の研究がこれまで数多くなされてきた. しかし, 実際に生きた細胞を用いて, 宇宙放射線による遺伝子損傷が可視化できていなかった. すでに我々は, 重粒子線がヒト培養細胞の核に二本鎖切断(DSB)を起こすことを γH2AX の抗体で染色し, 可視化することに成功してきた[9]この技術を宇宙空間で, 133 日間にルの細胞核の中に, 宇宙放射線によって生成された DSB が地上実験の鉄粒子のように, 連続的なトラック状に観察できるかどうかを調べた(図 3)[2]. 地上対照として JAXA の冷凍庫で保存されていたサンプル (図 3b)には殆ど γH2AX のフォーカスが観察されなかった. 観察された細胞でもたった 1 個のみであった. ISS の冷凍庫に保存されていたサンプルでも殆どの細胞でそのフォーカスは観察されなかった(図 3a). 観察された場合でもたった 1 個でしかなかった. しかしながら, ごく稀に連続したフォーカスが観察される細胞があった(図 3a と c). その頻度は *p53* 遺伝子型には関係なく, 正常型 *p53* 細胞と変異型 *p53* 細胞ともほぼ同じ頻度で約 1.5%であった. 地上実験では, 3 Gy の X 線による DSB 生成は散乱したフォーカスである(図 3d)が, 0.6 Gy の鉄粒子では高 LET 放

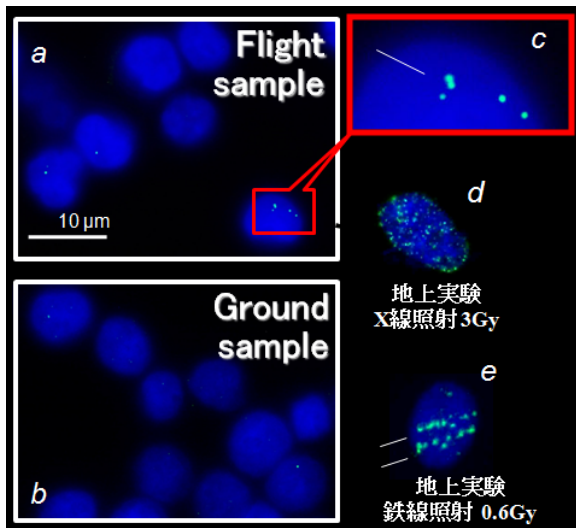


図 3. 宇宙放射線の DNA 損傷の傷跡.DSB を γ H2AX で緑に染色,核は DAPI で青に染色. **a**, 飛行サンプル; **b**, 地上対照; **c**, **a** の拡大図; **d**, 3 Gy の X 線照射; **e**, 0.6 Gy の鉄粒子線照射. **c** と **e** の白線は重粒子線の方向性を示す.

射線なので直線的に核内を貫いている(図 3e). エネルギーの高い宇宙放射線は ISS を貫き, 冷凍庫のサンプルフォルダーもとおり, 細胞内の核にこのような連続したフォーカス(トラック)を形成することが分かった[2].

(5)物理学的線量測定と生物学的線量測定の比較

高 LET 放射線を含む宇宙放射線ではこのように連続的な DNA 損傷をつくる可能性が大であることを物理学から類推していたことが[7], ここではじめて証明された. 地上でのサンプルには 0.3 Gy の鉄線 (200 keV/ μ m, 500MeV/u)で 1 本のトラックが走る. 宇宙放射線の中で最もエネルギーが高いとされる鉄線として多い目に想定しても, トラックの生成頻度から計算すると 94.5 mSv であった. 133 日間のフライトであったので, 1 日あたり約 0.7 mSv となる. しかし, 図 3c から見ても分かるように宇宙放射線のトラックは鉄線(図 3e)ほど数多くの DSB を生成していない. 今回は鉄線として計算しているので過大評価しすぎている可能性が高い. これまでは宇宙放射線の線量測定は物理学的測定のみであった. 今回のフライトでは物理学的線量測定を CR39 と TLD で測定したところ, 133 日間で 71.2 mSv, 1 日あたり 0.5 mSv であった. 重粒子は量的に少ないが, mSv に換算すると大きい値を占める. また, このようなトラックをもたらず線質がまだわからないので, これらの生物学的測定値と物理学的測定値は比較的に近いと言える. 今回の我々の成果は世界で初めてで, 生きたヒト細胞に宇宙放射線が起こした DNA の DSB という損傷を可視化できたこと, 生物学的線量測定ができたことは画期的な大発見であった[2]. これまで

は, 我々が別の方法で宇宙放射線で誘発される DNA 損傷をスペースシャトルとミールで確認していたが, それはすでに死んでいたヒト細胞の固定されたもので, 生細胞ではなかった[10].

(6)放射線適応応答

あらかじめの少ない線量の放射線被曝は次にくる大線量急照射の放射線生物影響を軽減するという放射線適応応答が発見されてから約 20 年以上になる. このあらかじめの放射線被曝にはある特定の線量域 (window) 20-100 mSv のみしか, 適応応答は存在せず, 細胞レベルでは生存率, アポトーシス誘導, 染色体異常発生, 姉妹染色体交換, 突然変異などいくつもの生物影響で測定されてきた. 一方, 我々の研究グループでは放射線適応応答は変異型 *p53* 細胞にはなく, 正常型 *p53* 細胞のみでしか存在しないことを報告してきた[3-5]. そこで, 我々は今回の宇宙飛行時に, 培養実験を行ったサンプルは放射線損傷を修復してしまっている可能性があるため, 飛行中 133 日間常にフリーザーの中で保存されていたサンプルについて放射線適応応答の実験を行った (図 1 と図 4) (投稿中).

あらかじめの放射線被曝の代わりに, 宇宙飛行中の宇宙放射線被曝が次の急照射放射線に抵抗性になれるか否かを明らかにするために, 帰還した細胞を 6 時間培養後, 正常型 *p53* 細胞と変異型 *p53* 細胞に 2 Gy を急照射した(図 4a と b). その後 46 時間培養して細胞数を比較した. 地上対照群では放射線抵抗性の変異型 *p53* 細胞は正常型 *p53* 細胞に比べて急照射に確かに抵抗性であった (図 4a と b). 正常型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射すると, 地上サンプルに急照射したものに比べて, 放射線抵抗性になることが分かった(図 4a). 一方, 変異型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射しても放射線抵抗性にならなかった(図 4b).

アポトーシスに関して, 帰還した細胞を 6 時間培養後, 正常型 *p53* 細胞と変異型 *p53* 細胞に 2 Gy を急照射し, 24 時間培養後のアポトーシス出現数を比較した. 地上対照群では変異型 *p53* は正常型 *p53* 細胞に比べて, 急照射でのアポトーシス出現頻度は低かった (図 4c と d). 正常型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射すると, 地上サンプルに急照射したものに比べてアポトーシス出現頻度が低くなった(図 4c). しかし, 変異型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射してもアポトーシス出現頻度が低くならなかった(図 4d).

同様に, 帰還した細胞を 6 時間培養後, 両細胞に 2 Gy を急照射し, 24 時間培養後の二動原体を指標とした染色体異常誘発数を比較した(図 4e と f). 地上対照群では変異型 *p53* は正常型 *p53* 細胞に比べて急照射での染色体異常出現頻度は高かった. 正常型

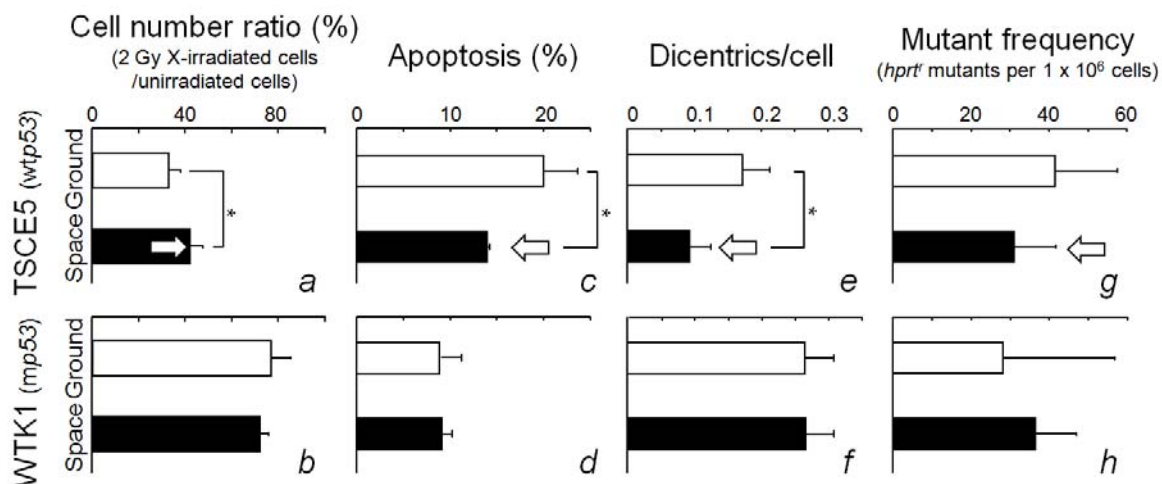


図4. 放射線適応応答.

a と **b**, 生存細胞数; **c** と **d**, アポトーシス出現頻度; **e** と **f**, 染色体異常出現頻度; **g** と **h**, 突然変異誘発頻度. **a,c,e,g**, 正常型の *p53* 遺伝子細胞; **b,d,f,h**, 変異型の *p53* 遺伝子細胞. 図中の矢印は放射線適応応答が見られたことを示す.

p53 細胞の宇宙サンプルに急照射すると、地上サンプルに急照射したもの比べて、染色体異常出現頻度が低くなった(図 4e). しかし、変異型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射しても染色体異常出現頻度が低くならなかった(図 4f).

急照射による突然変異誘発に関して、宇宙飛行の影響を見るために、*hprt* 遺伝子の *hprt^s* から *hprt^f* への変異で調べた(図 4g と h). 正常型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射すると地上サンプルに急照射したもの比べて突然変異誘発頻度が低くなった(図 4g). しかし、変異型 *p53* 細胞の宇宙サンプルに急照射しても突然変異誘発頻度が低くならなかった(図 4h).

(7)おわりに

宇宙飛行後の地上での高線量放射線急照射による生物影響(細胞増殖阻害, アポトーシス誘発, 染色体誘発, 突然変異誘発)はいずれも宇宙フライト経験によって抑制されることが判明した. しかもこの現象は正常型 *p53* 細胞のみ観察され, 変異型 *p53* 細胞では見られなかったので, まさに放射線適応応答と言ってよい. そのことは, 今回の宇宙フライトで window にあたる放射線量, すなわち 20-100 mSv の範囲を被曝していたことが言える. 実際は先述のとおり, 物理学的測定で約 70 mSv, 生物学的線量測定で約 94 mSv であった[2]. 実に見事に放射線適応応答の window の中に入っていた.

参考文献

- [1] Ohnishi, T. et al. (2009) *Biol. Sci. Space*, 23, 3-10.
- [2] Ohnishi, T. et al. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390, 485-488.
- [3] Matsumoto, H. et al. (2007) *Cancer Res.*, 67, 8574-8579.
- [4] Takahashi, A. et al. (2008) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 71, 550-558.
- [5] Takahashi, A. et al. (2009) *Adv. Space Res.*, 18, 1185-1192.
- [6] Doke, T. et al. (1995) *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, A365, 524.
- [7] Hayashi, T. et al. (1996) *Biol. Sci. Space*, 11, 355-364.
- [8] Cucinotta, F. A. et al. (2008) *Radiat. Res.*, 170, 127-138.
- [9] Takahashi, A. et al. (2008) *J. Radiat. Res.*, (Tokyo), 49, 645-652.
- [10] Ohnishi, T. et al. (2001) *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, 43, S133-S136.