

国際宇宙ステーション Kibo 利用宇宙実験「Rad Gene」の成果

高橋 昭久^{1,2*}・永松 愛子²・鈴木 雅雄³・鶴岡 千鶴³
 Xiaoming Su¹・鈴木ひろみ^{4,5}・大森 克徳²・嶋津 徹⁴・
 関 真也^{5,6}・橋爪 藤子^{5,6}・石岡 憲昭^{2,5}・大西 武雄^{2,7}

はじめに

国際宇宙ステーション (ISS) 宇宙実験 “Rad Gene” は 2000 年に JAXA で採択されたプロジェクトである¹⁾。ヒト培養細胞を用いて、宇宙放射線の生物影響研究を目指したテーマである。何年も研究実施が遅延したおかげで、やっと完成した日本のモジュールの Kibo で行われる生命科学の最初の宇宙実験となった。今後、ISS の完成は宇宙長期滞在が多くなることを意味する。宇宙飛行士の健康管理の面から宇宙放射線の物理的な防御はきわめて重要なことである。宇宙放射線の人体影響として、これまで宇宙飛行士の血中リンパ球の染色体異常発生、ライトフラッシュ (目に光を感じる現象)、中枢神経影響、目での白内障などが報告されている²⁾。宇宙放射線は ISS すらも貫いて宇宙飛行士に達する。宇宙放射線の特徴は低線量率で低線量である。しかし、線エネルギー付与 (linear energy transfer, LET) の高い重粒子線を含んでいる。したがって、それに被曝すると γ 線に比べて生物効果比 (relative biological effectiveness, RBE) が高い。今後、宇宙進出は月へ、さらには火星へと夢が拡大している。

ISS 内部にはさまざまな宇宙放射線が飛び込んでくる (図 1)。太陽フレアから太陽風によって地球にたどりつく。銀河系や遠くの星からもエネルギーの高い宇宙放射線がたどりつく。さまざまな線種の宇宙放射線によって、宇宙空間は複雑な放射線環境となっている。たとえば、大変多く含まれている中性子は ISS の金属にあたることによって 2 次放射線を生成する。放射線防護を考えたとしても複雑である。原子番号の大きな金属では γ 線を防護できるが、中性子では放射化されて、むしろ危険である。中性子は原子番号の小さな水などで防護しなければならない。どの放射線をどのように防護するかの研究も必要である。

これまでの宇宙実験では生物サンプルを宇宙に運び、

地上で生物影響の解析を行ってきた。この実験方法ではスペースシャトルの発射・着地時に生じる 2-3 G の加重力もかかることになり、厳密には微小重力の影響とは言い難かった。そこで、今回のサンプルは発射・着地時に冷凍状態に保つことで、加重力の影響を除いた。さらに、ISS での細胞培養実験装置 (CBEF, 37°C インキュベータ) に遠心機を装備することで、宇宙空間での 1 G 環境を実現し、図 2b と図 2c を比較することによって宇宙放射線のみ影響なのか、図 2a と図 2b とを比較することによって微小重力が宇宙放射線影響を修飾するのかが考察できるようになった。

宇宙実験

クルートレーニング 2008 年 7 月 9 日に宇宙実験を行う Sandra H. Magnus 博士が JAXA 筑波にクルートレーニングのために来訪した。彼女は第 18 次長期滞在クルー (1964 年米国イリノイ州生まれ、電気工学修士・材料工学博士) で、理系の科学者であるので、実験の目的、手順すべてに学習能力が高く、宇宙実験の成功に確信が持てた。

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³⁾。宇宙実験用のサンプルを 3 セット準備した。CBEF の μG (図 2a) と 1 G (図 2b) と地上コントロール (図 2c) である。培養バッグを凍結状態で 11 月 3 日から 7 日にかけて、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。地上コントロールは筑波 JAXA に置いた。

スペースシャトルでの打ち上げ サンプルは 11 月 10 日 NASA Cold Stowage Team に引渡した。打ち上げは日本時間 2008 年 11 月 15 日午前 9 時 55 分エンデバー号 STS-126 で予定通りなされた。11 月 22 日サンプルを Minus Eighty degree Celsius Laboratory Freezer for ISS (MELFI) に移動させた。

* 著者紹介 奈良県立医科大学医学部医学科生物学教室 (講師) E-mail: atakahas@naramed-u.ac.jp

¹奈良県立医科大学・生物学, ²JAXA, ³NIRS, ⁴JSF, ⁵鹿児島大学, ⁶AES, ⁷奈良県立医科大学・放射線腫瘍医学

特集

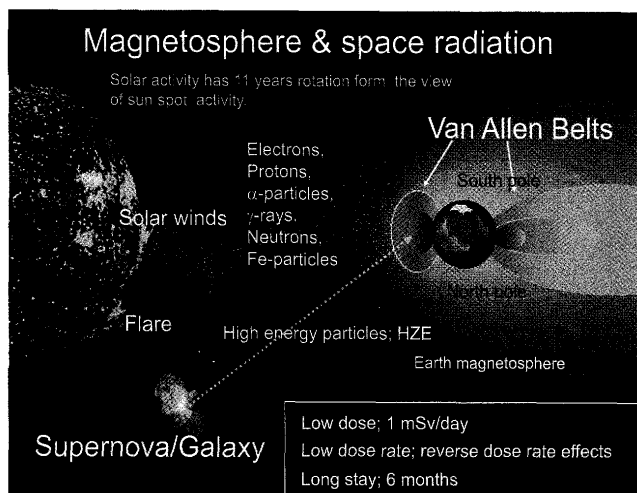


図1. 宇宙放射線の種類と源。太陽のフレア、超新星、銀河系などから地球にたどりつくが、地球の磁場や空気によって地上に降り注ぐ量が減少している。しかし、ISSではそれらに低線量率で曝露されている。半年ぐらゐの滞在では低線量被曝であるが、月滞在や火星進出には放射線防護の必要がある。

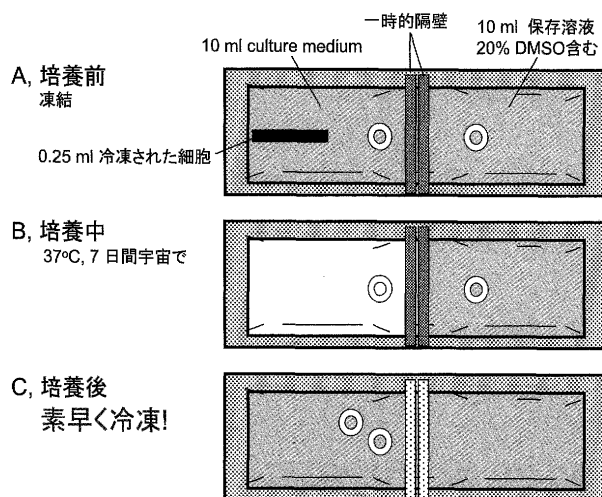


図3. 細胞培養バッグ。A, 培養前の様子。2つのピースが一時的隔壁の間に分かれている。赤色の棒が凍結されている細胞。B, 37°Cでの培養中の様子。左側で細胞が増殖（培地が黄色に変色）している。C, 培養の終了の様子。右側のDMSOを含む保存用液と左の培養後の細胞とが混合され、すぐに凍凍された。

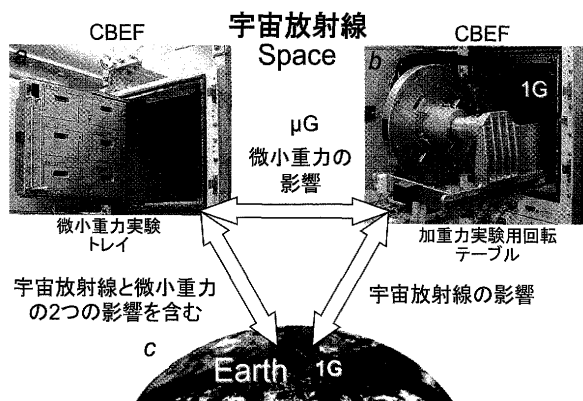


図2. 細胞培養装置 (CBEF)。a, 宇宙で37°C, CO₂インキュベータ; b, 1 Gの回転テーブルをもった37°C, CO₂インキュベータ; c, 地上でのコントロール (37°C, CO₂インキュベータ)。

宇宙での培養実験 当初、宇宙での細胞培養実験は2009年2月3-10日に予定されていた。CBEFのCO₂供給不能が判明し、1月21日バルブユニット交換;2月1日テレコマンド不能がわかり、2月3日障害復旧させ、培養開始を2月4日に延期;2月3日サンプルを回収する若田飛行士を乗せるスペースシャトル(ディスカバリー, STS-119)打ち上げ延期が判明し、培養開始を2月11日に延期;その後STS-119の発射延期により培養開始を順次延期した。延期に伴う培養日数の変更を地上サンプルの増殖実験で確認を行った。宇宙実験は予定より遅れたが、滞りなくMagnus宇宙飛行士によって2009年2月20-28日の間順調に行われた(図3)¹⁾。その間ISSのCBEFは問題なく正常状態で運転された。温度とCO₂濃度は地上

からチェックできる装置である。地上では3日遅れで宇宙実験とまったく同様の実験を筑波JAXAで行った。帰還はSTS-119によって2009年3月29日午後4時13分KSCに到着した。その後、サンプルを日本へと、それぞれの研究協力者に配分された。運搬、凍凍状況は完璧なものであった。サンプル回収は当初計画より約3週間遅れといえど、回収された細胞の増殖は順調であった。

飛行後解析

物理測定 宇宙放射線物理測定具(PADLES package 図4a)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。地上コントロールとして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4b)を測定した。吸収線量、線量当量などを求めた結果を図4c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^{3,4)}。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/dとされてきたが、今回の物理測定ではその半分の0.5 mSv/dと測定された(図4)。昨年、NASAのCucinottaのグループはファントム(人間

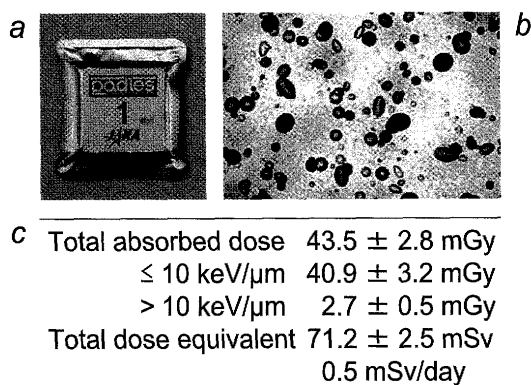


図4. 宇宙放射線物理学的測定装置. a, PADLES package; b, エッチング処理したCR-39. 宇宙放射線の数, 方向性, エネルギーが分かる. c, 物理学的測定結果をまとめたもの. エネルギーを分けて測定した.

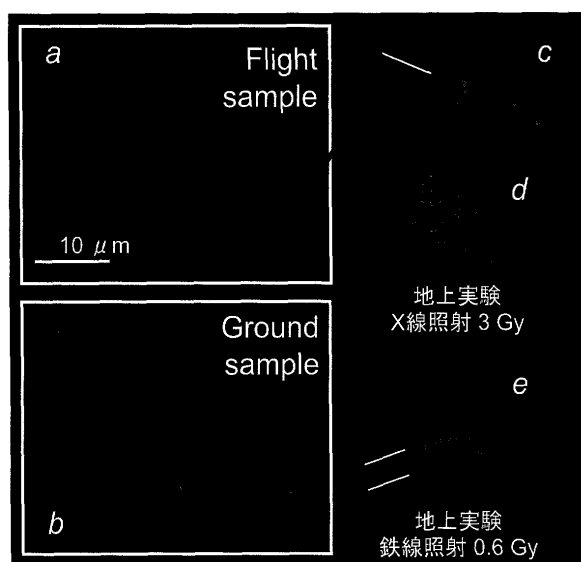


図5. 宇宙放射線のDNA損傷の傷跡. DSBを γ H2AXで緑に染色, 核はDAPIで青に染色. a, 飛行サンプル; b, 地上コントロール; c, aの拡大図; d, 3 GyのX線照射; e, 0.6 Gyの鉄粒子線照射. cとeの白線は重粒子線の方向性を示す.

の模型)での宇宙放射線量測定の結果, 今回の著者らの結果とまったく同様に0.5 mSv/dであったと報告している⁵⁾.

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に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. すでに著者らは, 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 γ H2AXの抗体で染色し, 可視化することに成功していた⁶⁾. この技術を宇宙空間で, 133日間に及ぶ長期間凍結状態で

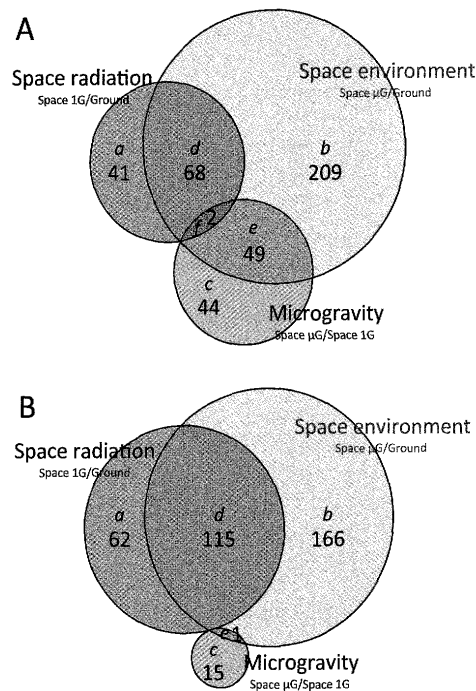


図6. 宇宙で培養された細胞でのp53依存性形質発現. A, 誘導される遺伝子群; B, 抑制される遺伝子群.

保存していた宇宙飛行サンプルの細胞核の中に, 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5)²⁾. 地上コントロールとしてJAXAの冷凍庫で保存されていたサンプル(図5b)にはほとんど γ H2AX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ほとんどの細胞でそのフォーカスは観察されなかった(図5a). 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5a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5d)が, 0.6 Gyの鉄粒子では高LET放射線なので直線的に核内を貫いている(図5e). 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ていた.

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/μm,

特 集

表1. 宇宙飛行後のp53依存性発現誘導遺伝子

No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio
1	HSPA6	10.56	14	THC2766373	2.59	27	HSP90AB1	2.29	40	CXCL9	2.10
2	IL7R	4.60	15	A_24_P585660	2.57	28	ENST00000390258	2.26	41	ENST00000360548	2.09
3	HSPA1A	4.02	16	ASPH	2.55	29	TNFSF10	2.24	42	AK023645	2.08
4	SYT4	3.46	17	A_24_P560332	2.54	30	HSP90AB3P	2.21	43	CEBPA	2.08
5	LOC730211	3.20	18	SLC24A3	2.53	31	FAM90A1	2.21	44	IL18BP	2.08
6	LOC85391	3.17	19	A_24_P631625	2.44	32	UCN2	2.21	45	POPI	2.06
7	FAM90A9	3.04	20	SCEL	2.41	33	ST8SLA2	2.19	46	AI015919	2.05
8	HSP90AA1	2.96	21	AK090827	2.38	34	KIAA0319L	2.16	47	CLGN	2.05
9	KCNQ1	2.95	22	ZNF205	2.36	35	THC2563387	2.16	48	THC2543840	2.03
10	LATS2	2.92	23	ENST00000378770	2.34	36	MUM1	2.16	49	KCNG4	2.02
11	LOC727891	2.81	24	XAF1	2.34	37	BC036435	2.15	50	GPR171	2.00
12	EDN1	2.80	25	PTPRE	2.29	38	LAMP3	2.14			
13	CSF2	2.72	26	CXCL11	2.29	39	AF007192	2.14			

500 MeV/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5c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5e)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、このトラックをもたらず閾値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。今回の著者ら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なされたことは画期的な大発見であった²⁾。これまでは、著者ら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、それは固定された死細胞で、生細胞ではなかった⁸⁾。

DNAアレイとプロテインアレイを用いた形質発現動態 形質発現、特にmRNA合成を測定するのに、最近では頻りにDNAアレイが用いられている。mRNAを抽出後、逆転写酵素でDNAにしてから、ヒトゲノムの1本鎖DNAアレイに広げたものである。発現量が高ければより強く発光することを利用している。

1) 飛行中凍結細胞を地上で解凍し、培養した細胞でp53依存性形質発現誘導された遺伝子群 133日間凍結状態で宇宙飛行したヒト細胞を、帰還後6時間培養した後、RNAを抽出した(図6)。著者らはこの手法を用いて、遺伝子発現量を測定した(表1, 表2)(投稿中)。

正常型p53細胞で合成されたmRNAから変異型p53細胞で合成されたmRNAを差し引いた、すなわちp53依存性に形質発現誘導される遺伝子群を解析した。正常型p53細胞での発現量から変異型p53細胞での発現量を差し引いたもののうち、2倍以上の発現誘導された50の遺伝子を表1にリストした。一方、正常型p53細胞での発現量から変異型p53細胞での発現量を差し引いたもののうち、半分以下に発現が抑えられた94の遺伝子を表2にリストした。これらリストされた遺伝子数はDNAアレイにのっていた41,000種の遺伝子のうち、0.35%の頻度を示した。

この実験において、凍結状態で宇宙飛行しているため微小重力や打ち上げおよび帰還時の加重力の影響は無視することができ、133日間の宇宙飛行時に被曝した71.2 mSvの宇宙放射線の影響のみが遺伝子発現変化に影響しているものと考えられる。

著者らはすでにラットを宇宙飛行させると、p53が筋肉・皮膚に蓄積することを報告してきた^{9,10)}。地上研究でp53を中心としたシグナル伝達が放射線・紫外線・温熱・低温・酸化ストレス・低pHで誘導されることも分かっている¹⁾。p53はアポトーシス、細胞周期停止、DNA修復促進などにはたらいて、遺伝子の不安定さ、すなわち染色体異常、突然変異さらにはがん化などを抑えることにつながる¹¹⁾。p53が遺伝子の守護神と呼ばれる由縁

表2. 宇宙飛行後のp53依存性発現抑制遺伝子

No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio	No	Gene symbol	Ratio
1	<i>TMPRSS6</i>	0.12	25	<i>GRIN2C</i>	0.34	49	<i>MTTP</i>	0.40	73	<i>ACP2</i>	0.47
2	<i>AF234262</i>	0.13	26	<i>OR2B6</i>	0.34	50	<i>MAOA</i>	0.40	74	<i>RREB1</i>	0.47
3	<i>RP4-621015.2</i>	0.13	27	<i>LOC126536</i>	0.34	51	<i>BX116163</i>	0.40	75	<i>A_32_P38806</i>	0.48
4	<i>FGFR2</i>	0.18	28	<i>TLX2</i>	0.34	52	<i>ASGR1</i>	0.41	76	<i>IFT80</i>	0.48
5	<i>DNASE1</i>	0.19	29	<i>CD44</i>	0.34	53	<i>AK123107</i>	0.41	77	<i>XRN1</i>	0.48
6	<i>THC2669878</i>	0.20	30	<i>H2AFB2</i>	0.34	54	<i>A_24_P932220</i>	0.41	78	<i>THC2742226</i>	0.48
7	<i>IRX6</i>	0.20	31	<i>A_32_P71171</i>	0.35	55	<i>PRKCZ</i>	0.42	79	<i>STC2</i>	0.48
8	<i>LOC338328</i>	0.21	32	<i>GDF15</i>	0.35	56	<i>AK022339</i>	0.42	80	<i>ENST00000372493</i>	0.49
9	<i>GALNACT-2</i>	0.22	33	<i>HSPX1</i>	0.35	57	<i>THC2617584</i>	0.43	81	<i>THC2733296</i>	0.49
10	<i>AF217970</i>	0.22	34	<i>THC2649341</i>	0.36	58	<i>AOC3</i>	0.43	82	<i>LOC647500</i>	0.49
11	<i>BX100437</i>	0.22	35	<i>BI913527</i>	0.36	59	<i>MYO5B</i>	0.43	83	<i>BBC3</i>	0.49
12	<i>CES7</i>	0.24	36	<i>AVIL</i>	0.36	60	<i>SEC61A2</i>	0.43	84	<i>BC042026</i>	0.49
13	<i>KLHDC8B</i>	0.25	37	<i>LOC497190</i>	0.36	61	<i>CHAC1</i>	0.44	85	<i>LOC55565</i>	0.49
14	<i>FUT1</i>	0.27	38	<i>CBLN3</i>	0.37	62	<i>HAMP</i>	0.44	86	<i>ICAM3</i>	0.49
15	<i>ADMR</i>	0.28	39	<i>AF283771</i>	0.38	63	<i>BE835321</i>	0.45	87	<i>BC021677</i>	0.49
16	<i>THC2717023</i>	0.28	40	<i>THC2520867</i>	0.38	64	<i>C10orf38</i>	0.45	88	<i>C10orf10</i>	0.49
17	<i>PRKCQ</i>	0.28	41	<i>AF318328</i>	0.38	65	<i>MGC4655</i>	0.45	89	<i>ZNF66</i>	0.49
18	<i>SH2D3C</i>	0.29	42	<i>DDIT3</i>	0.38	66	<i>LOC402573</i>	0.45	90	<i>MBD2</i>	0.49
19	<i>TRIM7</i>	0.29	43	<i>ZDHC11</i>	0.38	67	<i>IGHD</i>	0.46	91	<i>TAGLN</i>	0.50
20	<i>TNFAIP2</i>	0.29	44	<i>GRB10</i>	0.39	68	<i>TSC22D3</i>	0.46	92	<i>SESN2</i>	0.50
21	<i>C9orf167</i>	0.30	45	<i>CYP2E1</i>	0.39	69	<i>KIAA1324L</i>	0.47	93	<i>MTF1</i>	0.50
22	<i>SLFNLI</i>	0.32	46	<i>BE716310</i>	0.39	70	<i>TNFRSF17</i>	0.47	94	<i>TTYH2</i>	0.50
23	<i>INHBE</i>	0.32	47	<i>TXLNB</i>	0.39	71	<i>THC2550463</i>	0.47			
24	<i>CB250445</i>	0.32	48	<i>A_23_P158868</i>	0.40	72	<i>DYNLRB2</i>	0.47			

である。p53は遺伝子上流に結合して形質発現を調節する。それらの遺伝子群をp53関連遺伝子と呼んでいる。p53を中心としたシグナルトランスダクションは細胞をがん化から守ろうとしているので、宇宙環境でのp53量の蓄積は大いに興味を持たれてきた。このプロジェクトの採択理由でもあった。それにはアポトーシス関連遺伝子 [*AIF* (apoptosis inducing-factor), *Apaf1* (apoptosis protease activator protein-1), *Bax* (Bcl-2 associated x protein), *DR4* (death receptor 4), *DR5* (death receptor 5), *PERP* (p53 apoptosis effector related to PMP-22), *PIDD* (TP53-induced death-domain-containing protein), *PUMA* (p53-up-regulated modulator of apoptosis), *p53DINP1* (p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1)], 細胞周期調節関連遺伝子群 [*Cdkn1a* (formerly known as *Waf1*), *cyclin D*, *cyclin G*, *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10), *RB* (retino- blastoma gene product), *14-3-3 sigma*], DNA修復関連遺伝子群 [*Msh2* (mismatch repair protein MutS homolog 2), *p53R2* (p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit)], p53調節遺伝子 [*Hdm2* (human homolog of Mdm2)] などが含まれている。今回の遺伝子発現変化で見える限り、p53

およびこれらのp53関連遺伝子群に関しては誘導も抑制もされていなかった。まだ機能はよくわかっていないが、p53依存性に宇宙放射線に反応するものが今回リストされたものと考えられる。実際、上記の遺伝子群とは別にヒートショックタンパク質 (HSPs) の *HSPA6*, *HSPA1A*, *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *HSP90AB3P* がp53依存性に発現誘導していた (表1)。著者らは宇宙飛行した金魚の筋肉・皮膚・脾臓でHSP70の蓄積を観察している¹²⁾。また、ヒトの宇宙飛行した白血球でHSP27の遺伝子が減少していたことが報告されている¹³⁾。HSPはシャペロン機能によって、タンパク質の守護神としてはたらいっていることが知られている¹⁴⁾。最近、HSPの発現が正常型p53による転写調節されていることも報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。また、*CD44*がp53依存性に発現抑制していた (表2)。最近、*CD44*の遺伝子発現が正常型p53によって抑制されていること¹⁸⁾、さらに、興味深いことに、宇宙飛行したマウスの骨髄細胞で抑制されていたことが報告されている¹⁹⁾。

2) 宇宙空間で培養した細胞でp53依存性形質発現誘導された遺伝子群 さらにこの手法を用いて、宇宙空間で8日間培養されたヒト細胞での形質発現量を測定した (図6, 表3)²⁰⁾。

宇宙空間で培養されるまで97日間の凍結状態で被曝

特 集

表3. 宇宙で培養された細胞での*p53*依存性タンパク質発現

<i>p53</i> 依存性	Gene symbol	Value	Sample comparison	Cause
発現誘導タンパク質	MeCP2	1.85	Space 1G /Ground	Space radiation
	Notch1	1.63	Space μ G /Ground	Space environment
発現抑制タンパク質	DR4	0.66	Space 1G /Ground	Space radiation
	PRMT	0.63		
	ROCK-2	0.64		
	ROCK-2	0.59	Space μ G /Ground	Space environment
	TGF- β	0.63	Space μ G /Space 1G	Microgravity
	TWEAKR	0.55		
	Phospho-Pyk2	0.49		
14-3-3 θ/τ	0.42			

した宇宙放射線量は約52 mSv, 8日間の培養期間で被曝した宇宙放射線量は約4 mSvである。打ち上げおよび帰還時は凍結状態のため, 加重力の影響は無視できる。正常型*p53*細胞で合成されたmRNAから変異型*p53*細胞で合成されたmRNAを差し引き, *p53*依存性の形質発現変化する遺伝子群を解析した。実に, 750遺伝子以上の発現変動遺伝子がリストされた。このDNAアレイにのった41,000種の遺伝子のうち, 約2%の頻度を示した。

正常型*p53*細胞での発現量から変異型*p53*細胞での発現量を差し引いたもののうち, 2倍以上の発現誘導されたものを図6Aにリストした。一方, 正常型*p53*細胞での発現量から変異型*p53*細胞での発現量を差し引いたもののうち, 半分以下に発現が抑えられたものを図5Bにリストした。細胞培養は宇宙では1Gと μ Gの2か所であり, 地上培養群とを比較することによって, 宇宙放射線のみで誘導または抑制した遺伝子群を図5のa, 微小重力のみで誘導または抑制される遺伝子群をc, 微小重力と宇宙放射線を同時に含んだ環境で誘導または抑制される遺伝子群をbとした。図6ではそれらにまたがる遺伝子群をd, e, fと示した。特にbは宇宙放射線と微小重力の相乗効果があることを意味するものである。

これまで, 宇宙環境では放射線影響が微小重力で相乗的に誘導される事象が報告されてきた^{21,22)}。一方, 抑制する報告もあった²³⁾。相乗効果が認められない生物影響の報告も多かった²⁴⁻²⁷⁾。一体, 本当はどれなのか, 多くの科学的興味を引いていた。宇宙飛行士の健康管理にとっても, 放射線影響が微小重力で相乗的かどうかは大きな問題である。今回の著者らの実験結果は生物影響の結末である細胞死, 突然変異誘発, 染色体異常誘発, 姉妹染色体交換などではなく, 遺伝子レベルでの研究で

あった。宇宙放射線による遺伝子発現影響に微小重力が相乗的に影響した遺伝子群 (図6Ab) は実に209遺伝子もあったし, 相乗的に抑制した遺伝子群 (図6Bb) は166あったことが分かった。このことが, 生物影響に直接現れるのか否かは不明であるが遺伝子の形質発現レベルでは歴年の課題に大きな答えを出せたと信じている。

今回の遺伝子発現で見える限り, *p53*およびこれらの*p53*関連遺伝子群に関しては誘導または抑制されてはいなかった。ただし, 上記の遺伝子群とは別に, 最近報告された*p53*依存性誘導遺伝子群の*ALDH4* (aldehyde dehydrogenase 4)²⁸⁾, *BTG3* (B-cell translocation gene 3)²⁹⁾, *FEN1* (flap endonuclease 1)³⁰⁾, *PRG3* (*p53*-responsive gene 3)³¹⁾は宇宙放射線, 宇宙環境で誘導されていた。*SOD2* (superoxide dismutase 2)³²⁾は宇宙放射線で誘導されていた。また, *PIG3* (*p53*-induced genes 3)³³⁾, *PIG11*³⁴⁾, *HSP70* (heat shock protein 70)¹⁵⁻¹⁷⁾は宇宙環境で誘導されていた。

宇宙飛行中凍結していた細胞と, 宇宙空間で培養した細胞の間で宇宙放射線によって遺伝子発現が変化する遺伝子は4つのみ共通であった。これらは未知の*AF217970*, *TNFAIP2* (TNF α -induced protein 2), *CBLN3* (cerebellin 3 precursor), *ZDHHC11* (zinc finger, DHC domain containing 11)で*p53*との関連についてもよくわかっていない。このように共通性の少なさは被曝総線量, 宇宙空間で培養されたことによるDNA損傷修復や細胞周期の影響によるものと考えられた。今回リストされたものは, 新規の*p53*依存性な遺伝子や*p53*を中心としたシグナル伝達に関与する因子であり, 今後の研究の発展が期待される。

3) 宇宙空間で培養した細胞で*p53*依存性形質発現誘導されたタンパク質群 著者らは同様に、タンパク質を抽出後、642種類のヒトの抗体が載ったプロテインアレイに広げ、発現量が高ければより強く発光することを利用した手法を用いて、宇宙空間で8日間培養されたヒト細胞でのタンパク質の発現量を測定した(表3)(投稿中)。

正常型*p53*細胞で合成されたタンパク質から変異型*p53*細胞で合成されたタンパク質を差し引いた、すなわち*p53*依存性の形質発現誘導される遺伝子群を解析した。正常型*p53*細胞での発現量から変異型*p53*細胞での発現量を差し引いたもののうち、1.5倍以上に発現誘導したものは2種類のタンパク質がリストされた。*p53*依存性に宇宙放射線に反応してMeCP2 (mutations in methyl DNA binding protein 2)が、宇宙環境に反応してNotch1が発現誘導した。一方、正常型*p53*細胞での発現量から変異型*p53*細胞での発現量を差し引いたもののうち、0.66倍以下に発現が抑えられたものは7種類のタンパク質がリストされた。*p53*依存性に宇宙放射線に反応して発現抑制したのはDR4 (death receptor 4), PRMT1 (protein arginine methyltransferase 1)とROCK-2 (Rho-kinase)であった。このうち、ROCK-2は宇宙環境でも発現抑制した。*p53*依存性に微小重力に反応して発現抑制したのはTGF- β (transforming growth factor- β), TWEAKR (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor), phosh-Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2)と14-3-3 θ/τ であった。今回、プロテインアレイにのっていた約80の*p53*関連タンパク質に関して、遺伝子発現変化と同様に、大きく発現変化したものはリストされなかった。むしろ、DR4³⁵⁾, TGF- β ³⁶⁾, 14-3-3³⁷⁾のようにDNA損傷によって発現誘導することが知られているものが、今回は*p53*依存性に発現抑制されていた(表3)。まだ機能はよくわかっていなくても、*p53*依存性に応答するものが今回リストされたものと考えられる。実際、ROCK-2が減少することで*p53*依存性にNotch1遺伝子の発現が誘導することが報告されており^{38,39)}、今回の著者らの結果とも非常によく一致していたことは興味深い。今後の研究でこれらリストされたものの機能解明が望まれる。

著者らは宇宙飛行した細胞からゲノムの守護神である*p53*およびタンパク質の守護神であるHSPの蓄積を認めることはできなかった。これまでの動物での報告と異なる結果となった主な原因として、細胞培養系と個体との

違いが考えられた。動物では宇宙放射線や微小重力の影響以外にも打ち上げや帰還時の加重力、狭い飼育環境での心理的ストレスなどが複合的に影響していたのかもしれない。

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⁴⁰⁾。

あらかじめの放射線被曝の線量にはある特定の線量域(window)である20-100 mSvのみしか存在せず、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、著者ら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⁴¹⁻⁴⁴⁾。そこで、著者ら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7, 図8)⁴⁵⁾。

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8aとb)。その後46時間培養して細胞数を比較した。地上コントロール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8a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8a)。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8b)。

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。地上コントロール群では変異型*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8c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8c)。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8d)。

特集

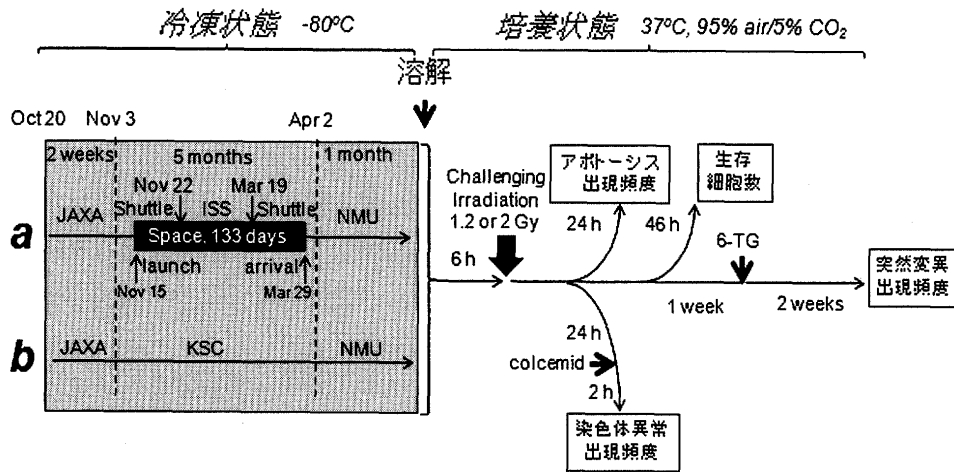


図7. 宇宙飛行細胞の放射線適応応答. a, 宇宙飛行サンプル; b, コントロールサンプル.

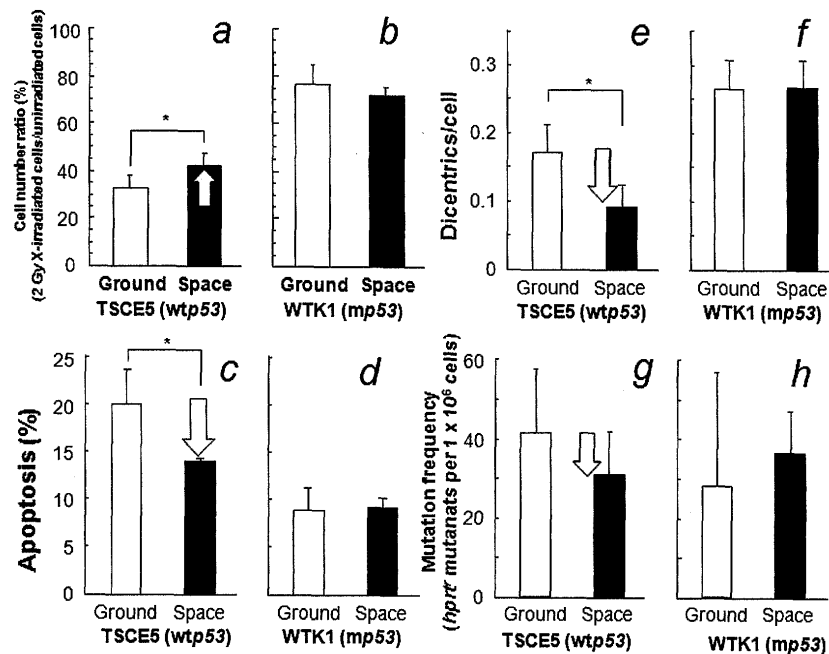


図8. 放射線適応応答. aとb, 生存細胞数; cとd, アポトーシス出現頻度; eとf, 染色体異常出現頻度; gとh, 突然変異誘発頻度. a, c, e, g, 正常型の $p53$ 遺伝子細胞; b, d, f, h, 変異型の $p53$ 遺伝子細胞. 図中の矢印は放射線適応応答が見られたことを示す.

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8eとf). 地上コントロール群では変異型 $p53$ 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 $p53$ 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、染色体異常出現頻度が低くなった(図8e). 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8f).

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 $hprt^R$ への変異で調

べた(図8g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に比べて突然変異誘発頻度が低くなった(図8g). 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8h).

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. 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. 実に見事に放射線適応応答の window の中に入っていた.

結 論

今回著者らは宇宙放射線を被曝する宇宙飛行士の健康のために, 宇宙放射線の生物影響研究を行った. 将来, 宇宙への人類の進出は一部の宇宙飛行士のみでなく, 多くの一般人にも宇宙飛行の可能性が開けていくであろう. また, 人類は月へ, さらに火星へと進出していくことであろう. 月表面では地球のように宇宙放射線に保護されておらず, 多種多量の宇宙放射線を被曝することになる. また, 火星探査へは約1年から1.5年間もその往復に時間を要する. これまでの著者らの研究成果からも約1.5 Sv もの宇宙放射線を被曝することになると想定されている. 地上でX線を一度に被曝するとすべてのヒトの白血球数の減少が見られる線量である. 宇宙放射線の防御研究が必要となるであろう.

今回の宇宙実験のすべてを完璧に行うことができた. 宇宙実験申請の採用が2000年であり, 実にフライトまでに8年間もの歳月を要した. 実はこの8年間に著者らの研究室の地上研究が飛躍的に進歩したこと, 千葉の放射線医学総合研究所に重粒子線照射施設が共同利用研究として, 広く研究テーマを受け入れてくれたことが大きな成果を生む最大の要因であった. 世界に先駆けてその施設の重粒子線による遺伝子損傷の可視化研究に著者らが成功していたことも, 今回の生物学的線量測定に応用できた. また, 当初からの目的の形質発現研究もすべてが成功した. 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. 実は著者らの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⁴¹⁻⁴³⁾. 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.

この研究の成果は文部科学省の科学研究費の援助および電力中央研究所のプロジェクト研究の共同研究として行われた. さらに, 日本宇宙フォーラムからの地上研究費およびJAXAからの

ワーキンググループに対する援助で進められた. 宇宙飛行士 Sandra H. Magnus 博士の完璧な実験に, JAXA, AES および JAMSS の運用要員諸君の訓練された的確な作業に心より感謝申し上げます.

文 献

- 1) Ohnishi, T. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **23**, 3 (2009).
- 2) Ohnishi, T. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 485 (2009).
- 3) Doke, T. *et al.*: *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, **A365**, 524 (1995).
- 4) Hayashi, T. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **11**, 355 (1996).
- 5) Cucinotta, F. A. *et al.*: *Radiat. Res.*, **170**, 127 (2008).
- 6) Takahashi, A. *et al.*: *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **49**, 645 (2008).
- 7) Goodhead, D. T.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **65**, 7 (1994).
- 8) Ohnishi, T. *et al.*: *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **43**, S133 (2001).
- 9) Ohnishi, T. *et al.*: *J. Appl. Physiol.*, **81**, 183 (1996).
- 10) Ohnishi, T. *et al.*: *Mutat. Res.*, **430**, 271 (1999).
- 11) Lane, D.: *Nature*, **358**, 15 (1992).
- 12) Ohnishi, T. *et al.*: *Adv. Space Res.*, **21**, 1077 (1998).
- 13) Cubano, L. A. and Lewis, M. L.: *J. Leukoc. Biol.*, **69**, 755 (2001).
- 14) Nollen, E. A. and Morimoto, R. I.: *J. Cell Sci.*, **115**, 2809 (2002).
- 15) Espinosa, J. M. and Emerson, B. M.: *Mol. Cell*, **8**, 57 (2001).
- 16) Barlev, N. A. *et al.*: *Mol. Cell*, **8**, 1243 (2001).
- 17) Xu, D. *et al.*: *EMBO Rep.*, **9**, 662 (2008).
- 18) Godar, S. *et al.*: *Cell*, **134**, 62 (2008).
- 19) Ortega, M. T. *et al.*: *J. Appl. Phys.*, **106**, 548 (2009).
- 20) Takahashi, A. *et al.*: *Int. J. Radiat. Biol.* (in press)
- 21) Bückner, H. *et al.*: *Naturwissenschaften*, **73**, 433 (1986).
- 22) Ikenaga, M. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **11**, 346 (1997).
- 23) Kobayashi, Y. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **10**, 97 (1996).
- 24) Ohnishi, T. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **11**, 29 (1997).
- 25) Takahashi, A. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **11**, 81 (1997).
- 26) Horneck, G. *et al.*: *Radiat. Res.*, **147**, 376 (1997).
- 27) Takahashi, A. *et al.*: *Int. J. Radiat. Biol.*, **76**, 783 (2000).
- 28) Yoon, K. A. *et al.*: *J. Hum. Genet.*, **49**, 134 (2004).
- 29) Ou, Y. H. *et al.*: *EMBO J.*, **26**, 3968 (2007).
- 30) Christmann, M. *et al.*: *Oncogene*, **24**, 8304 (2005).
- 31) Ohiro, Y. *et al.*: *FEBS Lett.*, **524**, 163 (2002).
- 32) Hussain, S. P. *et al.*: *Cancer Res.*, **64**, 2350 (2004).
- 33) Dhar, S. K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **281**, 21698 (2006).
- 34) Polyak, K. *et al.*: *Nature*, **389**, 300 (1997).
- 35) Guan, B. *et al.*: *J. Cell Physiol.*, **188**, 98 (2001).
- 36) Fujiwara, T. *et al.*: *Int. J. Cancer*, **56**, 834 (1994).
- 37) Hermeking, H. *et al.*: *Mol. Cell*, **1**, 3 (1997).
- 38) Yugawa, T. *et al.*: *Mol Cell Biol.*, **27**, 3732 (2007).
- 39) Lefort, K. *et al.*: *Genes Dev.*, **21**, 562 (2007).
- 40) Olivieri, G. *et al.*: *Science*, **223**, 594 (1984).
- 41) Takahashi, A.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **77**, 215 (2001).
- 42) Matsumoto, H. *et al.*: *Cancer Res.*, **67**, 8574 (2007).
- 43) Takahashi, A. *et al.*: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **71**, 550 (2008).
- 44) Takahashi, A. *et al.*: *Adv. Space Res.*, **18**, 127 (2009).
- 45) Takahashi, A. *et al.*: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (in press)